

118094-03

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( )발간등록번호( O )  
가축질병대응기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003717-01

# 구제역 바이러스 및 조류 인플루엔자 바이러스 동시 검출을 위한 신속 진단 키트 개발

2021. 11. 17.

주관연구개발기관 / 성균관대학교 산학협력단  
협동연구개발기관 / 숙명여자대학교 산학협력단  
팜스웰메디컬

농림축산식품부  
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

구제역 바이러스 및  
조류 인플루엔자  
바이러스 동시  
검출을 위한  
신속 진단  
키트 개발

2021

농림식품기술기획평가원  
농림축산식품부

제출문

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “구제역 바이러스 및 조류 인플루엔자 바이러스 동시 검출을 위한 신속 진단 키트 개발”(개발기간 : 2018. 11. 15. ~ 2021. 08. 14.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 11. 17

주관연구개발기관명 : 성균관대학교 산학협력단 (대표자) 박선균 (인)  
공동연구개발기관명 : 숙명여자대학교 산학협력단 (대표자) 이명석 (인)  
팜스웰메디컬 (대표자) 성원기 (인)

주관연구책임자 : 성균관대학교 이진기  
공동연구책임자 : 성균관대학교 이정현  
숙명여자대학교 임광일  
팜스웰메디컬 성원기

국가연구개발혁신법 시행령 제33조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		가축질병대응기술개발사업				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)						연구개발과제번호		118094-03	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 소분류 코드명 LA0702	60 %	2순위 소분류 코드명 LA0201	20 %	3순위 소분류 코드명 LA0602	20%		
	농림식품 과학기술분류	1순위 소분류 코드명 CA0102	10 0%	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명	%		
총괄연구개발명 (해당 시 작성)									
연구개발과제명		구제역 바이러스 및 조류 인플루엔자 바이러스 동시 검출을 위한 신속 진단 키트 개발							
전체 연구개발기간		2018. 11. 15 - 2021. 08. 14 (2년 9개월)							
총 연구개발비		총 936,000 천원 (정부지원연구개발비: 702,000 천원, 기관부담연구개발비: 234,000 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)							
연구개발단계		기초[ ] 응용[ ] 개발[ <input checked="" type="checkbox"/> ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]			기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준( ) 종료시점 목표( )		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)									
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)									
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	본 연구는 구제역과 조류 인플루엔자 바이러스로부터 추출한 유전체 RNA를 선택적으로 검출할 수 있는 형광 기반의 분자 표지 시스템을 이용하여, 바이러스 감염 여부 뿐 아니라 혈청형 또는 아형까지 빠르게 구별할 수 있는 검출기기를 개발하는 것을 목표로 함							
	전체 내용	<p>[1차년도]</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 구제역바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스의 염기서열 분석 및 각 바이러스의 혈청형과 아형을 구분할 수 있는 핵산 탐침 (Probe) 염기서열 설계</li> <li>- 물리적/화학적 방법을 통한 상용 전처리 기법 최적화</li> <li>- 형광 기반의 검지 시스템 개발을 위한 형광 나노재료 및 소광재료 설계 및 합성</li> <li>- 종이 기반 미세유체 소자의 설계 및 이차원 lateral flow sheet의 유동 조건 분석</li> <li>- 종이 기반 lateral flow 키트에의 검지기 형광 검출 알고리즘 설계</li> <li>- 소형 형광 검지기 설계를 위한 소자 선정 및 검출 모듈 성능 테스트</li> </ul> <p>[2차년도]</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 역유전학 (Reverse genetics) 기법으로 복제 능력이 제거된 모델 바이러스 생산</li> <li>- 모델 바이러스 RNA 유전체 추출 및 검체 안정성 극대화 연구</li> <li>- 바이러스 추출 핵산의 특정 염기서열과 결합할 수 있는 핵산을 이용한 형광 분자 표지 (Fluorescence molecular beacon) 개발</li> <li>- 구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스 혈청형 또는 아형 구별을 위한 형광 기반의 다중 검지 시스템 개발</li> <li>- 구제역과 조류독감 바이러스 검지 lateral flow sheet의 원천 기술 확보 및 발광에 따른 검지 메커니즘 연구</li> <li>- 소형 형광 검출 모듈 설계 및 제작, 종이 기반 키트 적용한 연동 테스트 및 성능 평가</li> </ul> <p>[3차년도]</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 실제 검지 상황을 모사한 야생 바이러스 생산</li> </ul>							

		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 전처리 기술을 바탕으로 한 야생 바이러스 RNA 유전체 추출 기술 개발</li> <li>- 구제역과 조류독감 바이러스 감염 여부 및 아종 바이러스 구별을 위한 lateral flow sheet 검출키트 개발</li> <li>- 바이러스 검출기기의 형광 신호 최적화 및 형광 신호와 바이러스 감염 여부간의 상호관계 해석</li> <li>- 바이러스 검출 성능 개선 연구 및 센서 안정도와 신뢰성 개선 연구</li> <li>- Lateral flow sheet 키트를 적용하여 검출 성능 확인</li> <li>- 통신/GPS 모듈이 추가된 바이러스 검지용 소형 형광 검출 장비 개발</li> </ul>
--	--	---

연구개발성과	<p>[정성적 연구 성과]</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 역유전학 기법을 통한 증식 능력이 제거된 모델 바이러스 생산 기술 개발</li> <li>- 야생 바이러스 생산 방법 구축 및 RNA 유전체 추출 기술 개발</li> <li>- 조류 인플루엔자 바이러스 및 구제역 바이러스의 존재를 검지할 수 있는 형광 분자 표지 설계 및 개발</li> <li>- 형광 분자 표지의 종이 상의 기능화 방법 확립</li> <li>- 바이러스 검지할 수 있는 lateral flow sheet 개발</li> <li>- 개발한 lateral flow sheet의 민감도를 개선하여 현장에서 사용 가능한 형광 분자 표지 농축 종이 칩 개발</li> <li>- 소형 형광 검출 모듈 설계 및 개발</li> <li>- 개발한 lateral flow sheet 및 형광 분자 표지 농축 종이 칩의 핵산 검지 테스트</li> <li>- 통신/GPS 모듈을 추가하여 바이러스 검지용 소형 형광 검출 장비 개발 및 제작</li> </ul>
	<p>[정량적 연구 성과]</p> <p>본 연구를 통해 계획했던 정량적 연구 성과에 비해 더 많은 양의 성과를 달성함.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 논문 8건 (4건 초과달성)</li> <li>- 학술발표 21건 (13건 초과달성)</li> <li>- 인력양성 11건 (3건 초과달성)</li> <li>- 정책활용 2건 (1건 초과달성)</li> <li>- 홍보전시 4건 (3건 초과달성)</li> <li>- 특허출원 4건</li> <li>- 기술실시 1건</li> <li>- 사업화 1건</li> <li>- 고용창출 1건 (1건 초과달성)</li> </ul>

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 본 연구를 통하여 확보한 유전체 RNA 기반 바이러스 검지 기술은 <b>향후 조류 인플루엔자 바이러스와 구제역 바이러스를 포함한 다양한 바이러스에 적용이 가능함</b></li> <li>- 본 연구를 통해 개발할 기기를 사용할 경우, 조류 인플루엔자와 구제역을 보다 빠르게 진단할 수 있어 <b>신속한 대응이 가능할 것으로 기대됨</b></li> <li>- 바이러스 조기 진단 및 대응을 통해 <b>축산 식품의 안전 신뢰도를 향상시키고</b>, 이를 바탕으로 축산 식품 시장 이익 확대가 가능함</li> <li>- 추가적인 응용 연구를 진행할 시, 원천기술 및 특허를 확보하여 <b>국부창출에 기여하고 신 성장 동력을 발굴할 수 있을 것으로 기대됨</b></li> </ul>
---------------------	---

연구개발성과의 비공개여부 및 사유

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문		특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화학물	신품종	
	생명 정보	생물 자원							정보	실물			
	8	4											
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호				
국문핵심어 (5개 이내)	구제역		조류 인플루엔자		바이러스		신종바이러스 대처 용이		종이 기반 핵산 검출 기기				
영문핵심어 (5개 이내)	Foot-and-mouth disease		Avian influenza		Virus		Easy to cope with new viruses		Paper-based nucleic acid detection device				

## 〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 .....	5
1) 연구개발 목적 .....	5
2) 연구개발의 필요성 .....	6
3) 연구개발 대상의 국내·외 현황 .....	8
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 .....	16
1) 연구개발의 최종목표 .....	16
2) 연구개발과제의 연차별 연구수행 계획 .....	17
3) 연구개발 추진 전략·방법 및 추진체계 .....	38
4) 연구수행 내용 .....	48
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 .....	196
1) 연구수행 결과 .....	196
2) 목표 달성 수준 .....	249
4. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도 .....	253
5. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 .....	257

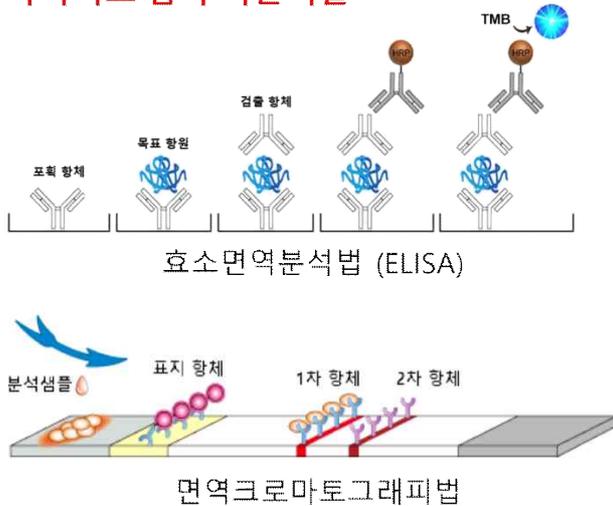
별첨 자료

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1) 연구개발 목적

- 본 연구는 구제역과 조류 인플루엔자 바이러스로부터 추출한 유전체 RNA를 선택적으로 검출할 수 있는 형광 기반의 분자 표지 시스템을 이용하여, 바이러스 감염 여부 뿐 아니라 혈청형 또는 아형까지 빠르게 구별할 수 있는 검출 기기를 개발하는 데에 목적이 있음

### 바이러스 검지 기존기술



#### 한계점

- 아형 및 혈청형 구분이 어려움
- ELISA의 경우 감도는 좋으나 검출속도가 느림
- 면역크로마토그래피법의 경우 검출 감도가 좋지 못함
- 조류 인플루엔자 바이러스와 구제역 바이러스 동시 검출 불가

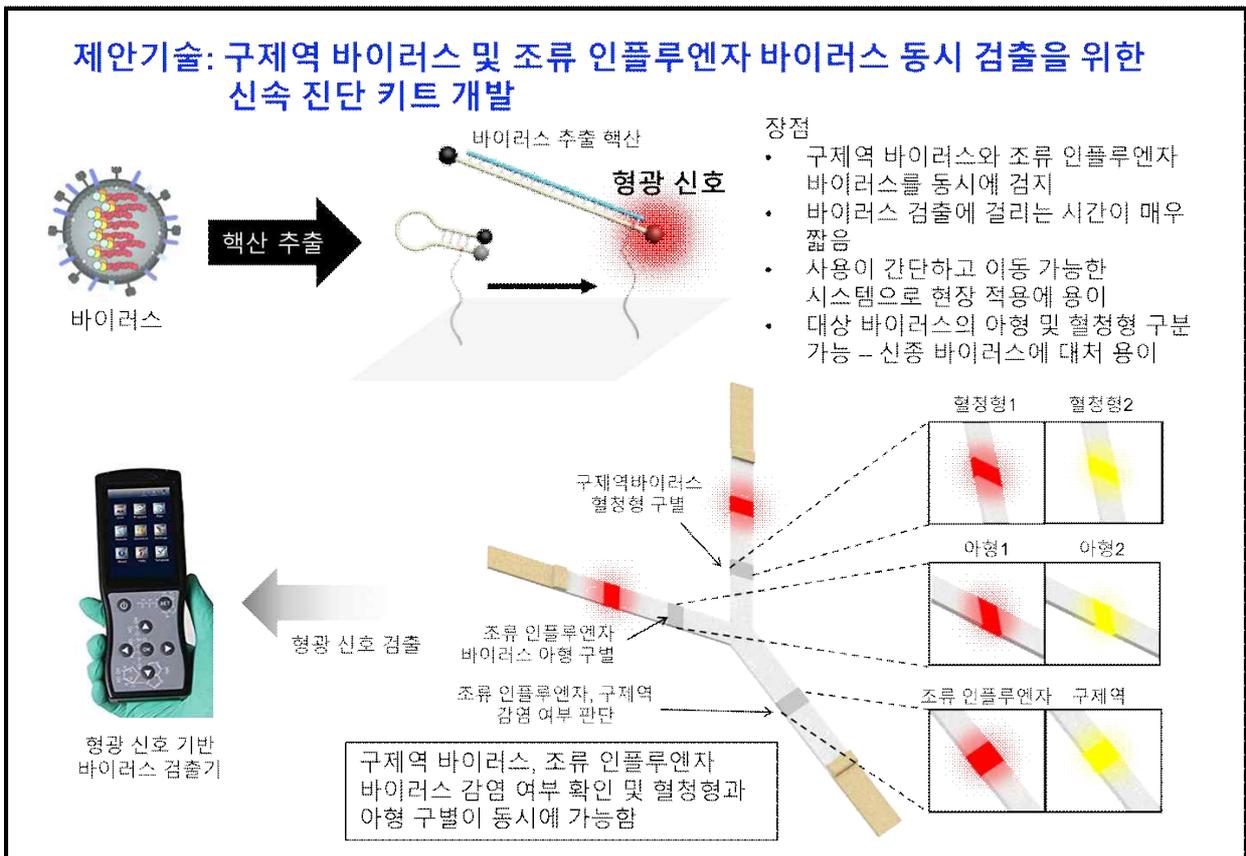


그림 1. 바이러스 검지 기존 기술과 제안기술의 비교

## 2) 연구개발의 필요성

- 구제역, 조류 독감 등의 동물 질병이 발생할 경우 살처분 등 질병방제 비용과, 육류의 생산성 감소, 축산물의 국제 교역 제한 등으로 막대한 경제적 피해가 발생함
- Food and Agriculture Organization (FAO)에 의하면 연간 가축질병으로 인한 관련 사업의 피해액은 국내에서만 2조 2천억 원 정도로 집계되며, 축산업의 국내 총 생산액이 10조원 대인 것을 감안할 때 가축질병이 미치는 영향력은 축산업의 성패를 좌우하는 척도가 됨

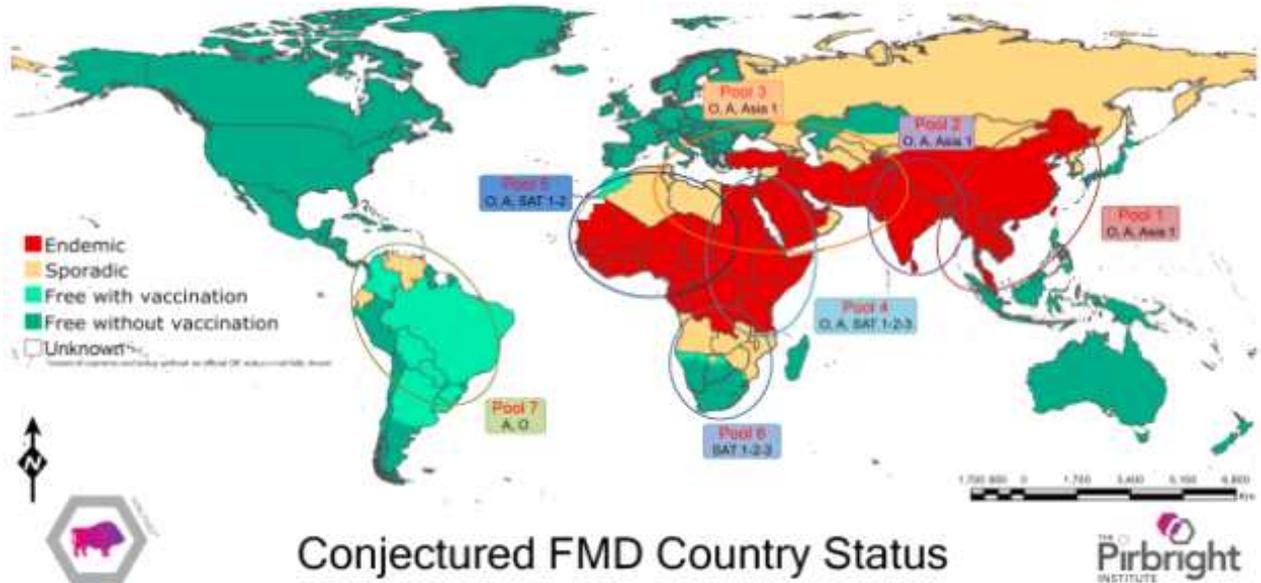


그림 2. 국가별/대륙별 구제역 바이러스 분포 현황. 선진국을 필두로 한 다양한 박멸정책을 통해 많은 나라에서 구제역 바이러스가 사라졌으나, 아직까지 아프리카, 중동, 아시아 및 남미에서 만연하고 있음

- 2010년 기준 구제역 발생 국가는 총 39개로 우리나라를 포함한 아시아 19개국, 아프리카 17개국, 유럽 2개국, 남미 1개국으로 아시아에서의 구제역 발생률이 가장 높으며, 대표적으로 대만의 경우 현재까지 42조원이 넘는 경제적 손실과 함께 축산기반 붕괴를 경험한 바 있음. 우리나라에서의 구제역이 준 직접적인 경제적 피해액은 방역활동, 가축보상비 등을 포함하여 3조원에 육박하고 있는 실정임
- 조류 독감의 경우, 2003년 이래로 우리나라에서 해마다 발생하여 농가와 산업에 큰 피해를 입혔음. 2016년 11월에서 이듬해 2월까지 우리나라의 166개 농장에서 60건의 고병원성 조류 독감이 발생한 바 있으며, 이로 인해 폐기된 사육조류가 3000만 마리를 넘어섬 (경향비즈, 2017)
- 이처럼 동아시아를 중심으로 빈번한 발생양상을 보이는 구제역과 조류 인플루엔자는 전파 속도가 매우 빠르기 때문에 이를 통해, 정치, 사회, 경제의 전 분야에 걸쳐 파급효과를 미치고 있으며, 따라서 우리나라에서도 제 1종 가축전염병으로 분류되어 국가 재난형 가축질병으로 불리고 있음
- 바이러스는 돌연변이를 통해 생체 내 면역반응을 회피할 수 있으며 숙주세포 내에서 자체 단백질과 유전체를 만들어 자손 바이러스를 생산함으로써 감염을 유지함. 바이러스 유전체의 돌연변이는 동종 숙주 동물의 감염 속도 및 감염 확대를 늘릴 수 있을 뿐만 아니라 이종 동물의 감염도 가능하게 하여 경제적, 의학적으로 큰 파급을 불러올 수 있음. 특히 유전체 복제의 부정확성으로 유전체의 돌연변이 속도가 매우 빠른 RNA 바이러스의 경우 지속적으로 새로운 진단시스템, 백신, 치료약 개발이 필요함

- 대표적 RNA 바이러스인 구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스 같은 고병원성 동물 바이러스의 경우, 지구 온난화에 따른 자연생태계 변화와 기후대의 이동으로 인하여 돌연변이 속도가 증가하고 감염 지역이 확대되면 산업적으로 큰 피해를 초래할 가능성이 높음
- 2016년, 미국 농무부 (USDA)와 동식물보건검역청 (APHIS)이 제시한 고병원성 조류 인플루엔자 준비와 대응 계획에 따르면 야생조류의 감시는 크게 두 가지로 나뉘는데, 이 중 첫째인 조기 진단과 관측을 위하여 정기적으로 환경에서 표본을 제출하여 분석 정보들을 공유하는 것을 관리위원회에서 권장하도록 규정하였음
- 우리나라의 경우, 2011년과 2015년 겨울에 구제역과 조류 인플루엔자의 발병시기가 겹치는 바람에 막대한 피해를 입은 사례가 있음. 2011년을 예로 들면, 살처분 보상금과 소독, 방역비용, 농가생계안정자금 등으로 정부가 재정에서 쓴 돈만 2조 7000억원에 달하는 엄청난 손실을 기록함 (주간경향, 2015)
- 이처럼 구제역 바이러스나 조류 인플루엔자 바이러스와 같은 전파가 빠른 고병원성 병원체들에 있어서는 **동물들에 대한 실시간 감시와 조기 진단의 수반이 나날이 강조되고 있음**. 특히 실시간 모니터링을 통해서, **인접해 있는 경우가 많은 농가들 사이에 공기 중으로 바이러스가 전파되는 것을 막고, 직접적인 증상이 나타나기 전에 전염의 원천적 봉쇄를 하는 것이 중요함**
- 현재 구제역이나 조류 인플루엔자의 진단은 크게 실시간 중합효소 연쇄반응 (qPCR), 효소결합면역흡착검사 (ELISA), 항원 항체 간이진단기기를 이용한 세 가지 방법을 통해 진단하고 있으며, 각각의 질병에 대한 검사는 각각의 질병을 위해 고안된 기기를 사용해야만 분석을 진행할 수 있는 상황임
- 실시간 중합효소 연쇄반응의 경우, 훈련된 인력의 필요성과 공간의 제약, 분석에 걸리는 시간이 오래 걸리기 때문에 병원체들의 빠른 전파에 대응하기 적합하지 않음
- 항체를 이용한 항원 검출용 효소결합면역흡착검사의 경우, 새로운 바이러스의 출현 시에 새로운 항체개발에 많은 시간이 소요됨으로 현장 대응에 있어 어려움이 있음
- 상용화된 간이진단기기들을 살펴보면, 구제역의 경우에는 하나의 기기 내에서 3가지의 혈청형을 동시에 검지할 수 있는 제품이 상용화되어있으나 (메디안디노스톡社), 조류 인플루엔자의 경우에는 여러 아형에 대응하는 간이기기가 부재하는 상황임
- 현재 사용 중인 모든 진단기기들은 새로운 바이러스의 출현 시에 신속하게 검출하고 대응할 수 없다는 치명적인 단점이 존재하므로, **간단한 탐침 변경만으로 빠르고 손쉽게 현장에서 대응 가능한 바이러스 검출시스템이 필요함**
- 특히 국가 재난형 가축질병으로 분류되는 구제역과 조류 인플루엔자에 대한 실시간 감시와 조기 진단을 위해서는, 표준화된 한 가지의 기기만으로 현장에서 추출된 표본들에 대한 분석이 가능한 검출 기기의 개발이 요구됨
- 위와 같은 필요에 의해 현장에서 추출된 표본들을 모아 **구제역과 조류 인플루엔자 바이러스를 감지하고 구별할 수 있으며, 탐침 DNA 서열의 변경만으로 현장대응이 가능한 진단기기를 개발함으로써, 제 1종 가축전염병이 발생할 경우 빠른 대응을 가능케 할 수 있을 뿐 아니라 높은 효율성과 경제적 기술 우위를 갖는 바이러스 검지 기기에 대한 원천 기술을 확보할 수 있을 것으로 판단됨**

### 3) 연구개발 대상의 국내·외 현황

#### 가. 기술현황

- 검출 기술은 크게 항체 검출 기반과 항원 검출 기반 기술로 나눌 수 있는데, 항체 검출 기반 기술은 동물의 혈액을 채취하여 혈청 내 바이러스에 대한 항체의 존재 유무를 판별하는 방식이며, 항원 검출 기반 기술은 조류 인플루엔자는 혈액, 난황 및 분변으로부터, 구제역은 수포액, 수포형성 상피 세포 등의 부위에서 검체를 채취해 바이러스 단백질과 같은 항원을 검출하는 방식임
- 면역크로마토그래피나 신속진단 기기의 경우 육안으로 판별하기 때문에 빠른 검사결과를 얻을 수 있다는 장점을 가졌지만, 검사의 정밀성이 떨어지며 아형까지는 구분하기 어려운 단점이 있음
- 항원-항체반응을 사용하는 효소결합면역흡착검사 (ELISA)를 사용한 제품 또한 혈청형 또는 아형을 구분하기 어려우며, 빛에 노출되지 말아야하는 등 다소 까다로운 취급을 요구함. 또한, 바이러스 단백질 검출 ELISA의 경우 새로운 바이러스 발생 시 새로운 항체 개발에 많은 시간이 드는 단점이 있음
- 정밀한 인플루엔자 검사법으로 알려져 있는 실시간 역전사 종합효소 연쇄반응 (qRT-PCR)을 이용한 제품군의 경우, 훈련된 인력의 필요성, 전문적인 장비와 공간의 필요성 때문에 현장에서의 사용에 많은 제약을 받음. 아형을 구분한다는 점에서 장점을 가진 마이크로어레이 (microarray) 기술의 경우, 시료 전처리와 분석에 드는 시간이 오래 걸리며 현장에서의 사용을 위한 휴대성이 떨어진다는 단점이 존재함. 마지막으로 유체마이크로칩의 경우, 휴대성을 극대화한 PCR칩으로서 아형을 구분할 수 있는 휴대용 진단 기기로 각광받고 있으나, PCR 자체의 느린 반응속도의 특성으로 인해 빠른 검진이 필요한 경우에 적합하지 않음
- 이러한 이유로 조류 인플루엔자바이러스와 구제역 바이러스의 **감염 여부 뿐 아니라, 각 아형을 손쉽게 빠르게 구별해내는 진단 시스템이 있다면, 바이러스의 확산 초기에 조기 대응을 가능하게 함으로써 바이러스로 인한 국가적 재난을 크게 줄일 수 있을 것으로 기대함**

#### 나. 시장현황

- 미국의 동물 의약품 보고서(Animal Pharm Report)에 따르면, 2013년 기준, 세계 동물 보건시장의 78%를 미국(47%)와 유럽(31%)이 차지했으며 미국과 유럽을 제외한 나머지 국가는 22% 수준에 불과함
- 또한, 이 보고서에 따르면 동물 질병 진단키트의 세계 시장 규모는 2007년 기준 2억 8300만 달러(약 3000억 원)이며, 미국의 아이덱스(Idexx)가 62% (1억 7,600만 달러), 헤스카(Heska)가 11% (3,100만 달러), Zoetis를 모기업으로 두고 있는 신바이오틱스(Synbiotics) 6%(1,800만 달러) 등 3개사가 79.5%를 점유하고 있어 사실상 소수의 선도 기업이 독점하고 있는 실정임
- 한국 기업의 국제경쟁력 및 시장점유율은 상대적으로 매우 빈약함
- 한국의 세계 시장 점유율은 0.2% (60만 달러)로 세계 10위권에 안착해 있는 것으로 나타나 있으나, 이는 미국 대비 1/150에 불과하여 매우 적은 수치임
- 농림축산검역본부에서는 동물 질병 관리기술 개발 연구에 막대한 예산을 투입하고 있으나, 여러 기업/대학과의 연구개발 결과가 실제 제품 개발 또는 산업화에 성공하는 비율이

낮음. 성과비중은 평균 0.8% 정도로 다른 부처에 비해 낮은 수준에 머물러 있음 (부처별 국가연구개발 사업 R&D 사업화 성과현황, 2008)

- 따라서 국내의 축산업 현장에 바로 투입이 가능하고 범용성이 높으며, 전문가 없이도 사용될 수 있을 정도로 접근성이 높은 제품의 개발 및 산업화가 우선되어야 함

다. 경쟁기관현황

- 가금발전계획(National Poultry Improvement Plan)을 중심으로 승인받은 제품들이 주로 상용화 되어 있으며, 미국의 아이덱스(IDEXX), 헤스카(Heska), 조에티스(Zoetis) 등의 3개사의 개발 제품들이 세계로 수출되고 있음
- 국내의 바이오노트사는 2014년부터 국내 정부 방역 프로젝트 단일 제품 공급업체로서 선정되어 인플루엔자 진단 기기를 독점 공급해왔음. 동년 11월, 미국의 Alere社로부터 분리되어 독자적인 국내 회사로 스핀오프한 이래로 2018년 초까지 신속진단 기기, 항원 항체 반응을 이용한 ELISA 기기, RT-PCR 기기를 개발하여 상용화하였음
- 메디안디노스틱사는 2018년 농림축산검역본부로부터 항원 간이진단 기기를 정식 품목으로 허가받아 바이오노트의 독점 공급 시장에 합류하여 가격, 품질 경쟁을 가속화시켰음. 주요 품목은 민감도와 특이성을 증가시킨 신속진단 기기와 ELISA 기기이며, 현재는 POCT-PCR 기기 개발 및 신속진단 기기의 반응 시간을 줄이기 위한 연구를 진행 중에 있음
- 현재 상용화된 조류 인플루엔자 검지에 사용되는 제품은 다음과 같음

표 1. 현재 상용화된 조류 인플루엔자 바이러스 검지용 경쟁기관 제품 현황

회사명	제품명	기반 기술 및 특성
메디안디노스틱	VDRG® AIV Ag Rapid Kit 	면역크로마토그래피를 이용한 항원진단법으로 신속하고 간편한 조류 인플루엔자 양성/음성 판정
	VDPro® AIV Ab ELISA 	ELISA를 이용한 항체진단법으로 신속한 진단과 정량분석 가능
	VDx AIV M qRT-PCR 	RT-PCR을 이용해 조류 인플루엔자 바이러스 유무를 고감도로 검사할 수 있으며 타입별 제품을 통해 HA 별 아형 확인 가능
인트론바이오	LiliF™ Avine Influeza virus common Ag rapid test kit	면역크로마토그래피를 이용한 항원진단법으로 신속하고 간편한 조류 인플루엔자

회사명	제품명	기반 기술 및 특성
	 <p>LiliF™ AIV HA (1-16) Multi-tube RT-PCR Kit</p> 	<p>양성/음성 판정</p> <p>qRT-PCR을 이용하여 조류 인플루엔자 바이러스의 비구조단백질을 검출하며 한번의 테스트로 HA 별 아형 확인 가능</p>
바이오노트	<p>Rapid AIV Ab Cat No. RB 2501M</p> 	<p>면역크로마토그래피를 이용한 항원진단법으로 신속하고 간편한 조류 인플루엔자 양성/음성 판정</p>
	<p>AIV Ab ELISA Cat No. EB 4502PO</p> 	<p>ELISA를 이용한 항체진단법으로 신속한 진단과 정량분석 가능 A형 인플루엔자만 진단 가능한 제품</p>
Thermofisher	<p>VetMAX™-Gold AIV Detection Kit</p> 	<p>qRT-PCR을 통해 고특이도, 고감도, 그리고 높은 재현성을 구현한 제품으로 H5, H7, H9 subtype 구분 가능</p>
IDEXX	<p>IDEXX AI Ab Test / RealPCR Influenza A RNA(AI)</p> 	<p>ELISA를 이용하여 하는 항체진단과 RT-PCR을 이용한 분석법 두가지를 제공하며, RT-PCR의 경우 70분 이내에 감염여부를 판단할 수 있음</p>
ZOETIS	<p>ProFLOK® AIV Ab</p> 	<p>항체를 이용한 테스트 키트로써, 민감도가 높고 특정성을 가짐 가금발전계획(National Poultry Improvement Plan) 승인을 받아 전 세계로 수출되는 제품이며 2시간의</p>

