

보안과제() 일반과제(O)

과제번호 108109-3

발간등록번호

11-1541000-001201-01

우유잔류 항생제 검출을 위한 광학바이오센서 개발

(Development of optical biosensor for detection of antibiotics residual at raw milk)

서울대학교

농림수산식품자료실



0004564

농림수산식품부

최 종 보 고 서

보안과제(), 일반과제(O) 과제번호 108109-3

우유 잔류 항생제 검출을 위한 광학바이오센서 개발

(Development of optical biosensor for detection of antibiotics residual at raw milk)

서울대학교 정밀기계설계연구소

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “우유 잔류 항생제 검출을 위한 광학바이오센서 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011년 12월 19일

주관연구기관명 : 서울대학교

정밀기계설계연구소

주관연구책임자 : 김 기 성

연 구 원 : 김 민 성

연 구 원 : 강 도 현

연 구 원 : 배 원 규

연 구 원 : 김 홍 남

협동연구기관명 : (주)메디안디노스틱

협동연구책임자 : 주 후 돈

협동연구기관명 : (주)한비세트론

협동연구책임자 : 정 유 섭

요 약 문

I. 우유 잔류 항생제 검출을 위한 광학 바이오센서 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

우유 잔류 항생제 물질을 다중, 신속, 정확히 검출할 수 있는 휴대용 바이오센서를 개발한다.

- (1) 다중 검출 마이크로 디바이스 제작 및 항생제 면역응집반응 알고리즘 개발
- (2) 항생제 검출을 위한 Bio/Immuno receptor 및 nano-bioprobe 개발
- (3) 면역응집반응을 이용한 항생제 검출 광학센서 개발

III. 연구개발 내용 및 범위

- (1) 다중 검출 마이크로 디바이스 제작 및 항생제 면역응집반응 알고리즘 개발
 - MEMS 기술 적용 다중 검출 Microfluidic chip 제작
 - 라텍스 입자, PDA 리포솜을 이용한 면역응집반응 최적화
 - 산란광 및 형광측정을 통한 항생제 정량적 분석법 개발
- (2) 항생제 검출을 위한 Bio/Immuno receptor 및 nano-bioprobe 개발
 - 상용화된 항체를 이용하여 성능검사를 할 수 있는 표준 설정
 - 라텍스 입자에 고정화 시킬 수 있는 새로운 단클론, 다클론 항체 개발
 - sulfonamides, fluoroquinolones, b-lactam 계열에 특이성을 가진 항체 개발
- (3) 면역응집반응 산란광 검출 광학센서 개발
 - 신호 추출을 위한 마이크로 프로세서와 신호처리장치 키트 설계와 개발
 - optical fiber를 위한 광원 source와 신호처리를 위한 USB모듈의 소형화 및 집적화
 - 다중 스캔을 위한 이동식 검출 스테이지 개발

IV. 연구개발결과

- (1) 라텍스 입자와 항생제 압타머를 이용한 항생제 검출법 개발
- (2) PDA 리포솜을 이용한 항생제 검출법 개발
- (3) sulfonamides, fluoroquinolones, b-lactam 계열에 특이성을 가진 항체 개발
- (4) 응집반응용 nano-bioprobe 개발
- (5) 항생제 검출용 산란광 및 형광 측정 광학센서 개발

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- (1) 현재 기존의 잔류 항생제 표준 검출 방법으로는 여러 가지 대상물질을 전부 조사하기 위한 검출방법이 복잡하고, 많은 시간이 소요되며, 휴대용 장비로 개발하기에는 많은 어려움이 있는데, 나노 MEMS기술로 제작한 바이오센서를 이용하면 검출이 간편해 검사 인력과 비용절감의 큰 효과를 가져 올 수 있다.
- (2) 한 번의 샘플 주입으로 동시에 다중 측정이 가능한 바이오센서의 개발로, 전량 외국에서 수입되는 Dip stick type의 rapid kit의 단점을 보완하고 검출 방법의 간소화로 탁상용 또는 휴대용 검출장비로 개발이 가능하고, 온라인 모니터링을 통한 중앙 집중방식으로 식품안전의 감시체계 구축이 가능하다.

Summary

I. Development of an optical biosensor to detect residual antibiotics in milk

II. Study objective and necessity

To develop a portable biosensor which detect multiple residual antibiotics of milk in a prompt and accurate manner.

- (1) Fabrication of a micro-device to detect multiple antibiotics and development of an antibiotic immuno-agglutination response algorithm
- (2) Development of bio/immuno receptor and nano-bioprobe for antibiotic detection
- (3) Development of an antibiotic detection optical biosensor using immuno-agglutination response

III. Development content and range

- (1) Fabrication of a micro-device to detect multiple antibiotics and development of an antibiotic immuno-agglutination response algorithm
 - Fabrication of a microfluidic chip applying a MEMS technology for multiple detection
 - Optimization of immuno-agglutination response using latex particle and PDA ribosome
 - Development of a method to quantify antibiotics using light scattering and fluorescence measurement
- (2) Development of bio/immuno receptor and nano-bioprobe for antibiotic detection
 - Standardization of a performance test using commercialized antibiotics
 - Development of mono- or multi-clone antibiotics to fix latex particle
 - Development of an antibiotics specific to a series of sulfonamides, fluoroquinolones, and b-lactam
- (3) Development of an antibiotic detection optical biosensor using immuno-agglutination response
 - Design and development of micro processor and signal processing kit for signal extraction
 - Miniaturization and integration of an USB module to process optical fiber light source and associated signal
 - Development of portable detection stage for multiple scanning

IV. Research & development results

- (1) Development of an antibiotic detection method using latex particle and antibiotic aptomer
- (2) Development of an antibiotic detection method using PDA ribosome
- (3) Development of an antibiotics specific to a series of sulfonamides, fluoroquinolones, and b-lactam
- (4) Development of a nano-bioprobe for immuno-agglutination response
- (5) Development of an optical biosensor for measuring light scattering and fluorescent light

for the antibiotic detection

V. Anticipated study achievement and application plan

- (1) Current existing standards ways to investigate all of the target substance for the detection of antibiotic residues is complex and time-consuming, and difficult to develop as a portable device. Thus a new biosensor developed based on nano-MEMS technology may allow for easy detection and thus save labor and expense.
- (2) Development of a biosensor that a single sample injection can allow biosensor to detect multiple substances simultaneously can supplement drawbacks of substitute dip stick type rapid kit, which completely depends on imports at present, and simplify detection method allowing for development of desktop or portable detection device. In this way, online monitoring system at a centralized manner can be realized as a new surveillance system for food safety.

CONTENTS

Summary	3
Chapter 1. Overview of Reaserch and development	9
1. The importance of research and development and research and development needs of the target	9
1. Economic and industrial side	9
2. The need for research and development	9
Chapter 2. Comparison of Koreac and foreign technical developments	11
1. Comparison of Korea and foreign technologies for this study	11
1. Levels of Korea and foreign technology and Research Status	11
2. Status both Korea and foreign research	11
3. The team technical level and domestic level	12
Chapter 3. Contents and results of research performed	14
1. Design and production of biosensor for antibiotic detection in raw milk	14
1. Manufacturing of microfluic device for experimental	14
2. Micro-devices for detection of high-volume production of residual antibiotic	18
3. Scattering particle immunoagglutination methods of laboratory measurement.	19
4. The development of detection probe using Non-labelling method	23
1. Highly carboxyl Latex bead에 antibiotic antibody 고정화 시키는 방법	23
2. The method of immobilized antibiotic antibody on highly carboxyl latex bead	24
3. Development of sensitivity PDA polymer liposome sensor	29
4. Synthesis of PCDA-Epoxy Monomer	29
5. Detection result of antibiotic used lipid probe	37
6. Detecton result of antibiotic used aptamer probe	37
7. Detection result of antibiotic used multi-biosensor chip	41
8. Research of PDA Liposome Coating on bead	43
2. Development of Bio/Immunoreceptor and nano-bioprobe for antibiotic detection	47
1. Development of recombinant PBP Bioreceptor	47
2. Development of Immunoreceptor	50
3. Production of developed monoclonal and polyconal antibody	54
4. Bioreceptor evaluation validity and selection	56
5. Final selection of Bioreceptor	60
6. Bioprobe production optimization and selected as representative for the standardization Immuno-receptor	61
3. Development of scattered light and fluorecence detection measurement optical fiber	

device for immune agglutination	72
Chapter 4. The goal of achieving and contribution of related fields	94
1. Design and production of biosensor for antibiotic detection in raw milk	94
2. Development of Bio/Immunoreceptor and nano-bioprobe for antibiotic detection	95
3. Development of scattered light and fluorescence detection measurement optical fiber device for immune agglutination	96
Chapter 5. Utilization of research and development plan	97
1. Accomplishment of this project	97
1. Accomplishment of manuscript	97
2. Accomplishment of patent	98
3. Additional research and plant to take advantage other research	100
Chapter 6. Collection of international scientific and technical information	106
1. Patent analysis	106
2. Manuscript analysis	106
Chapter 7. Reference	108

목 차

제 출 문	1
요 약 문	2
Summary	3
제 1 장 연구개발과제의 개요	9
제 1 절 연구개발 대상 기술의 중요성 및 연구개발의 필요성	9
1. 경제적·산업적 측면	9
2. 연구개발의 필요성	9
제 2 장 국내외 기술개발 현황	11
제 1 절 본 연구관련 국내외 기술수준 비교	11
1. 국내외 기술 수준 및 연구현황	11
2. 국내외 연구현황	11
3. 본 연구팀의 기술수준 및 국내수준	12
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	14
제 1 절 우유 내 잔류 항생제를 검출 바이오센서 설계 및 제작	14
1. 실험용 마이크로 디바이스 제작	14
2. 양산형 잔류 항생제 검출 용 마이크로 디바이스 제작	18
3. 실험실용 입자응집반응 산란광 측정장치 및 측정방법	19
제 2 절 Non-labelling 방법을 이용한 검출 probe의 개발	23
1. Highly carboxyl Latex bead에 antibiotic antibody 고정화 시키는 방법	23
2. 바이오 프루브 고정용 lipid vesicle 개발	24
제 3 절 고감도 PDA polymer liposome 센서 개발	29
1. PCDA-Epoxy Monomer 합성	29
2. PDA liposome 조립	34
3. PDA liposome 유리 기판 제작	34
4. 항체를 Probe로 이용한 항생제 검출 결과	35
5. Lipid를 Probe로 이용한 항생제 검출 결과	37
6. Aptamer를 probe로 이용한 항생제 검출 결과	37
7. Lipid를 Probe로 이용한 항생제 검출 결과	37
8. Aptamer를 probe로 이용한 항생제 검출 결과	37
9. 다중 검출 PDA 칩을 이용한 항생제 검출	41
8. PDA Liposome의 Coating 연구	43
제 2 절 항생제 검출을 위한 Bio/Immunoreceptor 및 nanobioprobe 개발	47
1. 유전자재조합 PBP Bioreceptor 개발	47
2. Immunoreceptor 개발	50
2. 개발된 단클론항체 및 폴리항체의 생산	54
3. Bioreceptor 유효성 평가 및 선정	56
4. Bioreceptor 후보 최종 선정	60
5. Bioprobe 제작 최적화 및 표준화를 위한 대표 Immuno-receptor 선정 및 응집반응 최적화	

를 위한 이론적 분석 모델 가정	61
제 3 절 면역응집반응 산란광 및 형광 검출 광학센서개발	72
1. 산란광 측정 장치 제작	72
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	94
제 1 절 다중검출 마이크로 디바이스 제작 및 항생제 면역응집반응 알고리즘 개발	94
제 2 절 항생제 검출을 위한 Bio/Immuno receptor 및 nano-bioprobe 개발	95
제 3 절 면역응집반응 산란광 및 형광 검출 광학센서 개발	96
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	97
제 1 절 연구개발 성과	97
1. 대표 논문 게재 성과	97
2. 특허 성과	98
3. 추가 연구 및 타연구 활용 계획	100
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	106
제 1 절 특허분석	106
1. 국외특허 분석 범위	106
2. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성	106
제 2 절 논문분석	106
1. 논문분석 범위	106
2. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성	107
제 7 장 참고문헌	108

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 대상 기술의 중요성 및 연구개발의 필요성

1. 경제적·산업적 측면

현재 우리나라 국민들은 선진국을 향해 경제가 성장함에 따라 복지 및 건강에 대한 관심이 증대 하고 있다. 특히 식생활 재료의 수입이 폭발적으로 증대하고 있으며, 우유에 대한 수요증가 및 각종 유제품의 생산량도 증가하고 있다. 이로 인해 수입 식품의 안전 관리를 위한 검사가 강화 되고 있으며, 축산업자들이 생산하는 원유에 대해서도 관리 감독을 강화 하고 있다. 하지만 이들 식품의 안정성을 확보하기 위한 고가의 검사 장비를 구비하기가 쉽지 않으며, 검사 수단도 복잡하여 간편하게 우유 내 잔류 항생제를 검출하기 위한 키트를 전량 수입해서 사용하고 있다. 본 연구를 통한 잔류 항생제 복합 검사 바이오센서의 개발을 통해 현재 선진국에 의존하고 있는 검사 키트의 수입 문제를 해결할 수 있고, 또한 나노 MEMS 기술을 활용한 신속, 정확, 휴대용 검사장치의 개발은 우유 뿐 만 아니라 기타 농산물의 잔류 농약 검사, 농작·축산물 질병 및 환경오염의 검출도 가능하여 산업적 파급 효과가 크며 경제적 가치도 높다고 생각된다.

2. 연구개발의 필요성

가. 축산식품으로부터 국민건강의 안정성 확보

농축산물내의 항생제 등 잔류물질에 대한 소비자의 관심이 높아져 안전성이 확보된 축산 식품의 요구가 그 어느때 보다도 강하게 표출됨에 따라 안전한 축산식품을 생산하기 위한 사양관리와 위생관리체제의 강화가 시급한 때이다. 근래 식생활 이 변천됨에 따라 축산식품 특히 우유의 수요증대에 대응하여 그 생산량은 많이 확대되고 축산 경영면 에서도 다두화, 집단화, 나아가서는 시설 축산으로의 사육형태의 변화가 이루어짐에 따라 사료의 종류, 품질 그리고 급여방법도 크게 달라지고 있다. 이러한 축산의 변화는 종래 거의 문제가 되지 않았던 만성적이고 소모성 질병을 유발하여 생산성 저하를 초래하기 때문에 이를 예방하기 위해 사료에 첨가하여 장기간 사용하는 항생제등의 의약품을 광범위하게 사용하는 것이 불가피한 실정이라 할 수 있다. 최근에 발표되는 연구 자료에서도 축산식품에 잔류되는 잔류 항생제에 따라 인체에 미치는 영향에 관해서도 많은 논란이 있으나 세계적인 흐름으로 보아서 그 위해성이 인정되어 결코 바람직스럽지 못하다. 현재 축산 선진국인 호주, 덴마크와 비교하면 항생제의 사용을 규제하고 있음에도 불구하고 한국의 축산농가에서 소, 돼지, 닭 등에 사용하는 항생제의 양이 덴마크 사용량의 16배에 달한다고 보고되고 있으며 이는 내항성을 가진 변종 바이러스의 출현 및 사람에게도 치명적인 질병을 유발할 수 있는 신종 질병의 발병 위험이 높아진다. 따라서, 축산식품의 잔류 항생제를 신속·정확하게 검출하여 국민 건강의 안정성을 확보할 필요성이 크게 증가하고 있다.

나. 신속·간편한 검사로 축산식품의 유통안정성 및 신선도 유지

우유에 항생제가 잔류하는 경우는 대부분 유방암 치료를 위한 항생제나 설파제가 함유된 동물성 의약품을 사용할 경우 젖소로부터 생산된 우유에 항생제나 설파제가 잔류할 수 있다. 또한, 혈액순환을 통해 치료하지 않은 분방에서 수집한 우유 및 근육 주사 등을 통해서도 항생제

가 잔류하는 등 많은 경로를 통해 우유에 항생제가 내포될 위험은 항상 존재하고 있다. 현재 표준 검출방법으로 사용하고 있는 Microbial assay는 검출하는데 많은 단계와 시간이 소요되고 고가의 장비 및 숙련된 기술자가 요구되기 때문에 우유의 신선도를 유지하기 위해 빠르고 정확한 검출 장비가 요구되고 있다.

다. 수입 대체 효과

미국 FDA에서 승인받은 몇 가지 rapid kit가 국내에 도입되어 유가공 현장에서 활용되고 있으나, 수입단가가 비싸며, 한 가지 키트로 특정 항생제만을 검출할 수 있는 제약이 있어 여러 가지 항생제를 동시에 검출하기 위해서는 적지 않은 시간과 비용을 투자해야만 한다.

이들 rapid kit를 보완할 새로운 항생제진단 바이오센서를 개발한다면 유가공 회사 뿐 만 아니라 저렴한 가격으로 각 축산농가에 보급할 수 있어 원천적으로 잔류 항생제로 오염된 우유가 신선한 우유와 혼합되는 것을 방지할 수 있다.

라. 항생제 특이성 항체의 개발로 원천기술 확보

이러한 센서를 개발하는데 있어서 항생제에 특이성 있는 항체를 개발하는 것은 매우 중요한 단계이다. 현재까지 보고된 항체의 특이성을 살펴보면 몇 가지 항생제에 동시에 반응함으로써 특정 물질을 검출하는데 있어서 정량적 분석이 어려워 간단한 오염여부만을 판단할 수 있다. 따라서, 이들 특이성 항체의 개발은 바이오센서의 핵심 기술로써 아직까지 보고되지 않은 원천적인 기술로 선진국 보다 기술적 우위의 확보가 가능하다.

마. 국가적 감시체계의 확립

2003년부터 항생제 내성 안전관리 사업이 시행되고 있으며 2005년부터 감축을 시작하여 2011년에는 완전히 금지한다는 목표를 세우고 국가적으로 잔류 항생제에 대한 감시 체계를 강화하고 있다. 현재 사용되고 있는 항생제 진단방법으로는 체계적으로 우유 내 잔류 항생제를 감시하기가 불가능하다. 특히 Point of Care Test (POCT)와 같이 축유 현장과 저장탱크, 수집탱크차량에서 우유의 항생제 검출이 필수 불가결하며 이를 간편하게 검출하는 바이오센서를 개발 함으로써, 국가적으로 축산식품의 안전성 확보에 큰 도움이 될 것이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

1. 국내외 기술 수준 및 연구현황

개념정립 단계		기업화 단계	◎	기술 안정화 단계	
---------	--	--------	---	-----------	--

가. 대표적인 잔류 항생제 검사 방법으로 microbial assay와 high performance liquid chromatography (HPLC), thin layer chromatography(TLC), electrophoresis등이 사용되고 있다. 이들 방법은 잔류 항생제를 검출하는 방법에 있어서 정확성은 뛰어나나 장비 및 숙련된 기술자가 요구되며 장시간의 검사시간이 소요된다.

나. 잔류 항생제중 sulfonamide, quinolone 타입의 항생제 검출법으로 STAR protocol과 TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride reduction) test를 이용하고 있으며, TTC test는 표준검사 방법으로 채택되어 있다. 하지만 이들 방법도 복잡한 단계를 거침으로써 고가의 검사비용 및 검출하는데 장시간이 소요된다.

다. 현재 우유 회사 및 축산 농가에서 사용되는 Dip stick type의 rapid kit는 전량 미국FDA승인을 받은 미국 및 유럽제품을 사용하고 있으며, 국내에서 생산되는 제품은 전무하다.

라. 잔류 항생제 검출을 위한 항체 개발을 하는 국내기업은 없는 상태이며, 일부 식품개발 연구원 등에서 연구용으로 개발하고 있는 실정이다.

마. 항생제 검출용 바이오센서 자체의 개발은 일부 연구기관 및 대학에서 진행 중에 있으나, 상용화 된 것은 없으며, 특히 검출장비와 결합한 항생제 검출 바이오센서 시스템은 전무한 상태이다.

2. 국내·외 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
동국대학교(한국)	HPLC,microbial assay를 이용하여 우유내 잔류 sulfonamide, quinolone 항생제 분석	sulfamerazine계 항생제의 일일최대잔류허용량의 국내 기준 확립에 활용
Cornell Univ.(미국)	b-lactam검출용 rapid kit 개발	Charm Science Inc.에서 검출용 키트를 생산 전세계에 판매를 하고 있음
Utrecht Univ. (네덜란드)	b-lactam검출용 광학 바이오센서 개발	연구 개발 시작단계
스페인 식품농업연구소 (스페인)	Magnetic nanoparticle을 이용한 sulfonamide계 잔류항생제 분석	sulfonamide계 검출 특이항체 생산에 성공
Ludwig-Maximilians Univ. (독일)	잔류항생제 검출을 위한 자동화 시스템 개발	chip 기반의 시스템을 이용하여 항생제를 동시에 여러 가지를 검출하는 기술 제공

3. 본 연구팀의 기술수준 및 국내수준

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준	
		우리나라	연구신청팀
잔류항생제 진단센서	미국	60	80
특이항체개발	미국	20	70

가. Optical fiber를 이용한 면역반응 검출 시스템 연구

본 연구진은 마이크로 채널 내부의 혼합 문제를 해결하기 위하여 carboxyl화 시킨 라텍스입자(그림 1)와 마이크로채널을 이용하여 입자 면역 응집반응(particle immunoagglutination, 그림 2)이 일어날 때 발생하는 산란광의 차이를 optical fiber 센서(그림 3)로 측정하고 정량화 하여 대장균의 농도를 측정하는 연구를 수행 하였다.

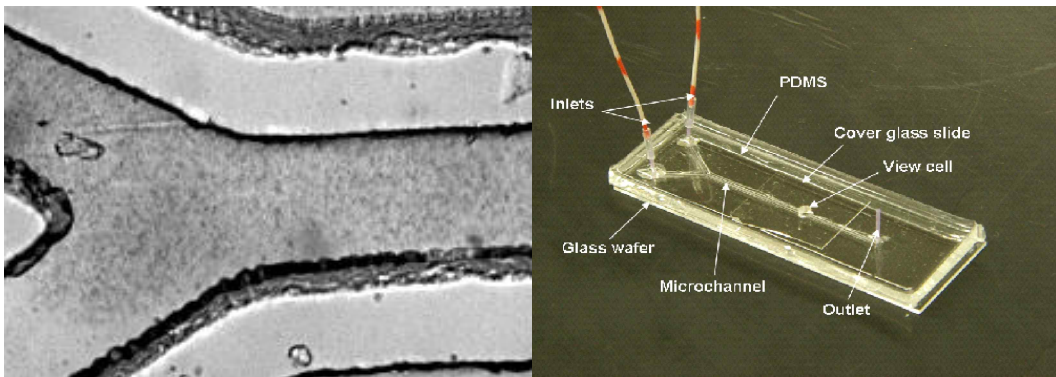


그림 1 마이크로채널 내부의 혼합 사진(좌)과 사용된 마이크로 채널(우) (Analytica Chimica Acta, 2007)

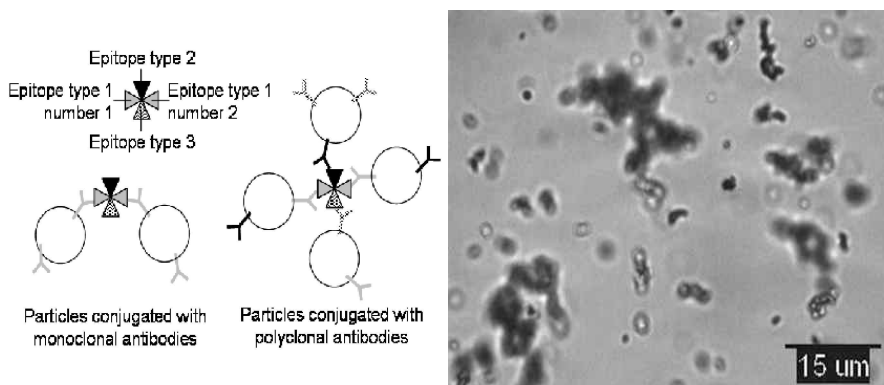


그림 2 입자 면역 응집반응의 개념(좌)과 현미경 사진(우)

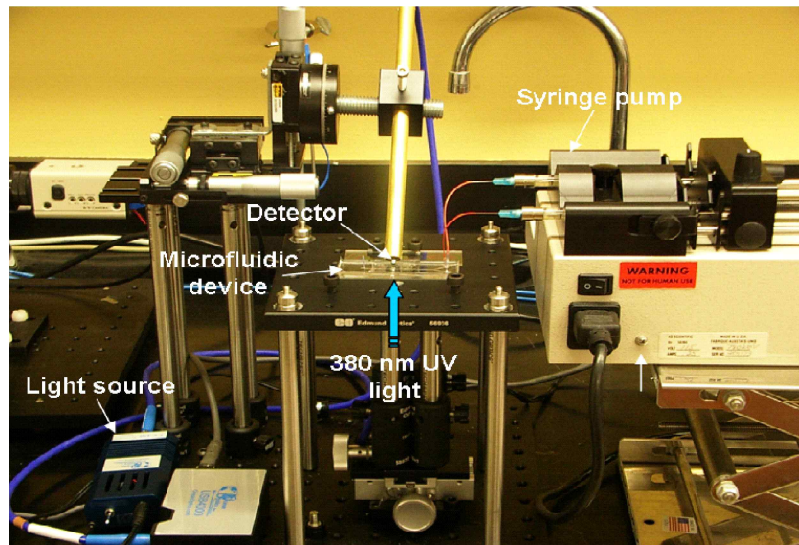


그림 3 입자면역응집반응 검출을 위한 광섬유센서(Biosensors and Bioelectronics, 2008)

나. Polydiacetylene(PCDA)를 이용한 multiplex lipid vesicle 개발

면역응집 반응을 이용하는 다양한 분석 기법에 활용이 가능하다고 생각된다. 특히 ELISA를 이용한 면역 응집 반응의 경우 항체의 고정화 기술이 가장 중요한데, 본 연구에서 제조한 lipid vesicle을 이용하면 ELISA분석 기법에서 항체의 배향성 및 고정화를 동시에 이룰 수 있을 뿐만 아니라, 비특이적 반응을 억제하기 위해 사용되는 blocking 시약을 사용하지 않고도 높은 감도로 측정이 가능하리라 생각 된다. 특히 이러한 lipid vesicle을 패터닝함으로써 drug screening 등과 같이 신약 개발 분야에 응용이 가능하리라 생각 되며, 여러 가지 바이오 센서 소자로써도 활용 가치가 높다.

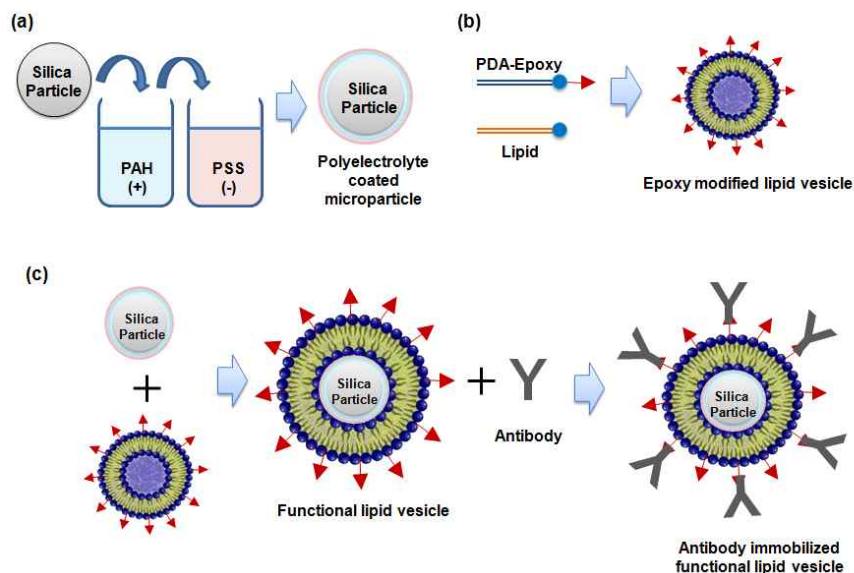


그림 4. 전해질 코팅된 silica particle을 이용한 Epoxy기를 가진 기능성 lipid vesicle의 제조방법과 항체의 고정화 과정

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 우유 내 잔류 항생제를 검출 바이오센서 설계 및 제작

1. 실험용 마이크로 디바이스 제작

가. 미세공기 제거용 마이크로 디바이스 설계 및 제작

면역응집반응의 산란광특성을 측정하기 위해서 제작된 마이크로 디바이스 1세대는 그림 5과 같이 설계 되었다. 이 장치의 경우 Inlet으로부터 유입된 샘플이 바닥면을 통하여 산란광을 측정하는 view cell에서 완벽하게 공간을 채워주지 못하고 outlet으로 빠져 나가는 현상이 종종 발생하여 산란광의 강도에 영향을 주었다. view cell 내부의 미세 공기방울은 산란광의 강도를 증가 시키는 요인으로 반드시 제거 되어야 하는 요인이다.

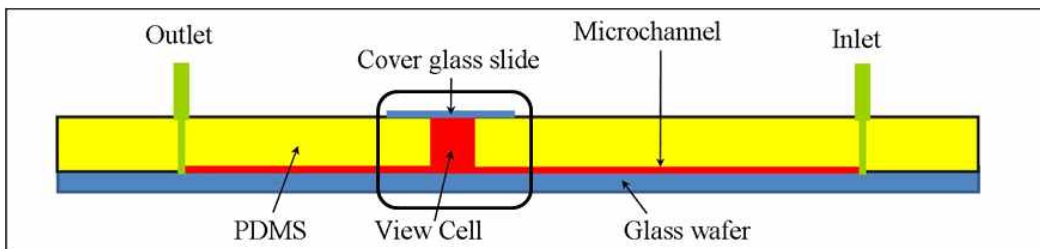


그림 5 면연응집반응 산란광 강도 측정을 위한 Y형 마이크로 디바이스

이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 그림 2와 같은 미세공기방울 제거용 Y형 마이크로 디바이스를 설계 제작 하였다. inlet부분을 개선하여 inlet에서 유입될수 있는 미세공기방울이 채널 내부로 유입되지 못하게 설계 하였고, inlet으로부터 유입되는 샘플이 view cell 부분을 완벽하게 채우고 배출 될 수 있도록 채널을 2단으로 설계 하였다.

그림 6과 같은 마이크로 디바이스를 제작하기 위해서 그림 3과 같이 실리콘 웨이퍼를 이용하여 마스터 몰드를 제작 하였다. 채널의 구조가 2단으로 구성되어 2개의 마스터 몰드가 필요 하고 그 제조 공정을 그림 7과 같고 그림 9는 제작된 마이크로 디바이스 이다.

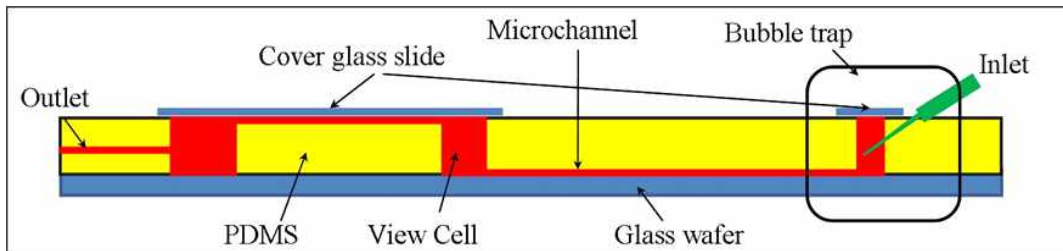


그림 6 미세공기방울제거용 Y형 마이크로 디바이스

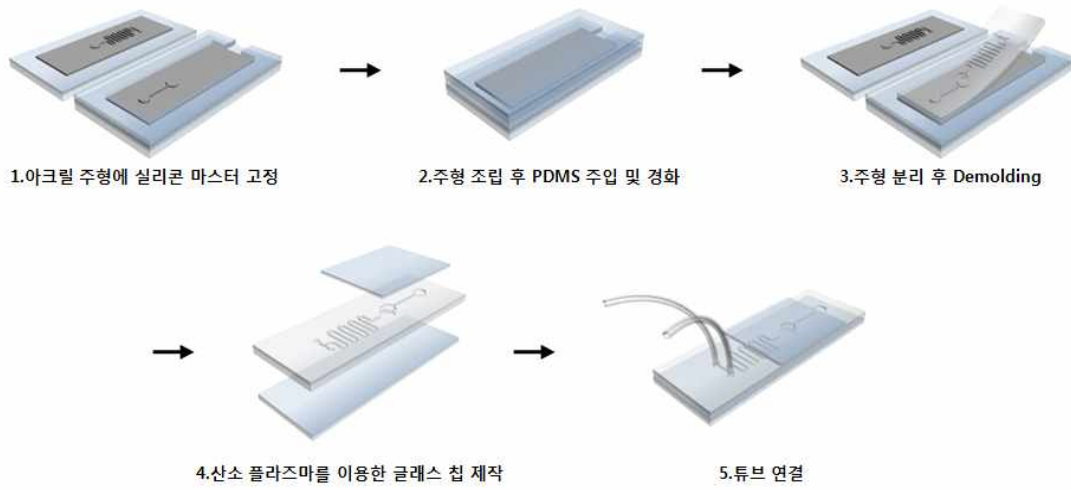


그림 7 마이크로 디바이스 제조 공정

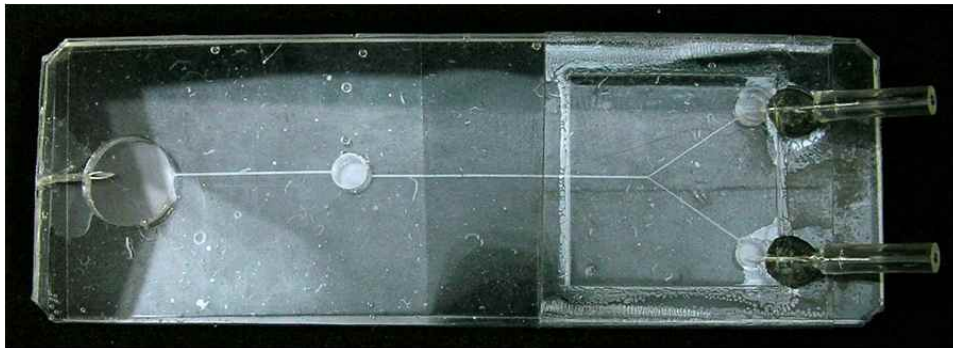


그림 8 미세공기제거용 Y형 마이크로 디바이스

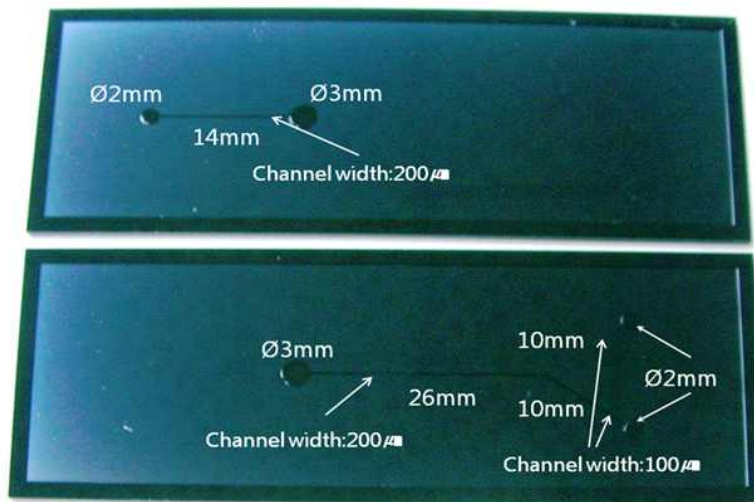


그림 9 미세공기제거용 마이크로 디바이스 제작을 위한 실리콘웨이퍼 마스터 몰드

나. 잔류 항생제 검출 용 마이크로 디바이스 개발 및 개선

면역응집반응의 산란광특성을 측정하기 위해서 제작된 마이크로 디바이스 1세대는 그림 1과 같이 설계 되었다. 이 형태의 미세유체칩의 경우 inlet에서 유입되는 미세공기를 100% 제거 하지 못할 경우 view cell에서 미세공기가 쉽게 빠져 나가지 못하는 경우가 종종 발생 하였다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 inlet에서 들어오는 미세 공기를 view cell 부분에서 신속하게 배출 시키기 위하여 그림 10과 같이 설계를 변경 하였다.

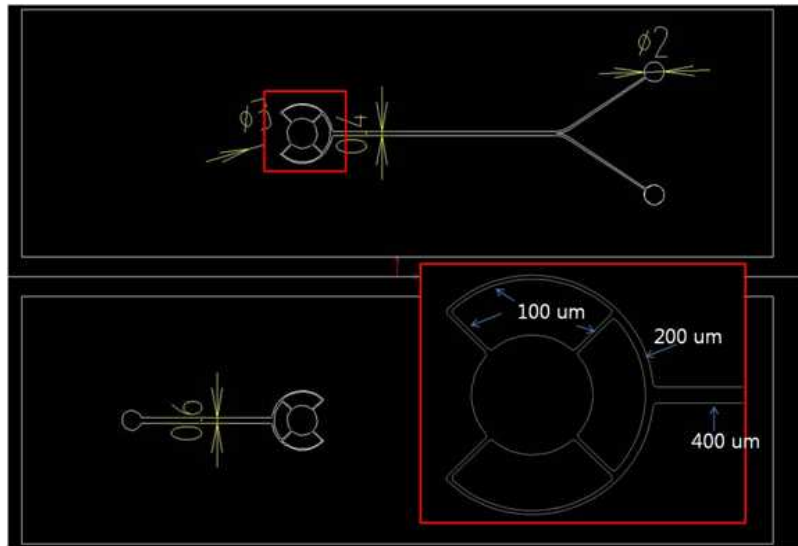


그림 10 View cell 부분의 미세공기 제거용 미세유체칩

그림 10의 Y형 미세유체칩은 샘플과 진단액의 유입구 부분(Y자 형태)의 각 액체의 유입 길이가 길어 유체칩의 제조과정에서 발생할 수 있는 채널의 미세한 변형과 샘플로딩의 시간차에 의해서 두 채널이 만나는 부분에서 혼합이 동시에 일어 나지 않는 문제가 발생한다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 그림 3과 같이 샘플과 진단액이 만나게 되는 점을 까지의 길이를 줄이고 반면 서로 반응 하는 시간을 길게 하기 위하여 그림 11과 같이 설계를 변경 하였다. 또한 측정부에서의 미세공기 발생 확률을 줄이기 위해 측정부의 설계도 변경 하였다.

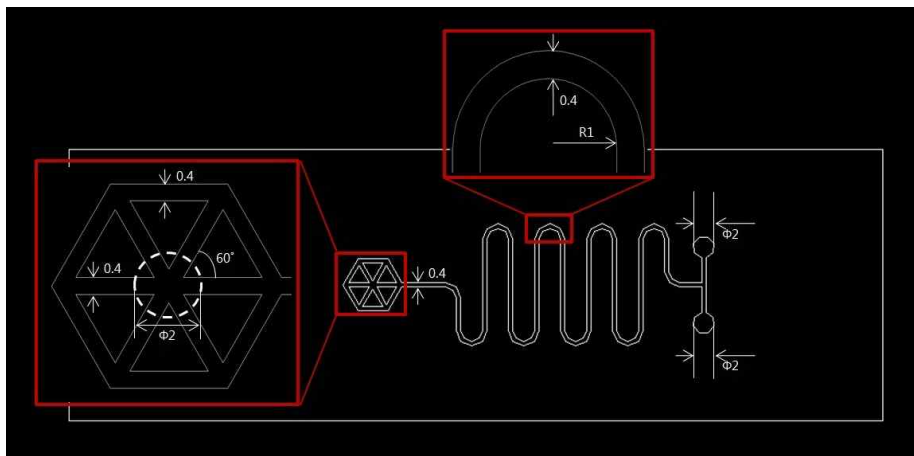


그림 11 Y형 미세유체칩의 단점을 보완한 T형 미세유체칩

그림 11은 유입구쪽의 채널길이를 짧게 하고 형태도 Y형에서 T형으로 변경하고 샘플과 진단용 시약이 충분히 믹싱 될 수 있도록 유로의 길이를 길게 하였다. 또한 view cell 부분에도 공기가 신속하게 빠져 나갈수 있도록 유로의 개수를 늘려서 제작 하였다. 이 경우 유입구쪽에서 발생 하던 문제는 해결이 되었으나 view cell에서 샘플이 완전히 채워지지 않는 문제는 간혹 발생 하였다. 그림 12는 view cell 부분의 문제를 해결 하기 위하여 view cell 주위에 모세관 현상을 일으키는 육각형 모양을 이용한 미세유로를 상 하 부분에 설치하여 샘플이 view cell에 도달하게 되면 사방으로 확산되게 하였다.

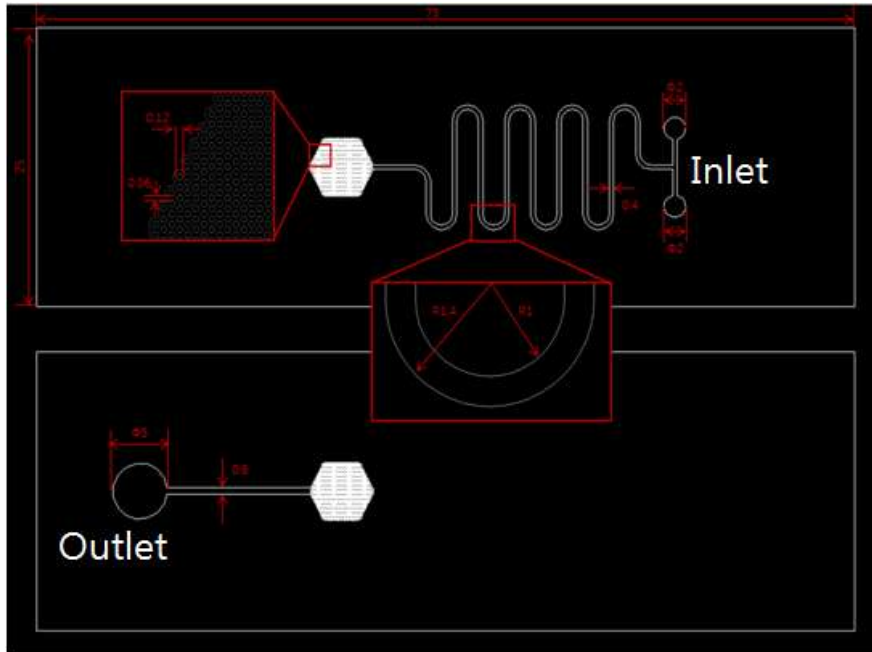


그림 12 View Cell 성능개선 마이크로 디바이스

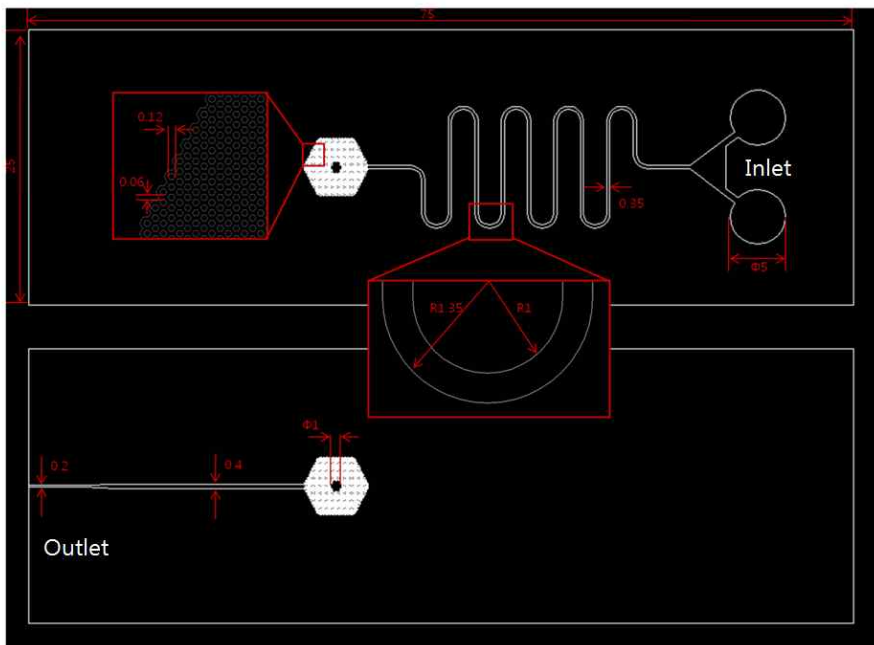


그림 13 마이크로 펌프를 이용한 양산형 마이크로 디바이스

그림 13의 마이크로 디바이스 설계도면은 그림 12의 샘플 Inlet 부분에 샘플을 로딩 할 수 있는 용기를 부착하고, Outlet 부분에서 마이크로 펌프를 이용하여 샘플 로딩 용기로부터 샘플을 빨아들이는 방식으로 설계를 변경하였다. 이와 같이 설계를 변경한 이유는 그림 12와 같은 Inlet 부분에서 샘플을 주입하는 방식은 오염된 샘플이 주입 될 경우 펌프 자체를 소독하지 않으면 펌프의 오염으로 인해 잘 못된 검사 결과를 유발할 수 있으며, 측정 장치를 단순화 하기 위하여 설계를 변경 하였다.

