

과제
번호

11-1543

000-003

010-01

나
노
플
루
이
드
3D
플
랫
폼
을
이
용
한
조
류
인
플
루
엔
자
바
이
러
스
진
단
시
스
템
개
발

최
종
보
고
서

2019

농
림
식
품
기
술
기
획
평
가
농
림
축
산
식
품
부

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

가축질병대응기술개발사업 제3차 연도 최종 보고서

11-1543000-003010-01

(건고딕31p)

나노플루이드 3D 플랫폼 (Nanofluidic 3D platform)을 이용한 현장용 조류인플루엔자바이러스 진단시스템 개발 최종보고서

2019.11.

(건고딕15p)

(별색바탕 : C50, M20, Y59, K0)

주관연구기관 / 충남대학교
협동연구기관 / 포항공과대학

(건고딕 15.5p)

농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

(건고딕 20p)

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "나노플루이드 3D 플랫폼(Nanofluidic 3D platform)을 이용한
현장용 조류인플루엔자바이러스 진단시스템 개발"(개발기간 : 2016. 11. ~
2019. 11.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 11. 20.

주관연구기관명 : 충남대학교 (대표자) 이영석
협동연구기관명 : 포항공과대학교 (대표자) 김상우
참여기관명 : ㈜씨맥 (대표자) 박종택

주관연구책임자 : 신현진
협동연구책임자 : 이정수
참여기관책임자 : 박종택

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116167-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2016. 11. 29 - 2019. 11. 28 (36개월)	단 계 구 분	(해당단계)/개발 (총 단 계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	나노플루이드 3D 플랫폼(Nanofluidic 3D platform)을 이용한 현장용 조류인플루엔자바이러스 진단시스템 개발			
	세부 과제명				
연구책임자	신현진	해당단계 참여연구원 수	총: 41명 내부: 27 명 외부: 14 명	해당단계 연구개발비	정부:288,000천원 민간:98,000천원 계: 386,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 19명 내부: 10 명 외부: 9 명	총 연구개발비	정부:652,000천원 민간:222,000천원 계: 874,000천원
연구기관명 및 소속부서명	충남대학교 산학협력단			참여기업명 (주)씨맥	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

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>	<p>본 연구는 조류인플루엔자 및 고병원성인플루엔자 바이러스의 조기 진단을 위한 축산업자용 실시간 고속 현장 진단 키트를 개발하여 조기 진단 및 방역을 가능케 함으로써 조류인플루엔자 바이러스의 2차 확산을 효과적으로 억제하고 축산 농가의 피해를 최소화 하는데 그 목표가 있다.</p>				
<p>연구개발성과</p>	<p>본 연구진들은 이 과제의 목적에 맞춰 조류인플루엔자 바이러스의 조기 진단을 위한 축산업자용 실시간 고속 현장 진단 키트를 개발하여 조기 진단 및 방역을 가능케 함으로써 조류인플루엔자 바이러스의 2차 확산을 효과적으로 억제하고 축산 농가의 피해를 최소화 하는데 그 목표가 있다. 종이 및 BioFET 기반 센서 플랫폼 제작 기술 개발을 성공적으로 완료하였으며, 조류인플루엔자 바이러스 육안 식별이 가능한 실시간/ 고속 현장 진단용 디지털 분석 기술 개발 완료, 전자칩 및 3차원 유로 내 유속 및 물질 전달 조절 기술 개발 완료, 조류 인플루엔자 바이러스 진단을 위한 최적의 항원 및 항체 발현시스템 구축 및 진단용 mAb 개발 완료, 항원-항체 반응을 테스트할 수 있는 BioFET 기반 센서 플랫폼 확립 및 제작, 그리고 이를 기반으로 한 조류 인플루엔자 바이러스 감지 시험을 완료하여 과제 목표에 맞는 현장용 조류인플루엔자 바이러스의 조기 진단 시스템 개발을 완료 하였다.</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>본 연구진들이 개발한 BioFET 기반 센서 플랫폼 제작 기술 개발을 통한 조류인플루엔자 바이러스의 조기 진단 시스템 특히나 현장용 진단 시스템의 완료로 단순한 양성/음성 판정 뿐 아니라 이를 정량화 할 수 있는 시스템의 개발이 완료 되었다. 또한 항원을 이용한 항체 검사/ 항체를 이용한 항원 검사 등도 가능한 시스템의 개발로 아직까지 매년 철새 도래로 인한 자연 재해의 일종인 현장용 조류인플루엔자 바이러스의 조기 진단 시스템의 활용으로 조류인플루엔자 바이러스 감염을 초기에 진단을 실시하여 방역 시스템 확보에 기여 할 것으로 판단되며, 이를 상용화 제품화에 노력하여 경제적 이익 창출을 마련할 뿐 아니라 농가 피해에 도움을 주고자 한다.</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>조류인플루엔자</p>	<p>조기 진단</p>	<p>실시간 고속 현장 진단</p>	<p>BioFET 기반 센서 플랫폼 확립</p>	<p>방역</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Avian Influenza</p>	<p>early detection</p>	<p>POCT</p>	<p>BioFET sensor platform</p>	<p>Quarantine</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 9
2. 연구수행 내용 및 결과 12
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 63
4. 연구결과의 활용 계획 등 66
붙임. 참고 문헌

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

<뒷면지>

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술 개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

본 연구는 조류인플루엔자 및 고병원성인플루엔자 바이러스의 조기 진단을 위한 축산업자용 실시간 고속 현장 진단 키트를 개발하여 조기 진단 및 방역을 가능케 함으로써 조류인플루엔자 바이러스의 2차 확산을 효과적으로 억제하고 축산 농가의 피해를 최소화 하는데 그 목표가 있다.

1-2. 연구개발의 필요성

본 연구과제는 조류인플루엔자를 현장에서 신속하고 간단하게 진단이 가능한 키트를 개발하는 것이 최종목표이다. 잘 알려져 있다시피 조류인플루엔자는 한 번 발병을 시작하면 그 전파속도가 매우 빠르고 축산농가에 엄청난 경제적 피해를 유발할 뿐만 아니라 사람에게도 전염될 수 있는 가능성이 있어 매우 위험한 병원체이다. 현재 조류인플루엔자 바이러스에 대한 다양한 백신이 개발되어 사용되어지고 있는데 대표적으로는 중앙백신의 “포울샷 플루+ 엔디“, 코미팜의 ”프로백 에이이케이, 녹십자의 “플루엔디 H9N2) 그리고 대성미생물연구소의 ”대성 AI(H9N2) 오일 치큰백 등이 있다. 하지만 모두 저병원성 인플루엔자 바이러스 예방 백신이기 때문에 고병원성 인플루엔자 바이러스를 효과적으로 예방하는 데는 한계가 있어 백신접종을 실시함에도 불구하고 매해마다 발병률이 현저히 줄어들지는 않는 경향을 보이고 있다. 이와 같은 이유로 농가 현장에서 간단한 방법을 통한 신속한 진단과 방역대책의 수립이 가능해진다면 조류인플루엔자 바이러스로 인한 피해를 최소화 할 수 있다. 본 연구진은 저렴하고 사용이 간편하며 신속하게 조류인플루엔자 바이러스 감염을 진단할 수 있는 키트를 개발로 축산 농가의 경제적 손실 최소화와 안전한 먹거리 확보라는 커다란 공중보건학적, 사회적 요구에 부응하는 결과를 도출하고자 한다.

지금까지 많이 사용되어져왔던 조류인플루엔자 바이러스 진단법으로는 바이러스를 분리하여 증식시킨 후 면역학적 방법이나 분자생물학적 방법으로 진단하거나, 검체에서 바이러스 유전자를 분리한 후 증폭시키는 방법 등이 있다. 하지만 이러한 방법들은 진단까지 소요되는 시간이 적게는 6시간에서 길게는 5일까지 소요되고 검사단계가 복잡하며 숙련된 전문검사인력들이 필요하다. 더욱이 현장에서는 진단할 수 없고 실험실에서 진행이 되어야 하는데 고병원성 조류인플루엔자를 다룰 수 있는 실험실이 매우 제한적이며 고가의 장비 또한 필요한 단점이 있다.

실리콘 나노그물 FET 바이오센서는 이러한 단점들을 보완하며, 우수한 센서 특성을 가진다. 다른 플랫폼에 비해 우수한 민감도와 실시간, 비표지 감지의 이점으로 빠른 감지 시간을 갖는 플랫폼의 개발로 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 성공적 방역 및 확산 방지가 가능하게 된다. 또한 나노그물 표면에 검출 표적 물질에 따른 다양한 수용체를 도입함에 따라서 본 연구의 주 표적인 고병원성 조류 조류인플루엔자 외에도 바이오센서, 화학센서, 및 메디컬소자 등으로 시장 및 기술의 적용범위에 있어 다양한 확장성을 가진다. 그리고 현재 또는 향후에도 급성장할 Smart healthcare 산업에 있어서 기술적 우위에 있는 ICT기술의 융합을 통해 IoT분야의 활용가능성 또한 높일 수 있다. 특히 IoT와 접목될 경우 신종플루, MERS등과 같은 전염성 질병에 대하여 환자 이동경로 확인 및 격리 환자 모니터링과 같은 역학조사에 활용이 용이하여 방역당국의 전염확산 관리 등에 큰 도움을 줄 것으로 기대된다.

이와 같은 장점들이 기존의 진단 방법 및 진단 키트와의 차별성을 가지며 효과적으로 조류인플루엔자 바이러스를 조기 진단함으로써 질병 확산을 막고 나아가 농가의 피해를 최소화 할 수 있을 것으로 기대된다.

1-3. 연구개발 범위

조류인플루엔자 바이러스의 조기 진단을 위한 실시간 현장형 진단 기술 개발을 위한 연구의 세부 범위는 다음과 같다.

1. BioFET 기반 센서 플랫폼 제작 기술 개발
2. 육안 식별이 가능한 실시간/ 고속 현장 진단용 디지털 분석 기술 개발
3. 3차원 유로 내 유속 및 물질 전달 조절 기술 개발
4. 조류 인플루엔자 바이러스 최적의 항원발현시스템 구축
5. 항원-항체 반응을 테스트할 수 있는 BioFET 기반 센서 플랫폼 확립 및 제작, 그리고 이를 기반으로 한 조류 인플루엔자 바이러스 감지 시험

			코드번호	C-03-02	
구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	
1차년도 (2017)	조류인플루엔자 바이러스 진단을 위한 조류인플루엔자 바이러스 항원 확보	조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 항원단백질 확보	조류인플루엔자바이러스 시스템을 이용한 항원단백질 발현	조류인플루엔자바이러스(H5N9) 진단을 위한 다양한 벡터 시스템 중 eukaryotic system 벡터를 이용한 항원단백질 발현	
			조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 발현 단백질 정제 및 반응성 검사	eukaryotic system 벡터를 이용한 조류인플루엔자 M1 단백질 발현 및 정제	
			조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 발현 단백질 정제 및 반응성 검사	Westernblot을 통한 발현 단백질의 반응성 검사 확인	
	종이 기반 3차원 미세 유체 플랫폼 제작 기술 개발	항원-항체반응을 테스트할 수 있는 3차원 종이 진단 키트 플랫폼 확립	유체역학 원리를 이용한 종이 기반 3차원 미세 유체 플랫폼 설계	3차원 미세유체 플랫폼 설계 완료 (유로 폭 3mm, 높이: 300 μm를 가지는 유체 흐름 확인 함)	
			인쇄 공정 및 후 처리 공정 기술을 이용한 3차원 유로 형성 기술	종이 300 μm 두께 내에서 3차원 유체 유로 형성 완료	
			유속 및 물질 전달 조절용 3차원 유로망 설계 및 형성 기술	50 mm 이상 단백질 이동이 가능한 3차원 유로 형성 완료	
			항원-항체반응 detection이 가능한 3D 기술 확립	유로 내에서 항원-항체 반응을 비색 분석법으로 확인	
	제품화 검증 및 대량 생산 체제 구축 준비	3차원 종이칩 유로형성용 인쇄공정 및 가열장비를 통해 대량 생산을 위한 설계 및 유로 형성 기술 확립	유로형성용 인쇄, 라미네이팅 최적화 가열장비 조건 확립 및 대량생산을 위한 제작 및 개선 방안	인쇄 공정과 가열장비를 활용하여 종이칩 디자인 작업 및 반응 영향인자 파악	
	2차 년도 (2018)	조류인플루엔자 바이러스 진단을 위한	조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 항원단백질 확보	조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 다양한 벡터 시스템을 이용한 항원단	조류인플루엔자바이러스(H5N9) 진단을 위한 다양한 벡터 시스템 중

조류인플루엔자 바이러스 항원 확보	항원을 이용한 항체 생산	백질 발현	eukaryotic system 벡터를 이용한 항원단백질 발현	
		조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 발현 단백질 정제 및 반응성 검사	eukaryotic system 벡터를 이용한 조류인플루엔자 M1 단백질 발현 및 정제	
		조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 발현 단백질 정제 및 반응성 검사	Westernblot을 통한 발현 단백질의 반응성 검사 확인	
	반도체 기반 조류인플루엔자바이러스 디지털 진단 기술 (실시간)	바이러스 진단을 위한 BioFET 플랫폼 제작 기술 개발	BioFET 설계 및 제작 공정 기술 확보	각 단위 공정 개발 및 wafer(lot) 단위의 소자 전체 공정 완료
			제작된 BioFET의 전기적 특성 분석	제작된 소자의 I-V 전달 특성 확보
제품화 검증 및 대량 생산 체제 구축 준비	3차원 종이칩 유로형성용 인쇄공정 및 가열장비를 통해 대량 생산을 위한 설계 및 유로 형성 기술 확립	유로형성용 인쇄, 라미네이팅 최적화 가열장비 조건 확립 및 대량생산을 위한 제작 및 개선 방안	인쇄 공정과 가열장비를 활용하여 종이칩 디자인 작업 및 반응 영향인자 파악	

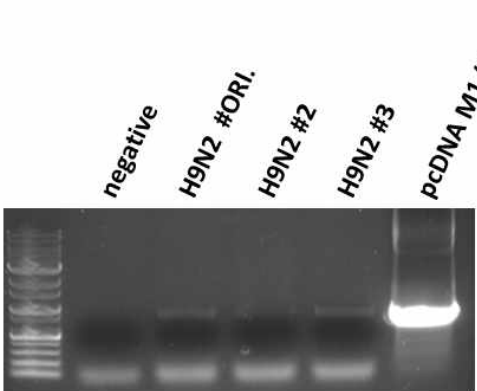
구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
3차년도 (2019)	조류인플루엔자 바이러스 진단을 위한 조류인플루엔자 바이러스 항원 확보	조류인플루엔자 바이러스 진단을 위한 항원단백질 확보	조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 다양한 벡터 시스템을 이용한 항원단백질 발현	조류인플루엔자바이러스 (H5N9) 진단을 위한 다양한 벡터 시스템 중 eukaryotic system 벡터를 이용한 항원단백질 발현
			조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 발현 단백질 정제 및 반응성 검사	eukaryotic system 벡터를 이용한 조류인플루엔자 M1 단백질 발현 및 정제
			조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 발현 단백질 정제 및 반응성 검사	Westernblot을 통한 발현 단백질의 반응성 검사 확인
	반도체 기반 조류인플루엔자 바이러스 디지털 진단 기술 (실시간)	BioFET 플랫폼 기반 조류인플루엔자 바이러스 감지 시험	BioFET 제작 양산 공정 기술 확보	양산 공정 설계 및 제작된 소자의 I-V 전달 특성 확보
주관연구기관에 의해 선별된 인플루엔자 바이러스를 BioFET를 이용하여 감지			인플루엔자 항원-항체 반응 확인	
		반도체 기반 조류인플루엔자 바이러스 디지털 진단	BioFET 플랫폼 기반 조류 인플루엔자 바이러스	

		기술 (실시간)	감지 시험
		주관연구기관에 의해 선별된 인플루엔자 바이러스를 BioFET를 이용하여 감지	인플루엔자 항원-항체 반응 확인
제품화 검증 및 대량 생산 체제 구축 준비	3차원 종이칩 유로형성용 인쇄공정 및 가열장비를 통해 대량 생산을 위한 설계 및 유로 형성 기술 확립	유로형성용 인쇄, 라미네이팅 최적화 가열장비 조건 확립 및 대량생산을 위한 제작 및 개선 방안	인쇄 공정과 가열장비를 활용하여 종이칩 디자인 작업 및 반응 영향인자 파악

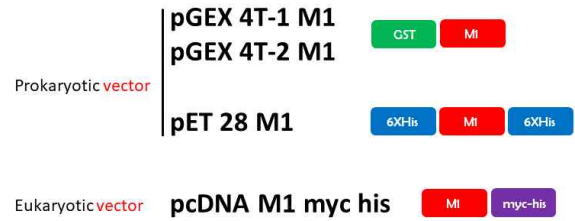
2. 연구수행 내용 및 결과

2-1 연구범위 및 연구수행 방법

가. 1차년도

		코드번호	C-04
연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용	
조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 다양한 벡터 시스템을 이용한 항원단백질 발현	양계농장에서의 조류인플루엔자 바이러스에 대한 백신을 하지 않는 근거로 항체를 이용한 항원 진단법이 현실적으로 중요	<p>- 조류인플루엔자의 다양한 혈청형을 공통으로 진단할 수 있는 공통 진단용 항체의 개발이 매우 중요함. 이제까지의 논문이나 학술적 근거에 입각하여 HA나 NA 단백질은 혈청형을 결정짓는 중요 항원이긴 하지만 진단용으로 AI 감염의 존재 여부를 판단할 수 있는 공통 항원으로 M1 단백질의 중요성이 부각되는바 이 공통항원인 M1 단백질의 발현을 위해 노력함. 이를 위하여 M1 단백질 유전자를 PCR을 이용하여 증폭하고 (756bp)</p>  <p>H9N2 M1 : 756bp</p>	

이 유전자를 다양한 벡터 (Prokaryotic, eukaryotic vector)에 클로닝 하였다.