회사명	제품명	기반 기술 및 특성
	FLU DETECT®AIV TYPE A  antigen Kit	면역크로마토그래피법을 이용한 신속 진단 키트이며, 15분 내에 결과를 볼 수 있는 장점을 가짐
	FLUDETECT® BE 	ELISA를 이용한 제품으로써 마찬가지로 가급발전계획의 승인을 받은 제품 2시간 정도의 검사시간을 가짐

- 구제역의 경우 선진국에서는 박멸되어 청정국 지위를 얻은 경우가 많고, 이외의 구제역 발생 국가들에서 진단기기에 대한 관심도가 높음. 우리나라는 아직 구제역 청정국이 아니며 또한 주변에 구제역 상재 발생국들이 있어 위험도가 높고, 이로 인해 진단 기술과 제품 개발이 활발하게 이루어지고 있음
- 미국 뉴저지에 본사를 두고 있는 PBM社의 한국지사인 PBM-east와 국립수의과학검역원의 공동개발을 통해 2002년 세계 최초의 구제역 신속간이항원진단 기기를 개발하였음
- 메디안디노스틱은 국립수의과학검역원, 강원도 가축위생시험소, 충남 축산위생연구소 등과 공동으로 2년여에 걸친 기술개발 끝에 2006년, 세계 3번째 구제역바이러스 NSP 항체 검사 ELISA 개발 및 품목허가를 받음. 2018년 4월에 메디안디노스틱은 개발된 기술을 통해 세계최초로 한 번의 시험으로 타액 만을 이용하여 모든 혈청형을 검출 할 수 있는 간이 기기를 상용화에 성공하였음
- 현재 상용화된 구제역 바이러스 검지에 사용되는 제품은 다음과 같음

표 2. 현재 상용화된 구제역 바이러스 검지용 경쟁기관 제품 현황

회사명	제품명	기반 기술
메디안디노스틱	VDRG® FMDV 3Diff/PAN Ag Rapid kit 	면역크로마토그래피를 이용한 항원진단법으로 신속하고 간편한 구제역 양성/음성 판정 A, O, Asia 1 type의 구분이 가능한 제품
	VDPro® FMDV NSP Ab ELISA 	ELISA를 이용해 구제역 비구조단백질에 특이적인 항체를 정성적으로 검출, 혈청형에 무관

회사명	제품명	기반 기술
	VDx FMDV qRT-PCR (3D) 	qRT-PCR을 이용해 구제역 바이러스 유무를 고감도로 검사할 수 있으며 타입별 제품을 통해 혈청형 확인 가능
인트론바이오	LiliF™ FMDV Real-time RT-PCR Kit 	Real-time RT-PCR을 이용하여 높은 민감도와 특이도를 가진 제품으로 구제역 바이러스의 7가지 혈청형 모두에 대해 검출 가능
바이오노트	FMD NSP Ab ELISA Cat No. EB 4801PO 	ELISA를 이용한 항체진단법으로 비구조단백질에 대한 항체를 검출하는 방식, 가축 종에 상관없이 사용 가능
바이오니아	AccuPower® FMDV Real-Time RT-PCR MasterMix Kit 	Real-time RT-PCR을 이용해 높은 민감도와 특이도를 가진 제품으로 구제역 genome의 3D region을 검출하는 방식

- 하지만 현장에서 조류 인플루엔자 바이러스와 구제역 바이러스를 진단할 뿐 아니라, 아형 또는 혈청형을 구분할 수 있는 검지 기기는 전무한 상황임. 축산업 종사자 또는 검역관이 현장에서 간단한 분석을 통하여 여러 동물군에 대한 이종 바이러스와 그 아형을 진단할 수 있다면 조기에 바이러스에 대한 원천적인 대응이 가능해질 것으로 기대함

라. 지식재산권현황

- 인플루엔자 관련 특허 중 검사 및 진단 기술 분야 특허가 17%를 차지하며 발병의 조기 발견이라는 분야의 중요도에 비해 백신 개발 기술 분야 (50%)보다 현저히 관심도가 낮음
- 조류 인플루엔자 검출관련의 국내 특허는 1997년의 5건을 시작으로 전년도인 2017년의 144건까지 꾸준히 증가하고 있으며 그 중 많은 비율의 특허들이 질병관리본부와 농림축산식품부를 포함한 정부 주도에 이루어지고 있는 것을 알 수 있음
- 조류 인플루엔자의 주요 진단방법인 rapid kit, qPCR, microarray에 관한 주요 특허를 표 3에 나타내었음

표 3. 조류 인플루엔자 바이러스 진단 방법에 대한 주요 특허 현황

	기술명(또는 특허명)	출원국/출원번호	지식재산권출원인
1	신속 면역크로마토그래피법에 의한 H9형 조류 인플루엔자 바이러스 진단 기기 및 이를 이용하여 H9형 조류 인플루엔자를 진단하는 방법	KR/10-2010-00 87163	주식회사 바이오노트 대한민국(농림축산식품부 농림축산검역본부장)
2	조류 인플루엔자 바이러스 감염진단용 형광면역진단기기	KR/10-2014-01 11745	원광대학교산학협력단
3	Colloidal gold immune chromatography fast differential diagnosis kit of chicken avian influenza vaccine immunity and virus strain infection and application	CN/2007100514 42	Huazhong Agricultural University
4	Rapid diagnosis method specific to avian influenza virus	US/12439432	Takahashi Kazuo Okuno Yoshinobu Nishimura Hiroshi Imoarai Takeshi Saito Noriyuki Taniguchi Tomokuni
5	A-type H5N6 subtype avian influenza virus dual-channel real-time fluorescence PCR (polymerase chain reaction) detection kit and detection method	CN/2015108595 61	Changsha Center for Disease Control and Prevention
6	H4 avian influenza virus rRT-PCR detection primer and probe detection kit, and detection method	CN/2015104022 45.1	Beijing Zhongtuolian Technology Development Co. Ltd.
7	Kit for detecting multiple influenza viruses by polymerase chain reaction (PCR) microarray	CN/2010102295 12	Da An Gene Co., Ltd. of Sun Yat-Sen University

○ 구제역 진단 관련 대표적 특허를 표 4에 정리하여 보여줌

표 4. 구제역 바이러스 진단 방법에 대한 주요 특허 현황

	기술명(또는 특허명)	출원국/출원번호	지식재산권출원인
1	구제역 바이러스의 감염여부를 진단하는 방법 및 이를 구현하기 위한 진단기기	KR/102003002 6809	대한민국(농림축산식품부 농림축산검역본부장) 프린스턴바이오메디테크코 포레이션 (주)피비엠이스트
2	구제역 바이러스 3A B 비구조단백질과 이에 특이적으로 반응하는 단일클론 항체 및 이들의 조합을 이용한 구제역바이러스의 비구조단백질 항체 검사 또는 구제역의 진단방법	KR/102005010 3057	주식회사 메디안디노스틱 강원도 대한민국(농림축산식품부 농림축산검역본부장)
3	구제역 O형, A형, A s i a 1형 바이러스 진단용 프라이머 및 이를 이용한 멀티플렉스 R T - P C R 방법	KR/102011007 6694	대한민국(농림축산식품부 농림축산검역본부장)
4	Foot and mouth disease viruses O, A and Asia I type ternary real time fluorescent quantitative RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) detection kit	CN/201510477 153	Henan Center for Animal Disease Control & Prevention

	기술명(또는 특허명)	출원국/출원번호	지식재산권출원인
5	Method and devices for rapid diagnosis of foot-and-mouth disease	US/10833933	Kang Je-Mo Shin Nam-Kyu Cho In-Soo Hyun Bang-Hun Lee Kwang-Nyeong Oem Jae-Ku Kye Soo-Jeong Ko Young-Joon Ku Bok-Kyung An Soo-Hwan Kim In-Joong Kim Ok-Kyung Kim Hee-Jong Jang Ki-Yong Hwang Suh-Ha Kim Chang-Ho Ko Song-Woo Joo Yi-Seok
6	Multi-species universal ELISA kit for differential diagnosis of foot and mouth disease virus infection	CN/201510680 061	Northeast Agricultural University

마. 표준화현황

- 현재 인플루엔자의 진단에 있어 세계보건기구 (WHO)의 표준 검출법에 근거하여 유정란이나 세포배양을 통해 얻은 바이러스 배양액을 통하여 바이러스를 검출 및 진단하는 것을 실험 표준으로 함
- 미국의 경우 qRT-PCR, Microarray, 항원-항체반응 등의 검사는 질병관리통제국 (CDC)에 승인된 기술이며 각각의 방법의 검사 과정은 CDC가 정한 진단법의 절차를 따름
- 국내의 질병관리본부 메뉴얼은 증상발현 14일 이후의 수치변화에 따라 양성을 판정하는 것이므로 **발병 이후 초기 대응에 있어 늦어질 수 있는 우려가 존재함**. 따라서 더욱 신속하며 다양한 아형 바이러스에도 대응 가능한 검진 방법을 토대로 한 표준화가 필요함
- 구제역 바이러스의 경우 농림축산검역본부에서 표준진단요령을 제공하며 end-point RT-PCR, qRT-PCR을 통한 유전자검사, 항원 ELISA 진단법, 항원 간이진단법, 항체 ELISA 진단법 (SP, NSP-ELISA), 액상차단효소면역법 (LPB-ELISA), 구제역 바이러스 중화시험을 표준으로 제시하고 있음
- 아래 표 5는 각 구제역 진단법의 표준이 되는 제품 및 회사를 보여줌

표 5. 동물질병표준 진단요령 (농림축산검역본부)

구제역 진단법	제품명	회사명
End point RT-PCR	MDV(type-U) Detection kit	Intron
qRT-PCR	FMDV typing real-time RT-PCR premix	엔지노믹스
qRT-PCR	FMDV real-time RT-PCR premix	바이오니아
구제역 항원 간이진단법	ioSign FMDV Ag	피비엠이스트
구제역 O형 SP 항체진단법	PrioCHECK FMDV type O ELISA	스위스 Prionics
구제역 NSP 항체진단법	VDPro FMDV NSP Ab ELISA	메디안디노스틱
구제역 NSP 항체진단법	NSP Ab ELISA kit	바이오노트
구제역 항체 간이진단법	BioSign FMDV Ab	피비엠이스트

○ 정리: 기존 바이러스 진단 기술의 종류 및 장·단점

기존 진단 기술	기존 기술의 장·단점	
면역 크로마토그래피 (신속 항원 진단법)	장점	면역크로마토그래피는 짧은 시간에 인플루엔자의 감염여부를 확인할 수 있고 타 기술에 비해 비교적 가격이 저렴한 장점이 있어 실제 임상에서 유용한 경우가 많음
	단점	바이러스 배양 (viral culture) 방법이나 실시간 중합효소 연쇄반응 (qPCR) 법에 비해 <b>정확도나 민감도가 떨어지며, 아형이나 혈청형 구분에 있어서 제한적임</b>
효소결합면역 흡착검사 (ELISA)	장점	특정한 항체만 고정시키면 결과의 민감도가 증가하기 때문에 제어가 쉬우며, 높은 감도와 정확성을 가짐
	단점	보통 항체에 형광물질과 같은 표지물질을 결합시키는데, 상기 항체에 결합된 형광물질에서 방출되는 형광의 세기가 한계가 있어, <b>항원의 농도가 낮은 경우에는 기저값과 비교하여 형광세기의 변화를 측정하기가 어려움</b>
실시간 중합효소 연쇄반응 (qPCR)	장점	특이적이고 다량의 검체에 있어서 정확히 진단할 수 있음. 특히 qPCR 결과는 우리나라의 경우, 농가의 살처분 등을 결정하는 자료로 활용되기 때문에 정확도가 무엇보다 중요한 진단 기술임
	단점	<b>검사과정이 복잡하고 검사 소요시간이 길어 진단이 늦어지는 단점이 있음.</b> 또한 제조업체에 따라 민감도 차이가 1000배 이상에 달하는 기술 수준에 따른 성능차가 <b>확연한 문제가 존재함</b>

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### 1) 연구개발의 최종목표

가. 최종목표: 구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스를 조기에 빠르고 정확하게 검지할 뿐만 아니라 각각의 혈청형 또는 아형을 구별할 수 있는 종이 기반 lateral flow sheet 바이러스 검지기 개발

#### 나. 세부목표

- 구제역과 조류독감 바이러스 감염 여부 및 아종 바이러스 구별을 위한 종이 기반 lateral flow sheet 검출기기 개발
- 바이러스 추출 핵산과 결합할 수 있는 형광 분자 표지 (fluorescence molecular beacon)의 개발 및 이를 기반으로 한 바이러스 검지 기술 개발
- 구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스의 유전체 염기서열 분석을 통한 바이러스 검지용 탐침 (probe) 분자 설계 / 바이러스의 혈청형 또는 아형을 구별할 수 있는 탐침 분자 설계
- 통신/GPS 모듈이 추가된 바이러스 검지용 소형 형광 검출 장비 개발

### 구제역 바이러스 / 조류 인플루엔자 바이러스 동시 검출을 위한 신속 진단 키트 개발

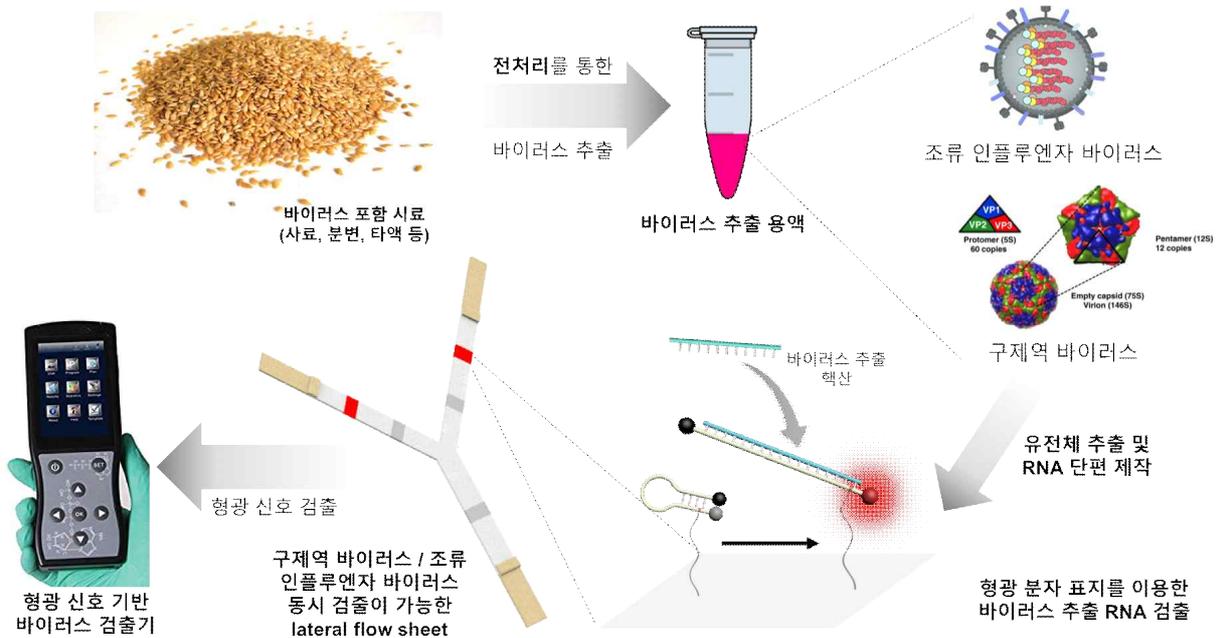


그림 3. 본 과제에서 개발하고자 하는 진단 키트의 모식도

## 2) 연구개발과제의 연차별 연구수행 계획

### <1차년도>

#### ○ 연구개발 목표:

(가) 제 1 세부 연구기관 (성균관대학교 기계공학부) :

- 종이 기반 미세유체 소자의 설계 및 이차원 lateral flow sheet의 유동 조건 분석
- 형광 나노재료 및 핵산 용액의 물성 파악 연구 및 종이 기반 기기와 시료간의 상호작용 연구
- 상용 전처리 추출기술을 활용한 물리적 전처리 방법 연구

(나) 제 2 세부 연구기관 (성균관대학교 신소재공학부) :

- 형광 기반의 검지 시스템 개발을 위한 형광 나노재료 및 소광재료 설계 및 합성
- 핵산 서열에의 고분자 도입 및 이를 이용한 종이에의 기능화

(다) 제 1 협동 연구기관 (숙명여자대학교 화공생명공학과) :

- 구제역바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스의 염기서열 분석 및 이를 바탕으로 한 바이러스 검지용 핵산 탐침 (Probe) 서열 설계
- 구제역 바이러스 및 조류 인플루엔자 바이러스 각각의 혈청형과 아형을 구분할 수 있는 핵산 탐침 염기서열 설계

(라) 제 2 협동 연구기관 (팜스웰메디컬) :

- 종이기반 Lateral Flow kit에의 검지기기 형광 검출 알고리즘 설계
- 설계단계 초기부터 의료기기 등록을 위한 절차 관련 사항을 적용한 체계도 작성 및 설계
- 소형 형광 검지기기 설계를 위한 소자 선정 및 검출 모듈 성능 테스트

#### ○ 개발 내용 및 범위

(가) 제1 세부 연구기관 (성균관대학교 기계공학부)

#### ■ 종이 기반 미세유체 소자의 설계 및 이차원 lateral flow sheet의 유동 조건 분석

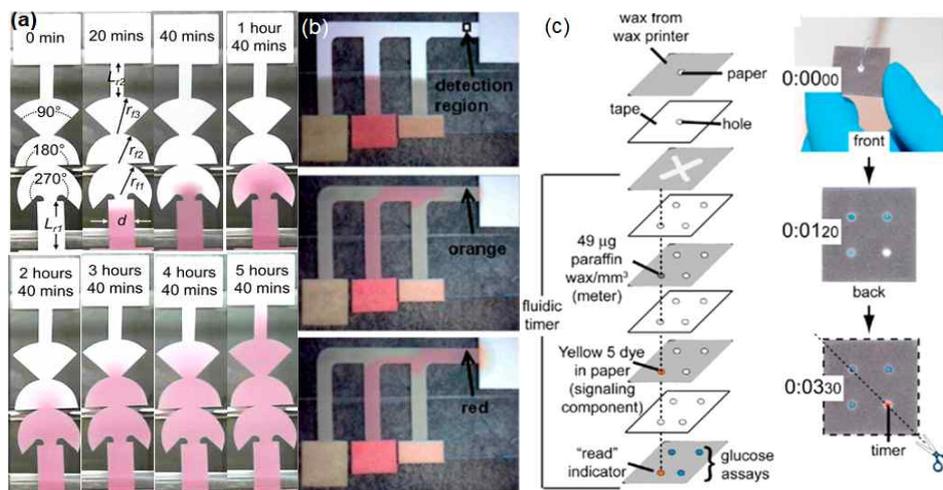


그림 4. 이차원 종이 sheet에서의 유동현상 예시 (a) 각도가 다른 부채꼴 형상을 연속적으로 붙인 형태의 종이에서의 유동, (b) 2차원 구조를 가지고 있는 종이에서의 유동, (c) 3차원 채널을 이용한 전개액 유동 제어

- 종이 기반의 기기로 소형화 및 대량 생산이 가능하며 또한 일회용으로 사용할 수 있는 검지 시스템을 설계함
- 종이는 다양한 재질을 사용할 예정이며 특히, 연구실 및 현장사용에 문제가 없는 것으

- 로 검증이 되어 있는 재료 중 생화학적 안정성이 높은 재료를 선택하여 사용할 예정임
- 다양한 다공성 종이 매질과 젖음성, 공극의 크기 등의 물성을 제어하여 본 연구에서 목표하는 바이러스 추출 핵산 검지에 가장 적합한 재료를 제작 및 선정하고 검지 소자와 결합할 수 있는 방법의 연구를 수행함
- 1차원 뿐 아니라 2차원(평면) 혹은 3차원(블록) 형태의 검지 시스템을 연구하고 최적의 유동 속도 및 반응 시간을 가질 수 있는 기기를 설계함

■ 형광 나노재료 및 핵산 용액의 물성 파악 및 종이 기반 기기와 시료간의 상호작용 연구

- 형광 나노재료 및 핵산 용액과 종이의 물리적 특성 및 종이기반 기기와 시료 용액간의 젖음성, 전개 용액의 유변학적 특성 분석을 통한 기기와 시료간의 상호작용 연구
- 전개용액은 핵산, 나노재료 등 포함 물질의 농도에 따라 다양한 점도와 유변학적 특성을 갖고 이는 종이 기반 기기 내 유동에 큰 영향을 미침
- 유변학적 특성은 전처리 정도에 따른 유변물성인 점도, shear thinning/ thickening, 유체 탄성 특성을 rheometer를 사용하여 측정하고 그에 따른 유동 조건 및 전개액의 성질을 최적화함

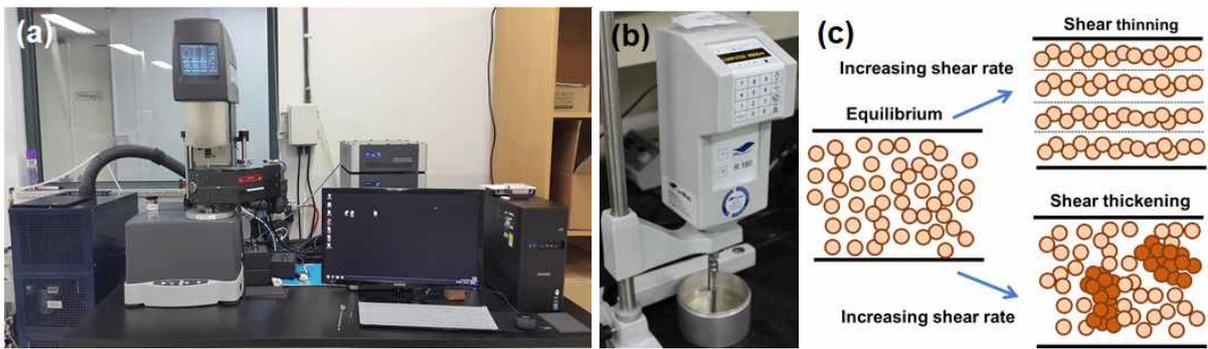


그림 5. (a) Rheometer와 (b) viscometer 사진, (c) shear thinning/thickening 현상의 개략도

- 다양한 종류의 종이기반 기기와 시료 용액 간의 젖음성을 파악하는 실험을 통해 다공성 매질 내 유동에 큰 영향을 줄 수 있는 물성인 시료 용액의 친수, 소수성 및 계면 장력 조건을 최적화함
- 또한, 종이의 공극률, 공극의 크기 그리고 투과성 등의 물성을 측정하여 바이러스 검지를 위한 종이 기반 기기에 최적화된 재료를 선정함

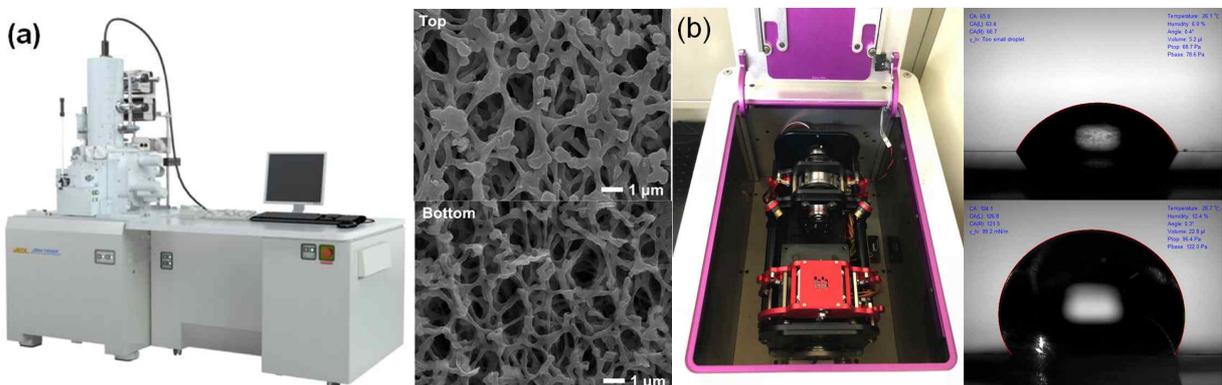


그림 6. (a) 주사전자 현미경 및 종이 공극 이미지, (b) droplet analyzer 및 실험 이미지 예시

■ 상용 전처리 추출기술을 활용한 물리적 전처리 방법 연구

- 바이러스 입자가 포함된 분석 대상 시료의 경우, 대부분 세포 유래 지방, 단백질, 탄화수소 뿐 아니라 동물의 체액, 혈액, 다양한 입자들이 혼재되어 있을 가능성이 높아 바이러스 감지를 위해 바이러스 유전체 분리시 언급된 불순물을 제거하는 전처리 과정이 필요함
- 바이러스 핵산을 추출하기 위해 구제역 바이러스와 조류독감 바이러스가 존재할 수 있는 대상 시료를 파쇄기를 이용하여 전처리할 수 있으며 이는 상용화 되어 있는 기기를 활용할 예정임



그림 7. 현재 상용화되어있는 파쇄기 예시

- 연구에서 사용되는 시료의 추출 효율을 향상시키고 이러한 추출시료를 종이기반 기기에 최적화시키기 위해 다양한 시료에서의 바이러스 추출 효율을 분석함
- 화학적 전처리 방법 연구를 수행할 제 2 세부 (성균관대학교 신소재공학부)와의 협력을 통해 다각적인 최적화 전처리 기술을 확립할 예정임

(나) 제 2 세부 연구기관 (성균관대학교 신소재공학부)

■ 형광 기반 on-off type 검지 시스템을 개발을 위한 형광 및 소광 나노재료 설계 및 합성

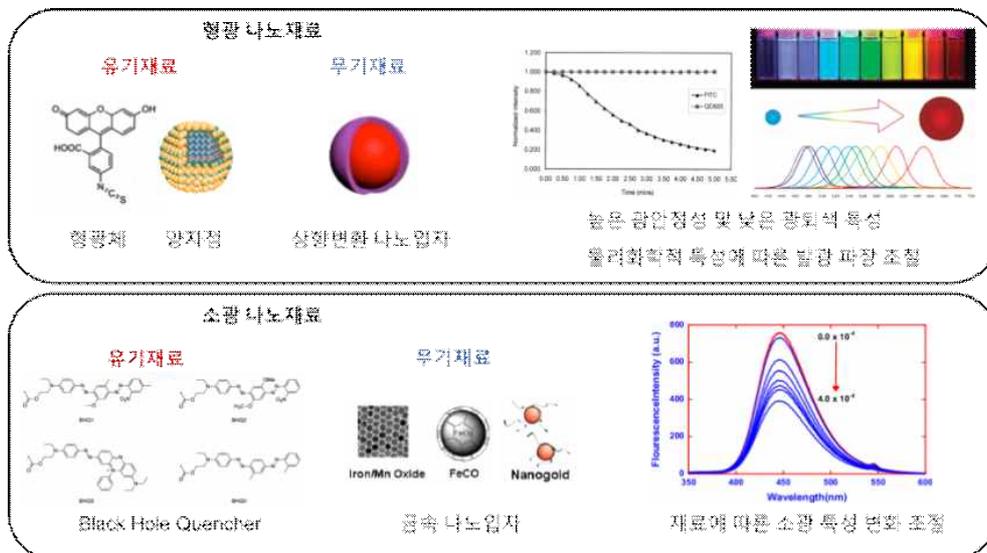


그림 8. 센서에 사용되는 형광 나노재료 및 소광재료의 종류와 선별 과정에서 고려해야하는 물리 / 화학적 지표 특성

- 광학 특성 제어가 가능한 형광 나노재료 및 소광재료 (quencher)를 선정하고, 바이러스 검지 환경에서 재료들의 광학 효율을 극대화할 수 있는 화학적 개선 연구 진행
- 두 재료간 거리에 따른 형광 효율 연구 및 센서 신뢰도 극대화를 위한 최적의 상호작용 거리를 유추함으로써, 바이러스 검지 조건을 고려한 형광 나노재료 / 소광재료 조합을 결정할 예정임

■ 핵산 서열에의 고분자 도입 및 이를 이용한 종이에의 기능화

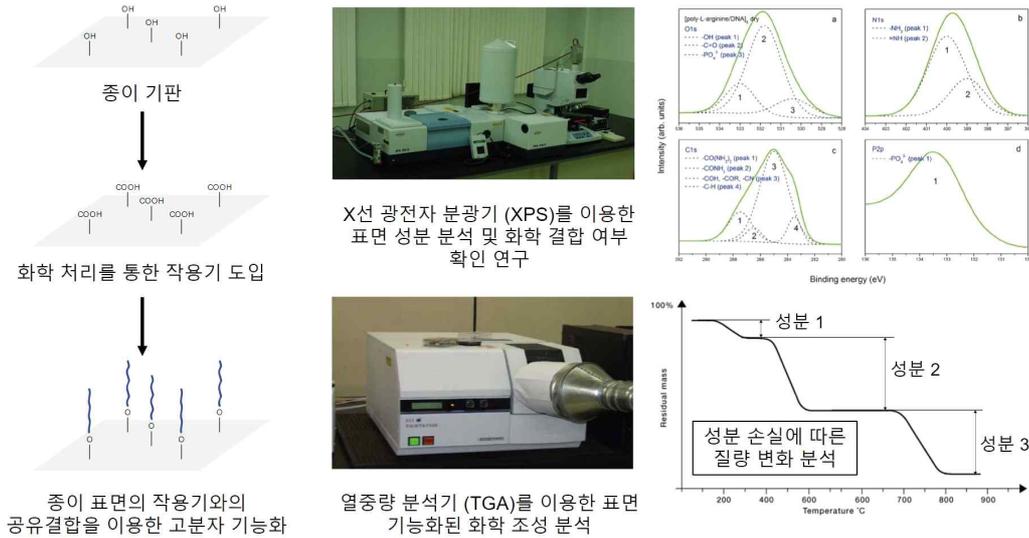


그림 9. 종이 표면의 화학적 처리를 통한 고분자 기능화 연구. 바이러스 검지부를 종이 소자에 도입하기 위한 고정부로서의 고분자 물질을 기능화하고 이를 평가하는 연구를 수행함

- 바이러스 센서 분자를 종이에 도입하기 위한 고분자 물질 선정 및 종이에의 균일한 기능화 연구를 통한 센서 구동 가능성 확인 연구 수행
- 핵산의 backbone에 특정 작용기 또는 고분자를 기능화하는 연구를 수행함으로써 2차년도에 개발될 형광 분자 표지를 종이 표면에 효과적으로 고정할 수 있는 방안 확보
- 종이에 기능화된 핵산 - 고분자 복합체의 결합 밀도 조절 및 화학 처리 조건 최적화 연구를 진행하여 안정적으로 핵산을 기능화하는 연구 수행