2. 양산형 잔류 항생제 검출 용 마이크로 디바이스 제작

그림 13의 설계를 바탕으로 양산형 마이크로 디바이스의 프로토타입을 제작 하였다. 실험에 사용된 마이크로 디바이스는 PDMS(polydimethylsiloxane)을 이용하여 제작 하였으나, 양산의 경우 PDMS로는 대량생산에 적합하지 않아, 광투과성이 좋고 대량생산 공정에 적합한 재료인 PMMA(polymethymethacrylat)를 이용하여 마이크로 디바이스를 제작 하였다 (그림 14). 그림 14에서 보는 것과 같이 양산형 마이크로 디바이스는 총 5개의 파트로 나누어 제작하여 조립하였다. ①은 샘플과 검출시약을 로딩하기 위한 탱크, ②는 View cell 부분을 덮기 위한 유리 기판, ③과 ⑤는 PMMA로 제작된 두께 1mm의 기판, ④는 미세유체가 흐를수 있게 특수 제작된 필름으로 구성되어 있다.

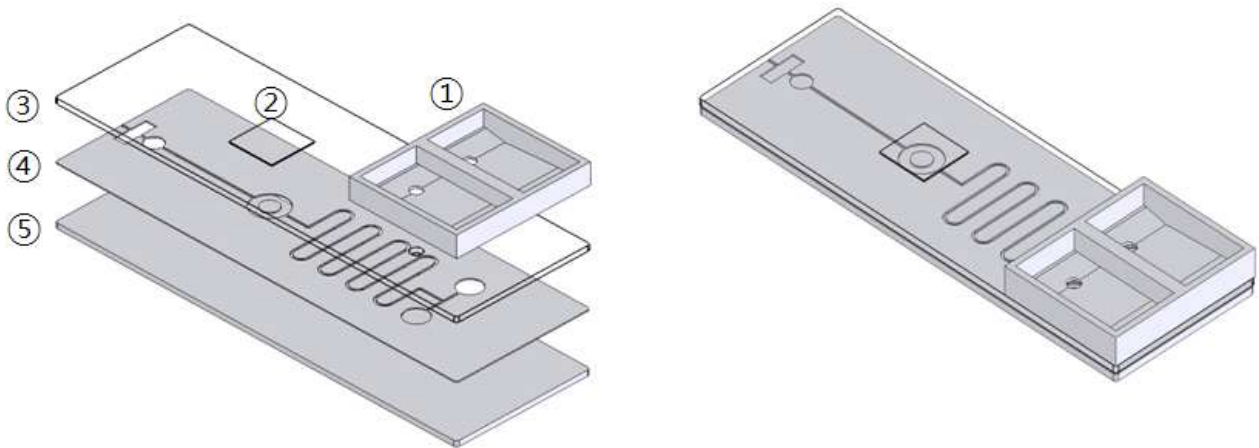


그림 14 PMMA를 이용한 양산형 마이크로 디바이스

3. 실험실용 입자응집반응 산란광 측정장치 및 측정방법

입자응집반응의 산란광을 측정하기 위하여 그림 15의 측정장치의 측정부 미세유동장치(A부분)을 대신하여 그림 16과 같은 미세유체칩 로딩 장치를 개발하여 부착 하였다. 미세유체칩 로딩 장치를 반복실험에 의한 미세유체칩의 좌표변화에 의한 산란광 측정강도의 오차를 줄이기 위하여 개발 하였다. 그림 17은 측정을 위한 광섬유 프루브의 위치를 나타내는 그림이다.

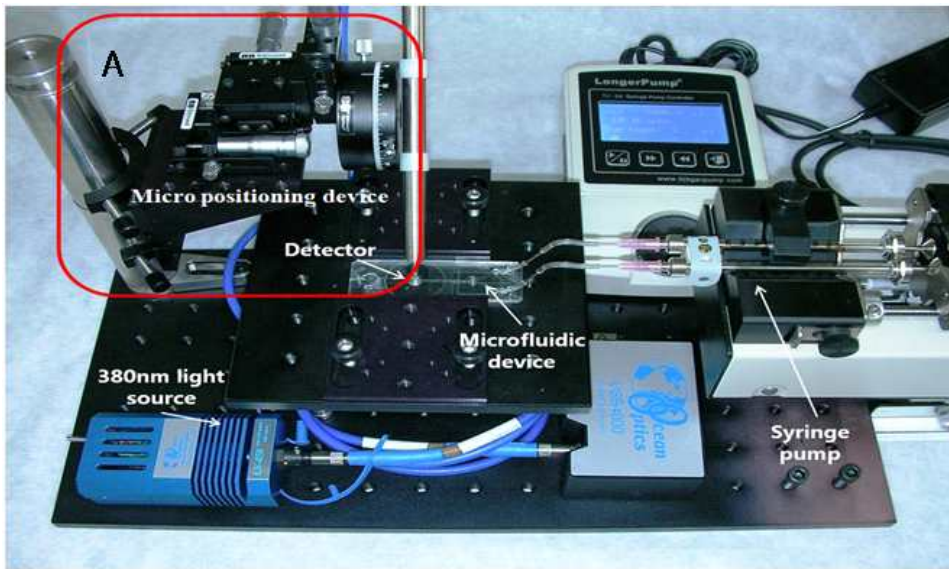


그림 15 입자면역응집반응 산란광 측정장치

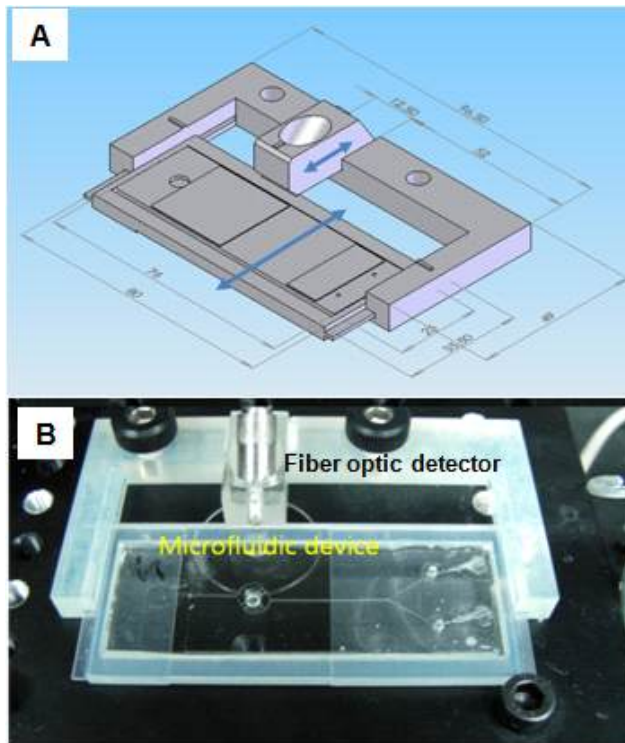


그림 16 미세유체칩 로딩장치

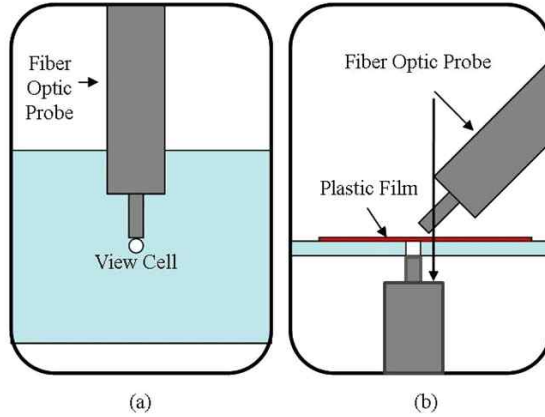


그림 17 입자면역응집반응 산란광 측정을 위한 probe의 위치

다. 500nm 라텍스 입자를 이용한 항생제 검출

면역응집반응을 이용한 특정 물질 검출 연구는 주로 박테리아 및 바이러스 검출에 응용이 되었으나, 본 연구에서는 항원-항체 반응을 이용하여 항생제 검출을 시도 하였다. 500nm 라텍스 입자에 항생제의 한 종류인 gentamicin 항체를 각 라텍스 입자 표면적의 50%를 차지하게 고정시켜 실험을 진행 하였다. 그림 14는 실험 결과이다. X축의 0 이 의미 하는 것은 MES 버퍼를 혼합하였을 때 의 산란광의 강도를 측정한 것이다. B1-B2는 젠타마이신 항체가 고정된 용액과 항생제가 포함되지 않은 용액을 마이크로 디바이스에 주입하여 산란광을 측정한 것이다. 산란광의 강도는 30000 전후 의 값을 나타내고 있다. 그 후 10,000ppb의 젠타마이신 농도 용액과 항체가 고정된 라텍스 입자 용액을 마이크로 디바이스 내부에서 혼합하면 S1-S5까지 값을 보였다. 결과와 같이 젠타마이신이 포함된 용액의 경우 면역응집반응이 어느 정도 일어 나는 것으로 측정되었으나 그 신호의 차이가 확연하게 나타나지 않는 경향을 보였다. 면역응집반응은 라텍스 입자의 크기, 항체의 성능, 마이크로 디바이스를 흐르는 유체의 유속, 항생제의 사이즈에 따라 그 반응의 결과가 다르게 나타 날 수 있으므로 각 항생제별 면역응집반응의 최적 조건을 찾는 실험을 진행 할 것이다.

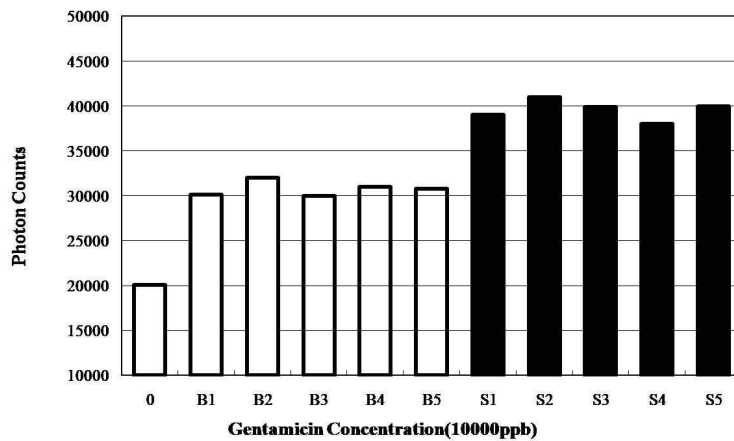


그림 18 500nm 라텍스 입자를 이용한 Gentamicin 검출 결과

라. 옥시테트라실린(oxytetracycline, OTC) 압타머와 미세유체칩 산란광 입자응집반응을 이용한 검출법

옥시테트라사이클린(oxytetracycline, OTC)는 그람음성균, 그람양성균에 대하여 정균화과가 우수한 항생물질로서 축 수산물의 장내세균 감염증, 호흡기 질병등의 치료제로서 뿐만 아니라, 각종 질병을 예방하고 사료 효율을 높이기 위하여 사료첨가제로서 매우 많이 사용되는 항생물질이다. OTC에 특이성을 갖는 ssDNA 압타머(5'-CGTACGGAATTCGCTAGCN₄₀-GGATCCGAGCTCCACGTG-3')를 합성하여 크기 902nm의 latex입자에 코팅을 하여 진단액을 만들었다.

OTC 압타머 고정 마이크로입자와 산란광측정 장치를 이용하여 OTC의 농도를 측정하였다. 그림 19는 OTC의 응집반응을 광학현미경을 이용하여 확인한 사진이다.

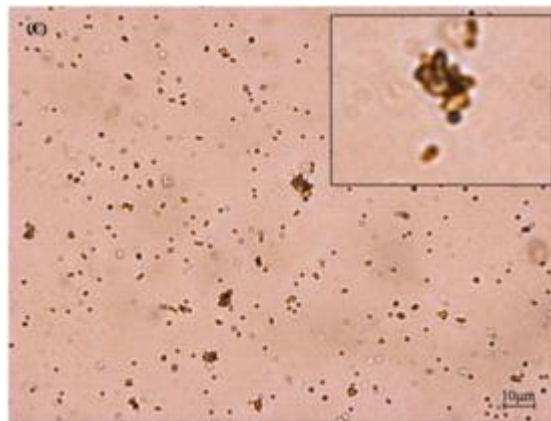


그림 19 OTC 압타머 고정 입자의 응집현상

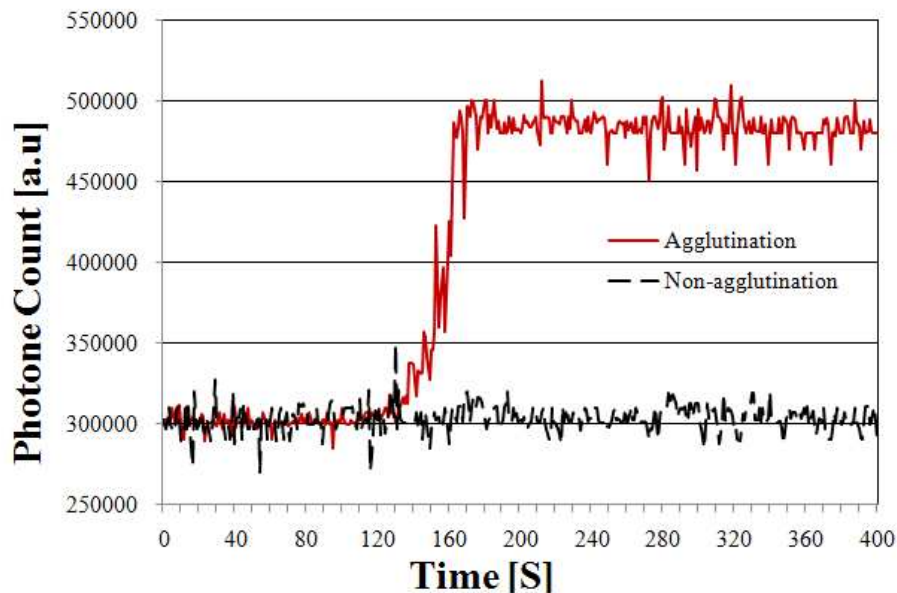


그림 20 산란광 입자응집반응변을 이용한 OTC 검출 시간

그림 20은 미세유체칩 내부에서 혼합이 일어나며 측정된 산란광의 강도변화를 시간으로 표시한 것이다. 미세유체칩에 샘플과 진단액이 주입된후 약 120초 후부터 반응이 일어 나기 시작

하여 160초 경과후 최고 값이 측정 되었다. 그림 19는 OTC 이외의 여러 항생제를 혼합한 샘플과 OTC 진단을 혼합하여 측정한 결과이다. OTC 이외의 항생제와 발생할 수 있는 비특이 반응에 의한 산란광의 변화는 측정되지 않았다. 그림 20은 OTC aptamer와 산란광 입자응집반응변을 이용한 OTC 검출 결과 이다. 그림에서와 같이 OTC의 농도가 100ppb 이상일 경우 산란광의 강도가 증가 하는 것을 알 수 있다. 이결과는 Electrophoresis(IF: 3.609, 2010, 31, 3115 - 3120) 2010년 9월호에 게재 되었다.

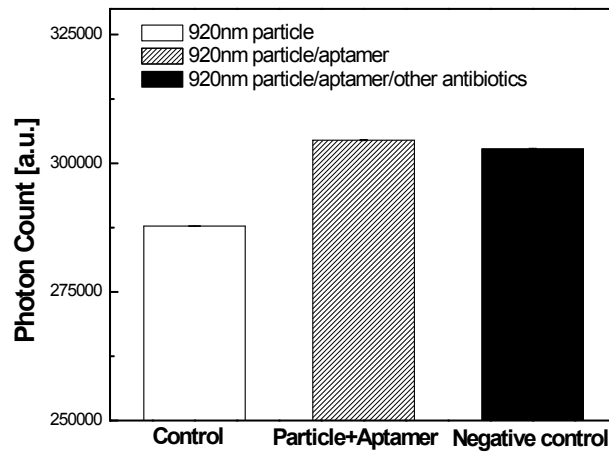


그림 21 OTC이외의 다른 항생제와의 비특이 반응 결과

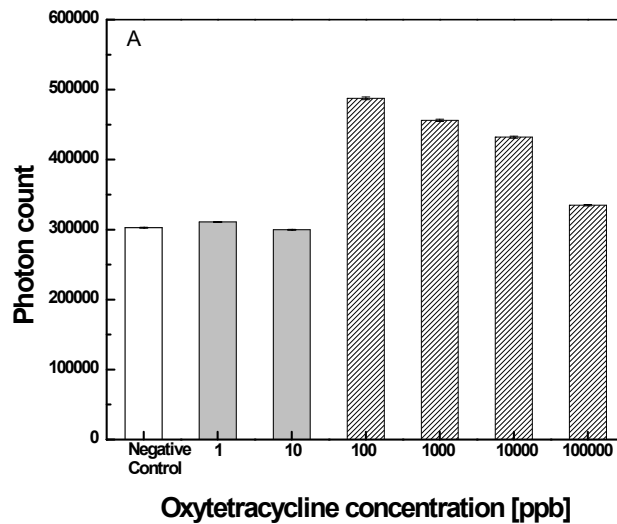


그림 22 OTC aptamer를 이용한 OTC 검출 결과

제 2 절 Non-labelling 방법을 이용한 검출 probe의 개발

1. Highly carboxyl Latex bead에 antibiotic antibody 고정화 시키는 방법

입자면역응집반응은 non-labelling 방법으로 그 원리는 그림 1 같다. 먼저 라텍스입자에 검출하고자 하는 항체를 붙이고 그 입자가 마이크로 디바이스 내부에서 항생제가 포함되어 있는 샘플만 만나게 되면과 같이 라텍스 입자가 응집을 일으키게 된다. 이 때 라텍스 입자의 직경보다 작은 파장의 빛을 조사하면 응집이 일어났을 때와 응집이 일어나지 않았을 경우에 빛의 산란광의 강도가 달라지게 되고, 이 때의 산란광을 측정 함으로써 검출하고자 하는 항생제의 농도를 비교 검출 할 수 있다. 라텍스 입자에 항체를 고정화 하는 방법은 다음과 같다.

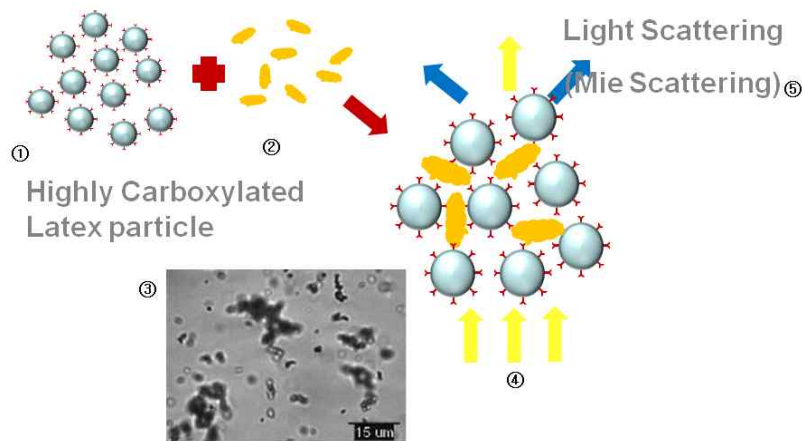


그림 1 입자면역응집반응 기본 개념도

가. 공유결합에 필요한 시약

500mM MES buffer, pH 6.2 와 세척용 50 mM MES buffer

52mmol/ml, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDAC)

50 mg/ml N-hydroxysuccinimide (NHS)

PBS-BN buffer, 30 ml, 100mM PBS buffer+742 ml, 400mg/ml BSA+15 ml, 1M sodium azide solution

나. 고정화 공정

(1) 1 mL 샘플제조 기준으로 100ml, 500mM MES buffer와 100mL 10% Latex bead를 혼합한 뒤, 계산된 52mmol/ml EDAC 용액을 첨가하여 10분간 incubation을 시킨 뒤, 50 mg/ml NHS 와 D.W를 첨가하여 1 mL의 샘플 용액을 제조한다.

(2) 제조된 샘플용액은 실온에서 30분간 mixing을 하고, 9000rpm에서 10분간 원심분리를 행한 후 상층액은 버린다.

(3) 50 mM MES buffer를 가지고 Latex bead 를 resuspend시킨 후에 다시한번 원심분리를 행한다.

(4) 원심분리 후 상층액은 제거하고, 100 ml, 500mM MES buffer와 계산된 양의 항체와 D.W로 1mL를 첨가하여 resuspend를 시킨 후, 실온에서 1시간 mixing을 하면서 반응시킨다.

(5) 미반응 항체를 제거하기 위해 원심분리를 행하고 상층액을 버린다. 이때 50mM MES buffer를 이용하여 이 과정을 두 번 행한다.

(6) 최종적으로 얻어진 항체결합 latex bead는 1mL의 PBS-BN용액을 이용하여 실험전 까지 냉장 보관을 한다.

위에 설명한 일반적인 항체고정법을 사용하여 미세입자에 항체를 고정 시킨 경우 시간이 경과 하면 입자와 입자의 자가 응집반응이 발생한다(그림 2의 우측). 이러한 자가 응집반응은 항생제 검출시 검출 한계를 높여서 센서의 정밀도를 방해 하는 요소가 되며, 검출 시약의 제조 후 바로 사용하지 않으면 안되는 문제점이 있어 상용화에 걸리들이 되고 있다. 이와 같은 문제 점을 해결 하기 위하여 lipid를 이용한 바이오 프루브를 개발 하였다.

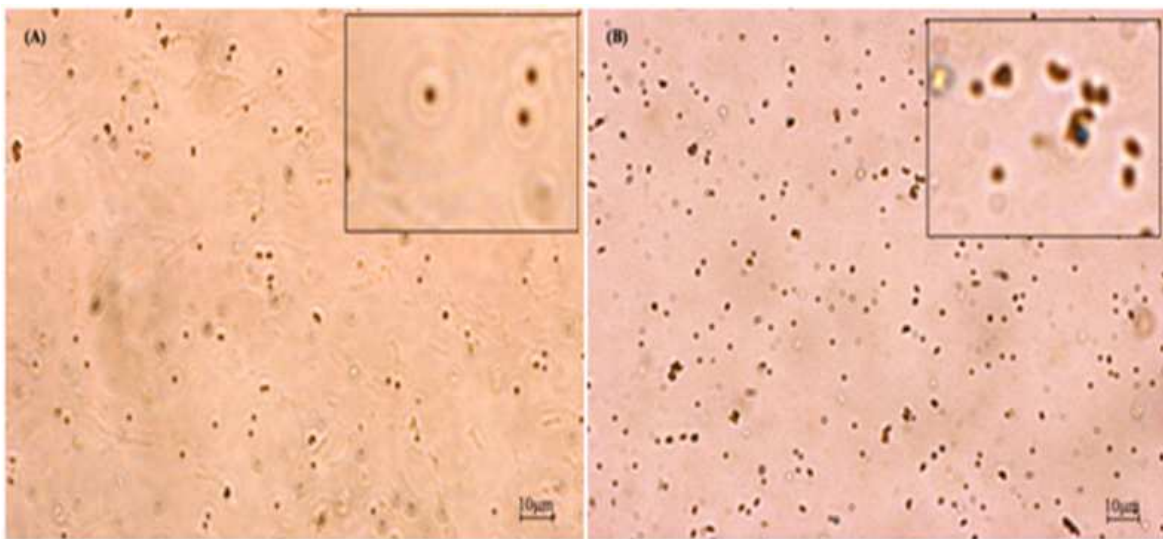


그림 2 항체고정 미세입자의 자가 응집반응 (좌: 항체 고정 전 미세입자, 우: 항체 고정 후 자가응집 반응이 발생한 미세입자)

2. 바이오 프루브 고정용 lipid vesicle 개발

가. Antibody 고정용 Lipid vesicle 제조

양친매성 지질 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine(POPC), egg yolk phosphatidyl-ethanolamine(EPE), 양전하성 지질 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium -propane (DOTAP), 음전하성 지질 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero- 3-[Phospho-*rac*-(1-glycerol)](DMPG), polydeacetylen with epoxy terminate (PDA-Epoxy), cholesterol을 다음과 같은 molar ratio 비율로 혼합한 다음 chloroform에 녹인다.

(1) Amino coupling을 이용한 Probe

(A) POPC : EPE : Cholesterol = 10 : 1 : 3

(2) Epoxy-PDA를 이용한 Probe

(B) POPC : DMPG : Epoxy-PDA : Cholesterol = 7 : 3 : 1 : 3

(C) POPC : DOTAP : Epoxy-PDA : Cholesterol = 7 : 3 : 1 : 3

나. Sonication 방법을 이용한 Lipid vesicle의 제조

각각의 molar ratio로 혼합한 분말을 0.2 mL chloroform 용액에 용해를 시킨다음, 이 용액을 pH 7.0 PBS buffer solution 30 mL에 injection시킨다. 그리고 용액이 포함된 용기를 bath-sonicated 에 10분간 넣어서 10-30 nm size의 lipid vesicle을 제조한다.

이렇게 제조된 각각의 Lipid vesicle 의 최종 농도는 1 mM이 되도록 하였다. Sonication이 끝나면 이 용액을 0.8 μm cellulose syringe filter를 이용하여 세 번정도 filtering 시킨다음 원하는 크기의 lipid vesicle을 만든다. 이들 lipid vesicle은 사용하기 전 2시간 정도 4 $^{\circ}\text{C}$ 에 정치시켜 안정성을 높인다.

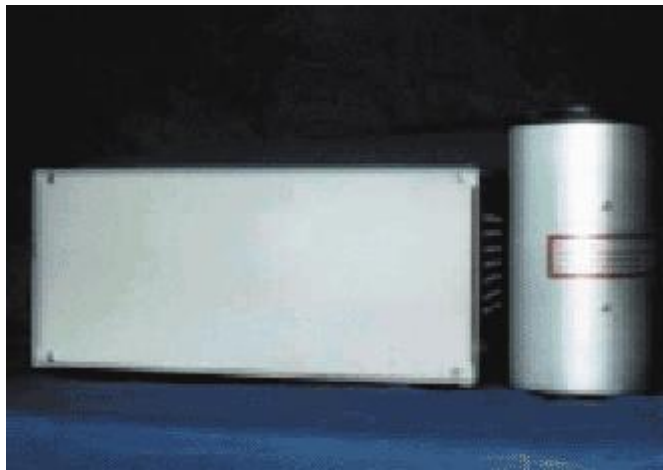


그림 3 Ultra sonic bath cleaner (Avanti Co.)

나. Polyelectrolyte multilayer supports를 이용한 각종 lipid layer의 코팅방법

다양한 Lipid의 조성을 변화시켜 제조한 liposome을 이용하여 자가 응집반응을 최소화 시킨 병원체 검출용 probe를 제조하기 위해 Latex bead 를 대신하여 Silica particle에 전해질 폴리머를 이용하여 표면의 성질을 변화 시켰으며, 이를 이용하여 다양한 종류의 Lipid vesicle을 이용하여 bilayer로 코팅하는 방법을 조사하였다.

(1). 실험 방법

Silica Particle; 1 μm , Poly(allyamine hydrochloride), Poly(diallyldimethylammonium chloride)(PAH), Poly(styrenesulfonate sodium salt)(PSS)를 이용하여 silica microparticle에 한 층 씩 코팅을 하였다. PAH를 시작으로 최종 2~4 layer PSS를 최 외각층에 위치하도록 하였다.

실험은 우선 10% (v/v) silicon dioxide microparticle을 0.1M NaCl 용액에 분산 시킨다음 PAH 용액과 1:1의 비율로 혼합한 다음 10분간 2000rpm rotate shaking에서 incubation 시킨다. Incubation이 끝나면 4500 rpm에서 5분간 원심 분리 시킨 다음 상층액은 버리고 0.1M NaCl 용액으로 3번 세척과정을 거친다. 그리고 원심분리로 상층액을 버린다음 PSS 용액과 1:1

의 비율로 혼합하여 위 과정을 거쳐서 2 layer의 전해질 코팅을 한다. 그리고 같은 과정을 한번 더 함으로써 4 layer 전해질 코팅 microparticle을 제조한다. 최종적으로는 만들어진 microparticle을 100mM PBS buffer solution에 분산 시킨다. 현재까지 수행한 결과 최 외곽 전해질 고분자를 PSS(negative charge)를 이용할 때 Lipid layer의 코팅이 잘되는 것으로 조사되었다.

공정:

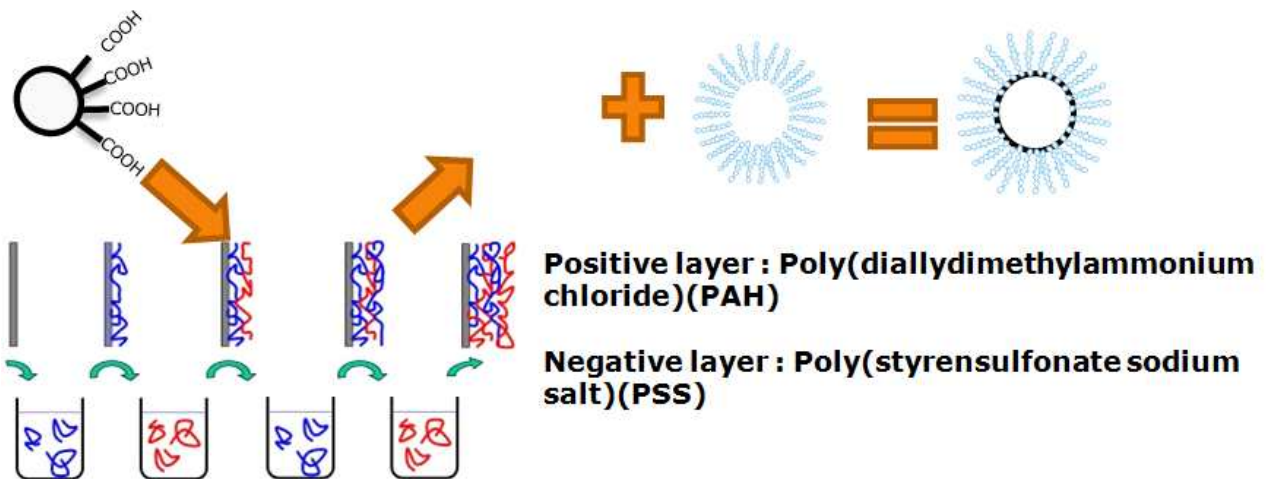


그림 4 Lipid vesicle을 이용하여 bilayer로 코팅하는 방법

(2) 동적 광산란법 (Dynamic light scattering)을 이용한 입자 크기 측정

동적 광산란법을 이용하여 polyelectrolyte multilayer supports를 이용한 lipid layer의 크기를 조사하였다. 평균 입자가 300 nm에서 500 nm로 증가한 것을 알 수 있었다. 이것은 silica microparticle상에 전해질이 코팅이 되었고, 전해질 층은 대략 1 layer가 150 nm 정도로 두꺼워짐을 알 수 있었고 그 위에 lipid가 코팅된 것을 보여주고 있다.

다. 코팅된 lipid layer상에 항체고정화 방법

본 연구에서는 항체를 고정화 시키기 위해 세 가지 기능성 lipid vesicle을 제조하였다. 먼저 Amino coupling 결합을 이용한 POPC/EPE/CH lipid vesicle을 이용하여, EDC, WSC를 이용하여 항체와 공유결합을 시도하였다. 또 다른 방법은 합성된 PDA-epoxy와 양전하를 가지는 DOTAP, 음전하를 가지는 DMPG를 일정 비율로 혼합한 lipid vesicle을 사용하였다. 그림 5는 이들을 이용하여 항체를 고정화 시키는 공정을 보여주고 있다.

라. Surface plasmon resonance (SPR)을 이용한 항체의 고정화 정도 관찰

표면플라즈마 공명 장치를 이용하여 제조된 실리카 Particle에 항체가 고정화 되는 정도를 조사하였다. 표준 항체로는 Mouse IgG를 이용하여 시행하였으며, I) Amino coupling을 이용한 파티클, II) Negative charge Lipid vesicle 이용, III) Positive charge Lipid vesicle 이용하

여 Mouse IgG의 결합정도를 관찰하였다. 그림 17에서 보여주는 것처럼 I,II의 경우는 항체의 결합이 이루어지긴하나 흡착의 수준에 머물고 III)의 경우는 의미있는 흡착능을 보여준다. 이것은 전해질 코팅 microparticle의 최외각층이 negative charge를 가지기 때문에 positive charger를 가지는 Lipid vesicle이 더 전기적 상호작용으로 인해 코팅이 잘 되고 있다고 판단 된다.

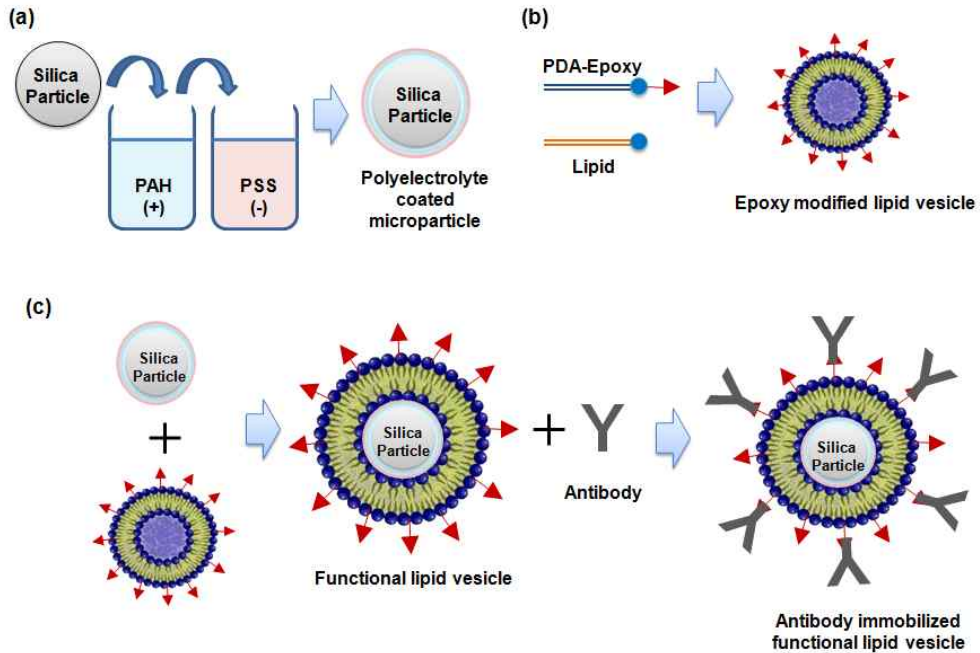


그림 5 전해질 코팅된 silica particle을 이용한 Epoxy기를 가진 기능성 lipid vesicle의 제조방법과 항체의 고정화 과정

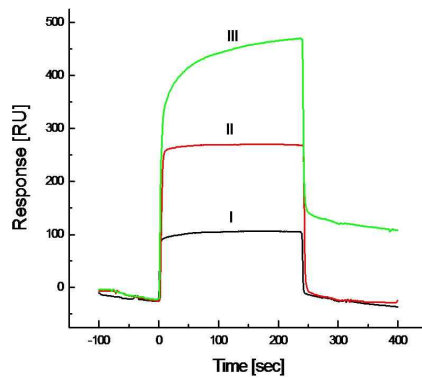


그림 6 I) POPC;EPE;CH Lipid vesicle amino coupling, II) POPC: DMPG : Epoxy-PDA : CH, III) POPC: DOTAP : Epoxy-PDA : CH Lipid vesicle 코팅 microparticle의 항체결합도.

마. 항체의 안정성

Positive 성질을 가진 Lipid vesicle (III)의 항체 결합 안정성을 검토하였다. 먼저 SPR을 이용하여 III Lipid vesicle을 코팅한 기능성 microparticle에 항체를 1주일 뒤부터 4주동안 항체 결합 실험을 행하였다. 그림7에서 보여 주는 것처럼 1주일까지는 처음과 비슷한 결합능을 가지고 있으며, 2,3주후에는 감소되는 경향을 보이며 4주에는 처음보다 70%정도 결합능이 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 최대한의 수율로 항체를 고정화 시키기 위해서는 기능성 Lipid vesicle이 코팅된 microparticle의 최대 보존기간은 4주정도가 적당할 것으로 보인다

그림 8은 4주후의 기능성 Lipid vesicle 코팅 microparticle의 Optical image를 보여주는데 부분적으로 dimer, trimer등의 oligomer를 형성하고 있음을 알수 있었다. 이와 같이 단량체가 아닌 부분적인 응집이 일어남으로써 기능성 Lipid vesicle microparticle 표면에 항체가 결합할 수 있는 부분이 감소하는 것으로 보인다.

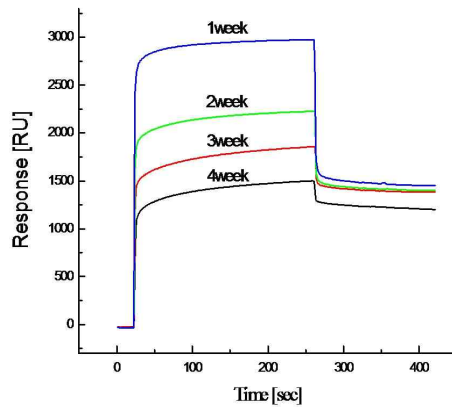


그림 7 POPC:DOTAP:Epoxy-PDA:CH
기능성 Lipid vesicle 코팅 microparticle
에서 시간에 대한 항체결합능력 비교

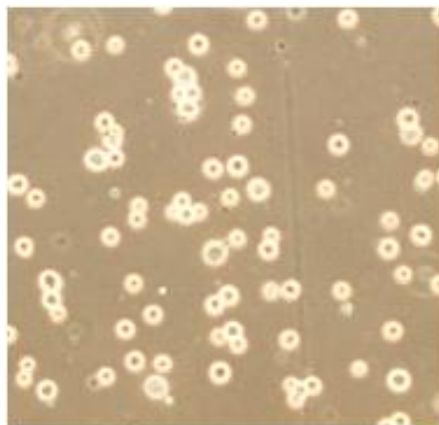


그림 8 4주후 III Lipid vesicle
코팅 microparticle의 Optical
image.

바. 검출능 평가

Positive 성질을 가진 Lipid vesicle (III)에 anti-mouse IgG 항체를 결합한 파티클을 이용하여 Mouse IgG에 대한 검출 능력을 SPR을 이용하여 평가하였다. 먼저 SPR 용 아민 처리된 Gold 표면위에 제조한 Lipid vesicle (III)을 유속 10 µl/min로 흘려주면서 표면에 고정화 시킨 다음 PBS buffer를 이용하여 washing 시켰다. 다음 각 농도별 Mouse IgG 용액을 유속 50 µl/min 속도로 반응을 진행하였고, 그 결과 1-1000 ng/ml 까지 측정이 가능하였다.

그림 9에서 보여주는 것 처럼 1 ng/ml 에 대한 검출 신호가 270 RU 정도로 나타났으며 이는 충분히 ng 단위까지 측정이 가능함을 보여준다. 여기서는 보여주지 않지만 Lipid 가 코팅되어 있지 않고 단순하게 공유결합을 통해 고정된 항체 파티클의 경우는 Mouse IgG에 대해 100 ng/ml에서 30 RU 정도의 검출 신호를 보여 주었다. 그리고 10 ng/ml 에서는 거의 변화를 찾아 볼 수 없었다.

따라서 Lipid vesicle이 코팅된 파티클의 경우 병원균의 검출이 100배이상 향상 됨을 알 수 있었다.

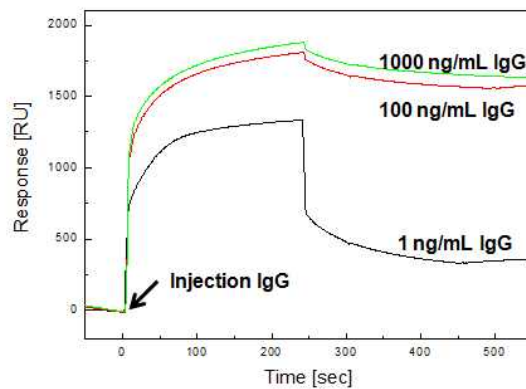


그림 9 Lipid vesicle (III)에 대한 Mouse IgG 농도 별 SPR 신호검출

제 3 절 고감도 PDA polymer liposome 센서 개발

1. PCDA-Epoxy Monomer 합성

PDA liposome은 그림 1과 같은 과정을 통해 합성 되며 각 합성 단계의 세부 과정은 다음과 같다.

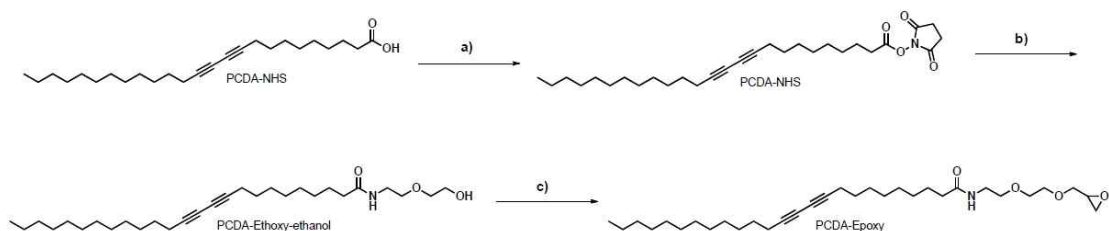


그림 1 PDA liposome 합성 과정

가. PCDA-NHS 합성

- (1) 상온에서 250ml 1-neck 플라스크에 magnetic stir를 넣고, EDC(1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride)를 0.76 g(8.02 mmol)와 NHS(N-hydroxysuccinimide)를 1.52 g(6.94 mmol) 넣는다.
- (2) 50ml 비커에 약간 polymerization 되어 푸른 하늘색을 띠는 PCDA(pentacosadiynoic acid) powder 2.0 g(5.34 mmol)를 solvent methylene chloride에(10ml) 녹인다. 녹으면 polymerization 분자들이 붉은색을 낸다. powder부터 먼저 넣어야 한다.
- (3) 20 ml syringe에 숨을 넣고 (1) 플라스크에 입구를 댄 뒤, (2)의 용액을 부어 polymerization 된 분자들을 filter 시킨다. 흘러나오는 용액은 붉은 색이 제거 되어 맑아야 한다.
- (4) 1-neck 플라스크를 septa로 밀봉한다. 이때 septa에 주사기 바늘을 하나 꽂아서 공기가 빠져 나갈 수 있게 한다. stir를 돌려서 상온에서 반응 시킨다. TLC test를 수시로 하여, 반응물의 TLC peak가 완전히 사라질 때 까지 반응 시킨다. 보통 2시간 정도 걸린다. 또한 stir가 일정한 속도로 안정되게 돌고 있는지 수시로 체크 한다.
- (5) 250ml evaporate flask로 용액을 옮긴다. 옮기기 전에 methylene chloride를 파스퇴르 피펫으로 플라스크 안쪽 벽면에 뿌려 벽면에 붙은 것들을 씻어 녹인다. 옮긴 후에도 같은 방법으로 1-neck flask에 methylene chloride를 가한 뒤, evaporate flask로 용액을 옮기는 것을 반복하여 2-neck flask 안의 모든 내용물이 찌꺼기 없이 옮겨지도록 한다. 또한 250ml evaporate flask의 벽에도 methylene chloride를 가하여 벽면에 붙은 내용물들이 없도록 한다.
- (6) rotary evaporator에 5도의 물이 흘러가게 한 뒤, flask를 장착하고, 상온에서 감압하고 적당한 속도로 (1~10에서 6정도) 돌려서 solvent를 날린다.