클로닝된 유전자 분석을 위하여 유전자 sequencing을 통하여 유전자 확정을 하였다.

```

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

sequence1  All in one M1 #3
sequence2  HSN2 M1

sequence1  CGSACCTTTTAAATAAGGGGGGATTTGGGCCCCTAGATGCAATGCTCGAGGGGCGCCAGT
sequence2  -----

sequence1  GTGATGGAATATCTGCAGAAATTOGCCCTTGGCTAGAAATGAGTCTTCTAAACCGAGGTGAAA
sequence2  -----ATGAGTCTTCTAAACCGAGGTGAAA
*****

sequence1  ACGTADGTTCCTCTATCATCCCTTCAGGGCCCTCAAAAGCCGAGATTTGGCCAGAGACTT
sequence2  -----AAGCCGAGATTTGGCCAGAGACTT
*****

sequence1  GAAGATGATTTTCCAGGGAGAACACAGACTCTCGAGGCTCTCATGGATGGCTAAAGACA
sequence2  -----
*****

sequence1  AAGCAATCCCTGTCACTCTGACTAAGGGGATTTTGGGGTTTTGGTTTTGGTTCAAGCTCAACCCG
sequence2  -----AAGCAATCCCTGTCACTCTGACTAAGGGGATTTTGGGGTTTTGGGGTTTTGGTTCAAGCTCAACCCG
*****

sequence1  CCCCAGTGAAGGAGGACTGCAAGCTTGAAGCTTTTGTCCAAAATGGCCCTAAATGGTAAAGGGA
sequence2  -----CCCAAGTGAAGGAGGACTGCAAGCTTGAAGCTTTTGTCCAAAATGGCCCTAAATGGTAAAGGGA
*****

sequence1  GACCCAAACAACTTSCACAGGGCAGTCAAGCTGTACAGGAACTGAAAGAGAAATAACA
sequence2  -----
*****

sequence1  TTCCATGGAGCTAAGGAGGTAGCACTTAGCTACTCAACCGGTGCACTTGGCAGCTGCATG
sequence2  -----TTCCATGGAGCTAAGGAGGTAGCACTTAGCTACTCAACCGGTGCACTTGGCAGCTGCATG
*****

sequence1  GGTCCTCATATACAAACAGGATGGGAAAGGTAACTACAGAAATGGCTTTTGGCCAGTGTGT
sequence2  -----GGTCCTCATATACAAACAGGATGGGAAAGGTAACTACAGAAATGGCTTTTGGCCAGTGTGT
*****

sequence1  GGCAGCTTGTGAGCAGATTTGCTGACTCAGCAGCTGGTCTCAGCAGCAGATGGTGACTACT
sequence2  -----
*****

sequence1  ACCAATCCACTAATCAGGCAATGAAAACAGAAATGGTGTGGCCAGCACCAGGCTAAAGCT
sequence2  -----ACCAATCCACTAATCAGGCAATGAAAACAGAAATGGTGTGGCCAGCACCAGGCTAAAGCT
*****

sequence1  ATGGAAACAGATGGCTGGAATCAAGTGAACAAGGGGCGGAGGCCATGGAGTTGCTAGTCAAG
sequence2  -----ATGGAAACAGATGGCTGGAATCAAGTGAACAAGGGGCGGAGGCCATGGAGTTGCTAGTCAAG
*****

sequence1  GGTAGGACAGATGGTACAGGCAATGAGAACAAATGGGACTCATCTAGCTCCAGTCCCGGT
sequence2  -----GGTAGGACAGATGGTACAGGCAATGAGAACAAATGGGACTCATCTAGCTCCAGTCCCGGT
*****

sequence1  CTGAAAATGATCTCTTGAATAATTTCCAGGCTACCAAGAACGGATGGGAGTGCAAAATG
sequence2  -----CTGAAAATGATCTCTTGAATAATTTCCAGGCTACCAAGAACGGATGGGAGTGCAAAATG
*****

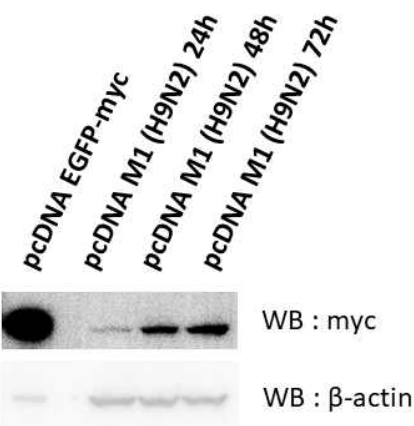
sequence1  CAAGSATTCAAG-----
sequence2  -----

sequence1  ATC CGA GCT CCG TAC CAA GCT TGG GGT AAT CAT GGT CAT AGC TGT TTC CTG TGT GAA ATT
sequence2  -----

```

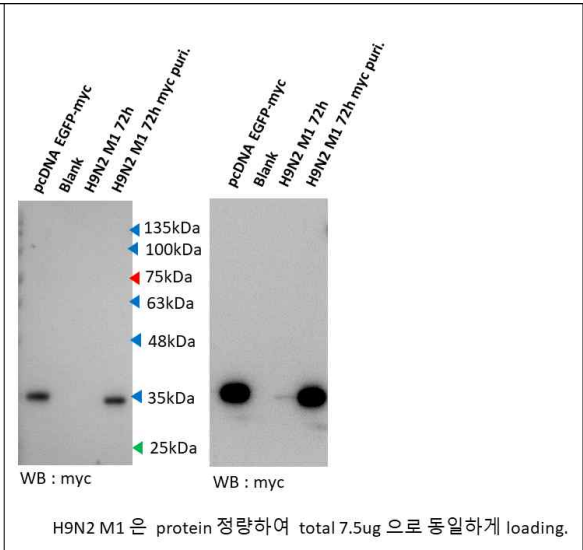
확정된 유전자를 다양한 벡터에서 발현 하여 이를 정제하였다.

그 중 하나의 결과로 pcDNA에 클로닝하여 발현한 M1 단백질을 분석한 결과이다.

		 <p>이렇게 발현된 M1 유전자는 크기가 30kDa으로 예상하고 있던 사이즈와 일치하여 M1 단백질의 발현을 확정 할 수 있었다. 이렇게 발현된 M1 단백질은 293T 세포에서 발현하였으며 6well plate에서의 transfection을 통하여 얻은 결과이며, 상대적인 정량을 위하여 위에서 언급한 M1 단백질의 정량을 분석한 결과 약 40ug/ml 정도의 발현양을 나타내었다.</p>
<p>조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 발현 단백질 정제 및 반응성 검사</p>	<p>진단용 항체 생산을 위한 항원 조류인플루엔자 진단용 공통항원 발현 및 정제</p>	<p>이렇게 발현된 (prokaryotic, eukaryotic system 이용) M1 단백질의 항체 생산을 위한 항원을 준비하기 위하여 purification kit를 이용하여 단백질 발현을 실시하였다. 발현 단백질 정제 kit는 각각의 vector에 추가로 본 연구진들이 삽입한 다양한 tagging protein을 위하여 각각에 맞는 purification kit를 이용한 정제를 실시 하였고 그 중 myc purification kit를 이용한 결과만 보고 하면 다음과 같다.</p> <p>정제하기 전의 발현양과 정제 후에도 발현 양에 큰 차이를 보이지 않을 정도로 정제 과정이 잘 진행되었음을 증명하는 결과이다. 발현된 단백질과 정제 후 단백질을 정제후 동량을 SDS-PAGE 및 western blot 을 통하여 증명한 결과이다.</p>

조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 발현 단백질 정제 및 반응성 검사

발현정제된 단백질의 실제 반응성 검사를 통한 확인



조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 발현 단백질 정제 및 반응성 검사

발현정제된 단백질의 실제 반응성 검사를 통한 확인

발현 및 정제된 단백질을 chicken에 injection 하여 항체 생산을 실시하였다. 충남대학교 실험동물사에 병아리를 세 그룹으로 나누어 (negative control, Virus injection, M1 단백질 group)으로 분류하여 각각의 group에 5마리의 병아리를 분리하여 위치한 후 각각의 항원을 injection 하였다.



첫 항원 injection 2주 후 boosting을 실시하였다.

유체역학 원리를 이용한 종이 기반 3차원 미세

1. 이론적 접근 방법 :
- 3차원 유로 형성을 위한 왁스

- Wn이 1.0mm인 선을 인쇄한 후 라미네이터를 사용하여 140°C에서 0.08~0.40초 동안 열처리한 후 왁스패턴이 형성된 구간

유체 플랫폼 설계

스의 용융 점도와 기공성 매질 내 왁스의 유속과의 상관 관계 해석을 기반으로 함.

- 종이에서 가열에 의해 녹은 왁스는 모세관에서의 유체의 흐름과 유사한 양상을 나타내므로 왁스패턴의 가열 후 높이는 모세관에서의 유체의 흐름에 의한 Washburn equation을 따름.

$$L^2 = \frac{\gamma Dt}{4\eta}$$

(L : 퍼짐 거리, t : 시간, η : 점도)

- 점도는 온도에 반비례하므로 상기 식으로부터 왁스패턴의 가열 후 높이는 시간과 가열온도에 비례함을 예상함.

- 왁스의 가열온도가 높아질수록 가열높이를 만족시킬 수 있는 가열시간은 짧아지며, 가열온도가 낮을수록 열처리에 소요되는 시간은 길어짐.

- 이를 바탕으로 3차원 유로 플랫폼 설계함.

2. 실험적 접근 방법 :

- 용융점 이상이 온도에서 왁스의 거동 현상 실험하여 이를 바탕으로 설계함.

- 왁스 패턴의 설계넓이에 변화함에 따라 가열높이는 초반에는 빠르게 증가하며, 임계넓이 이상에서는 설계넓이와 무관하게 가열높이가 일정한 것을 확인하는 실험 진행함.

- 따라서 안정한 조건에서 미세 유체장비를 제작할 수 있도록 하기 위해서는 상기 패턴의 설

에서 평균 Hh을 측정하였다. 도 2의 (B)는 가열 시간에 따른 왁스패턴의 높이의 변화를 확인함 (그림 1).

- 기공성 매질 내 왁스의 가열 높이는 시간과 가열온도에 비례함을 확인함.

- 가열장비는 일정한 가열온도와 가열시간을 제공할 수 있는 장비 즉, 라미미네이터를 사용하여 가열롤러와 가열온도와 가동속도를 제공하는 것에 열처리시간을 정밀하게 제어할 수 있을 것으로 예상함.

- 종이에 인쇄될 왁스패턴을 적절히 선택하고, 설계넓이와 가열시간, 가열온도를 적절히 조절하는 것에 의해 적절한 위치에 벽과, 상부유로, 하부유로를 형성되도록 하는 것에 의해 3차원 미세유체장비를 제작할 수 있음을 확인함.

- 벽과 상부유로, 하부유로를 형성할 수 있는 조건 확립 및 이를 바탕으로 3차원 유로 형성 조건을 포함하여 설계함 (그림 2).

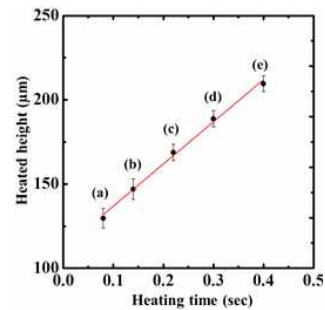


그림 1. 기공성 매질 내에서 가열 시간에 따른 왁스의 가열 높이

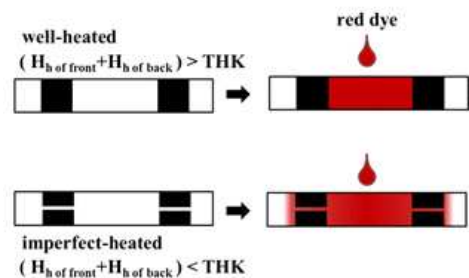


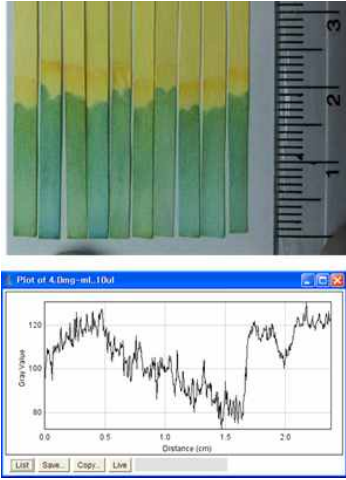



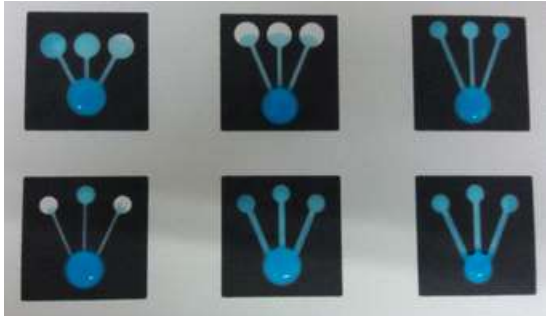


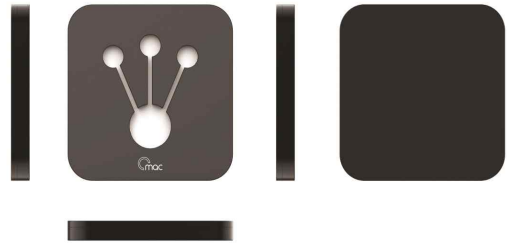
그림 2. 3차원 유로 형성 조건 설계

	<p>계넓이는 상기 임계넓이 이상인 것을 확인하는 실험을 진행함.</p>	
<p>인쇄 공정 및 후 처리 공정 기술을 이용한 3차원 유로 형성 기술</p>	<p>1. 이론적 접근 방법 :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 기공성 매질 내 유체 거동 현상 해석을 기반으로 3차원 유로 형성 조건을 기반으로 형성 기술 확립함. - 벽 : $H_{hf} + H_{hb} \geq THK$ - 상부유로 : $H_{hb} < THK$ - 하부유로 : $H_{hf} < THK$ - THK : 종이 두께 - H_{hf} (Hh of front sheet) : 가열 후 전면의 왁스패턴의 높이 - H_{hb} (Hh of back sheet) : 가열 후 후면의 왁스패턴의 높이 - 유체의 3차원 거동이 가능한 3차원 종이기반 미세유체장비를 위한 설계함. <p>2. 실험적 접근 방법 :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 상기 사전실험의 결과, 설계 넓이 0.8mm 이상, 가열온도 140℃, 가열시간 0.3초를 미세유체장비 제작에 최적의 조건으로 설정하고 3차원 미세유체장비를 제작함. - 앞서 설계한 미세유로를 종이의 앞면과 뒷면에 각각 패턴이 대향되도록 양면인쇄를 통하여 왁스패턴을 인쇄하였다. 이후 라미네이터를 통해 140℃에서 0.3초간 열처리함. - 저점도 액체를 주입하여 3차원 유로내 3차원 유체 흐름을 확인함. 	<ul style="list-style-type: none"> - 패턴을 왁스 프린트한 후 가열(열처리)하면, 왁스가 녹으면서 종이로 스며들게 되어 처음 인쇄되었을 당시의 높이(H_p)보다 가열 후의 높이(H_h)가 높아짐. - 종이의 전면에 인쇄된 왁스 패턴과 후면에 인쇄된 왁스 패턴은 양면인쇄 당시의 조건의 차이나 열처리 조건의 차이에 의해 가열 후의 높이에 다소 차이가 있을 수 있으므로, 가열 후 전면 왁스패턴의 높이와 가열 후 후면 왁스패턴의 높이를 각각 H_{hf}, H_{hb}로 정의한다. 왁스패턴의 가열에 의해 종이에 깊게 스며들면서 양면에 모두 왁스패턴이 인쇄된 영역에서 $H_{hf} + H_{hb} \geq THK$ (가열 후 종이의 두께)인 조건에서 전면에서 침투한 왁스와 후면에서 침투한 왁스가 서로 만나 왁스 벽을 형성함. - 이 때, $H_{hb} < THK$이고 $H_{hf} < THK$의 조건이 동시에 만족된다면, 후면에만 왁스패턴이 형성된 영역에는 상부유로가 상면에만 왁스패턴이 형성된 영역에는 하부유로가 생성되므로 종래기술과 같이 복잡한 공정을 거치지 않더라도 한 장의 종이만을 사용하여 3차원 종이기반 미세유체장비를 제작할 수 있음. - 종이 300 μm 두께 내에서 3차원 유로 형성하고 저점도 액체를 주입하여 3차원 유로내 3차원 유체 흐름을 확인함. <div data-bbox="853 1456 1444 1568" style="text-align: center;">  </div> <p style="text-align: center;">그림 3. 3차원 유로 내 3차원 유체 흐름</p>
<p>유속 및 물질 전달 조절용 3차원 유로망 설계 및</p>	<p>1. 이론적 접근 방법 :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 3차원 유로 내 유속과 물질 전달 현상 해석함. 	<ul style="list-style-type: none"> - 3차원 유로의 형태를 변형하여 아래 그림과 같이 유속 및 물질 전달 조절이 가능한 3차원 유로망 형성 기술 확립함 (그림

<p>형성 기술</p>	<p>2. 실험적 접근 방법 :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 유로 내에 0.1M citric acid monohydrate와 0.1M sodium citrate tribasic dehydrate를 82:18의 부피비로 혼합하여 만든 pH 3.0의 citrate 완충액 (CBS) 37μl를 흡수시키고 상온에서 1시간 동안 건조하였음. -이후 Tetrabromophenol Blue (TBPB)를 52.2%(v/v) 에탄올에 0.866mg/ml의 농도로 용해시켜 제조한 용액 37μl를 흡수시키고 다시 상온에서 1시간 동안 건조하고 단백질 샘플을 흘려서 단백질의 이동 거리 측정함. - 이를 통하여 유속과 물질 전달 상호 관계 분석함. 	<p>4.).</p> <ul style="list-style-type: none"> - 유속에 따른 단백질 이동거리를 측정하여 유속과 물질 전달 상호 관계 분석함 (그림 5.).  <p>그림 4, 유속 및 물질 전달 조절이 가능한 3차원 유로망</p>  <p>그림 5 기공성 매질 내 물질 전달 현상 분석</p>
<p>항원-항체 반응 detection이 가능한 3D 기술 확립</p>	<p>1. 이론적 접근 방법 :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 항원-항체 반응 시간과 다중 유체 유속 상호 관계 분석함. <p>2. 실험적 접근 방법 :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 항원, 항체를 담지한 유체를 서로 만나게 하여 항원-항체 반응 유도함. 	<ul style="list-style-type: none"> -유로 내에서 항원-항체 반응을 비색 분석 방법으로 확인함.  <p>그림 6. 3차원 유로내 항원-항체 반응</p>
<p>사업화 전략 방향성 도출 및 제품화를 위한 중이칩 설계 및 시</p>	<p>사업화 전략방향성 도출</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 1단계 기술개발단계 : 세부과제별 진행된 3차원 유로 기반 조류인플루엔자 질병 분석 기술 및 다중 유로 설계 기술을 통한 검증 및 제품화 단계로 3차원 다중 유로 형성용

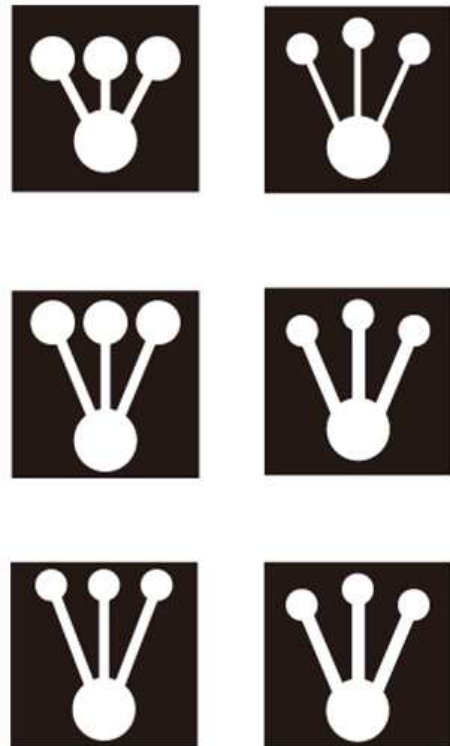
<p>제품 제작</p>		<p>인쇄, 가열장비 제작 및 개선</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2단계 기술개발 및 사업화 준비단계 : 미세유체기반 종이칩 개발 기술 확보 및 종이칩 대량생산을 위한 시제품 생산 및 제품 생산라인 설계 및 제품 신뢰성 검증 - 3단계 사업화 완료 단계 : 사업화를 위한 전문 인력 채용 및 판매망 구축을 통해 제품 사업화 및 정부 조달 사업을 위한 B2G 시장 진입
	<p>제품화 가능성, 사업성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 세부과제별 연구과제를 통해 습득된 기술을 통해 자체 생산 및 종이칩 설계 기술 확립을 위한 설계 및 테스트 <div style="text-align: center;">    </div>