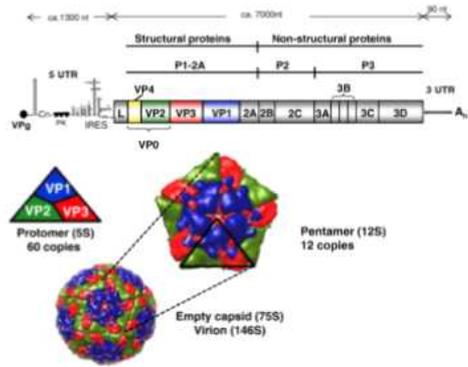
■ 바이러스 RNA 유전체 추출을 위한 화학적 전처리 방법 연구

- 바이러스가 포함된 용액이나 시료에서 RNA 유전체를 추출하는 화학 처리 기반 바이러스 전처리 방법을 연구하여 기존 상용화된 전처리법을 보완할 수 있는 방법을 연구
- 상용화 제품의 반응 기작 및 원리를 조사하고 이를 활용하여 바이러스가 포함되어 있는 검체에서 높은 효율로 바이러스만을 추출할 수 있는 방법을 도입할 예정임
- 검체의 종류에 따라 처리 방법 및 조건을 세분화하여 전처리 효율을 극대화할 수 있는 방안 연구
- 물리적 전처리법 연구를 수행할 제 1 세부 (성균관대학교 기계공학부)와의 협력을 통한 전처리 기술 최적화

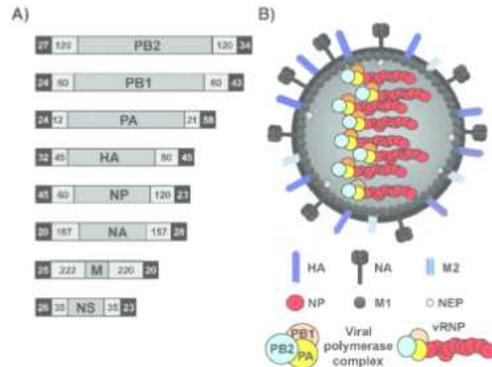
(다) 제 1 협동 연구기관 (숙명여자대학교 화공생명공학과)

■ 구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스를 구별할 수 있는 핵산 기반 탐침 (Probe) 염기서열 설계

구제역 바이러스의 형태 및 유전체 구조



조류 인플루엔자 바이러스의 형태 및 유전체 구조



조류 인플루엔자 바이러스와 구제역 바이러스의 표면 단백질 발현 유전자 염기서열 비교 연구

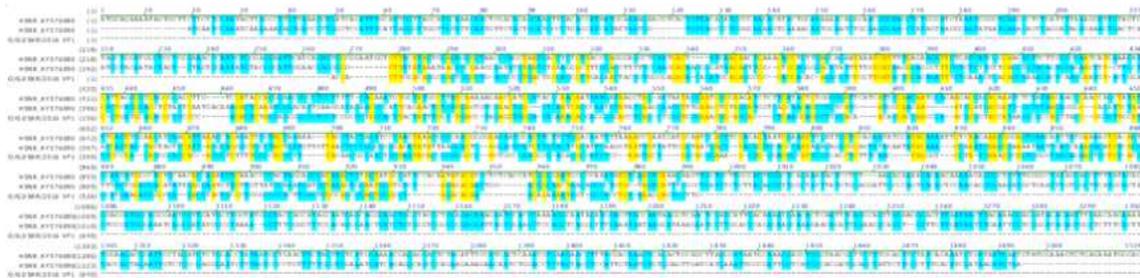


그림 10. 구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스의 형태 및 유전체 구조 비교와 표면 단백질 발현 유전자의 염기서열 비교. 고병원성 바이러스의 유전체 염기서열 분석 및 비교로부터 구제역바이러스와 조류인플루엔자 바이러스를 구분하거나, 각 바이러스의 혈청형 또는 아형을 구분할 수 있게 하는 DNA 탐침 (probe) 분자 설계가 가능함

- 7종의 주요 구제역 바이러스 혈청형 (serotype) (O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3, Asia1) 과 4종의 주요 조류 인플루엔자 바이러스 아형 (subtype) (H5N1, H5N6, H5N8, H7N9)의 HA, NA 유전자 서열 분석 및 전 염기서열 분석을 바탕으로 한 종간·혈청형 (또는 아형)간 비교 연구 수행
- 구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스 유전자는 염기 서열간 유사점이 거의 없기 때문에 (그림 10), 각 바이러스에 특이적인 탐침을 사용할 경우 구분이 매우 용이할 것으로 판단됨. 따라서 구제역의 혈청형을 구분하는 탐침 분자와 조류 인플루엔자 바이러스의 아형을 구분하는 탐침 분자는 서로간의 교차반응성 (Cross-reactivity) 없이 바이러스를 구분하는 데 이용할 수 있을 것으로 기대함.
- 하지만 혈청형 또는 아형 특이적인 탐침을 사용하여 바이러스 유무를 알고자 한다면 해당 바이러스 별 모든 혈청형 또는 아형에 대한 탐침을 적용해야하는 문제가 있음. 따라서 혈청형 종류에 관계없이 모든 구제역 바이러스를 검지할 수 있는 공통 유전체 부분이 존재한다면 (그림 11의 파란색 박스 부분 참조) 이에 선택적인 탐침을 설계·적용함으로써 구제역 바이러스의 유무를 빠르게 판별할 수 있을 것으로 기대됨
- Vector NTI 등의 프로그램을 활용하여 염기서열 기반 핵산 올리고의 결합 및 이차구조를 예측하고, 탐침 분자의 길이 및 hybridization 온도 등 최적화 조건을 실험에 반영할 예정임

■ 구제역 바이러스 및 조류 인플루엔자 바이러스 각각의 혈청형과 아형을 구분할 수 있는 핵산 탐침 염기서열 설계

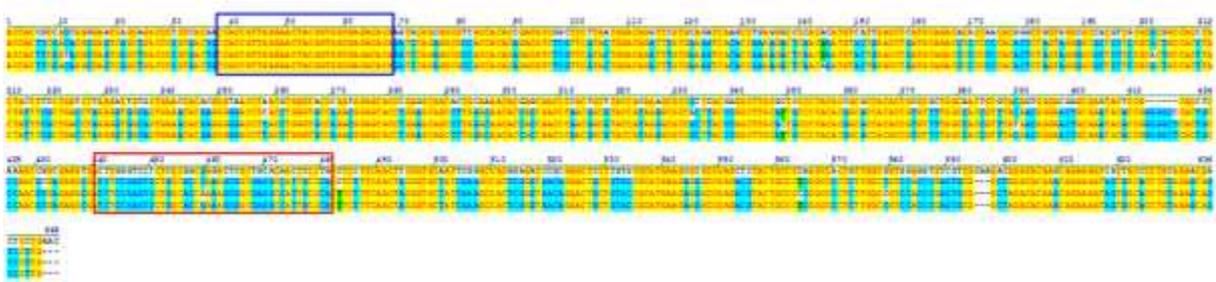


그림 11. 최근 5년간 한국에서 분리된 구제역바이러스들의 VP1을 암호화하는 유전자 염기서열. 위에서부터 A/YC/SKR/2017, O/GJ/SKR/2016, O/GC/SKR/2016, O/SKR/JC/2014 strain의 VP1 유전자 서열을 나타냄. Strain의 이름에서 알 수 있듯이 첫번째 서열만 A형 바이러스의 것이고 나머지는 O형의 것임. 혈청형 간 VP1 유전자 서열이 일치하는 부분은 노란색으로, 일치하지 않은 부분은 파란색 또는 녹색으로 표시함. 염기서열이 연속적으로 일치하는 노란색 부분은 파란색 박스로 표시하였고 혈청형 상 차이가 많은 부분은 빨간색 박스로 나타내었음

- 구제역 바이러스 캡시드 단백질의 하나인 VP1을 암호화하는 유전자 염기서열을 최근 5년간 한국에서 분리된 구제역 바이러스들에서 비교한 결과, 구제역 바이러스 유전자 간의 유사점과 차이점이 동시에 존재하는 것을 확인하였음 (위 그림의 파란색 박스 부분과 빨간색 박스로 나타낸 부분 참조).
- 바이러스 내에 존재하는 공통 염기서열을 검출대상으로 활용한다면, 하나의 탐침 분자로부터 구제역 바이러스를 혈청형에 상관없이 검지할 수 있을 것으로 판단됨. 또한, 추가 염기서열 분석을 통해 좀 더 다양한 공통 염기서열 정보를 확보함으로써 보다 정확도 높은 구제역 바이러스 존재여부 판정을 위해 활용할 예정임
- 각 구제역 바이러스 혈청형이 가지는 고유 염기서열 또는 그 일부를 탐침 분자의 타겟으로 고려한다면, 구제역 바이러스의 혈청형을 빠르게 판별할 수 있는 기술로 활용할 수 있으며, 본 기술을 통해 구제역 바이러스의 존재 여부 확인과 혈청형 구분을 빠르게 수행할 수 있을 것으로 기대됨

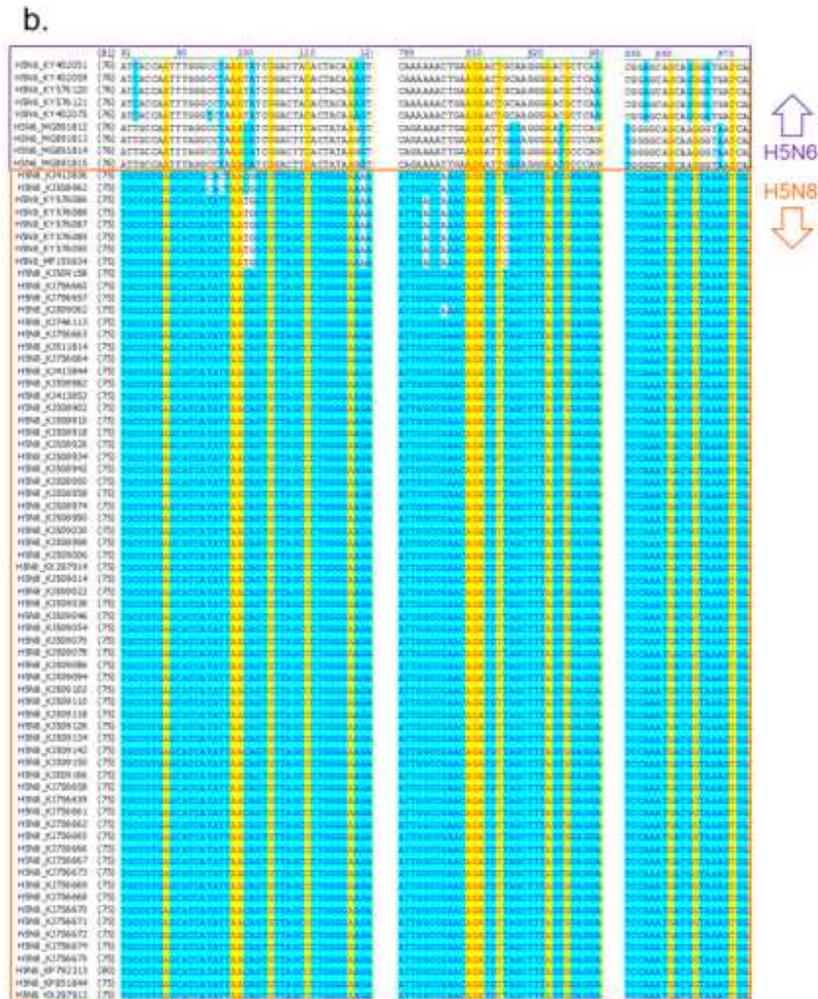


그림 12. 최근 5년간 한국에서 분리되었던 77종의 조류 인플루엔자 바이러스 NA 유전자 염기서열을 비교한 결과. 처음 9개 염기서열은 H5N6 아형의 경우이고 나머지는 H5N8 아형의 염기서열임. 염기서열이 일치하는 경우 노란색, 이보다 약간 덜 일치하는 경우는 파란색, 나머지는 무색으로 표시하였음

- 조류 인플루엔자 바이러스 또한 염기서열의 유사점과 차이점이 극명히 존재하기 때문에, 위에 언급한 분석 기술을 통하여 조류 인플루엔자 바이러스 존재 여부 확인 및 아형 판별이 가능한 탐침 분자의 정보를 유추해낼 수 있음
- 또한, 조류 인플루엔자 바이러스의 경우 유전체 shuffling으로 인해 변이 속도가 빠르기 때문에, 관련 유전체 정보들에 대해 새로운 탐침 설계 및 시스템 적용을 시도할 예정임

(라) 제 2 협동 연구기관 (팜스웰메디컬)

■ 종이기반 Lateral Flow kit에의 검지기 형광 검출 알고리즘 설계

- 1차년도 제1, 2 세부, 제 1 협동 기관의 추진내용을 기반으로 형광 검출에 방식에 대한 소프트웨어 알고리즘을 설계
- 팜스웰메디컬이 기 개발한 형광 검출기의 특징 및 특허 등을 기반으로 검출 알고리즘을 설계에 적용하여 개발함. 주요 제조사 중 시장 지배력이 높은 제조사의 제품을 선정하여 비교 검토함

표 6. 상용화된 형광 검출기의 현황

	제조사	제품명	Detection Technology
	Becton Dickinson & co. Ltd	BD Veritor Plus System	REF
	Detekt Biomedical LLC	RSD-2500	REF/FLU
	Oasis Diagnostics	VerOFy & LIAM	REF/FLU
	Qiagen Lake Constance GmbH	ESEQuont LFR	REF/FLU

\* reflectance(REF), fluorescence(FLU)

- 설계단계 초기부터 의료기기 등록을 위한 절차 관련 사항을 적요한 체계도 작성 및 설계
  - 의료 장비 등록에 따른 장비 관련내용을 검토하고 장비 설계 시 체계적인 시스템을 구축함. 특히 검지기기의 검교정 관련 프로토콜 및 시스템 검증 (Verification) 및 유효성 확인 (Validation) 작업을 수행할 수 있도록 구체적인 실행 프로토콜을 설계에 반영하여 상용화 과정에서 구체적으로 보완할 수 있도록 기초 설계안을 작성함
    - 1) time-triggered cooperative (TTC) scheduler 알고리즘
    - 2) System Verification 알고리즘
    - 3) Detection Validation 알고리즘
    - 4) Detection Process 알고리즘
    - 5) 결과값 처리 알고리즘
  
- 소형 형광 검지기기 설계를 위한 소자 선정 및 검출 모듈 성능 테스트
  - 검지기기의 핵심인 형광 검지 모듈에 적용함에 있어서 협동기관의 형광 나노재료 및 소광 재료의 특성을 고려하여 검출 방식 및 소자를 선정함
  - 나노재료 및 소광 재료를 고려해서 선정할 중요 부분은 아래와 같음
    - 1) 광원 (LED, 할로겐, Laser등)
    - 2) 렌즈
    - 3) Filter
    - 4) Detection 방식 (CCD, Photodiode, PMT, MPPC)

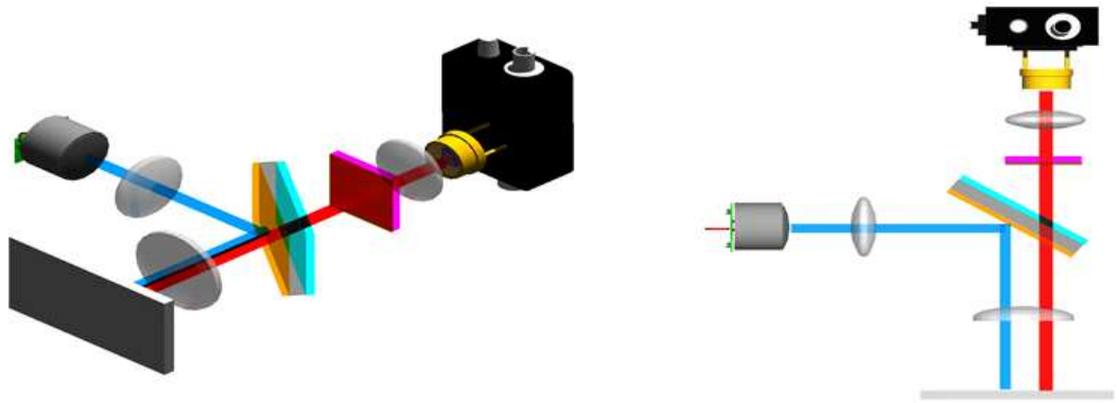


그림 13. 소형 형광 검지기기의 구동 원리

- 특히 광원의 경우 제품의 가격, 서비스, 내구성을 고려하여 특정파장의 고휘도 LED를 적용하여 제품화할 예정임. 일차년도에는 다른 광원과의 비교 실험을 통해 소재를 선정하고자 함
- 검출방식을 고려하여 2가지 정도의 소자를 선정하여 특성 및 검출 한계 등을 test하여 2차년도 검출 모듈 설계 및 제작에 적용함

### <2차년도>

#### ○ 연구개발 목표:

(가) 제 1 세부 연구기관 (성균관대학교 기계공학부) :

- 실험실에서 종이기반 기기를 평가할 수 있는 실시간 모니터링 시스템 개발
- 구제역과 조류독감 바이러스 검지 lateral flow sheet의 원천 기술 확보 및 발광에 따른 검지 메커니즘 연구

(나) 제 2 세부 연구기관 (성균관대학교 신소재공학부) :

- 바이러스 추출 핵산의 특정 염기서열과 결합할 수 있는 핵산을 이용한 형광 분자 표지 (fluorescence molecular beacon) 개발
- 구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스 혈청형 또는 아형 구별을 위한 형광 기반의 다중 검지 시스템 개발

(다) 제 1 협동 연구기관 (숙명여자대학교 화공생명공학과) :

- 역유전학 (Reverse genetics) 기법을 이용한 복제 능력이 제거된 모델 바이러스 생산
- 모델 바이러스 RNA 유전체 추출 및 검체 안정성 극대화 연구

(라) 제 2 협동 연구기관 (팜스웰메디컬) :

- 소형 형광 검출 모듈 설계 및 제작
- 종이 기반 키트 적용한 연동 테스트 및 성능 평가

#### ○ 개발 내용 및 범위

(가) 제 1 세부 연구기관 (성균관대학교 기계공학부)

##### ■ 실험실에서 종이기반 기기를 평가할 수 있는 실시간 모니터링 시스템 개발

- 종이 기반 기기에서 핵산 전개액의 유동 및 형광 민감도를 최적화하기 위한 실시간 모니터링 시스템 개발
- 유동 평가는 기본적으로 현미경과 카메라를 이용하여 진행하지만 추출된 용액의 유체 역학적 특성, 종이 기기의 크기, 검지시 주변 환경 등을 고려하여 적절한 모니터링 시

시스템을 구축

- 추출된 바이러스 핵산 용액을 종이 내 전개액으로 사용함으로써 핵산 전개액의 속도 등이 온도에 민감하게 변화할 수 있기 때문에 온도 변화에 따른 유동을 평가
- 구제역과 조류 인플루엔자 바이러스로부터 각각 추출한 핵산과 형광 분자가 표지된 핵산에 대한 정보를 세부 연구기관에서 받아 상보결합에 의한 발광 반응성 평가
- 우선적으로 면밀한 정량적인 분석을 위하여 본 실험을 현미경을 활용하여 연구를 수행 후, 제 2 협동 기관(팜스웰메디컬)에서 개발하는 휴대형기기 개발을 위하여 팜스웰메디컬에 정량지표 제공

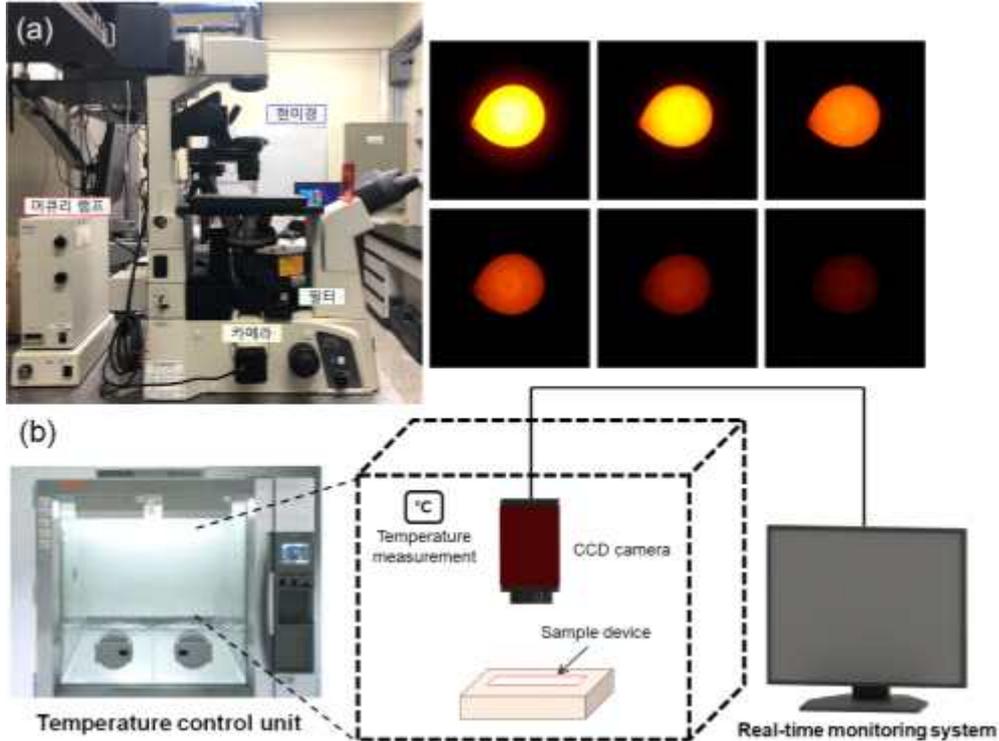


그림 14. (a) 형광 관찰용 현미경 set-up 및 형광 측정 예시, (b) 고성능 항온 챔버와 실시간 유동 평가를 위한 모니터링 시스템

■ 구제역과 조류독감 바이러스 검지 lateral flow sheet의 원천 기술 확보 및 발광에 따른 검지 메커니즘 연구

- 2차년도에는 종이 기반 조류독감, 구제역 바이러스 감염 검지기 원천 기술 확보, 3차년도에 조류독감, 구제역 바이러스 감염 검지 및 아종 바이러스 구별을 위한 종이 기반 기기 개발 연구
- 2차년에는 1차원 lateral flow sheet에서 실제 발현 확인 및 그 민감도의 최적화를 우선으로 연구하고 유량은 검지할 바이러스의 양이나 핵산의 상보 결합수, 형광 분자표지량 등을 고려하여 채널의 너비 및 크기를 조절하여 제어
- 종이기반 바이러스 감염 진단기기는 시료패드 (sample pad), 니트로셀룰로오스 막, 흡수패드 (absorbent pad) 등 3 개의 막으로 구성됨. 니트로셀룰로오스 막에는 바이러스 감염 검지를 위한 결합지역 (capture region), 기기가 제대로 작동했는지를 확인할 수 있는 관리지역 (control region)이 포함됨
- 아래 그림과 같이 바이러스에서 추출된 핵산을 포함한 전개액이 종이 기반 기기 sample pad에 떨어지면 채널을 따라 흐르다가 형광 나노재료가 표지된 핵산이 코팅된

결합지역 (capture region)에서 상보 결합되고 형광 나노재료가 발광하게 되면서 바이러스가 검지됨. 하지만 바이러스 추출 핵산을 포함하지 않고 있다면 결합지역에서는 소광분자 표지에 의해 발광이 일어나지 않고 관리지역에서만 발광이 일어남

바이러스에 감염되지 않았을 때

바이러스에 감염되었을 때

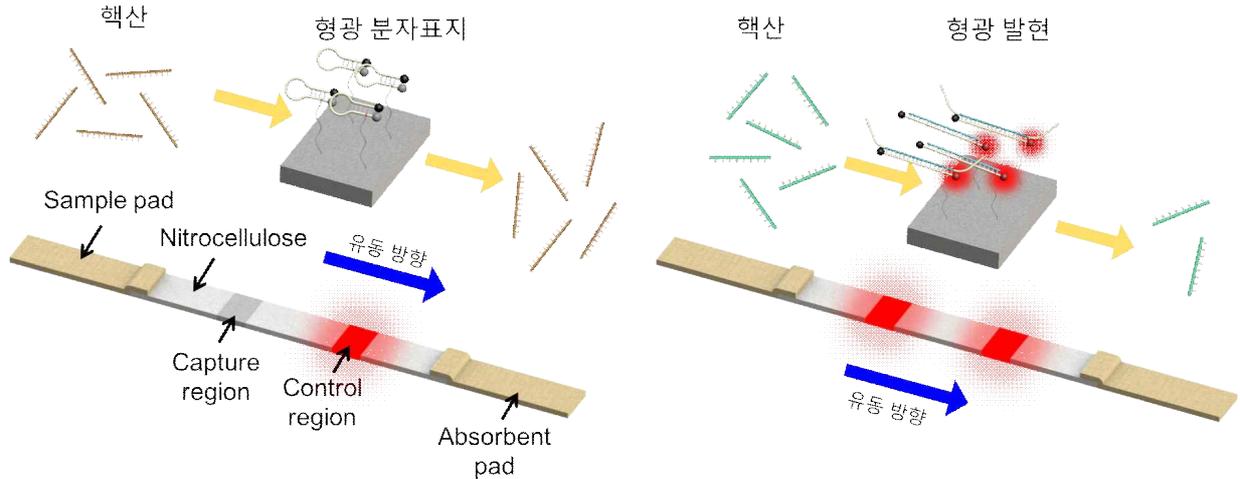


그림 15. Lateral flow sheet의 구조 및 구제역과 조류 인플루엔자 감염 검지 메커니즘

- 2차년도 이후 개발되는 구제역과 조류독감의 아종 바이러스를 구별하는 기기를 개발하기 위해 2차원 lateral flow sheet에서의 바이러스 핵산 용액의 유동 및 아종 구별 메커니즘 연구를 진행 (3차년도까지 지속 연구)
- 구제역과 조류독감 바이러스 감염 검지 및 형광분자 표지를 이용한 아종 검지 메커니즘은 아래 그림과 같음. 바이러스 핵산 용액이 시료패드에서부터 전개되어 첫 번째 결합지역에서 조류독감이나 구제역 바이러스에 감염되었는지 여부를 판별해줌. 이 후 각 바이러스별 아종 형광분자 표지가 고정되어 있는 결합지역에 도달하고 고정된 바이러스별 각 2가지의 아종 형광분자 핵산과 상보 결합하는 핵산을 가지고 있다면 소광이 풀리면서 발광함.
- 아종 형광분자 표지에는 아종 별로 각각 다른 발광 파장을 가지고 있기 때문에 아종별 형광색을 통해 종류를 판별함. 만약 첫 번째 결합지역에서는 발광이 일어났지만 고정된 아종 형광분자 표지와 결합하지 않아 발광이 일어나지 않고 관리지역에서만 발광이 일어났다면 3가지 아종과는 다른 종의 바이러스라는 것을 나타냄. 또한 구제역과 조류독감 바이러스 핵산이 존재하지 않는다면 모든 결합지역에서 발광이 일어나지 않고 관리지역에서만 발광이 일어남

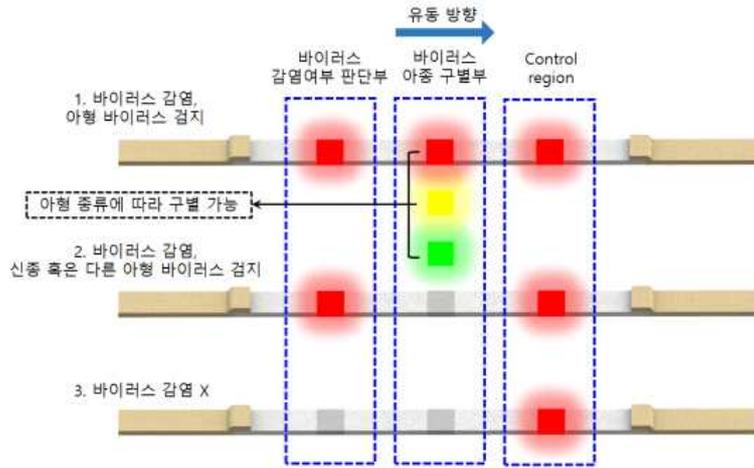


그림 16. 구제역과 조류독감의 아종 바이러스 구별을 위한 바이러스 검지 메커니즘

(나) 제 2 세부 연구기관 (성균관대학교 신소재공학부) :

■ 바이러스 추출 핵산의 특정 염기서열과 결합할 수 있는 핵산을 이용한 형광 분자 표지 (fluorescence molecular beacon)

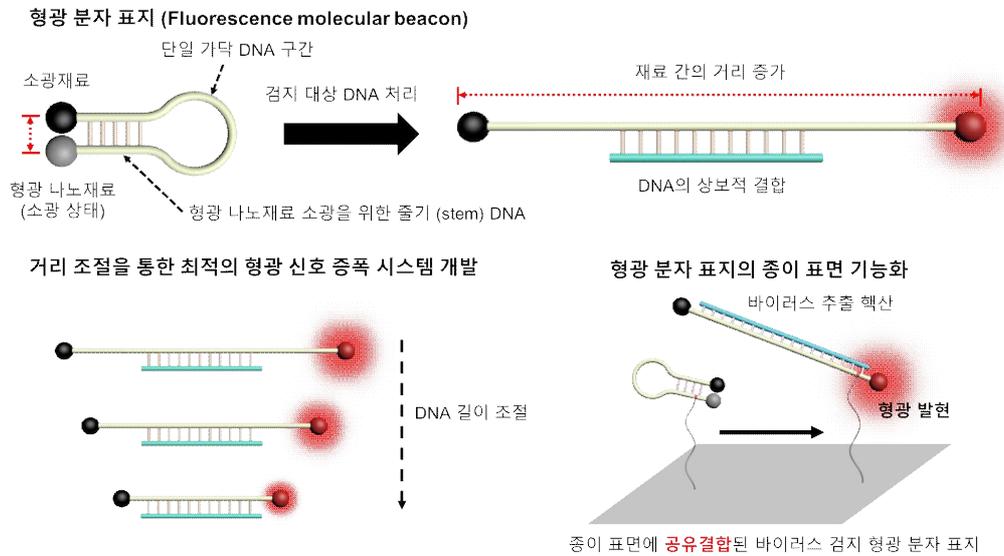


그림 17. 형광 나노재료와 소광재료, 핵산으로 구성된 형광 분자 표지의 구조 및 구동 메커니즘. 대상 바이러스 추출 핵산이 존재함에 따라 형광 나노재료와 소광재료의 물리적 거리가 변경되어 형광 신호가 증폭되는 구조임

- 구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스의 유무를 판별할 수 있는 유전자 내 특정 염기서열을 확인하고, 해당 정보를 바탕으로 형광 분자 표지 시스템을 디자인함
- 바이러스의 혈청형 또는 아형에 관계없이 공통으로 포함된 염기서열과 상호작용할 수 있는 핵산과 앞서 선별한 형광 나노재료 및 소광재료를 포함하는 유-무기재료 기반 형광 분자 표지를 개발하고, 바이러스 유무로 대표되는 염기서열의 유무를 형광 신호의 발현을 통해 확인
- 나노재료의 추가 화학적 변형 (chemical modification)을 통해 검출 민감도를 개선하고, 형광 분자 표지 내에 포함된 핵산의 길이 및 염기서열 변화를 통해 바이러스 검지 효율을 극대화함
- 종이 소자에의 형광 분자 표지 기능화를 위한 고분자를 도입함으로써, 샘플의 화학 조성에 영향을 받지 않고 바이러스 추출 핵산을 검출할 수 있는 시스템을 구현할 예정임

■ 구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스 아형 구별을 위한 형광 기반의 다중 검지 시스템 개발