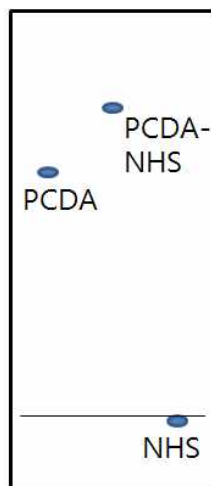


그림 2 PCDA-NHS 반응 TLC Peak (Eluent EA:Hex=1:2)

- (7) (6)의 산물에 ethylene acetate를 부어 충분히 흔들어 녹인다. 대부분의 내용물이 ethylene

acetate에 녹는다. 안 녹는 것들도 있는데 이것은 반응하지 않고 남은 불순물로 원하는 물질이 아니기 때문에 ethylene acetate에 충분히 흔들어 녹였다면, 이것들이 안 녹았다고 해서 염려할 필요 없다.

(8) (7)을 250ml separating funnel에 넣고 그 위에 brine 용액(NaCl 포화 용액)을 붓는다. 그리고 separating funnel을 흔든다. 그리고 brine층과 ethylene acetate층으로 분리 될 때 까지 기다린 뒤, ethylene acetate층의 용액만을 받아 낸다. 이것을 총 세 번 반복한다. 반복할 때 마다, 녹아나오는 불순물의 양이 줄어들어 brine 용액 층이 점점 투명해진다.

(9) (8)의 용액에 용액의 우유색이 되도록 MgSO₄를 충분히 가한 뒤, 10분간 stir를 돌리고, filter하여, 용액에 섞여있는 water를 제거한다. Filter 시에는, 500ml filtering flask위에 filter adapter와 porcelain funnel(지름 8cm 정도)를 장착하고, aspirator와 호스로 연결한다. 플라스크를 red ring으로 걸어 넘어지지 않도록 한다. funnel위에 filter paper(Whatman, NO.5)를 놓는다. filter paper는 미리 methylene chloride로 적셔서 바닥과 밀착하게 한다. aspirator를 작동시켜 진공을 잡은 뒤, 4.의 용액을 천천히 붓는다. aspirator를 끌 때는 호스부터 빼고 진공을 꺼야 한다.

(9) 걸러진 용액을 (5)대로 250ml evaporate flask로 용액을 옮긴 뒤, (6)의 방법대로 solvent를 날린다. 그 후, powder를 긁어내어 20ml 바이알로 옮기고, 은반지에 싼 뒤, dry oven에 넣어 진공에 10분 간 둔 뒤, 냉장 보관한다.

(10) NMR 피크는 500 MHz, Solvent CDCl₃ 에서 0.86(t, 3H), 1.21-1.52(m, 36H), 2.21(t, 4H), 2.60(t, 2H), 2.87(s, 4H) 이다.

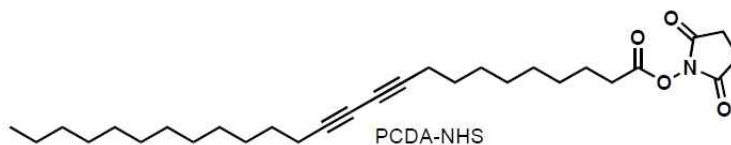


그림 3 PCDA-NHS의 구조식

나. PCDA-Ethoxy-ethanol 합성

(1) 1.60g(15.26mmol)의 2-(2-aminoethoxy)ethanol를 methylene chloride에 녹여 100ml의 용액을 만든다.

(2) 1단계의 산물 PCDA-NHS를 2.40g(5.08mmol) methylene chloride에 녹여 50ml의 용액을 만든다.

(3) 250ml 1-neck 플라스크에 magnetic stir와 (1)를 넣고 (2)를 dropping funnel로 한 방울씩 30분 간 모두 떨어뜨린다. (2)를 dropping funnel에 넣을 때, 1.에서처럼 filter 하여 넣는다.

(4) 1-neck 플라스크를 septa로 밀봉한다. 이때 septa에 주사기 바늘을 하나 꽂아서 공기가 빠져 나갈 수 있게 한다. TLC test를 수시로 하여, 반응물의 TLC peak가 완전히 사라질 때 까지 반응 시킨다. 보통 3시간 정도 걸린다. 또한 stir가 일정한 속도로 안정되게 돌고 있는지 수시로 체크 한다.

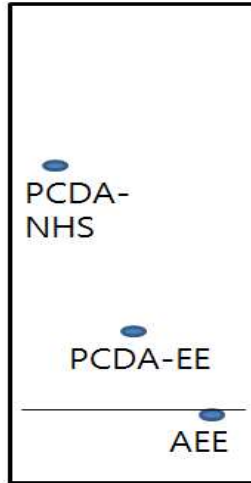


그림 4 PCDA-EE 반응 TLC Peak (Eluent EA:Hex=4:1)

(5) (4)의 내용물을 250ml evaporate flask에 옮겨 담은 뒤, rotary evaporator에 5도의 물이 흘러가게 한 뒤, flask를 장착하고, 상온에서 감압하고 적당한 속도로 (1~10에서 6정도) 돌려서 solvent를 날린다.

(6) (5)의 산물에 ethylene acetate를 부어 충분히 흔들어 녹인다. 대부분의 내용물이 ethylene acetate에 녹는다. 안 녹는 것들도 있는데 이것은 반응하지 않고 남은 불순물로 원하는 물질이 아니기 때문에 ethylene acetate에 충분히 흔들어 녹였다면, 이것들이 안 녹았다고 해서 염려할 필요 없다.

(7) (8)을 250ml separating funnel에 넣고 그 위에 brine 용액(NaCl 포화 용액)을 붓는다. 그리고 separating funnel을 흔든다. 그리고 brine층과 ethylene acetate층으로 분리 될 때 까지 기다린 뒤, ethylene acetate층의 용액만을 받아 낸다. 이것을 총 세 번 반복한다. 반복할 때 마다, 녹아나오는 불순물의 양이 줄어들어 brine 용액 층이 점점 투명해진다.

(8) 1. (9)의 과정대로 MgSO₄로 dry 한다. (9)의 내용물에서 solvent를 evaporating 한다.

(9) (10)의 내용물을 methanol에 recrystallization 한다. methanol를 (8)의 250ml 플라스크의 1/3정도 붓고, 열을 가하여, powder를 완전히 녹인 뒤, 냉장고의 냉동실에 넣어 overnight 한다.

(10) (9)의 내용물을 filtering 한다. 500ml filtering flask위에 filter adapter와 porcelain funnel (지름 8cm 정도)를 장착하고, aspirator와 호스로 연결한다. 플라스크를 red ring으로 걸어 넘어지지 않도록 한다. funnel위에 filter paper(Whatman, NO.5)를 놓는다. filter paper는 미리 methylene chloride로 적셔서 바닥과 밀착하게 한다. aspirator를 작동 시켜 진공을 잡은 뒤, (10)의 용액을 천천히 붓는다. aspirator를 끌 때는 호스부터 빼고 진공을 꺼야 한다.

(11) filtering 되어 filter paper 위에 놓인 PCDA-Ethoxy-ethanol 결정들을 20ml 바이알에 은 반지로 싸서 따로 보관한다.

(12) NMR 피크는 500 MHz, Solvent CDCl₃ 에서 0.86(t, 3H), 1.21-1.52(m, 36H), 2.22(m, 6H), 3.44(q, 2H), 3.55(q, 4H), 3.72(q, 2H), 5.81(s, 1H) 이다.

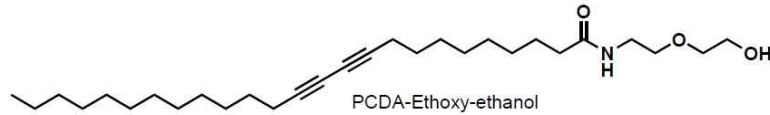


그림 5 PCDA-Ethoxy-ethanol 구조식

다. PCDA-Epoxy 합성

- (1) 250ml 1-neck 플라스크에 magnetic stir를 넣어 둔다. 영상 5도에서 0.10g(4.24.26mmol)의 sodiumhydride를 플라스크에 넣고 10ml의 tetrahydrofuran를 가한다. tetrahydrofuran은 anhydrous 해야 한다.(수분이 들어가서는 안 된다.) 따라서 tetrahydrofuran를 꺼낼 때는 시린지에 시린지 바늘을 꽂은 후, 바늘을 병의 마개에 꽂아 solvent를 꺼낸다.
- (2) 2단계의 산물 PCDA-Ethoxy-Ethanol를 1.00g(2.16mmol) tetrahydrofuran에 녹여 20ml의 용액을 만든다. 이때도 (1)과 마찬가지로의 방법으로 tetrahydrofuran를 다룬다.
- (3) (2)의 용액을 dropping funnel에 넣는 뒤, dropping funnel로 (1)의 플라스크에 15분정도 drop을 떨어뜨린다.
- (4) 내용물을 4시간 동안 상온에서 stir를 돌려 반응 시킨다.
- (5) (4)의 내용물에 0.5g(3.69mmol)의 epibromohydrin을 가한 뒤, 상온에서 밤새도록 stir를 돌린다. TLC Test로 생성물을 확인한다.

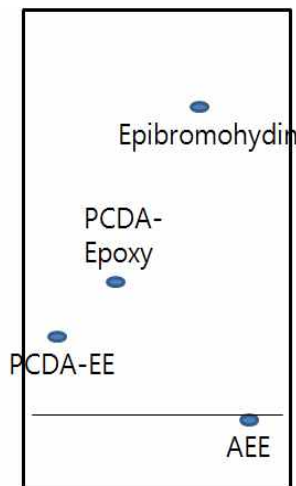


그림 6 PCDA-EE 반응 TLC Peak (Eluent Chloroform:Methanol=95:5)

- (6) (5)의 내용물을 filtering 한다. 500ml filtering flask위에 filter adapter와 porcelain funnel (지름 8cm 정도)를 장착하고, aspirator와 호스로 연결한다. 플라스크를 red ring으로 걸어 넘어지지 않도록 한다. funnel위에 filter paper(Whatman, NO.5)를 놓는다. filter paper는 미리 methylene chloride로 적셔서 바닥과 밀착하게 한다. aspirator를 작동 시켜 진공을 잡은 뒤, 4.의 용액을 천천히 붓는다. aspirator를 끌 때는 호스부터 빼고 진공을 꺼야 한다.
- (7) filter된 내용물을 250ml evaporate flask에 옮겨 담은 뒤, rotary evaporator에 5도의 물이 흘러가게 한 뒤, flask를 장착하고, 상온에서 감압하고 적당한 속도로 (1~10에서 6정도) 돌려서

solvent를 날린다.

(8) column chromatography로 내용물을 정제한다. 이 때, chloroform과 methanol를 95:5로 섞은 것을 사용한다.

(9) NMR 피크는 500 MHz, Solvent CDCl_3 에서 0.86(t, 3H), 1.21-1.58(m, 37H), 2.16(t, 6H), 2.57(q, 1H), 2.77(t, 1H), 3.14(m, 1H), 3.43(m, 3H), 3.52(t, 2H) 3.59~3.65(m, 4H), 3.79(q, 1H), 5.89(s, 1H) 이다.

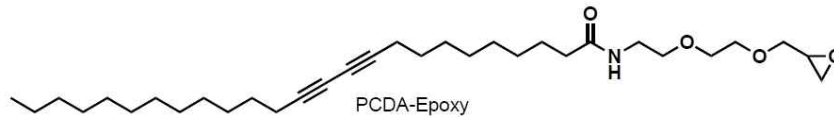


그림 7 PCDA-Epoxy 구조식

2. PDA liposome 조립

- (1) PCDA 0.749 mg와 PCDA-epoxy 4.142 mg를 0.2 ml THF 에 녹인다.
- (2) 5mM pH 8 HEPES buffer 20 ml를 20 ml 바이알에 담고 (1)를 syringe로 injection 한다.
- (3) 3분간 bath sonication 한다.
- (4) 0.8 um syringe filter로 (3)의 용액을 10ml 씩 filter 한다.
- (5) 2hr 동안 냉장고(5도) 에 넣어 보관한다.

3. PDA liposome 유리 기판 제작

1) PCDA-epoxy liposome 고정화를 위한 유리 기판 처리 방법

- (1) 슬라이드 glass를 chloroform에 담가 초음파 세척기에 5분간 bath sonication 한다.
- (2) acetone에 5분간 bath sonication 한다
- (3) 2-propanol 5분간 bath sonication 한다
- (4) 적당량의 nochromix를 넣은 sulfuric acid용액에 위의 슬라이드 glass를 넣은 후, 60분간 bath sonication한다.
- (5) 증류수를 이용하여 sulfuric acid를 충분히 세척한 후 건조한다.,
- (6) glass 표면을 2 wt% 3-aminopropyltriethoxysilane/toluene 용액에 1시간 담근 뒤, 꺼내어 toluene으로 가볍게 세척하고 130 °C에서 30분간 baking 한다.
- (7) 그 후, 슬라이드 glass를 toluene, toluene: methanol (1:1), methanol 용액에 각각 3분간 초음파 세척기로 세척하여 결합되지 않은 silane모노머를 제거한다.

2) PCDA-epoxy liposome 고정화

- (1) 위에서 silane 처리한 슬라이드 glass 를 PCDA-epoxy liposome 용액에 담근 뒤, 20 분간 실온에서 incubation 시킨다.
- (2) 10mM pH 8 HEPES Buffer를 이용하여 세척하고 건조한 후, 5 °C에 보관한다.
- (3) 항체나, aptamer 용액은 manual microarrayer 를 이용하여 70% humidity에서 PCDA-epoxy liposome 코팅된 슬라이드 glass위에 spot한 다음 6시간 incubation 시킨다.

3) UV-lamp를 이용한 photopolymerization

Incubation 시킨 슬라이드 glass는 10mM pH 8 HEPES Buffer를 이용하여 세척한 다음 질소를 이용 건조 시킨 다음 254 nm UV light을 이용하여 30 초간 photopolymerization시킨다.

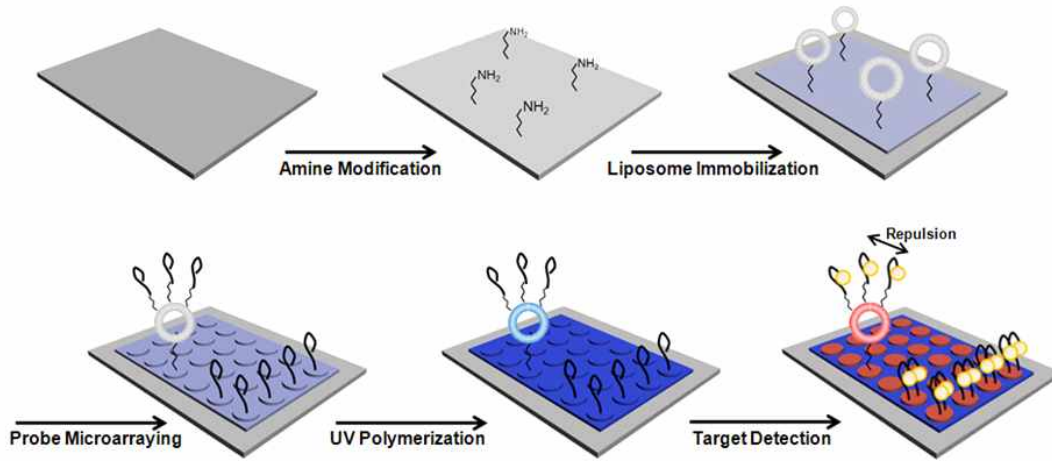


그림 8 PDA liposome 기판 제작 과정

4. 항체를 Probe로 이용한 항생제 검출 결과

Gentamycin 항체를 Probe로 이용하여, Gentamycin을 검출하는 실험을 수행하였다. 항체는 전체 항체를 그대로 이용하는 방법과 항체를 절단하여 결합 부분이 있는 Fab 부분만 이용하는 방법 두 가지로 진행하였다.

가. Gentamycin 항체의 전체를 이용 했을 경우

이 경우에는 PDA의 형광이 검출 되지 않았다. 항체의 길이가 커 (~10nm) 항생제가 항체에 결합되어도, 그 힘이 PDA liposome까지 전달이 되지 않기 때문으로 설명할 수 있다.

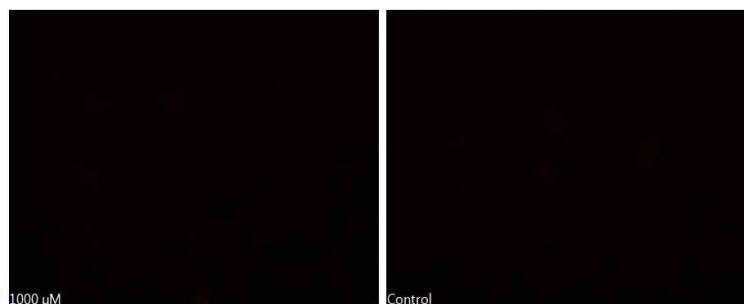


그림 9 전체 항체를 이용한 수용액 상에서의 Gentamycin 검출 결과

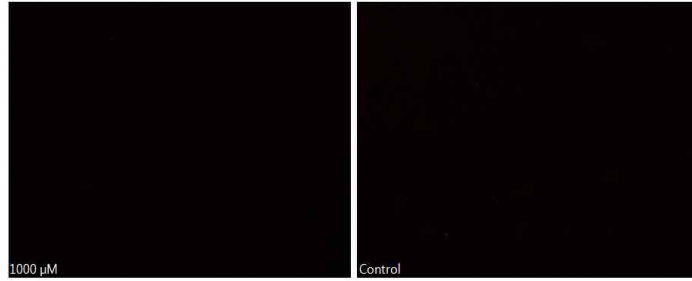


그림 10 전체 항체를 이용한 우유 상에서의 Gentamycin 검출 결과

나. Gentamycin 항체의 Fab 부분만을 이용 했을 경우
 이 경우에는 약간의 형광 신호를 볼 수 있었다. 그러나 Fab 부분만을 이용하였다고 하더라도 aptamer에 비해서 그 길이가 길기 때문에, PDA에 힘이 잘 전달되지 않아 매우 약한 형광 신호를 보인다.



그림 11 항체의 Fab 부분을 이용한 수용액 상에서의 Gentamycin 검출 결과

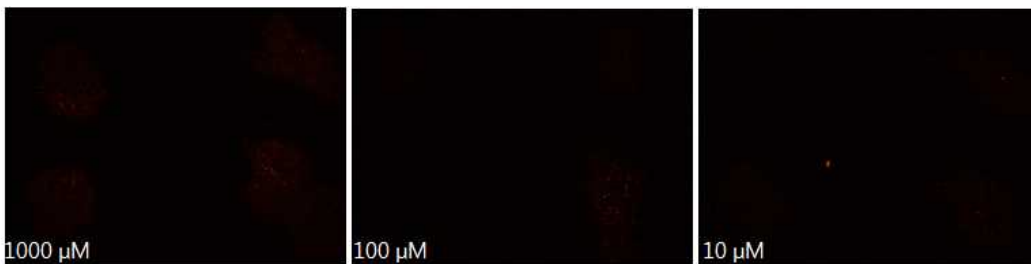


그림 12 항체의 Fab 부분을 이용한 우유 상에서의 Gentamycin 검출 결과

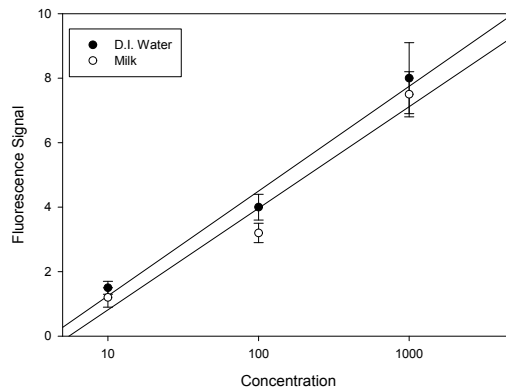


그림 13 항체의 Fab 부분을 이용한 Gentamycin 검출 곡선

5. Lipid를 Probe로 이용한 항생제 검출 결과

Aptamer와 항체를 이용한 현 실험 방법의 약한 검출 강도를 개선 하고자 항생제 중 neomycin과 반응하는 lipid를 PDA liposome으로 조립하여 검출 실험을 수행해 보았다. Neomycin 과 반응하는 lipid, PIP2를 PDA monomer PCDA와 4:1의 비율(PCDA:PIP2 = 4:1)로 조립한 뒤, 수용액 상에서 neomycin과 반응 시켰다. 그 결과 신호 개선의 가능성을 볼 수 있었다.

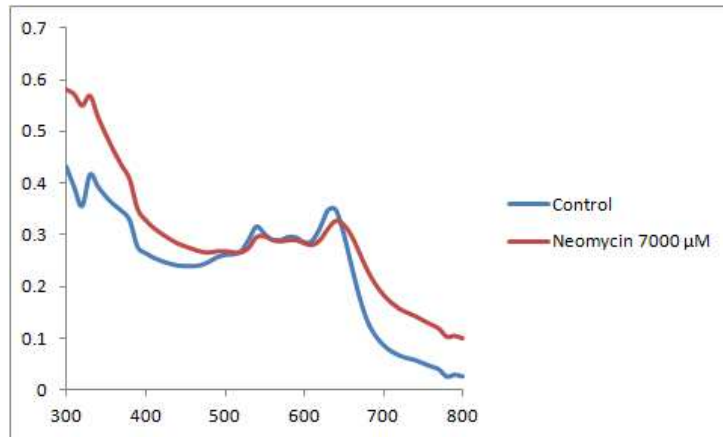


그림 14 Lipid를 Probe로 이용한 Neomycin 검출 UV-Vis 스펙트럼

6. Aptamer를 probe로 이용한 항생제 검출 결과

가. Oxytetracycline 검출

Oxytetracycline을 농도별로 준비한 샘플 용액을 위에서 만든 PDA 칩 위에 뿌린 뒤, 1시간 후에 형광 현미경으로 관찰 하였다. 용액은 D.I water와 우유 두 종류로 준비하였다. 검출 실험 결과는 아래 그림과 같다. FDA 기준 Oxytetracycline의 검출 허용량은 300 ppb (~ 0.6 μM) 이다.

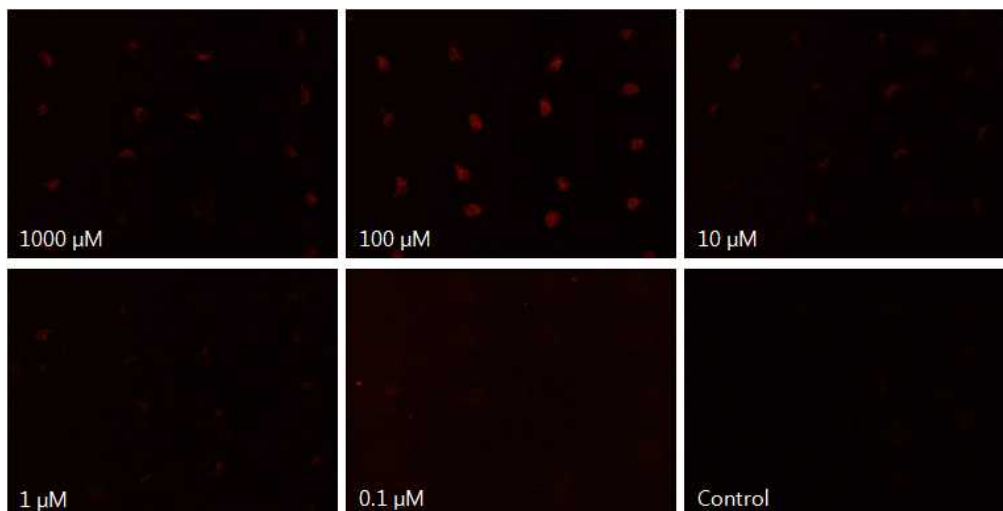


그림 15 수용액 상에서의 Oxytetracycline 검출 결과

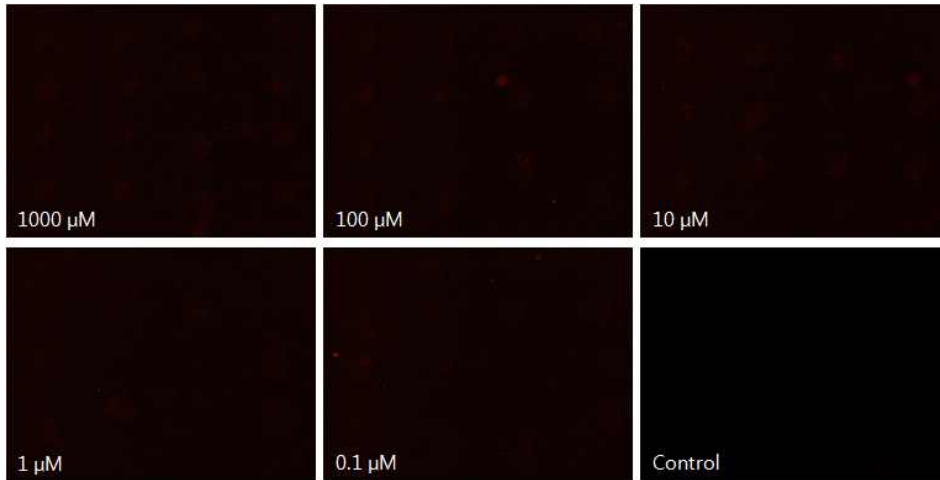


그림 16 우유 상에서의 Oxytetracycline 검출 결과

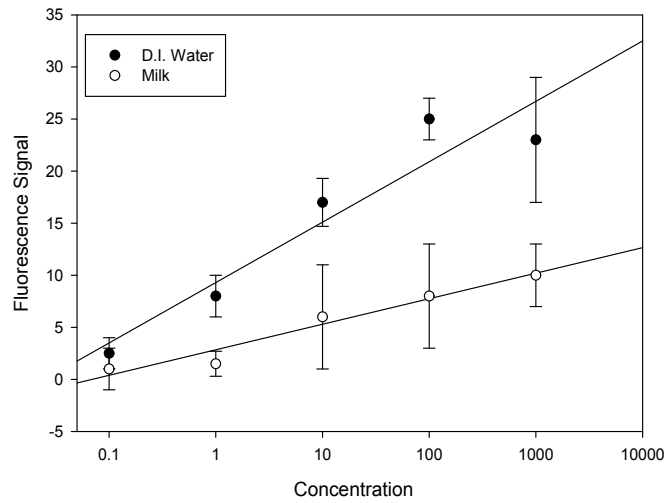


그림 17 Oxytetracycline 검출 곡선

나. Neomycin 검출 결과

Oxytetracycline과 마찬가지로 Neomycin 을 농도별로 준비한 샘플 용액을 위에서 만든 PDA 칩 위에 뿌린 뒤, 1시간 후에 형광 현미경으로 관찰 하였다. 용액은 D.I water와 우유 두 종류로 준비하였다. 검출 실험 결과는 아래 그림과 같다. Neomycin의 검출 허용량은 150 ppb (~0.165 μM) 이다.



그림 18 수용액 상에서의 Neomycin 검출 결과



그림 19 우유 상에서의 Neomycin 검출 결과

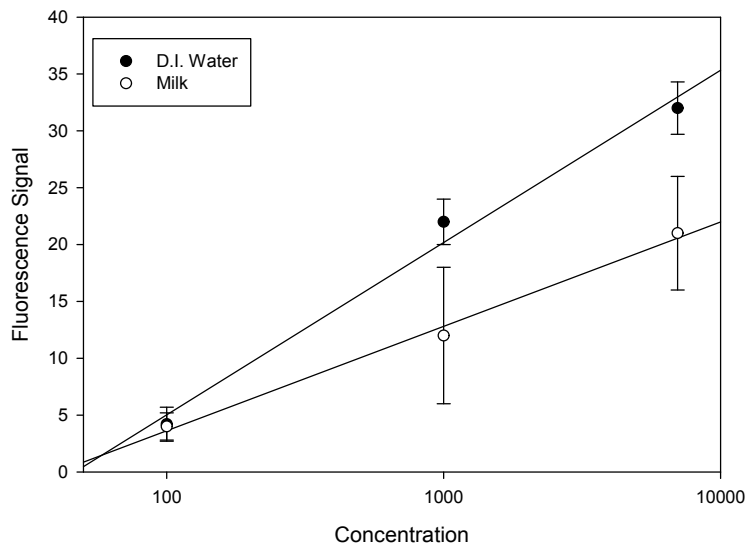


그림 20 Neomycin 검출 곡선

다. Streptomycin 검출 결과

Oxytetracycline과 마찬가지로 Streptomycin 을 농도별로 준비한 샘플 용액을 위에서 만든 PDA 칩 위에 뿌린 뒤, 1시간 후에 형광 현미경으로 관찰 하였다. 용액은 D.I water와 우유 두 종류로 준비하였다. Streptomycin의 경우, 높은 농도에서도 검출을 확인할 수 없었다.



그림 21 수용액 상에서의 Streptomycin 검출 결과

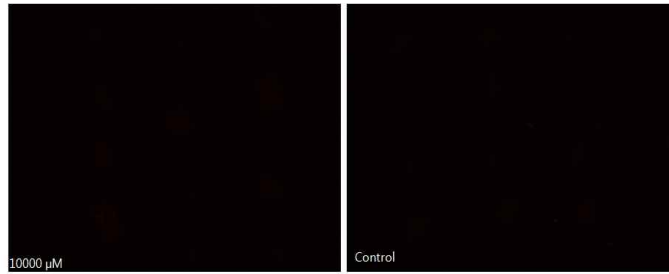


그림 22 우유 상에서의 Sterptomycin 검출 결과

라. Tobramycin

Oxytetracycline과 마찬가지로 Tobramycin 을 농도별로 준비한 샘플 용액을 위에서 만든 PDA 칩 위에 뿌린 뒤, 1시간 후에 형광 현미경으로 관찰 하였다. 용액은 D.I water와 우유 두 종류로 준비하였다. Tobramycin의 검출 허용량은 500 ppb (~ 0.11 μM) 이다.



그림 23 수용액 상에서의 Tobramycin 검출 결과

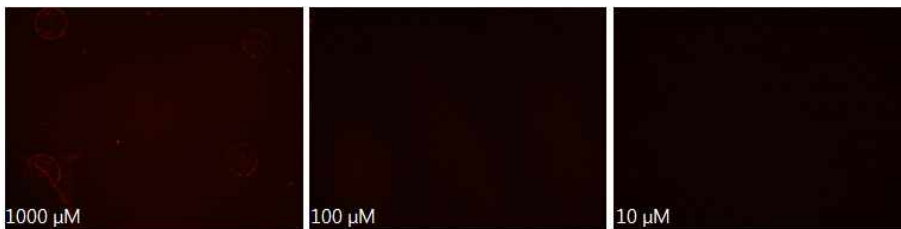


그림 24 우유 상에서의 Tobramycin 검출 결과

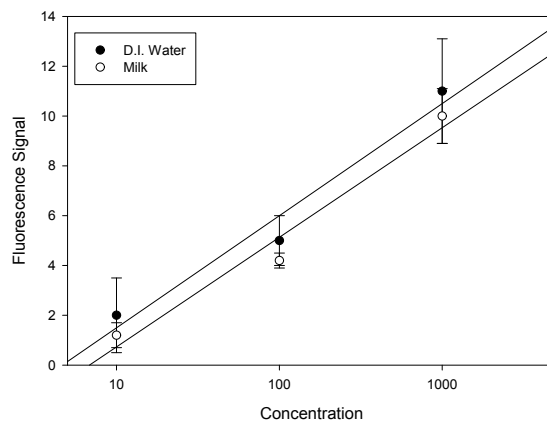


그림 25 Tobramycin 검출 곡선

마. Nonspecific Binding의 확인

PDA liposome이 고정된 Aptamer나 항체와 특이적으로 반응하는 항생제가 아닌 다른 종류의 항생제와 비특이적으로 반응하여 PDA liposome의 형광이 생기지는 않는지 Nonspecific Binding을 확인해 보았다. 그 결과, 모든 경우에서 형광 강도 값이 매우 미미하여 우려한 Nonspecific Binding은 없음을 알 수 있었다. 항생제의 종류가 많아 실험 데이터가 많기 때문에 대표 실험 결과를 아래에 첨부하였다.



그림 26 우유 상에서의 Nonspecific Binding 확인

항생제가 Aptamer와 결합될 때 발생하는 힘이 PDA의 Conjugated Chain을 물리적으로 휘게 만들 만큼 크지가 않아 전반적으로 포화용액에 가까운 고농도임에도 불구하고, 형광 신호가 약하거나, Streptomycin처럼 아예 검출이 되지 않은 경우가 있었다. 이 문제를 해결하기 위해서는 PDA에 좀 더 강한 힘을 줄 수 있도록 Aptamer를 재설계하거나, 다른 검출 방법을 고려해야 한다.

7. 다중 검출 PDA 칩을 이용한 항생제 검출

Amine 코팅된 글라스에 구멍을 뚫은 PMMA 고분자 판을 붙인 바이오 센서 칩을 제작하여, PDA liposome을 이용한 항생제 다중 검출을 실험하여 보았다. PMMA의 구멍에 노출된 글라스에 PDA Liposome을 코팅한 뒤, 그 위에 아래 그림과 같이 각각의 항생제 aptamer를 붙여서 제작하였다.

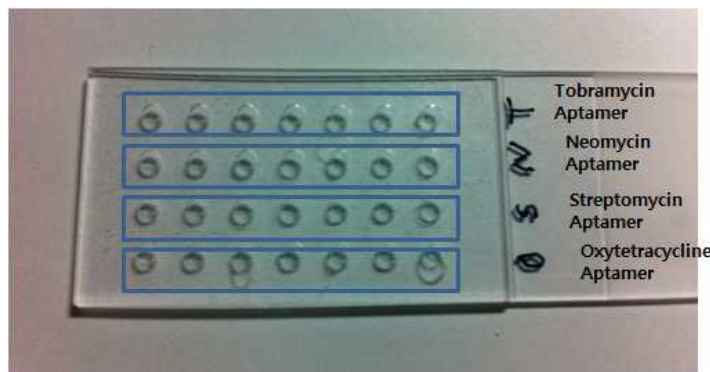


그림 27 항생제 다중 검출을 위한 PDA Biosensor 칩

위 칩 위에 oxytetracycline 1000 μM , 100 μM , 10 μM 과 neomycin 7000 μM 이 담긴 용액을 뿌려, PDA의 색 변화를 조사 하였다 그 결과는 다음과 같다.

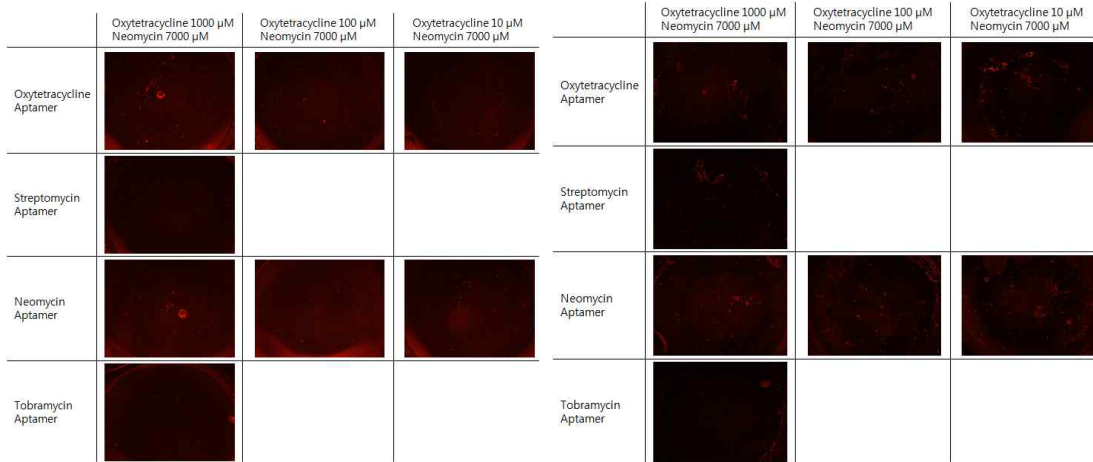


그림 28 항생제 다중검출 실험 결과
(수용액)

그림 57 항생제 다중검출 실험 결과
(우유)

위의 결과를 가지고 형광 강도를 정량적으로 분석하였다. 그 결과 아래 그림에서처럼, oxytetracycline aptamer가 코팅 된, PDA의 경우 아래와 같이 neomycin이 같이 녹아져 있는 경우에도 oxytetracycline의 농도에 따라 형광 강도가 증가함을 볼 수 있었다. neomycin aptamer가 코팅 된, PDA의 경우 아래와 같이 oxytetracycline의 농도에 상관없이 neomycin 7000 μM 의 농도에 대해서 형광 강도를 보여 주었다.

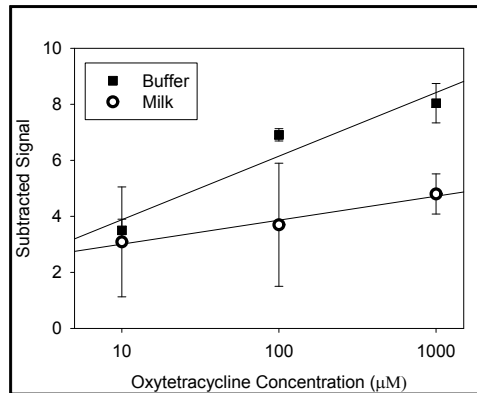


그림 29 다중 검출 환경 하에서의 Oxytetracycline 검출 곡선

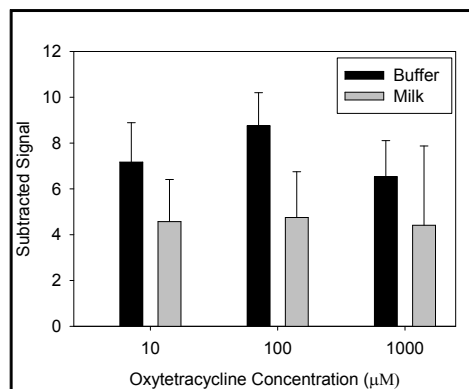


그림 30 다중 검출 환경 하에서의 Neomycin 검출 곡선

sterptomycin, tobramycin aptamer가 코팅 된, PDA의 경우 아래와 같이 neomycin과 oxytetracycline에 대해 반응이 현저히 나타나지 않았다.

8. PDA Liposome의 Coating 연구

가. Film 표면에의 Coating

현재 글라스에 코팅하고 있는 PDA Liposome을 다양한 센서 시스템으로 응용하기 위해 글라스가 아닌 필름 표면에 코팅하는 실험을 진행하였다. 그 프로토콜은 다음과 같다.

- 1) Polyurethane primed PET film (50 μm)에 oxygen plasma 처리 (1min at 50 mtorr)
: 표면을 hydroxylation 하여 silane이 잘 붙기 위함.
- 2) APTES coating
 - 1) 2% APTES (v/v) Toluene solution에 1 hr 동안 담금.
 - 2) 130 $^{\circ}\text{C}$ 오븐에 30min간 둠.
- 3) APTES가 coating 된 필름에 liposome을 40분간 고정함.

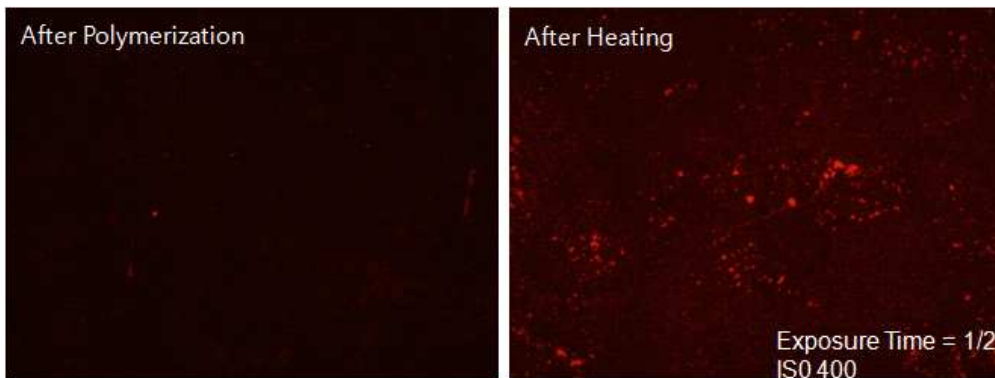


그림 31 필름 코팅 실험 결과

그 결과 글라스와 마찬가지로 일반 범용 필름에 aminosilane을 코팅하여, PDA liposome이 잘 붙을 수 있음을 확인하였다. 4 개월 동안의 보관 및 bending 실험 후에도 signal이 검출 될 수 있는지를 아래와 같이 확인하였다.



그림 32 필름에 코팅된 liposome의 장기 견실성 실험

그 결과 장기간 보관 및 벤딩에도 위 PDA liposome system이 처음과 거의 비슷한 성능으로 작동 될 수 있음을 볼 수 있었다.

향후 계획으로 Liposome 코팅이 더 많이 붙고, 좀 더 균일해 질 수 있게 하기 위해, silane 코팅 방법을 개선하거나, 다른 방법들을 시도해 볼 것이다. 장기간 bending에 의해 표면에 crack이 가해질 수 있으나, 이는 PDA coating이 아닌 PET 필름 문제로 보인다. 얇은 PET 필름을 이용하거나, 역시 silane coating을 개선하여 해결해 볼 것이다.

나. Paper에의 코팅

PET 필름에 대한 낮은 코팅율을 극복하기 위해, PET 필름 대신에 Paper(종이)나, Porous Membrane에 PDA liposome을 코팅하는 실험을 진행 하였다. Paper는 가격이 싸기 때문에, 최근 개발도상국들에서의 진단 시스템 개발에 많이 이용되고 있는 소재이기도 하다.

여러 paper중, Chromatography paper와 일반 A4 용지에 대해 PDA liposome을 코팅하는 실험을 하였으며, 그 결과 일반 A4 용지에 PDA liposome이 잘 코팅됨을 확인할 수 있었다.