시제품 모형제작



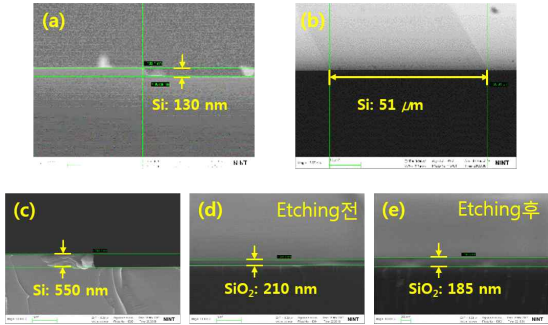
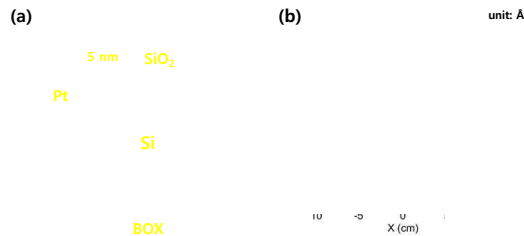
다양한 디자인을 통한 상품제작 평가

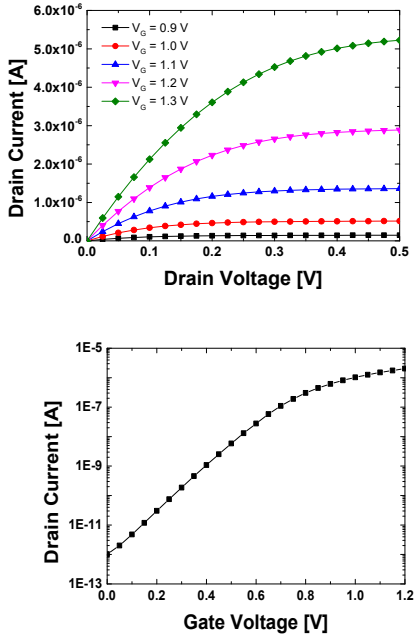
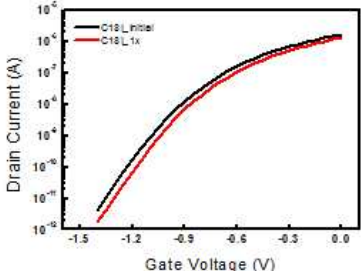
- 유로, 주입부, 검출부에 따른 주입 시료의 이송 및 반응기작 확인을 위한 다양한 설계 인자 검증

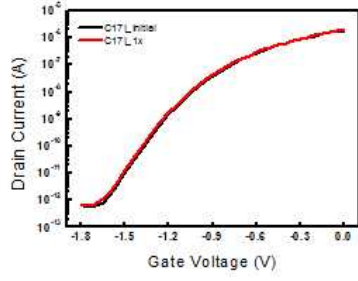
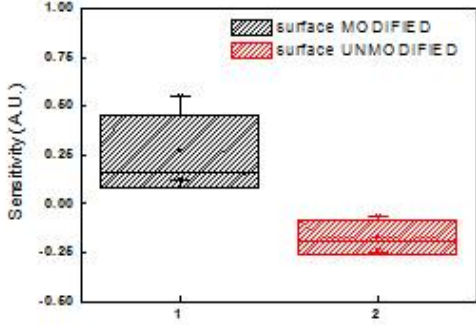


나. 2차년도

		코드번호	C-04
연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용	
BioFET 설계 및 제작 공정 기술 확보	BioFET의 시작 재료인 SOI wafer에서 최종적으로 소자를 제작하기까지의 전체 공정 과정상의 각 단계에 해당하는 단위 공정 기술을 먼저 개발하고 이 공정 과정을 통해 소자를 제작함.	<p>(1) 주요 공정 Flow</p> <ul style="list-style-type: none"> · 다음과 같은 과정을 포함한 BioFET의 제작 공정 flow를 설계함. - SOI wafer 기판에 source, drain, channel을 포함한 패턴 영역을 건식 식각방식을 이용한 top Si 식각을 통해 형성함; - Photoresistor (PR)를 이용하여 channel 영역을 마스크하고 Implant 공정을 진행하여 source와 drain을 형성함; - E-beam lithography 공정을 통해 channel 영역에 나노그물구조 채널을 형성함 (나노그물구조에서 나노선 너비는 50~500 nm로 자유롭게 조정 가능함); - Furnace를 통해 gate oxide를 위한 thermal SiO₂를 형성함; - E-beam Evaporator를 이용하여 source, drain, 기준전극 영역에 metal(Ag)을 증착하여 전극을 형성함; - Passivation 역할로 PR를 증착하고 미세유체채널을 형성함. <div style="text-align: center;"> <p>① Active Region Formation ② Implantation ③ Nanowire Formation</p> <p>④ Gate-insulator Growth ⑤ Metal Deposition ⑥ Passivation</p> </div> <p>[나노그물구조 바이오 센서 소자 공정과정]</p> <p>(2) 단위 공정 개발 결과</p> <p>1) 건식 식각 공정 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - SOI wafer에서 나노그물 구조 채널을 형성하기 위해서는 기판과 수직 방향으로 Top Si을 식각하여야 함. 건식 식각 공정에서는 식각 마스크 또는 Etch stop layer로 쓰이는 물질과 타겟 물질 간의 식각비를 최대화 하는 것이 중요함. - 식각 테스트용 패턴 수직 깊이를 120 nm 와 너비를 50 μm로 목표 하였을 때, 실제 식각 패턴의 수직 깊이는 130 nm 와 너비는 51 μm 값을 얻었으므로 초과식각 비율은 10% 이하인 건식식각 조건을 개발하였으며, 건식식각에서 Si을 550 nm를 식각했을 때 SiO₂는 25 nm가 식각되었으므로 선택비가 Si/SiO₂ = 22:1인 건식식각 조건을 개발함. 	

		 <p>[건식식각 공정 개발]</p> <p>2) 게이트 절연막 형성 공정 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 나노그물구조 바이오FET센서에서 게이트 절연막 형성 공정은 소자의 전기적 특성에 가장 큰 영향을 미치는 핵심적인 공정으로 소자의 성능 및 안정성에 직접적인 영향을 끼침. 그러므로 게이트 절연막 형성에서 절연막질이 가장 뛰어난 열산화 (thermal oxidation) 방식을 사용함. - 게이트 절연막의 두께는 우수한 게이트 조절능력 (gate controllability)을 가지고 기생 전기용량 성분을 줄이기 위해서 가능한 작게 ~5 nm 열산화 단일 공정 조건을 확보하고, 또 제작된 소자간 전기적 특성의 차이를 줄이고 신뢰성 확보를 위해 8인치 wafer내 균일도가 2% 이하인 열산화 단일 공정 조건을 개발함  <p>[~5nm 게이트 절연막 TEM 사진 단면도; 및 절연막 두께 분포도 (unit: angstrom);]</p>
<p>제작된 BioFET의 전기적 특성 분석</p>	<p>제작된 소자의 I-V 전달 곡선을 얻고, 이로부터 소자의 전기적인 특성을 평가할 수 있는 parameter들 (문턱 전압, SS 등)을 추출하여 제작된 소자의 특성을 평가함.</p>	<p>(1) 측정 방법</p> <ul style="list-style-type: none"> - 0.01x PBS 용액을 측정 buffer solution으로 사용하여 소자 위에 drop하고, 소자의 S/D와 gate 에 전압을 독립적으로 인가함. 드레인과 게이트 전압은 소스 전압을 0 V 로 고정하여 소스를 기준으로 한 상대 전압을 인가하게 됨. - 출력 특성(I_d-V_d) 측정 시에는 드레인 전압(V_d)을 0~1 V 범위에서 50 mV 전압 step으로 sweep하고, 게이트 전압(V_g)은 0.9~1.3 V 범위에서 100 mV 간격의 constant 전압을 인가함. - 전달특성(I_d-V_g) 측정 시에는 게이트 전압(V_g)을 50 mV 간격으로 0 V에서 1.2 V 까 sweep하고, 드레인 전압(V_d)은 100 mV 로 인가됨. <p>(2) 측정결과 및 수치 분석</p>

		 <p>[제작된 바이오FET소자의 (a) I_d-V_d 전기적 특성; (b) I_d-V_g 전기적 특성]</p> <ul style="list-style-type: none"> - V_{th}(threshold Voltage): V_{th}추출 방식은 I_d-V_g 전달 곡선에서 constant I_d 전류 값에서 추출하는 방식을 사용하였고, 본 과제에서는 I_d가 0.1 μA에서 $V_{th} = 0.76 (\pm 0.079)$ V를 가짐. - SS (Subthreshold swing): I_d-V_g 전달 곡선에서 I_d 전류 값이 직선구간을 유지하는 1 nA ~ 10 nA 구간에서 추출하며 값은 142 (± 17.6) mV/dec를 얻음.
<p>주관연구기관에 의해 선별된 항원-항체 반응을 미세유체채널이 결합된 bioFET 상에서 구현</p>	<p>AIV의 항원과 이에 해당하는 항체를 포함한 혈청 샘플을 이용하여 AIV 표적에 대한 BioFET의 센서로서의 feasibility를 시험하였음.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - AIV 항체를 BioFET 소자의 표면에 고정하여 AIV 항원을 감지함. 비교검증을 위해 항체를 고정하지 않은 BioFET의 PEDV 항원에 대한 특성 곡선의 반응을 함께 비교해봄. - 항체를 고정한 소자에서는 AIV 항원을 반응시킨 이후 특성 곡선이 오른쪽으로 이동하였으나, 항체를 고정하지 않은 소자에서는 같은 농도의 AIV 항원과의 반응 이후 특성곡선의 이동이 없음. 

		 <p>[항체 고정된 BioFET 소자(위)와 항체 고정되지 않은 BioFET 소자 (아래)의 AIV 향원에 대한 반응]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 이에 대한 반응을 각 소자마다 추출한 민감도의 평균값으로 비교해보면, 표면처리한 소자들에서 얻어낸 민감도가 그렇지 않은 소자들에서 얻어낸 민감도에 비해 유의미하게 큼을 확인할 수 있음  <p>[항체 고정 여부에 따른 소자의 민감도 비교]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 이후 주관기관에서 AIV 단일클론 항체 또는 새로운 타겟에 대한 항원-항체 조합을 만들어 제시한다면, 이를 적용해 더 정확하고 민감한 센서 플랫폼을 만들 수 있음.
--	--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

다. 3차년도

<p>pcDNA3(-)-myc-His 벡터 및 다양한 eukaryotic 발현 벡터에 확보된 유전자원을 cloning 하여 발현 확인.</p>	<p>AIV의 진단용 항원 및 항체로 이용하기 위한 AI 단백질이며 주요 진단용 항원으로 사용되고 있는 HA, NA, M1 단백질 유전자를 PCR로 증폭하여 이를 cloning 하여 발현 확인.</p>	<p>조류인플루엔자바이러스 혈청형 중 H9N2 strain의 다양한 항원 단백질 유전자 확보 및 이들의 발현을 시도하였다. 그 중 특히나 진단의 목적으로 많이 사용되는 단백질이 다양한 인플루엔자들에 공통적으로 갖고면서 단백질의 유전자 타입에 상당히 상동성을 가진다고 알려져 진단 목적을 많이 사용되는 단백질 이 M1 단백질이다. 이 두 단백질 유전자들을 다양한 발현 벡터에 클로닝하여 이들의 발현에 노력하였다. 다양한 단백질들 중 진단 목적</p>
---------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

으로 사용하기 위하여는 다양한 인플루엔자 혈청형에 공통으로 진단이 가능한 단백질과 혈청형을 구별 할 수 있는 단백질이 가장 중요하다고 판단되어 2차년도에서는 M1 단백질을 공통 항원으로 HA와 NA 단백질을 혈청형 분리 진단용 단백질로 결정하고 이들 단백질의 유전자를 증폭하고 발현 정제하는데 집중 하였다. 다음은 이들 유전자 단백질 유전자의 증폭을 위한 primer 정보 이다.

HA9 primer

H9 F XhoI/EcoRI CCG **CTCGAG GAATTC**GCCACC
ATGGAAATAATAGCACTAATAGC

H9 R BglII GA **AGATCT**
TATACAAATGTTGCATCTGCAAGATCC

NA2 primer

N2 F EcoRI **CG GAATTC GCCACC**
ATGAATCCAAATCAGAAAATAATAAC

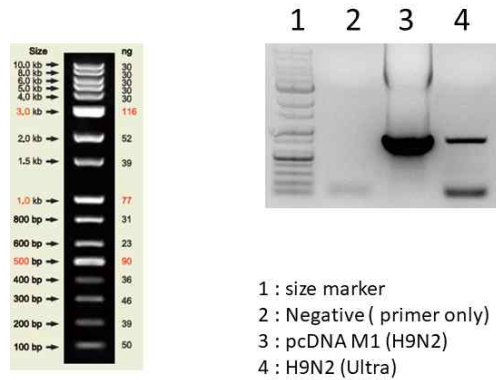
N2 R BglII GA AGATCT
TATAGGCATAAAAATTGATATTAGCCC

M1 primer

BamHI / HindIII M1 F CGC GGATCC AAGCTT
ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAAC

KpnI / EcoRI M1 R CGG GGTACC GAATTC
CTTGAATCGTTGCATTTGCACTCC

AIV의 M1 단백질유전자 증폭



H9N2 M1 756bp

M1 단백질 유전자 증폭한 증명으로, 유정란에서 배양한 H9N2 바이러스 샘플에서의 증폭된 결과와 이 바이러스를 ultracentrifugation을 통하여 분리 정제한 바이러스로부터의 PCR 결과를 비교 검토하였다.

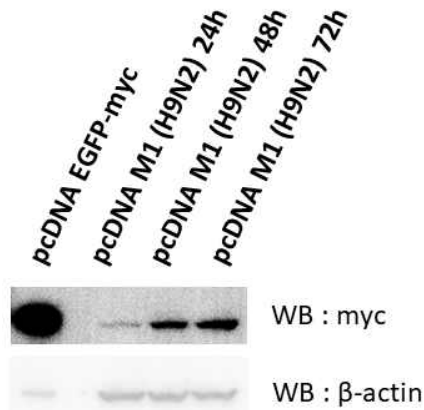
증폭된 유전자를 pcDNA3등 다양한 eukaryotic vector를 이용하여 발현을 시도 하였고, 어떤 벡터에

AIV의 M1 단백질 발현에 대한 결과

발현된 AIV의 M1 단백질의 항원 사용을 위한 purification 결과

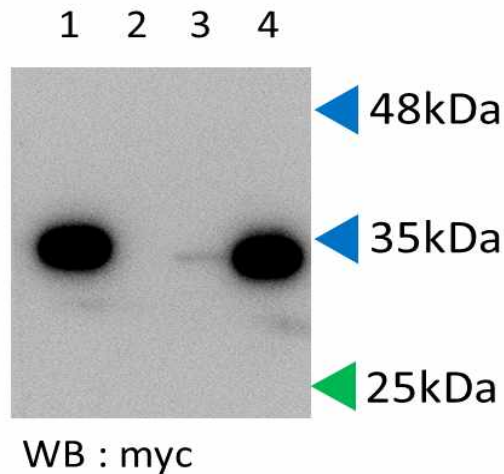
발현된 AIV의 M1 단백질의 purification 결과 재검증

서 이들 인플루엔자바이러스 단백질들이 발현되는지 비교 검토하였다.



이렇게 발현된 M1 유전자는 크기가 30kDa으로 예상하고 있던 사이즈와 일치하여 M1 단백질의 발현을 확정할 수 있었다. 이렇게 발현된 M1 단백질은 293T 세포에서 발현하였으며 6well plate에서의 transfection을 통하여 얻은 결과이며, 상대적인 정량을 위하여 위에서 언급한 M1 단백질의 정량을 분석한 결과 약 40ug/ml 정도의 발현양을 나타내었다.

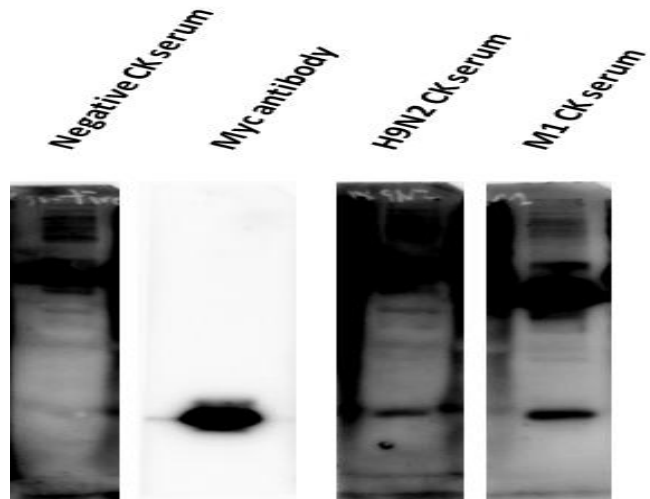
이렇게 발현된 단백질을 진단용 항원으로 사용하기 위하여 단백질들의 발현을 myc purification kit를 사용하여 실시하였다.



위의 그림에서와 같이 발현된 M1 단백질의 발현 정제된 이후의 확인 결과로서 30kDa의 정제된 순수한 M1 단백질을 확보하였다.

이렇게 발현 정제된 단백질의 검증 및 반응성 실험을 위하여 westernblotting 및 혈청과의 반응성 검사를 위하여 ELISA를 실시하였다.

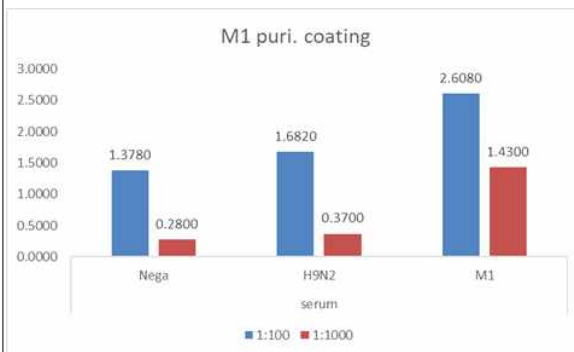
우선 이렇게 발현 정제된 단백질의 검증을 위하여 1차년도에 닭에서 얻은 혈청과의 반응성 검사를 위한 westernblotting 결과이다.



pcDNA3 벡터에서 발현되는 단백질들은 벡터의 구성 상 C'쪽에 myc tagging protein이 달려있어야 하기 때문에 이들 검증을 위하여 myc monoclonal antibody를 구매하여 이들과의 반응성 검사를 실시 하였고 또한 인플루엔자바이러스 및 M1 단백질 접종된 닭혈청과의 반응성 검사를 실시하여 이렇게 발현된 단백질들이 myc antibody 및 닭혈청과 잘 반응함을 검증하였다.