형광 분자 표지를 이용한 혈청형 또는 아형 구별 검지 시스템 개발

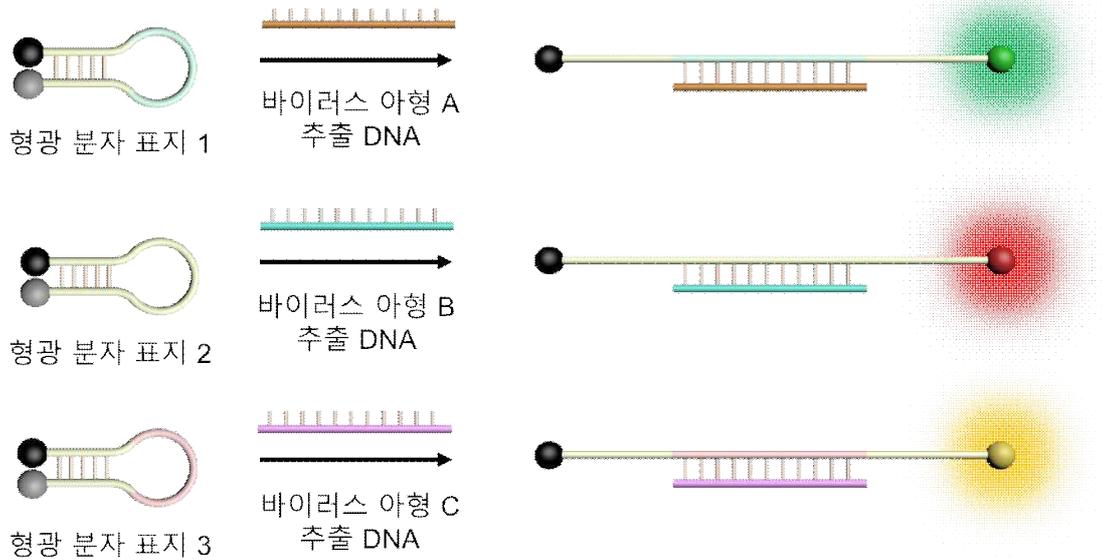


그림 18. 구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스의 표현형·아형 확인이 가능한 다중 검지용 형광 분자 표지 시스템의 개발. 다양한 표현형 또는 아형을 갖는 구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스를 형광 나노재료의 발광 및 소광을 통해 검지할 수 있는 시스템을 개발

- 조류 인플루엔자 및 구제역 바이러스를 구별함은 물론, 각각의 바이러스 혈청형·아형을 구별하기 위해서는 바이러스 표현형에 따라 다른 파장의 형광 신호가 발광되어야 하기 때문에, 선별한 형광 나노재료 및 소광재료 후보군에서 아형에 따라 다른 재료들을 이용하여 형광 분자 표지를 추가로 개발
- 종이 소자에의 기능화를 진행할 때 제한된 결합지역 내에 처리할 형광 분자 표지의 농도를 정량함으로써 센서의 핵산 검지 신뢰도를 향상
- 바이러스의 혈청형 및 아형에 대응되도록 설계된 수 개의 형광 분자 표지를 바탕으로 복수종의 바이러스 추출 핵산이 포함된 상태에서 각 핵산을 선택적으로, 또는 동시에 검지가 가능한지를 확인하는 실험을 진행하고, 각각의 형광 신호를 분석함으로써 검출 신뢰성 개선 및 신속 대응 가능성을 확인함

(다) 제 1 협동 연구기관(숙명여자대학교 화공생명공학과)

■ 역유전학 (Reverse genetics) 기법을 이용한 복제 능력이 제거된 모델 바이러스 생산

역유전학을 이용한 증식능이 없는 모델 바이러스 생산 연구

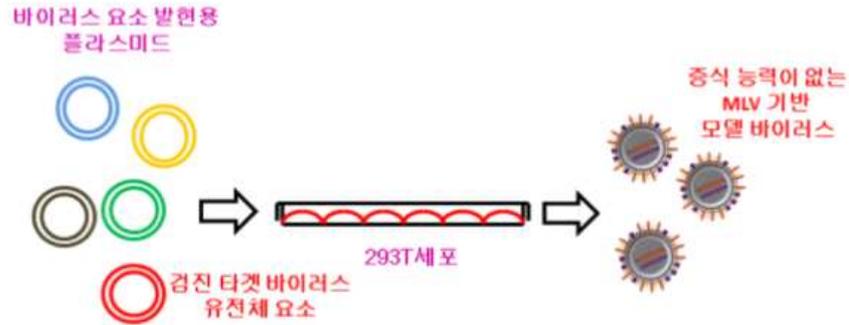


그림 19. 역유전학 기반의 검체 바이러스의 생산. 바이러스를 구성하는 각 요소를 발현할 수 있는 플라스미드를 세포에 삽입하여 원하는 대상 바이러스를 생산할 수 있음

- 균일한 특성을 지닌 바이러스의 다량 확보의 어려움, 바이러스 감염으로 인한 실험자 안정성 등의 문제로 진단 시스템 구축을 위한 다양한 최적화 연구 수행에 어려움이 있으므로, 증식 능력이 제거된 모델 바이러스를 역유전학 기법을 적용하여 생산함으로써 이를 모델 시스템으로 이용하고자 함
- 역유전학 기법을 적용할 경우, 바이러스가 포함하는 유전체를 설계 및 조작하는 것이 용이하므로 개발될 검출 시스템에 대한 다양한 연구 및 검증이 가능함
- 바이러스의 복제 능력을 제거하기 위해 Murine leukosis virus (MLV) 유전체의 50% 이상을 구제역 바이러스 또는 조류 인플루엔자 바이러스 유전체로 치환할 예정이며, 바이러스 생산을 위한 세포주에 바이러스 RNA를 발현할 수 있는 DNA를 도입하여 바이러스를 생산하므로 균일한 특성을 가진 바이러스 시료의 생산이 가능할 것으로 판단
- 또한, 모델 바이러스 생산 시에 GFP (녹색 형광 단백질)를 포함할 수 있는 서열 도입을 통해 형광 기반 바이러스 정량이 가능하며, 이를 바이러스 추출 RNA의 형광 검지 정확도 향상에 적용할 수 있음
- 만약 역유전학 기법의 적용이 어려울 경우, 한국수의유전자원은행으로부터 바이러스를 분양받아 Baby hamster kidney (BHK) 세포와 같은 세포주에의 감염을 통한 증폭 방식으로 바이러스 입자를 확보할 예정임

■ 모델 바이러스 RNA 유전체 추출 및 검체 안정성 극대화 연구

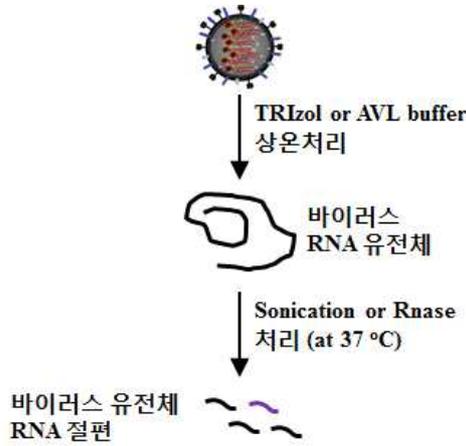


그림 20. 바이러스 유전체 추출 및 단편화

- 바이러스 검체 시료에 포함된 지방, 단백질 등 검지 과정에서 신뢰성을 감소시킬 수 있는 부산물들을 녹일 수 있는 세정제를 포함한 시약 또는 버퍼를 적용함으로써, 바이러스 검체로부터 유전체 RNA만을 추출하는 연구 진행
- 바이러스로부터 RNA를 추출하기 위해 사용되는 Trizol, AVL 버퍼 등 처리하는 용액의 화학 조성에 따라 대상 RNA의 분리 효율을 평가하고, 잔존 부산물의 양을 측정함으로써 바이러스 검출 과정에서의 간섭 오차를 최소화함
- 또한, 검체내 바이러스 RNA 유전체의 분리 후 물리적·화학적 처리를 통한 단편화를 수행해 검출 반응 과정에서 RNA 응집에 의한 확산 제한을 최소화함
- RNA의 안정도가 낮아 검지 안정성 및 효율이 낮을 경우, 무작위 염기서열을 가지는 짧은 핵산 올리고를 이용한 역전사효소 반응 (reverse transcription)을 통해 바이러스 유전체의 cDNA 단편을 만들고자 함. cDNA는 RNA보다 화학적 안정성이 높아 바이러스 검출 신뢰도를 높일 수 있을 것으로 기대됨
- 본 과정에서 역전사효소로는 MLV 인테그라제를 사용할 계획이며, 이를 통해 35-42°C의 낮은 온도 조건에서 20분 이내에 바이러스 cDNA 단편을 만들 수 있음

(라) 제 2 협동 연구기관 (팜스웰메디컬)

■ 소형 형광 검출 모듈 설계 및 제작

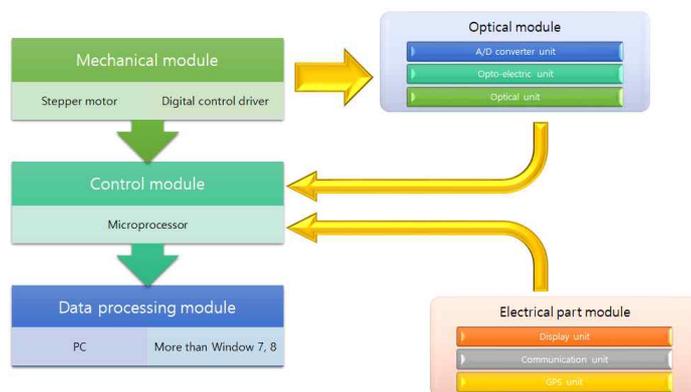


그림 21. 소형 형광 검출 모듈의 모식도

- 소형 형광 검지기를 설계할 경우에 설계할 모듈은 위와 같음
- 광원, 필터, 검지소자, 렌즈 등의 구성품을 기초로 검지 광학부분을 개발함

- 1) 광학부분에서는 선정된 광원의 안정적 정전류 공급과 검출 소자의 전기적 신호처리, 잡음 처리 등의 기능을 수행할 수 있도록 회로를 설계
- 2) 특히 종이기반의 lateral flow 키트의 형상 등을 고려하여 난반사나 흡수 등의 문제 자 발생되지 않도록 측정부분의 외관 설계 등을 포함한 기구설계 부분도 동시에 진행

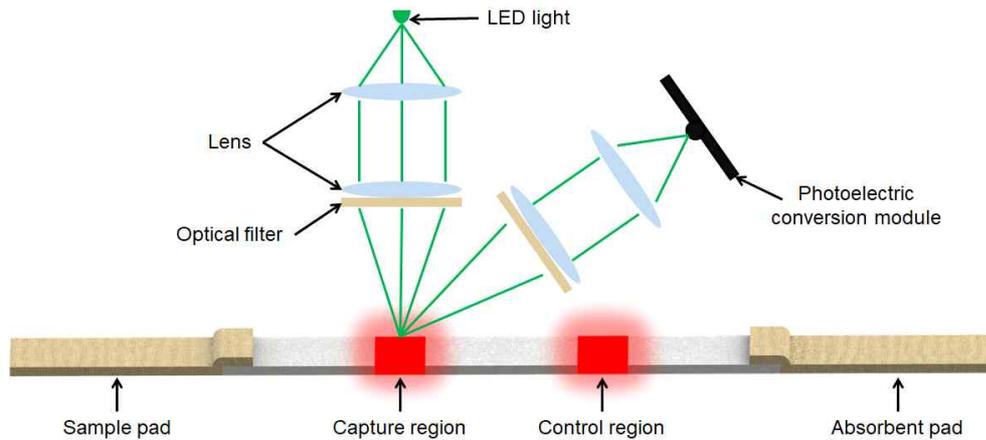


그림 22. 종이기반 lateral flow 키트의 형광 검출을 위한 설계

- 기계부분에서 중요한 부분은 종이기반의 lateral flow 키트를 장착할 수 있는 부분과 모터를 이용하여 시험 kit를 검지부로 이동하여 정위치에 고정하는 장치 등을 설계함
- 제어모듈에서는 각각의 모듈을 제어하는 제어보드를 설계함
  - 1) 검지소자로 부터의 신호 처리 및 광원 조정
  - 2) Lateral flow 키트 이송장치 조정
  - 3) Display 모듈 제어
  - 4) 위치기반, 통신 모듈 제어

■ 종이 기반 키트 적용한 연동 테스트 및 성능 평가

- Test용 종이 기반 kit를 이용하여 장비의 성능 및 안정성을 평가하여 장비의 성능을 결정
  - 1) 분석 물질의 농도에 따른 Lower limit of quantification(LLOQ) 와 upper limit of concentration(ULOQ)를 확인
  - 2) Sensitivity 확인하여 저농도에서도 충분히 검출이 가능한지 확인함. 또한 S/N비를 확인하고 노이즈 감소회로를 추가 할 것인지를 검토하여 수정 설계

### <3차년도>

#### ○ 연구개발 목표:

(가) 제 1 세부 연구기관 (성균관대학교 기계공학부) :

- 구제역과 조류독감 바이러스 감염 여부 및 아종 바이러스 구별을 위한 lateral flow sheet 검출기기 개발
- 시작품 제작을 위한 위탁연구기관과의 상호 협력 및 최적화

(나) 제 2 세부 연구기관 (성균관대학교 신소재공학부) :

- 바이러스 검출기기의 형광 신호 최적화 및 형광 신호와 바이러스 감염 여부간의 상호관계 해석
- 바이러스 검출 성능 개선 연구 및 센서 안정도와 신뢰성 개선 연구

(다) 제 1 협동 연구기관 (숙명여자대학교 화공생명공학과) :

- 실제 검지 상황을 모사한 야생 바이러스 생산
- 전처리 기술을 바탕으로 한 야생 바이러스 RNA 유전체 추출 기술 개발

(라) 제 2 협동 연구기관 (팜스웰메디컬) :

- Lateral Flow sheet Kit를 적용하여 검출 성능 확인
- 통신/GPS 모듈이 추가된 바이러스 검지용 소형 형광 검출 장비 개발

#### ○ 개발 내용 및 범위

(가) 제 1 세부연구기관 (성균관대학교 기계공학부)

#### ■ 구제역과 조류독감 바이러스 감염 여부 및 아종 바이러스 구별을 위한 lateral flow sheet 검출기기 개발

- 다중 검지를 위해서는 일반적으로 두 개 이상의 결합지역을 일렬로 나열하는데, 이 경우 검출할 수 있는 아종 및 바이러스 종류에 한계가 존재
- 구제역과 조류독감 바이러스 감염 여부 및 2가지 이상의 아형 바이러스 검지용 lateral flow sheet 개발
- Lateral flow sheet는 아래 그림과 같이 조류 독감과 구제역 바이러스를 검출 할 수 있는 첫 번째 결합지역, 이 후에, 조류 독감 혹은 구제역 바이러스의 아종을 판별할 수 있는 결합지역이 있는 두 개의 채널로 구성

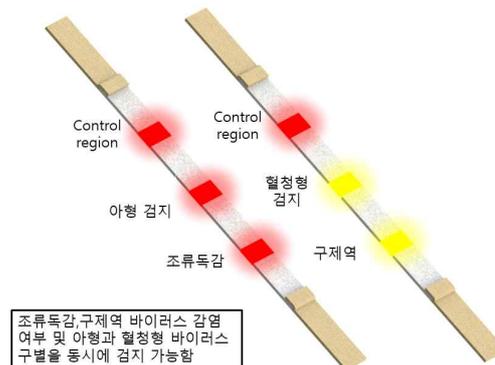


그림 23. 구제역과 조류독감 바이러스 감염 여부 및 아종 구별을 위한 lateral flow sheet

- 본 연구에서는 lateral flow sheet을 개발하여 그 활용성을 확인하고 필요하다면 2, 3차 원형상을 개발하여 그 활용 영역을 늘릴 예정이며, 기존 제품들과는 차별화된 구조 설계 및 제작
- Lateral flow sheet에서의 유량은 검지할 바이러스의 양이나 핵산의 상보 결합수, 형광

분자표지 양 등을 고려해야 하며 특히 아종 바이러스의 개수에 따른 핵산 용액의 양, 발광을 위한 상보 결합의 수를 최적화하고 이와 동시에 높은 발광 반응성을 가지도록 종이 기반 기기 개발

- 이러한 검지 기법은 구제역 혹은 조류독감 뿐만 아니라 고병원성, 고위험군의 다종 바이러스 감지 및 아종 구별에 쉽게 적용이 가능하다는 장점이 있으며 바이러스 감지와 아종 구별이 동시에 가능하기 때문에 높은 경제성과 효율성을 가짐
- 또한, 본 연구에서 개발하는 검지 기술은 구제역, 조류 인플루엔자 바이러스와 기술적 유사성이 높은 타 바이러스가 출현하더라도 탐침 핵산 서열만 변경하면 신속하게 보완 및 검출에 적용 가능

■ 시작품 제작을 위한 상호 협력 및 최적화

- 실험실 기반으로 진행되었던 형광 이미징 분석 결과와 세부연구기관에서 개발한 휴대용 형광 검출기기를 이용한 결과를 비교하고 피드백을 통해 최적화함
- 세부 및 협동기관의 연구개발 결과를 통합: 핵산과 형광시료를 종이 형태의 소자에 적용시킨 구제역과 조류독감 바이러스 및 아종 구별 검지기기를 휴대용 검출장비 시작품에 적용하기 위한 통합연구
- 지속적인 상호 협력연구를 통해 기기의 단점을 보완하고 제품의 효과상승과 효율성, 정확성을 높이기 위한 최적화를 진행함

(나) 제 2 세부 연구기관 (성균관대학교 신소재공학부)

■ 바이러스 검출기기의 형광 신호 최적화 및 형광 신호와 바이러스 감염 여부간의 상호관계 해석

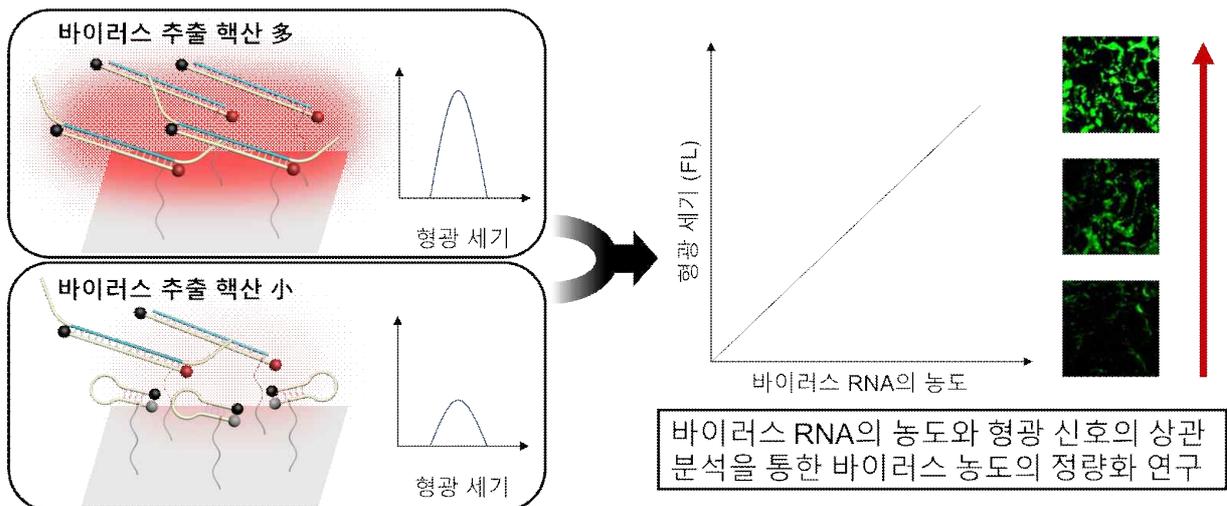


그림 24. 바이러스 추출 핵산의 정량화를 통한 형광 신호와 바이러스의 상관 분석 및 이를 통한 바이러스 농도 정량화 연구. 종이기기를 통해 바이러스 핵산의 농도별 형광 신호를 정량하고, 이를 바이러스 농도와 연관시킴으로써 바이러스 농도를 정량적으로 분석하는 기술을 개발함

- 실제 바이러스 핵산 추출 용액이 개발된 종이기반기기 내에서의 유동과정에서 검지 성능에 영향을 주는지를 확인하고, 이를 최소화할 수 있는 반응 최적화 및 추가 화학적 기능화 연구 진행
- 결합지역과 관리지역의 형광신호 발현량의 정량 및 분자 표지의 혼성화 에너지를 이용한 추출 용액 내 바이러스 농도의 정량법을 연구하고, 이를 통해 역산한 결과값과 처리

바이러스 농도의 상관 분석 (correlation analysis)을 진행할 예정임

- 형광 probe를 통한 이미징 검지법을 통하여 검지에 필요한 민감도를 충분히 확보할 수 있을 것으로 판단하고 있지만, 필요할 경우 RPA등을 통한 상온 증폭 기술도 고려예정임.

■ 바이러스 검출 성능 개선 연구 및 센서 안정도와 신뢰성 개선 연구

- 다양한 검출 시료를 대상으로 센서 검출 신뢰도를 평가하고, 시료의 특성에 구애받지 않는 바이러스 검출 민감도 및 정확도를 확보하기 위한 최적화 연구를 수행
- 종이 소자 제작 후 상온 또는 검지 환경에 노출되었을 때의 센서 안정성을 확인하고, 장기간 보관 시의 안정성을 개선할 수 있는 최적화 기술을 개발
- 본 연구에서 검지하고자 하는 구제역, 조류 인플루엔자 바이러스와 기술적 유사성이 높은 타 바이러스에도 해당 검지 방식을 도입하는 연구를 수행함으로써 기술의 범용성을 극대화하고 기술 가치를 향상시킴
- 전통적으로 qPCR 방법으로 바이러스 유무를 판정하고 있으므로 이 방법과 본 연구 개발된 검출기기의 성능을 비교 평가할 예정임. 다만, 개발하고 있는 방법은 기존 방법과 다른 장점, 현장형 및 신속 검출 등을 목표로 하고 있으므로, 이러한 현장형 및 신속 검출의 장점을 극대화하기 위해서 장비 설계시 사용자 중심의 편의성과 현장 활용성 등을 고려하여 개발할 계획임.

(다) 제 1 협동 연구기관 (숙명여자대학교 화공생명공학과)

■ 실제 검지 상황을 모사한 야생 바이러스 생산

야생 구제역 바이러스 생산을 위한 유전체 cDNA



역유전학 기법에 기반한 야생 조류 인플루엔자 바이러스 생산의 예

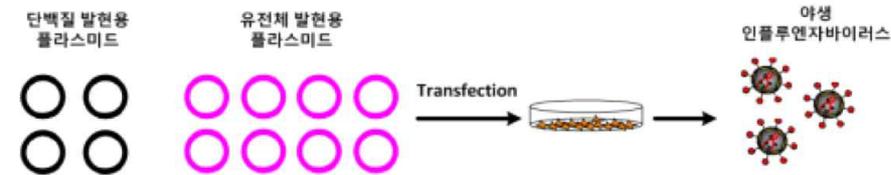


그림 25. 역유전학 기법을 이용한 야생 구제역 바이러스와 야생 조류 인플루엔자 바이러스의 생산. 모델 바이러스와 달리 복제 능력을 포함하고 있기 때문에 실제 바이러스와 동일하며, 해당 바이러스를 이용하여 실제 검지 상황을 모사한 실험 및 최적화 연구를 진행할 수 있음

- 모델 바이러스를 이용한 최적화 연구를 실제 검지 상황으로 확장하기 위하여 복제 능력이 포함된 야생 바이러스 (wild type virus)를 개발함
- 야생 조류 인플루엔자 바이러스의 경우, 분절된 RNA 유전체를 각각 발현할 수 있는 8종의 플라스미드 및 바이러스 단백질 생산용 플라스미드 시스템을 세포에 도입함으로써 야생 바이러스를 생산하고자 함
- 역유전학 기법의 적용이 어려울 경우, 농림축산검역본부, 건국대 수의대 (송창선교수

연구팀)로부터 바이러스를 분양받아 세포주 기반 바이러스 증폭을 통해 바이러스를 생산할 예정임. 또한, 3차년도 말에 건국대학교 송창선 교수 연구팀과 농림축산검역본부와의 협업을 통하여 실제 조류 인플루엔자 바이러스와 구제역 바이러스 임상검체를 이용하여 검사를 진행할 예정임. 이러한 실험의 경우, 복제 능력이 포함된 야생 바이러스의 병원성이나 감염 확대를 방지하기 위하여 BSL3 수준의 시설에서 개발된 시스템을 이용이 필요함.

- 특히, 조류 인플루엔자 바이러스의 경우 송창선 교수 연구팀에서 한 개의 아미노산 돌연변이로 병원성을 없애 실험의 용이성을 크게 향상시킨 것으로 알려져 본 연구개발에 큰 도움이 될 것으로 판단됨.
- 현장에서 바이러스를 추출한 후 검출을 할 수 있다면 이상적이겠지만, 현실적으로 본 과제에서 이를 실험으로 진행하는 것은 어려움이 많으므로 건국대학교와 농림축산검역본부와의 협업을 통하여 본 센서가 성공적으로 작동하는 것을 확인한다면 향후 현장에서 충분히 활용 가능하고 효용성이 높을 것으로 사료됨.

■ 전처리 기술을 바탕으로 한 야생 바이러스 RNA 유전체 추출 기술 개발

- 구제역 바이러스 및 조류 인플루엔자 바이러스가 포함되어 있는 검지 대상 시료를 사용하여 핵산 추출, 분리, 검지의 전 과정을 수행하고, 시료의 야생 바이러스에서의 RNA 추출 효율을 개선하는 연구 진행
- 바이러스를 구성하고 있는 단백질과 유전체로부터 유전체만을 추출하는 화학적 처리 기법을 개선하고, 이를 통해 센서 검출 신뢰도를 높일 수 있는 고순도 RNA 추출 기술을 확립하고자 함. 본 기술은 센서 내의 유동 과정에서 용액의 특성을 균일하게 유지하기 위한 필수 불가결한 선행 기술이며, 이를 통해 검출 오차 및 위양성 발현 가능성을 현저히 낮출 수 있을 것으로 기대됨

(라) 제 2 협동 연구기관 (팜스웰메디컬)

■ Lateral flow sheet 키트를 적용하여 검출 성능 확인

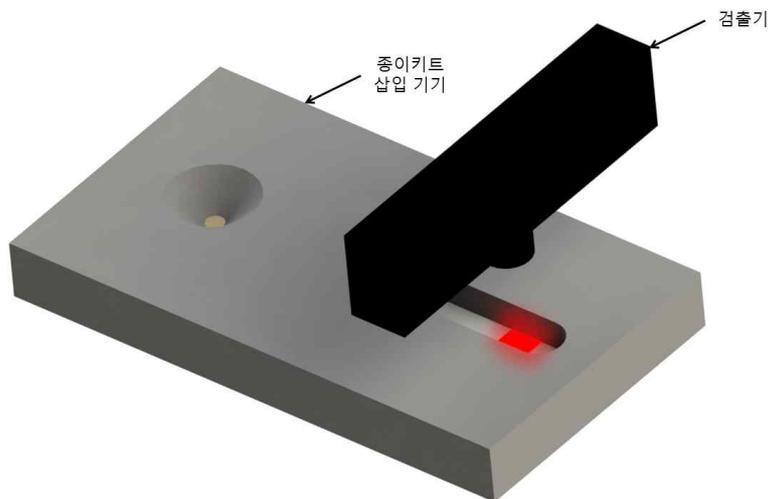


그림 26. 바이러스 검지용 소형 형광 검출 장비

- Kit를 동시 검출 할 수 있는 장비를 제작하여 농도에 따른 lower limit of quantification(LLOQ)와 upper limit of concentration(ULOQ)를 확인함
- 또한, 바이러스를 검출했을 경우에 편차나 감도에 대한 부분을 평가하고 시스템 검증 기준을 설정

- 진단기 성능은 아래와 같은 기준으로 시작품을 개발하고자 함

검출 신뢰도	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기존 기술의 검출 신뢰도               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 면역 크로마토 그래피 : 93%</li> <li>- ELISA : 95%</li> <li>- qRT-PCR : 96.6%</li> </ul> </li> <li>○ 95% 이상의 검출 신뢰도 (ELISA 수준 이상)</li> </ul>
검출 민감도	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ ~100 EID<sub>50</sub>/mL (면역 크로마토그래피 검출 민감도의 10배 이상)</li> </ul>

■ 통신/GPS 모듈이 추가된 바이러스 검지용 소형 형광 검출 장비 개발

- IoT기반 기능 중의 하나인 Tracking Service와 Metering Service를 사용하여 장비의 측정된 결과를 위치기반 정보와 함께 서버로 전송하여 runtime 상황 파악을 가능하도록 함
- Tracking System은 module 형태로 구성하여 장치와 별도로 제작 및 구현이 가능
- Tracking Module은 크게 3가지 function으로 구성됨
  - 1) GNSS 측정부 (Location Manager): GNSS (Global Navigation Satellite System)는 GPS를 비롯한 측위 위한 위성시스템의 통칭으로 장치 위치를 파악하는 기능을 함. 일반적으로 Serial 기반의 NMEA 규격의 프로토콜로 측위 파악이 가능함
  - 2) 서버 연동부 (Connection Manager): 보안을 기반으로 하여 서버와 연동하여 주기적 측정보고, 요청에 따른 측정보고, 각종 장비 설정 값 변경 등을 수행함. 전송되는 데이터의 양, 전원 종류에 따라 LTE 또는 LTE-M, NB-IoT, LoRa 등의 이동통신기술이 사용됨
  - 3) 장비 연동부 (Device Manager): 장비의 측정값을 읽거나 각종 설정치 변경 등을 수행함. 장비와의 연동은 장비와 독립된 개발이 가능하도록 UART를 사용함. 또한 보안을 위해 암호화된 프로토콜을 사용하는 것이 좋음 (예, Encrypted HDLC Protocol)

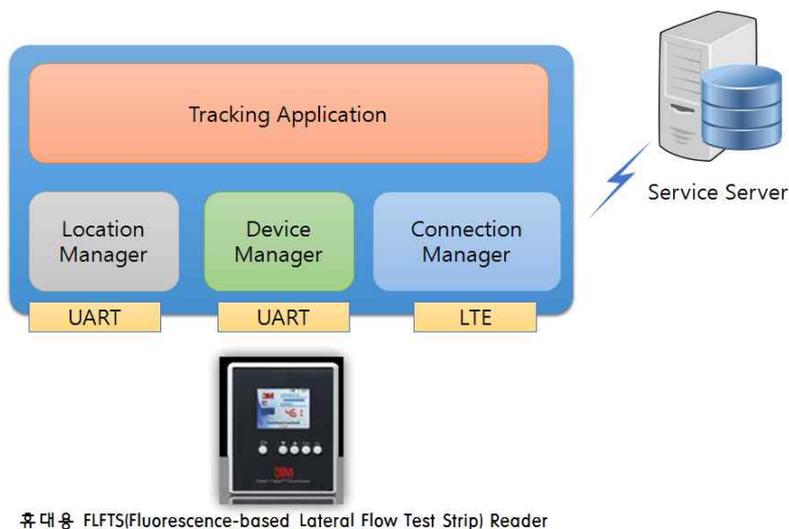


그림 27. Tracking module의 설계 모식도

### 3) 연구개발 추진 전략·방법 및 추진체계

#### 3-1. 추진 전략 및 방법

- 연구 개발의 성공 및 실용화 가능성을 높이기 위해 핵심기술 확보 및 검증 기술 확보, 조기 실용화 등 세 부분별 전략적 연구 추진

	검증 기술 확보 전략
검증기술 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 바이러스 연구에 있어 안전 확보를 위하여 증식 능력이 제거된 모델 바이러스를 활용하여 실험 수행</li> <li>○ 바이러스 관련 연구를 안전하게 할 수 있도록 배기 시설이 갖추어진 실험 공간 및 시설을 임차하여 사용</li> <li>○ 본 연구과제 개발 제품이 검출/ 진단용 기술적용 제품임 따라서 신뢰성과 정확성을 확보하기 위하여 기초 데이터 확보 및 데이터베이스 구축이 중요함</li> <li>○ 본 연구과제 수행 기간 동안 축적된 결과는 신뢰성과 정확성을 확보한 후 데이터베이스화하여 활용 추후 본 연구과제 개발 제품의 신뢰성검증을 위한 기초 데이터로 활용할 계획</li> </ul>