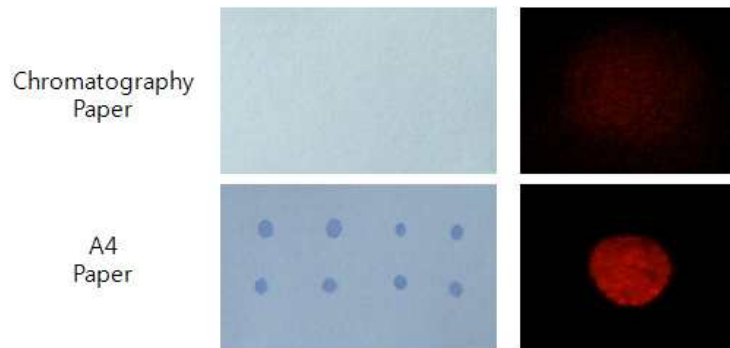


그림 33 종이에 대한 PDA liposome 코팅 실험 결과

다. Porous Membrane에의 코팅

여러 Membrane 중 NC(Nitrocellulose) membrane pore size 0.45 μm (Millipore HYHY00010)에 대하여 PDA liposome를 코팅하는 실험을 진행하였다. 위 NC membrane는 본 연구에서 개발하고자 하는 장치에 적용될 수 있을 뿐만 아니라, 임신 진단 장치와 같은 실용화 된 장치에 바로 적용해 볼 수 있다는 장점이 있다. 사용한 PDA liposome의 조성은 PCDA:DMPA:PCDA-epoxy 7:2:1 (total 1mM) in 1x PBS이다.

실험 방법으로는 NC membrane을 이용한 분석 실험 중 하나인 Dot Blot 방법을 이용하였으며, 우선 PDA liposome의 고정 조건을 찾기 위해, 아래 5가지 경우에 대해 실험을 하였다.

- 1) 아무 처리 안 한 Membrane 위에 liposome 1 μl 을 pipet으로 spotting후, 건조
- 2) D.I water에 Membrane을 1시간 동안 담근 후, 질소로 말린 뒤, liposome 1 μl 을 pipet으로 spotting 후, 건조
- 3) 20x SSC Buffer에 Membrane을 1시간 동안 담근 후, 질소로 말린 뒤, liposome 1 μl 을 pipet으로 spotting후, 건조

- 4) 20x SSC Buffer를 1 μ l spotting 한 뒤, 건조. 그 위에 liposome 1 μ l을 pipet으로 spotting 후, 건조
- 5) 아무 처리 안 한 Membrane 위에 liposome 1 μ l을 pipet으로 spotting 후, 그 아래에서 진공 압력을 가하여 liposome 용액을 membrane에 스며들게 함.

그 결과는 다음과 같다.

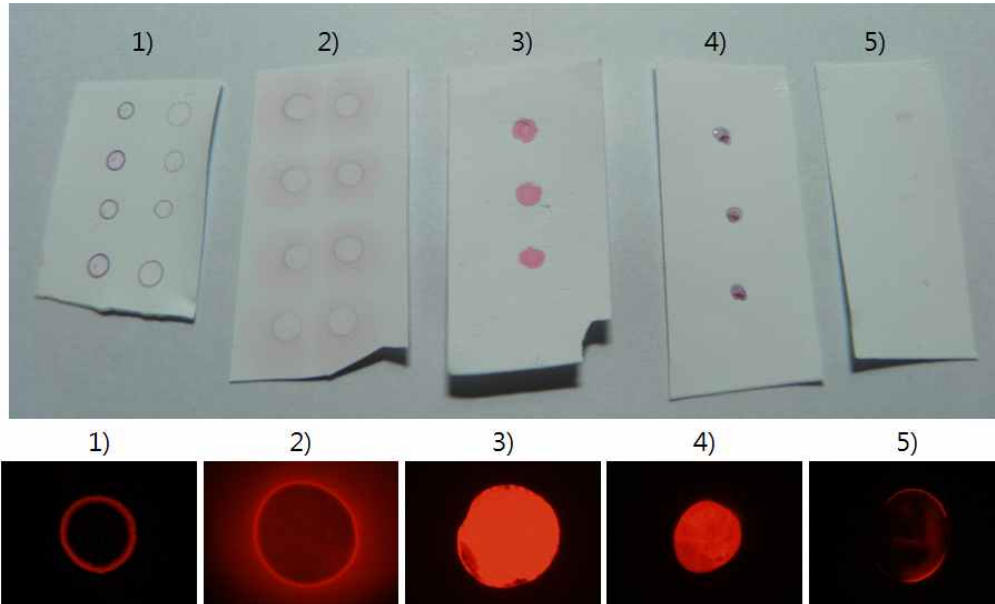


그림 34 NC membrane에 대한 PDA liposome 고정 실험

Liposome과 Nitrocellulose Membrane 모두 중성 및 알칼리 pH 에서 모두 음전하를 가지기 때문에, 1) 번 실험 결과처럼 표면 처리 없이 바로 고정시키는 경우엔, 서로 간의 반발 때문에, Liposome이 membrane에 잘 고정 되지 않았다. Spotting한 용액 속의 Liposome이 membrane 안으로 잘 스며들지 못하고, 용액이 마르게 되어, Spot의 가장자리만 Liposome이 있게 되었고, 5)번 결과에서처럼 압력을 가하여 liposome 용액을 membrane 내로 투과시켜 고정해 보려 하였으나, 이 역시도 liposome이 고정되지 않았다.

문제의 원인이 되는 Nitrocellulose Membrane의 음전하를 해소하기 위해 20X SSC Buffer를 이용하였다. 이 방법은 음전하를 띠는 DNA를 NC membrane에 고정할 때 제시된 방법이기도 하다. 그 결과, Control (2)번 실험)에 대해 Liposome이 고르게 Spotting 되는 것을 3)번 실험에서 확인할 수 있었다. 아울러 Membrane 전체를 20X SSC Buffer로 적시지 않고 일부분(Spot)만 적셔서 Liposome이 잘 고정 되는 것도 4)번 실험에서 확인하였다.

결론적으로 20x SSC Buffer를 이용하여, Liposome을 Membrane에 잘 고정 시킬 수 있었다. 기본적으로 Glass에 Liposome을 붙이는 것 보다 membrane에 붙이는 것이 liposome의 양이 많아 큰 신호가 나왔다. (형광현미경의 낮은 exposure time에서도 membrane의 경우, 큰 형광을 볼 수 있음. Glass는 exposure time이 1/3 이나, Membrane은 1/30.) 즉, membrane을 통해 감도도 증가 시킬 수 있음을 확인하였다.

둘들 말은 Tape 형태의 system의 경우, NC membrane은 깨지기가 쉽고, 정전기가 심해 다루기가 어렵다는 단점이 있다. 이를 해결하기 위해, NC membrane이 코팅된 고분자 필름이나, NC membrane보다 단단하며, 원래 Positive 전하를 띠어 SSC Buffer 없이도 Liposome이 잘 붙을 수 있는 Nylon

Membrane의 이용을 고려하고 있다.

NC membrane에 코팅된 PDA liposome을 이용하여 다음과 같이 Neomycin을 검출하는 실험을 진행하였으며, 결과는 다음과 같다.

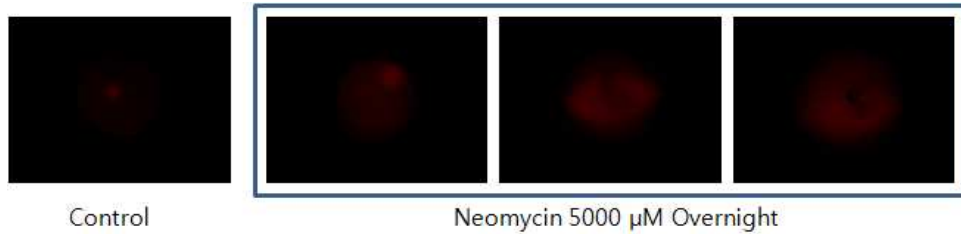


그림 35 NC membrane에 코팅된 PDA liposome을 이용한 Neomycin 검출

위와 같이 Neomycin를 가한 membrane에서 더 강한 형광을 확인할 수 있었다. 검출 시간을 줄이기 위해 PDA liposome을 개선하는 연구가 더 진행 될 것이다.

라 Bio-inspired Simple and Material-independent 코팅 방법

고분자 필름에 PDA가 코팅되지 않은 문제를 해결 하고자, Silane을 쓰지 않는 코팅 방법을 고안하였다. 자연계에 존재하는 여러 소재들 중 홍합 단백질의 경우, 그 접착력이 굉장히 좋으며, 재료를 가리지 않는다. 이 홍합 단백질의 주성분인 Dopamine을 PDA liposome에 붙여서 PDA liposome을 표면 처리 없이, 그리고 재료에 상관없이 코팅하는 연구를 진행하였다.

우선은 글라스 표면에 대하여 실레인 등의 아무 처리도 하지 않은 슬라이드 글라스에 PDA liposome을 코팅하는 실험을 진행하였으며, 현재 코팅이 잘 이루어질 수 있는 적정 조건을 찾을 수 있었다.

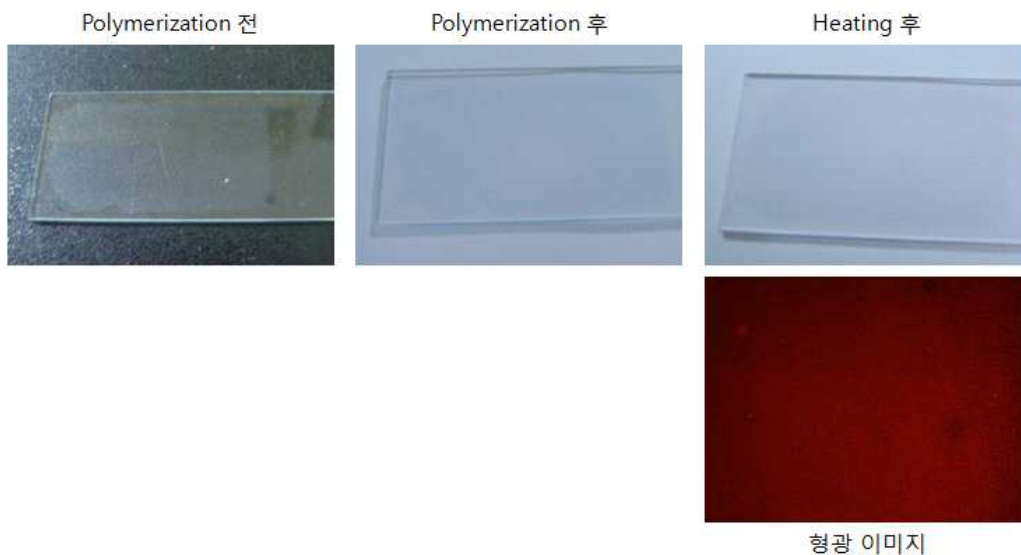


그림 36 Dopamine을 이용한 PDA liposome 코팅 실험 결과

Dopamine을 이용하여, 아무런 처리도 하지 않은 글라스에 PDA liposome이 잘 붙을 수 있음을 확인할 수 있었다. Dopamine에 의해, Liposome이 글라스 표면에 붙었으며, 이와 동시에 Dopamine의 접착력 덕분에 Liposome과 Liposome 사이에서도 접착이 일어나, 코팅이 더 잘 이루어 질수 있었으며, 코팅이 거

친 Washing 과정에서도 잘 견뎌를 확인 할 수 있었다. 이 원리를 PET 필름 등 다른 재료에도 적용하여, 재료에 상관없이 PDA liposome이 잘 코팅 될 수 있는지를 확인해 볼 것이다.

또한 Dopamine에는 Antibody와 Aptamer와도 붙을 수 있는 작용기가 있기 때문에 이를 이용하여 프로브를 고정하여 타겟을 검출하는 실험도 계속하여 진행 할 것이다.

제 2 절 항생제 검출을 위한 Bio/Immunoreceptor 및 nanobioprobe 개발

1. 유전자재조합 PBP Bioreceptor 개발

가. PBP 유전자 증폭

Penicillin binding protein (PBP) 발현을 위한 유전자는 *Staphylococcus aureus* (S.aures, ATCC 25923) 에서 획득하였다. PBP 단백질은 그림 1과 같이 4 부위로 구분되며 PBP 단백질 중 transmembrane anchor (aa 1-23)부분을 제외한 전체 PBP 단백질을 코딩하는 유전자 (bp75 - 2111)와 PBP의 주요 epitope부위인 transpeptidase domain (aa 327-668)을 코딩하는 유전자 (bp 1081- 1893)를 그림 2와 같이 p-ET 28 벡터를 이용하여 각각 발현하였다.

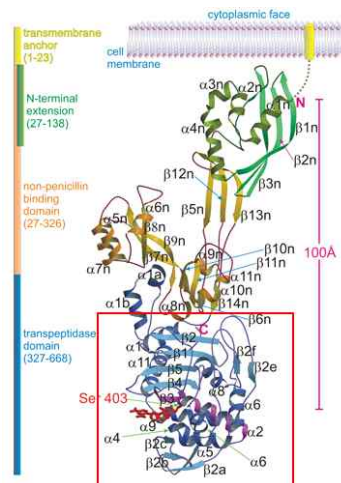


그림 1. Penicillin binding protein의 3차구조 모델

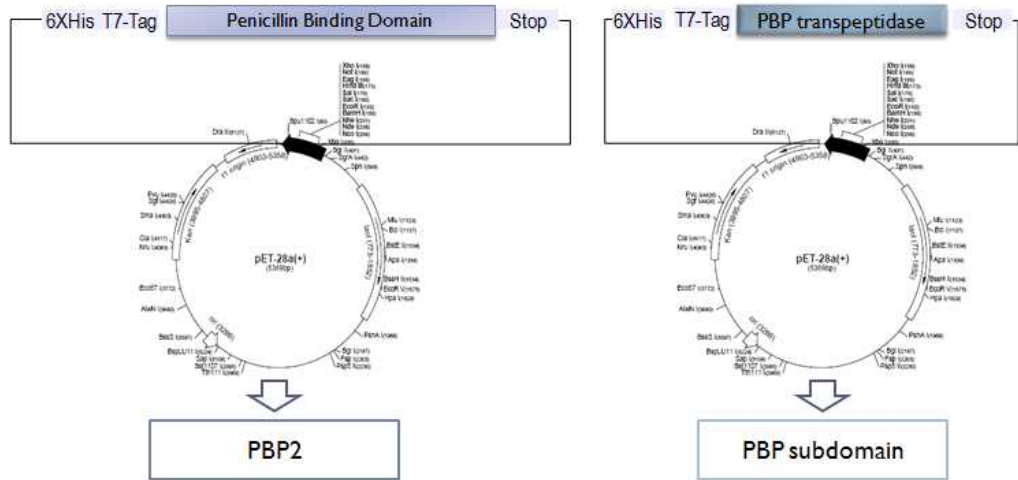


그림 2. Penicillin binding protein의 재조합 단백질 발현 전략

나. PBP 유전자 발현 벡터 제작

효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 실시하여 유전자를 그림 3과 같이 증폭하였고, 증폭된 DNA를 각각 pGEMT (Promega,USA)를 이용하여 클로닝하고, 제한효소 BamHI과 Xol I를 절단 후 pET28과 라이게이션 하여 PBP 전체를 발현하는 p-ET PBP벡터와 PBP transpeptidase domain을 발현하는 p-ET tPBP를 각각 작성하였다(그림 4).

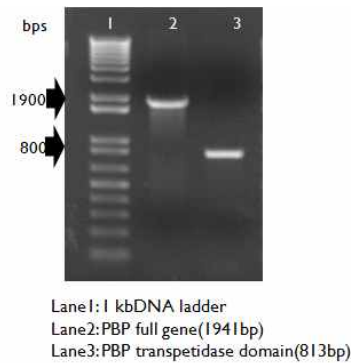


그림3. Penicillin binding protein의 유전자 증폭 결과

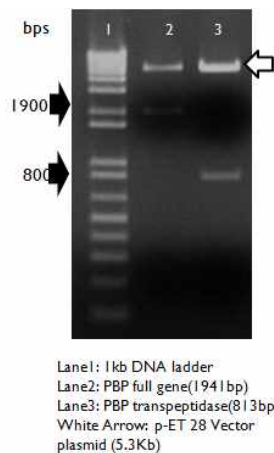


그림 4. Penicillin binding protein 발현을 위한 재조합 벡터 작성

다. 유전자재조합 PBP의 발현

유전자재조합 PBP를 발현하기 위하여 2종의 벡터를 Rosetta-gami2(DE3)plysS에 transformation 후에 LB medium에서 대장균을 배양하였고, IPTG를 첨가하여 재조합 단백질을 induction 하였다. 발현된 단백질을 SDS-PAGE를 통하여 확인한 결과 p-ET PBP에서는 71 kDa의 단백질이, p-ET tPBP에서는 30 kDa의 단백질이 확인되었다(그림 5).

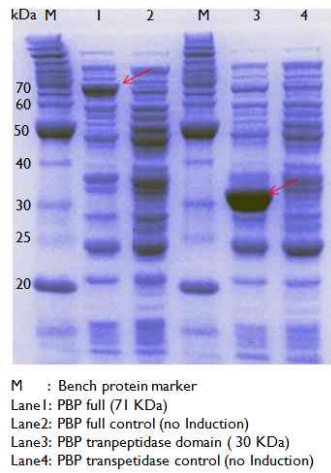


그림 5. SDS-PAGE에서 유전자 재조합 Penicillin binding protein 발현 확인

라. 유전자재조합 PBP (rPBP)의 면역 반응성 평가

발현된 rPBP의 β -lactam 계열 항생제와 반응성을 평가하기 위하여 발현된 단백질을 ELISA 플레이트에 농도별도 고정화 후 Peroxidase (POD)가 결합된 Penicillin과 ampicillin과의 반응성을 평가한 결과 그림 6과 같이 고정화된 rPBP농도에 의존적인 반응성을 나타내었다. 향후 정확한 반응성을 검정하기 위하여 rPBP의 발현, 정제조건을 설정하여 경쟁적 ELISA를 사용하여 평가할 계획이다.

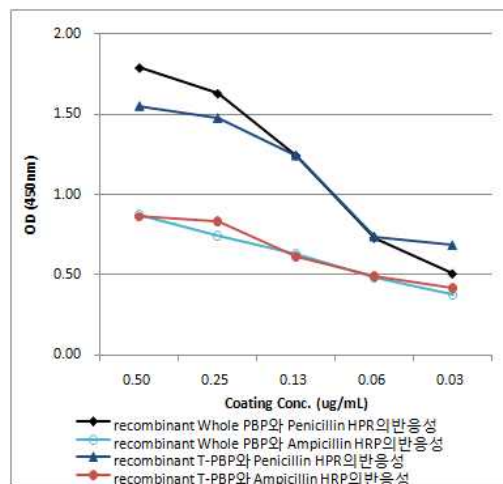


그림 6. Indirect ELISA에서 유전자재조합 단백질의 반응성 평가

2. Immunoreceptor 개발

가. Antibiotics haptenized protein conjugated 제작

Immunoreceptor 제작을 위한 antibiotics haptenized protein은 항생제 5종 (Penicillin G, Ampicillin, Tetracycline, Chloramphenicol, Gentamicin, Sulfamethazine)을 도입하였고, 그림 7과 같이 sulfamethazine은 maleimide를 이용하여 BSA와 KLH carrier protein과 중합하였고, 다른 항생제 4종은 EDC를 이용하여 중합체를 각각 제작하였다(표 1).

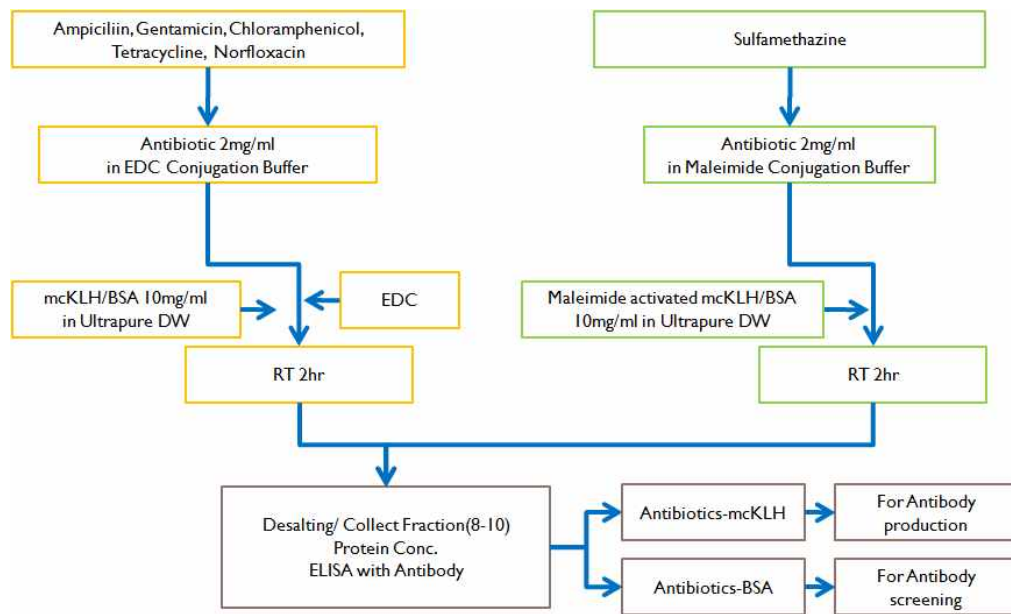


그림 7. Antibiotics haptenized protein의 제작

표 1. Antibiotics haptenized protein 중합체 제작 결과

Antibiotics	BSA-coupling			mcKLH-coupling		
	Conc.($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Volume(mL)	Total(mg)	Conc.($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Volume(mL)	Total(mg)
Ampicillin	650	1.0	0.650	530	1.8	0.954
Tetracycline	676	2.0	1.352	646	2.0	1.292
Gentamicin	437	1.5	0.655	752	1.9	1.429
Chloramphenicol	900	0.2	0.180	744	1.8	1.339
Sulfamethazine	4,000	0.1	0.400	522	2.0	1.044

나. Antibiotics haptenized protein 중합체의 유효성 평가

Antibiotics haptenized protein 중합체의 면역원성을 평가하기 위하여 상용 항체를 도입하여 Indirect ELISA를 이용하여 평가하였다. 중합체를 ELISA 플레이트에 1.0ug/mL의 농도로 첨가하여 밤새 흡착하여 고정화하였고, 상용 항체를 PBST에 10ug/mL부터 2진 계단 희석하여 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응한 후에 HRPO가 결합된 이차항체를 100ng/mL의 농도로 첨가하여 흡광도를 측정된 결과 그림 8과 같이 5종의 중합체는 상용 항체의 농도에 의존적인 정량적인 반응성을 나타내어 중합된 항생제가 유효한 것으로 평가되었다.

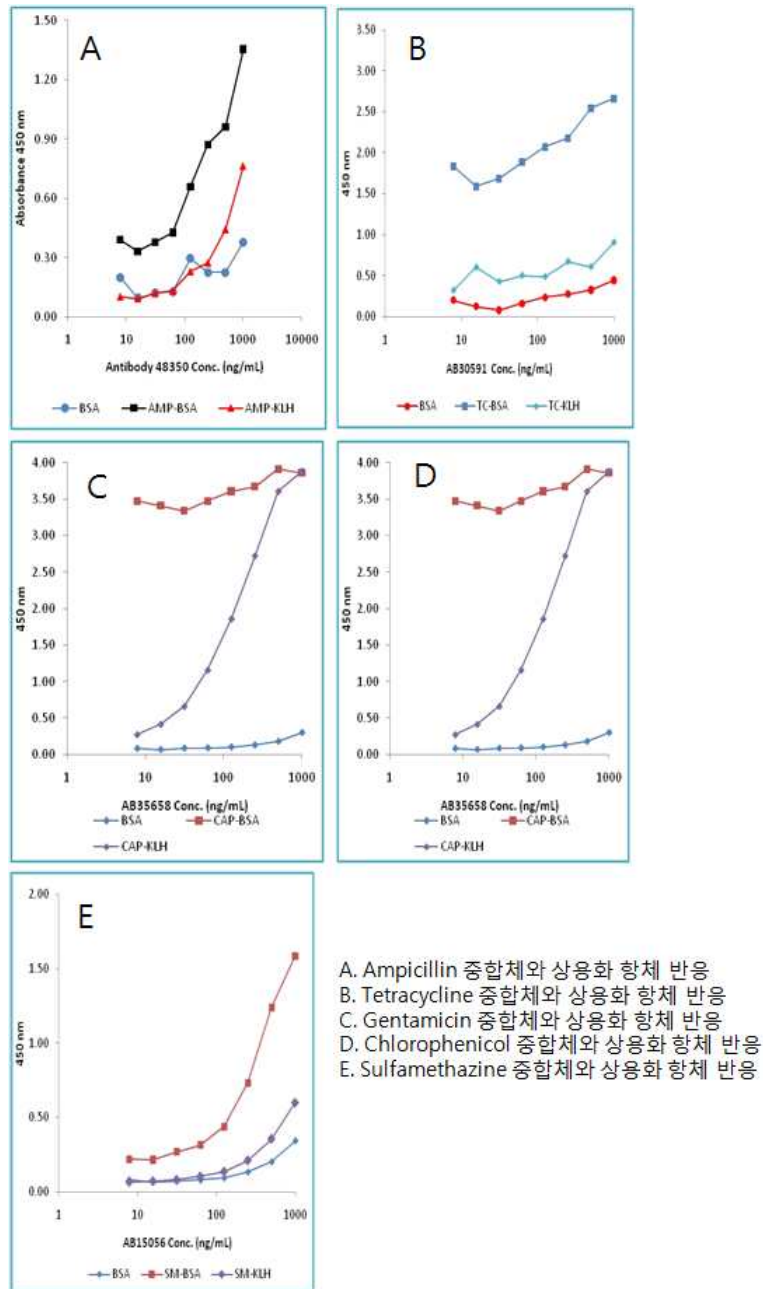


그림 8. Antibiotics haptenized protein 중합체의 항체반응성 측정결과

다. Antibiotics haptenized protein을 이용한 단클론항체 및 폴리클론 항체 제작

항생제 검출을 위한 Immunoreceptor을 제작을 위하여 증합된 Antibiotics haptenized protein을 마우스와 SPF 가토에 그림9와 같이 면역을 진행하였다.

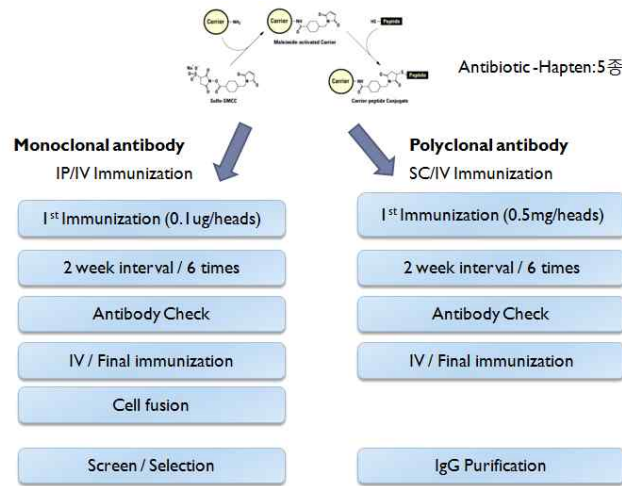


그림 9. Antibiotics haptenized protein 중합체를 이용한 immunoreceptor 제작 모식도

단클론항체 개발을 위하여 면역 반응이 유도된 마우스의 비장을 적출하여 암종세포 SP2/0 Ag14와 PEG를 이용하여 융합세포주를 제작하였다. 항체 선별을 위하여 BSA가 증합된 항생제 5종을 ELISA 플레이트에 1.0ug/mL의 농도로 첨가하여 고정화한 후에, 융합세포주 배양 상층액을 PBST에 5배 희석 후 100uL를 첨가하였다. 실온에서 1시간동안 반응한 후에 HRPO가 결합된 anti-mouse IgG를 100ng/mL의 농도로 희석하여 첨가하였고, 흡광도를 측정하였다.

표 2와 같이 gentamicin에 특이적인 반응을 나타내는 클론 7G41을 선별하였고, Sulfamethazine에 대한 클론은 S2G8를 선별하였다. Chloramphenicol, Tetracycline, Ampicillin에 대해서는 반응성을 나타내는 클론이 없었으며 재선발을 추진할 예정이다.

표 2. Indirect ELISA에서 단클론항체의 반응성 평가

Antibiotics	Clone	Antibiotics-BSA (ELISA OD, 450nm)					Isotype
		Ampicillin	Gentamicin	Chloramphenicol	Tetracycline	Sulfamethazine	
Ampicillin	A2C	0.539	0.449	0.523	0.250	0.522	IgG2a/Kappa
	A3D	0.490	0.522	0.565	0.232	0.415	IgG1/Kappa
Gentamicin	7G41	0.258	3.707	0.288	0.276	0.295	IgG2b/Kappa
	6A	1.388	3.681	0.221	0.164	0.163	IgG1/Kappa
	4H	0.424	2.873	0.354	0.204	0.774	IgG1/Kappa
Chloramphenicol	C1A	0.134	0.124	0.118	0.133	0.086	IgG1/Kappa
	C1B	0.116	0.105	0.082	0.087	0.080	IgG1/Kappa
Tetracycline	T11F	0.472	0.517	0.499	0.824	0.447	IgG3/Kappa
	T9G	0.411	0.345	0.440	0.897	0.629	IgG1/Kappa
Sulfamethazine	S2G8	0.768	1.006	0.426	0.511	1.921	IgG1/Kappa
	S2A10	0.689	0.786	0.382	0.714	1.124	IgG1/Kappa
	S2A11	0.881	0.528	0.650	0.497	1.009	IgG1/Kappa

라. Competitive ELISA를 이용한 immunoreceptor 평가

선발된 단클론항체와 상용항체를 사용하여 immunoreceptor의 적합성을 평가하기 위하여 Indirect competitive ELISA를 이용하여 경쟁반응율 (Percentage Inhibition rate, PI%)를 측정하였다. BSA가 중합된 항생제 5종을 각각 ELISA 플레이트에 1.0ug/mL의 농도로 첨가하여 고정화한 후에, 1ug/mL로 희석된 항체와 10ug/mL부터 십진 계단 희석한 5종의 항생제를 각각 혼합하여 플레이트에 100uL를 첨가하였다. 실온에서 1시간동안 반응한 후에 HRPO가 결합된 anti-mouse IgG를 100ng/mL의 농도로 희석하여 첨가하였고, 흡광도를 측정하여 PI%를 산출하였다. 표 3과 같이 100ng/mL에서의 경쟁률은 gentamicin 33.8%, sulfamethazine 13.4%, Ampicillin 6.6%, Chloramphenicol 13.7%, Tetracycline 37.6%로 각각 측정되어 최저검출한계를 충족하는 것으로 확인되었다.

표 3. Indirect Competitive ELISA에서 7G41 항체와 상용 항체의 경쟁반응 비교

Analyte (ng/mL)	Gentamicin (7G41)		Sulfamethazine (S2G8)		Ampicillin (48351)		Chloramphenicol (79245)		Tetracycline (30591)	
	OD	PI%	OD	PI%	OD	PI%	OD	PI%	OD	PI%
10000	0.283	92.4	1.129	51.4	0.858	36.8	1.221	44.2	0.236	52.0
1000	0.877	76.4	1.771	23.7	0.987	27.3	1.391	36.4	0.419	49.5
100	2.458	33.8	2.01	13.4	1.267	6.6	1.887	13.7	0.518	37.6
10	3.536	4.8	2.163	6.8	1.297	4.4	2.011	8.1	0.609	26.6
1	3.562	4.1	2.195	5.4	1.358	-0.1	2.158	1.3	0.779	6.1
0.1	3.655	1.6	2.037	12.2	1.357	0.0	2.333	-6.7	0.825	0.6
0.01	3.647	1.8	2.149	7.4	1.339	1.3	2.158	1.3	0.854	-2.9
Control	3.714	0.0	2.321	0.0	1.357	0.0	2.187	0.0	0.830	0.0

마. 비 표지형 바이오 칩을 이용한 immunoreceptor의 친화도 평가

항체 친화도를 측정하기 위하여 label을 사용하지 않는 Surface Plasmon Resonance (SPR) 방법인 BIACORE 2000을 사용하였다. 그림 10과 같이 BIACORE CM5 센서칩을 구입하여 개발된 단클론항체 7G41과 상용 항체인 Gentamicin MAb (Biospecific)은 분석농도를 각각 10000, 2000, 400, 80, 16, 3.2 ng/mL로 희석하여 센서칩에 35 μ l를 주입하여 420초간 반응시켰고, 반응이 끝난 후에는 10 mM PBS(pH 7.4)를 420초간 주입하여 탈착반응을 유도하였고, 분석 프로그램을 이용하여 부착속도상수(k_a)와 탈착속도상수(k_d) 그리고 평형부착상수(K_A)를 계산하였다.

그림 11과 같이 7G41의 부착속도상수는 5.71×10^6 , 탈착속도상수는 1.11×10^{-3} , 평형부착상수는 5.19×10^9 으로 측정되었고, 상용항체의 부착속도상수는 1.2×10^6 , 탈착속도상수는 4.3×10^{-4} , 평형부착상수는 2.8×10^9 으로 측정되어, 개발된 항체는 상용 항체보다 1.85배 부착평형상수가 높은 것으로 확인되어 우수한 것으로 평가되었다. 이에, 개발 및 도입된 항체의 친화도를 추가적으로 평가하여 immunoreceptor의 적합한 항체를 선발하고자 한다.

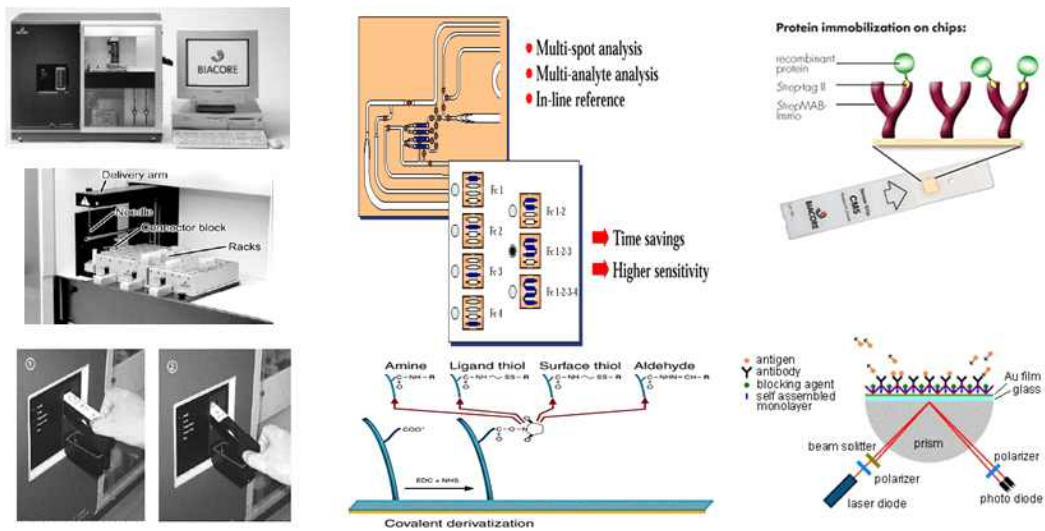


그림 10. SPR BIA Core2000의 항체 친화도 평가 모식도

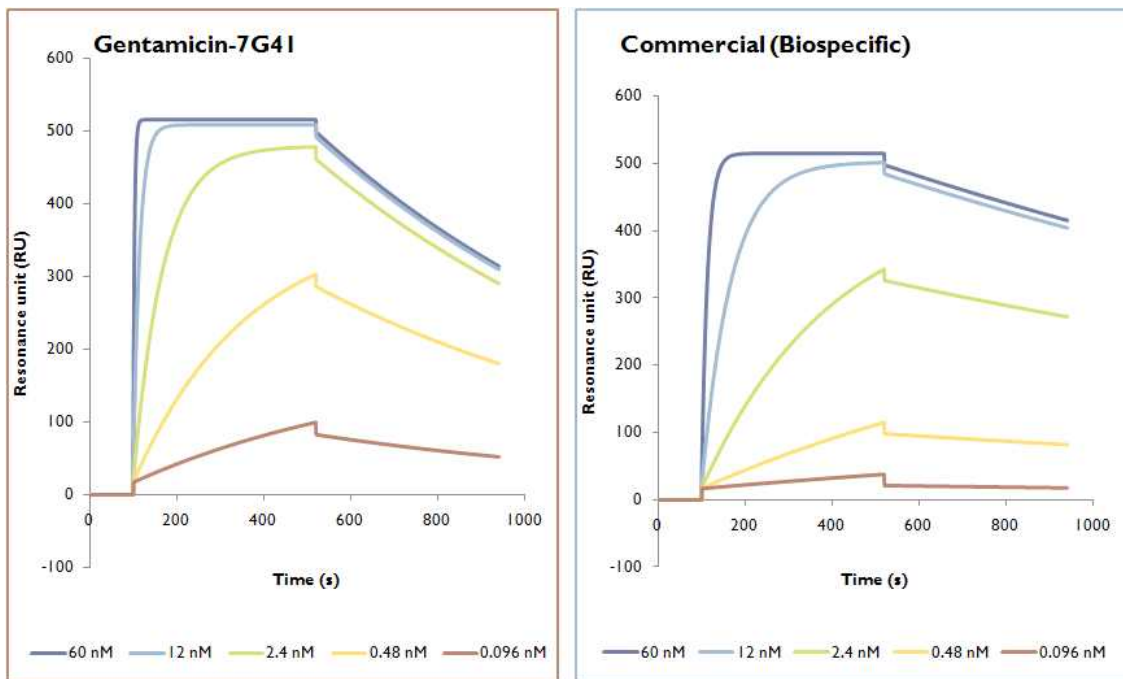


그림 11. BIA Core를 이용한 immunoreceptor의 친화도 평가결과

3. 개발된 단클론항체 및 폴리항체의 생산

가. 단클론항체 생산을 위한 Ascites 확보 및 정제

1차년도에서 확보한 Gentamycin 및 norfloxacin에 대한 단클론항체를 생산하기 위하여 ascities를 생산하였다(표 4). 반응성이 있는 것으로 확인된 융합 세포주를 마우스 복강으로 접종하여 2주간 항체생산을 유도한 후 복강으로부터 복수를 채취하여 Protein G column을 통하여 항체를 정제하였다. 정제

후 BCA 농도 정량을 통하여 정량한 결과 표 4와 같은 항체의 양을 확보할 수 있었다.

표 4. 1차년도에서 확보된 Antibiotics 단클론 및 isotype, 정제 후 생산 결과

Antibiotics	Clone	Isotype	생산양(mg)
Gentamicin	7G41	IgG2b/Kappa	14
Norfloxacin	3D4	IgG1/Kappa	3.6
	3D29	IgG1/Kappa	3.8
	3D33	IgG1/Kappa	5.2

나. 폴리클론 항체 생산 및 정제

Antibiotics haptenized protein(KLH)을 SC/IV로 투여한 SPF rabbit으로부터 DPI 별(2주간, 6회)로 혈액을 채취하여 항체 생성 유무를 판단하였다. 항체 생성 유무 판단을 위하여 BSA가 중합된 항생제 6종을 ELISA 플레이트에 1.0ug/mL의 농도로 첨가하여 고정화한 후에, 채취한 혈액을 PBST에 5배 희석 후 100uL를 취하여 실온에서 농도별 free antibiotics 100uL와 1시간동안 반응한 후에 BSA-antibiotics가 고정된 ELISA 플레이트에 위 반응혼합액을 100uL 주입하여 37°C에서 한시간동안 반응하였다. 이후 HRP가 결합된 anti-rabbit IgG를 100ng/mL의 농도로 희석하여 첨가하였고, 흡광도를 측정하였다. 표 2의 P.I(Percentage of Inhibition, %)값 으로부터 Norfloxacin에 특이적인 반응을 나타내는 혈청을 선별하였고, Gentamicin은 면역화 중 DPI 1주째 되는 때에 하반신 마비 증상이 나타나 안락사 시켰다. 그 외 Ampicillin, Chloramphenicol, Tetracycline, Sulfamethazine에 대한 유효한 혈청을 확보하지 못하여 추가면역을 진행 중에 있다.

표 5. Indirect Competitive ELISA에서 폴리클론항체의 반응성 평가

Antibiotics (ng/mL)	Antibiotics-BSA (ELISA OD, 450nm, DPI 6주)											
	Ampicillin		Gentamicin		Chloramphenicol		Tetracycline		Sulfamethazine		Norfloxacin	
	OD	P.I(%)	OD	P.I(%)	OD	P.I(%)	OD	P.I(%)	OD	P.I(%)	OD	P.I(%)
10000	3.114	7.8	3.209	14.8	2.656	-32.9	1.72	-23.2	3.752	3.9	3.573	8.5
1000	3.574	-5.7	3.241	14.0	2.857	-42.9	1.5	-7.5	3.823	2.09	3.638	6.9
100	3.378	0.08	3.645	3.3	1.79	10.4	0.905	35.1	3.779	3.22	3.697	5.4
10	3.52	-4.1	3.6	4.5	2.596	-29.9	1.398	-0.2	3.83	1.9	3.652	6.5
1	3.523	-4.1	3.679	2.4	1.385	30.6	1.266	9.2	3.695	5.3	3.7	5.3
0.1	3.573	-5.6	3.622	3.9	1.667	16.5	1.128	19.1	3.812	2.3	3.74	4.3
0.01	3.678	-8.7	3.68	2.3	1.627	18.5	1.266	9.2	3.722	4.6	3.783	3.2
Blank	3.381		3.77		1.998		1.395		3.905		3.909	

위 결과로부터 Norfloxacin이 면역된 Rabbit을 심장채혈을 통하여 약 70mL의 혈액을 확보하였고 이후 혈액으로부터 혈장을 제거하고 혈청으로부터 Protein A column을 통하여 항체를 정제하였다. 정제 후 BCA 농도 정량을 통하여 정량한 결과 표 6과 같은 항체의 양을 확보할 수 있었다.

표 6. Antibiotics 폴리클론항체 정제 후 생산 결과

Antibiotics	Host	생산양(mg)
Norfloxacin	Rabbit	9

4. Bioreceptor 유효성 평가 및 선정

가. Antibiotics haptenized protein conjugated 제작

ELISA를 이용한 bioreceptor의 유효성 평가를 위해 antibiotics haptenized protein을 제작하였다. 항생제 5종 (Ampicillin, Tetracycline, Chloramphenicol, Gentamicin, Norfloxacin)에 대해서는 EDC를 이용하여 BSA를 중합하였고, sulfamethazine은 maleimide를 이용하여 BSA와 중합하여 각각 제작하였다 (그림 12, 표 7).