이렇게 발현된 M1 단백질의 진단 항원으로서의 가능성 평가를 위하여 ELISA를 이용한 항체와의 반응성 검사 및 whole virus와의 비교 검토를 실시하였다.

우선 본 연구실에서 만들어지고 발현 정제된 M1 단백질의 항원성 검증을 위한 ELISA 결과는 M1 단백질을 ELISA coating 항원으로 사용하여 ELISA 값을 검증한 결과이다.

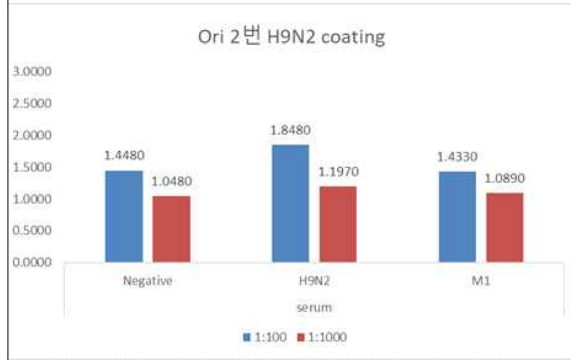


위의 결과는 발현 정제된 M1 단백질을 ELISA

purification된 AIV의 M1 단백질 진단용 항원으로서의 평가

coating하고 H9N2 바이러스를 접종하여 얻은 닭혈청과 M1 단백질을 접종하여 얻은 닭혈청과의 반응성 비교 결과이다.

이것을 다시 순수바이러스 배양후, ultracentrifuge하여 분리 정제한 바이러스를 ELISA coating 항원으로 사용한 후 비교 검토한 결과는 다음과 같다.

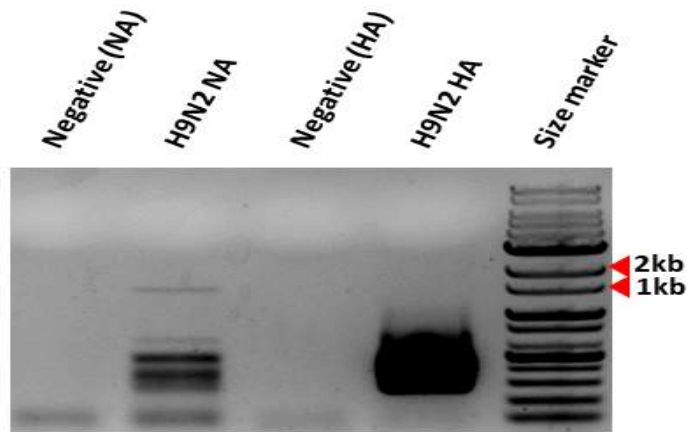


이렇게 본 연구진들이 발견 정제한 M1단백질이 바이러스를 coating 한 것과 비교 했을 때 그리 큰 차이점을 나타내지 않아 하나의 진단 항원으로 사용해도 문제 없을 것이라 판단하고 있으며, 다른 혈청형과의 비교 검증 중이다.

조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 발견 정제된 항원 단백질들에 대한 비교 평가

AIV의 주요 항원이며, 표면 단백질인 NA 단백질 유전자 증폭

위에서 한 방법과 같이 HA와 NA 단백질도 역시나 발견 정제하였다.



NA : 1,407bp
HA : 1,680bp

AIV의 주요 항원이며, 표면 단백질인 NA 단백질 유전자 분석 결과

```

sequence1 우리겟 H9N2 NA
sequence2 비교용 H9N2 NA

sequence1 ATGAAATCCAAATCAGAAAATAATAACAATTGGCTCTGTCTCTCTAACCCATTGCAACAGTA
sequence2 ATGAAATCCAAATCAGAAAATAATAACAATTGGCTCTGTCTCTCTAACCCATTGCAACAGTA
*****

sequence1 TGTTTCTCATTCAGATCGCCATTCTAGCAAGCACTGTAAACACTGCACTTCAAGCAAAAT
sequence2 TGTTTCTCATTCAGATCGCCATTCTAGCAAGCACTGTAAACACTGCACTTCAAGCAAAAT
*****

sequence1 GAATGCAGCATCCDCTCGAGCAACCAAGTAGTGCCATGTGAACCAATCATAATAGAAAGG
sequence2 GAATGCAGCATCCDCTCGAGCAACCAAGTAGTGCCATGTGAACCAATCATAATAGAAAGG
*****

sequence1 AACATAACAGAAAATAGTATATTTGAAATAACTACCATAGAGAAAGAACCTTTGTCTCTAAA
sequence2 AACATAACAGAAAATAGTATATTTGAAATAACTACCATAGAGAAAGAACCTTTGTCTCTAAA
*****

sequence1 GTGGTAGAATACAGGAATTGGTCSAAAACCGCAGTGTGAGATTACAGGGTTTGCTCCTTTC
sequence2 GTGGTAGAATACAGGAATTGGTCSAAAACCGCAGTGTGAGATTACAGGGTTTGCTCCTTTC
*****

sequence1 TCCAAAGCAACTCAATCCGACTTTCTGCTGGTGGGAGCATCTGGGTAAACAAGAGAACCT
sequence2 TCCAAAGCAACTCAATCCGACTTTCTGCTGGTGGGAGCATCTGGGTAAACAAGAGAACCT
*****

sequence1 TATGTGTCTAGCAGCTCCGATAAATGTATCAAAATTTGCATCTGGGCAAGGAACCCAGCTA
sequence2 TATGTGTCTAGCAGCTCCGATAAATGTATCAAAATTTGCATCTGGGCAAGGAACCCAGCTA
*****

sequence1 GACAACAACAACACTCAATGGGACAATACATGATAGGATCCCTCATCGAACCCCTTTTAAATG
sequence2 GACAACAACAACACTCAATGGGACAATACATGATAGGATCCCTCATCGAACCCCTTTTAAATG
*****

sequence1 AACGAGTTGGGTGTCCGTTTCAATTTGGGAACCAACAGGTGTGTATAGCATGCTCCAGC
sequence2 AACGAGTTGGGTGTCCGTTTCAATTTGGGAACCAACAGGTGTGTATAGCATGCTCCAGC
*****

sequence1 TCAAGCTGCCATGATGGGAAAGCATGGTTACATGTTTGTGTCTCTGGGGATGATAGAAAT
sequence2 TCAAGCTGCCATGATGGGAAAGCATGGTTACATGTTTGTGTCTCTGGGGATGATAGAAAT
*****

sequence1 GCAACTGCTAGTTTCAATTTATGATGGAAATGCTTGTGACAGTACTGGAATCATGGTCTCAA
sequence2 GCAACTGCTAGTTTCAATTTATGATGGAAATGCTTGTGACAGTACTGGAATCATGGTCTCAA
*****

sequence1 AATATTTCTCAGAACTCAGGAGTCAGAAATGGGTTTGCATCAATGGAACTGTACAGTAGTA
sequence2 AATATTTCTCAGAACTCAGGAGTCAGAAATGGGTTTGCATCAATGGAACTGTACAGTAGTA
*****

sequence1 ATGACTGATGGAAGTGCAATCAGGAAGAGCTGACACTAGAATACTATTTCATTAAGAGGGGG
sequence2 ATGACTGATGGAAGTGCAATCAGGAAGAGCTGACACTAGAATACTATTTCATTAAGAGGGGG
*****

sequence1 AAAATTTGTCATATTAAGCCATTAATCAGGAAGTCTCAGCATATAGAGGAAATGTTCTTGT
sequence2 AAAATTTGTCATATTAAGCCATTAATCAGGAAGTCTCAGCATATAGAGGAAATGTTCTTGT
*****

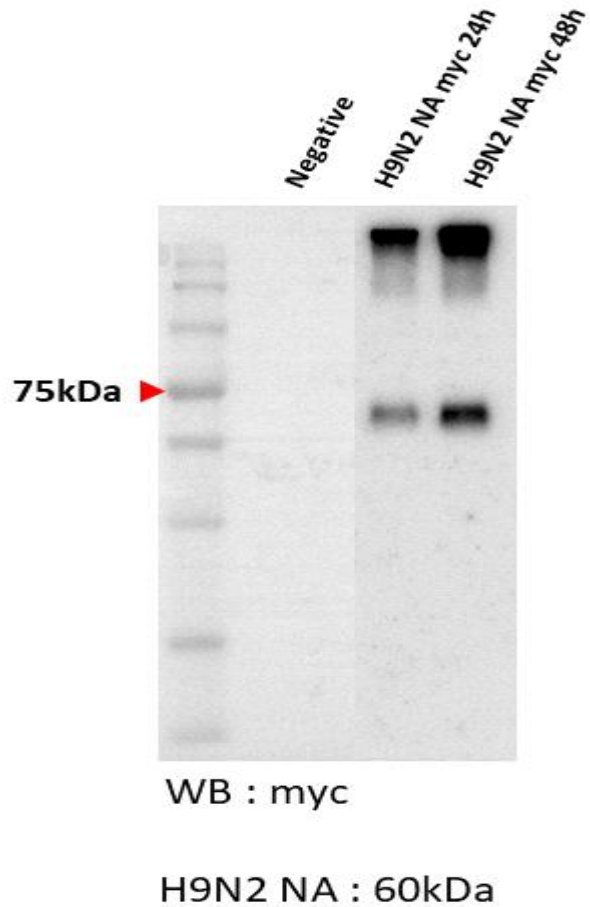
sequence1 TATCCDGGATATCCAGACGTAGATGTGTTTGCAGAGACAATTTGGAAGGGCTCTAATAGG
sequence2 TATCCDGGATATCCAGACGTAGATGTGTTTGCAGAGACAATTTGGAAGGGCTCTAATAGG
*****

sequence1 CCGATTATAAATATAAATATGGCGGATCATAGCAATGATTCACAGTATATGTGTGCTCGGGA
sequence2 CCGATTATAAATATAAATATGGCGGATCATAGCAATGATTCACAGTATATGTGTGCTCGGGA
*****

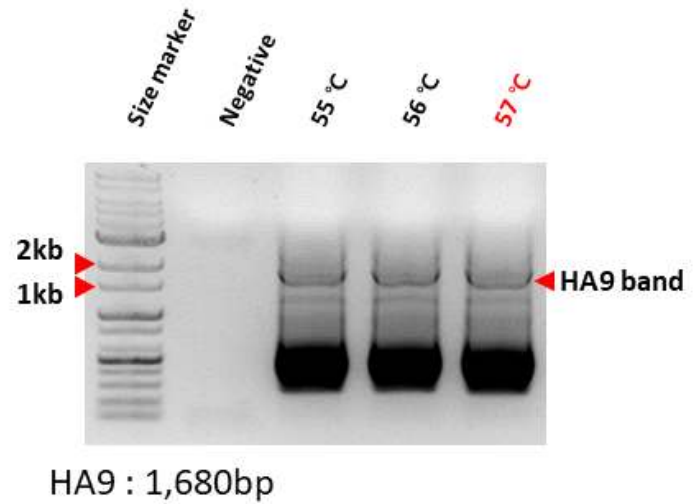
sequence1 CTTGTTGGGCAACACCAAGGAATGATGATGGCTCTAGCAACAGTAACTGCAAAAGATCCCT
sequence2 CTTGTTGGGCAACACCAAGGAATGATGATGGCTCTAGCAACAGTAACTGCAAAAGATCCCT
*****

```

AIV의 주요 항원이며, 표면 단백질인 NA 단백질 발현 결과



AIV의 주요 항원이며, 표면 단백질인 HA 단백질 유전자 증폭



sequence1 All in on H9N2 H9
sequence2 H9N2 H9

```

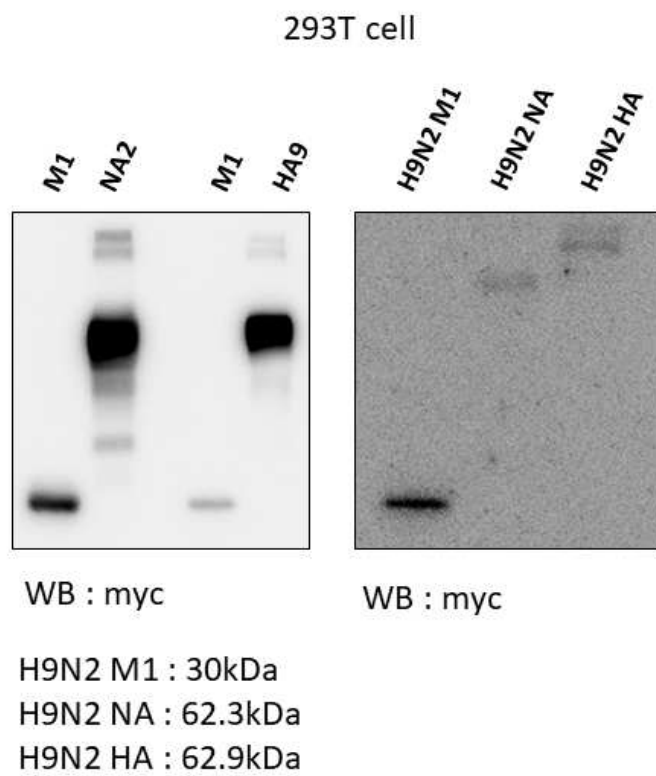
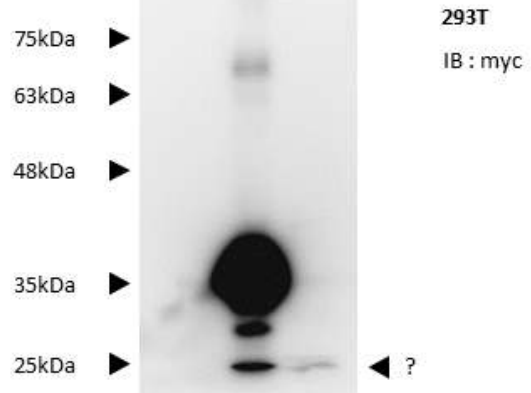
sequence1      GATTTAATTCTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCAAGT
sequence2      -----
sequence1      TGATGGATATCTGCAGAATTGGCCCTTCGCTCGAGGAATTCGCCACCATGGAAATAATA
sequence2      -----ATGGAAATAATA
sequence1      GCACATAAGCTATACTGGTAGTGACAAAAACAGGCAATGCAGATAAAATTTGCATTGGC
sequence2      GCACATAAGCTATACTGGTAGTGACAAAAACAGGCAATGCAGATAAAATTTGCATTGGC
sequence1      TADCAGTCAACAACTCCACAGAACTGTGTATACACTAGTAGAAAAACAATGTCCCTGTG
sequence2      TADCAGTCAACAACTCCACAGAACTGTGTATACACTAGTAGAAAAACAATGTCCCTGTG
sequence1      ACACATACCAAAGAATTGCTCCACACAGAGCAAAATGGAATGCTATGTGCAACAAACCTG
sequence2      ACACATGDCAAAGAATTGCTCCACACAGAGCAAAATGGAATGCTATGTGCAACAAACCTG
sequence1      GGGCAACCTCTCATCCTAGACACCTGCAACATCGAAGGGTGGTGTACGGCAACCCCTCC
sequence2      GGGCAACCTCTCATCCTAGACACCTGCAACATCGAAGGGTGGTGTACGGCAACCCCTCC
sequence1      TGTGATTTGCTACTGGAGGGAAAGAATGGTCTTACATTTGTGCAAGATCATCAGCTGTC
sequence2      TGTGATTTGCTACTGGAGGGAAAGAATGGTCTTACATTTGTGCAAGATCATCAGCTGTC
sequence1      AATGGGATGTGTACCCGGAAGGGTAGAAGCCTGGAGAACTCAGGCTTTTTTCAGC
sequence2      AATGGGATGTGTACCCGGAAGGGTAGAAGCCTGGAGAACTCAGGCTTTTTTCAGC
sequence1      TCDGCTCGCTCCTACAAAAGACTCCTGCTCTTCCAGACAGAACTTGGAAATGTGACTTAC
sequence2      TCDGCTCGCTCCTACAAAAGACTCCTGCTCTTCCAGACAGAACTTGGAAATGTGACTTAC
sequence1      ACTGGGACAGCAAAAGCATGTTCAAACCTCATTTACAGAAATGAGATGGCTGACACAC
sequence2      ACTGGGACAGCAAAAGCATGTTCAAACCTCATTTACAGAAATGAGATGGCTGACACAC
sequence1      AAGAGGATTTCTTACCCATTCAAGAGGCCCAATATACTAACGATTTGGGGAAGAATATT
sequence2      AAGAGGATTTCTTACCCATTCAAGAGGCCCAATATACTAACGATTTGGGGAAGAATATT
sequence1      CTCTTCAATGTGGGCAACACCCACCTACTGATCTGAGCAAAATAAATCTATACAAA
sequence2      CTCTTCAATGTGGGCAACACCCACCTACTGATCTGAGCAAAATAAATCTATACAAA
sequence1      AAAAGCTGATACAACAACAAGTATAACAACGGGAAGATATCAATCGAACTTTCAAACCAAGT
sequence2      AAAAGCTGATACAACAACAAGTATAACAACGGGAAGATATCAATCGAACTTTCAAACCAAGT
sequence1      ATAGGGCCAAGGCCTCTTGTCAATGGTCAACAAGGGAGAATGATTATTATTGGTCAGTA
sequence2      ATAGGGCCAAGGCCTCTTGTCAATGGTCAACAAGGGAGAATGATTATTATTGGTCAGTA
sequence1      CTAAAGCCAAGGCACGCACTGGAGTGAATCCAATGGGAATCTAATTTGCCCATGGTAT
sequence2      CTAAAGCCAAGGCACGCACTGGAGTGAATCCAATGGGAATCTAATTTGCCCATGGTAT
sequence1      GGACACATTCTTTCAG-AGAAAGCCAAGGAAGATCCTGAAAGACCGATTTGAGTAGTGGC
sequence2      GGACACATTCTTTCAG-AGAAAGCCAAGGAAGATCCTGAAAGACCGATTTGAGTAGTGGC
sequence1      AACTGCTAGTACAAATGCCAACTGAGAAAGGTGGTTTGAACACGACCTTGCATTCCAC
sequence2      AACTGCTAGTACAAATGCCAACTGAGAAAGGTGGTTTGAACACGACCTTGCATTCCAC

```

AIV의 주요 항원이며, 표면 단백질인 HA 단백질 유전자 분석 결과

AIV의 HA 단백질의 발현

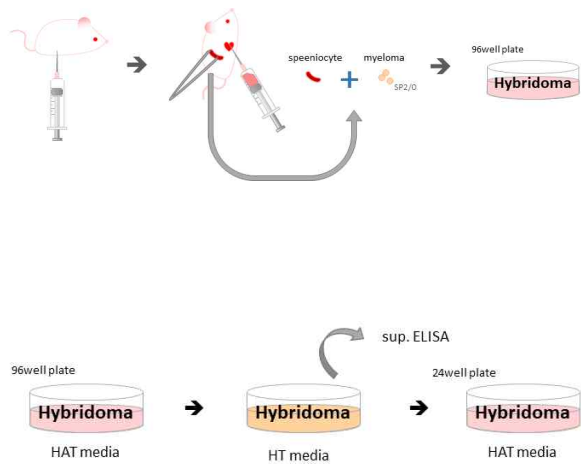
AIV의 주요 항원 즉 M1, HA, NA 단백질의 293T 세포에서의 발현 및 myc purification 결과