	핵심기술 확보 전략
국내외 전문가 활용	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 국내 선진 기술 보유 기관 및 전문가 자문</li> <li>○ 해외 문헌 및 세미나 참여로 네트워크 구축 및 활용</li> </ul>
성공 가능성 제고	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 국내에서 기확보 또는 개발 성공한 기술을 최대한 응용하여 개발 추진</li> <li>○ 종이 기반 바이러스 검출 및 아형 구별 기기 개발 관련 국가 R&amp;D의 기술적 성취도를 최대한 반영</li> </ul>
유전정보 분석 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 결합정확도를 높이기 위하여 유전정보분석기술 활용</li> <li>○ 바이러스 검지를 위하여 적용된 유전정보 분석기술은 추후 구제역과 조류독감 뿐만 아니라 확장된 기술적용에 주요 핵심 기술로 적용 가능</li> </ul>

	기술의 조기 실용화를 위한 시장 친화적 연구개발 전략
조기 실용화 추진	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 사회적 니즈에 부합하면서 틈새시장을 창출 할 수 있도록 연구개발 수행</li> <li>○ 개발 제품의 조기 실용화와 활용화를 위해 검인증, 표준화 확보</li> </ul>
기술인증 관련	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기술인증의 경우 과제를 종료한 후에 시제품(2021년 예정), 사업화를 위한 양산제품개발(2022년 예정)후 적절한 공인인증기관(농림축산검역본부 등)을 통해 인허가를 받을 예정임.</li> <li>○ 인허가 시험법의 경우에는 공인인증기관의 시험법을 따를 예정임.</li> </ul>

- 샘플 전처리를 위한 최적의 프로세스 개발
  - 동일한 바이러스라도 각 샘플의 균일도에 따라 다양한 오염 결과값을 나타내는 특성 때문에 이를 표준화하는 작업이 필요함
  - 일반적으로 바이러스를 추출하는데 사용되는 물리적 방법인 파쇄기, 교반기, vortex, 원심분리기 등은 현장에서 바로 사용하기 어려움
  - 따라서, 연구기간 동안에는 특정 장비만을 사용해야 하는 물리적 방법의 한계를 극복하기 위한 화학적 방법을 도입하여 좀 더 신속하고 간편하게 바이러스를 추출할 수 있는 기술에 대한 연구를 수행할 계획임
  - 바이러스 추출 조건이나 추출 시료의 물성에 따라 추출되는 검체의 균일도 및 신뢰도 차이가 크기 때문에, 균일한 바이러스 추출 및 검지대상 핵산을 얻기 위한 전처리 기법을 연구

하고, 이를 적용하는 연구를 수행함

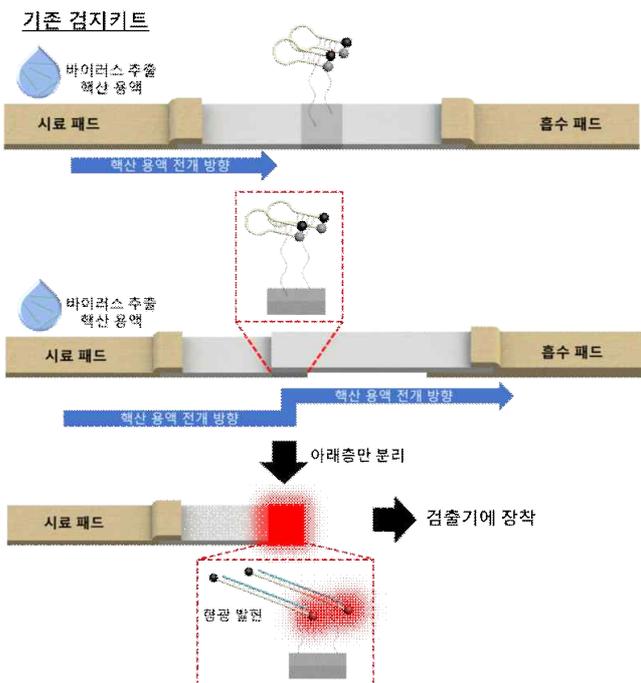
- 상용화된 바이러스 추출 제품들을 분석하고, 해당 제품들의 효율을 증가시킬 수 있는 방안  
에 대해 연구함으로써 최적화된 바이러스 추출 기법을 바탕으로 검출 효율을 높일 예정임

- 바이러스 염기서열 분석 및 형광 나노재료 기능화를 통한 바이러스 검지 한계 개선 연구
  - 바이러스의 경우, 감염 여부를 확인하기 위한 바이러스 최소양은 약 1,000개 정도이며,  
바이러스 염기서열 분석을 통해 유전체로부터 아형/혈청형 구별 등과 같은 정보를 얻어  
디자인한 탐침 분자는 바이러스의 배수만큼 존재할 수 있음. 예를 들어, 하나의 바이러스  
입자로부터 5 종류의 탐침 분자를 얻을 수 있다면, 1,000개의 바이러스 입자로부터 추출  
할 수 있는 탐침 분자는 5,000개가 됨
  - 바이러스 염기서열 분석을 통해 본 연구에서 구현하고자 하는 바이러스의 종류 판별 및 혈  
청형/아형 구별에 이용될 수 있는 탐침 분자의 종류를 다양화한다면, 바이러스의 검지 한  
도를 낮출 수 있을 것으로 기대됨
  - 형광 분자 표지에 사용될 수 있는 나노재료의 한 종류인 양자점의 경우, 표면에 결합할 수  
있는 단일 가닥 DNA의 수가 10개 이하임. 또한, 양자점과 단일 가닥 DNA의 결합 과정에  
서 NaCl 농도와 같은 반응 조건을 조절하여 결합 비율을 조절할 수 있음을 확인하였고,  
이를 바탕으로 바이러스 추출 RNA의 양을 정량적으로 분석할 수 있는 형광 분자 표지의  
개발이 가능할 것으로 예상됨

○ 원천 특허 확보 전략

**특허회피 전략**

기존기술과의 차별성



**검지용 probe 및 센서 측면**  
구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스의 존재와 그 혈청형, 아형을 구분할 수 있는 probe 염기 서열 및 센서 구조에 대한 특허 출원 가능

**재료적 측면**  
**기존 키트**  
바이러스를 검지하기 위해 사용하는 분자 표지 또는 나노입자를 종이 표면에 물리적으로 흡착시키기 때문에, 종이 두께나 유동량에 의해 검지 성능 차이가 발생함  
**차별성**  
형광 분자 표지 내 핵산의 backbone에 긴 고분자를 직접 기능화하여 종이에 고정함으로써 길이가 긴 타겟 RNA에 대한 반응성 향상, 검지 한도 향상

**유동적 측면**  
**기존 키트**  
핵산 용액이 전개지 내부를 따라 흐르기 때문에 바이러스 핵산이 형광 세기에 직접적인 영향을 줄 수 있는 종이 상층부에 기능화된 형광분자표지와 반응하지 못함  
**차별성**  
다차원 lateral flow sheet를 설계함으로써 바이러스 핵산 용액이 상층부의 형광분자 표지와 모두 만나 반응성이 증가하고 형광 세기를 보다 정량적으로 분석할 수 있음

그림 28. 본 연구에서 제안한 바이러스 다중 검지 키트에 대한 특허 확보 전략

- 구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스의 염기서열 분석을 통해 탐침 분자를 개발하여 바이러스 특이적 탐침 분자 염기서열에 대한 핵심 물질 특허를 확보함
- 바이러스에서 추출한 RNA를 통해 바이러스를 정량적으로 검출할 수 있는 형광 분자 표지

- 의 개발과 이를 바탕으로 한 요소 기술에 대한 특허를 확보함
- 형광 분자 표지 내 핵산의 backbone에 긴 고분자를 직접 기능화하여 종이에 고정함으로써 길이가 긴 검지 RNA에 대한 반응성 향상 및 검지 한도 향상이 가능할 것으로 예상되며, 이에 대한 요소 기술 특허를 확보함
- 아형 또는 혈청형을 구별할 수 있는 진단 기기의 개발로 기존 제품과는 차별화된 핵산 기반 바이러스 검지 기술 특허를 확보함
- 본 연구에서 개발할 진단기기에 사용되는 lateral flow sheet의 설계에 관련된 변수들을 연구하고, 이를 통해 해당 분야의 원천 특허를 확보함

○ 바이러스 확산 모니터링 기술과의 연계성

- 본 기기의 경우 기술한 바와 같이 GPS를 포함하고 있어 감염질병발생시 그 위치정보를 실시간으로 모니터링 할 수 있음. 이 정보를 다른 과제를 통해 개발되어질 확산 모니터링 기술의 위치정보 자료로 활용이 가능함

3-2. 추진 체계

- 본 연구과제에는 성균관대학교 기계공학과, 성균관대학교 신소재공학과, 숙명여자대학교 화공생명공학과, 그리고 팜스웰메디컬이 참여함. 각 기관은 구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스 및 그 혈청형 또는 아형을 신속하게 검지할 수 있는 lateral flow sheet 기반의 바이러스 검지기기를 개발하기 위하여 아래의 세부 연구를 수행할 예정임

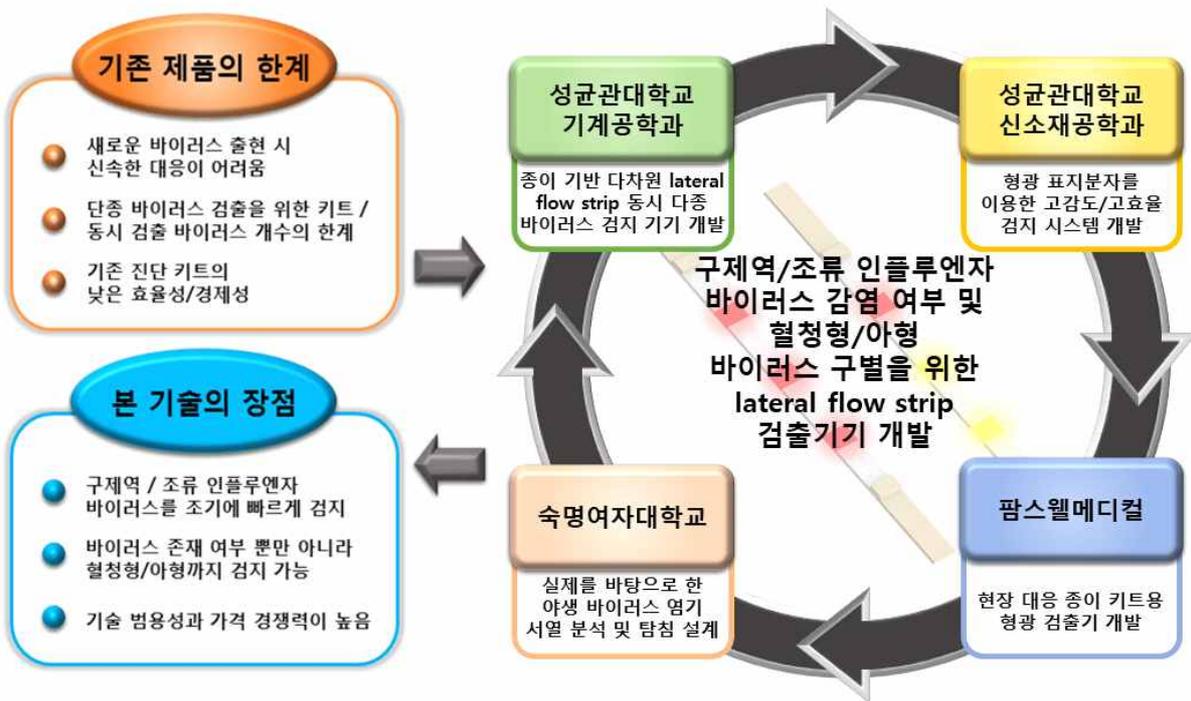


그림 29. Lateral flow sheet 기반의 바이러스 검지기기 개발을 위한 연구 추진 체계

○ 각 기관의 업무 분장은 다음과 같음

구분	기관	업무
주관 제 1 세부	성균관대 (기계공) [이진기 교수] 마이크로 바이오 유체 역학	종이 기반 검지키트 개발의 물리/역학적인 부분을 연구 Lateral flow sheet 기반 바이러스 검지용 센서 개발 검지용 샘플 준비를 위한 물리적 전처리 프로세스 연구 바이러스 확산 예측 모델과의 연계 방안 마련
제 2 세부	성균관대 (신소재공) [이정헌 교수] 나노-바이오 센서 소재	바이러스 검지를 위한 형광 분자 표지 시스템 개발 구제역과 조류독감 바이러스와 아형 구분을 위한 다중 검지용 바이러스 검지용 센서 디자인 및 개발
제 1 협동	숙명여대 (화공생명공) [임광일 교수] 바이러스 공학/유전공학	구제역과 조류독감 바이러스와 아형 구분을 위한 핵산기반 탐침 (Probe) 염기서열 설계 역유전학 (Reverse genetics) 기법을 이용한 검체 바이러스 생산
제 2 협동	팜스웰메디컬 [성원기 대표이사] 광학 장비 설계 및 개발	종이 기반의 검출 키트 분석을 위한 소형 형광 검출 장비 설계 및 개발 검출 장비에 통신/GPS 모듈 추가를 통한 바이러스 확산 예측 모델과의 연계 방안 마련

- 본 연구과제에 참여하는 4개 기관은 각 기관이 보유하고 있는 기술과 전문성을 바탕으로 유기적인 상호 협력 하에 본 과제를 수행할 예정임
- 본 연구를 성공적으로 수행하는 데에 협력기관 간의 협력체계가 매우 중요하며, 본 과제에 참여하는 4개 기관이 주기적인 연구 회의를 하는 등 매우 긴밀하게 협의하여 연구를 수행하고 있음.
- 또한, 시제품의 개발 및 최적화를 위해 최선을 다해 연구를 수행할 예정임.

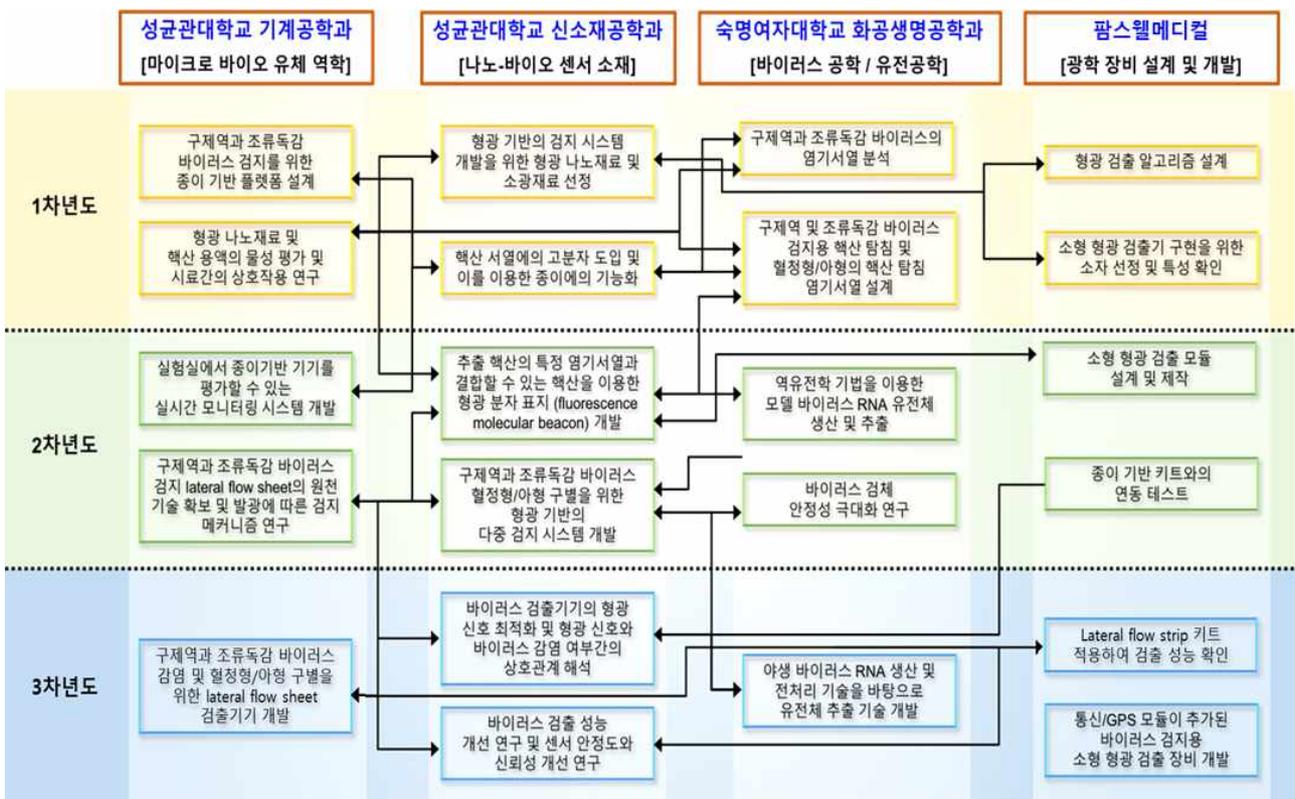
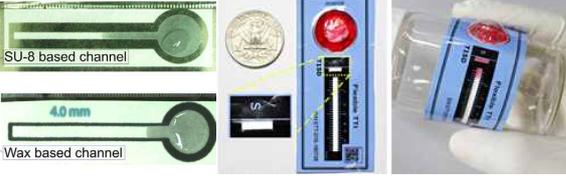
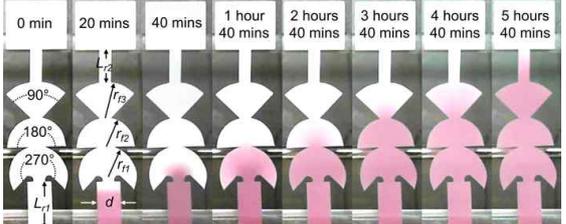
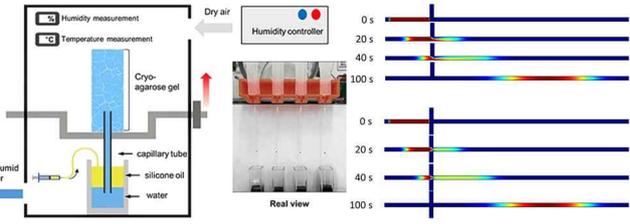
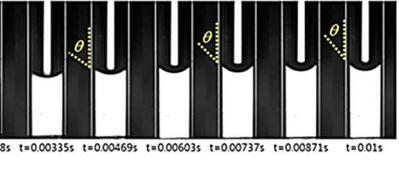
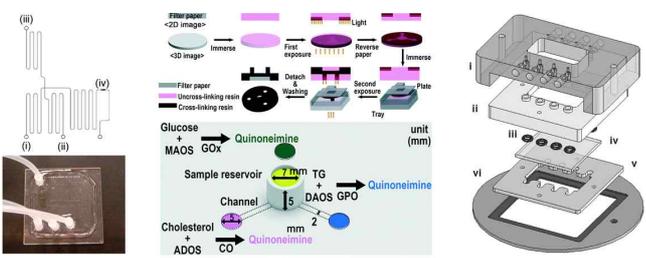
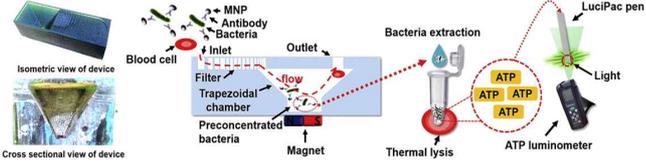
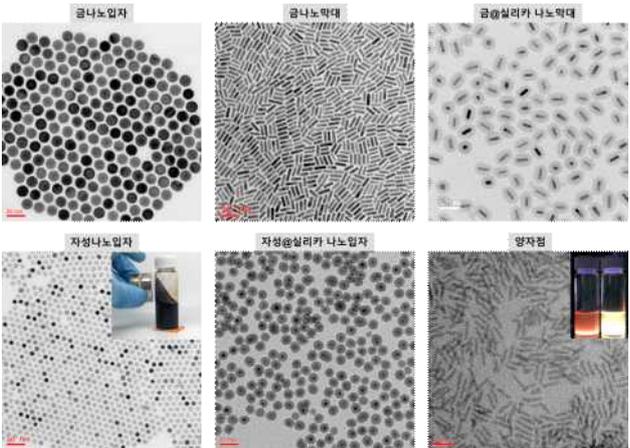
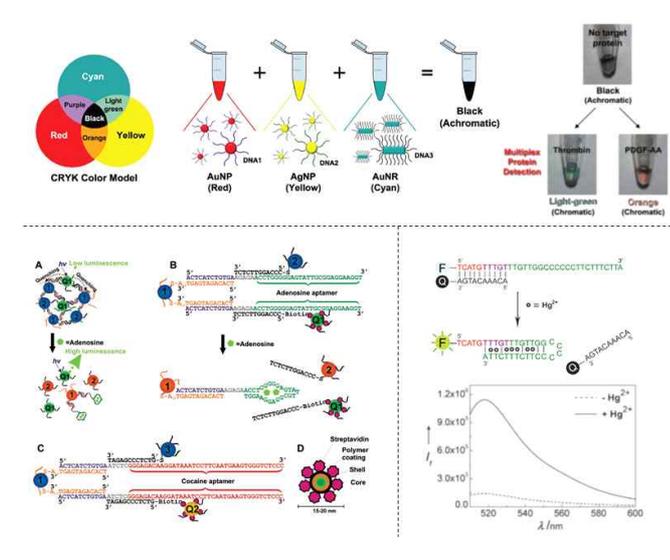
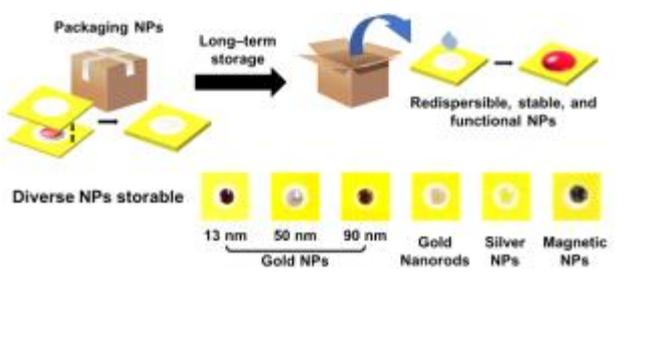


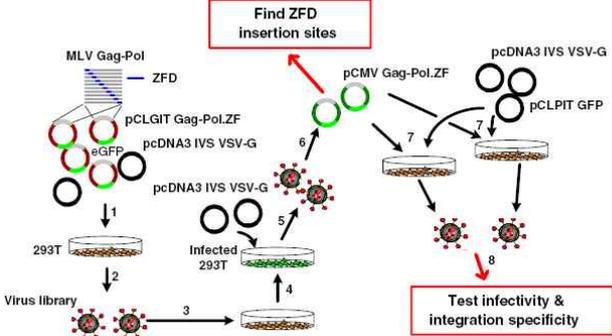
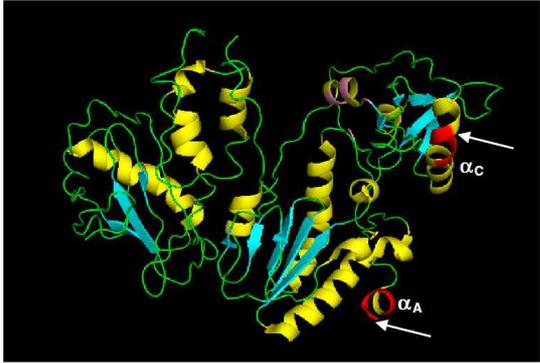
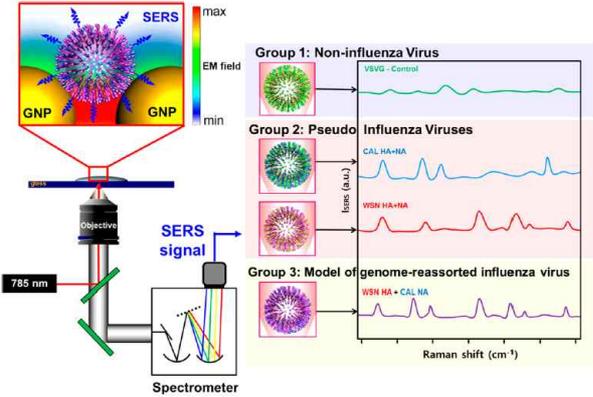
그림 30. 기관별 연구 내용 및 협력 방안

3-3. 과제 수행에 필요한 보유 기술

○ 본 연구과제에 참여하는 4개 기관은 본 과제를 수행하는데 필요한 다음과 같은 기술과 관련 실적을 보유하고 있음

기관	기술 내용	관련 실적
제 1 세부 [성균관대 기계]	<p style="text-align: center;"><b>종이 기반 미세유체역학 기기 개발 기술</b></p>  	<p>○ 논문</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Microfluidics and Nanofluidics, 2017, 21.3: 57.</li> <li>2. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2016, 492: 190-198.</li> </ol> <p>○ 특허</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 다성분 동시 정량 분석용 측방 유동 디바이스 (등록: 10-1412777)</li> <li>2. 전개형 플렉서블 온도 적산 표시장치 및 그 제조방법 (등록: 10-1412628)</li> </ol>
제 1 세부 [성균관대 기계]	<p style="text-align: center;"><b>마이크로유동 제어 및 분석 기술</b></p>  	<p>○ 논문</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Scientific reports, 2017, 7.1: 14735.</li> <li>2. Journal of Electrostatics, 2017, 85: 11-22.</li> <li>3. International Journal of Heat and Mass Transfer, 2017, 104: 813-818.</li> <li>4. Langmuir, 2014, 30.31: 9390-9396.</li> </ol> <p>○ 특허</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 유체 공급 장치 및 이를 이용하는 전해 장치 (등록: 10-1803142)</li> <li>2. 복제몰드를 이용한 미소구체의 제조방법 (등록: 10-1408704)</li> </ol>
제 1 세부 [성균관대 기계]	<p style="text-align: center;"><b>바이오 미세유체역학 칩 설계 및 제작 기술</b></p>  	<p>○ 논문</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Lab on a Chip, 2018, 18.11: 1533-1538.</li> <li>2. Journal of microbiological methods, 2017, 132: 128-133.</li> <li>3. Biotechnology progress, 2007, 23.6: 1506-1512.</li> <li>4. Biotechnology progress, 2006, 22.5: 1416-1425.</li> </ol> <p>○ 특허</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 다성분 동시 정량 분석용 측방 유동 디바이스 (등록: 10-1412777)</li> <li>2. 복제몰드를 이용한 미소구체의 제조방법 (등록: 10-1408704)</li> </ol>

기관	기술 내용	관련 실적
제 2 세부 [성균관대 신소재]	<p style="text-align: center;"><b>센서 제작용 나노소재 합성 및 화학적 기능화 기술</b></p> 	<p>○ 논문</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cryst. Growth Des., 2018, 18 (8), 4731-4736</li> <li>2. Nanoscale, 2017, 9, 7114-7123</li> <li>3. Phys. Chem. Chem. Phys., 2017, 19, 237-244</li> <li>4. J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, 8906-8908</li> </ol> <p>○ 특허</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 색변환을 이용한 유기산 검출 센서의 제조방법 및 이에 의하여 제조된 유기산 검출 센서 (등록: 10-1824777)</li> <li>2. Alignment of nanomaterials and micromaterials (US patent application 11/939,226)</li> </ol>
제 2 세부 [성균관대 신소재]	<p style="text-align: center;"><b>형광/색깔 변화 기반의 다중 검지용 센서 개발 기술</b></p> 	<p>○ 논문</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Adv. Mater., 2008, 20, 3263-3267</li> <li>2. J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 14217-14226</li> <li>3. Nanoscale, 2016, 8 (43), 18341-18351</li> <li>4. BioChip Letters, 2017, 12 (2), 10-12</li> </ol> <p>○ 특허</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 색변환 센서의 이미지 분석 시스템 및 이를 이용한 색변환 센서의 이미지 분석 방법 (등록: 10-1826425)</li> <li>2. Achromatic colorimetric sensor using nanoparticles (US patent application 15/234,393)</li> <li>3. Fluorescent sensor for mercury (US patent 8,062,893)</li> </ol>
제 2 세부 [성균관대 신소재]	<p style="text-align: center;"><b>종이 기반의 색변화 센서; 나노입자의 장시간 보관을 위한 처리 기술</b></p> 	<p>○ 논문</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Analyst, 2014, 139 (24), 6486-6493</li> <li>2. Analyst, 2016, 141, 3890-3897</li> </ol> <p>○ 특허</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 기판에 고정화, 재분산 및 검지가 가능한 나노 입자 기반의 색변환 센서 및 이의 제조 방법 (등록: 10-1834642)</li> <li>2. 안정적인 나노구조체 및 상기 나노구조체를 이용한 센서 (등록: 10-1509398)</li> <li>3. 바닷물 내에서 안정적인 나노입자 복합체를 포함하는 조성물 및 그 제조방법 (등록: 10-1725582)</li> </ol>

기관	기술 내용	관련 실적
제 1 협동 [숙명여대 화공생명]	<p style="text-align: center;"><b>다양한 유전공학적 기법을 이용한 바이러스 설계 및 조립</b></p> 	<p>○ 논문</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2010, 107, 28, 12475-12480</li> <li>2. Nat. Neurosci., 2012, 15, 10, 1399-1406</li> <li>3. PLOS Comput. Biol., 2006, 2, 9, 1001-1016</li> <li>4. PLOS Comput. Biol., 2009, 5 2, e1000283</li> </ol>
제 1 협동 [숙명여대 화공생명]	<p style="text-align: center;"><b>레트로바이러스 역전사효소 Engineering</b></p> 	<p>○ 논문</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2010, 107, 28, 12475-12480</li> </ol>
제 1 협동 [숙명여대 화공생명]	<p style="text-align: center;"><b>다양한 RNA 바이러스의 외피단백질 (Envelope protein)을 가지고 있는 모델 바이러스 생산 및 표면증폭라만분광법 (Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS))를 이용한 바이러스 감별</b></p> 	<p>○ 논문</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Anal. Chem., 2015, 87, 23, 11652-11659</li> </ol>
제 2 협동 [팜스웰메 디컬]	<p style="text-align: center;"><b>3M Protein Swap Reader 3M Allergy Swap Reader</b></p> 	<p>○ 상용화 : 3M Protein Swap Reader, 3M Allergy Swap Reader</p> <p>○ Technology: Colorimetric</p> <p>○ 성능 : 수 ppt 농도 검출 결과값 예측 및 정량기능</p>