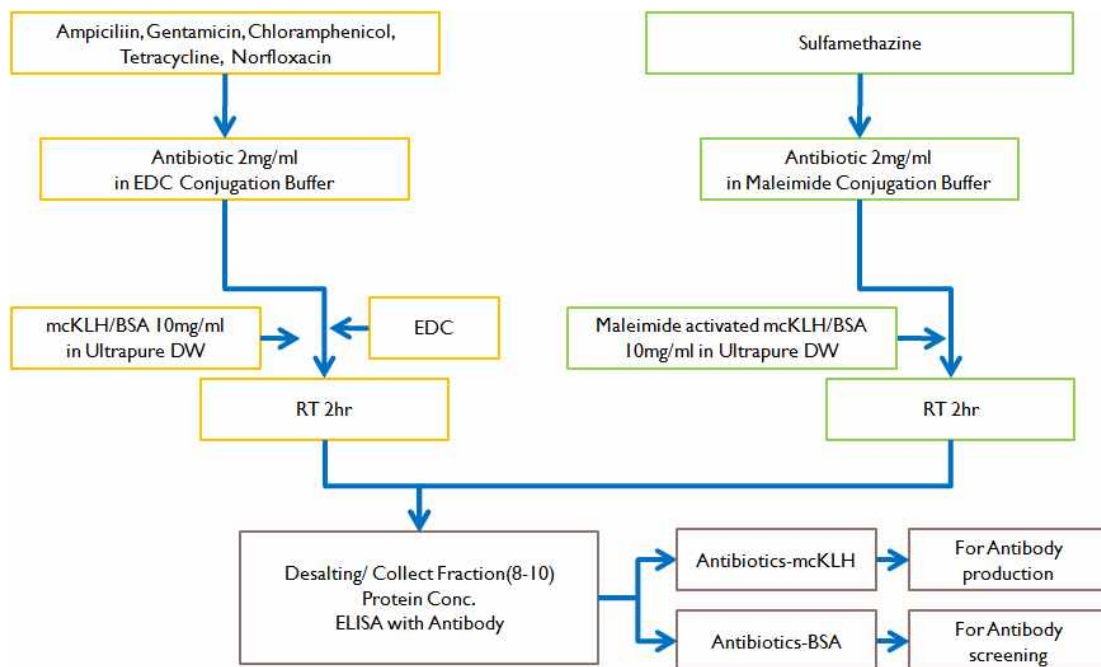


그림 12. Antibiotics haptenized protein 중합체 제작 모식도

표 7. Antibiotics haptized protein 중합체 제작 결과

Antibiotics	BSA-coupling		
	Conc.($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Volume(mL)	Total(mg)
Ampicillin	650	1.0	0.650
Tetracycline	676	2.0	1.352
Gentamicin	437	1.5	0.655
Chloramphenicol	900	0.2	0.180
Sulfamethazine	4,000	0.1	0.400
Norfloxacin	4	0.5	2.000

나. Indirect Competitive ELISA (IC-ELISA)를 이용한 개발 항체와 상용항체 성능 비교 검사

개발된 항체의 성능 비교를 위하여 항생제 6종에 대한 상용 항체를 도입하였다(표 8). 성능비교 방법은 각 항체의 free antibiotics와의 결합능을 비교하기 위해 competitive Indirect ELISA를 이용하여 평가하였다. BSA-antibiotics 중합체를 ELISA 플레이트에 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가하여 밤새 흡착하여 고정화하였고, 각 항생제를 PBST에 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 부터 10진 계단 희석하여 100 μL 를 취한 후 개발된 항체와 상용항체를 PBST를 이용하여 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 희석한 후 100 μL 를 취하여 위 농도별 항생제와 1시간 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 반응한 후에 HRP가 결합된 이차항체를 100 ng/mL 의 농도로 첨가하여 흡광도를 측정하여 결과 그림 2와 같이 개발된 항체와 모두와 2종의 상용 항체는 항생제 농도에 의존적인 정량적인 반응성을 나타내어 유효한 것으로 평가되었다. 또한 개발된 항체와 상용 항체의 비교 결과 비슷하거나 특정 농도 구간에서는 더 우수한 반응성을 나타내는 것으로 확인되었다(표 9, 그림 13).

표 8. 비교대상 상용항체 도입 내역

Antibiotic	Company	Cat. No.	Host	Immunogen	Subtype	Conc (mg/mL)
Ampicillin	Carpricorn	48351	Mouse	Unknown	IgG1	2.45
	Carpricorn	48350	Mouse	Unknown	IgG1	2.2
	Lifespan	LS-C68936	Mouse	BSA	IgG1	0.95
	Santacruz	160-110	Mouse	BSA	IgG1	0.1
Tetracycline	Abcam	ab30591	Sheep	BSA	-	9.98
Gentamicin	Biospacific	A32060085P	Mouse	Unknown	IgG1	5.31
Chloramphenicol	Abcam	ab15056	Mouse	KLH	IgG2b	0.5
	Abcam	ab35658	Sheep	KLH	-	25.3
	Lifespan	LS-C79245	Mouse	KLH	IgG2b	0.5
	Abcam	ab35210	Sheep	KLH	-	27.9
Sulfamethazine	Abcam	ab31987	Rabbit	Thyroglobulin	-	0.5
Norfloxacin	Boreda	α -Nor-07-01	Rabbit	Unknown	-	4
Penicillin	Biospacific	A41010036P	Mouse	BSA	IgG1	4.67

표 9. Indirect Competitive ELISA를 이용한 개발 항체와 상용 항체의 성능평가

Antibiotics (ng/mL)	Antibiotics-BSA (ELISA, P.I)									
	Ampicillin	Gentamicin		Chloramphenicol	Tetracycline	Sulfamethazine	Norfloxacin			
	48351	A32060085P	개발항체	ab35658	ab30591	ab31987	α-Nor-07-01	개발항체		
			7G41					3D4	3D29	3D33
10000	-41.0	69.1	60.8	12.1	61.8	-3.3	48.2	51.1	25.3	45.1
1000	14.9	59.3	54.3	13.7	36.3	10.5	52.4	30.7	3.6	30.7
100	27.4	2.1	16.3	12.5	6.4	18.9	46.2	20.5	-3.0	24.1
10	34.0	-1.3	1.1	10.1	-10.6	3.5	21.2	21.6	9.7	27.4
1	32.4	-0.8	4.4	7.1	-44.7	14.7	9.9	15.1	7.1	31.6
0.1	21.5	2.3	2.2	6.0	-41.4	-0.5	10.4	30.1	12.3	29.4
0.01	20.4	-0.2	2.4	6.6	-39.2	-5.0	8.4	13.0	10.0	10.7

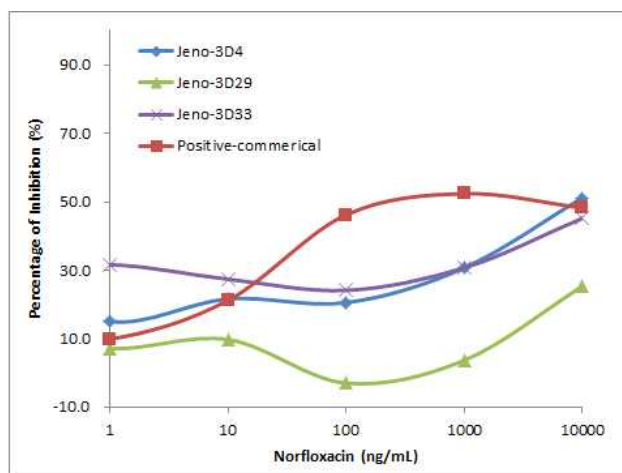
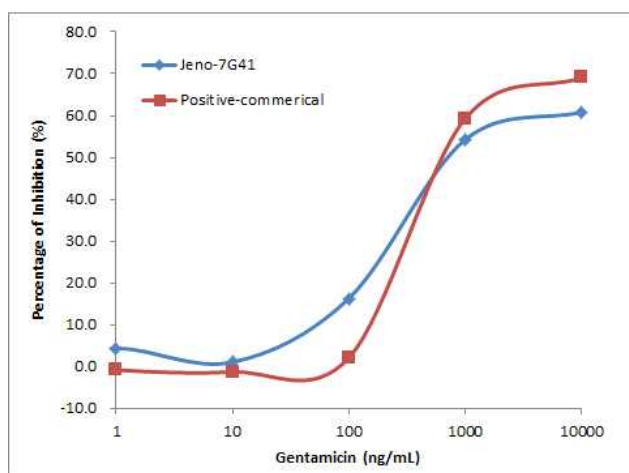


그림 13. Gentamicin, Norfloxacin에 대한 Indirect competitive ELISA를 이용한 개발 항체와 상용 항체의 성능평가

다. Direct Competitive ELISA (DC-ELISA)를 이용한 항체 유효성 평가

Indirect Competitive ELISA에서 항생제와 경쟁반응하지 않는 항체들을 포함하여 보다 정밀하게 항체의 반응성을 확인하기 위하여 Direct Competition ELISA로 조건을 변경하여 각 항체들을 검사하고 성능을 분석하였다. Direct ELISA를 위해 항생제 각 6종에 대해 EDC coupling 방법으로 HRP를 중합하였으며 중합결과는 아래 표 10과 같다.

표 10. Antibiotics-HRP 중합체 제작 결과

HRP conjugates	Concentration (mg/mL)
Ampicillin	1.285
Norfloxacin	0.74
Tetracycline	1.45
Gentamicin	0.425
Chloramphenicol	0.96
Sulfamethazine	1.06

분석을 위하여 표 8에서 열거한 상용항체와 개발된 항체 5종을 ELISA 플레이트에 0.5 ug/mL 농도로 첨가하여 밤새 흡착하여 고정화하였고, 각 항생제를 PBST에 10ug/mL부터 10진 계단 희석하여 100 uL를 취한 후 Antibiotics-HRP를 PBST를 이용하여 500 ng/mL으로 희석한 후 100 uL를 취하여 위 농도별 항생제와 혼합한 후에 항체가 고정된 플레이트에 100 uL씩 주입한 후 1시간 동안 37°C에서 반응한 후에 흡광도를 측정하였다.

Direct Competitive ELISA에서는 표 11과 같이 Ampicillin(48351), Gentamicin(A32060085P), Tetracycline(ab30591) 3종의 상용항체와 개발항체 Gentamicin (7G41)은 항생제 농도에 의존적으로 정량적인 반응성을 나타내어 유효한 것으로 평가되었다. 그 외 상용항체는 위와 같은 분석시스템으로 free antibiotics와 반응하지 않는 것으로 확인되었다(표 11).

표 11. Competitive direct ELISA를 이용한 개발 항체와 상용 항체 유효성 평가

Antibiotics (ng/mL)	Antibody coating (ELISA, P.I)									
	Ampicillin				Gentamicin		Chloramphenicol			
	48351	48350	LS-C68936	160-110	A32060085P	개발항체 7G41	ab15056	ab35658	LS-C7925	ab35210
10000	43.4	44.0	47.7	35.3	73.1	44.8	2.0	10.7	7.4	-1.1
1000	15.5	20.5	-2.5	-7.0	53.0	16.9	4.0	-4.9	11.7	3.3
100	7.1	13.7	-4.5	-4.2	-4.9	9.8	8.0	7.4	6.1	0.0
10	-4.9	8.5	-7.8	-2.3	-19.0	-6.0	8.0	-4.1	1.8	-5.5
1	1.8	17.5	-17.3	-7.4	-34.3	0.0	10.7	1.6	6.7	16.5
0.1	3.5	16.7	-12.8	-3.7	-18.7	-7.1	10.0	13.9	-4.3	2.2
0.01	-4.9	3.0	-0.8	-7.9	-35.8	-12.6	0.0	-6.6	0.6	-2.2

Antibiotics (ng/mL)	Antibody coating (ELISA, P.I)					
	Tetracycline	Sulfamethazine	Norfloxacin			
	ab30591	ab31987	α -Nor-07-01	개발항체		
				3D4	3D29	Rabbit
10000	63.7	-1.0	7.6	10.9	-10.3	-7.0
1000	16.5	-4.9	20.5	8.4	-38.8	-26.3
100	8.0	9.8	-5.8	-14.8	-41.6	-38.2
10	0.0	11.8	-13.9	13.2	-42.3	-45.2
1	-14.6	4.9	2.1	-13.4	-49.0	-40.3
0.1	1.4	5.9	-8.2	-15.5	-53.5	-40.3
0.01	2.8	13.7	-1.8	-1.5	-36.4	-20.4

5. Bioreceptor 후보 최종 선정

항생제 검출을 위한 단클론항체 및 폴리클론 항체의 성능을 각기 다른 ELISA 분석시스템으로부터 Light scattering을 위한 Nano bio-probe 제작에 적합한 항체를 선정할 수 있었다.

Indirect Competitive ELISA 분석방법으로부터 단클론항체로는 Gentamicin 상용항체 1종과 개발항체 1종, Norfloxacin 상용항체 1종과 개발항체 1종을 선별할 수 있었고 Competitive direct ELISA 분석방법으로부터 Ampicillin 상용항체 1종과 Tetracycline 상용항체 1종, Gentamicin 상용항체 1종과 개발항체 1종을 선별할 수 있었다. 폴리클론항체는 Norfloxacin에 대하여 개발항체 1종, 상용항체 1종을 선별하였다.

이에 따라 최종적으로 4종 항생제 (Ampicillin, Tetracycline, Gentamicin, Norfloxacin)에 대하여 4종의 단클론항체, 1종의 폴리클론 항체를 개발하였으며, 상용항체는 3종의 단클론항체, 1종의 폴리클론 항체를 선별하여 총 9종의 유효한 항체를 확보하였다. 이들 항체는 항생제 표준물질과 10-100ng/mL의 농도까지 경쟁반응을 보여 응집반응에 사용 가능성이 있는 항체로 평가되었다(표 12). 그러나 전체 도입한 13종의 상용 항체 중 4종만이 액상에서 항생제와 결합능이 있는 확인하였으며 나머지 9종의 항체는 반응하지 않아 기존에 판매되고 있는 상용항체의 성능은 매우 좋지 않은 것으로 확인되었다.

표 12. Free antibiotics에 반응하는 Nano-bio probe 용 항체 최종선발 결과

Antibiotics	Company	Product / Clone number
Ampicillin	Carpricorn	48351
Tetracycline	Abcam	ab30591
Gentamicin	개발 단클론항체	7G41
	Biospacific	A32060085P
Norfloxacin	Boreda (폴리클론)	α -Nor-07-01
	개발 폴리클론 항체	Rabbit IgG
	개발 단클론항체	3D4
		3D29
3D33		

6. Bioprobe 제작 최적화 및 표준화를 위한 대표 Immuno-receptor 선정 및 응집반응 최적화를 위한 이론적 분석 모델 가정

가. Bioprobe 제작 최적화 및 표준화 대상 Immuno-receptor 모델 선정

2차년도 기술개발 결과에서 항생제에 대한 항체는 4종 항생제에 대한 9종의 항체가 선발되었다(표 13). 이들 항체를 이용하여 bioprobe 제작 최적화와 표준화를 위해 대표항체를 2종 (Gentamicin: 7G41, Norfloxacin: 3D4)을 선발하였다. 9종 중 단 2종만 선발한 근거는 9종 전부를 최적화하게 되면 소요시간이 오래 걸릴 뿐만 아니고 선정된 항체 중 일부는 상업용 항체이기 때문에 지속적인 공급이 어려운 단점이 있다. 따라서 선정된 항체 중 가장 반응성이 뛰어나고 우리가 직접 개발하여 생산이 가능한 항체 2종인 Gentamicin: 7G41과 Norfloxacin: 3D4를 선정하였다. 이들 두 항체로 bioprobe 제작 최적화 및 표준화를 실시할 예정이고 추후 설정된 조건으로 선정된 모든 항생제 항체에 대해 bioprobe를 제작할 예정이다. 단 항체 후가공이 필요하지 않은 조건에서는 일부 항생제(Ampicillin, Tetracycline)에 대해 테스트를 실시하기도 하였다.

표 13. 2차년도에서 선정된 Bioprobe용 Imuuno-receptor 최종선발 결과 및 대표 모델선정

Antibiotics	Company	Product / Clone number
Ampicillin	Carpricorn	48351
Tetracycline	Abcam	ab30591
Gentamicin	개발 단클론항체	7G41
	Biospacific	A32060085P
Norfloxacin	Boreda (폴리클론)	α -Nor-07-01
	개발 폴리클론 항체	Rabbit IgG
	개발 단클론항체	3D4
		3D29
3D33		

나. 응집반응 최적화를 위한 이론적 분석 모델 가정

항생제는 일반적으로 인위적으로 제작된 hapten 크기의 화학 합성 물질로서 그 크기가 매우 작다. 따라서 항원으로서의 역할을 할 수 있는 epitope 또한 작은 크기로 인해 그 숫자가 매우 적다. 결국 이는 cross-linking 기반인 응집반응에 결정적인 영향을 미치게 되어 응집반응이 원활하게 일어나지 않게 된다. 그리하여 항생제를 항체를 이용하여 검출하고자 할 때는 기본적으로 경쟁반응을 기반으로 하여 분석하는 경우가 대부분이며 현재 상용화되어있는 항체기반의 항생제 검출 키트도 경쟁반응을 기본원리로 사용하고 있거나 자체개발한 특수한 분석조건을 원리로서 사용하고 있다.

따라서 현재 본 과제의 개발기술인 항생제를 항체를 이용한 응집반응으로 검출하는 경우는 한계가 있기 때문에 아래와 같이 새로운 분석 모델을 설계하였다(그림 14).

		1 st condition	2 nd condition
1 st model	1-1		
2 nd model	2-1		
3 rd model	3-1		

그림 14. 항생제의 응집반응 유도를 위한 분석 모델

그림 14와 같이 각 분석조건을 모델(model)과 조건(condition)별로 나누었고 나눈 기준은 model은 사용되는 Immuno-receptor 별로 나누었음을 뜻하고 condition은 각 model 별로 경쟁자(competitor)의 유무와 종류에 따라 나누었다.

1번과 2번 모델(1-1, 1-1, 2-1, 2-2)는 EDC coupling 방법을 이용하여 bio-probe를 제조하는 방법이고 3번 모델(3-1, 3-2)는 streptavidin coated bead를 이용하여 biotinylation된 항체와 결합시켜 bioprobe를 제조하는 방법이다. 또한 2번 모델은 단백질 절단효소를 이용하여 완전한 구조의 항체를 항체절편(Fab)으로 절단하여 사용하였다.

위와 같이 총 6가지의 실험조건을 설정한 이유는 앞서서 설명하였듯이 궁극적으로 응집반응을 유도하기 위함이며 경쟁반응(1-1, 1-2, 2-2, 3-2)과 구조적 방해(Steric hinderance,

2-1, 3-1) 요소 제거를 통해 해결하고자 함에 있다.

다. Bioprobe 제작 조건 최적화, 표준화, 민감도 및 특이도 평가

(1) Bioprobe 제작 조건 최적화를 위한 항체 절편 제조

Bioprobe 제작 조건 최적화를 위해 Gentamicin(7G41)에 대하여 항체 절편(Fab)을 제작하였다. 절편 제작에 사용된 원리는 해당항체가 IgG2b isotype이기 때문에 단백질절단효소인 papain을 이용하여 절단하였으며 상용화 키트인 Pierce사의 Fab preparation kit(#44985)를 사용하였다. 제작 원리와 결과는 아래 그림 2와 같으며 수율은 36%로 계산되었다.

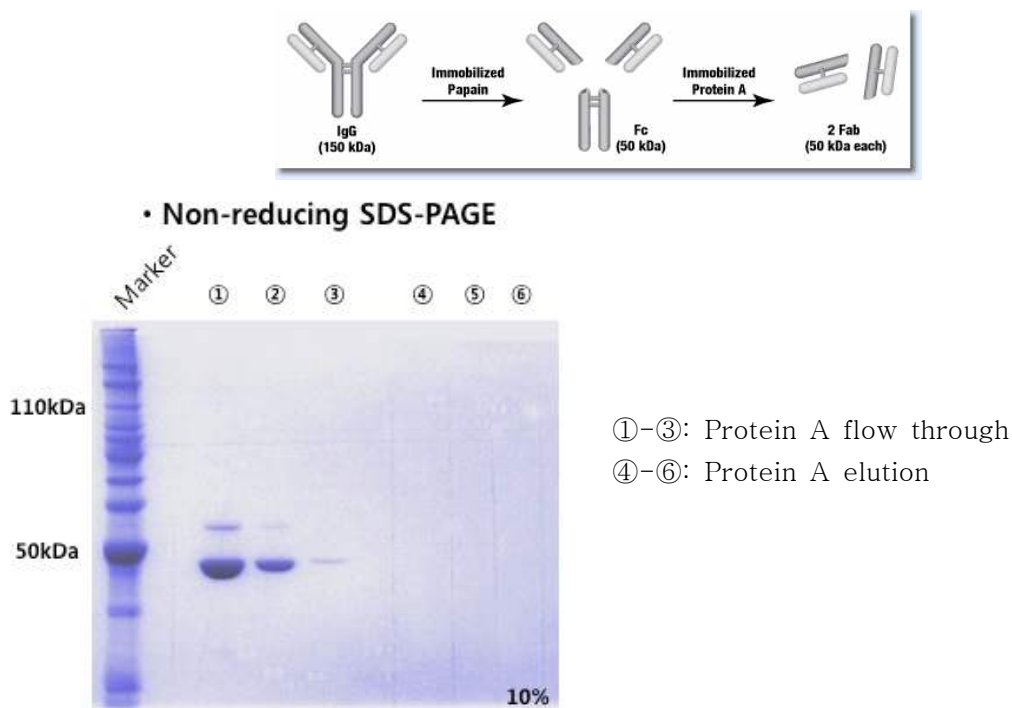


그림 15. 항체절편(Fab) 제작 원리(상단)와 Gentamicin(7G41)에 대한 항체절편(Fab) 제작 결과(하단)

(2) Bioprobe 제작 조건 최적화를 위한 항체의 random biotinylation

Bioprobe의 제작을 위해 역시 Gentamicin(7G41)에 대하여 random biotinylation을 실시하였다. 제조 원리와 과정은 다음과 같다. 항체에 amine 결합을 통하여 biotin을 무작위적으로 결합시킨 후 비반응된 biotin은 size exclusion chromatography 방법으로 항체와 biotin의 크기 차이에 기인하여 분리시켰고 이후 biotin과 결합하지 못한 순수한 항체들은 monomeric avidin column을 이용하여 항체와 항체-biotin을 각각 분리하였다(그림 16). 정제 후 fraction 들은 bradford와 fraction ELISA로 elution이후 과정에 나오는 peak들을 모아서 투석을 진행하였다.

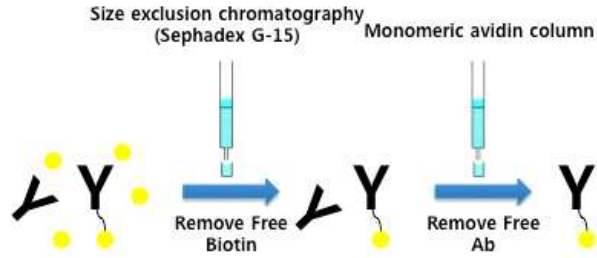
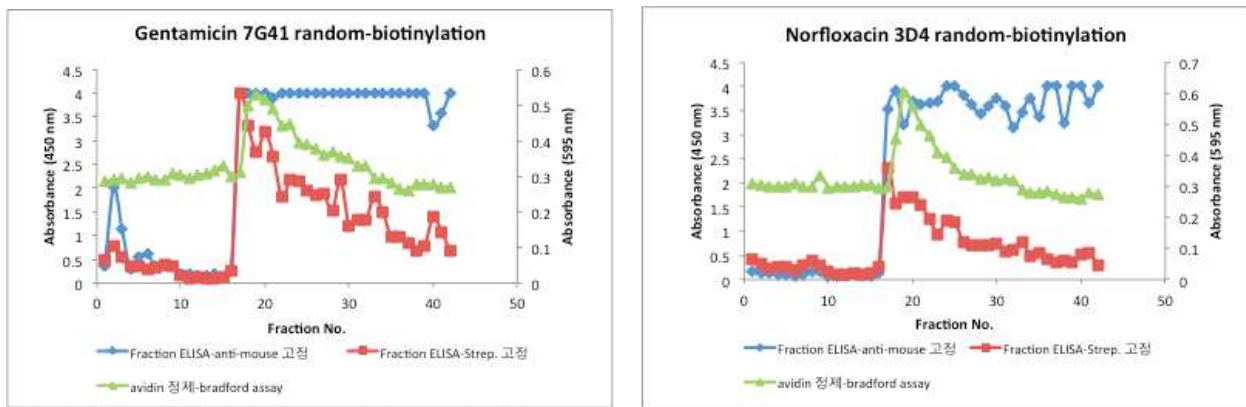


그림 16. Random biotinylated 항체 제작 원리

Biotinylation 과정의 각각에 사용된 재료들은 다음과 같다. Biotin은 NHS-LC-LC Biotin(Spacer arm length: 30.5A, Pierce, #21343) 사용하였고, size exclusion chromatography에 사용된 column은 Hitrap Desalting column, Sephadex G-25, GE healthcare, #17-1408-01)을 monomeric avidin column 은 Monomeric avdin kit(Pierce, #20227)를 사용하였다.

제조 결과 아래 그림 17과 같이 결과가 나타났고 각각 Peak가 겹치는 부분을 합하여 투석 후 정량을 실시한 결과 수율은 각각 43.8%, 43.4%로 나타났다.



수율: 43.8%, 제작양: 2.19 mg

수율: 43.4%, 제작양: 2.17 mg

그림 17. Random biotinylated Gentamicin(7G41), Norfloxacin(3D4) 제작 결과

(3) 이론적 분석 모델의 검증 및 최적 응집반응 모델 선정

이론적 분석 모델의 검증을 위한 시험재료 준비들이 앞서 준비완료 되었기 때문에 실제 각 조건별로 테스트를 진행하였다. 공통적으로 3번 모델을 제외하고 실험에 사용된 재료 및 조건은 다음과 같다.

실험재료

Carboxyl-modified microspheres 120 nm (10%, Bangslab), Activation buffer : 0.05 M MES buffer (pH 6), Water soluble carbodiimide (WSC) : EDC (Pierce, 77149), Anti-antibiotics Antibody 1 mg/ml, Quenching solution : hydroxylamine, Storage buffer : 0.05 M PBS (pH 7.4).

Bioprobe 제조과정(EDC coupling)

- ① 냉장 보관되어 있는 bead를 꺼내 약 1분간 vortexing하여 용액 내에 잘 분산되도록 한다.
- ② 2ml tube에 0.05 M MES buffer 0.995 ml + bead 0.005 ml (final 0.05 % in 1 ml)을 넣어 vortexing 한 후, 4 °C, 9,900 g (11,000 rpm)로 15분간 또는 13,000 rpm 30분 원심분리한다.
- ③ 원심분리 후, 상등액은 버리고 다시 0.05 M MES buffer 0.996 ml을 넣어 vortexing 한 후, 9,900 g (11,000 rpm)로 15분간 또는 13,000 rpm 30분 원심분리한다.
- ④ 원심분리가 끝난 후, 냉장 보관된 EDC (10 mg)를 꺼내 D.W 1 ml을 넣어 녹인다. (EDC 10 mg/ml) (사용하기 전에 바로 만드는 것이 좋다.)
- ⑤ 3번의 상등액을 버리고, 새로운 0.05 M MES buffer 0.996 ml + EDC 1 ml을 넣고, 상온에서 15분간 mixing한다.
- ⑥ Mixing 후, 9,900 g (11,000 rpm)로 15분간 또는 13,000 rpm 15분 원심분리한다.
- ⑦ 상등액을 버리고, 1X PBS 1 ml을 넣고 9,900 g (11,000 rpm)로 15분간 또는 13,000 rpm 15분 원심분리한다.
- ⑧ 항체는 1X PBS 0.962 ml + 항체 0.038 ml 로 희석해 놓는다.
- ⑨ 원심분리 후, 상등액은 버리고 새로운 1X PBS 1 ml을 넣고 희석해 놓은 항체 1 ml을 넣어 3시간 동안 상온에서 mixing 한다.
- ⑩ 9,900 g (11,000 rpm)로 15분간 또는 13,000 rpm 15분 원심분리하고, 상등액은 따로 모아 BCA assay에 사용한다.(conjugation이 제대로 되었는지 확인!)
- ⑪ Hydroxylamine(+ 1% BSA 0.025 ml) 1 ml을 넣고 상온에서 30분간 mixing한다.
- ⑫ 13,000 rpm 30분 원심분리하여 상등액은 버리고, 1X PBS 1 ml을 넣고 한번 더 13,000 rpm 30분 원심분리한다.
- ⑬ 원심분리가 끝나면, 1X PBS 1 ml을 넣고 vortexing 한후 냉장 보관한다(4 °C).

테스트방법

- ① 항생제는 1 ug/mL부터 2진으로 8단계까지 1X PBS로 희석하여 10 uL씩 준비한다.
- ② Bioprobe는 사용농도를 0.04%로 하여 1X PBS로 희석하여 10 uL씩 준비한다.
- ③ ①번과 ②번에서 준비한 시료를 PCR tube에서 혼합한 후 Multi-well glass에 10 uL 씩 drop 하여 측정 준비한다.
*경쟁반응의 조건인 경우 위 PCR tube에 Antibiotics-BSA를 10 uL 씩 추가로 넣는다.
- ④ 위 ③번에서 준비한 시료를 분석장치에 위치시키고 340 nm에서 측정을 실시한다.

(가). 1-1 조건: EDC coupling과 Whole Ab로 제조된 Bioprobe와 Competitor로 Antibiotics-BSA 사용

선정된 9종의 항체 중 Ampicillin(Carpricorn, 48351), Gentamicin(7G41), Norfloxacin(3D4)을 사용하여 1-1 조건을 수행하였고 실험재료, bioprobe 제조 및 테스트방법은 위에 기술된 바와 같다. 그 외 실험에 사용되는 Antibiotics-BSA conjugates 제조 방법은 2차년도 연차보고서에 자세히 서술되었다. 측정결과 competitor로써 사용된 ampicillin-BSA을 1ug/mL으로 사용하였을 때 ampicillin의 농도에 따라 그래프가 증가하는 형태를 나타내었다(그림 18). 하지만 수행된 1-1 조건은 경쟁반응으로써 항생제의 농도가 증가함에 따라 그래프가 감소하는 형태를 나타내어야 하는 것이 일반적인 이론이지만 competitor로써 사용된 antibiotics-BSA conjugates는 응집유도체로 작용을 한 것으로 보인다. 그리하여 위와 같은 가정의 재현성을 확인하기 위해 같은 조건에서 실험은 더 수행하였고 수행결과 재현성

을 나타내는 것으로 보아 ampicillin 응집반응의 경우 ampicillin-BSA는 응집유도체로서의 역할을 하는 것으로 확인할 수 있었다(그림 19). 검출민감도는 약 10 ng/mL로 측정되었다.

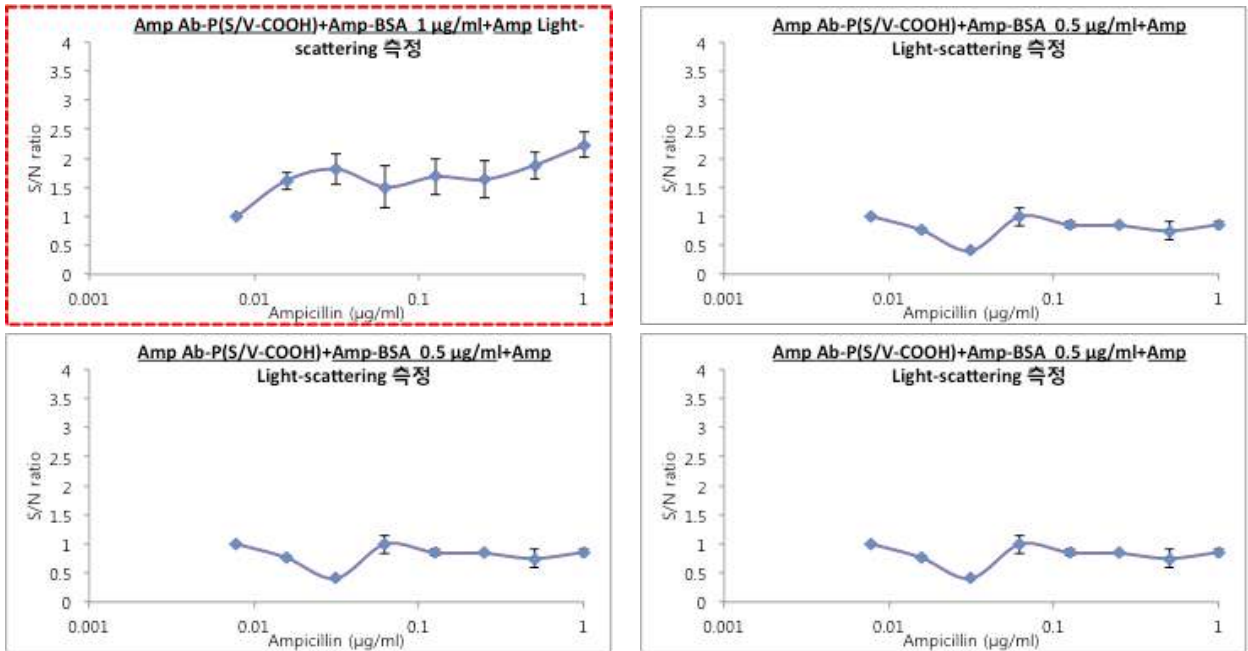


그림 18. 1-1 조건으로 수행한 ampicillin의 응집반응 테스트

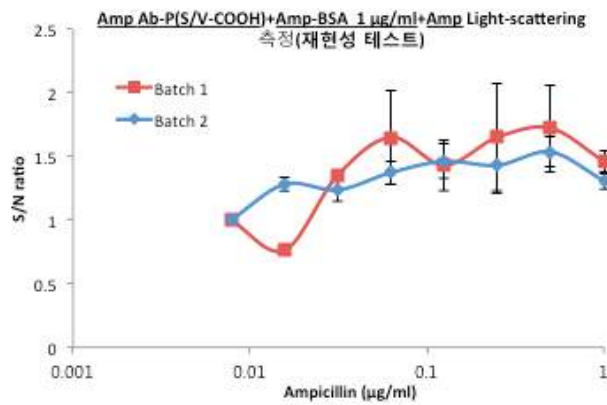


그림 19. 1-1 조건(Ampicillin-BSA: 1µg/mL)에서 ampicillin의 테스트 batch 별 응집반응 재현성 테스트

그 외 Gentamicin과 Norfloxacin은 1-1 조건에서 응집반응을 나타내지 않았다(그림 20-21). 이러한 결과는 같은 항생제거나 및 유사한 크기더라도 항생제의 그룹(기본 구조차이)에 따라 변화되는 epitope에 대한 항체의 3차원적인 반응양상이 근본적으로 다른 것이라고 해석할 수 있다.

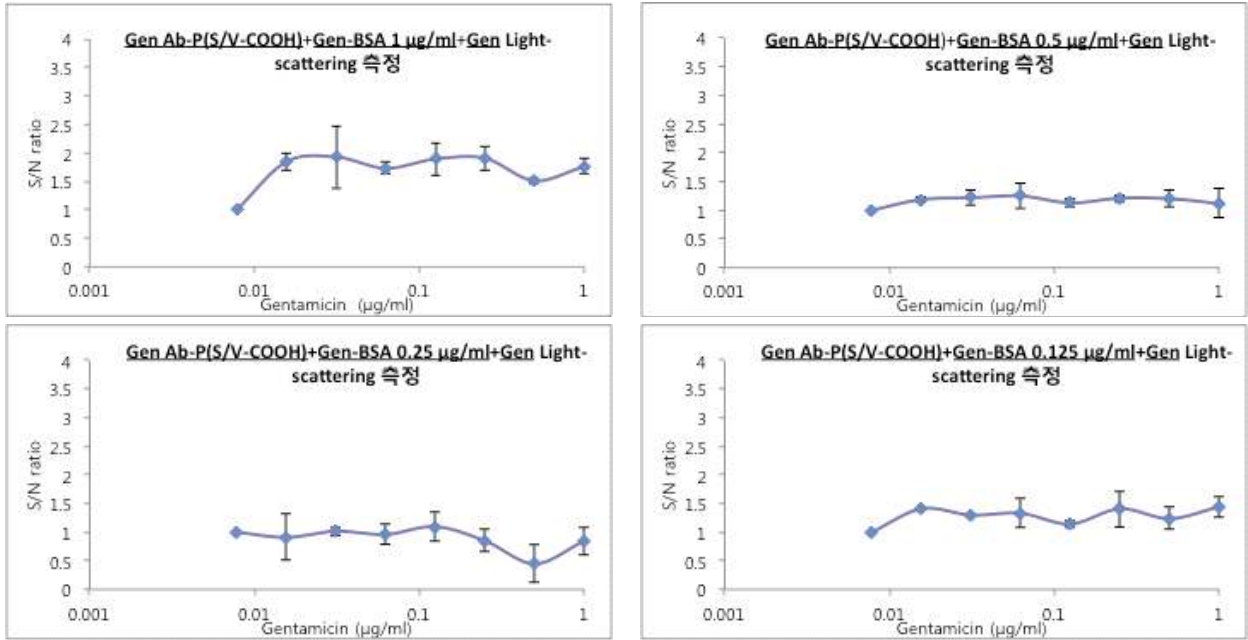


그림 20. 1-1 조건으로 수행한 gentamicin의 응집반응 테스트

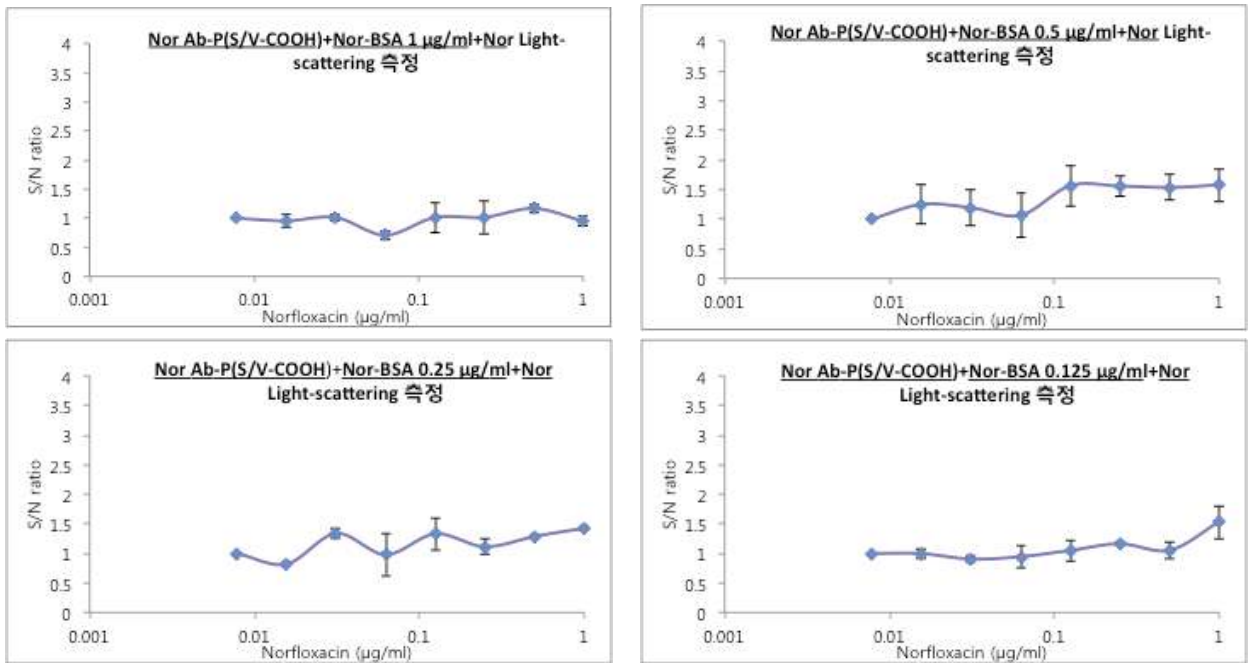


그림 21. 1-1 조건으로 수행한 norfloxacin의 응집반응 테스트

(나). 1-2 조건: EDC coupling과 Antibiotics로 제조된 Bioprobe와 Competitor로써의 Anti-antibiotics Antibody 사용

1-2 조건의 수행 목적은 응집반응 최적화에도 목적이 있지만 항원이 작거나 bioprobe가 클 때 구조적으로 cross-linking을 방해하여 응집반응을 저해한다는 것을 확인하고자 함이다(그림 22). 이를 확인하기 위하여 선정된 9종의 항체 중 Ampicillin(Carpricorn, 48351), Gentamicin(7G41),

Norfloxacin(3D4), Tetracycline(Abcam, ab30591)을 사용하여 1-2 조건을 수행하였고 실험재료, 테스트 방법은 위에 기술된 바와 같으나 bioprobe 제조시 항체 대신에 항원을 사용하였다. 측정결과 모든 항생제에서 응집반응이 유도되지 않음을 알 수 있었고 가정한 바와 같이 항생제의 응집반응은 항원의 크기 또는 bioprobe의 크기에 민감하게 반응을 함을 확인할 수 있었다(그림 23).

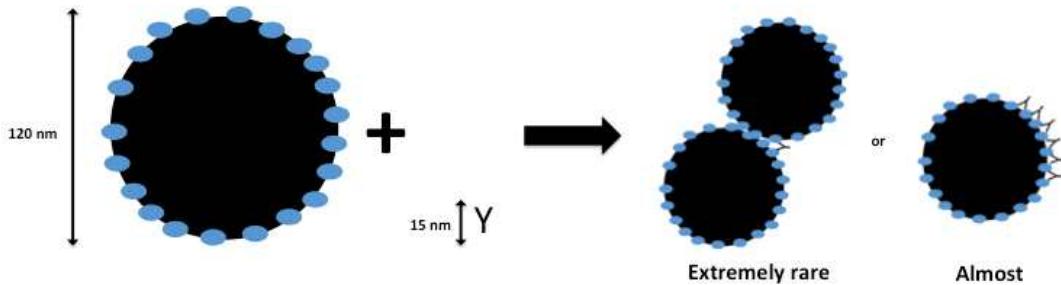


그림 22. 1-2 조건에서의 반응 양상 예측

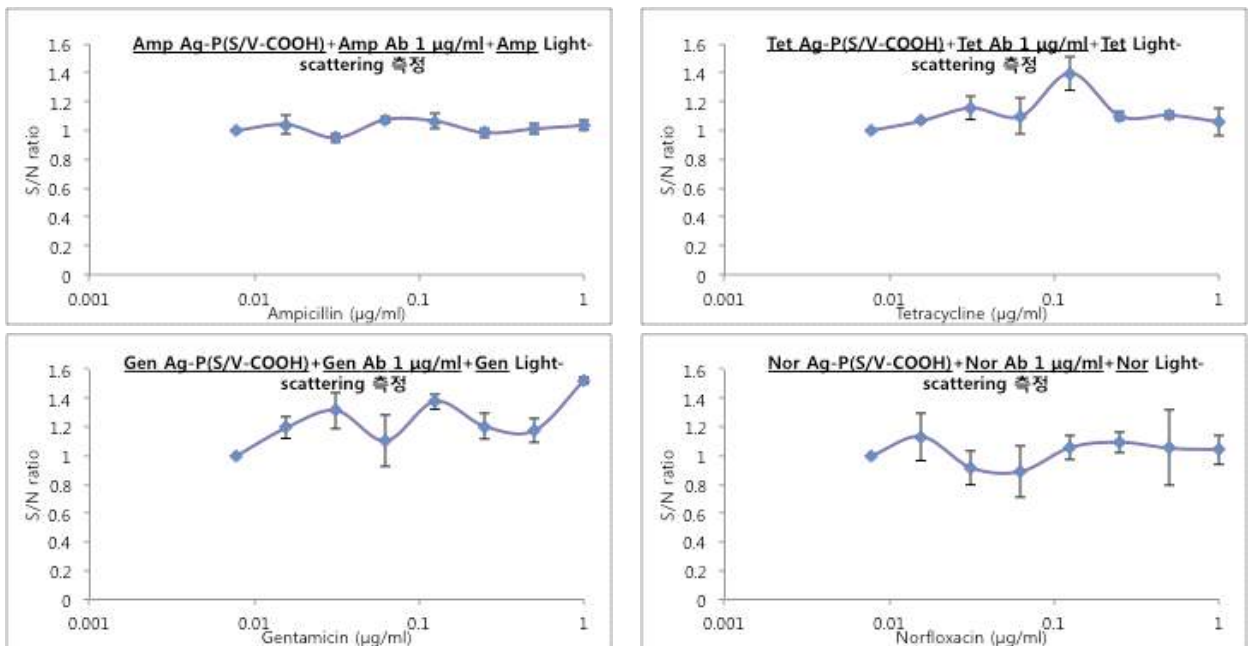


그림 23. 1-2 조건으로 수행한 4종 항생제의 응집반응 테스트

(다). 2-1 조건: EDC coupling과 Fab로 제조된 Bioprobe의 사용

선정된 9종의 항체 중 Gentamicin(7G41)에 대해 2-1 조건을 수행하였고 실험재료, 테스트방법은 위에 기술된 바와 같으나 bioprobe 제조시 완전한 항체 대신에 항체절편(Fab)을 사용하였다. Fab의 제조방법에 대해서는 앞서서 설명하였고 Fab를 사용하는 근본적인 이유는 위에서도 서술하였듯이 배향성을 부여하여 구조적인 방해요소를 제거하기 위함이다. 따라서 Fab를 사용하여 bioprobe를 제조하면 이러한 문제점을 해결할 수 있을 것이라는 가정 하에 조건을 설정하고 실험을 수행하였다(그림 24). 실험결과 예상대로 응집반응이 유도됨을 확인할 수 있었고 검출민감도는 약 20 ng/mL로 측정되었다. 수행하지 못한 나머지 8종에 대한 항체에 대해서는 남은 잔여 개발기간 동안 항체절편(Fab)를 제작하여 동일한 조건으로 테스트를 할 예정이다.