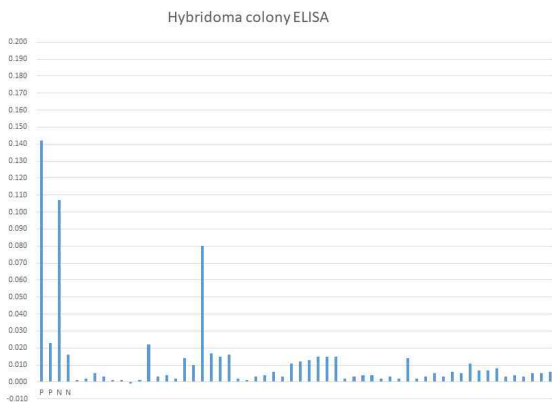
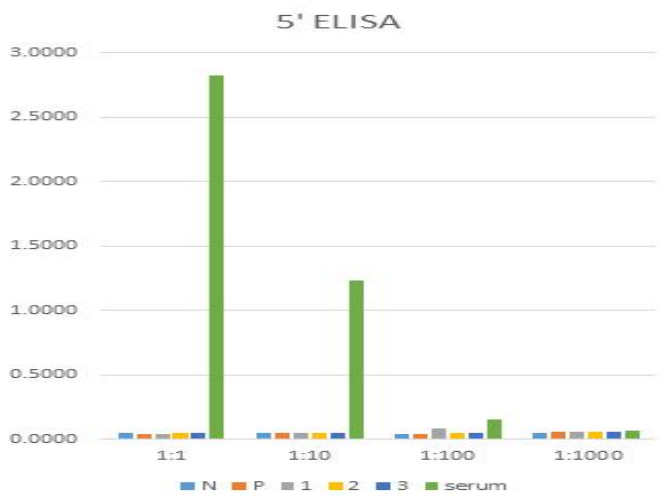
	<p>AIV의 HA 및 NA 단백질의 진단용 항원으로서의 평가 결과</p>	<div data-bbox="740 197 1442 743" data-label="Figure"> <table border="1"> <caption>H9N2 1차 serum ELISA Data</caption> <thead> <tr> <th>Sample</th> <th>1:100</th> <th>1:500</th> <th>1:1000</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PBS (Virus)</td> <td>~2.9</td> <td>~2.8</td> <td>~2.8</td> </tr> <tr> <td>H9N2 (Virus)</td> <td>~2.9</td> <td>~2.9</td> <td>~3.0</td> </tr> <tr> <td>M1 (Virus)</td> <td>~2.9</td> <td>~2.8</td> <td>~2.8</td> </tr> <tr> <td>PBS (protein)</td> <td>~1.9</td> <td>~0.7</td> <td>~0.5</td> </tr> <tr> <td>H9N2 (protein)</td> <td>~2.4</td> <td>~1.1</td> <td>~0.8</td> </tr> <tr> <td>M1 (protein)</td> <td>~1.9</td> <td>~0.9</td> <td>~0.7</td> </tr> </tbody> </table> </div> <p>이들의 활성 및 효율성 평가를 비교 검토하였다.</p>	Sample	1:100	1:500	1:1000	PBS (Virus)	~2.9	~2.8	~2.8	H9N2 (Virus)	~2.9	~2.9	~3.0	M1 (Virus)	~2.9	~2.8	~2.8	PBS (protein)	~1.9	~0.7	~0.5	H9N2 (protein)	~2.4	~1.1	~0.8	M1 (protein)	~1.9	~0.9	~0.7
Sample	1:100	1:500	1:1000																											
PBS (Virus)	~2.9	~2.8	~2.8																											
H9N2 (Virus)	~2.9	~2.9	~3.0																											
M1 (Virus)	~2.9	~2.8	~2.8																											
PBS (protein)	~1.9	~0.7	~0.5																											
H9N2 (protein)	~2.4	~1.1	~0.8																											
M1 (protein)	~1.9	~0.9	~0.7																											
	<p>mAb 제작을 통한 안정적인 인플루엔자 항체 생산 시스템 개발</p> <p>AIV 진단용 항체의 안정적이고 지속적 제작을 위한 진단용 항체용 mAb 제작 과정</p>	<p>진단 방법으로 항원을 이용한 항체 진단법과 반대로 항체를 이용한 인플루엔자 항원 진단법을 구상중인 관계로 효율성이 높은 인플루엔자 항체 생산 시스템 개발을 위하여 인플루엔자바이러스에 매우 특이적으로 반응하는 mAb 제작중이다. 이를 위하여 Balb/c 마우스를 이용하여 순수 분리정제된 인플루엔자 바이러스를 접종한 후 비장을 적출하여 다음과 같은 방법으로 mAb 생산하였다. 이것에 대한 자세한 과정에 대한 모식도이다.</p>																												

AIV 진단용 항체의 안정적이고 지속적 제작을 위한 진단용 항체용 mAb 제작 과정 (HA, NA, M2 단백질에 대한 항체)

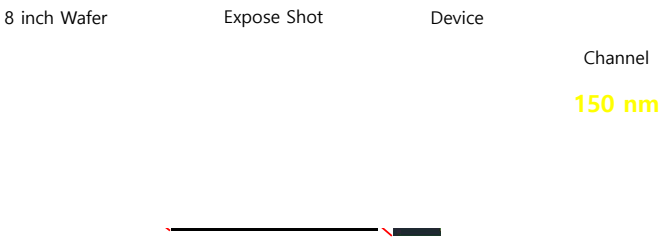
Screening 및 selection을 통한 최적의 항체 생산 mAb 확보 방안

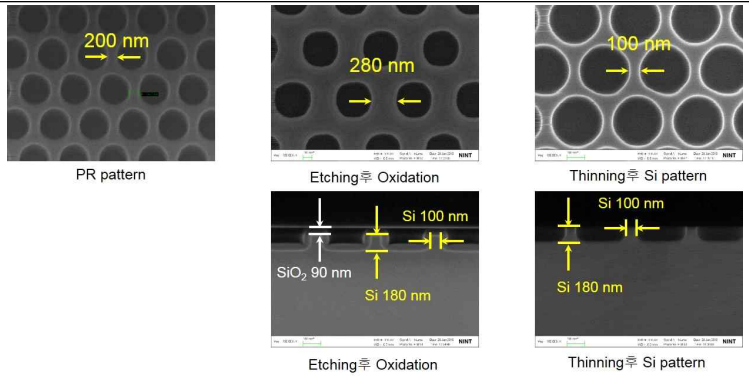


현재 한참 fusion cell clone 확보중이며, 이들 각각의 clone들을 ELISA를 이용하여 확인 작업 중이며 몇 개의 후보군 확보를 위한 지속적 screen을 실시하였다.



--	--	--

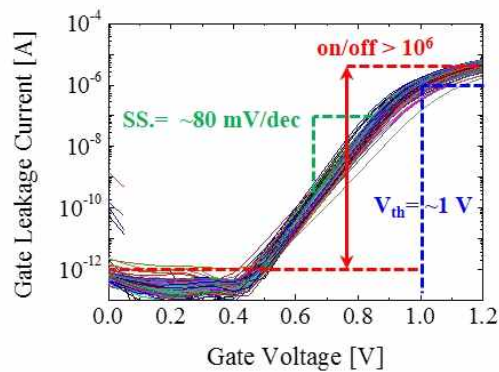
연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
BioFET 제작 양산 공정 기술 확보	<p>확보된 단위 공정 기술과 양산화를 위한 단위 공정과의 결합을 통하여 소자를 제작함. 제작된 소자의 I-V 전달 곡선을 얻고, 이로부터 소자의 전기적인 특성을 평가할 수 있는 parameter들 (문턱 전압, SS 등)을 추출하여 제작된 소자의 특성을 평가함.</p>	<p>(1) 양산용 소자 레이아웃 및 마스크 설계</p> <ul style="list-style-type: none"> - 기존의 패턴 형성을 위한 포토 공정은 stepper & scanner 장비를 이용하여 높은 throughput을 가지는 양산 공정을 도입함. stepper & scanner 장비에 해당되는 Active Layer, Implant Layer, Metal Layer, Passivation Layer를 포함한 총 4장의 reticle 마스크를 설계 및 제작함. - 양산 소자 제작을 위하여 wafer는 8 inch 크기 SOI를 사용한다. 양산 소자의 크기는 1.75×1.25 mm², 개수는 ~14000 개/wafer, honeycomb 나노선 너비는 150 nm로 설계함. transmission line 너비는 0.05 mm, source, drain pad 크기는 0.2×0.3 mm²로 설계함. 양산 공정의 편리를 고려하여 기준전극은 소자 내부에 형성되지 않고 외부전극을 사용하는 것으로 설계함. <div style="text-align: center;">  <p>[소자 레이아웃]</p> </div> <p>(2) 양산용 소자 채널 형성 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 전자빔 리소그래피를 활용한 미세 패턴 형성 기술은 수십 나노미터 스케일의 미세 패턴을 형성할 수 있고 원하는 디자인을 유연하게 선택할 수 있다는 장점이 있지만, 공정에 드는 시간과 비용이 크고 throughput이 작다는 단점 때문에 양산 공정에서는 채택되기 어려우므로 stepper & scanner 장비를 이용하여 높은 throughput을 가지는 양산 공정을 개발함. stepper & scanner 포토공정을 통해 180 nm Si 패턴을 형성하고, 산화공정을 통해 Si 패턴의 윗면 및 양측을 40 nm Si 타겟으로 산화하여 최종적으로 thinning 된 소자 채널 너비 Si NW = 100 nm을 형성하는 기술을 확보함.



[양산용 소자 실리콘 나노선 제작 공정]

(3) 양산 BioFET소자의 전기적 특성을 통한 수율 평가

- 2차년도에 확보된 단위 공정 기술과 양산 공정 기술을 이용하여 BioFET 소자를 제작하고, 전기적 특성을 측정함.
- 8inch 웨이퍼 단위로 제작되는 양산 공정에서는 총 14000개 이상의 소자가 제작되는데, 이 중 100분의 1 이상의 샘플 즉 150개 소자를 랜덤으로 선택하여 소자 수율 평가 샘플로 정함. AgCl/Ag 외부 기준전극을 통해 gate 전압을 인가하였고, 버퍼 용액은 pH 7인 0.01x PBS버퍼를 사용함.
- SS (Subthreshold swing): I_d-V_g 전달 곡선에서 I_d 전류 값이 직선구간을 유지하는 1 nA ~ 10 nA 구간에서 추출하며 평균값 78.4 mV/dec, 최대값 94.7 mV/dec, 최소값 70.1 mV/dec, 표준편차 4.6 mV/dec, 변화율 5.87%을 가짐.
- V_{th} (threshold Voltage): V_{th} 추출 방식은 I_d-V_g 전달 곡선에서 constant I_d 전류 값에서 추출하는 방식을 사용하였고, 정확히 on state라고 판단되는 전류 레벨 10^{-6} A 수준에서 도출하였으며, 평균값 1.01 V, 최대값 1.14 V, 최소값 0.95 V, 표준편차 0.03 V, 변화율 2.84%을 보임.



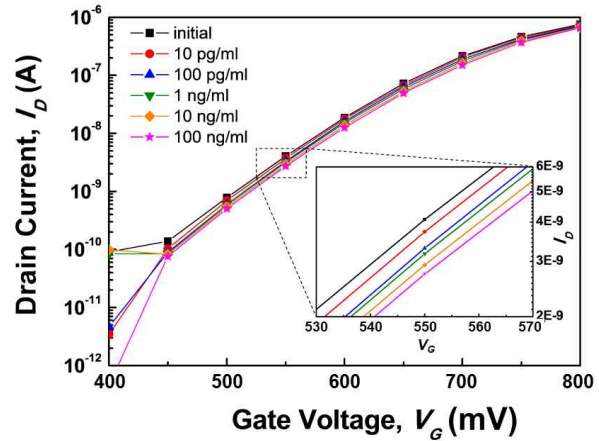
[양산형 BioFET소자 전기적 특성]

주관연구기관에 의해 선별된 인플루엔자 바이러스를 이용하여 BioFET를 감지

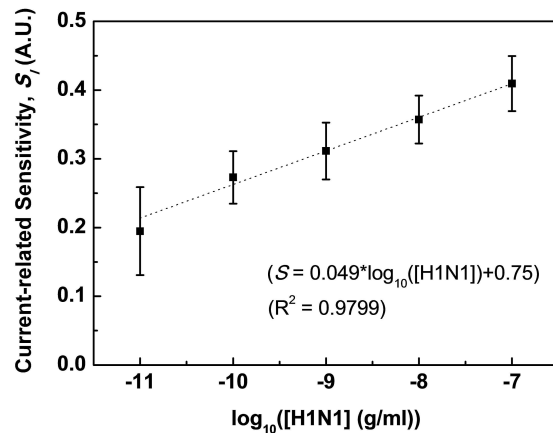
인플루엔자의 항원과 이에 해당하는 항체를 포함한 혈청 샘플을 이용하여 조류 인플루엔자 표적에 대한 검출을 시행함.

- BioFET 채널의 실리콘 산화막 표면에 APTES, Glutaraldehyde 등의 일련의 표면처리 과정을 통하여 인플루엔자 항체를 BioFET 소자의 표면에 고정하여 인플루엔자 바이러스 (H1N1) 을 감지함.
- 인플루엔자 바이러스의 pI = 5.4 이므로 0.01X PBS

buffer 용액 내에서는 negative 전하를 가짐. 이에 따라 소자의 특성 곡선은 전류가 줄어드는 방향인 오른쪽으로 이동함. 아래는 바이러스의 농도에 따른 BioFET 특성 곡선의 변화를 나타냄. 10 pg/ml - 100 ng/ml 의 인플루엔자 A에 대해 실험을 진행함.



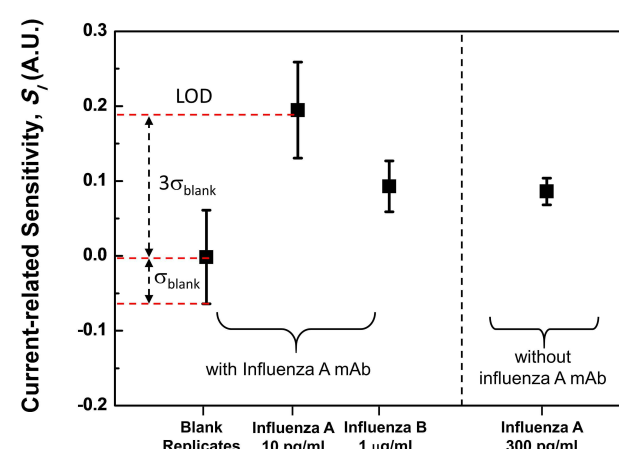
[인플루엔자 바이러스 농도에 따른 소자의 특성 곡선 변화]

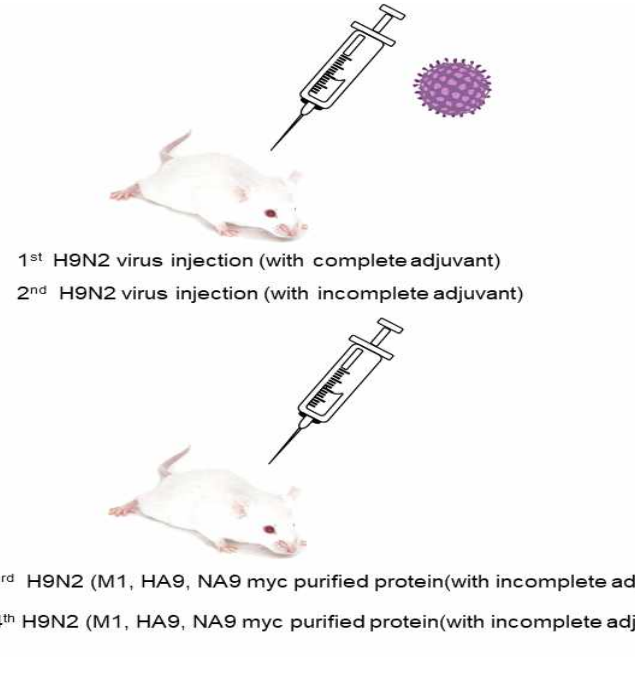


[인플루엔자 바이러스 농도에 따른 전류민감도]

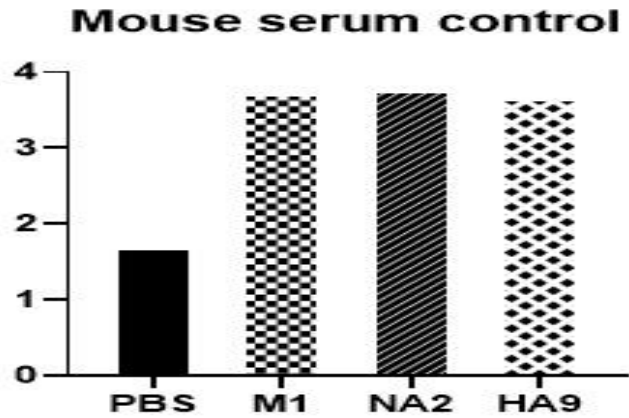
선택도 비교검증을 위해 인플루엔자 항체를 고정하지 않은 BioFET의 인플루엔자 A에 대한 특성 곡선의 반응과 인플루엔자 B에 대한 반응을 비교해봄. 또한, 3-sigma 방법을 이용하여 검출한계를 설정하기 위하여 인플루엔자 A가 포함되지 않은 blank replicate 샘플에 대한 특성 곡선 변화도 확보함.

- 항체를 고정하지 않은 소자에서는 높은 농도의 인플루엔자 A에 대해서도 낮은 전류 민감도를 나타냄
- 선택도 특성 확인을 위하여 인플루엔자 B에 대한 검출을 수행한 결과, 높은 농도임에도 불구하고 낮은 전류 민감도를 나타냄

		<p>- 검출한계는 blank replicate를 이용한 민감도의 표준편차의 3배에 해당하는 민감도를 가지는 농도이다. 이번 연구에서 10 pg/ml 의 우수한 검출한계를 확보하였다.</p>  <p>[인플루엔자 바이러스의 선택도, 검출한계 실험 결과]</p>
--	--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

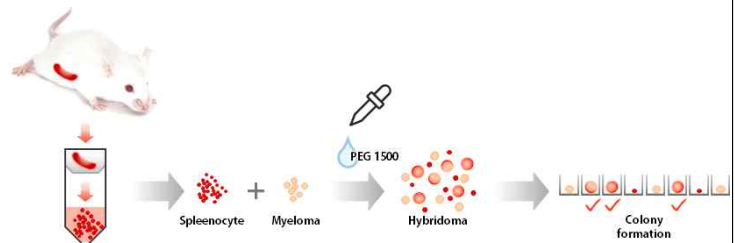
<p>AIV 진단용 항체 개발</p>	<p>AIV 감염을 현장에서 진단할 수 있는 진단용 mAb 개발</p>	<p>- AIV 감염을 현장에서 진단할 수 있는 진단용 mAb 개발의 목적으로 hybridoma를 제작하기 위하여 본 연구진들이 수행한 방법은 hetero injection 방법을 수행하였다. 항체 생산을 위한 항체 접종 방법으로 하나의 항원을 주기적으로 접종하는 homo injection 방법에 국한하지 않고 최근의 추세인 hetero injection 전략을 실시하였다. 즉 하나의 항원을 주입하지 않고 다양한 항원을 주입하는 방식을 택하였다. 총 4회 injection을 실시하였고, 그 내용은 다음과 같다.</p>  <p>이렇게 접종 한 후, 매주 각각 mouse 별 혈청으로 부터의 각각 감염 항원 즉, AIV, NA, HA, M1 항원에 대한 항체가를</p>
----------------------	-----------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

ELISA를 통하여 분석하고 최대치가 나온다고 판정된 시점에 각 mouse를 sacrifice하여 이들로부터 비장 세포를 적출하여 Myeloma cell과의 fusion을 실시하였다.