기관	기술 내용	관련 실적
제 2 협동 [팜스웰메 디컬]	<b>마이크로유동 제어 및 분석 기술</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기술보유:플렉서블 Time-Temperature Indicator 제작 기술</li> <li>○ 특허               <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 다성분 동시 정량 분석용 측방 유동 디바이스 (등록: 10-1412777)</li> <li>2. 전개형 플렉서블 온도 적산 표시장치 및 그 제조방법 (등록: 10-1412628)</li> </ol> </li> </ul>
		
제 2 협동 [팜스웰메 디컬]	<b>Handheld PCR System</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기술보유 : Handheld PCR 시스템 기술 보유</li> <li>○ 특징 : 4 samples, Bio-rad PCR system과 동등 사양의 성능 평가</li> </ul>
		
제 2 협동 [팜스웰메 디컬]	<b>Lateral Flow Strip용 Incubator</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 상용화 : 3M, Medexx Korea</li> <li>○ 특징 : 2,3 channel 동시 배양</li> </ul>
		
제 2 협동 [팜스웰메 디컬]	<b>Microarrayer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기술보유 : Microarray System 제작 기술 개발(Prototype 제작)</li> <li>○ 기술 : Automation System 설계, 기술 보유</li> <li>○ 특징 : 4 chips array 3,600 spots per sub-microarray (9 x 9 mm)</li> </ul>
		
제 2 협동 [팜스웰메 디컬]	<b>Colony Counter</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 상용화 : 3M 건조필름배지용 Colony Counter</li> <li>○ 기술 : Image Analysis Technology</li> <li>○ 특징 : 자동 미생물 분류 및 숫자 계산</li> </ul>
		

3-4. 연구 추진 일정

차수	세부 개발 연구내용	수행기관 (주관/참여/위탁 등)	기술개발기간												비고	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1차 년도	종이 기반 미세유체 소자의 설계 및 이차원 lateral flow sheet의 유동 조건 분석	주관 (제 1 세부)	■	■	■	■										
	형광 나노재료 및 핵산 용액의 물성 파악 연구 및 종이 기반 기기와 시료간의 상호작용 연구	주관 (제 1 세부)			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	상용 전처리 추출기술의 적용	주관 (제 1 세부)							■	■	■	■	■	■	■	
	형광 기반의 검지 시스템 개발을 위한 형광 나노재료 및 소광재료 설계 및 합성	제 2 세부	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	핵산 서열에의 고분자 도입 및 이를 이용한 종이에의 기능화	제 2 세부			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	화학적 전처리 추출기술의 적용	제 2 세부					■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	구제역바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스의 염기서열 분석 및 이를 바탕으로 한 바이러스 검지용 핵산 탐침 (Probe) 서열 설계	제 1 협동	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	구제역 바이러스 및 조류 인플루엔자 바이러스 각각의 혈청형과 아형을 구분할 수 있는 핵산 탐침 염기서열 설계	제 1 협동			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	종이 기반 Lateral Flow kit에의 검지기기 형광 검출 알고리즘 설계	제 2 협동	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	설계단계 초기부터 의료기기 등록을 위한 절차 관련 사항을 적용한 체계도 작성 및 설계	제 2 협동	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	소형 형광 검지기기 설계를 위한 소자 선정 및 검출 모듈 성능 테스트	제 2 협동							■	■	■	■	■	■	■	
2차 년도	실험실에서 종이 기반 기기를 평가할 수 있는 실시간 모니터링 시스템 개발	주관 (제 1 세부)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
	구제역과 조류독감 바이러스 검지 lateral flow sheet의 원천 기술 확보 및 발광에 따른 검지 메커니즘 연구	주관 (제 1 세부)					■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	바이러스 추출 핵산의 특징 염기서열과 결합할 수 있는 핵산을 이용한 형광 분자 표지 (fluorescence molecular beacon) 개발	제 2 세부	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스 혈청형 또는 아형 구별을 위한 형광 기반의 다중 검지 시스템 개발	제 2 세부								■	■	■	■	■	■	
	역유전학 (Reverse genetics) 기법을 이용한 복제 능력이 제거된 모델 바이러스 생산	제 1 협동	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	모델 바이러스 RNA 유전체 추출 및 바이러스 검지 안정성 극대화 연구	제 1 협동									■	■	■	■	■	
	소형 형광 검출 모듈 설계 및 제작	제 2 협동	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
종이 기반 키트 적용한 연동 테스트 및 성능 평가	제 2 협동									■	■	■	■	■		
3차 년도	구제역과 조류독감 바이러스 감염 여부 및 아종 바이러스 구별을 위한 lateral flow sheet	주관 (제 1 세부)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		

차수	세부 개발 연구내용	수행기관 (주관/참여/위탁 등)	기술개발기간												비고
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	검출기기 개발														
	시작품 제작을 위한 위탁연구기관과의 상호 협력 및 최적화	주관 (제 1 세부)													
	바이러스 검출기기의 형광 신호 최적화 및 형광 신호와 바이러스 감염 여부간의 상호관계 해석	제 2 세부													
	바이러스 검출 성능 개선 연구 및 센서 안정도와 신뢰성 개선 연구	제 2 세부													
	실제 검지 상황을 모사한 야생 바이러스 생산	제 1 협동													
	전처리 기술을 바탕으로 한 야생 바이러스 RNA 유전체 추출 기술 개발	제 1 협동													
	Lateral Flow sheet Kit를 적용하여 검출 성능 확인	제 2 협동													
	통신/GPS 모듈이 추가된 바이러스 검지용 소형 형광 검출 장비 개발	제 2 협동													

3-5. 연구개발의 기술적 달성 목표

연구개발의 성능 목표	연구개발의 내용 및 정량지표
검출 가능한 대상 또는 바이러스의 종류	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 구제역 바이러스 (2 종 이상)</li> <li>○ 조류 인플루엔자 바이러스 (2 종 이상)</li> </ul>
분석 소요 시간	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기존 기술의 분석 시간 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 면역 크로마토그래피 : 0.5 시간</li> <li>- ELISA : ~ 2 시간</li> <li>- qRT-PCR : 6 시간 이상</li> </ul> </li> <li>○ 0.5시간 (면역 크로마토그래피와 동일)</li> <li>○ RNA 전처리 시간 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 바이러스 추출 : ~ 2시간</li> <li>- 바이러스에서 RNA 추출 : 30분</li> </ul> </li> </ul>
검출 신뢰도	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기존 기술의 검출 신뢰도 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 면역 크로마토 그래피 : 93%</li> <li>- ELISA : 95%</li> <li>- qRT-PCR : 96.6%</li> </ul> </li> <li>○ 95% 이상의 검출 신뢰도 (ELISA 수준 이상)</li> </ul>
검출 민감도	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ ~100 EID<sub>50</sub>/mL (면역 크로마토그래피 검출 민감도의 10배 이상)</li> </ul>
검출 키트의 크기	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기존 검출 키트의 크기 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 면역 크로마토그래피 : 4 × 70 (mm)</li> <li>- ELISA 플레이트 (96 well) : 85.4 × 127.6 (mm)</li> </ul> </li> <li>○ 개발 검출 키트의 크기 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 종이 기반 키트 : ~ 40 × 80 (mm)</li> <li>- 형광 검출기 : ~ 160 × 160 × 60 (mm)</li> </ul> </li> </ul>

#### 4) 연구수행 내용

- 제 1 세부 연구기관(성균관대학교 기계공학부)

① 종이 기반 미세유체 소자의 설계 및 이차원 lateral flow sheet의 유동 조건 분석

■ 종이 기반 미세유체 소자 구성 및 설계를 위한 최적의 재료 선정

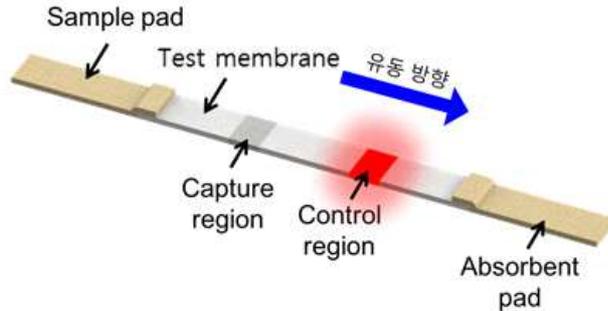


그림 31. 종이 기반 미세유체 소자의 구성

- 본 연구에서 사용될 종이 기반 미세유체 소자의 구성은 그림 31과 같이 용액을 흘려 주는 부분인 sample pad, capture region과 control region을 통해 결과를 분석하는 test membrane 그리고 흐른 용액이 저장되는 absorbent pad로 구성됨.
- 종이 기반 미세유체 소자의 각 부분에서 사용될 재료 후보군을 선정하기 위해 그림 32와 같이 다양한 종이의 섬유 구조를 SEM 이미지를 통해 확인함.
- 섬유 구조에 따라 sample pad는 Whatman 사의 CF3와 CF5 그리고 chromatography paper를 후보군으로 선정하였으며 absorbent pad의 후보군은 Whatman 사의 CF3, CF5, chromatography paper 그리고 Millipore 사의 absorbent pad로 선정함.
- Test membrane은 종이에 고분자 및 형광 분자 표지의 기능화가 용이하고 자체적인 형광이 없어야 하며 DNA 용액이 잘 흐를 수 있는 종이를 선정해야하기 때문에 8가지 종이를 모두 후보군으로 선정하고 선정을 위한 실험을 진행함.

CF3 (Whatman)	CF5 (Whatman)	Standard17 (Whatman)	Chromatography paper(Whatman)
Glass fiber filter (Whatman)	Nitrocellulose membrane (Whatman)	Absorbent pad (Millipore)	Conjugate pad (Millipore)

그림 32. 다양한 종이의 SEM image

■ 이차원 lateral flow sheet의 유동 조건 및 재료별 형광 특성 분석

- Sample pad와 absorbent pad 그리고 test membrane을 선정하기 위해 표 7과 같이 후보군의 공극률, 공극의 크기, total intrusion volume을 automatic porosimeter를 이용해 측정

함.

- Sample pad는 용액을 흘려주는 데에 목적이 있으므로 total intrusion volume이 작은 Whatman 사의 CF3로 선정하였고, absorbent pad는 용액을 흡수하는 데에 목적이 있으므로 total intrusion volume이 큰 Millipore 사의 absorbent pad로 선정함.

표 7. Sample pad, absorbent pad 그리고 test membrane의 후보군 및 물성

	제품명 (회사명)	공극률	공극의 크기 (μm)	Total intrusion volume (mL/g)
Sample pad	CF3 (Whatman)	0.589	3.195	1.0502
	CF5 (Whatman)	0.716	4.851	1.7929
	Chromatography Paper (Whatman)	0.585	11	1.1814
Absorbent pad	CF3 (Whatman)	0.589	3.195	1.0502
	CF5 (Whatman)	0.716	4.851	1.7929
	Chromatography Paper (Whatman)	0.585	11	1.1814
	Absorbent pad (Millipore)	0.767	7.739	2.2811
Test membrane	CF3 (Whatman)	0.589	3.195	1.0502
	CF5 (Whatman)	0.716	4.851	1.7929
	Standard17 (Whatman)	0.875	34.74	7.4013
	Chromatography Paper (Whatman)	0.585	11	1.1814
	Glass fiber filter (Whatman)	0.864	3.882	6.4702
	Nitrocellulose membrane (Whatman)	0.454	0.191	0.5975
	Absorbent pad (Millipore)	0.767	7.739	2.2811
	Conjugate pad (Millipore)	0.909	68.24	6.7564

- 종이 내 유동을 평가하기 위해서 test membrane의 후보군으로 선정된 종이에 DNA buffer 용액(10 mM Tris+50 mM NaCl+1 mM MgCl<sub>2</sub>)을 흘려 유동을 보았으며 결과는 그림 33과 같음.
- Whatman 사의 NC membrane에서 유속이 가장 느리며 Millipore 사의 absorbent pad에서 유속이 가장 빠름.

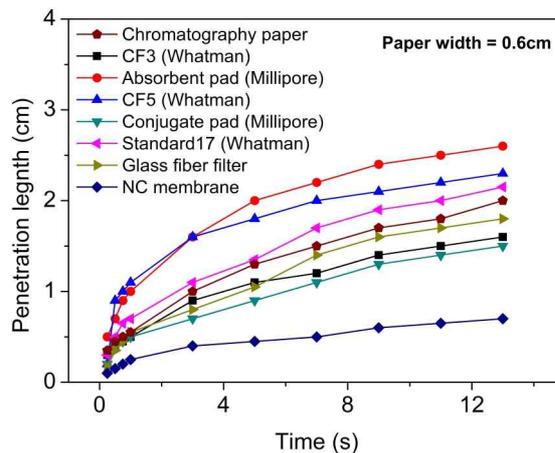


그림 33. 다양한 종이를 이용한 시료 용액 유동실험 결과

- Test membrane을 선정하기 전에 test membrane 자체의 형광이 capture region과 control region에서 발광되는 형광과 간섭을 일으킬 수 있기 때문에 형광 관찰용 현미경을 이용하여 종이 자체의 형광 특성을 측정함.
- 종이 형광을 측정하기 위해 초록색 파장대역 (540±25 nm)을 이용하여 빨간색 파장대역 (605±55 nm)을 측정하는 TRITC 형광 필터, 파란색 파장대역 (480±30 nm)을 이용하여 초록색 파장대역 (535±45 nm)을 측정하는 FITC 형광 필터 그리고 자외선 파장대역 (375±28 nm)을 이용하여 파란색 파장대역 (460±60 nm)을 측정하는 DAPI 형광 필터를

사용함.

- 그림 34와 같이 빛 노출시간에 따라 종이 형광을 측정하였으며 Whatman 사의 CF3, CF5 그리고 Millipore 사의 absorbent pad는 종이 자체의 형광이 뚜렷하게 드러나서 test membrane의 후보군에서 제외함.
- Test membrane은 남은 후보군에서 DNA 유동 여부와 형광 분자 표지의 기능화 정도를 평가하여 선정함.

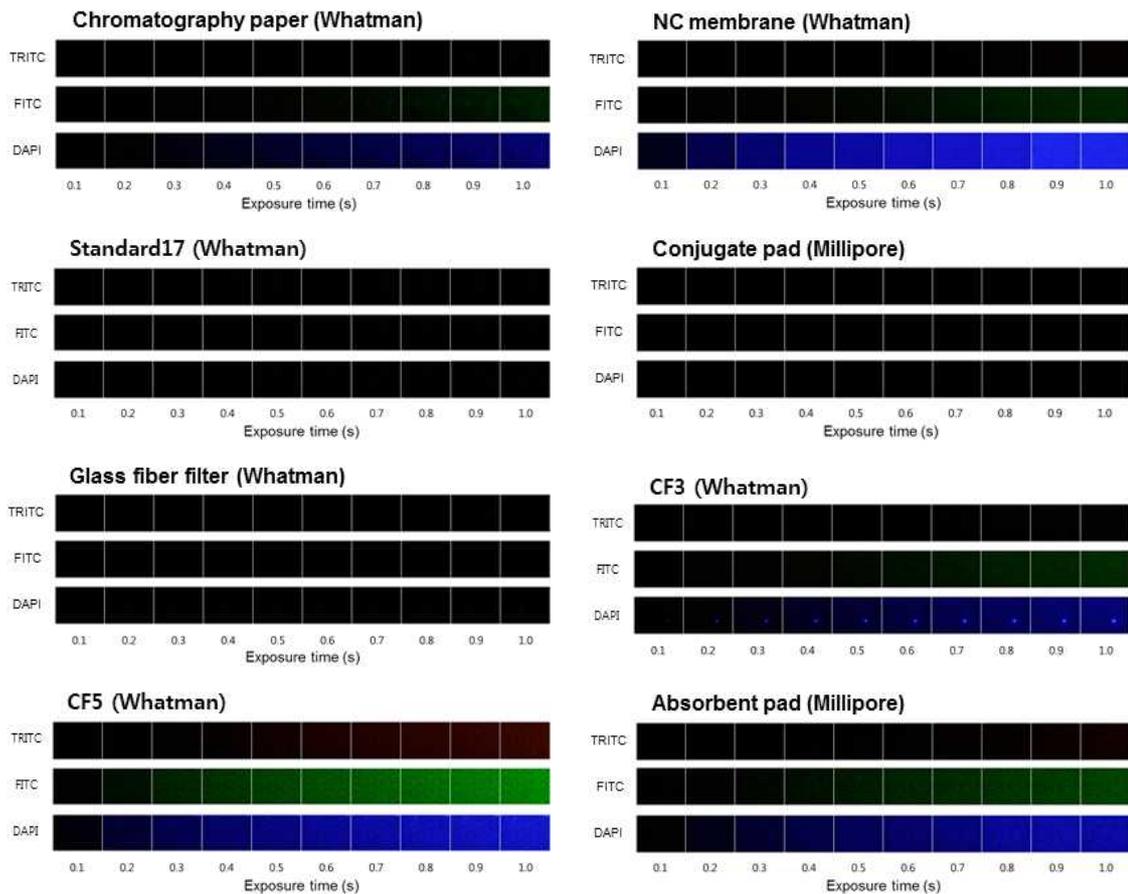


그림 34. 다양한 종이의 형광 특성

② 형광 나노재료 및 핵산 용액의 물성 파악 연구 및 종이 기반 기기와 시료간의 상호작용 연구

■ 종이 기반 기기에서의 DNA와 DNA 용액의 거동 관측

- DNA가 포함된 용액이 종이 칩에서 잘 흐르는지를 관측하기 위해 picogreen dye로 염색된 DNA를 이용한 유동실험을 진행함.
- Picogreen dye는 DNA와 반응해야만 형광을 띄며 파란색 파장대역 (485 nm)을 받으면 초록색 파장대역 (528 nm)을 발광하는 특성을 가짐.
- Picogreen이 염색된 DNA의 거동을 형광 관찰용 현미경에 FITC 필터를 장착하여 관측함.

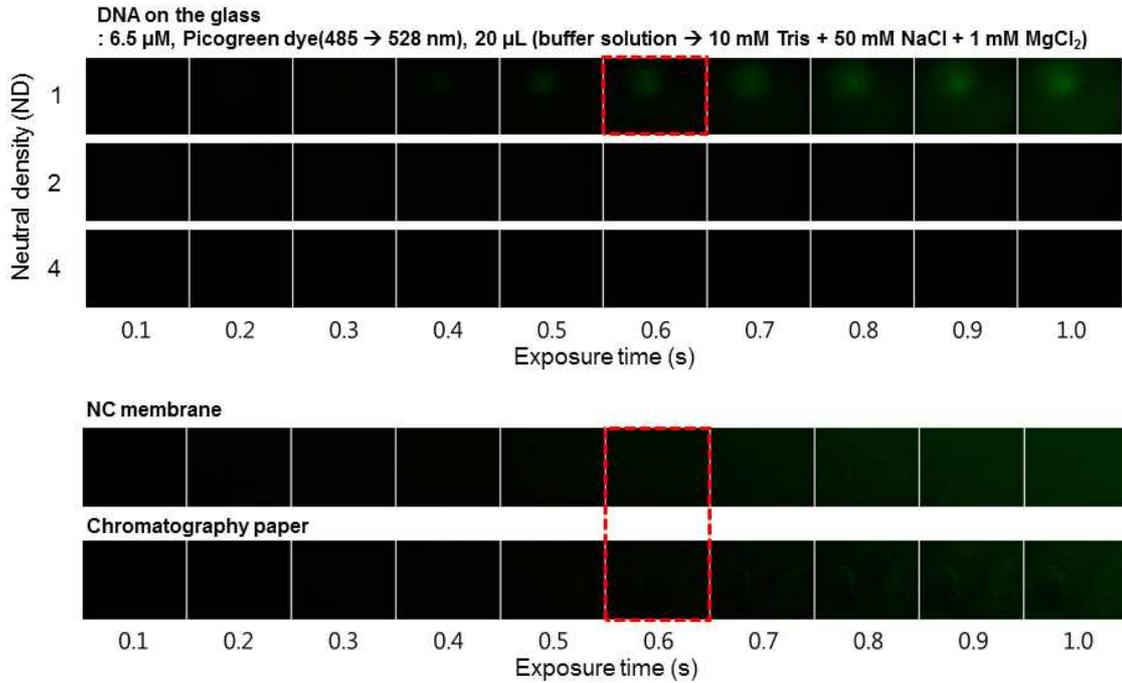


그림 35. 유리기판위에서의 DNA 형광 및 종이 형광

- DNA 거동을 관측하기 이전에 염색된 DNA가 현미경으로 잘 관측되는 조건을 확립하기 위해 DNA를 유리기판 위에 떨어뜨린 후, 그림 35와 같이 형광세기와 노출 시간을 변경하여 관측함. 형광 세기는 ND 필터로 제어되며 낮은 값을 가질수록 형광이 강해짐.
- 노출시간을 0.7 s 이상으로 했을 때는 NC membrane과 chromatography paper에서 종이 자체의 형광이 발광되기 때문에 DNA 형광과 간섭을 일으키지 않은 0.6초의 노출 시간, ND 값은 1인 조건을 설정하여 DNA 유동실험을 진행함.

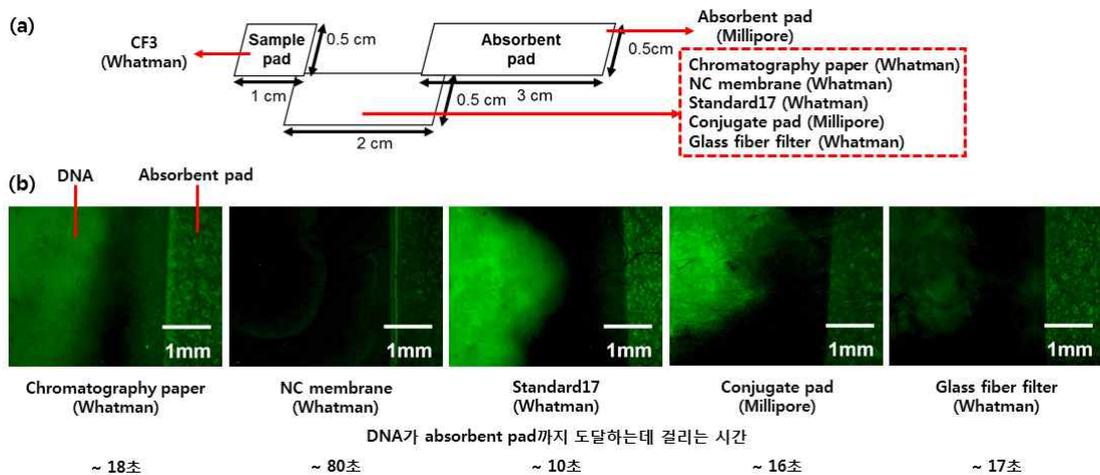


그림 36. (a) DNA 유동 실험을 위한 종이 칩,  
(b) 다양한 test membrane에서의 DNA 유동 실험

- 유동실험에서는 그림 36.(a)와 같이 종이 칩을 디자인하고 이 종이 칩에 6.5  $\mu$ M DNA 용액 60  $\mu$ L를 sample pad에 떨어뜨려 absorbent pad까지 형광이 도달하는 시간을 측정함.
- 그림 36.(b)에서와 같이 DNA가 absorbent pad까지 도달하는 시간은 Whatman 사의 NC membrane을 사용했을 때 약 80 초 정도로 가장 느리며 Whatman 사의 standard17을 사용했을 때 약 10 초로 가장 빠름.



그림 37. 종이 칩에서의 유체의 거동 및 결과

- 또한, 종이 칩에서 유체의 거동이 DNA 거동과 비슷한지 알아보기 위해 그림 37과 같이 파란색 잉크를 첨가한 buffer solution 60  $\mu$ L를 sample pad에 떨어뜨려 유체가 absorbent pad까지 도달하는 시간을 측정함.
- 유체가 absorbent pad까지 도달하는 시간은 Whatman 사의 NC membrane을 사용했을 때 약 71.9 초 정도로 가장 느리며 Whatman 사의 standard17을 사용했을 때 약 9.6 초로 가장 빠름.
- 위 두 가지 실험을 통해 종이 칩에서 DNA와 DNA 용액의 거동에 큰 차이가 없다는 것을 알 수 있음.

■ 고분자의 기능화에 따른 test membrane 선정

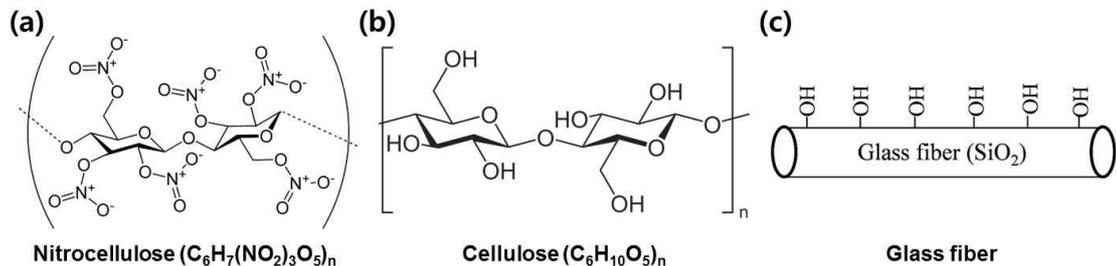


그림 38. 종이 구성섬유의 화학구조 (a) NC membrane, (b) chromatography paper, (c) glass fiber filter, conjugate pad 그리고 standard17

- 본 연구에서 사용할 test membrane을 선정하기 위해 유동실험 이외에도 종이 섬유에 형광 분자표지의 기능화 가능 여부를 살펴봐야 함.
- 이에 종이의 구성섬유의 화학구조를 찾아보았으며 그림 38과 같음.
- 제 2세부에서 종이에 형광분자표지 기능화를 위한 고분자를 종이표면에 기능화하는 과정에는 종이의 하이드록실기(-OH)를 클로로아세트산( $\text{ClCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ )과 수산화나트륨( $\text{NaOH}$ )를 이용하여 카르복실기(-COOH)로 치환이 필요함.
- 하지만 NC membrane은 구성 섬유가 nitrocellulose로 종이 표면이 -OH가 아닌 -ONO<sub>2</sub>로 구성되어 (그림 38.(a)) 기능화가 불가능하여 후보군에서 제외함.
- Chromatography paper의 종이 구성 섬유는 cellulose (그림 38.(b)) 그리고 glass fiber filter, conjugate pad 그리고 standard17은 glass fiber (그림 38.(c))로 구성되어 있기 때문에 고분자 기능화가 가능함.
- 또한, 고분자를 기능화하는 과정마다 종이 표면에 남은 화학물질을 제거하기 위해 washing 과정이 있는데 chromatography paper는 washing 과정에서 종이가 형상을 유지하지 못하기 때문에 test membrane 후보군에서 제외함.
- 따라서, test membrane의 최종 후보군은 Whatman 사의 standard17과 glass fiber filter 그리고 Millipore 사의 conjugate pad로 선정됨.
- 최종 test membrane은 차년도에서 선정할 예정이며 최종 후보군 종이 표면에 형광 분자표지를 기능화한 후, DNA를 떨어뜨려 각 종이에서 발현되는 형광 및 형광의 분포, 반응성 등을 판단하여 최종 선정할 예정임.

③ 상용 전처리 추출기술을 활용한 물리적 전처리 방법 연구

■ 상용화 전처리 제품 조사 그리고 전처리 기기 및 시료 선정

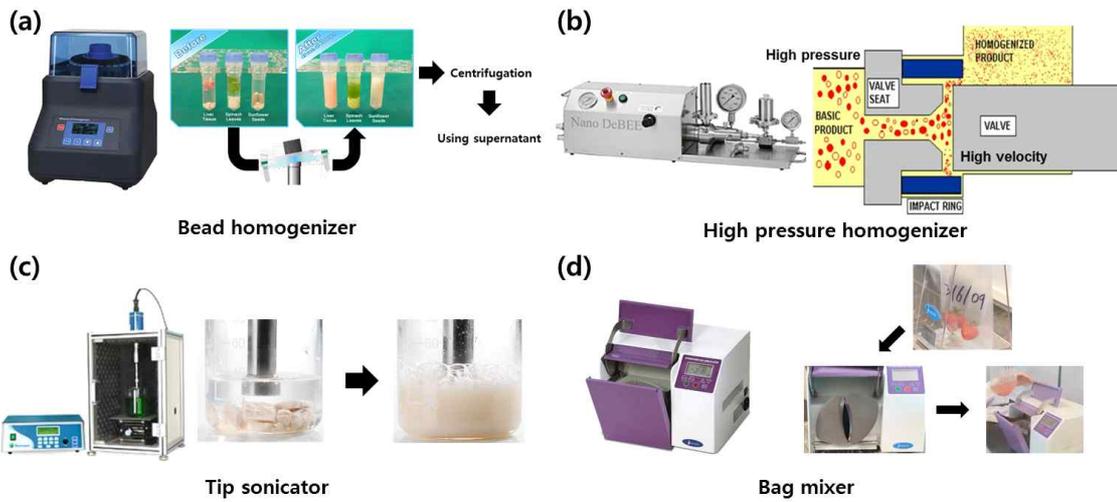


그림 39. 상용화 전처리 제품 및 시료 전처리 원리

- 본 연구에서는 상용화된 전처리 제품을 이용하여 시료들을 물리적으로 전처리하였을 때 DNA가 추출되는지 여부를 확인하고자 함.
- 상용화 되어있는 전처리 제품에는 그림 39와 같이 bead를 이용하여 시료를 물리적으로 파쇄하여 전처리하는 bead homogenizer, 고압을 이용하여 시료를 분쇄하는 high pressure homogenizer, 초음파를 이용하여 시료를 분쇄하는 tip sonicator 그리고 시료를 bag에 넣고 철판으로 강하게 때려 시료를 분쇄하는 bag mixer 등이 있음.
- Bead homogenizer와 high pressure homogenizer는 장비 가격이 너무 높아 접근성이 낮기 때문에 tip sonicator과 bag mixer를 이용한 전처리 실험을 진행함.
- 전처리에 사용할 시료는 일반적으로 구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스를 검출할 때 쓰이는 조직시료와 바이러스가 전파되는 경로 중 하나인 사료를 선정함.