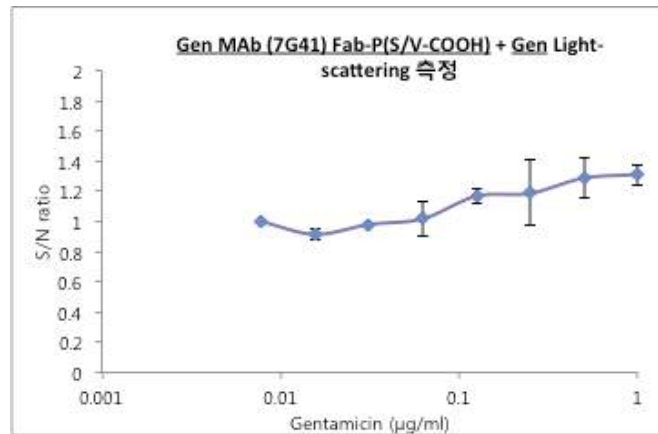


그림 24. 2-1 조건으로 수행한 gentamicin의 응집반응 테스트

(라). 2-2 조건: EDC coupling과 Fab로 제조된 Bioprobe와 Competitor로써의 Antibiotics-BSA 사용

2-1 조건에서 사용된 동일한 bioprobe를 이용하여 테스트를 진행하였고 이번에는 competitor로써 gentamicin-BSA를 1 µg/mL 사용하였다. 수행결과, 마찬가지로 농도별로 그래프가 증가하는 현상을 보였으며 이는 역시 competitor로써 사용된 gentamicin-BSA가 1-1조건의 ampicillin 테스트와 마찬가지로 응집유도체 역할을 하는 것으로 보인다. 또한 1-1 조건에서 마찬가지로 사용된 gentamicin-BSA가 1-1 조건에서는 응집유도체의 역할을 하지 못한 것으로 보아 bioprobe의 특성에 따라 응집반응이 유도되거나 유도되지 않음을 확인할 수 있다. 검출민감도는 약 200 ng/mL로 측정되었다(그림 25).

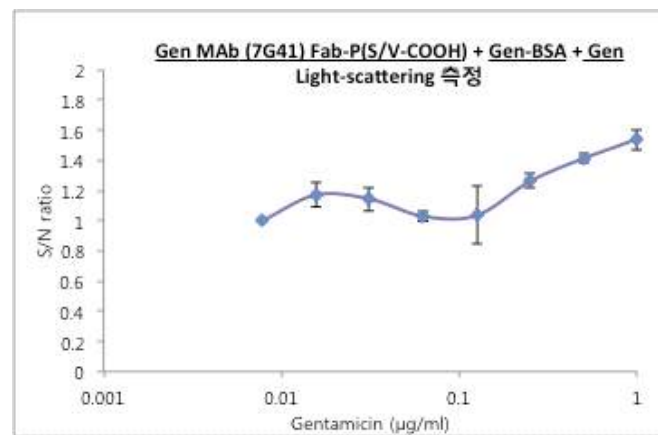


그림 25. 2-2 조건으로 수행한 gentamicin의 응집반응 테스트

(마). 3-1 조건: Biotinylated Ab-Streptavidin coated bead로써의 제조된 Bioprobe의 사용

3-1과 3-2 조건은 앞서 제조된 random biotinylated antibody를 이용하여 streptavidin coated bead와 결합된 bioprobe를 제조하는 방법으로써 2번 조건이 항체절편을 통해 배향성만을 부여하기 위함이었다면 3번 조건은 항체에 spacer arm을 부착함으로써 배향성을 부여하고 streptavidin-bioin 결합을 이용하여 결합효율을 증가시키고자 함에 목적이 있다. 공통적인 제조과정은 아래와 같으며 그 외 분석방법은 동일하다.

Bioprobe 제조과정(Streptavidin-Biotin coupling)

- ① 0.13 μm (Gentamicin), 0.51 μm (Norfloxacin) streptavidin coated bead, 0.1 M PBS (pH 7.4)를 준비한다.
- ② 0.1 M PBS 1 ml에 bead 0.05 ml (0.05 % solids, 0.5 mg/ml)을 넣고, 13,000 rpm에서 15분간 washing한다.
- ③ 0.1 M PBS 1 ml에 resuspension한다.
- ④ 3번 용액에 항체 1 ml을 넣는다.
 *Gentamicin: 0.13 μm bead: 항체 1 ml = 0.01 M PBS 0.945 ml + biotinylated Ab(1 mg/ml) 0.0550 ml)
 *Norfloxacin: 0.51 μm bead: 항체 1 ml = 0.01 M PBS 0.890 ml + biotinylated Ab(1 mg/ml) 0.110 ml)
- ⑤ 상온에서 30분간 mixing한다.
- ⑥ 0.01 M PBS로 3번 washing한다.
- ⑦ washing이 모두 끝나면, 0.01 M PBS 1 ml에 resuspension하고 냉장보관한다.

위 제조과정 중 gentamicin과 norfloxacin의 bioprobe 제조에 사용되는 bead의 size와 항체 양이 상이한 이유는 최적화 과정을 통해 응집반응이 가장 잘 유도되는 조건을 선정하였기 때문이다. 또한 두 항생제의 크기는 비슷하나 제조 방법이 상이한 이유는 항생제의 epitope 개수의 차이와 구조적인 문제로 여겨진다.

위와같이 bioprobe를 제작하여 gentamicin과 norfloxacin을 측정할 결과 모두 응집반응이 유도되지 않았음을 확인할 수 있었다(그림 26). 이러한 결과는 역시 항생제 크기에 따른 3차원적인 반응양상에 기반하는 것으로 볼 수 있다.

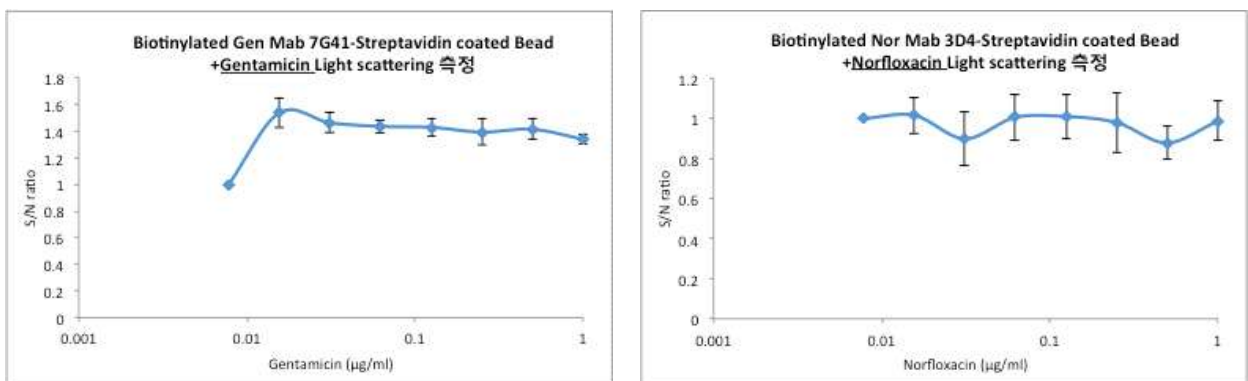


그림 26. 3-1 조건으로 수행한 gentamicin, norfloxacin의 응집반응 테스트

(바). 3-2 조건: Biotinylated Ab-Streptavidin coated bead로 제조된 Bioprobe와 Competitor로써의 Antibiotics-BSA 사용

3-1 조건에서 사용된 동일한 bioprobe를 이용하여 테스트를 진행하였고 competitor로써 gentamicin-BSA를 1 $\mu\text{g/ml}$ 사용하였다. 수행결과, 응집반응이 유도된 것으로 확인 되었으며 이전 결

과와 다르게 농도별로 그래프가 감소하는 현상을 보였고 이는 competitor로써의 역할을 할 것으로 사용된 antibiotics-BSA가 competitor로써의 역할을 수행하는 것으로 보인다(그림 27). 검출민감도는 gentamicin, norfloxacin 모두 약 20 ng/mL로 측정되었다.

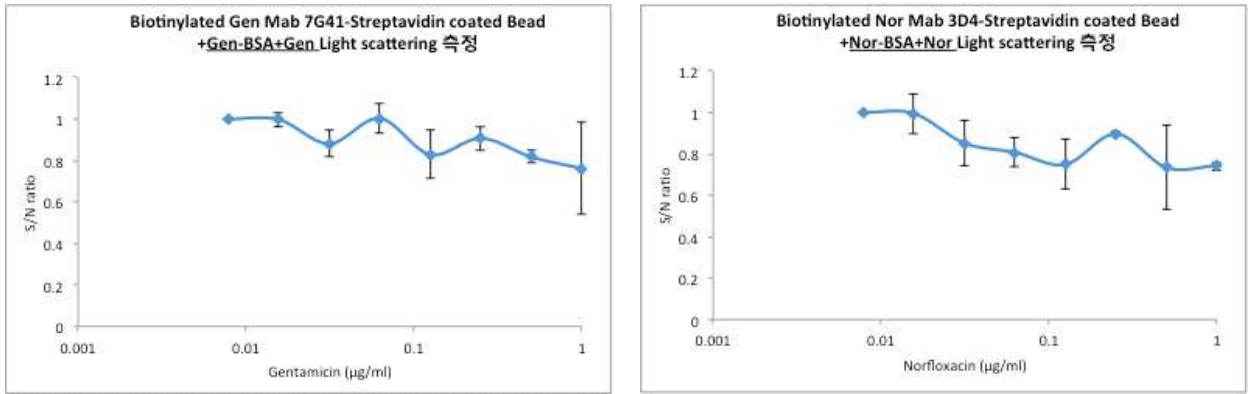


그림 27. 3-2 조건으로 수행한 gentamicin, norfloxacin의 응집반응 테스트

라. 항생제 별 bioprobe 제조 및 분석 조건 요약

최초 가정된 모든 조건에서 모델 항체 2종 및 일부 항체에 대해 테스트가 완료되어 결과를 아래 표 2와 같이 요약하였다. 정리하면 ampicillin은 1-1 조건에서 응집반응이 유도되었고 gentamicin은 2-1, 2-2, 3-2 조건에서 각각 응집반응이 유도되었다. 또한 tetracycline은 1-2 조건만 수행되었으나 응집반응이 유도되지 않았고 norfloxacin은 3-2 조건에서만 응집반응이 유도되었다. 모델 항체 2종 외 일부 조건(1-1)에서만 테스트가 진행된 항체(ampicillin, tetracycline)는 상업화 항체로 지속적인 수급문제로 테스트하는데 어려움이 있었고 모델 항체 중 nofloxacin에 대해 2번 조건을 수행하지 못한 이유는 해당 항체에 대한 항체절편(Fab) 공정이 확립되지 못하였기 때문이다. 검출 민감도는 조건에 따라 상이하나 10~200 ng/mL 범위에서 측정되었다. 남은 잔여 개발기간 내 일부 상업화 항체에 대해서는 수급 가능할 것으로 보여 남은 잔여 연구기간 내 동일한 조건으로 최적화를 수행할 예정이다.

표 14. 항생제 별 응집반응 유도 가능한 bioprobe 제조 조건 요약

Model	1		2		3	
	1	2	1	2	1	2
Ampicillin	O	X	△	△	△	△
	검출민감도: 10 ng/mL					
Gentamicin	X	X	O	O	X	O
			검출민감도: 20 ng/mL	검출민감도: 200 ng/mL		검출민감도: 20 ng/mL
Tetracycline	△	X	△	△	△	△
Norfloxacin	X	X	△	△	X	O
						검출민감도: 20 ng/mL

O: 응집반응 유도 가능 조건, X: 응집반응 유도 불가능 조건, △:조건 최적화 미시행

제 3 절 면역응집반응 산란광 및 형광 검출 광학센서개발

1. 산란광 측정 장치 제작

가. 산란광 측정 장치 제작을 위한 기본 구성

1차년도에서 설계된 산란광 측정장치를 바탕으로 2차년도에서는 장치 구성품들의 사양 결정과 검증을 통해 재설계 및 장치 제작을 완성하였고, 2차년도에서 제작된 산란광 측정장치를 바탕으로 3차년도에서는 데이터 검증을 통해 3차 시제품 설계 및 장치 제작을 완성하였다. 장치의 기본 구성에 대한 개념은 항체 고정화 나노입자와 검사 물질을 마이크로 유체 바이오 칩의 Inlet을 통하여 주입시켜 항원항체에 의한 응집 반응을 일으키게 한다. 이때 마이크로 유체 바이오 칩의 view point에 수직으로 아래에서 위로 UV LED 380nm 램프를 조사하면 마이크로 유체 바이오 칩의 view point 윗 부분에서 optical fiber로 Mie scattering되는 산란 빛을 감지하게 된다.

감지된 산란광은 380nm의 파장대에서 응집된 입자의 크기에 따른 photoelectron의 Intensity를 측정하게 된다. 측정 방식은 CCD array sensor로 측정하는 방식과 photodiode를 이용하여 측정하는 방식으로 각각 별도의 장치를 제작하였다.

산란광을 이용한 측정 장치의 기본 개념은 다음 그림과 같다.

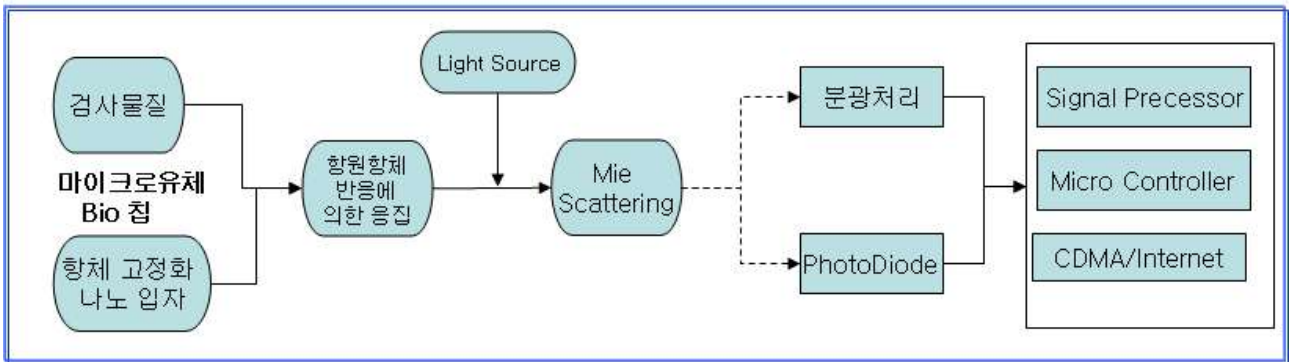


그림 1. 산란광 측정 장치 제작을 위한 기본 구성

나. 산란광 측정 장치 제작을 위한 3D 설계

(1) 1,2차 시제품 설계

산란광 측정장치의 구성은 다음 그림2와 같이 구성을 하였다. 본 3D 설계는 장치 제작시 각 구성 부품들의 원활한 배치와 공간 구성 및 외함 케이스 제작이 용이 하도록 설계를 한 것이다. 각 구성 부품들의 기능은 다음과 같다.

① LCD 디스플레이

- 진단장치의 각종 데이터 표시 및 메뉴를 표시한다.

- ② 분광기
 - 입력되는 빛을 분광하여 CCD 센서로 데이터를 전달한다.
- ③ 광원부
 - 칩로딩부에 조사되는 광을 공급하는 것
- ④ 밧데리
 - 전원공급없을 경우, 장치에 전원을 공급한다.
- ⑤ CDMA 통신
 - 측정된 데이터를 필요시 휴대폰 SMS 문자로 전송한다.
- ⑥ 칩로딩장치
 - 측정하고자 하는 샘플을 장착한다.
- ⑦ 제어보드 부분
 - 진단 장치의 전체 시스템을 제어한다.

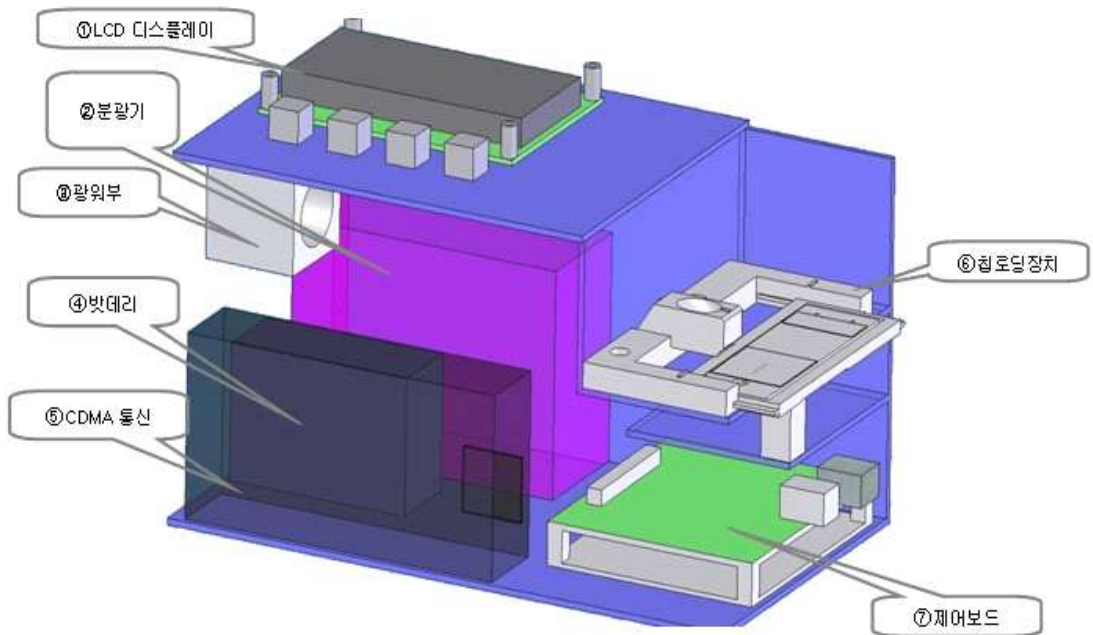


그림 2. 산란광 측정 장치 제작을 위한 3D 설계(2차 시제품)

(2) 3차 시제품 설계

1, 2차 시제품을 바탕으로 3차 시제품을 다음 그림3과 같이 구성을 하였다. 본 3D 설계는 장치 제작시 각 구성 부품들의 원활한 배치와 공간 구성 및 외함 케이스 제작이 용이 하도록 설계를 한 것이다. 각 구성 부품들의 기능은 다음과 같다.

측정 샘플에 자동측정을 위한 자동 로딩되는 장치의 개발과 spot위치의 미세 자동 보정을 위해 바이오센서칩의 X,Y축 이동을 위한 구동장치의 개발을 하였다

- ① X-Y 이동 장치

- 칩의 view point의 정확한 위치조정 및 다중배열시 이동을 위해 모터와 엔코더, 드라이브로 구성된 이동장치를 구성한다.
- ② 로딩장치
 - 측정 Glass를 자동으로 로딩 및 배출을 위해모터와 엔코더, 드라이브로 구성된 이동장치를 구성한다.

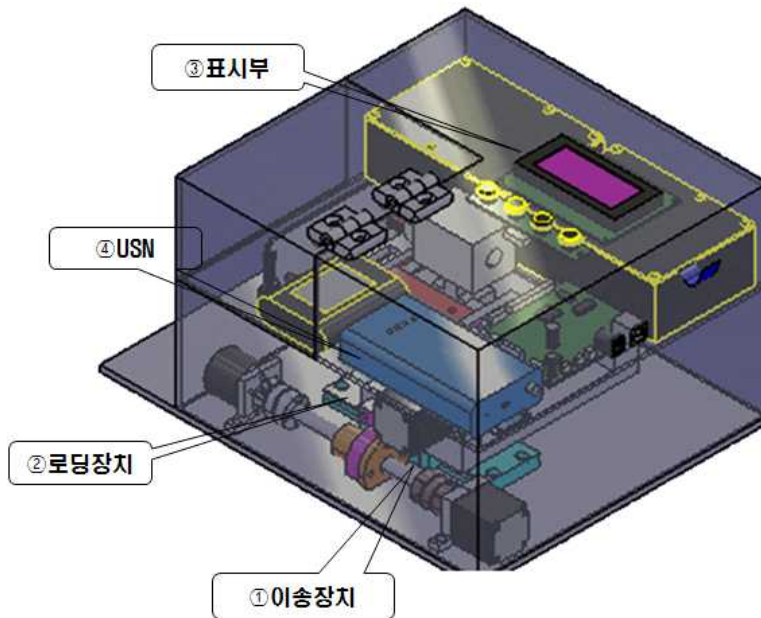


그림 3. 산란광 측정 장치 제작을 위한 3D 설계(3차 시제품)

로딩장치는 다음 그림 4와같이 구성을 하였다. Door(그림 ①)는 스프링 형태로 고정을하여 바이오 센서칩이 안착되었을 시 자동 삽입되는 슬라이딩(그림 ②) 장치를 개발하였고, Door는 좌우에 스프링(그림 ③)으로 고정이 되어 슬라이딩 장치가 전진하면 open 되고, 후진하면 close가 되도록 개발하였다

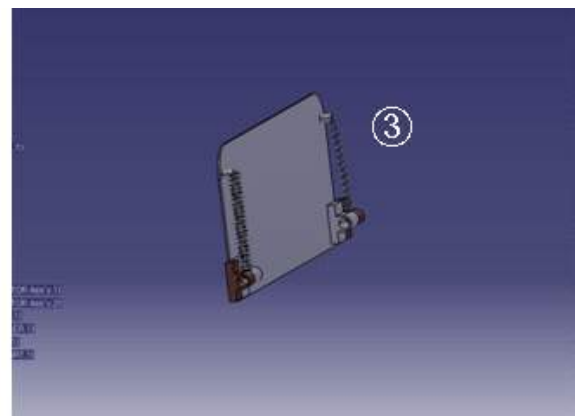
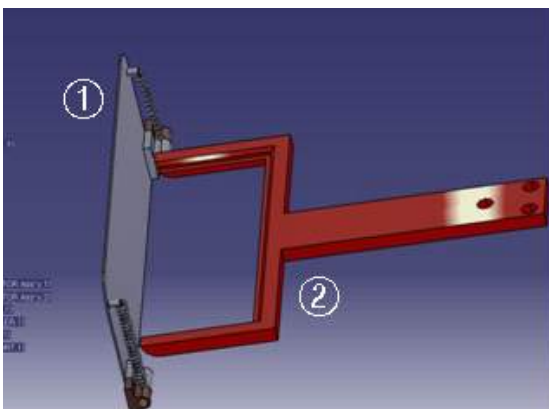


그림 4 바이오센서칩 로딩장치 모식도

그리고 다음 그림 5와 같이 바이오센서칩 로딩장치(그림 ①)를 x축 구동장치(그림 ②)와 y축 구동장치(그림 ③)를 이용해 미세 조정 및 셋팅된 측정 Point 로 이동이 가능하도록 개발하였다. 최대 좌우로의 가변 이동 위치는 -15mm ~ +15mm 내에서 구동이 가능하도록 개발하였고, x축 구동장치(그림 ②)와 y축 구동장치(그림 ③)의 1회 정밀 이동은 0.01mm이 가능하도록 개발 하였다.

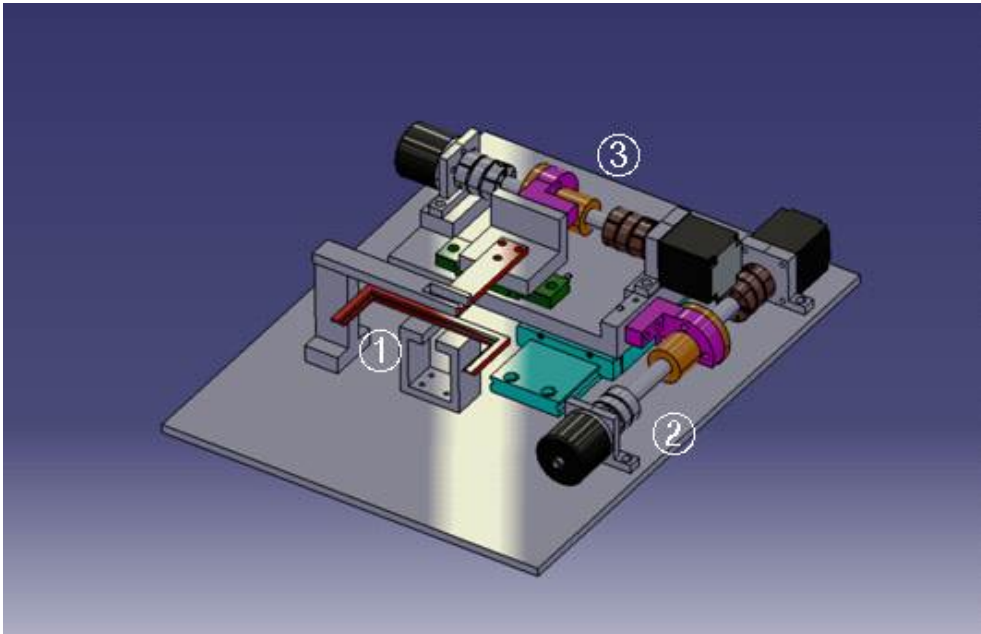


그림 5 바이오센서칩의 미세조정장치 모식도

(3) 신호처리부의 설계

본 개발 장치의 핵심인 신호처리부는 크게 Optical fiber로 들어오는 산란광을 입력받아 CCD Array 센서를 거쳐 분광 처리하는 모듈과 포토다이오드를 이용하여 photo-electron의 intensity를 처리하는 모듈로 설계를 하였다. 두 가지의 측정 방식을 가지고 항원항체의 면역응집 반응시 Mie Scattering되는 산란광을 측정하도록 제작하였다. 두 가지의 측정 방식을 이용하여 메인모듈은 동일하게 측정 결과에 대한 데이터 전송을 위한 CDMA 모듈, LCD 디스플레이 모듈, 컴퓨터와의 통신을 위한 USB 모듈, AC 전원 없이 배터리 사용만으로 동작이 가능한 전원 모듈, 램프 모듈, 측정 데이터 저장이 가능한 내부 저장 메모리 등으로 구성된 신호처리부를 아래 그림과 같이 설계 및 제작을 하였다.

본 장치의 기본 설계 개념은 모듈별로 구성을 하여 CCD 센서와 포토센서를 교체하여 사용할 수 있고, 기본 LED 램프 및 할로겐 램프를 교체하여 사용할 수 있도록 하였다. 또한, DC전원을 이용하여 장치에 전원공급 및 배터리를 충전할 수 있도록 설계를 하였다.

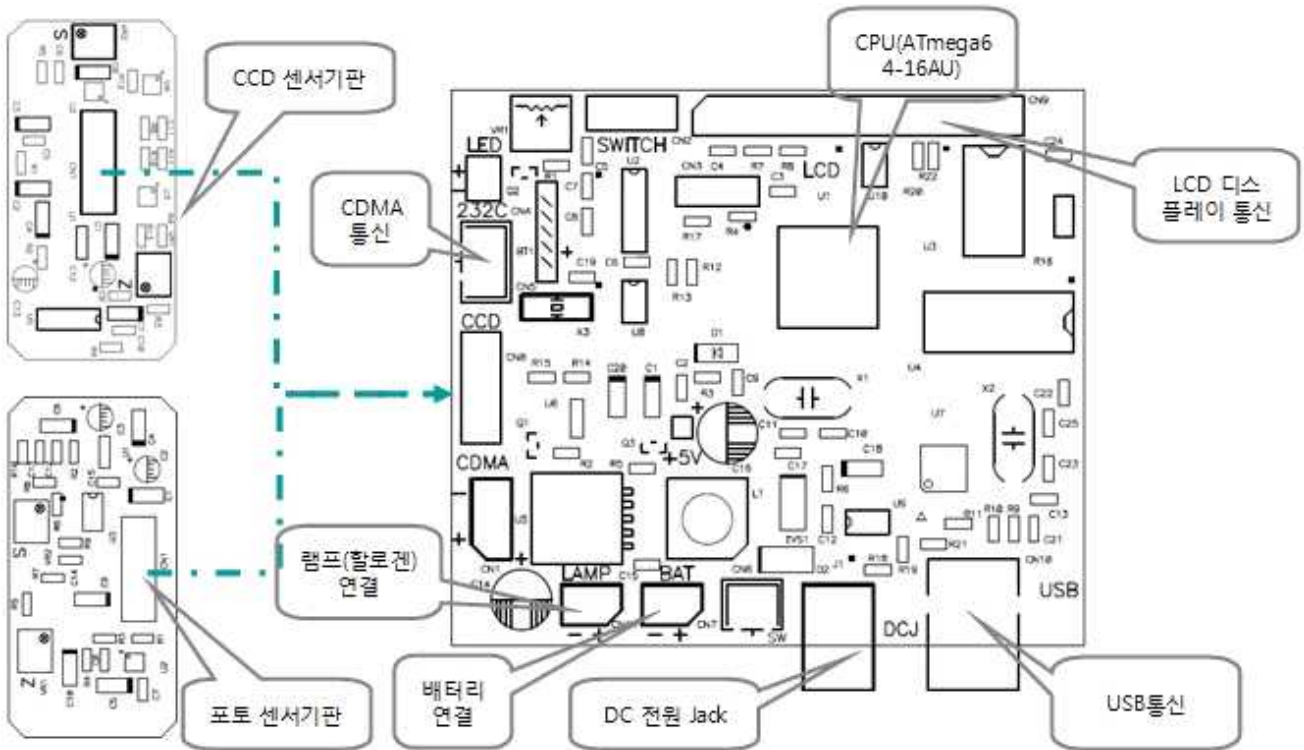


그림 6. 신호처리부의 구성 및 설계

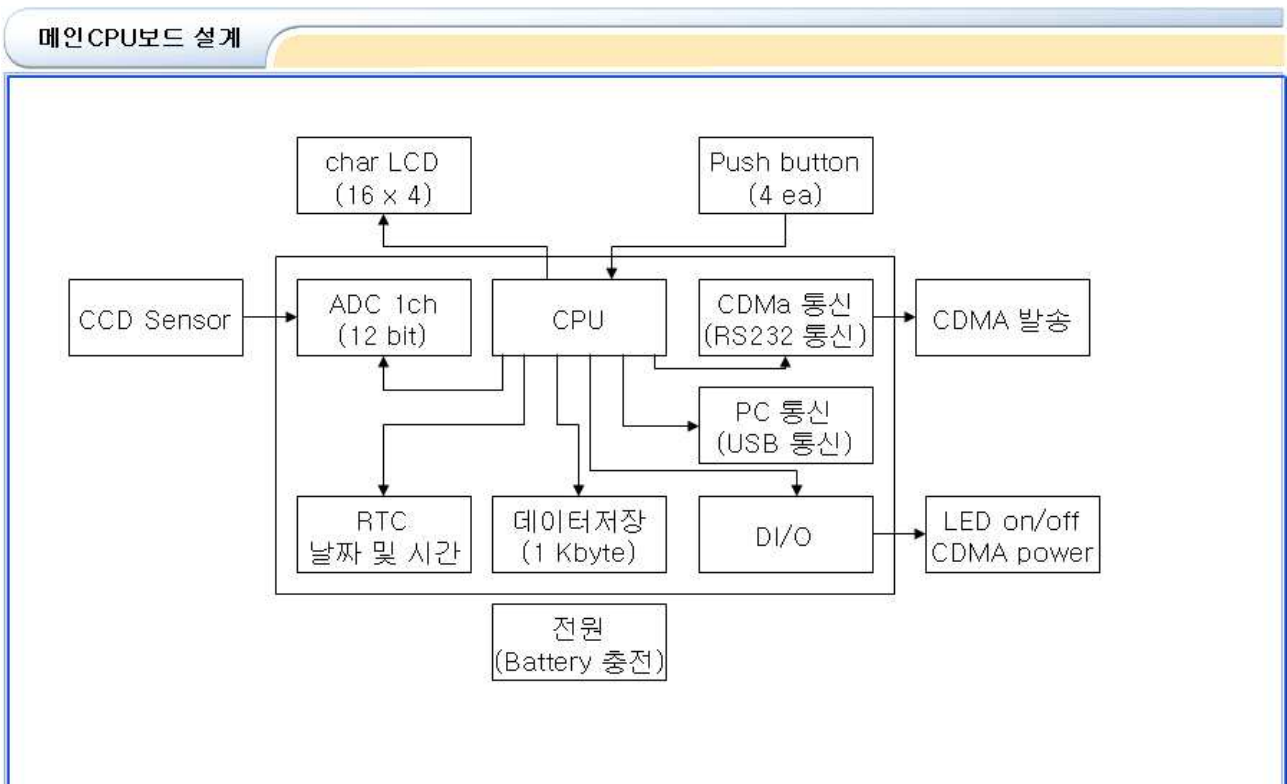


그림 7. 신호처리부의 기능별 구성 및 설계

(4) LCD 디스플레이 모듈 제작과 외함 케이스

본 장치는 one-chip의 embedded 컴퓨터이기 때문에 컴퓨터와의 연결 없이 자체 OS로 동작할 수 있도록 구성하였다. 장치 외관에 부착되어 데이터를 표시하여 주는 그림 8의 LCD는 4줄까지 최대 64자(영문기준)를 표시할 수 있도록 구성하였다. 표시 내용은 다음과 같다.

- 측정 항생제의 종류
- 현재 항생제 측정 값
- 시간/날짜
- 자체 데이터 저장 여부
- 배터리 잔량 여부



그림 8. LCD 디스플레이 모듈

또한, 측정할 항생제의 종류를 선택하거나 측정 시간, 허용치의 상하 레벨 설정등을 하기 위하여 LCD window 아래 부분에 각 버튼을 설치하였다. 각 버튼의 기능은 다음과 같다.

- Up/Down 키 버튼
- Set Up 설정 키
- 확인 키

외함 케이스의 옆면부는 전원 ON/OFF 버튼과 전원 단자, USB 통신 단자가 부착되어 있다.

다음 그림9는 외함 케이스의 LCD window 화면 구성과 각 기능들의 버튼, 케이스 옆면의 기능을 표시한 그림이다.

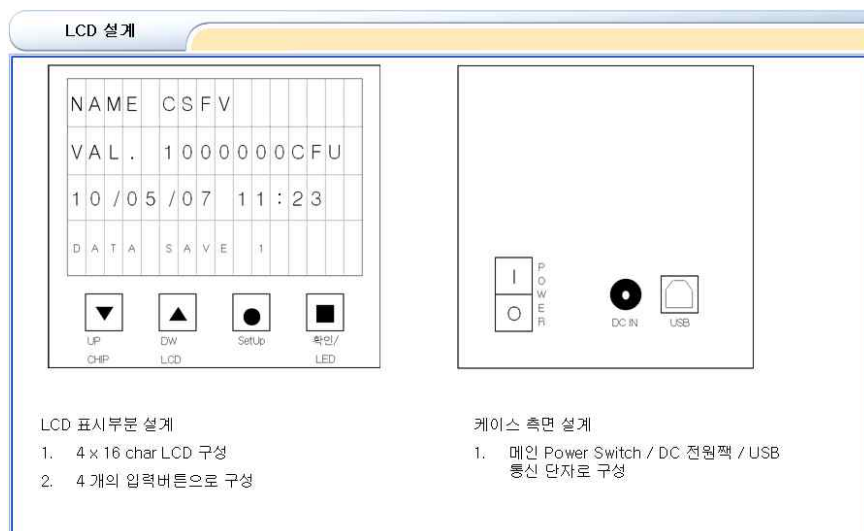


그림 9. 케이스 부착 LCD의 설계

그림 10과 11은 LCD window와 버튼 사용 방법에 대한 설계를 표시하였고, 각 사용 메뉴들의 구성과 기능을 표시하였다. 또한, 각 메뉴 기능을 이용하여 데이터 저장 방법, 측정 방법, 통신 설정등을 할 수 있도록 설계된 내용이다.

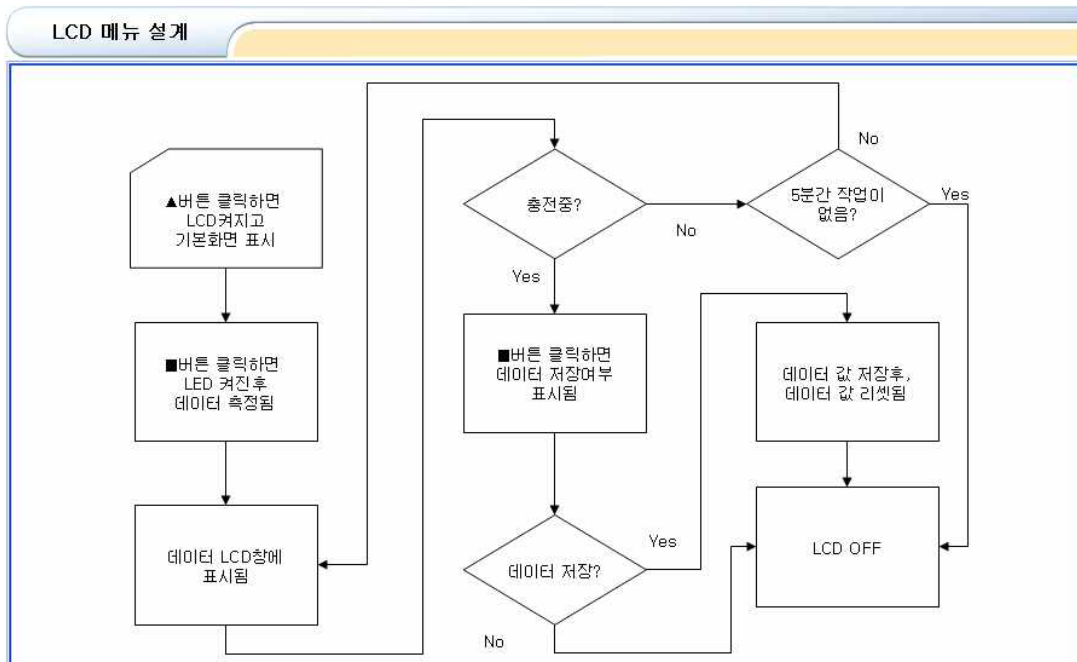


그림 10. LCD 메뉴의 설계

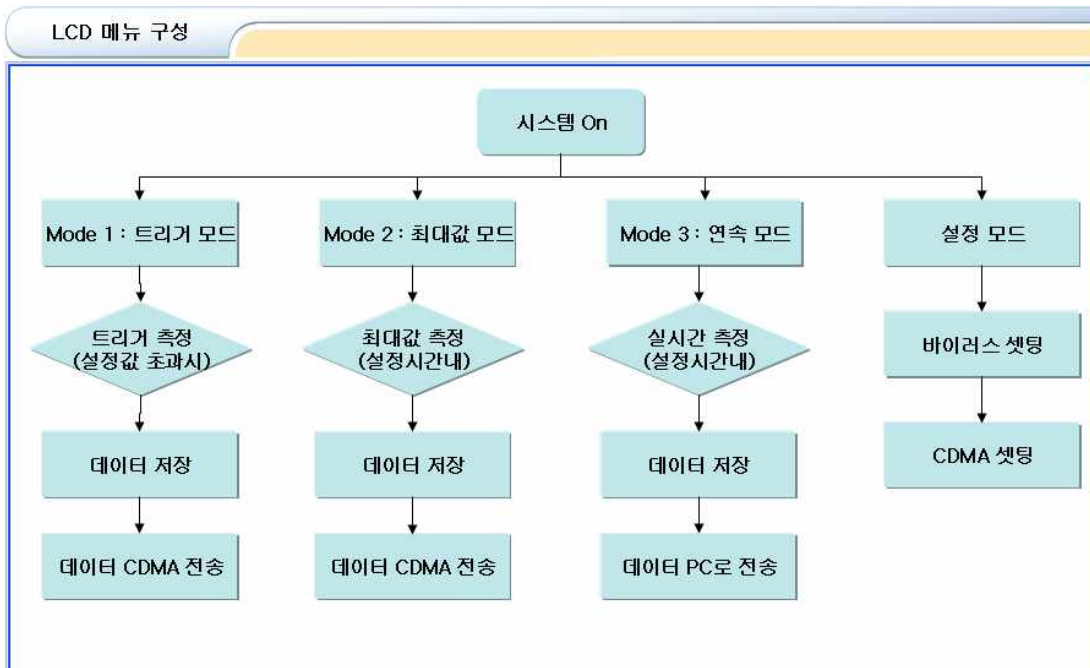


그림 11. LCD 메뉴 구성

(5) 컴퓨터 모니터링 프로그램의 설계와 제작

개발장치에서 측정된 데이터는 컴퓨터와 USB 통신으로 데이터를 전송하게 된다. 컴퓨터에서 볼 수 있는 모니터링 프로그램의 기본 사양과 기능은 다음과 같다.

- Operating System : MS Window 계열
- 개발환경 : MS의 VC++
- 저장 환경 : Binary data
- 데이터 변환 : 자동 Excel 변환 및 screnn capture image 변환
- 데이터 분석 : Zoom In/Out, ROI(Region of Interest) 설정
- 시각화 변환 : 표시 그래프 선들의 색상/표시 두께/눈금표시/폰트 크기 임의의 변환
- 데이터 View : 측정 장치로 부터의 원시데이터 View/Moving average/Frame average를 조정하여 데이터를 볼 수 있음
- Set-up 기능 : Spectrum table /항생제별 환산값/측정시간

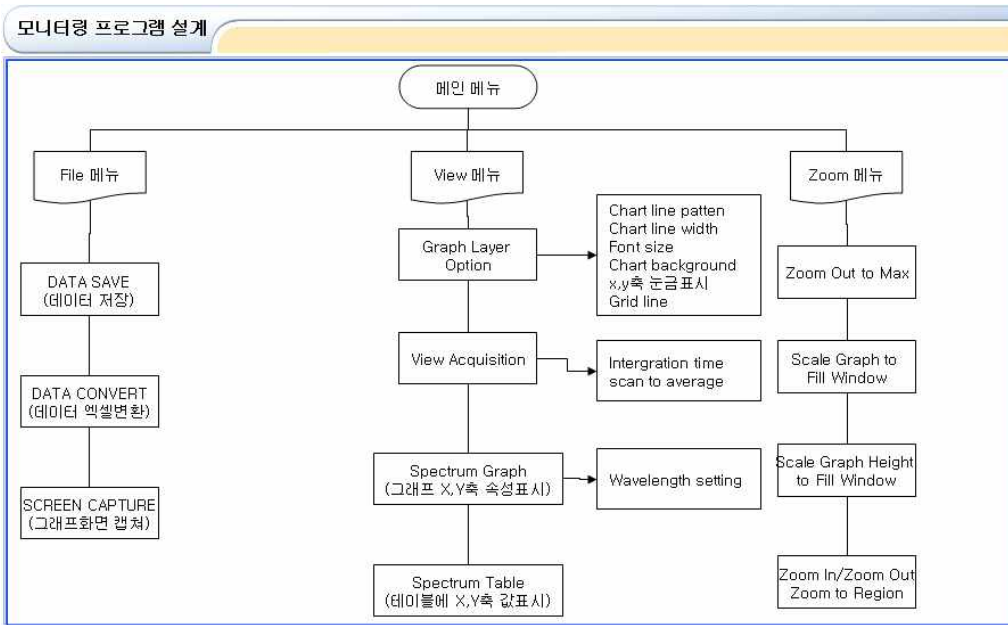


그림 12. 모니터링 프로그램설계

프로그램 화면 설계(2차)

화면개요	USB를 통해 전달되는 데이터를 그래픽으로 디스플레이한다	기능설명
	<p>전송된 데이터를 그래프에 표시한다</p> <p>Y축은 Intensity, X축은 Pixel 과 Wavelength, Time 으로 표시한다.</p> <p>그래프를 2개로 나누어 하단의 그래프에는 특정파장범위를 표시한다.</p>	

그림 13. 모니터링 화면

(6) 개발 장치의 사양

개발된 장치는 다음 그림14와 같은 사양으로 제작하였다. 본 장치는 8bit one-chip cpu를 사용하여 8Mbps의 데이터 처리 속도와 컴퓨터와 연결시 9.6Mbps의 데이터 전송 속도를 가질 수 있도록 제작하였다. 또한, CDMA 모듈은 153Kbps 속도와 16X4의 LCD 모듈을 내장하도록 제작되었다.