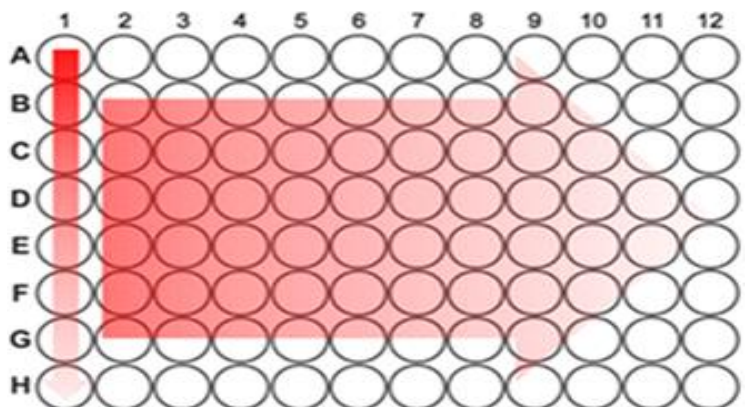
Hybridoma fusion 결과

Hybridoma fusion 결과 총 1008개의 well에서 192개의 fusion colony를 확인하였으며, 이들 각각의 fusion colony 즉 mother line들을 확보하고 이들의 지속적인 expansion을 통한 single cell expansion을 실시하였다.

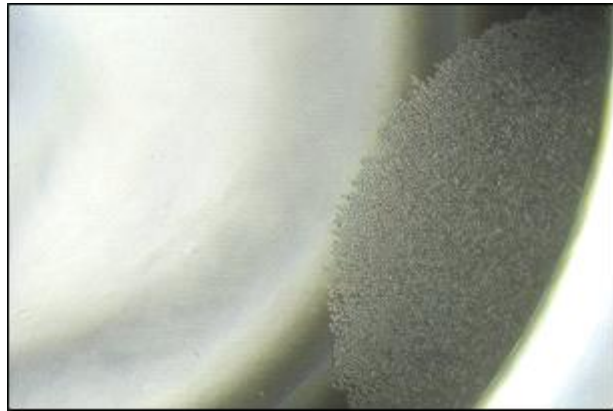


Total	Fusion colony
1,008	192

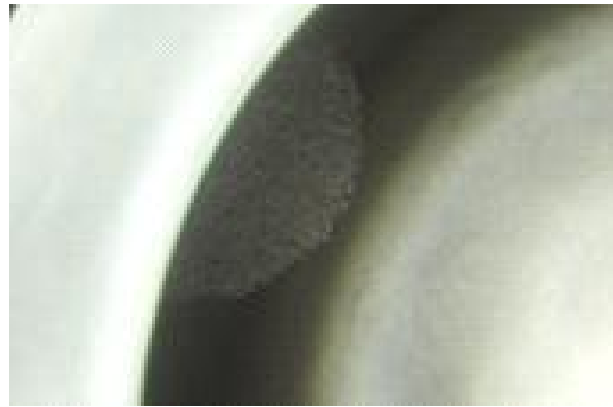
Single cell expansion



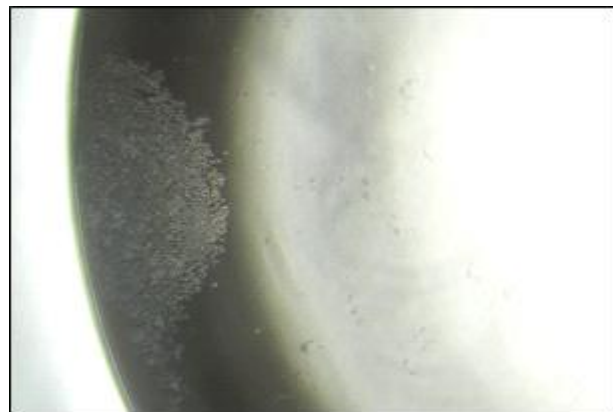
이런 single cell expansion을 통하여 매우 많은 수의 single cell colony들을 확보 할 수 있었다.



M1에 대한 single cell clone



HA에 대한 single cell clone

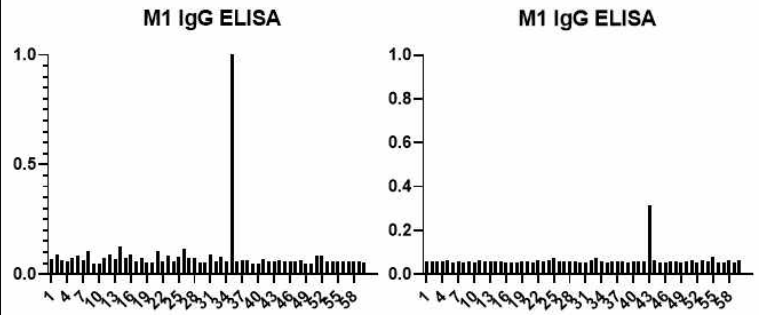


NA에 대한 single cell clone

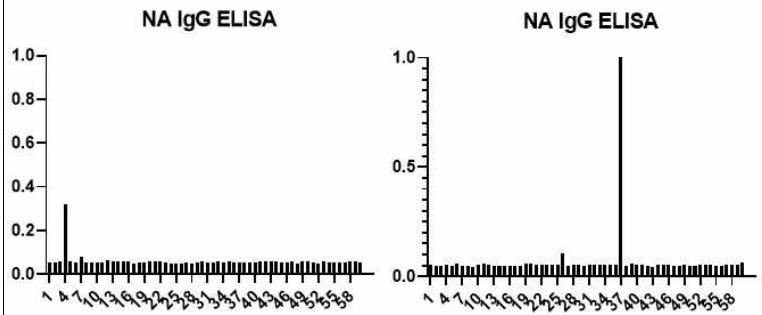
single cell colony들의 AIV에 대한 specificity test 결과

-각각의 single colony들에 대한 평가를 ELISA를 이용하여 특이성 평가를 실시하였다. 다양한 mAb 중 가장 specificity가 높은 single colony를 찾기위한 지속적인 panning과

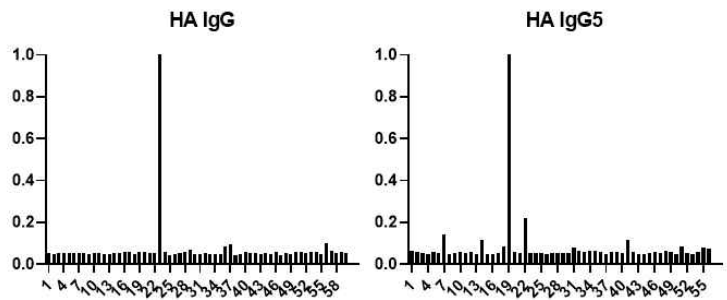
expansion, ELISA를 반복적으로 실시하여 가장 훌륭한 mAb screening을 위한 노력을 실시하였다.



M1 mAb들에 대한 screening 결과



NA mAb들에 대한 screening 결과

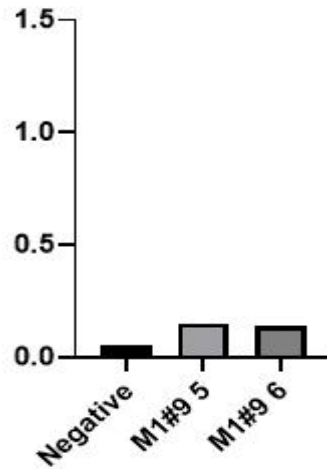


HA mAb들에 대한 screening 결과

AIV 진단용 mAb에 대한 specificity test 결과 및 최종 평가

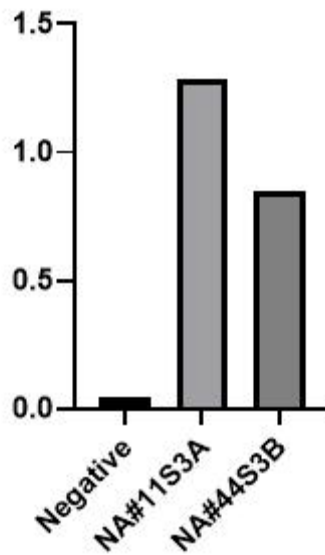
- 최종적으로 M1 specific한 mAb 2개를 확보 하였다. HA나 NA에 비하여 반응성은 떨어지지만 M1 specific한 항체를 확보하였다.

M1 specific 2

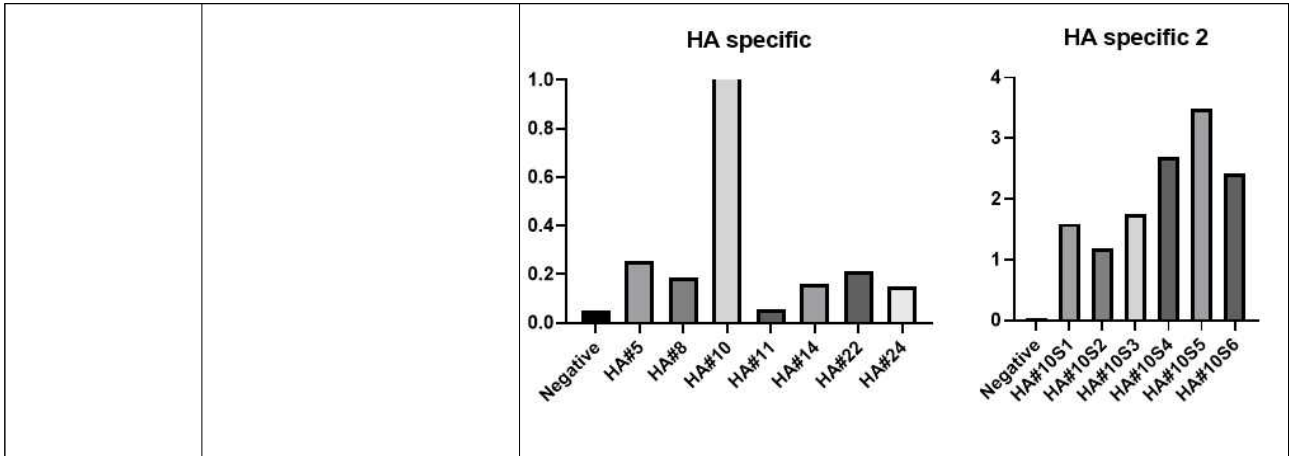


- 최종적으로 NA specific한 mAb 2개를 확보 하였다. M1에 대한 mAb보다 훨씬 높은 반응성을 나타내는 2개의 mAb 확보에 성공하였다.

NA specific 2



- 최종적으로 HA specific한 mAb 13개를 확보 하였다. M1에 대한 mAb보다 훨씬 높은 반응성을 나타내는 13개의 mAb 확보에 성공하였다.

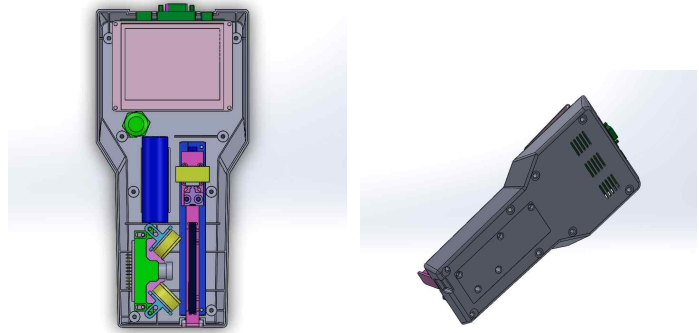


휴대용 현장용 진단 기기의 개발

- BioFET 기술 기반 칩을 이용한 진단시스템 개발의 필수 요소인 진단기기 개발에 노력하여 프로그램 개발, 센서 개발, 항원, 항체의 개발 결과를 가지고 다음과 같은 시스템 확보에 성공하였다.

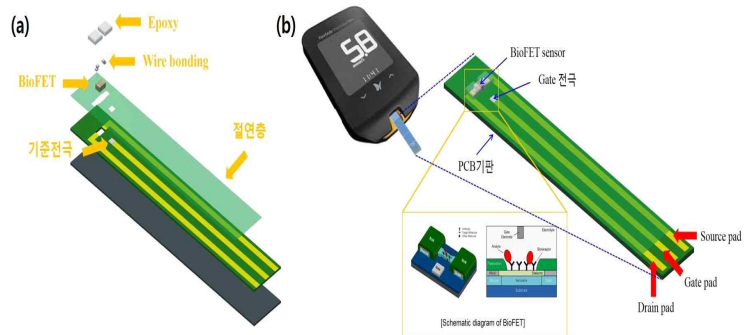
우선 다양한 디자인과 성능을 견비할 수 있는 디자인, 형태, 색깔등을 고려한 설계본 제작을 실시하였다.

▪ 측정 하드웨어 기구물 제작 (설계본)

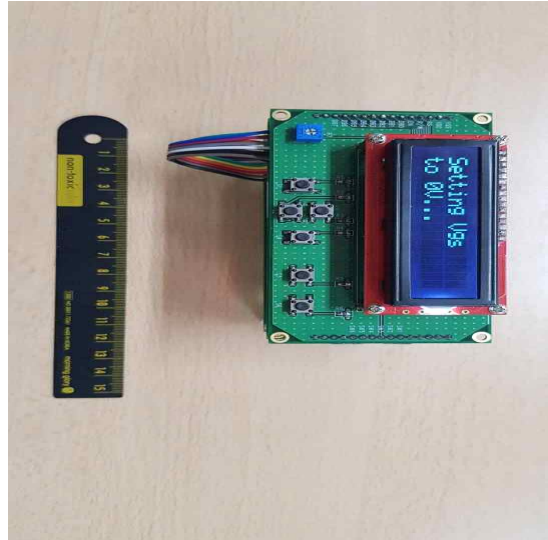


측정 하드웨어 기구물 제작 (설계본)

휴대용 현장용 진단 기기의 개발

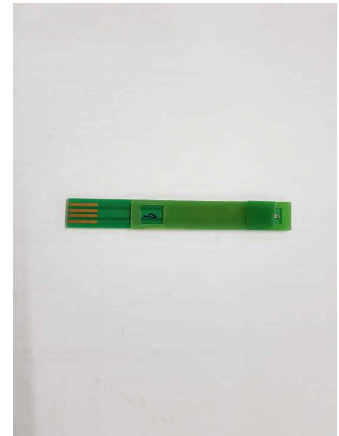


- 이러한 설계본을 바탕으로 기기 완성에 성공하였다. 아직은 시제품적인 상품이지만 케이스 개발 및 프로그램 시연을 여러번 하고 있는중이다.

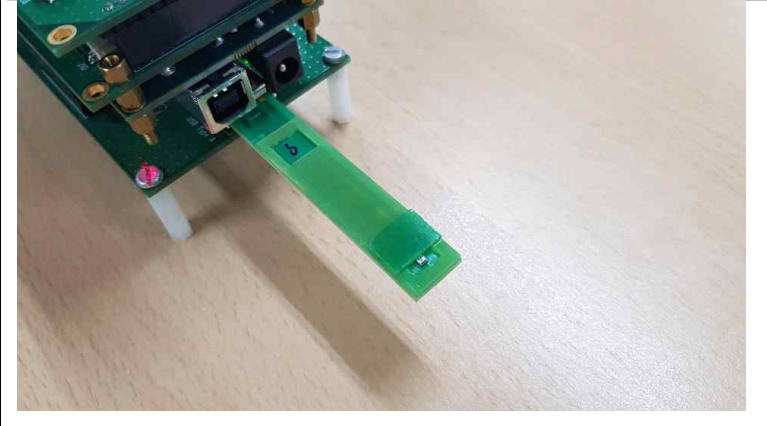
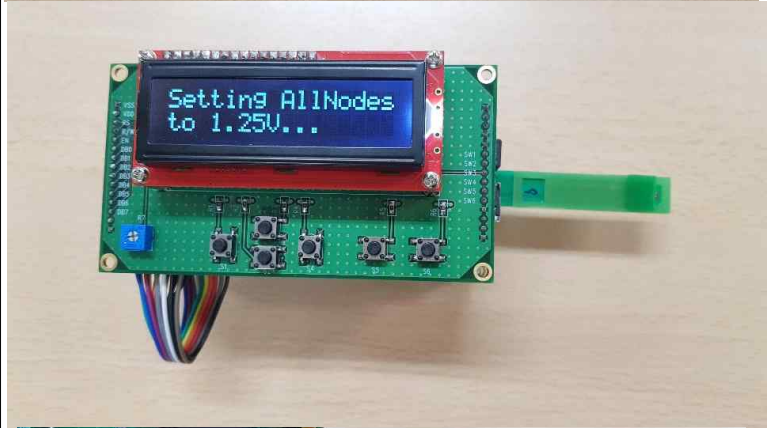


기기의 크기 조절과 디자인 및 색깔 변경에 전문가 상의를 통하여 최종적으로 결정하고자 한다.

-또한 진단키트의 strip 제조에 성공하여 다음과 같은 prototype 으로 개발되었다.