■ 선정된 전처리 기기와 시료를 이용한 물리적 전처리

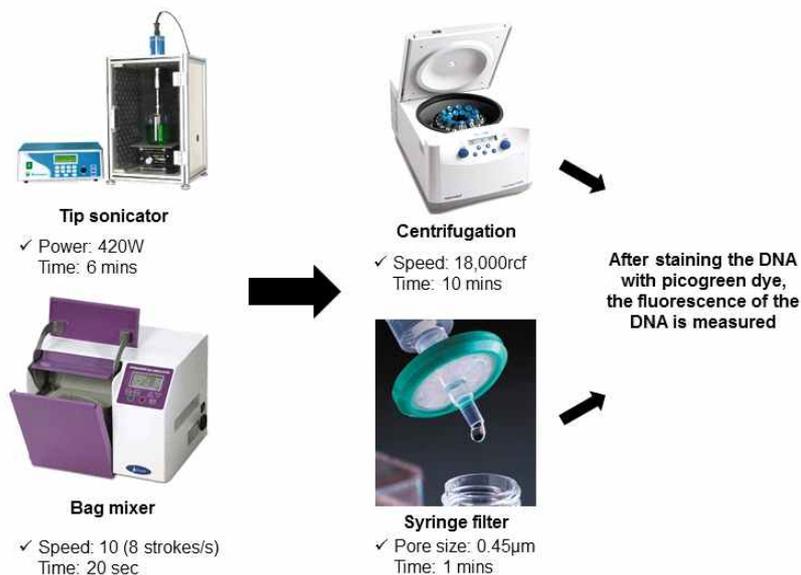


그림 40. Tip sonicator와 bagmixer를 이용한 전처리 과정

- Tip sonicator와 bag mixer를 사용하여 사료시료를 전처리하는 과정은 그림 40과 같음.
- 사료시료를 tip sonicator과 bag mixer로 분쇄하고 원심분리기와 주사기 필터로 용액에 남

아있는 부유물을 제거함.

- 물리적 전처리로 DNA가 추출되는지 여부를 판단하기 위해 6.5  $\mu\text{M}$  DNA용액을 10  $\mu\text{L}$  떨어뜨리고 말린 사료시료와 떨어뜨리지 않은 사료 시료 두 가지를 준비해 비교 분석함.
- 사료시료에서 추출된 DNA의 농도를 측정하기 위하여 DNA에만 염색되는 picogreen dye를 사용하여 DNA를 염색하고 형광검출기를 이용하여 형광의 세기를 측정함.

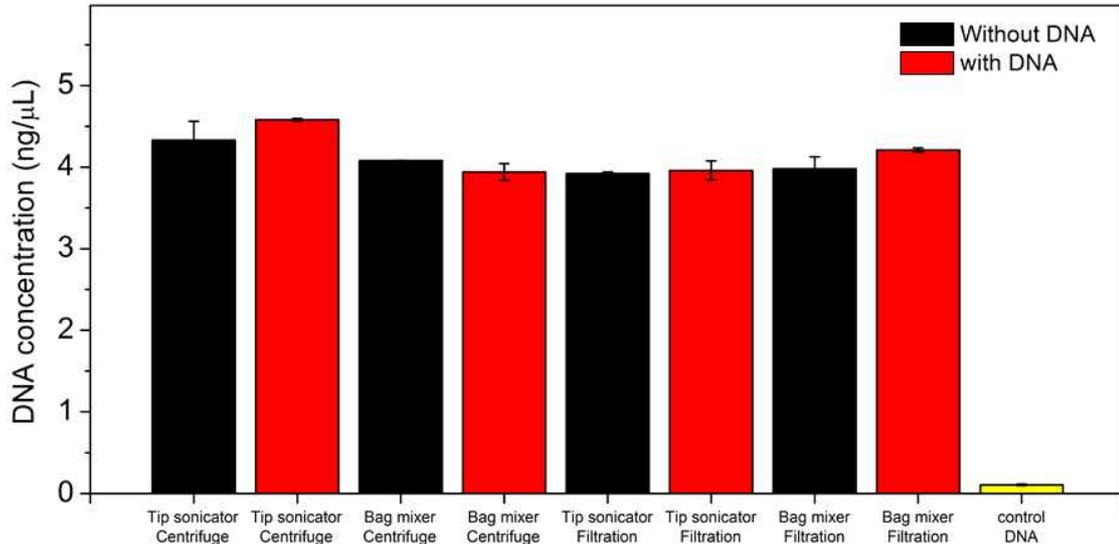


그림 41. 사료시료의 물리적 전처리 결과

- 측정 결과는 그림 41과 같으며 사료시료를 물리적으로 전처리하면 DNA가 추출되며 주사기 필터를 사용하는 것과 원심분리기를 사용하는 것 사이에 차이가 없음을 알 수 있음.

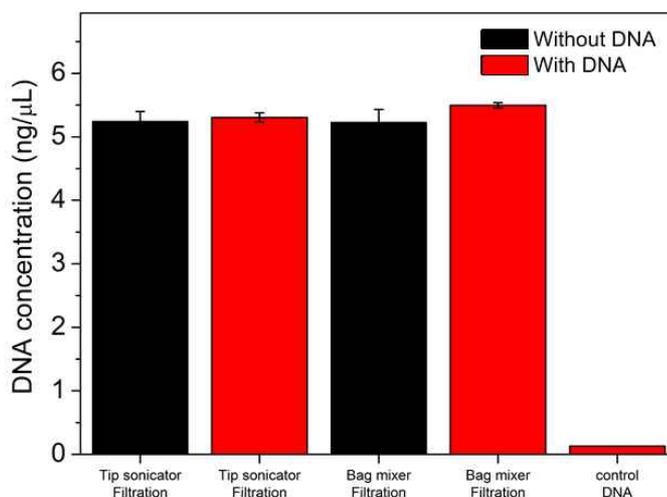


그림 42. 조직시료의 물리적 전처리 결과

- 조직시료는 사료시료와 동일하게 6.5  $\mu\text{M}$  DNA용액을 10  $\mu\text{L}$  떨어뜨리고 말린 조직시료와 떨어뜨리지 않은 조직시료 두 가지를 준비하고 전처리를 진행하였음.
- 주사기 필터를 사용하는 것과 원심분리기를 사용하는 것 사이에 차이가 없기 때문에 조직시료의 경우 주사기 필터만 사용하여 전처리용액을 여과하고 여과된 용액의 DNA 측정을 진행하였고 결과는 그림 42와 같음.
- Tip sonicator와 bag mixer를 사용하여 사료시료와 조직시료를 물리적으로 전처리한 결과가 크게 다르지 않아 추후 휴대성이 좋아 현장에서 사용 가능한 bag mixer와 주사기 필터를 사용하는 것이 좋음.

④ 실험실에서 종이기반 기기를 평가할 수 있는 실시간 모니터링 시스템 개발

- 형광 분자 표지(fluorescence molecular beacon)의 형광 발현 분포에 따른 test membrane 선정
- 고분자의 기능화 가능 여부와 고분자를 기능화하는 과정에서의 종이 평가를 통해 정한 test membrane의 최종 후보군은 Whatman 사의 standard 17과 glass fiber filter 그리고 Millipore 사의 conjugate pad임.

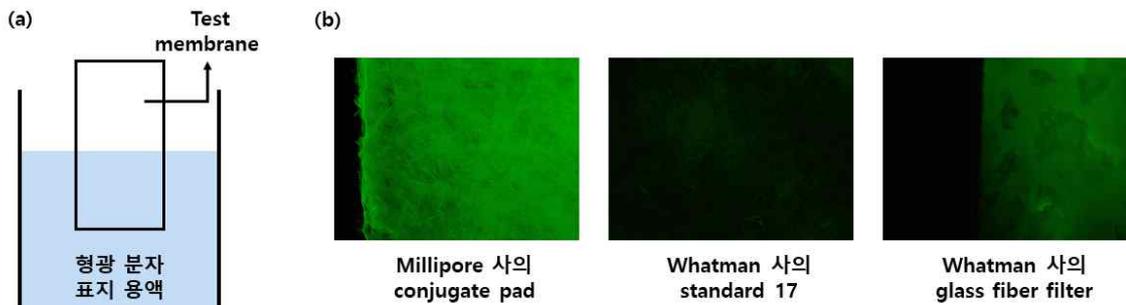


그림 43. (a) Test membrane의 형광 분자 표지 기능화 방법 및 (b) 각 후보군에서의 형광 분자 표지의 형광 발현 실험 결과

- 그림 43.(a)와 같이 고분자가 기능화된 종이의 한 부분을 5  $\mu\text{M}$  형광 분자 표지 용액에 넣어 반응을 시켜 형광 분자 표지를 기능화하고 기능화한 종이에 0.5  $\mu\text{M}$  target DNA 용액 50  $\mu\text{L}$  를 떨어뜨려서 형광의 발현 및 분포를 관찰함.
- 형광 분자 표지에 붙어있는 형광 나노재료는 56-FAM으로 파란색 파장대역 (495 nm)을 받으면 초록색 파장대역 (520 nm)을 발광하는 특성을 갖고 있으므로 파란색 파장대역 ( $480 \pm 30$  nm)을 이용하여 초록색 파장대역 ( $535 \pm 45$  nm)을 측정하는 FITC 형광 필터를 사용함. 낮은 값을 가질수록 형광 세기가 강해지는 ND (neutral density) filter의 값은 1로 노출 시간은 0.6 초로 설정하여 형광 발현 분포 실험을 진행하였으며 이를 형광 관찰용 현미경을 이용하여 결과를 관찰함.
- 형광 발현 실험의 결과는 그림 43.(b)와 같으며 실험 결과와 같이 Whatman 사의 standard 17에서는 형광 분자 표지가 기능화되지 않아 형광이 나타나지 않았으며 Millipore 사의 conjugate pad와 Whatman 사의 glass fiber filter에서는 형광이 나타났으나 Millipore 사의 conjugate pad에서의 형광 발현 분포가 가장 좋게 나타남.
- 실험 결과에 따라 Millipore 사의 conjugate pad를 test membrane으로 선정함.

■ 종이 기반 미세유체 소자에서 capture/control region의 제작을 위한 시스템 구축

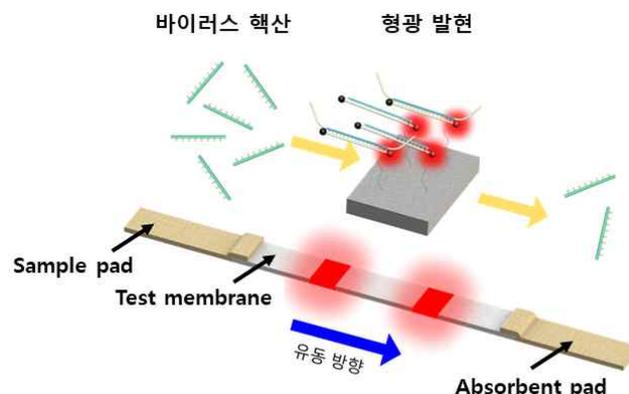


그림 44. 바이러스 핵산으로 인한 test membrane에서의 형광 발현

- 그림 44와 같이 test membrane에서 형광 분자 표지를 기능화한 특정 부분에서만 바이러스

핵산의 유무에 따라 형광이 발현되어야 함. 따라서, test membrane의 특정 부분에만 형광 분자 표지를 기능화하기 위한 실험을 진행함.

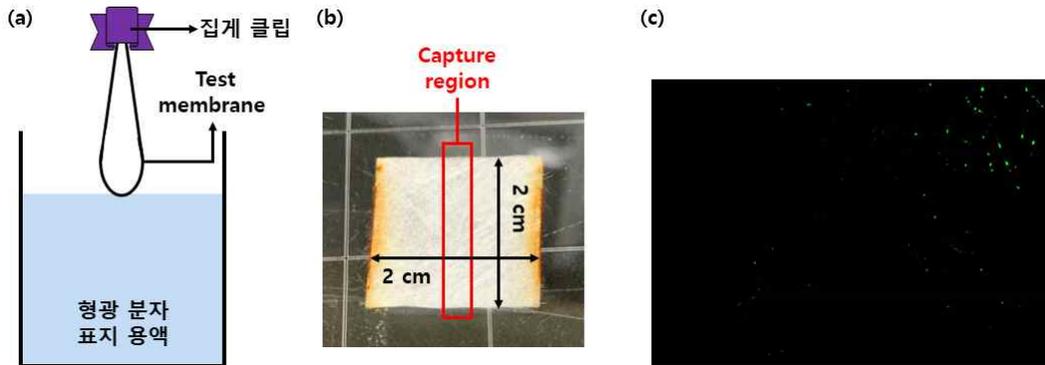


그림 45. (a) 집게 클립을 이용한 형광 분자 표지 기능화 방법, (b) 형광 분자 표지가 기능화된 종이 그리고 (c) target DNA를 종이에 흘려준 결과

- 그림 45.(a)와 같이 집게 클립을 이용하여 고분자가 기능화된 test membrane의 양 끝단을 고정하고 test membrane에서 형광 분자 표지를 기능화하고자 하는 부분만 5  $\mu$ M 형광 분자 표지 용액에 닿게하여 형광 분자 표지의 기능화를 진행하였으며 기능화를 완료한 종이는 그림 45.(b)와 같음.
- 그림 45.(b)와 같이 특정 부분에 형광 분자 표지를 기능화한 종이에 0.5  $\mu$ M target DNA 용액 50  $\mu$ L를 떨어뜨려주고 형광의 발현을 관찰하여 형광 분자 표지가 종이에 잘 기능화 되었는지를 확인함.
- 관찰 결과는 그림 45.(c)와 같으며 그림과 같이 형광의 세기가 약할 뿐만 아니라 형광의 분포가 매우 낮다는 것을 통해 집게 클립을 이용하여 형광 분자 표지를 종이에 기능화하는 방법은 적합하지 않다는 결과를 얻음.

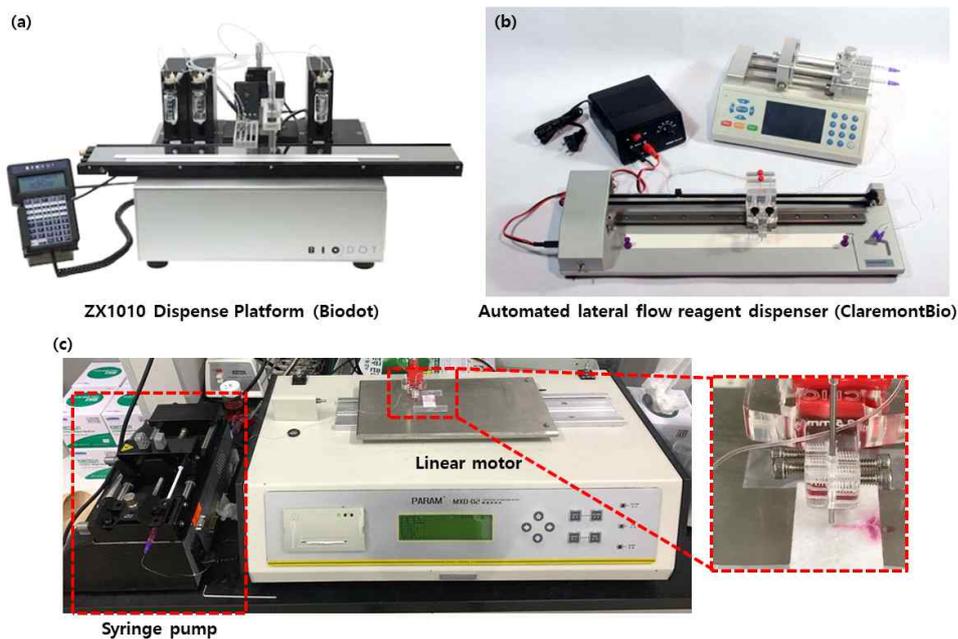


그림 46. Dispensing system (a) Biodot 사의 ZX1010 dispense platform, (b) ClaremontBio 사의 automated lateral flow reagent dispenser 그리고 (c) Capture 및 control region 제작을 위해 구축한 dispensing system

- 이를 해결하기 위해 상용화되어있는 제품을 조사하였으며 그림 46.(a)와 같이 주사기 바늘이 고정되어 있고 종이를 고정한 판이 움직이면서 line을 그려주는 Biodot 사의 ZX1010

dispense platform과 반대로 그림 46.(b)와 같이 종이를 고정한 판은 고정되고 주사기 바늘이 움직이면서 line을 그려주는 ClaremontBio 사의 automated lateral flow reagent dispenser 제품을 참고하여 형광 분자 표지를 line으로 그려주기 위한 dispensing system을 제작함.

- 주사기 펌프와 linear motor를 이용하여 그림 46.(c)와 같이 linear motor 위의 판에 종이를 고정하고 이 판이 움직임에 따라 line을 그려줄 수 있는 dispensing system을 구축함. 해당 시스템을 이용하여 test membrane에 capture region 및 control region을 제작함.

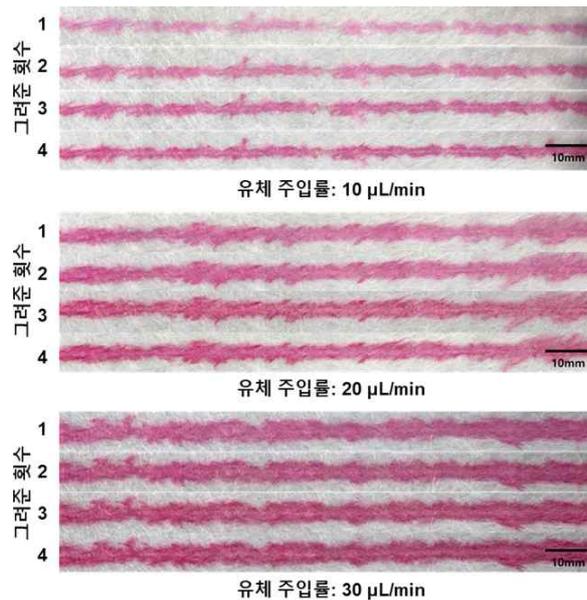


그림 47. Dispensing system에서 유체 주입률 및 그려준 횟수에 따른 line 형성 결과

- 구축한 dispensing system에서 linear motor의 판이 움직이는 속도는 150 mm/min으로 고정되어 있기 때문에 빨간색 잉크가 섞인 DI water를 1 mL 주사기에 넣고 주사기 펌프의 유체 주입률을 바꿔가며 test membrane에 line을 그려주는 조건을 설정하기 위한 실험을 진행함.
- 조건을 설정하기 위한 실험은 주사기 펌프의 유체 주입률에 따른 선의 두께 변화 및 같은 위치에 한 시간 간격으로 line을 중복으로 그려줌에 따른 색깔 변화를 관찰하는 실험으로 실험 결과는 그림 47과 같음.
- 그림 47과 같이 주사기 펌프의 유체 주입률이 10, 20 그리고 30 µL/min 일 때, 그려진 line의 두께는 각각 약 2.5, 3.5 그리고 5 mm이며 한 시간 간격으로 line을 중복으로 그렸을 때 색깔이 진해지며 line의 두께에는 변화가 없다는 결과를 도출함으로써 test membrane에 line을 제작하는 데에 주사기 펌프의 유체 주입률을 20 µL/min으로 설정함.

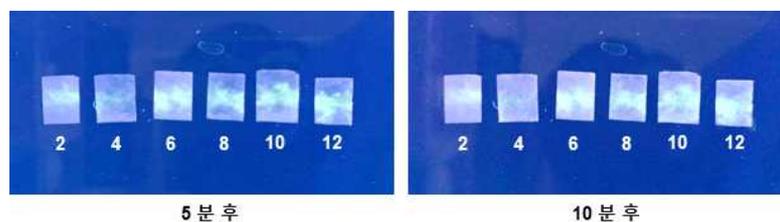


그림 48. 자외선 발광기를 이용한 종이 위의 형광 분자 표지 기능화 확인 실험 결과

- 5 µM 형광 분자 표지 용액을 넣은 주사기와 설정한 조건으로 맞춘 dispensing system을 이용하여 크기가 1 cm × 1.3 cm인 고분자가 기능화된 test membrane의 중간 부분에 2, 4, 6, 8, 10 그리고 12 번 중복으로 line을 그려주고 해당 종이에 5 µM target DNA 용액 50 µL를 떨어뜨리고 자외선 발광기를 이용하여 형광 분자 표지가 잘 기능화 되었는지를 확

인함.

- 자외선 발광기를 이용하여 확인한 결과는 그림 48과 같으며 target DNA 용액을 떨어뜨리고 5 분 후와 10 분 후를 확인해주었을 때에 test membrane의 가운데 부분에만 형광이 발현되는 결과를 확인함으로써 구축한 dispensing system을 이용하여 test membrane의 특정 부분에 형광 분자 표지를 기능화 할 수 있다는 것을 확인함.
- 또한, 그림 48을 통해서 5  $\mu$ M 형광 분자 표지 용액을 2 번 그리고 4 번 중복으로 그려주었을 때의 형광의 세기가 6 번 중복으로 그려주었을 때에 비해 비교적 약하고 6 번 이상 중복으로 그려주었을 때는 line에서의 형광의 세기가 비슷하게 나타남.

■ 제작한 형광 분자 표지의 모니터링을 위한 형광 관찰용 현미경 조건 설정

- 형광 분자 표지를 기능화하는 방법이 고분자가 기능화된 종이를 형광 분자 표지 용액에 담귀서 기능화를 하는 방법에서 dispensing system을 이용하여 그려주는 방식으로 변경됨으로써 형광 관찰용 현미경을 통해 형광 분자 표지를 모니터링하는 조건 역시 변경해야함.
- 이를 위해 형광 분자 표지를 기능화한 종이에 5  $\mu$ M target DNA 용액을 떨어뜨려 반응시키고 현미경의 프로그램 내부의 노출 시간, 형광 현미경의 ND filter 그리고 대물렌즈를 바꿔가면서 형광 모니터링에 있어 최적의 조건을 설정함.

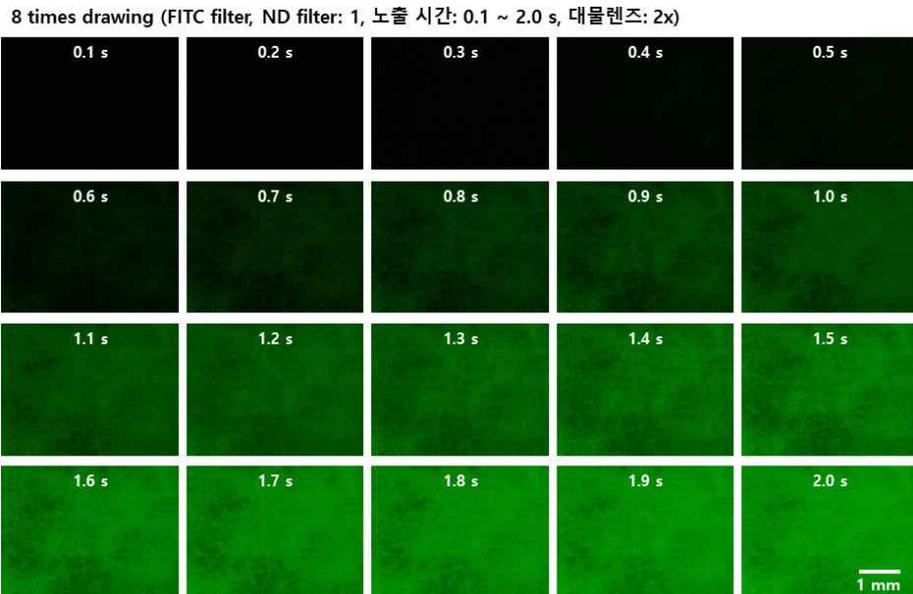


그림 49. 노출 시간 변화에 따른 형광 관찰 결과

- 대물렌즈를 2배 렌즈를 사용하고 ND filter의 값을 1로 설정한 후, 5  $\mu$ M target DNA 용액을 떨어뜨리고 노출 시간을 0.1 초에서 2.0 초까지 변경하면서 형광의 발현 정도를 관찰한 결과는 그림 49와 같으며 그림과 같이 노출 시간을 2.0 초로 설정했을 때에 형광이 잘 관찰된다는 것을 알 수 있음.

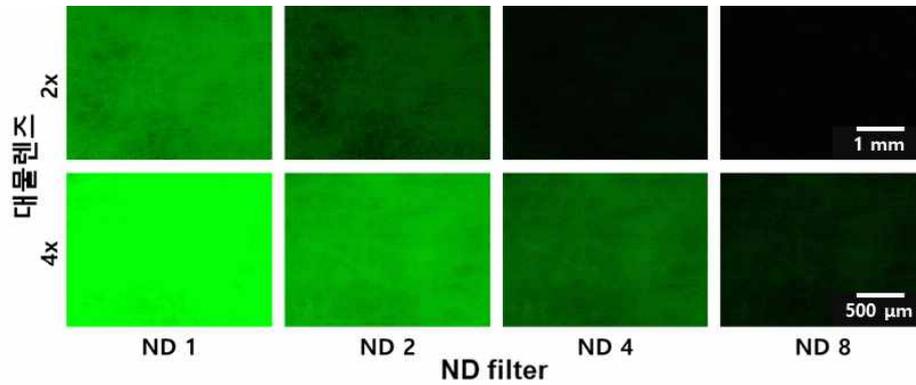


그림 50. 대물렌즈의 배율 및 ND filter 값의 변화에 따른 형광 관찰 결과

- 노출 시간을 2.0 초로 고정하고 대물렌즈의 배율과 ND filter의 값을 변경하며 관찰되는 형광의 세기를 비교하였으며 그림 50과 같이 대물렌즈의 배율이 4배일 때에 관찰되는 형광의 세기가 가장 강하고 ND filter의 값이 감소함에 따라 형광의 세기가 감소하는 경향을 보임.
- 형광 분자 표지의 모니터링을 위해서는 형광의 세기 변화에 민감할 뿐만 아니라 종이를 비교적 넓은 범위에서 관찰할 필요가 있음. 이러한 이유로 형광을 모니터링하는 조건은 대물렌즈는 4배 렌즈, ND filter의 값은 1 그리고 노출 시간은 2.0 초로 설정함.

⑤ 구제역과 조류독감 바이러스 검지 lateral flow sheet의 원천 기술 확보 및 발광에 따른 검지 메커니즘 연구

■ 종이 상의 형광 분자 표지 기능화 조건 최적화

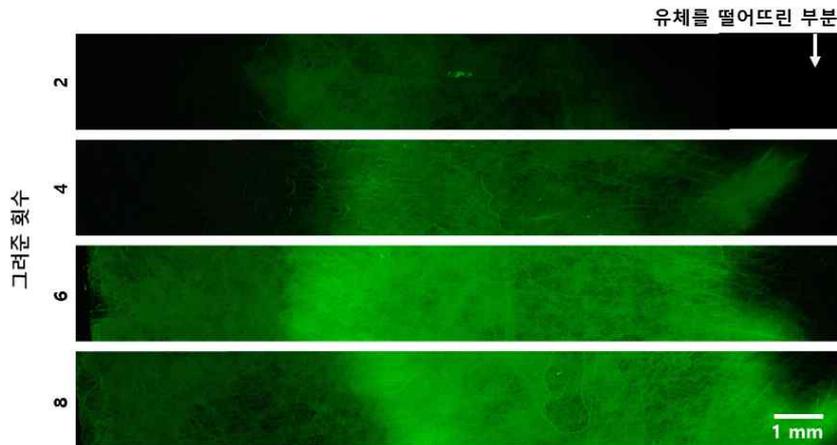


그림 51. 형광 분자 표지를 그려준 중복지수에 따른 형광 분자 표지의 거동

- 종이의 기능화된 고분자의 수는 한정되어있기 때문에 형광 분자 표지를 과량으로 그려준 종이에 target DNA 용액을 흘려주면 고분자에 반응하지 못한 여분의 형광 분자 표지의 형광이 용액을 흘려준 반대편에 나타날 수 있음.
- 이를 확인해주기 위해 고분자가 기능화된 종이의 중간 부분에 2, 4, 6, 8 번 중복으로 형광 분자 표지를 그려주고 한 쪽에서 5 μM target DNA 용액을 떨어뜨려 흘려주고 형광 발현을 관찰함으로써 형광 분자 표지를 그려주는 횟수를 최적화하고자 함.
- 그림 51과 같이 형광 분자 표지를 2, 4 번 중복으로 그려준 경우에는 용액을 떨어뜨린 반대편에서 형광이 나타나지 않았으나 6, 8 번 중복으로 그려준 경우에는 용액을 떨어뜨린 반대편에서 형광이 나타난다는 결과를 얻음으로써 최적의 형광 분자 표지를 그려주는 횟수는 4 번으로 이후 형광 분자 표지를 이용하여 test membrane에 capture/control region을 제작 시, 4 번 중복으로 그려주는 것으로 결정함.

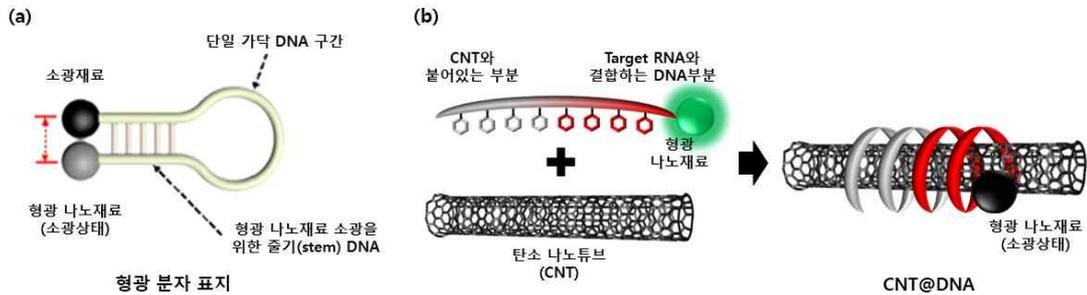


그림 52. (a) 형광 분자 표지의 구조 및 (b) CNT@DNA의 구조

- 형광 분자 표지의 구조는 그림 52.(a)와 같으며 시간이 지남에 따라 형광 분자 표지의 stem이 열려 형광이 발현된다는 문제점을 가지고 있기 때문에 이에 대한 문제점으로 인해 바이러스 검지를 위한 다른 물질도 병행해서 평가하고 각 물질의 평가 결과에 따라 최종적으로 바이러스 검출을 위해 사용하는 물질을 선정하고자 함.
- 그림 52.(b)와 같이 탄소 나노 튜브(Carbon nanotube, CNT)에 형광 나노재료가 붙어있는 DNA를 감은 물질(CNT@DNA)을 이용하여 바이러스를 검출하기 위한 실험을 진행하였으며 형광 나노재료가 붙어 있는 DNA의 구조에서 받은 target RNA와 결합할 수 있는 염기서열로 설계되어있으며 나머지 받은 CNT와 붙어있을 수 있게 해주는 염기서열로 설계되어있음. 또한, DNA에 붙은 형광 나노재료는 DNA가 CNT에 감김에 따라 CNT와 접촉하게 되고 이로 인해 소광상태로 존재하게 됨.

■ CNT@DNA의 형광 발현 모니터링을 위한 형광 관찰용 현미경 조건 설정

- 기존의 형광 분자 표지와는 다른 CNT@DNA의 형광 발현을 모니터링을 진행해야하기 때문에 형광 관찰용 현미경 조건을 변경하고자 함. 이를 위해 화학적 처리가 되지 않은 test membrane에 CNT@DNA를 2번에서 12번까지 중복해서 line으로 그려주고 난 후 target DNA 용액을 종이에 떨어뜨리고 대물렌즈의 배율을 변경하며 형광을 관찰함.