진단장치 규격		Model 명
Micro-processor embedded device	CPU	ATmega64-16AU 8bit
	Power	AC 110~220V, DC 11.1V , 2200 mAh Battery (2 hour)
	Processing speed	CCD<->CPU board - 규격 : I2C, 8.0Mbps, 3648*12 bit, 30회/sec
	Communication speed	CPU board <-> Computer - 규격 : USB2.0, 9.6Mbps, 3648*12 bit, 8.5회/sec
	CDMA 모듈	EMII-800K CDMA 1x 800MHz, 153 Kbps
	LCD 모듈	WH1604E Gharacter 16 x 4
	Resoution	ADC 12bit
Photodiode chamber	Photo TR	KIC3T03AL
	Optic fiber	600um core size, UV fier 50cm long, 1/4" ferrule in_out
	Filter	550nm CWL, 10nm Bandwidth, 12.5mm Mounted Diameter

그림 14. 개발 장치의 사양

분광처리 부분의 주요 사양은 optical fiber로부터 분광처리부로 들어오는 Entrance Slit이 25um로 구성하였고, CCD array sensor와 Grating, Mirror등으로 구성하였다. 분광처리부의 자세한 사양과 내부 설계도는 그림 15, 16와 같다.

진단장치 규격		Model 명
Spectroscope	Grating	12x12x6 mm size 600gr/mm blazde @500nm
	Toroidal Mirror	15x15x3mm(350nm-700nm)
	CCD linear image sensor	Pixel Number : 3648 Pixel Size : 8um x 200um Photo Sensing Region :: High Sensitive & Low Dark Current pn Photodiode
	Optical path	Crossed czerny-turner
	Resolution	1.5nm FWHM(546nm)
	Capacity	광량성능(photon/nm) 130/400 , 60/600 Corrected Linearity 95%
	Wavelength	
Light Power	Slit Size	25 um
	PDA용	Halogen 12V Capsule 20W G4 12V CL
	산란광용	380 nm UV LED 25mA @ 12V

그림 15. 분광 처리부의 사양

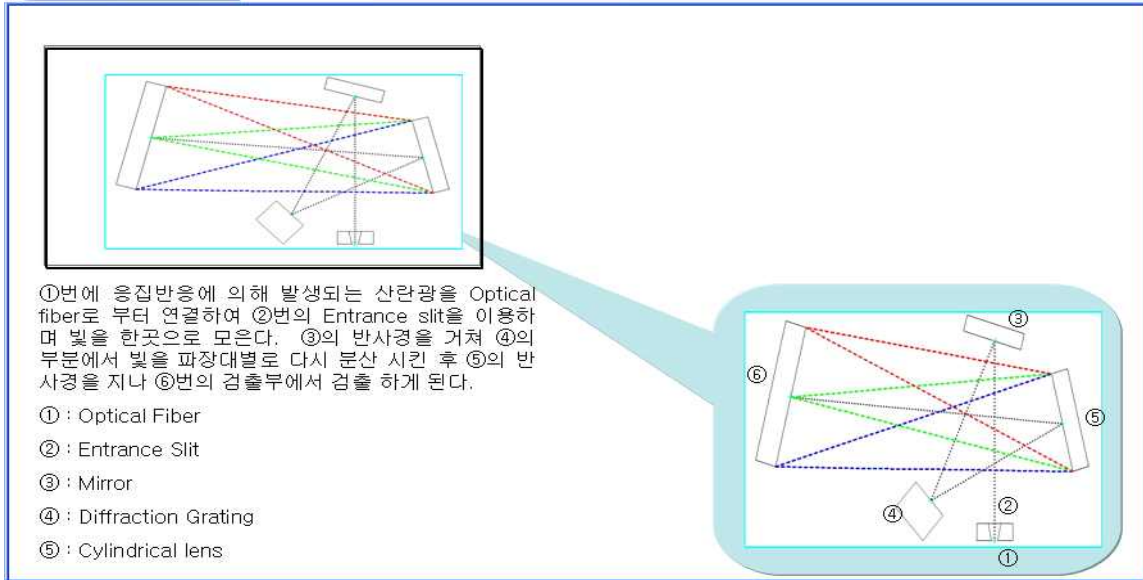


그림 16. 분광기의 내부 설계

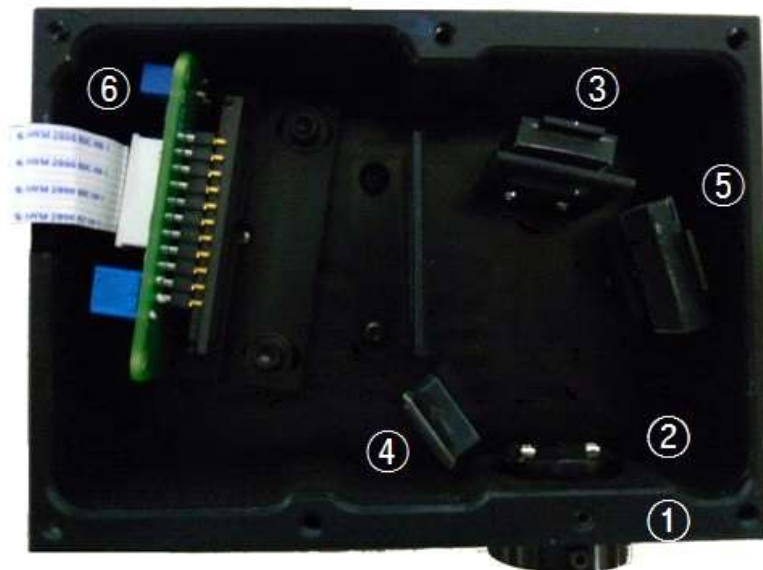


그림 17. 분광기의 내부구성

(7) 제작된 장치와 검증 데이터

그림 18은 제작된 개발 장치의 외관이다. 제작장치는 3D 모델링을 기본으로 하여 각 모듈과 마이크로 유체 바이오 칩을 장착하게 되었다. 3D 모델링은 제작시 try and error를 줄이기 위하여 여러번의 시뮬레이션을 통하여 위치, 크기, 기능을 고려하여 하였다. 특히 나노 수준의 데이터를 측정하는 초정밀 측정 기기이기 때문에 Optical fiber의 위치와 마이크로 유체 바이오 칩의 위치 조정에 많은 어려움이 있었다. 외부의 진동이나 빛의 영향등 외부의 요인에 의해서도 측정 데이터의 신뢰성을 결정지을 수 있기 때문에 여러번의 설계 변경과 제작을 시도하였다.

그림 18은 2차년도에 제작 완성된 장치의 외관 사진이다.

그림 19는 장치 위에서 의 모습이다. 실제 Optical fiber가 마이크로 유체 바이오 칩의 view-point에 위치하고 있으며, 바이오 칩의 아래 부분에서는 빛을 조사하고 있는 사진이다.

또한, 외부 빛의 영향을 없애기 위하여 마이크로 유체 바이오 칩을 덮개를 이용하여 빛의 차단을 없애도록 하였고, LCD window가 활성화되어 있는 사진을 보여주고 있는 것이다.

그림17는 제작 장치의 옆면을 보여주는 사진이다. 제작장치는 DC 12V를 사용하고 있으며, 장치 내부에 AA 충전용 전지가 내장되어 있어 약 3시간 정도 자체 밧데리를 이용하여 연속 측정이 가능하도록 제작되었다.

그림 21은 3차년도에 제작 완성된 장치의 외관 사진이다.

그림 22에서처럼 측정하고자하는 바이오 칩을 자동 로딩하고, 필요시 X-Y축으로 미세조정 및 이동이 가능하도록 제작되었다.

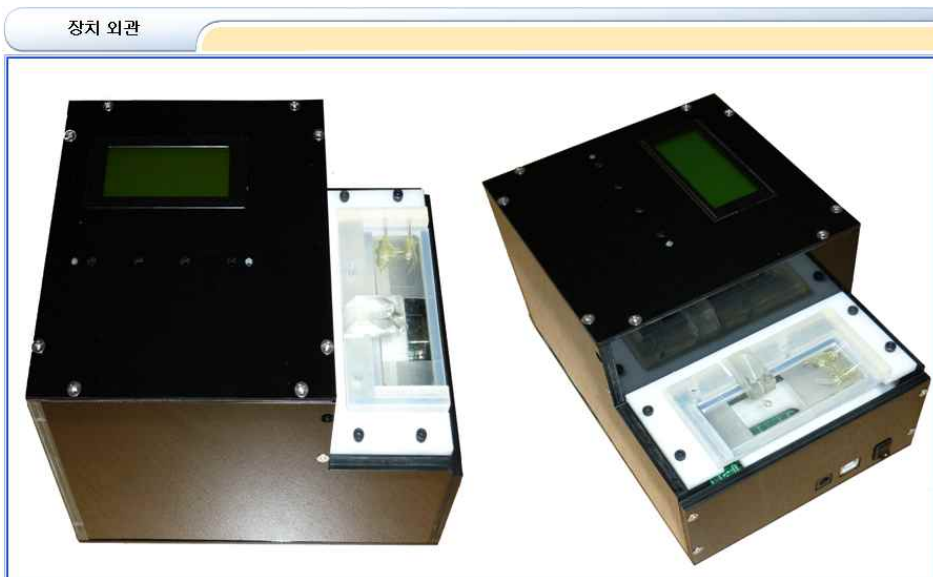


그림 18. 제작된 장치(2차시제품)



그림 19. 제작된 장치의 윗면(2차시제품)



그림 20. 제작된 장치의 옆면(2차시제품)



그림 21. 제작된 장치(3차시제품)

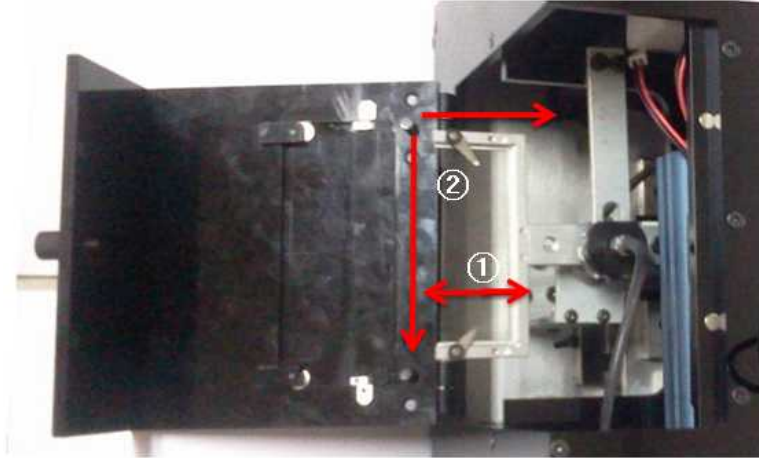


그림 22. 자동 로딩 및 이동 스테이지 장치(3차시제품)

그림 22는 자동 로딩장치 및 이동 스테이지를 표시한다. ① Auto-sliding 기능이 장착되어 있어 항상 정확한 위치에 센서를 고정할 수 있고, ②의 이동 스테이지는 검출부의 다수의 측정위치를 정확하게 이동할 수 있는 장치이다.

(8) Han5000과 USB4000 장비의 성능 비교테스트

(가) 2차 시제품의 테스트 내용(2차년도)

제작된 장치의 검증을 위하여 Ocen Optics사의 USB4000과 비교하여 검증을 하였다.

검증 방법은 표준 파장 모듈을 이용하여 컴퓨터 화면에 디스플레이 되는 파장 영역과 intensity를 비교하여 검증하였다. 또한, 투명한 glass를 1장부터 10장까지 쌓아서 투과되는 빛의 감도를 측정하도록 하였다. 제작 장치는 측정 파장의 영역 폭이 300nm이기 때문에 범용화로 사용되고 있는 USB4000 보다 정밀한 분광 데이터를 확인할 수 있었다.

그림 23~25에 검증된 데이터에 대한 실험 결과를 표시하였다.

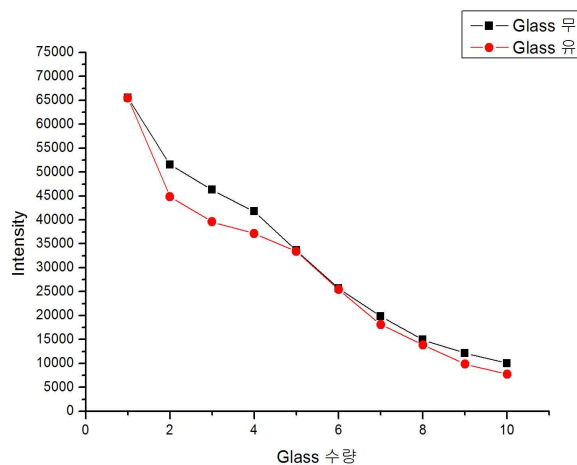


그림 23. 제작장치의 검증 평가 데이터

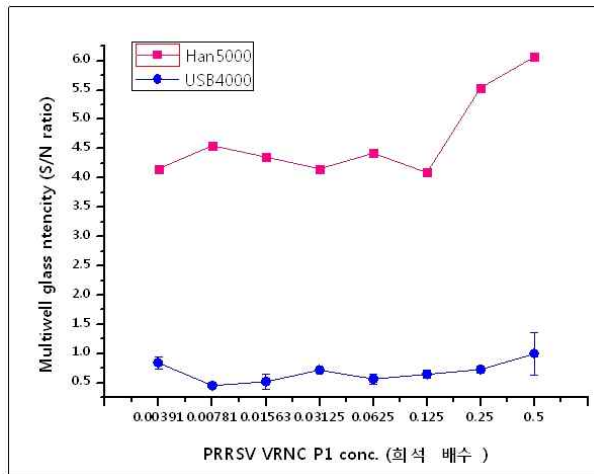


그림 24 제작장치의 검증 평가 데이터

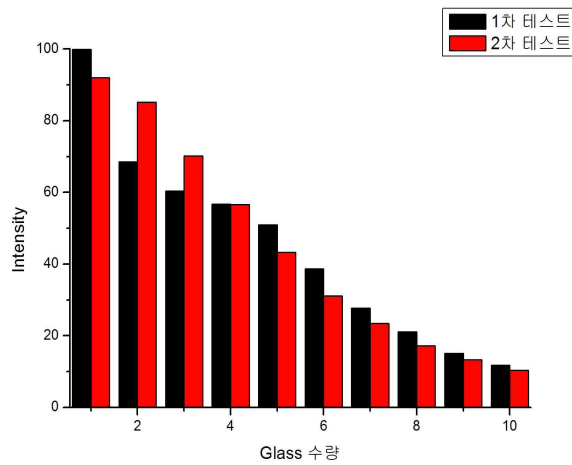


그림 25. 제작장치의 검증 평가 데이터

(나) 3차 시제품의 테스트 내용(3차년도)

① Han5000 vs Oceanoptics 성능 테스트

㉠ 장비조건

1) Integration : 150

2) Average : 100

3) 측정 흡광도 파장

가) Han5000 : 378.5nm

- 나) Oceanoptics : 377.03nm
 4) 광원 : 380nm LED

㉠ 실험조건

- 1) 공통으로 120nm Carboxylated 사용
- 2) 항체 : FMDV, PRRSC Mab
- 3) 항원 : Recombinant protein

㉡ 측정방법

- 1) 항체(FMDV, PRRSV Mab)와 항원(recombinant protein)을 사용하여 응집반응을 유도한 후 multi-well glass slide에 원액과 원액을 1/2씩 희석하여 총 8개의 농도를 광원과 분광기를 45°로 하여 측정

㉢ 측정결과

- 1) Multiwell glass slide에 원액의 1/2씩 희석하여 측정한 결과 농도별 차이는 나타나나 그 차이가 Han5000이 USB4000에 비해 농도별 S/N ratio가 더 크게 나옴(표 1, 그림27)
- 2) Baseline intensity를 기준으로 각 농도의 intensity를 S/N ratio로 계산하여 그래프작성

가) PRRSV 4A.5-P(S/V-COOH, 120nm) 테스트

표 1. PRRSV 4A.5-P(S/V-COOH, 120nm)의 intensity S/N ratio

PRRSV VRNC P1 conc.(희석배수)	Multiwell glass slide intensity		S/N ratio	
	Han5000	USB4000	Han5000	USB4000
baseline	304	380.1	1	1
0.5	1844	378.23	6.065789	0.99508
0.25	1684	276.185	5.539474	0.726611
0.125	1244	245.29	4.092105	0.64533
0.0625	1344	215.33	4.421053	0.566509
0.03125	1264	272.44	4.157895	0.716759
0.015625	1324	197.54	4.355263	0.519705
0.0078125	1384	172.265	4.552632	0.45321
0.00390625	1264	319.25	4.157895	0.839911

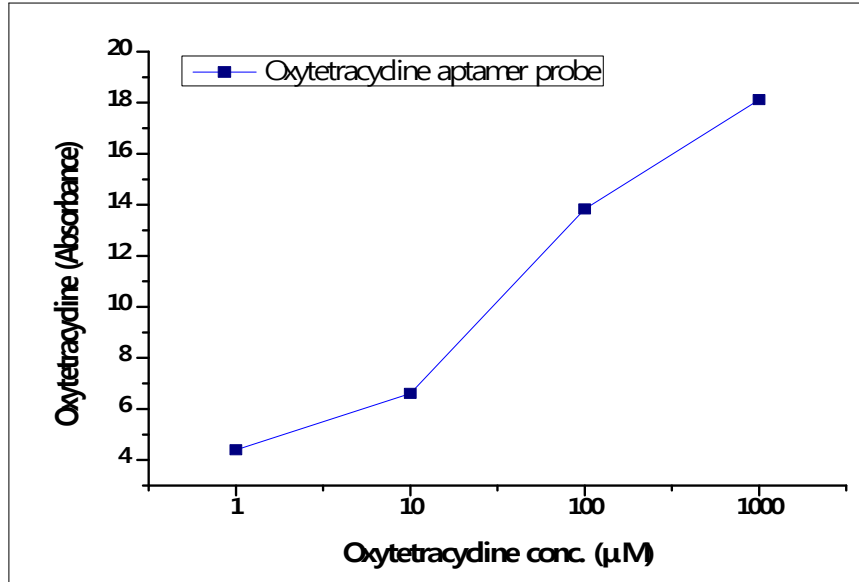


그림 27. Han5000과 USB4000의 측정결과 S/N ratio 비교

표 2 FMDV 75.9F-P(S/V-COOH, 120nm)의 intensity S/N ratio

FMDV VP1 conc.(희석배수)	Multiwell glass slide intensity		S/N ratio	
	Han5000	USB4000	Han5000	USB4000
baseline	300	210.65	1	1
0.5	5850	349.21	19.5	1.65555
0.25	3660	283.675	12.2	1.411108
0.125	2080	221.885	6.933333	1.083333
0.0625	2220	158.22	7.4	0.74999
0.03125	1800	158.22	6	0.740733
0.015625	2010	195.67	6.7	0.942588
0.0078125	1650	183.495	5.5	0.933312
0.00390625	2310	210.65	7.7	1

나) FMDV 75.9F-P(S/V-COOH, 120nm) 테스트

② Han5000 Mouse IgG antibody 테스트

㉠ Mouse IgG antibody 테스트

1) 장비조건

가) Integration : 50

나) Average : 10

다) 광원 : 450nm Laser

2) 실험조건

가) PDA chip

- ① PCDA:DMPA:PCDA-epoxy=7:2:1/10mM PBS buffer liposome
- ② Silane 처리한 slideglass에 liposome incubation time : 3hr

나) 항체 : Mouse IgG antibody 10mg/mL

다) 항원 : Mouse IgG antigen(원액 0.5mg/mL, 원액을 1/10씩 희석하여 총 10⁻⁵까지 희석하여 반응에 사용)

라) Aptamer, antigen incubation time : 1hr

마) Polymerization time : UV254nm에서 20sec

바) Antibody, antigen은 2mm PDMS mold를 사용하여 반응시킴

3) 측정방법

리포솜을 붙인 아민글라스에 mouse IgG antibody(10mg/mL)를 고정시킨 후 antigen 농도별로 반응시킨 후 Han 5000에서 PDA chip의 liposome blue(control)을 ref.base로 한 후 PDA chip에서 반응한 CSFV spot을 PDA mode로 하여 기기 측정

4) 측정결과

가) Antigen의 농도가 저농도일때는 변화의 폭이 적으나 0.5mg/mL ~ 0.000005mg/mL 까지 측정이 됨

나) 측정결과는 한 PDA chip에 같은 농도 3개의 spot을 측정했으며 총 한 농도에 16개의 spot을 평균내어 결과도출함

다) 형광intensity는 형광현미경 4X배율로 1/2.0sec로 형광 측정한 후 imageJ 프로그램으로 intencity 측정

라) 형광현미경 측정결과(그림 28), Han5000 측정결과(그림 29), 형광현미경 측정결과와 Han5000측정결과와의 비교(그림 30)

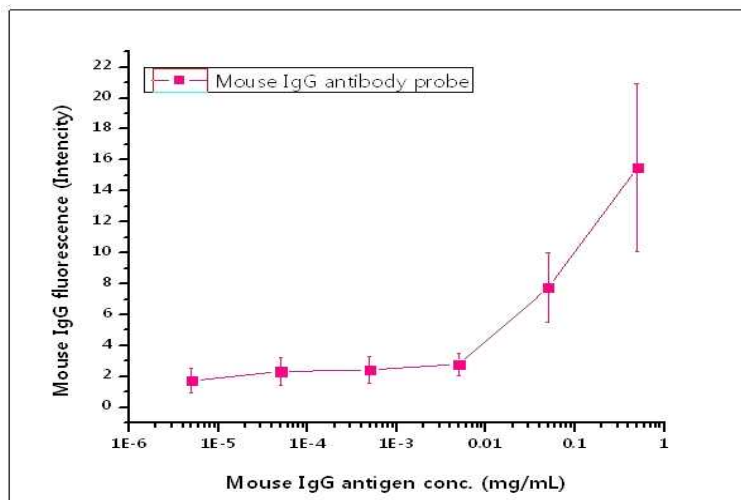


그림 28 Mouse IgG antibody의 fluorescence probe

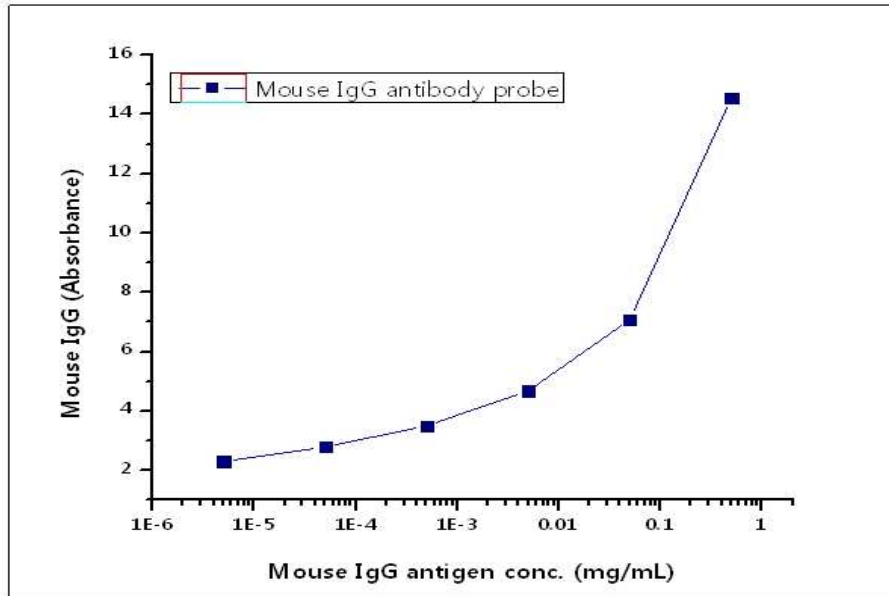


그림 29 Mouse IgG antibody의 Han5000 측정결과

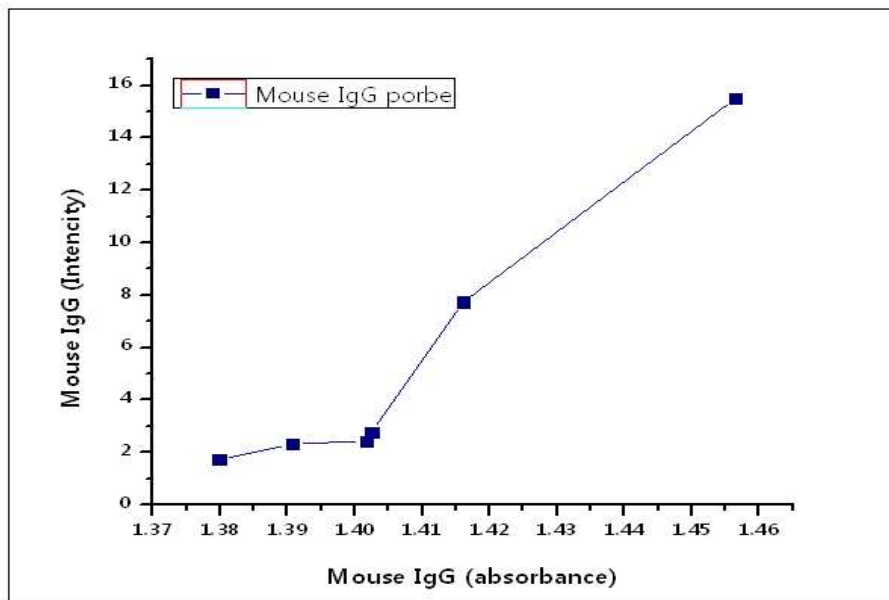


그림 30 Mouse IgG antibody의 Absorbance, fluorescence 비교

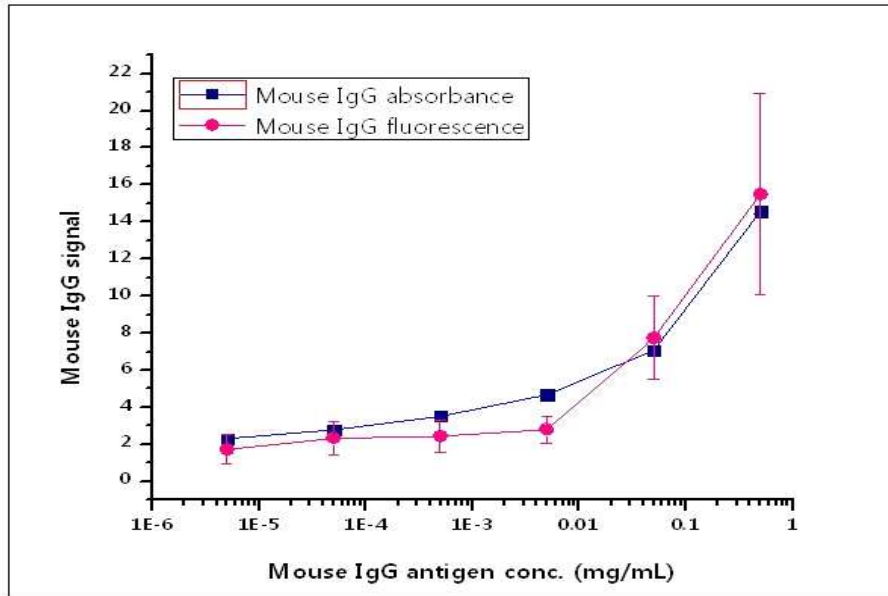


그림31 Mouse IgG antibody의 mouse IgG antigen 농도에 따른 Han5000측정 absorbance와 형광현미경으로 측정한 fluorescence 비교

㉔ Oxytetracycline 테스트

1) 장비조건

- 가) Integration : 50
- 나) Average : 10
- 다) 광원 : 450nm Laser

2) 실험조건

가) PDA chip

- ① DMPA:PCDA-epoxy=4:1/ 1X PBS buffer liposome
- ② Silane 처리한 slide glass에 PCDA-epoxy liposome을 manual

microarrayer를 이용하여 spotting한후 4시간 incubating

나) 항생제 : Oxytetracycline aptamer

3) 측정방법

리포솜을 붙인 아민글라스에 oxytetracycline aptamer를 농도별로 준비한 샘플용액을 뿌린뒤 1시간후 fluorescence를 측정한 후 Han5000에서 PDA chip의 control을 ref.base로 한 후 PDA chip에서 반응한 spot을 PDAmode로 하여 측정

4) 측정결과

가) Oxytetracycline aptamer를 농도별로 준비한 샘플용액을 뿌린뒤 1시간 후 형광현미경으로 fluorescence intensity를 측정한 것 보다 Han5000에서 absorbance측정한 값이 농도에 따라 측정값이 직선을 그림

나) 측정결과는 한 PDA chip에 같은 농도 3개의 spot을 측정했으며 총 한

농도에 3개의 spot을 평균내어 결과도출함

다) 형광intensity는 형광현미경 4X배율로 1/2.0sec로 형광 측정 한 후 imageJ 프로그램으로 intencity 측정

라) 형광현미경 측정결과(그림 32), Han5000 측정결과(그림 33), MPPC module 측정결과(그림 34), 형광현미경 측정결과와 Han5000측정결과와의 비교(그림 35), 현광현미경의 측정결과와 MPPC module 측정결과와의 비교(그림 36)

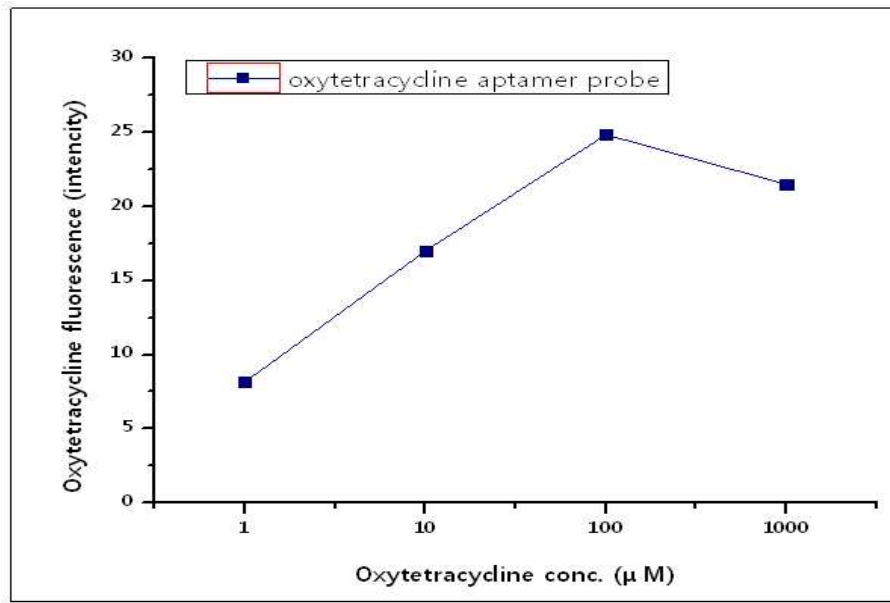


그림 32 Oxytetracycline aptamer의 농도에 따른 형광현미경 fluorescence 측정결과

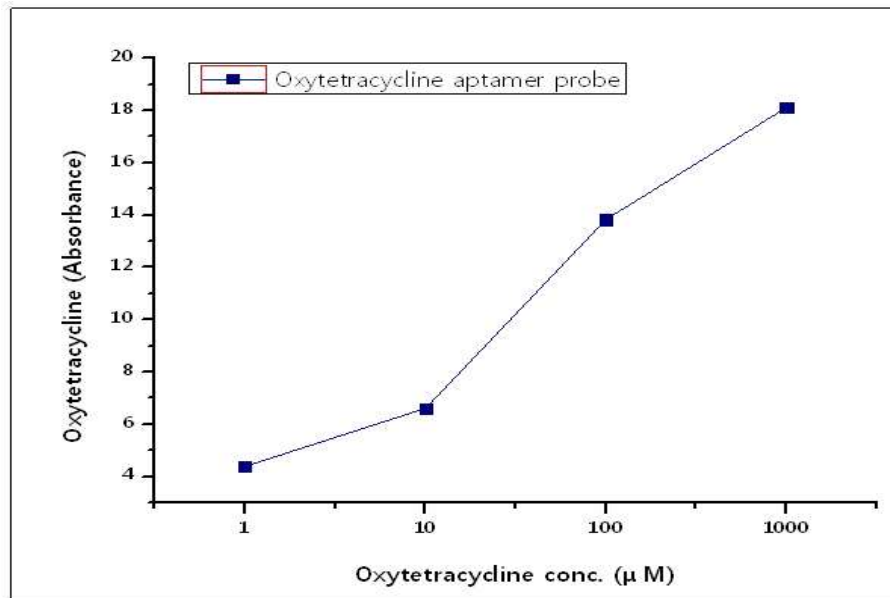


그림 33 Oxytetracycline aptamer의 농도에 따른 Han5000의 absorbance 측정결과

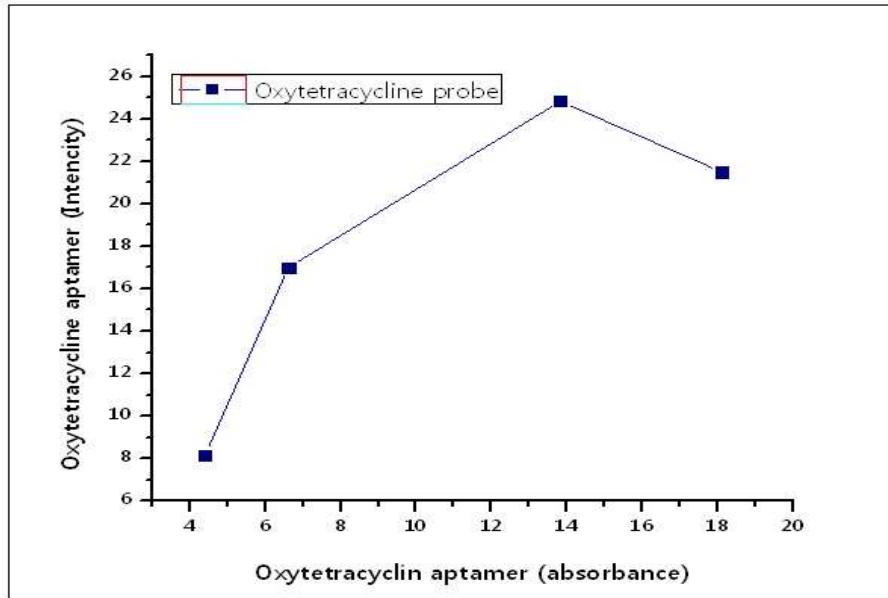


그림 34 Oxytetracycline aptamer의 농도에 따른 Absorbance, fluorescence 비교

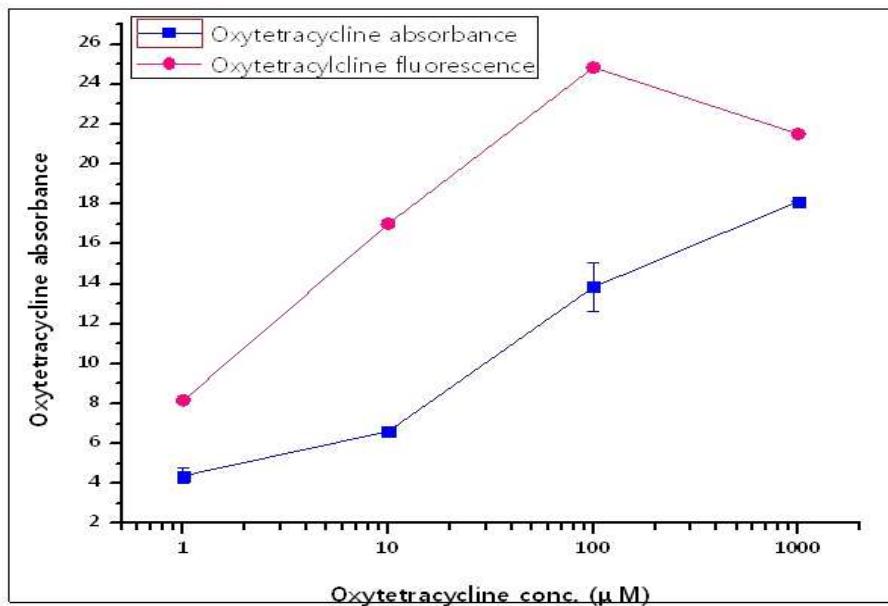


그림 35 Oxytetracycline aptamer 농도에 따른 Han5000측정 absorbance와 형광현미경으로 측정한 fluorescence 비교

(9) 포토다이오드 시제품 설계

포토다이오드 타입의 진단장치로 기존의 CCD 센서 기판을 포토센서 기판으로 교체를 할 수 있도록 제작을 하였다

기존의 CCD센서부분과 분광기부분이 없어지고, 포토센서 부분이 추가되었다.

메인 CPU 보드와 모니터링 프로그램은 기존의 CCD센서 기판을 사용할 경우와 동일하게 사용할 수 있도록 펌웨어 및 보드를 설계를 하였다.

측정광은 x,y,z 축으로 매뉴얼로 작동을 할 수 있도록 케이스를 제작하였다.