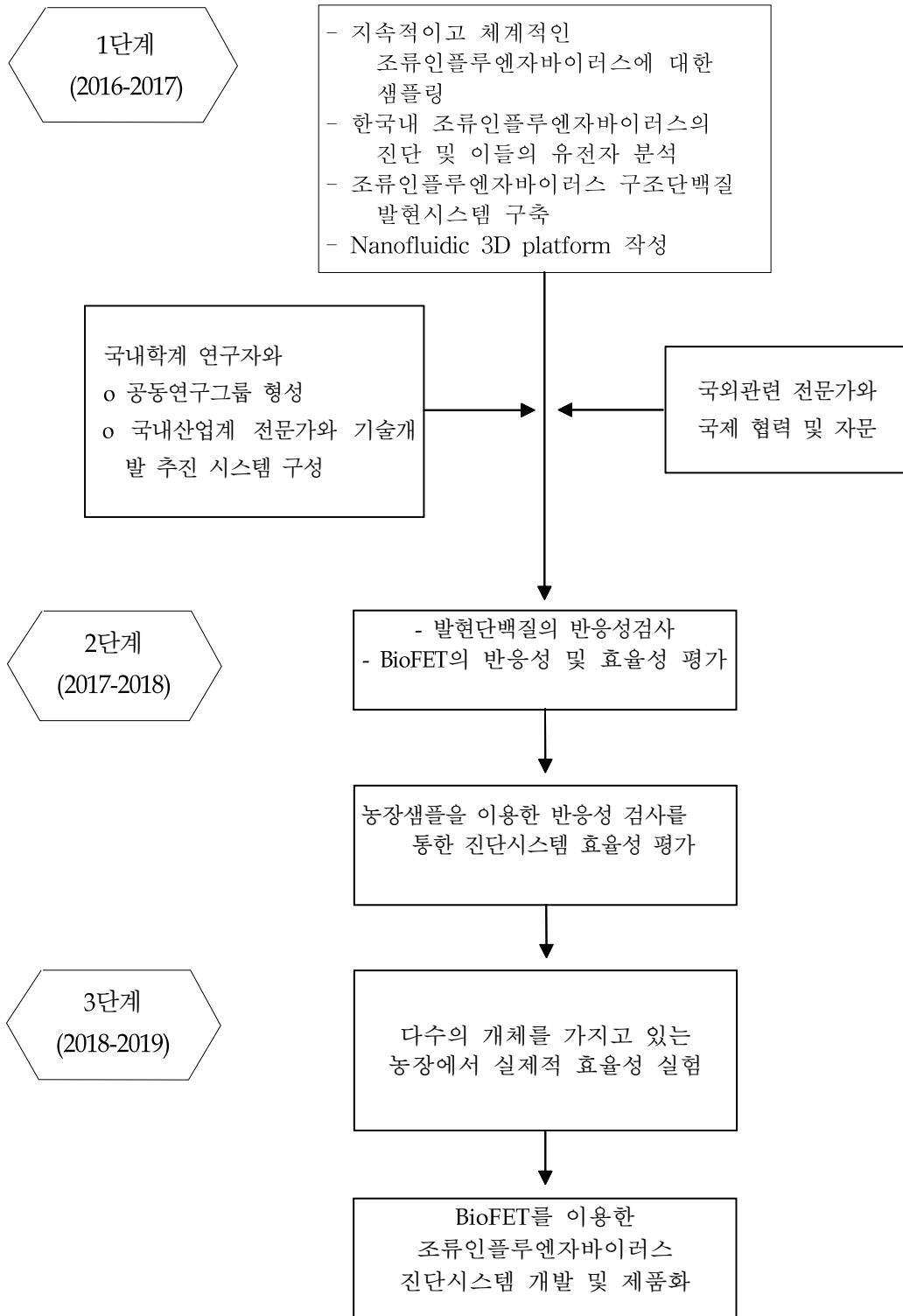
- 본 연구진들이 최종적으로 개발한 진단시스템 (reader/strip)사진들이다.



2-2. 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계

가. 연구개발 추진전략·방법

	코드번호	B-06-01
○		



나. 연구개발 추진체계

코드번호	B-06-02
------	---------

○

<연구개발 추진체계>

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	Nanofluidic 3D platform을 이용한 현장용 조류인플루엔자바이러스 진단시스템 개발	주관연구책임자 (신현진)의 총 40명

기관별 참여 현황		
구 분	연구기관수	참여연구원수
대 기 업		
중견기업		
중소기업	1	14
대 학	2	27
국공립(연)		
출 연 (연)		
기 타		

주관연구기관명
조류인플루엔자바이러스 진단시스템 개발을 위한 항원개발
연구책임자명 (신현진)의 ○○명
담당기술개발내용

협동연구기관명
조류인플루엔자바이러스 진단시스템 개발을 위한 BioFET platform 개발
연구책임자명 (이정수)의 2명
담당기술개발내용
BioFET 센서 제작 및 조류 인플루엔자 바이러스 감지 실험

공동연구기관명
Nanofluidic 3D platform을 이용 조류인플루엔자 바이러스 진단키트 시제품 제작 및 상품화
연구책임자명 (박종택)의 ○○명
담당기술개발내용

위탁연구기관명
과 제 명
연구책임자명 (○○○)의 ○○명
담당기술개발내용

공동연구기관명
과 제 명
연구책임자명 (○○○)의 ○○명
담당기술개발내용

위탁연구기관명
과 제 명
연구책임자명 (○○○)의 ○○명
담당기술개발내용

다. 추진 일정

		코드번호		B-06-03												
1차년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	조류인플루엔자바이 러스 표면 단백질 항원 선별 및 유전자원 확보														25,000	신현진 (충남대)
2	Prokaryotic cell에서 선별된 항원 단백질 발현 시스템 구축														35,000	신현진 (충남대)
3	Prokaryotic cell에서 발현된 항원 단백질의 항원성 테스트														40,000	신현진 (충남대)
4	종이 기반 3차원 미세유체 플랫폼 설계														30,000	이창수 (충남대)
5	인쇄공정 및 후 처리 공정 기술을 이용한 3차원 유로 형성 기술 확립														40,000	이창수 (충남대)
6	항원 - 항체 반응 detection이 가능 한 nanofluidic 3D 기술 확립.														20,000	이창수 (충남대)
7	사업화 전략방향성 도출 및 시장동향 분석을 통한 시장 의 요구 분석														40,000	박종택 (씨맥)
8	기술성, 제품화 가 능성, 사업성 평 가														35,000	박종택 (씨맥)
9	시제품 모형제작 및 다양한 디자인 을 통한 상품제작 평가.														35,000	박종택 (씨맥)
10	제품 보존 온도, 보존 기간 및 보 존 방법에 대한 평가 테스트														10,000	박종택 (씨맥)

2차년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	다양한 eukaryotic 발현 벡터에서 확보된 유전자원 발현	■	■	■											10,000	신현진 (충남대)
2	Eukaryotic cell에서 선별된 항원 단백질 발현 시스템 구축		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	30,000	신현진 (충남대)
3	Eukaryotic cell에서 발현된 항원 단백질의 항원성 테스트								■	■	■	■	■	■	30,000	신현진 (충남대)
4	두 가지 이상의 항원 단백질을 동시에 사용하여 항원성 증대 여부 확인								■	■	■	■	■	■	10,000	신현진 (충남대)
5	발현된 eukaryotic 단백질을 효과적으로 정제할 수 있는 기술 구축				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	20,000	신현진 (충남대)
6	BioFET 설계 및 제작 공정 기술 확보	■	■	■	■	■	■	■							30,000	이정수 (포항공대)
7	제작된 BioFET의 전기적 특성 분석			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	10,000	이정수 (포항공대)
8	주관연구기관에 의해 선별된 항원-항체 반응을 bioFET 상에서 구현								■	■	■	■	■	■	10,000	이정수 (포항공대)
9	시제품 제작 및 성능 테스트						■	■	■	■	■	■	■	■	30,000	박종택 (씨맥)
10	제품 보존 온도, 보존 기간 및 보존 방법에 대한 평가 테스트						■	■	■	■	■	■	■	■	10,000	박종택 (씨맥)
11	제품 생산을 위한 설비 시설 계획 및 준비						■	■	■	■	■	■	■	■	30,000	박종택 (씨맥)
12	비즈니스 모델 설계 및 수익성 검증	■	■	■	■	■									40,000	박종택 (씨맥)

3차년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	농장 샘플을 이용한 다양한 혈청과 선별된 항원 단백질의 항원-항체반응 테스트														15,000	신현진 (충남대)
2	키트에 적용할 검체의 종류, 채취 방법 확립.														20,000	신현진 (충남대)
3	다양한 pH, 온도에서의 항원-항체 반응성 테스트														25,000	신현진 (충남대)
4	조류인플루엔자 바이러스의 정량적 진단 테스트														20,000	신현진 (충남대)
5	농장 샘플을 이용한 다양한 혈청과의 제품의 안정성 테스트														10,000	신현진 (충남대)
6	조류인플루엔자바이러스 진단 성능과 결과의 정밀성 확보														10,000	신현진 (충남대)
7	BioFET 제작 양산 공정 기술 확보														35,000	이정수 (포항공대)
8	주관연구기관에 의해 선별된 인플루엔자 바이러스를 BioFET를 이용하여 감지														65,000	이정수 (포항공대)
9	완성된 제품의 생산 규모, 보관 환경, 유통 조건 최종 확인 및 생산된 제품의 보관 공간 확보														40,000	박종택 (씨맥)
10	제품의 완성도 확인 및 홍보														30,000	박종택 (씨맥)

2-3. 연구성과(해당되는 성과만 기재)

가. 국내의 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	코드번호		C-06-01		
					국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	고성능 TFT소자 응용을 위한 폴리스티렌 나노입자를 이용한 나노그물망 제작공정 개발	반도체디스플레이기술학회지	윤길상	3	한국	한국반도체디스플레이기술학회	비SCI	2018년 9월	
2	Electrical Characteristics and pH response of a Parylene-H sensing Membrane in a Si-Nanonet Ion-Sensitive Field Effect Transistor	Sensors	Bo Jin	18	스위스	MDPI	SCI	2018년 11월	
3	Highly Sensitive Detection of Influenza A (H1N1) Virus with Silicon Nanonet BioFETs (accepted)	IEEE Sensors Journal	박찬오		미국	IEEE	SCI	2019년 8월	
4	Improved long-term responses of Au-decorated Si nanowire FET sensor for NH3 detection (accepted)	IEEE Sensors Journal	김동훈		미국	IEEE	SCI	2019년 11월	
5	Isolation of new porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), CNUP6-2018 strain in South Korea and its genetic characteristics	Journal of Preventive Veterinary Medicine	박재연	43(4)	한국	한국예방수의학회	비SCI지	2019년 12월	

나. 국내 및 국제학술회의 발표

			코드번호		C-06-02
No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	5th International Conference on Bio-Sensing Technology	정성근	2017년 5월 8일 ~ 5월 10일	Riva del Garda	Italy
2	Annual Summit on Cell Therapy and Molecular Medicine	신현진	2017. 09. 27- 2017. 09. 29	Chicago	USA
3	한국미생물학회연합 국제학술대회	신현진	2018. 10. 11- 2018. 10. 12	서울	한국
4	The 26 th Korean Conference on Semiconductors	김동훈	2019. 02. 13- 2019. 02. 15	횡성	한국
5	American Society of Virology 2018	신현진	2019. 07. 13- 2019. 07. 18	Maryland	USA
6	American Society of Virology 2019	신현진	2019. 07. 22- 2019. 02. 26	Minneapolis	USA

다. 생명자원(생물자원)/화합물

		코드번호		C-06-03
No	생명자원(생물자원)/화합물명	등록/기탁번호	등록/기탁기관	발생년도

라. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

			코드번호		C-06-04				
No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	신호 강도 증폭이 가능한 종이칩	대한민국	이창수, 정성근	2017. 05.26.	10-2017-0 065116	충남학산 학단	2019.10. 23	10-2037757	5

마. 저작권(소프트웨어, 서적 등)

					코드번호		C-06-05	
No	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록번호	저작권자명	기여율	

바. 전문연구 인력양성

								코드번호		C-06-06			
No 1	분류	기준 년도	현 황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
	충남대	1차년도	3	3	3		8	1		9			
	충남대	2차년도	2	2			2	2		4			
	충남대	3차년도	1	4			3	2		5			
	포항공대	2차년도	2	2			4				4		
	포항공대	3차년도	3	2			5		3		2		

사. 산업기술 인력양성

					코드번호		C-06-07	
No	프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원		
1								
2								

아. 기술거래(이전) 등

						코드번호		C-06-08	
8	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황			

자. 사업화 투자실적

					코드번호		C-06-09	
No	추가 R&D 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자자금 성격			
					1) 내부자금 2) 신용대출 3) 담보대출 4) 투자유치 5) 기타			

차. 사업화 현황

(단위 : 명, 년)

							코드번호		C-06-10		
No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생년도	기술 수명	
							국내	국외			
	기술이전 자기실시	신제품개발 기존제품개선 신공정개발 기존공정개선 기타	국내 국외								

카. 표준화

					코드번호		C-06-11
No	수행기관명	표준화 주제	표준화 기구	표준화 단계	관련번호	제출(채택)일	국가
						yyyy.mm.dd	

타. 기술요약정보

			코드번호		C-06-12
연도	기술명	요약내용	기술완성도	등록번호	

파. 보고서 원문

		코드번호		C-06-13
연도	보고서 구분	발간일	등록번호	

하. 기타

2.4. 연구성과(해당되는 성과만 기재)

가. 기술적 성과

제안 기술은 ELISA와 같은 순차 반응을 통한 전문 실험실 수준의 고감도 분석을 FET 기반 플랫폼에서 시행이 가능하므로, 전문 실험실이 아닌 병원 종사자 및 의사가 현장에서도 육안으로 손쉽게 조류 인플루엔자 감염 유무 및 감염 정도 (정량 분석 가능)를 판단할 수 있음. 신속하게 조류인플루엔자 바이러스를 진단할 수 있는 최첨단 진단 플랫폼 시스템 장비의 독자적 개발함으로써 빠른 방역을 가능케 함으로써 조류인플루엔자 바이러스의 확산을 방지하고 가금류 농장의 피해를 최소화 할 수 있을 것으로 기대됨.

반도체 기반 질병 진단 바이오센서는 다양한 분야의 나노기술이 융합된 분야로써 이를 위한 표면처리 기술, 생체분자 고정화 기술, 바이오마커 발굴 등의 추가 연구를 통하여 새로운 연구분야 창출이 가능함. 채널 표면에 다양한 생화학적 기능기를 도입함으로써 본 연구의 타겟인 조류인플루엔자 외에도 다양한 질병의 진단이 가능하다. 이에 따라 인간, 가축, 애완동물의 다양한 질병에도 적용 가능한 범용기술을 이용하여 신규 시장 진입이 가능함.

[경제적·산업적 측면]

개발되는 탐지 센서의 원천기술은 가스센서, 바이오센서, 의료용센서 등 다양한 분야로 확장할 수 있어 의료, 환경, 보건, 검역 등 관련 산업의 경제적, 산업적 파급효과와 수입대체효과를 가짐. 플랫폼의 세대교체는 현재 외국 기업 일변도의 글로벌 진단시장에 국내 기업의 진입을 가능하게 하고, 이는 혈당센서에 국한된 국내 바이오센서 시장 규모를 확대시켜 해외 대기업 제품의 수입대체 효과에 따른 지대한 경제적 파급효과를 가져올 것으로 기대함. 향후 시장 규모가 큰 바이오 의료 산업 분야 및 환경, 군사 식

품등지에 활용 가능한 범용 플랫폼으로의 발전이 매우 클 것으로 예상되며, 더불어 바이오 융합 반도체 센서라는 국내 기술 아이টে임을 확보하게 됨에 따라 비메모리 분야의 반도체 경쟁력 및 의료/바이오용 기기의 국내 기술 경쟁력 확보, 낮은 단가, 고집적 능력 확보가 가능 할 것으로 기대됨.

[사회적 측면]

해외 여행자의 증가에 따라 전염성이 높고 국내 유입 가능성이 높은 다양한 세균 및 바이러스성 질병에 대한 확진수단을 제공함. 진단의 정확도와 효율을 높임으로써 정밀의료가 확대되는 기회를 제공하고 공중보건학적 대응체계 및 국가 방역시스템 구축에 기여함.

(기술개발 의의)

- 선진국 대비 기술수준, 국산화율

나. 경제적 성과 (씨맥)

[경제적·산업적 측면]

개발되는 탐지 센서의 원천기술은 가스센서, 바이오센서, 의료용센서 등 다양한 분야로 확장할 수 있어 의료, 환경, 보건, 검역 등 관련 산업의 경제적, 산업적 파급효과와 수입대체효과를 가짐. 플랫폼의 세대 교체는 현재 외국 기업 일변도의 글로벌 진단시장에 국내 기업의 진입을 가능하게 하고, 이는 혈당센서에 국한된 국내 바이오센서 시장 규모를 확대시켜 해외 대기업 제품의 수입대체 효과에 따른 지대한 경제적 파급효과를 가져올 것으로 기대함. 향후 시장 규모가 큰 바이오 의료 산업 분야 및 환경, 군사 식품등지에 활용 가능한 범용 플랫폼으로의 발전이 매우 클 것으로 예상되며, 더불어 바이오 융합 반도체 센서라는 국내 기술 아이টে임을 확보하게 됨에 따라 비메모리 분야의 반도체 경쟁력 및 의료/바이오용 기기의 국내 기술 경쟁력 확보, 낮은 단가, 고집적 능력 확보가 가능 할 것으로 기대됨.

[사회적 측면]

해외 여행자의 증가에 따라 전염성이 높고 국내 유입 가능성이 높은 다양한 세균 및 바이러스성 질병에 대한 확진수단을 제공함. 진단의 정확도와 효율을 높임으로써 정밀의료가 확대되는 기회를 제공하고 공중보건학적 대응체계 및 국가 방역시스템 구축에 기여함.

기술적인 측면에서 국내외 경쟁사 기술 및 제품과의 규격, 성능, 정밀도 등 사양비교를 통한 우월성 등 서술

○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

- 사업화 계획 및 매출 실적

본 연구진들이 개발한 진단시스템, 즉 진단 키트 및 휴대용 진단기기의 제품화 및 상품화를 추진하여 향후 상품화 및 매출 확보 실시 예정임. 키트의 대량화 및 기기 디자인을 완성하여 2022년까지 제품화를 완성할 계획임. 특히나 동물용 진단시스템이기 때문에 상품화 후 제품 판매를 위해서는 검역검사본부의 동물용의료기기 허가를 득해야 하는 사항이기 때문에, 검역검사본부와의 긴밀한 업무 협조를 통하여 신속하게 제품 등록을 득하고자 노력하겠음. 동물용의료기기 허가에 필요한 조건과 진행 단계를 자세히 득하여 이 제품의 상품 허가 등록을 최대한 빨리 마치겠음. 검역검사본부 동물약품 평가과의 가이드라인에 나와 있는 절차에 따라 수행하겠음.

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2년			
	소요예산(백만원)	300,000,000원			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0	3	6	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	20	50
국외		0	3	5	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	본 기술을 이용한 다양한 동물 및 사람에 대한 감염성 진단 시스템 개발 가능함.			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(대수)				
	수 출				

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0억원
			향후 3년간 매출	3억원
		관련제품	개발후 현재까지	100억원
			향후 3년간 매출	500억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 20 % 국외 : 3 %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 20 % 국외 : 3 %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		0위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		100위

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

코드번호	C-05-01
<ul style="list-style-type: none">○ 본 연구의 성과는 정성, 정량적으로 하기와 같은 평가기준을 제시한다.○ 정성적 성과<ul style="list-style-type: none">- AI 진단키트개발 : 기존 상용화 AI 진단키트 대비 동등 혹은 그 이상의 효과를 지닌 AI 진단키트 및 진단시스템 개발○ 정량적 성과 : 하기 표 참조<ul style="list-style-type: none">- SCI 논문 : 4편 게재- 비SCI 논문 : 3편 게재- 학술발표: 6건- 인력양성: 27명- 특허출원 : 1건- 특허등록 : 1건- 기술이전/제품화 : 기술이전 0건 (자가 실시)/제품화 0건	

3-2. 목표 달성여부

성과 목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 1재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		논문평균 IF	학술발표			정책 활용	홍보전시	
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	20	20				20			10					15		15				
최종목표	2	2				2			3			2	0	6		27				
1차년도	목표	0							0			2		2		9				
	실적	1							2			0		2		9				
2차년도	목표	1							1			2	0	2		9				
	실적	0							3				1	2		8				
3차년도	목표	1	1			2			1			2	0	2		9				
	실적	3	2			0			9			2	1	2		10				
소계	목표	2	1			2			3			6	0	6		27				
	실적	4	2			0			14			6	2	6		27				

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

현재 AI 진단용 다양한 mAb들이 생산되어 이들에 대한 각각의 출원 및 등록이 가능하다고 판단된다. 이미 개발이 완료된 mAb들에 대한 특허 출원을 실시하여 이들을 이용한 상품화 노력하겠음. 이들 mAb들에 대한 추가 논문, 학술 발표, 특허 등록을 통한 기술이전 및 사업화 확대에 노력하겠음.