그림1을 보면, 모델 (①)을 평면도 (②) /정면도 (③) /측면도(④)로 표시한다

진단장치 포토다이오드

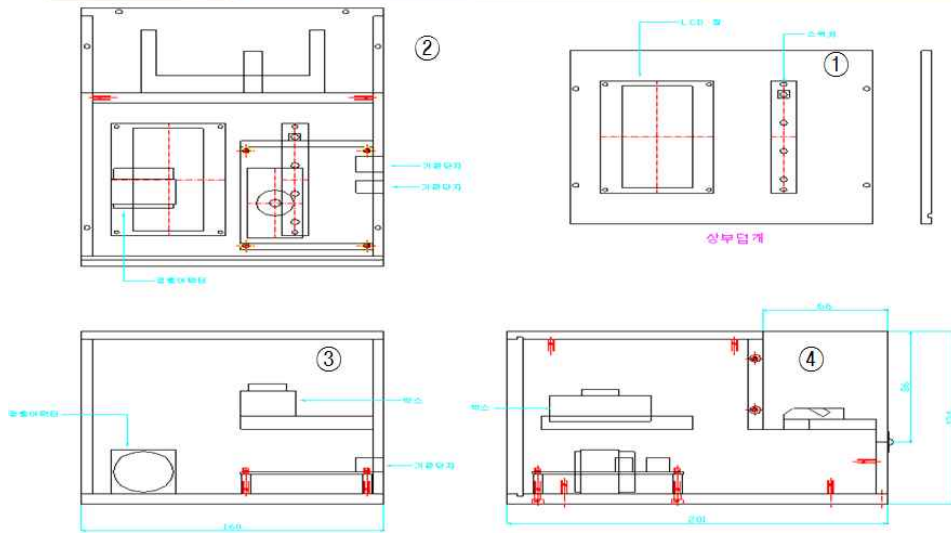


그림 36 포토다이오드를 이용한 진단장치 설계(1차 시제품)

포토다이오드 진단장치

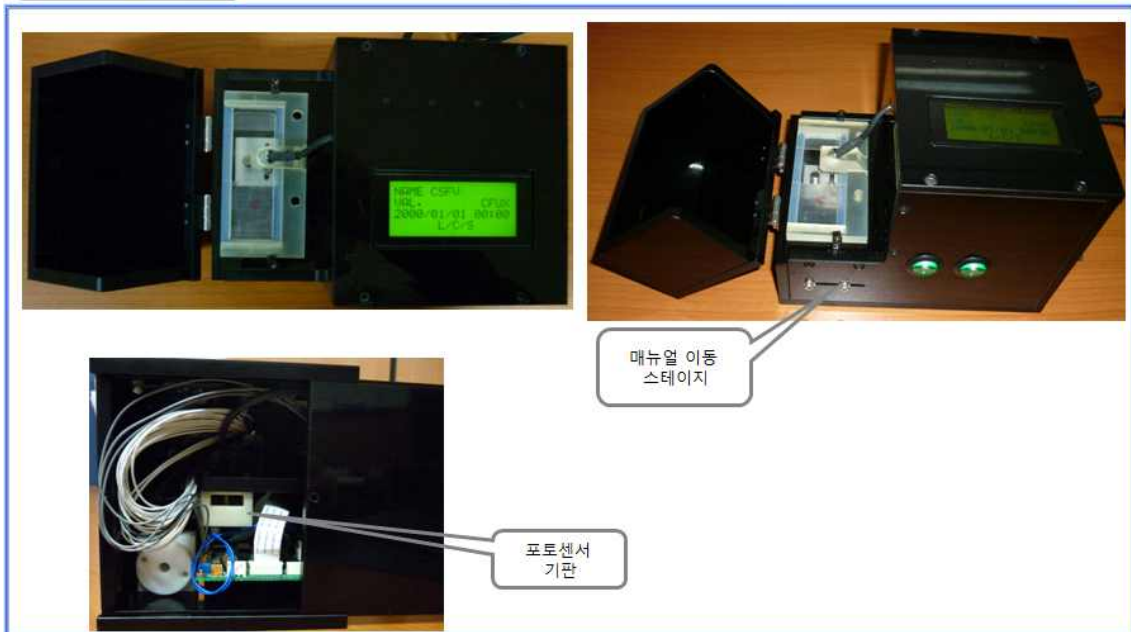


그림 37 포토다이오드를 이용한 산란광 측정장치

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 다중검출 마이크로 디바이스 제작 및 항생제 면역응집반응 알고리즘 개발

* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전의 기여도 등을 기술

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	다중검출 마이크로 디바이스 제작 및 항생제 검출 알고리즘개발	다중검출 마이크로 디바이스 제작 및 성능 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> Soft lithography 기술을 이용한 마이크로 디바이스 제작 및 평가 상용항체를 이용한 신호검출 능력 평가 폴리머 bead에 항체를 고정하여 non-labelling 검출 probe 개발 폴리머 bead의 nano particle을 이용한 probe 개발
2차 연도 (2010)		우유와 개발된 항체를 통한 마이크로 디바이스 실험	100	<ul style="list-style-type: none"> Silicon master 제작 poly(urethane acrylate) (PUA) 물질을 이용하여 첫 번째 replica를 제작 Lab-on-a-chip 제작 바이오센서 칩을 이용한 표준 항생물질의 정량분석 Raw milk를 이용한 분석결과 평가 기존 분석방법과의 비교 평가
		PDA리포솜을 이용한 항생제 검출	100	<ul style="list-style-type: none"> 마이크로디바이스를 이용한 항생제 검출법의 문제점을 해결 하기 위한 PDA리포솜 항생제 검출법 개발 PDA리포솜을 이용한 항생제 검출칩 개발
3차 연도 (2011)		항생제검출 바이오센서 검출 평가 실험	95	<ul style="list-style-type: none"> 마이크로 디바이스를 이용한 항생제 검출 실험 PDA 칩을 이용한 항생제 검출 실험

제 2 절 항생제 검출을 위한 Bio/Immuno receptor 및 nano-bioprobe 개발

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	항생제 검출을 위한 Bio/Immuno receptor 및 nano- bioprobe 개발	유전자 재조합 Bioreceptor 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> • 유전자 재조합 PBP 개발 완료 • 유전자 Truncated protein 개발 완료 • PBP재조합단백질정제 및 평가
		Immunoreceptor 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> • 5종 antibiotics의 haptenized protein 제작 완료 • 단클론항체를 이용한 immunoreceptor 개발: 2종 완료, 3종 선발 • 폴리혈청을 이용한 immunoreceptor 개발: 5종 제작 • 상용항체를 이용한 Immunoreceptor의 성능 평가
2차 연도 (2010)		Bio/immuno receptor 개발 및 선정	100	<ul style="list-style-type: none"> • 1차년도에서 개발된 단클론항체 2종 (4클론) 생산 완료 • 1차년도에서 개발중이었던 폴리혈청을 이용한 immuoreceptor 5종 중 1종 개발 및 생산 완료 • ELISA를 이용하여 Bioreceptor 17종에 대한 유효성 평가 및 최종 4종 선정 완료 • C-ELISA를 이용하여 Immuno-receptor 4종 선정 및 상용항체와의 성능평가 비교 완료 • 5종 대상 항생제 중 4종에 대한 Immuno-receptor로 사용가능한 9종 항체의 선발 완료
3차 연도 (2011)		Bio/Immuno receptor 제작 제작 조건 최적화 및 표준화	95	<ul style="list-style-type: none"> • 2차년도에 선발이 완료된 9종의 Immuno-receptor(항체) 중 2종을 bioprobe 제작 최적화 및 표준화 대표모델로 선정 • 응집반응 최적화를 위해 위 모델 항체에 대한 항체절편제작(Fab) 및 random biotinylation 수행 • 최적응집반응을 나타내는 조건으로 제작된 bioprobe와 위 모델 항체에 대응하는 표준 항생제 시료를 이용한 bioprobe의 검출 민감도 및 특이도 평가 • 위에서 설정된 최적화 및 표준화 방법으로 나머지 7종의 항생제 Immuno-receptor에 대하여 검증 실시

제 3 절 면역응집반응 산란광 및 형광 검출 광학센서 개발

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	항생제 검출을 위한 Bio / Immunoreceptor 및 nanobioprobe 개발	전체 계획수립시스템 구성 설계 H/W Infra 구축	100	<ul style="list-style-type: none"> Optical fiber로부터 조사되는 light 조명장치 설계 Optical fiber와 연결할 수 있는 광학장치의 entrance 설계 UV light 필터 장치 설계 collimation, focusing mirror와 collection lense등을 거친 영상 신호 검출 장치 설계 Linear CCD array detector와 필터 설계 Linear CCD array detector로부터 송출되는 전기적인 신호의 노이즈제거 회로 설계 미세신호의 증폭과 필터회로 설계
		특정과장 광검출 시스템구축	100	<ul style="list-style-type: none"> 광학적 설계를 통학 시험기구 제작 디지털화된 데이터를 마이크로 프로세서 내부 를 통한 신호 인식과 필요시 통신 또는 디스플레이할 수 있는 키트의 설계와 개발
2차 연도 (2010)		인식알고리즘개발	100	<ul style="list-style-type: none"> 측정 데이터 전송 프로토콜 작성 측정 데이터 디스플레이 화면 개발 각 항체별 전기적인 특성 분석과 특징 데이터 추출 각 항체별 특징 데이터의 인식 추출 알고리즘 개발 및 구현 마이크로프로세서 키트에 인식 프로그램 Emulation 작업 및 테스트
3차 연도 (2011)		문제점 분석과 현장 적용 test를 통한 최종 제품 설계	95	<ul style="list-style-type: none"> 3차년도 계획 조정 2차 시작품 검증 및 비교 Data 분석 3차 시작품 설계 변경 최종 적용 장치의 입력 / 출력/ 및 통신 시험 적용 테스트 및 보완 완제품 조립 및 규격서 작성 사용자 및 제품 Manual 작성 및 인쇄 Version UP 준비

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

구분	특허		신품 중				유전 등록	논문		기타
	출원	등록	품명 중 등록	중생 수 입 신 고	품중보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
목표	2						2			
달성	2						2	1		

1. 대표 논문 게재 성과

가. High-sensitivity detection of oxytetracycline using light scattering agglutination assay with aptasensor, Electrophoresis SCI IF: 3.608 2010, 31, 3115-3120

3115

Electrophoresis 2010, 31, 3115-3120

Keesung Kim^{1,2}
Man-Bock Gu³
Do-Hyun Kang¹
Jee-Won Park¹
In-Hong Song¹
Ho-Sup Jung¹
Kahp-Yang Suh^{1,2}

Research Article
High-sensitivity detection of oxytetracycline using light scattering agglutination assay with aptasensor

We present an aptamer-based biosensor (aptasensor) for rapid and high-sensitive detection of oxytetracycline (OTC) antibiotic in PBS inside a Y-channel PDMS microfluidic device. The detection was made by real-time monitoring of the agglutination assay of ssDNA aptamer-conjugated polystyrene latex microspheres with proximity optical fibers. The agglutination assay was performed with serially diluted OTC antibiotic solutions using highly carboxylated polystyrene particles of 920 nm diameter conjugated with OTC-binding ssDNA aptamer. Proximity optical fibers were used to measure the increase in 45° forward light scattering of the aggregated particles by fixing them around the viewing cell of the device with stable angle and distance to the detector. The detection limit was around 100 ppb for the current aptasensor system with the detection time less than 3 min.

Keywords:
 Agglutination assay / Aptamer / Microfluidic device / Oxytetracycline / Static light scattering
 DOI 10.1002/elps.201000217

¹School of Mechanical and Aerospace Engineering, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea
²Institute of Advanced Machinery and Design (IAMDI), Seoul National University, Seoul, Republic of Korea
³College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul, Republic of Korea
⁴Research Institute for Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea

Received April 15, 2010
 Revised July 14, 2010
 Accepted July 18, 2010

1 Introduction

Antibiotics are natural compounds of low molecular weight that can be produced by fungi or bacteria. They possess antibacterial activity; therefore, killing or inhibiting the growth of many microorganisms [1, 2]. In animal husbandry, antibiotics are mainly used to prevent bacterial infections and to increase growth rate. If these antibiotics were to be improperly administrated, however, their residual or degradation products may be present in the final products, which cause harmful effects on consumers. In particular, a trace amount of antibiotic compounds in milk can foster the development of antibiotic-resistant bacteria [3]. To address this issue, many countries have set definitive maximum residue limits in food products, for which suitable analytical methods need to be developed to control the concentration of these compounds below the maximum residue limit level [2].

Oxytetracycline (OTC) has been licensed for use in a variety of food producing animals including cattle, sheep, goats, poultry, and fish, as an additive in feed or drinking water to maintain optimal health. For this reason, many researchers have made extensive efforts to develop a rapid, accurate, and sensitive detection method for the determination of antibiotic contents [4]. Several methods have been introduced on the basis of fluorescein-assisted bioassays, but they usually lack sensitivity and specificity [5, 6].

Antibodies provide a fertile ground for molecular recognition for a wide range of applications and thus have made substantial contributions toward the advancement of diagnostic assays [7]. However, the use of antibodies in multiple detection methods or in the analysis of very complex samples could encounter limitations mainly from the nature and synthesis of their protein receptors. In order to circumvent some of these drawbacks, other recognition molecules have been explored as an alternative [8]. Of these, the systematic evolution of aptamer by Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment process has made possible the isolation of oligonucleotide sequences with an ability to recognize virtually any class of target molecules with high affinity and specificity [9].

Here, our interest lies in the combination of the aptamer-based biosensing with light scattering detection within a microfluidic channel. As is known, light scattering offers advantages such as small size, low cost, and ease of integration [10, 11]. Although there have been a number of optical approaches with microfluidic devices including surface enhanced Raman scattering, interferometry, and particle beam emission spectroscopy [12-14], little effort has been made

Correspondence: Associate Professor Kahp-Yang Suh, School of Mechanical and Aerospace Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea
E-mail: sky4u@snu.ac.kr
Fax: +82-2-883-0179

Abbreviations: LSPIA, light scattering particle immunoagglutination assay; OTC, oxytetracycline; PS, polystyrene

***Additional corresponding author:** Assistant Professor Ho-Sup Jung
E-mail: jhs@msu.ac.kr

© 2010 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim www.electrophoresis-journal.com

나. Design of polydiacetylene-phospholipid supramolecules for biosensor applications (Langmuir, 2010 impact factor 4.268, SCI 투고완료 심사중)

다. An Optimum Light Environment Design of Double-Stack Bed System by using Genetic Algorithms, 2011, 53(6), 93-100. (한국농공학회, KSCSI)

2. 특허 성과

출원된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2010	입자면역응집반응 산란광 측정 장치 및 방법	김기성 정유섭	대한민국	10-2010-0007898
2010	미세유동장치 및 그를 이용하여 마이코플라즈마 뉴모니아를 검출하는 방법	김기성 정유섭	대한민국	10-2010-006344

관인생략 출원번호통지서

출원일자 2010.01.28
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2010-0007898 (접수번호 1-1-2010-0060273-70)
 출원인명칭 서울대학교산학협력단(1-2007-050924-2)
 대리인성명 김정현(9-2001-000021-4)
 발명자성명 정호섭 고성별 정유섭 김기성
 발명의명칭 입자면역응집반응 산란광 측정 장치 및 방법

특 허 청 장

- 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
- 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 **심사청구 후 평균 16개월**에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 **출원 후 평균 10개월**에 1차 심사처리가 이루어집니다.
 2-나. 특허 및 실용신안은 **특허청 홈페이지**(<http://www.patent.go.kr>)의 "고객지원서비스-민원처리과장 동지 서비스" 코너에서 1차 심사결과동지 예고서비스를 신청하시면, 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원건의 1차 심사결과동지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.
 2-다. [상표 및 디자인은 **특허청 홈페이지(공지사항)**에 **류별 1차 심사결과동지 예정시기**를 매월 게시하고 있으며, **특허정보검색서비스 시스템**(<http://www.kipris.or.kr>)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과동지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과동지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, **SMS 또는 E-mail 서비스**로 제공해 드립니다.
 * 상기 1차 심사결과동지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 질 수 있습니다.
 2-라. 1차 심사결과동지(심사관이 특허결정의 통보를 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 빠른 때)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다. 특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리됨을 알려드립니다.
- 우선심사 특허(실용신안등록)출원** 또는 **디자인등록출원, 상표등록출원**에 대해 조기에 심사를 원하시면 "우선심사제도"를 이용하실 수 있습니다.
- 주소 등 변경신고** 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
- 산업재산권 표시, 광고요령** 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
 예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
- 미성년자 미성년자인 출원인**이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
- 문의처** 기타 문의사항이 있으시면 특허고객 콜센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.
- 특허청 주소** 302-701 대전광역시 서구 선사로 139 정부대전청사 4동
특허청 서울사무소 주소 135-911 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한국지식센터
 FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-566-8454

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2010.02.23
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(0011)
출원번호 10-2010-0016344 (접수번호 1-1-2010-0118779-53)
출원인명칭 서울대학교산학협력단(1-2007-050924-2)
대리인성명 리앤목 특허법인(9-2005-100002-8)
발명자성명 김기성 정호섭 경유섭
발명의명칭 미세유동장치 및 그를 이용하여 마이코플라즈마 뉴모니아를 검출하는 방법

특 허 청 장

- 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호통지서는 출원절차가 종료 될 때까지 보관하시기 바랍니다.
- 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 심사청구 후 평균 16개월에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 출원 후 평균 10개월에 1차 심사처리가 이루어집니다.
2-나. 특허 및 실용신안은 특허청 홈페이지(<http://www.patent.go.kr>)의 “고객지원서비스-민원처리과정 통지 서비스” 코너에서 1차 심사결과통지 예고서비스를 신청하시면, 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다
2-다. 상표 및 디자인은 특허청 홈페이지(공지사항)에 류별 1차 심사결과통지 예정시기를 매월 게시하고 있으며, 특허정보검색서비스 시스템(<http://www.kipris.or.kr>)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드립니다.
※ 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 질 수 있습니다.
2-라. 1차 심사결과통지서(심사관이 특허결정의 등본을 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 빠른 때)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리됨을 알려드립니다.
- 우선심사 특허(실용신안등록)출원 또는 디자인등록출원, 상표등록출원에 대해 조기에 심사를 원하시면 “우선심사제도”를 이용하실 수 있습니다
- 주소 등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보 변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
- 산업재산권 표시, 광고요령 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
- 미성년자 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
- 문의처 기타 문의사항이 있으시면 특허고객 콜센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.
- 특허청 주소 302-701 대전광역시 서구 선사로 139 정부대전청사 4동
특허청 서울사무소 주소 135-911 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한국지식센터
FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-566-8454

3. 추가 연구 및 타연구 활용 계획

가. Polydiacetylene(PCDA) liposome을 이용한 중금속 검출

PCDA liposome을 고정화 시킨 센서 칩을 사용하여 형광 현미경을 이용한 색 변이를 관찰하였다. PCDA liposome 센서 칩은 한비 세트론에서 제조하는 방법을 이용하였으며, aptamer 문헌 조사를 통해, 선택된 Pb, Cu, Zn, Hg 에 특이적으로 반응하는 ssDNA 압타머를 합성하여 PCDA liposome에 100% coverage를 가지도록 고정화 시켰다. 다음은 대표적으로 납 이온에 농도별로 반응한 형광 현미경 사진을 보여준다. 그림과 같이 농도가 높을수록 짙은 색의 붉은 빛깔을 보이며, photo intensity 작업을 통해서 정량적으로 분석한 그래프를 보여준다. 그래프에서 보여주는 것처럼 정량 분석이 가능함을 보여 주며, 특히 현미경이 아닌 UV 측정 장비를 이용한다면 보다 고감도의 검출이 가능할 것으로 기대 된다.

Pb ion concentration (mg/L) : incubation time 10 min

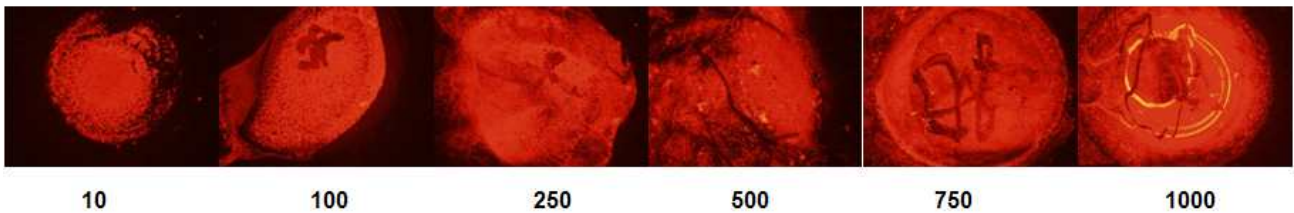


그림 1.농도별 PCDA 센서칩 색변이 형광현미경 사진

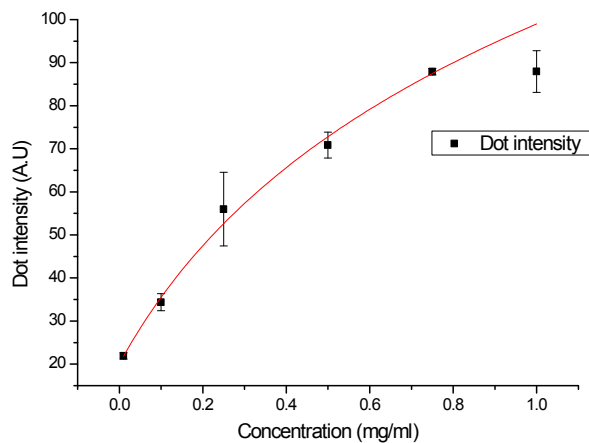


그림 2 Pb 이온 농도별 강도 변화

Condition	Aptamer info.	Aptamer concentration	Detection Area	Reaction time
Value	Hg-1(Geno Tech) 90.8 nmole MW : 6770.0 Tm : 54.7°C	40mM	Diameter 1mm	30min
	Pb-1(Geno Tech) 63.3 nmole MW : 8451.8 Tm : 71.1°C			
	Cu-1(Geno Tech) 6.5 nmole MW : 22406.0 Tm : 80.8°C			
	Zn-1(Geno Tech) 6.3 nmole MW : 23232.6 Tm : 80.9°C			

Hg fluorescence intensity pic.

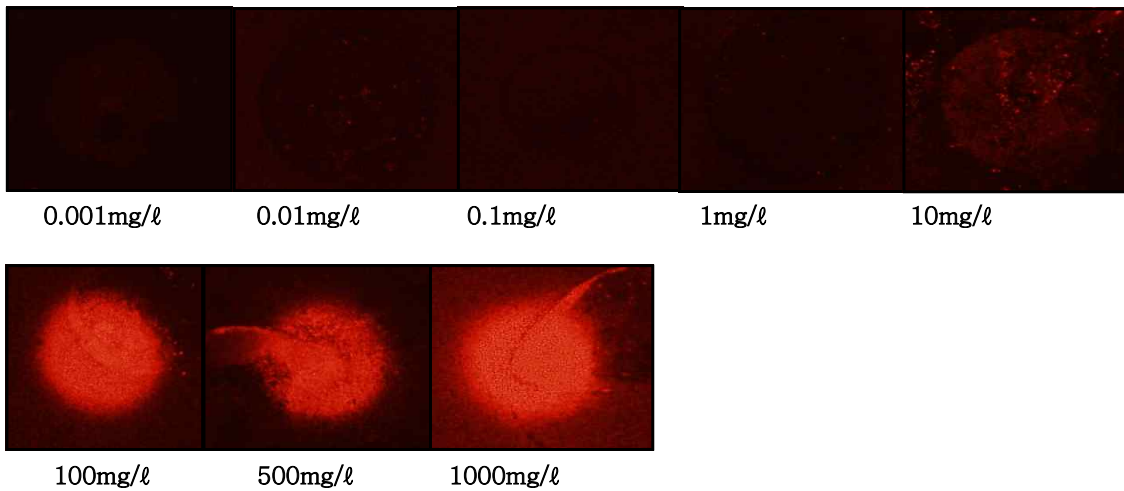


그림 3 수은 농도별 형광현미경 사진

Aptamer와 반응용액(수은표준용액)을 희석하여 농도별로 찍은 형광현미경 사진이다. 반응용액 농도10mg/l 부터 사진으로 확인하였을 때 확실히 변화를 알 수 있으며 100mg/l 부터는 형광 변화를 눈으로 확인할 수 있을 정도로 변화 하는 것을 알 수 있다.

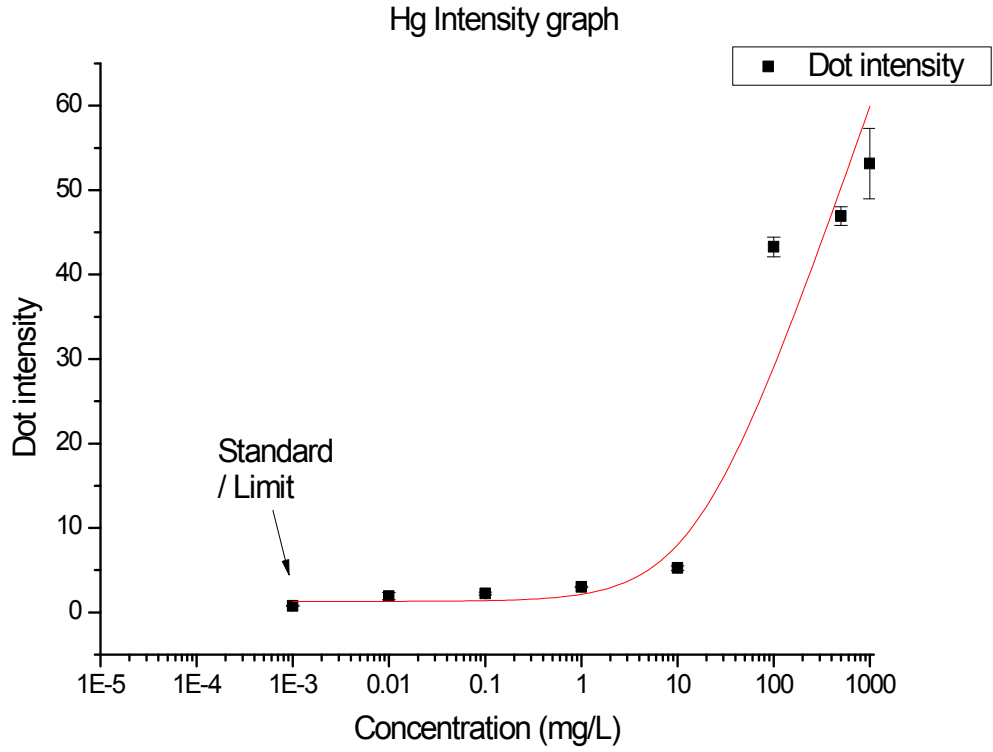


그림 4 수은 농도별 형광 Intensity 그래프

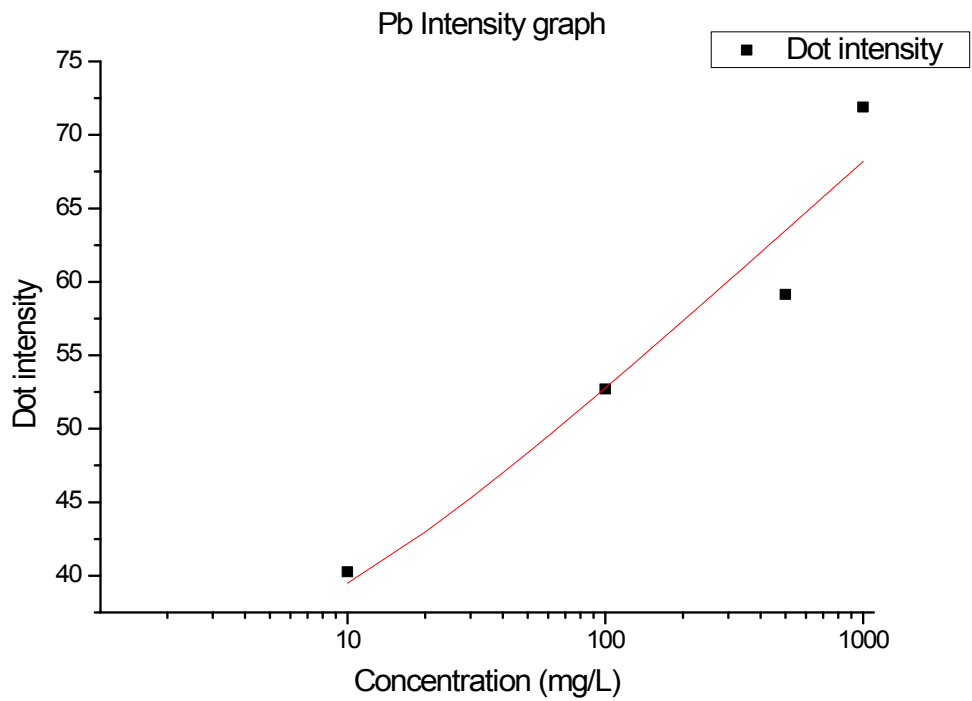


그림 5 납 고농도별 형광 Intensity 그래프

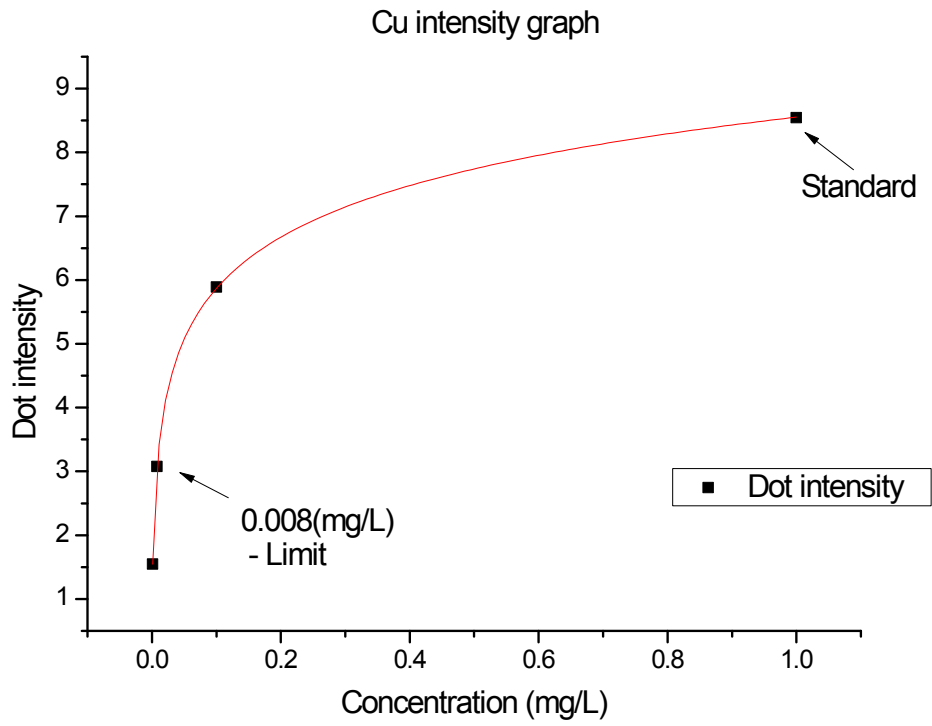


그림 6 구리 저농도별 형광 Intensity 그래프

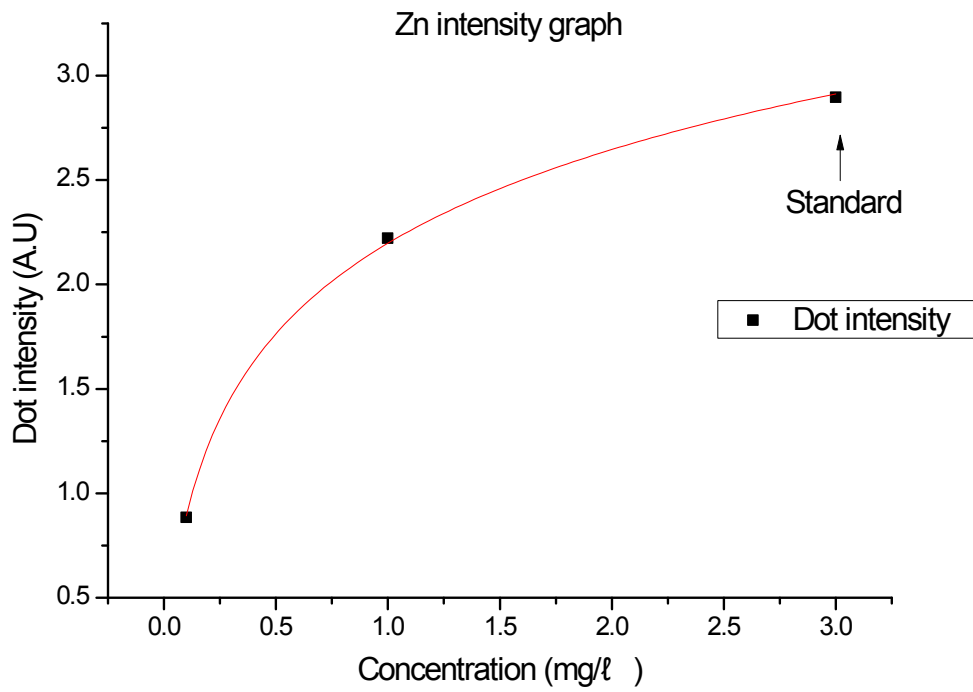


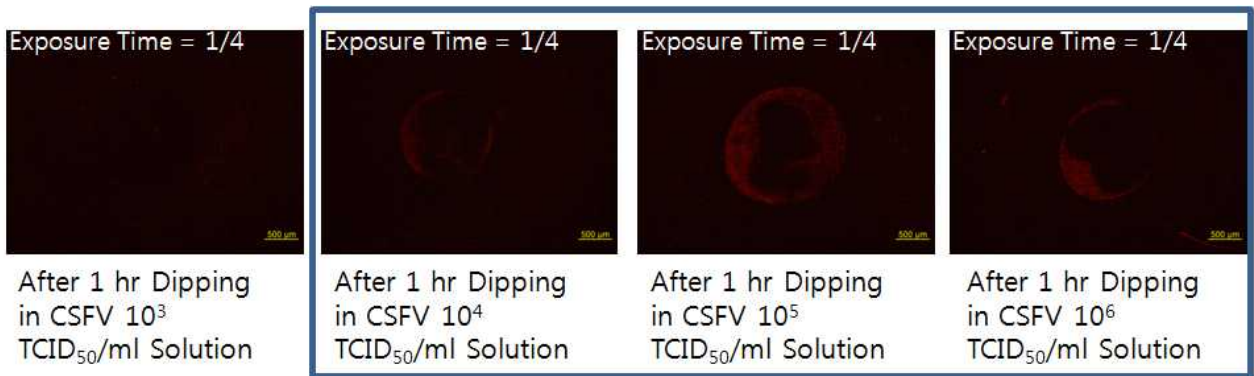
그림 7 아연 저농도별 형광 Intensity 그래프

형광현미경 사진으로 보았을 때 각 중금속 농도별로 intensity 변화를 나타내는 그래프 이다. 각 중금속 Aptamer와 반응시키는 반응용액의 농도에 따라 형광세기가 변하는데, 반응용액의 농도가 올라갈수록 형광의 세기가 강해지는 것을 알 수 있다. 이는 개발된 기기로 확인했을 경우 더 확연하고 정밀하게 측정 할 수 있음을 나타낸다.

나. PDA chip을 이용한 동물질병 검출 실험

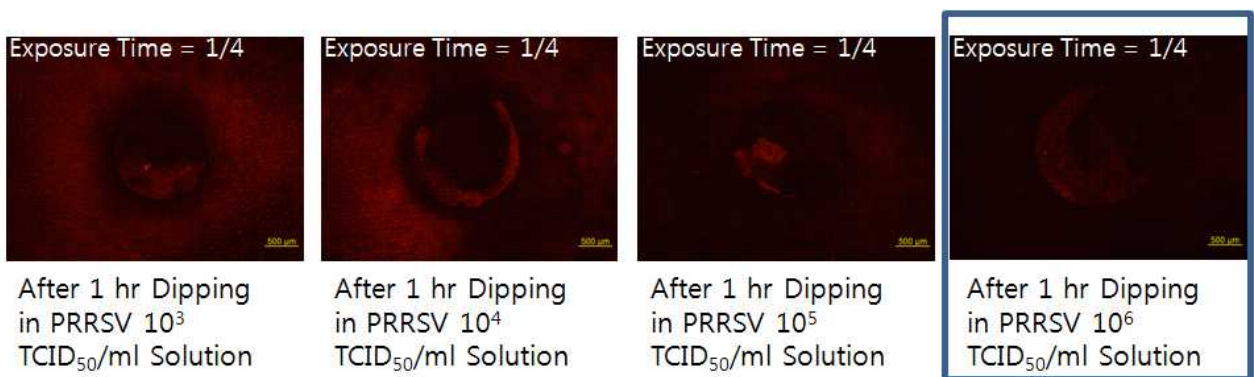
(1) 돼지열병바이러스 (Classical Swine Fever Virus, **CSFV**)

CSFV 농도별로 준비된 샘플용액에 PDA 칩을 완전히 담근 후 1시간 후에 형광 현미경으로 관찰 하였다. 검출 실험 결과는 아래 그림과 같다. 10^6 TCID₅₀/ml 에서도 검출이 가능 하나 반복적인 실험을 더 해봐야 할 것으로 판단된다.



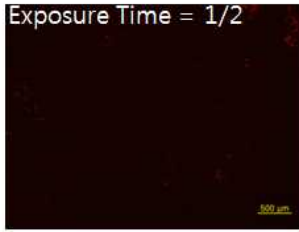
(2) 돼지생식기 및 호흡기 증후군 (Procine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, **PRRSV**)

PRRSV 농도별로 준비된 샘플용액에 PDA 칩을 완전히 담근 후 1시간 후에 형광 현미경으로 관찰 하였다. 검출 실험 결과는 아래 그림과 같다. 10^6 TCID₅₀/ml 에서도 검출이 가능 하나 반복적인 실험을 더 해봐야 할 것으로 판단된다.

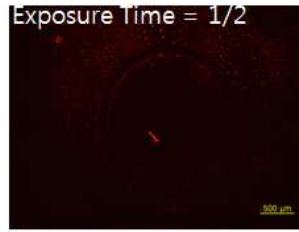


(3) 조류독감 (Avian Influenza, **AI**)

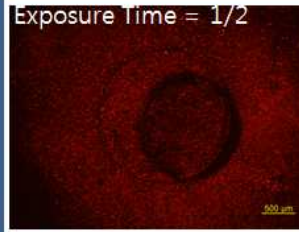
농도별로 준비된 Avian Influenza 샘플용액에 PDA 칩을 완전히 담근 후 1시간 후에 형광 현미경으로 관찰 하였다. 검출 실험 결과는 아래 그림과 같다. 2^6 과 2^7 H.A. solution 에서도 검출이 가능한 것으로 판단 되며 검출한계와 검출시간에 대한 추가 연구가 진행 되어야 한다.



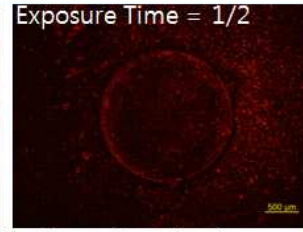
After 1 hr Dipping
in A.I. 2⁴ H.A.
Solution



After 1 hr Dipping
in A.I. 2⁵ H.A.
Solution



After 1 hr Dipping
in A.I. 2⁶ H.A.
Solution



After 1 hr Dipping
in A.I. 2⁷ H.A.
Solution

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 특허분석

1. 국외특허 분석 범위

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

2. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		(기술 1)	(기술 2)
Keyword		antibiotic residue	fiber optic sensor
검색건수		58	44,223
유효특허건수		1	2,653
핵심특허 및 관련성	특허명	잔류항생제의 진단방법 및 진단키트	Self-encoding sensor with microspheres
	보유국	한국	USA
	등록년도	1995	2008
	관련성(%)	50%	10%
	유사점	마이크로 웰에 항생제와 반응하는 물질을 코팅하여 진단함	scattering을 이용한 검출방법
	차이점	단일검출	물리적 강도 검출

제 2 절 논문분석

1. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	Aureka DB, pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), 국회도서관(www.nanet.go.kr)
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

2. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		fiber optics sensor	Detection of Antibiotics in the milk
Keyword		fiber optics, micro channel, fiber optics sensor, diagnosis chip	antibiotics residue, antibiotics in milk
검색건수		600여건	80여건
유효논문건수		65	15
핵심논문 및 관련성	논문명	On-chip fluorescence-activated particle counting and sorting system.	Automated microarray system for the simultaneous detection of antibiotics in milk
	학술지명	Anal Chim Acta	Anal. Chem.
	저자	Kang Y, Wu X, Wang YN, Li D.	Bertram G. Knecht, Angelika Strasser, Richard Dietrich, Erwin Martlbauer, Reinhard Niessner, Michael G. Weller
	게재년도	2008	2004
	관련성(%)	80%	60%
	유사점	fluidic 기반의 채널을 설계하여 fiber optics를 이용하여 particle을 검출하는 원리 이용	chip 기반의 시스템을 이용하여 항생제를 동시에 여러 가지를 검출하는 기술 이용
	차이점	단순 particle을 다루는 chip 연구로서 항원-항체 반응 등을 이용하여 particle을 형성시키는 기술 미포함	Well type의 chip과 CCD camera를 이용한 검출 방식으로 fluidic type과 fiber optics를 이용하는 기술과 상이

제 7 장 참고문헌

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

- [31] Cox, A. J., DeWeerd A. J., Linden, J., *Am. J. Phys.* 2001, 70, 620–625.
- [32] Price, C.P., Newman, D. J., *Principles and practice of immunoassay. Stockton Press, New York* 1997, 445–472.
- [33] Aristov, Y. I., Glaznev, I. S., Frenni, A., Restuccia, G., *Chem. Eng. Sci.* 2006, 61, 1453–1458.
- [34] Wei, Y., Shen, J., Yu, H., *Particuology* 2009, 7, 76–82.
- [35] Kim, H. -J., Lee, J., Kim, T. -H., Lee, T. S., Kim, J., *J. Adv. Mater.* 2008, 20, 1117–1121
- [36] Cheryl, L. F., *Electrophoresis* 1997, 18, 2427–2437.
- [37] María, C-P., Antonio, L. C., María, L. M., *Electrophoresis* 2010, 31, 229–250.
- [38] Johnathan, W. F., Yuegang, Z., *Food Chemistry* 2007, 105, 1297–1301.
- [39] Papadoyannis, I.N., Samanidou, L.A., Kovatsi, L.A., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Anaysis* 2000, 23, 275–280.
- [40] Fletouris, D., Psomas, J., Botsoglou, N., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1990, 38, 1913–1917.
- [41] Dihuidi, B., Kuchatogr, M. J., Roets, E., Hoodmartens, J., Vanderghe, H., *Journal of Chromatography* 1985, 413–424.
- [42] Tombelli, S., Miunni, M., Maxcini, M., *Biomolecular Engineering* 2007, 24, 191–200.
- [43] Jayasena S. D., *Clinical Chemistry* 1999, 45:9, 1628–1650.
- [44] Domachuk, P., Grillet, C., Ta'eed, V., Mägi, E., Bologer, J., Eggleton, B. J., *Appl. Phys. Lett.* 2005, 86, 1031–1033.
- [45] Jin, F., Hickman, J. J., Lenghaus, K., Maeda, R. K., *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, 380, 204–211.
- [46] Liu, G., L., Lee, L. P., *Appl. Phys. Lett.* 2005, 87, 4101–4104.
- [47] Han, J. H., Brian, C. H., Yoon, J.Y., *Biosens. Bioelectron.* 2008, 23, 1303–1306.
- [48] Lucas, L. J., Han, J.-H., Chesler, J., Yoon, J.-Y., *Biosens. Bioelectron.* 2007, 22, 2216–2222.
- [49] Takagi, T., *Electrophoresis* 1993, 14, 1255–1256
- [50] Pyo, H. B., Jung, M. Y., Park, S. H., *Biochip J.* 2007, 1, 281–287.
- [51] Kim, K., Jung, H.S., Song, J.Y., Lee, M.Y., Kim, K.S., Suh, K.Y., *Electrophoresis* 2009, 30, 3206–3211.
- [52] Yoon, J. Y., Yoo, D. J., *Journal of Biological Engineering* 2008, 2, 1–12.
- [53] Han, J. H., Brian, C. H., Yoon, J.Y., *Biosens. Bioelectron.* 2008, 23, 1303–1306.
- [54] Javed, H. N., Lee, S.J., Kim, Y.S., Gu, M.B., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2008, 16, 1254–1261.
- [55] Kim, P., Kwon, K. W., Park, M. C., Lee, S. H., Kim, S. M., Suh, K. Y., *Biochip J.* 2008, 2, 1 - 11.
- [56] Stevens, M. K., Krause, D. C., *Infect. Immun.* 1990, 58, 3430 - 3433.

- [57] Brian C. H., Song J. Y., Lee C. H., Najam A., Yoon J. Y., *Sensors and Actuators B : chemical* 2008, 138(2), 491-496.
- [58] Lee J. F., Stovall G. M., Ellington A. D., *Current Opinion in Chemical Biology* 2006, 10, 282-289.
- [59] Johanna P., Ursula S., Patrick D., Claudia P., *Biosensors and Bioelectronics* 2008, 24, 1456-1461.
- [60] Haugh R., *Hospitals & Health Networks* 2006, 80, 46 - 51.
- [61] Price, C.P., Newman, D. J., *Principles and practice of immunoassay*. Stockton Press, New York 1997, 445-472.
- [62] S. Okada, S. Peng, W. Spevak and D. Charych, *Accounts Chem Res*, 1998, **31**, 229-239.
- [63] J. Lee, H. J. Kim and J. Kim, *J Am Chem Soc*, 2008, **130**, 5010-5011.
- [64] J. Lee, H. Jun and J. Kim, *Adv Mater*, 2009, **21**, 1-4.
- [65] J. Lee, E. J. Jeong and J. Kim, *Chem Commun*, 2011, **47**, 358-360.
- [66] D. Seo and J. Kim, *Adv Funct Mater*, 2010, **20**, 1397-1403.
- [67] S. W. Lee, C. D. Kang, D. H. Yang, J. S. Lee, J. M. Kim, D. J. Ahn and S. J. Sim, *Adv Funct Mater*, 2007, **17**, 2038-2044.
- [68] K. W. Kim, H. Choi, G. S. Lee, M. K. Oh, J. M. Kim and D. J. Ahn, *Macromol Res*, 2006, **14**, 483-485.
- [69] Y. L. Su, J. R. Li and L. Jiang, *Colloid Surface B*, 2004, **38**, 29-33.
- [70] C. X. Guo, P. Boullanger, T. Liu and L. Jiang, *J Phys Chem B*, 2005, **109**, 18765-18771.
- [71] B. A. Pindzola, A. T. Nguyen and M. A. Reppy, *Chem Commun*, 2006, 906-908.
- [72] C. H. Park, J. P. Kim, S. W. Lee, N. L. Jeon, P. J. Yoo and S. J. Sim, *Adv Funct Mater*, 2009, **19**, 3703-3710.
- [73] K. W. Kim, H. Choi, G. S. Lee, D. J. Ahn and M. K. Oh, *Colloid Surface B*, 2008, **66**, 213-217.
- [74] M. A. Reppy and B. A. Pindzola, *Chem Commun*, 2007, 4317-4338.
- [75] K. Lee, L. K. Povlich and J. Kim, *Analyst*, 2010, **135**, 2179-2189.
- [76] B. Yoon, S. Lee and J. M. Kim, *Chem Soc Rev*, 2009, **38**, 1958-1968.
- [77] Z. F. Ma, J. R. Li, M. H. Liu, J. Cao, Z. Y. Zou, J. Tu and L. Jiang, *J Am Chem Soc*, 1998, **120**, 12678-12679.
- [78] S. Kolusheva, L. Boyer and R. Jelinek, *Nat Biotechnol*, 2000, **18**, 225-227.
- [79] S. Y. Okada, R. Jelinek and D. Charych, *Angew Chem Int Edit*, 1999, **38**, 655-659.
- [80] S. Kolusheva, E. Wachtel and R. Jelinek, *J Lipid Res*, 2003, **44**, 65-71.
- [81] C. Cametti, F. Bordi, S. Sennato and D. Truzzolillo, *Phys Rev E*, 2007, **76**.
- [82] A. A. Yaroslavov, A. V. Sybachin, E. Kesselman, J. Schmidt, Y. Talmon, S. A. A. Rizvi and F. M. Menger, *J Am Chem Soc*, 2011, **133**, 2881-2883.
- [83] J. Wilschut, N. Duzgunes, D. Hoekstra and D. Papahadjopoulos, *Biochemistry-US*, 1985, **24**, 8-14.

- [84] T. Lian and R. J. Y. Ho, *J Pharm Sci*, 2001, **90**, 667–680.
- [85] D. L. Sparks, W. S. Davidson, S. Lundkatz and M. C. Phillips, *J Biol Chem*, 1993, **268**, 23250–23257.
- [86] G. Y. Bai, M. Nichifor, A. Lopes and M. Bastos, *J Phys Chem B*, 2005, **109**, 518–525.