4. 연구결과의 활용 계획 등

4-1. 연구성과의 활용, 추가 연구의 필요성 및 타 연구에의 응용

	코드번호	B-07-01
[기술적 측면]		
제안 기술은 ELISA와 같은 순차 반응을 통한 전문 실험실 수준의 고감도 분석을 FET 기반 플랫폼에서 시행이 가능하므로, 전문 실험실이 아닌 병원 종사자 및 의사가 현장에서도 육안으로 손쉽게 조류 인플루엔자 감염 유무 및 감염 정도 (정량 분석 가능)를 판단할 수 있음. 신속하게 조류인플루엔자 바이러스를 진단할 수 있는 최첨단 진단 플랫폼 시스템 장비의 독자적 개발함으로써 발빠른 방역을 가능		

케 함으로써 조류인플루엔자 바이러스의 확산을 방지하고 가금류 농장의 피해를 최소화 할 수 있을 것으로 기대됨.

반도체 기반 질병 진단 바이오센서는 다양한 분야의 나노기술이 융합된 분야로써 이를 위한 표면처리 기술, 생체분자 고정화 기술, 바이오마커 발굴 등의 추가 연구를 통하여 새로운 연구분야 창출이 가능함. 채널 표면에 다양한 생화학적 기능기를 도입함으로써 본 연구의 타겟인 조류인플루엔자 외에도 다양한 질병의 진단이 가능하다. 이에 따라 인간, 가축, 애완동물의 다양한 질병에도 적용 가능한 범용기술을 이용하여 신규 시장 진입이 가능함.

[경제적·산업적 측면]

개발되는 탐지 센서의 원천기술은 가스센서, 바이오센서, 의료용센서 등 다양한 분야로 확장할 수 있어 의료, 환경, 보건, 검역 등 관련 산업의 경제적, 산업적 파급효과와 수입대체효과를 가짐. 플랫폼의 세대교체는 현재 외국 기업 일변도의 글로벌 진단시장에 국내 기업의 진입을 가능하게 하고, 이는 혈당센서에 국한된 국내 바이오센서 시장 규모를 확대시켜 해외 대기업 제품의 수입대체 효과에 따른 지대한 경제적 파급효과를 가져올 것으로 기대함. 향후 시장 규모가 큰 바이오 의료 산업 분야 및 환경, 군사 식품등지에 활용 가능한 범용 플랫폼으로의 발전이 매우 클 것으로 예상되며, 더불어 바이오 융합 반도체 센서라는 국내 기술 아이টে를 확보하게 됨에 따라 비메모리 분야의 반도체 경쟁력 및 의료/바이오용 기기의 국내 기술 경쟁력 확보, 낮은 단가, 고집적 능력 확보가 가능 할 것으로 기대됨.

[사회적 측면]

해외 여행자의 증가에 따라 전염성이 높고 국내 유입 가능성이 높은 다양한 세균 및 바이러스성 질병에 대한 확진수단을 제공함. 진단의 정확도와 효율을 높임으로써 정밀의료가 확대되는 기회를 제공하고 공중보건학적 대응체계 및 국가 방역시스템 구축에 기여함.



Micro/Nano Biosystems

Albuminuria

3D Paper chip for Digital assay

Chang-Soo Lee

Micro/Nano Biosystems Lab, Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, Korea

 동물진단 시장 <small>(Veterinary Diagnostics Market)</small>	 인체 체외진단 시장 <small>(In Vitro Diagnostics Market)</small>	 환경 모니터링 시장 <small>(Environmental Monitoring Market)</small>
2013 USD 2,859M	2012 USD 49,297M	2015 USD 14,300M
2013-2018 CAGR 8%	2012-2017 CAGR 7.1%	2015-2020 CAGR 7.5%
2018 USD 4,200M	2017 USD 69,141M	2020 USD 20,529.5M

※ 상기 시장규모 및 성장률에 관한 정보는 시장조사전문기관 Marketsandmarkets의 자료임

4-2 기업화 추진방안

가. BM 수립 배경

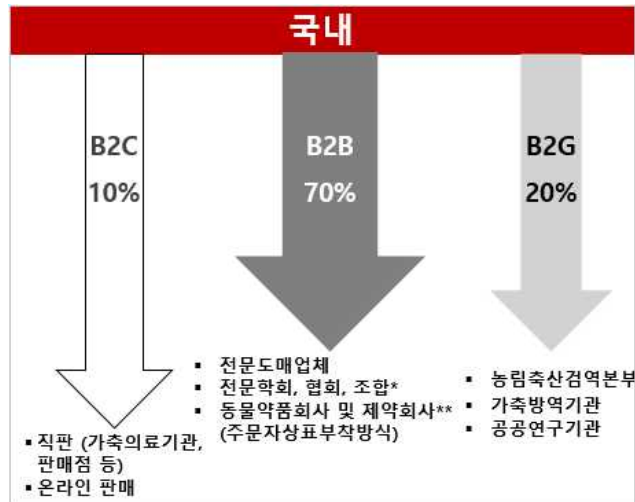
본 제품의 사업화는 가격경쟁력과 민감도, 짧은 진단시간, 사용 후 소각이 용이하다는 장점을 바탕으로 경쟁사인 IDEXX, 바이오노트와 경쟁하여 먼저 국내 시장 진출을 통해 해외시장 확대로 사업화를 추진하고자 함.

국내 연구개발을 통한 사업화 프로그램과 중소기업제품 성능 인증 등을 통해 제품 신뢰성을 확

보하여 국내 농가에 정부 조달을 통한 보급과 수의사 단체와 연계한 축산농가 보급을 통해 빠른 시간 내에 시장진출을 진행

- [B2G] : 가축 질병 진단 방역 조달사업 (국내 조달) , 국내 조달사업을 통해 확보된 신뢰성을 바탕으로 저개발국가 지원사업인 해외 ODA, KOICA 등 프로그램을 통해 해외 시장 진출 추진

- [B2B] : 제품 공급 채널은 직접 판매보다는 기존 유통망을 구비한 도소매 업체를 활용하거나, 수의사의 시장 영향력이 높은 특수성을 고려하여 주요학회를 통한 제품 홍보



나. BM 목표 및 핵심경쟁요인

(1) BM 목표

- 국내 시장에서 가격경쟁력과 사용의 편리성, 짧은 진단시간 등을 통한 조기진단을 통한 경제적 효과와 제품의 신뢰성을 확보하여 해외 수출 추진
- 초기시장 진입시 연구자 보유 네트워크 기업과 연계하여 기술제휴 및 업무제휴를 통해 해외 시장 개척
- 각종 박람회나 해외 전시회에 참가하여 제품 홍보
- 우진 B&G, 코미팜, 중앙백신연구소 社와 업무협력 MOU를 통해 해외유통 확장
 - 아시아 17개, 중동 7개, 남미 5개, 아프리카 3개, 유럽 4개 국가의 영업망 보유 가능
 - 우진 B&G 社는 Novartis(스위스), Janssen(벨기에), Intervet-Schering plough(미국), Biochemie(오스트리아) 등 다국적 기업과의 파트너쉽을 통해 수준높은 기술력과 노하우를 공유하고 있음

(2) 핵심경쟁요인

- 저렴한 매출원가를 고수익 유통마진으로 활용하여 중간 디스트리뷰터와의 Win-Win 마케팅 전략 구조 추진
- 연구개발 종료 후 3년까지 관련 기술인증 획득 완료 후 반려동물 시장 진입
- 농림축산검역본부, 각 지자체 방역기관의 정부사업을 통해 초기매출 확보
- 내수시장을 통해 해외진출 기반을 마련하여 수출 시장 확장

나. 수익 확보 전략

(1) 주요 고객군

- 국내 양계 축산 농가 : 직접 제품 판매 또는 인터넷 통신 판매
- 동물 백신 제조업체 또는 동물 약품 제조 업체 : 제품판매, 서비스판매, OEM 제조 판매
- 전문도매업체 : 제품 판매
- 농림축산 검역 본부 / 시도 가축방역기관 : 조달청을 통한 조달 판매
- 수의사 / 동물병원 : 제품 판매

(2) BM의 수익창출 방안

- 신기술을 이용한 새로운 진단법을 통해 개발단계에서부터 가격 경쟁력과 신뢰성을 바탕으로 해외 제품 및 해외 공급 원료를 근간으로 생산되는 제품과 경쟁력을 확보하여 확보된 경제성을 사용자인 축산 농가에 저렴하게 공급하여 육계 생산 단가의 상승을 방지하며, 안정적인 사업을 영위할 수 있도록 대응하고, 저렴한 매출원가를 통해 전문도매업체, 동물 백신제조업체, 수의사 등 중간 공급자에게도 타사 제품에 비해 상대적으로 높은 수익이 될 수 있도록 가격 정책을 펼쳐 고객확보와 시장확대에 집중해 국내외 유통망 확대가 가능할 것이다.

4-3 기술이전

연구 진행동안 지속적인 연구회 미팅을 통한 연구진과 기업 연구진들의 지속적인 기술 미팅을 통한 기술의 이해를 위해 노력하였으며, 현재 개발된 연구진들의 노력의 결과물들을 기술 이전을 통한 상품화에 적극 노력할 계획임.

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 나노플루이드 3D 플랫폼(Nanofluidic 3D platform)을 이용한 현장용 조류인플루엔자바이러스 진단시스템 개발 (영문)Development of on-site detection system for avian influenza virus using nanofluidic 3D platform				
주관연구기관	충남대학교		주 관 연 구 책 임 자	(소속)충남대학교	
참 여 기 업	(주)씨맥			(성명)신현진	
총연구개발비 (천원)	계	874,000	총 연구 기간	2016. 11. 29 - 2019. 11. 28(3년 월)	
	정부출연 연구개발비	652,000	총 참 여 수	총 인 원	41
	기업부담금	222,000		내부인원	27
	연구기관부담금			외부인원	14
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>본 연구는 조류인플루엔자 및 고병원성인플루엔자 바이러스의 조기 진단을 위한 축산업자용 실시간 고속 현장 진단 키트를 개발하여 조기 진단 및 방역을 가능케 함으로써 조류인플루엔자 바이러스의 2차 확산을 효과적으로 억제하고 축산 농가의 피해를 최소화 하는데 그 목표가 있다</p> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <p>본 연구를 통하여, BioFET 기반 센서 플랫폼 제작 기술 개발, 조류 인플루엔자 바이러스 최적의 항원발현시스템 구축, 항원-항체 반응을 테스트할 수 있는 BioFET 기반 센서 플랫폼 확립 및 제작, 그리고 이를 기반으로 한 조류 인플루엔자 바이러스 감지 시험, 육안 식별이 가능한 실시간/ 고속 현장 진단용 디지털 분석기기 개발과 같은 연구 성과물을 확보하였다.</p> <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <p>BioFET 기반 센서 플랫폼 제작 기술 개발은 조류인플루엔자뿐 아닌 다른 다양한 질병에의 적용이 가능하여 이를 바탕으로 한 다양한 제품군 확보 노력할 계획임. 또한 항원-항체 반응을 테스트할 수 있는 BioFET 기반 센서 플랫폼 확립 및 제작, 그리고 이를 기반으로 한 조류 인플루엔자 바이러스 감지 시험을 통한 결과 확보를 바탕으로 다양한 제품군 확보 노력할 계획임</p>					

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		116167-3	
사업구분	농생명·첨단·수출·가축질병 사업				
연구분야	RB0201			과제구분	단위
사업명	가축질병대응기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	나노플루이드 3D 플랫폼(Nanofluidic 3D platform)을 이용한 현장용 조류인플루엔자바이러스 진단시스템 개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구기관	충남대학교			연구책임자	신현진
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2016. 11. 29 - 2017. 11. 28	158,000	54,000	212,000
	2차연도	2017. 11. 29 - 2018. 11. 28	206,000	70,000	276,000
	3차연도	2018. 11. 29 - 2019. 11. 28	288,000	98,000	386,000
	4차연도				
	5차연도				
	계	2016. 11. 29 - 2019. 11. 28	652,000	222,000	874,000
참여기업	(주)씨맥				
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2020. 1. 20

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
충남대학교	교수	신현진

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	신현진
----	-----

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

우수: 본 연구에서 개발한 나노그물 BioFET 센서는 저비용, 초소형, 우수한 전기적 성능, 초민감도와 낮은 검출 한계의 검출 성능을 가지는 것과 더불어 비표지 감지가 가능함에 따라 현장형 BioFET 진단 기기에 적용 가능한 획기적인 기술임.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

우수: 연구개발결과는 기술적, 경제적, 산업적, 사회적 측면으로 우수한 파급효과를 가진다. 저비용, 현장형, 고감도, 정량적 진단이 가능하며 공중보건학적 대응체계 및 국가 방역시스템 구축에 기여한다. 가스센서, 바이오센서, 의료용센서 등 다양한 분야로 확장할 수 있는 원천기술이며, 의료, 환경, 보건, 검역 등 관련 산업의 경제적, 산업적 파급효과와 수입대체효과, 글로벌 진단 시장으로의 진입을 가능케 하는 우수한 결과임.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

우수: 저비용, 현장형, 고감도, 정량적 진단이 가능하며 최첨단 진단 플랫폼 시스템 장비의 독자적 개발이 가능함. 또한, 채널 표면에 다양한 생화학적 기능기를 도입함으로써 본 연구의 타겟인 조류인플루엔자 외에도 다양한 질병의 진단에 적용하여 고감도 신속진단이 필요한 가스센서, 바이오센서, 의료용 센서 등 다양한 분야로의 확장이 가능함.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

보통: 연차별 추진 일정에 따라 연구개발을 수행하였으나 아직까지 다양한 샘플들에 대한 적용등 추가 연구 필요.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

보통 : 인플루엔자 검출과 관련한 내용을 담은 SCI 급의 논문을 포함하여 기타 논문, 인력 양성, 학술회의 발표 등은 우수한 성과를 보여주며 과제 목표에 상응하지만 아직까지 특허 출원, 등록 및 제품화 목표 달성 미흡.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
BioFET 기반 센서 플랫폼 제작 기술 개발	20	20	
조류 인플루엔자 바이러스 최적의 항원발현시스템 구축	30	30	
항원-항체 반응을 테스트할 수 있는 BioFET 기반 센서 플랫폼 확립 및 제작, 그리고 이를 기반으로 한 조류 인플루엔자 바이러스 감지 시험	20	20	
육안 식별이 가능한 실시간/ 고속 현장 진단용 디지털 분석기기 개발	30	25	진단기기의 커버 디자인 확보 필요
합계	100점	95점	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구는 조류인플루엔자 및 고병원성인플루엔자 바이러스의 조기 진단을 위한 축산업자용 실시간 고속 현장 진단 키트를 개발하여 조기 진단 및 방역을 가능케 함으로써 조류인플루엔자 바이러스의 2차 확산을 효과적으로 억제하고 축산 농가의 피해를 최소화 하는데 그 목표가 있는 과제로, 진단용 항원의 개발 및 반응성 평가 완료, BioFET 기술 이용 진단 시스템 및 진단 기기의 확보가 이루어져 목표 대비 결과물 확보를 할 수 있었다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

BioFET 기술 이용 진단 시스템 및 진단 기기의 확보가 이루어져 목표대비 결과물 확보를 할 수 있었으며, 이를 참여기업에 기술 이전을 실시하고 제품을 상품화 및 상품 등록에 노력하고자 한다.

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

--

2. 연구기관 자체의 검토결과

--

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	나노플루이드 3D 플랫폼(Nanofluidic 3D platform)을 이용한 현장용 조류인플루엔자바이러스 진단시스템 개발			
주관연구기관	충남대학교		주관연구책임자	신현진
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	652,000	222,000		874,000
연구개발기간	2016. 11. 29 - 2019. 11. 28			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(상품화 추진 중) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유: _____)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
BioFET 기반 센서 플랫폼 제작 기술 개발	100%
조류 인플루엔자 바이러스 최적의 항원발현시스템 구축	100%
항원-항체 반응을 테스트할 수 있는 BioFET 기반 센서 플랫폼 확립 및 제작, 그리고 이를 기반으로 한 조류 인플루엔자 바이러스 감지 시험	100%
육안 식별이 가능한 실시간/ 고속 현장 진단용 디지털 분석기기 개발	95%

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	20	20			20			10					15	15						
최종목표	2	2			2			3			2	0	6	27						
연구기간내 달성실적	1	1			0			14			6	2	6	27						
달성율(%)	50				0			46 0			30 0	20 0	10 0	10 0						

4. 핵심기술

구분	50핵심기술명
①	BioFET 기반 센서 플랫폼 제작 기술 개발
②	조류 인플루엔자 바이러스 최적의 항원발현시스템 구축
③	항원-항체 반응을 테스트할 수 있는 BioFET 기반 센서 플랫폼 확립 및 제작, 그리고 이를 기반으로 한 조류 인플루엔자 바이러스 감지 시험
④	육안 식별이 가능한 실시간/ 고속 현장 진단용 디지털 분석기기 개발

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장에로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술					v					
②의 기술										
③의 기술		v								
④의 기술					v					

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	BioFET 기반 센서 플랫폼 제작 기술 개발은 조류인플루엔자뿐 아닌 다른 다양한 질병에의 적용이 가능하여 이를 바탕으로 한 다양한 제품군 확보 노력할 계획임
②의 기술	조류 인플루엔자 바이러스 최적의 항원발현시스템 구축을 통한 poly 및 monoclonal antibody 확보하여 다양한 sensing 기술을 이용한 진단 기술 확용에 이용 가능
③의 기술	항원-항체 반응을 테스트할 수 있는 BioFET 기반 센서 플랫폼 확립 및 제작, 그리고 이를 기반으로 한 조류 인플루엔자 바이러스 감지 시험을 통한 결과 확보를 바탕으로 다양한 제품군 확보 노력할 계획임
④의 기술	육안 식별이 가능한 실시간/ 고속 현장 진단용 디지털 분석기기 개발로 다양한 제품군 확보 노력할 계획임

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명					
가중치	20	20				20		10					15		15				
최종목표	2	2				2		3			2	0	6		27				
연구기간내 달성실적	1	1				0		14			6	2	6		27				
연구종료후 성과창출 계획	1	1				2													

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			