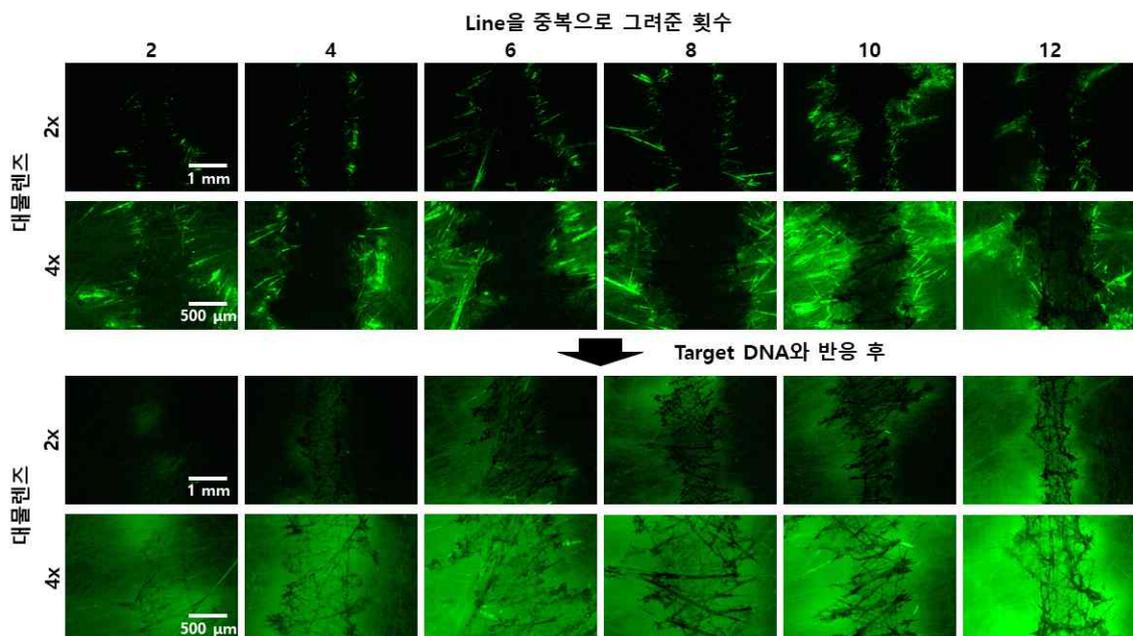


그림 53. CNT@DNA를 중복으로 그려준 횟수, ND filter 그리고 대물렌즈 배율에 따른 형광 관찰 결과 (a) 대물렌즈: 2배 렌즈 및 (b) 대물렌즈: 4배 렌즈

- Test membrane에 line을 중복으로 그려주고 형광 관찰용 현미경을 이용하여 관찰한 결과는 그림 53과 같으며 종이 위의 CNT@DNA 자체의 형광이 나타난다는 것을 알 수 있으며 대물

렌즈 배율을 4배로 설정하고 형광을 관찰했을 때보다 2배로 설정하고 관찰했을 때에 CNT@DNA 자체의 형광이 덜 관찰되는 것을 확인함.

- 그림 53과 같이 종이 위의 CNT@DNA가 target DNA와 반응한 이후를 형광 관찰용 현미경을 통해 관찰했으며 대물렌즈의 배율이 2배에서는 CNT@DNA가 중복으로 8번 그려준 이후부터는 형광의 세기가 비슷하다는 결과를 확인함.
- 이러한 결과를 바탕으로 CNT@DNA의 형광 발현 모니터링을 하는데 있어서 2배 렌즈로 관찰하는 것으로 결정하였으며 종이 위에 CNT@DNA를 중복으로 그려주는 횟수를 8번으로 선정함.

■ 종이 상에서의 CNT@DNA의 형광 발현 거동 및 메커니즘 확인

- CNT@DNA를 사용하여 line을 만들어주었을 때에 test membrane에서 따로 고정화하지 않았기 때문에 CNT@DNA가 잘 고정화되었는지 여부를 확인하고 종이 위에서 CNT@DNA 자체의 형광이 관찰되기 때문에 target DNA 외의 용액을 흘려 형광이 target DNA를 흘려주었을 때만 관찰되는지 여부를 확인함.

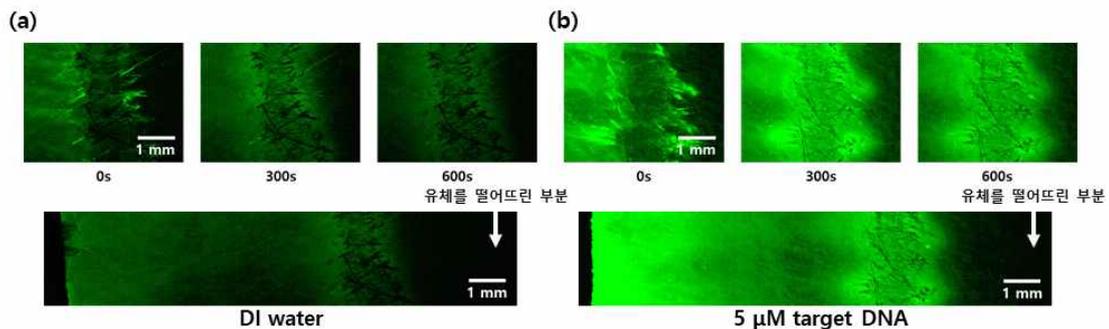


그림 54. CNT@DNA가 그려진 test membrane에 용액을 떨어린 후, 시간에 따른 line에서의 형광 변화와 종이 전체에서의 형광을 관찰한 결과  
(a) DI water 및 (b) 5  $\mu$ M target DNA

- 그림 54.(b)과 같이 5  $\mu$ M target DNA 100  $\mu$ L를 흘려주었을 때에 형광이 강하게 나타나지만 그림 54.(a)와 같이 DI water를 흘려주었을 때도 형광이 나타난다는 결과를 확인했으며 유체를 흘려주고 종이 전체에서의 형광의 발현 여부를 관찰한 결과 line에서만 형광이 발현되어야 함. 하지만, 유체를 떨어뜨린 반대 방향에서 형광이 발현되는 결과를 확인했고 해당 결과는 CNT@DNA가 test membrane에 고정화되지 않았다는 것을 의미함.
- Target DNA 용액이 아닌 DI water를 흘려주었을 때에도 형광이 발현되는 문제와 CNT@DNA가 고정화되지 않았다는 문제점을 확인할 수 있었으며 이 두 문제점에 대한 원인을 분석함으로써 CNT@DNA가 target DNA를 만났을 때만 반응하게 하는 방법과 CNT@DNA를 종이에 고정화하는 방법을 고안하고자 함.

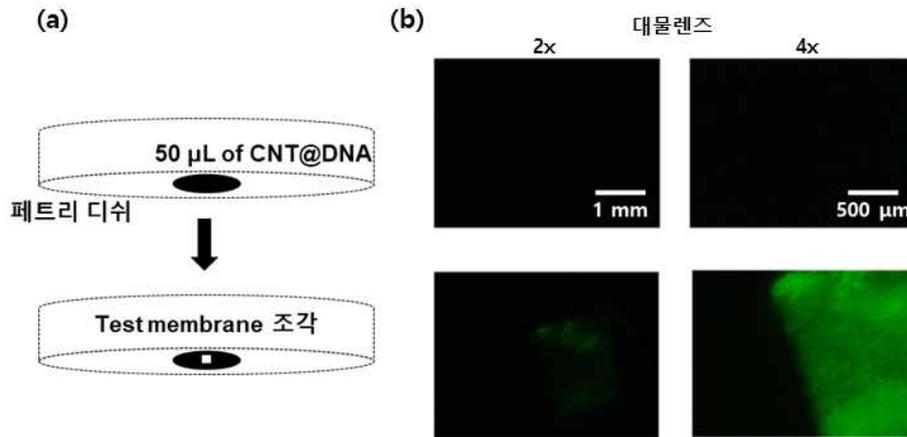


그림 55. CNT@DNA와 test membrane의 친화력 확인 (a) 실험 및 (b) 결과

- 먼저, CNT@DNA가 DI water를 흘려주었을 때도 형광이 발현되는 원인으로 CNT@DNA의 DNA가 CNT보다 test membrane인 glass fiber에 높은 친화력을 갖고 있기 때문에 형광이 발현된다는 것을 판단하고 이를 증명하기 위해 그림 55.(a)와 같이 플라스틱으로 만들어진 페트리 디쉬에 CNT@DNA 용액을 떨어뜨리고 CNT@DNA 용액의 형광을 관찰한 후 test membrane 조각을 떨어뜨려 형광의 발현 여부를 관찰함.
- 그림 55.(b)와 같이 CNT@DNA 자체에서는 형광이 나타나지 않았지만 test membrane의 조각을 떨어뜨렸을 때에 test membrane 조각에서 형광이 나타난다는 결과를 얻을 수 있었으며 CNT@DNA의 DNA가 CNT보다 test membrane인 glass fiber에 높은 친화력을 갖고 있기 때문에 DI water를 흘려주었을 때도 형광이 발현된다는 것을 확인할 수 있었음.

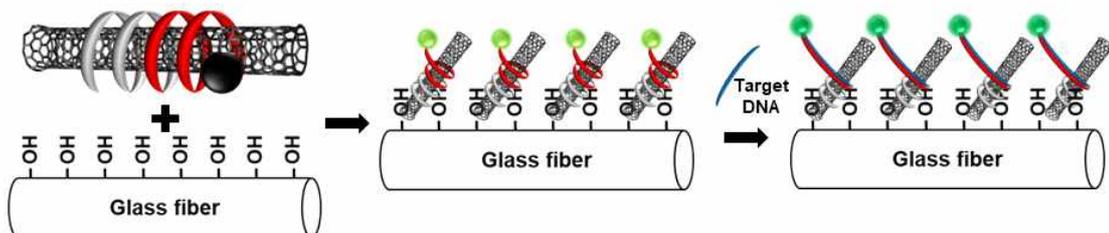


그림 56. Test membrane 상의 CNT@DNA 형광 발현 메커니즘

- 이러한 메커니즘은 그림 56과 같으며 해당 메커니즘을 통해서 그림 54에서 도출된 결과에 대한 설명이 가능함.
- CNT@DNA가 종이에 그려졌을 때는 그림 56과 같이 DNA의 인산 부분이 glass fiber의 OH와 반응하여 수소결합을 형성하기 때문에 종이 위에서 CNT@DNA 자체의 형광이 조금 발현되게 되는데 여기에 DI water를 흘려주면 그림 54.(a)와 같이 형광이 약하게 나타나게 되며 target DNA를 흘려주면 그림 54.(b)와 같이 형광이 강하게 나타나게 됨.

■ CNT@DNA를 종이에 고정화하는 방법 고안

- 그림 54.(b)에서 CNT@DNA로 만든 line에서만 발현되어야 하는 형광이 유체를 흘려준 반대편에서 발현되는 문제를 발견하였고 이를 해결하기 위해 종이에 CNT@DNA를 고정화하는 방법을 고안하게 됨.

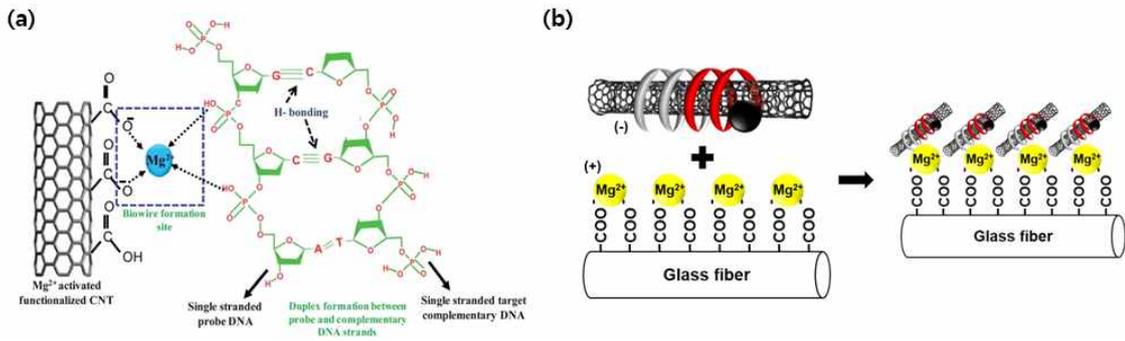


그림 57. 마그네슘 이온을 이용하여 (a) CNT에 DNA를 고정화하는 방법 및 (b) glass fiber에 DNA를 고정화하는 방법

- 그림 57.(a)와 같이 Das, Maumita, et al. ("Electrophoretically fabricated core-shell CNT-DNA biowires for biosensing." Journal of Materials Chemistry 22.6 (2012): 2727-2732)에서는 카르복실기가 기능화된 CNT에 DNA의 인산 부분을 마그네슘 이온으로 biowire를 형성함으로써 CNT에 DNA를 고정화하는 연구를 진행했음.
- 해당 논문을 참고하여 그림 57.(b)와 같이 glass fiber로 이루어진 test membrane 표면의 하이드록시기를 카르복실기로 치환하고  $MgCl_2$ 를 1 차적으로 그려준 후 CNT@DNA를 그려 줌으로써 CNT@DNA를 종이에 고정화하고자 함.
- Test membrane을 카르복실기로 치환하여 실험을 진행하기 전에 마그네슘 이온을 이용하여 카르복실기로 치환하지 않은 test membrane에 CNT@DNA를 고정화가 가능한지 여부를 알아보기 위한 실험을 진행함.

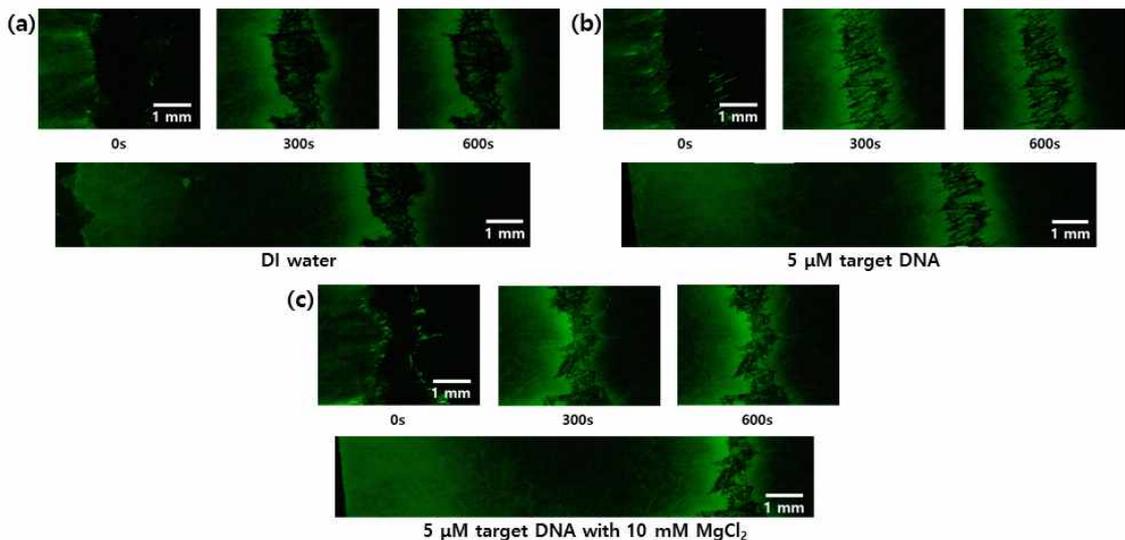


그림 58. Test membrane에  $MgCl_2$  처리하고 CNT@DNA를 그린 종이에 용액을 흘려 CNT@DNA의 고정 가능 여부 확인 실험 결과

(a) DI water, (b) 5  $\mu M$  target DNA 그리고 (c) 5  $\mu M$  target DNA with 10 mM  $MgCl_2$

- Test membrane에  $MgCl_2$  처리하고 CNT@DNA를 그린 종이에 DI water, 5  $\mu M$  target DNA 그리고 10 mM  $MgCl_2$ 와 함께 5  $\mu M$  target DNA 용액을 각각 흘려준 결과는 그림 58과 같으며 그림 58.(a)와 58.(b)를 통해서 CNT@DNA를 그린 종이에 DI water와 5  $\mu M$  target DNA 용액을 흘려줬을 때의 발현되는 형광의 세기가 비슷하다는 것을 알 수 있음.
- 10 mM  $MgCl_2$ 와 함께 5  $\mu M$  target DNA 용액을 흘려준 결과는 그림 58.(c)와 같으며 형광이 다른 용액을 흘려주었을 때보다 더 강하게 나타난다는 것을 확인함.

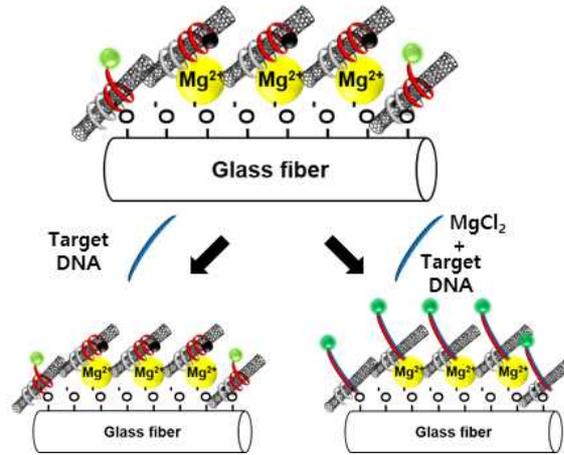


그림 59.  $MgCl_2$  처리된 CNT@DNA의 형광 발현 메커니즘

- 이는 그림 59와 같이 마그네슘 이온이 처리된 부분에 CNT@DNA가 안정적인 형태로 존재하고 있는데 CNT@DNA의 전기적 성질은 음 전하를 띄고 있음. 이때 target DNA만 흘려주게 되면 CNT@DNA와 target DNA 사이에 전기적 척력이 작용하게 되어 반응하지 못하게 되어 그림 58.(a)와 58.(b)와 같은 결과가 나타남.
- 하지만, 10 mM  $MgCl_2$ 와 함께 5  $\mu M$  target DNA를 흘려주면 마그네슘 이온이 target DNA의 음 전하를 스크리닝하게 되면서 target DNA가 CNT@DNA 반응을 할 수 있게 됨으로써 그림 58.(c)와 같은 결과가 나타남.
- 해당 실험을 통해서 카르복실기로 치환하지 않은 test membrane에 CNT@DNA를 고정화하는 것은 불가능하다는 결론을 도출함.

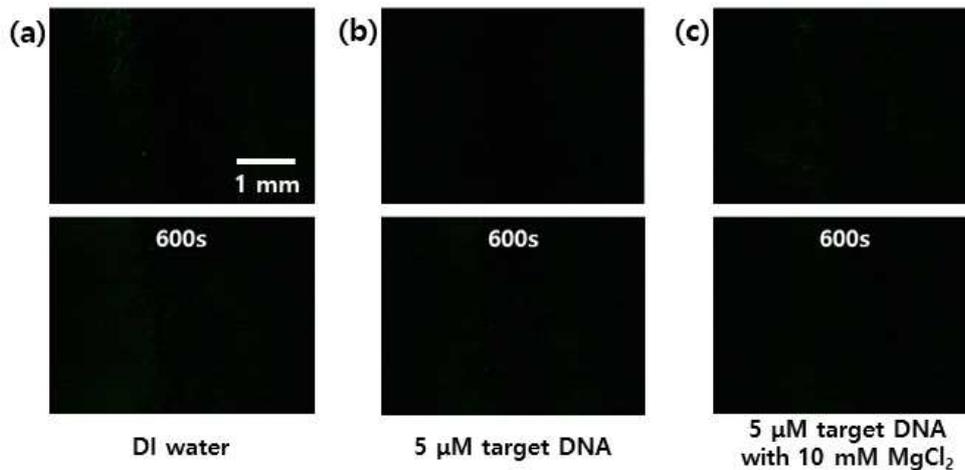


그림 60. 카르복실기로 치환된 Test membrane에  $MgCl_2$  처리하고 CNT@DNA를 그린 종이에 용액을 흘려 CNT@DNA의 고정 가능 여부 확인 실험 결과  
(a) DI water, (b) 5  $\mu M$  target DNA 그리고 (c) 5  $\mu M$  target DNA with 10 mM  $MgCl_2$

- Test membrane 표면의 하이드록시기를 카르복실기로 치환하고  $MgCl_2$ 를 1차적으로 그려준 후 CNT@DNA를 그려주고 DI water, 5  $\mu M$  target DNA 그리고 10 mM  $MgCl_2$ 와 함께 5  $\mu M$  target DNA 용액을 각각 흘려주어 CNT@DNA의 형광 발현과 고정화 여부를 관찰하였으며 결과는 그림 60과 같음.
- 그림 60과 같이 용액을 흘려주기 전에도 CNT@DNA에서의 형광이 관찰되지 않았을 뿐만 아니라 용액을 흘려주었을 때도 형광이 관찰되지 않았는데 이는 그림 57.(b)와 같이 CNT@DNA가 완전히 안정적인 상태로 붙어있게 되어 어떤 물질이 흘러와도 반응할 수 없는 상태가 되었음을 알 수 있음.

- 이를 통해 CNT@DNA는 종이 칩에서 바이러스 RNA를 검출하는 물질로 사용하기에 어려울 것이라고 판단을 내렸으며 바이러스 RNA를 검출하는 물질은 형광 분자 표지를 사용하는 것으로 결정함.

■ 형광 분자 표지의 발광 메커니즘 및 검지 한계 확인

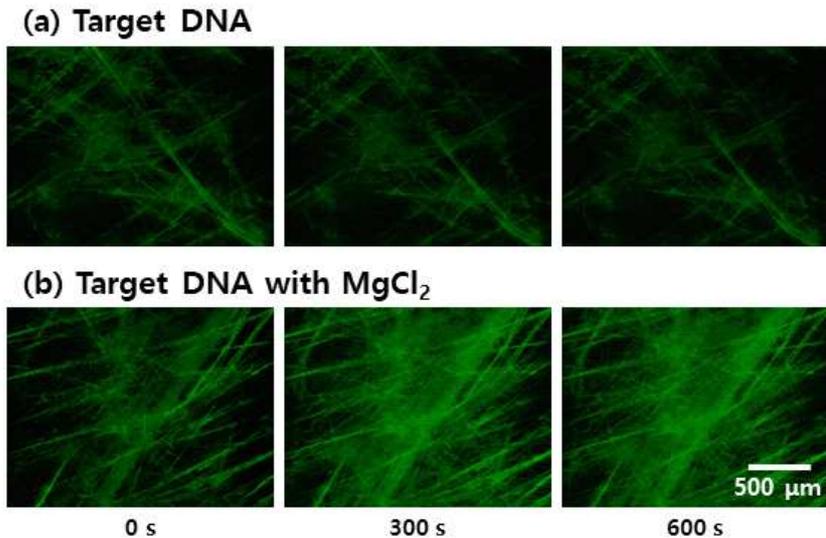
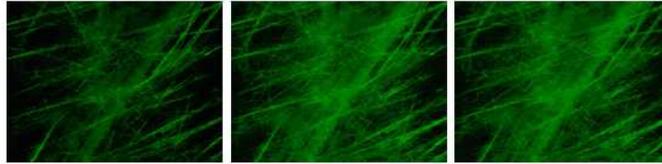


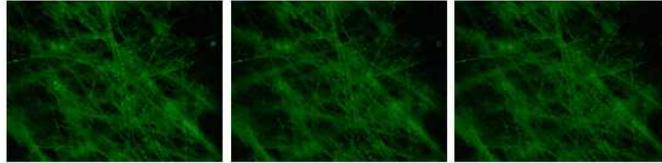
그림 61. 종이 상에서 형광 분자 표지의 형광 발현 결과  
(a) 5  $\mu$ M target DNA 그리고 (b) 5  $\mu$ M target DNA with 10 mM MgCl<sub>2</sub>

- 형광 분자 표지가 기능화된 종이에 5  $\mu$ M target DNA 그리고 10 mM MgCl<sub>2</sub>와 함께 5  $\mu$ M target DNA 용액을 각각 흘려주고 형광 발현 여부를 관찰하였으며 이에 대한 결과는 그림 61과 같음.
- 그림 61.(a)와 같이 5  $\mu$ M target DNA 용액을 흘려주었을 때에 형광이 발현되지 않는다는 것을 통해서 형광 분자 표지가 음전하를 띄고 있으며 target DNA만 흘려주게 되면 형광 분자 표지와 target DNA 사이에 전기적 척력이 작용하게 되어 반응을 잘하지 못하게 된다는 것을 확인함.
- 반면, 그림 61.(b)와 같이 10 mM MgCl<sub>2</sub>와 함께 5  $\mu$ M target DNA를 흘려주면 마그네슘 이온이 target DNA의 음 전하를 스크리닝하게 되면서 target DNA가 형광 분자 표지와 반응을 할 수 있게 된다는 발광 메커니즘과 형광 분자 표지는 종이에 기능이 된 이후 흘러가지 않는다는 결과를 확인함.

(a) 5  $\mu\text{M}$  target DNA with  $\text{MgCl}_2$



(b) 50 nM target DNA with  $\text{MgCl}_2$



(c) 0.5 nM Target DNA with  $\text{MgCl}_2$

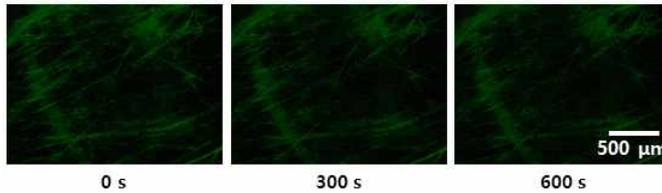


그림 62. DNA 농도에 따른 형광 분자 표지의 형광 발현 결과

(a) 5  $\mu\text{M}$  target DNA with 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , (b) 50 nM target DNA with 10 mM  $\text{MgCl}_2$  그리고  
(c) 0.5 nM target DNA with 10 mM  $\text{MgCl}_2$

- 직사각형 형상인 test membrane에서의 형광 분자 표지의 검지 한계를 확인하고자 5  $\mu\text{M}$ , 50 nM 그리고 0.5 nM target DNA를 종이에 흘려주었고 target DNA 농도에 따른 형광 발현 결과는 그림 62과 같음.
- 그림 62와 같이 5  $\mu\text{M}$  target DNA를 떨어뜨렸을 때는 시간이 갈수록 형광 분자 표지의 형광이 강하게 발현되는 반면 용액의 농도가 낮아지면 낮아질수록 발현되는 형광의 세기가 약해진다는 것을 확인함.
- 0.5 nM target DNA를 떨어뜨렸을 때는 형광이 거의 나타나지 않는다는 결과를 통해서 직사각형 형태의 test membrane에서 형광 분자 표지의 검지 한계는 0.5 nM로 확인함.

■ 검지 한계를 향상시키기 위한 test membrane 디자인 및 검지 한계 확인

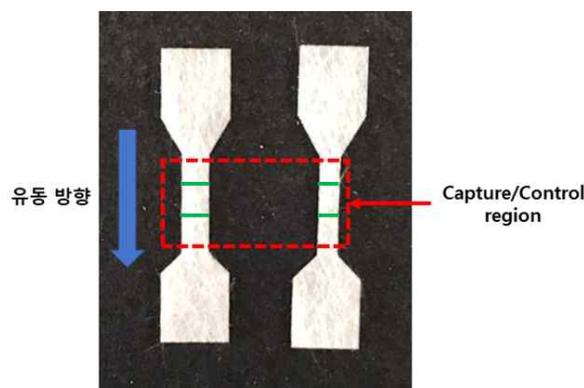


그림 63. 형광 분자 표지의 검지 한계를 향상시키기 위한 test membrane 설계

- 기존의 직사각형 모양의 test membrane에서는 형광 분자 표지의 검지 한계가 낮지 않았기 때문에 이를 향상시키기 위해 그림 63과 같은 형태로 test membrane을 설계하였으며 이를 레이저 커터로 제작함.
- 디자인한 test membrane에서 target DNA가 넓은 채널에서 좁은 채널로 이동하게 되는데 좁은 채널에 형광 분자 표지가 기능화되어 있기 때문에 target DNA가 단위 면적 당 형광 분자 표지와 접하게 되는 개수가 많아지게 되며 이는 target DNA를 농축하여 흘려주는 것과

같은 효과를 나타낼 수 있음.

- 디자인한 test membrane에서의 형광 분자 표지의 검지 한계를 측정하는 실험은 남은 연구 기간에 진행할 예정임.

⑥ 구제역과 조류독감 바이러스 감염 여부 및 아종 바이러스 구별을 위한 lateral flow sheet 검출기기 개발

■ 형광 분자 표지의 기능화 방법 개선

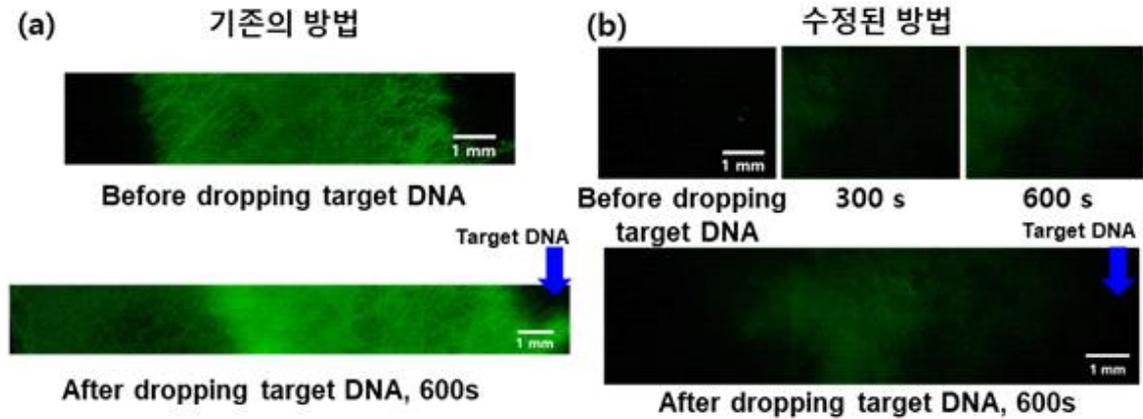


그림 64. 형광 분자 표지를 종이 표면에 기능화시키는 방법에 따른 형광 발현 결과  
 (a) 기존 방법으로 형광 분자 표지를 기능화한 종이 및  
 (b) 수정된 방법으로 형광 분자 표지를 기능화한 종이의 실험 결과

- 기존 형광 분자 표지가 기능화된 종이를 이용해 실험을 진행한 결과, 그림 64.(a)와 같이 target DNA를 흘려주기 전에 형광 분자 표지를 그려준 부분에서 형광이 강하게 나타나고, 10 mM MgCl<sub>2</sub>와 함께 5 μM target DNA를 흘려주면 형광이 유체의 흐름에 따라 흘러가는 것을 확인함.
- 이는 형광 분자 표지가 종이상에서 안정적인 상태로 존재하지 않고 제대로 고정되지 않은 것을 의미하며 형광 분자 표지를 종이에 기능화시키는 방법에 문제가 있음을 확인함.
- 형광 분자 표지를 종이 표면에 기능화하기 위해서 티올기를 포함하는 고분자인 thiol-PEG-amine를 사용되었음. 그러나 형광 분자 표지의 티올기와 고분자의 티올기가 결합하기 위해서는 촉매제인 요오드(I<sub>2</sub>)를 처리하는 추가적인 과정이 필요한데 그 과정이 생략되었기 때문에 형광 분자 표지가 고분자와 제대로 결합하지 못한 것으로 판단됨.
- 이에 대해 제 2 세부 연구기관인 신소재공학부와 상의한 결과, 형광 분자 표지를 종이에 기능화하는 방법을 수정하여 기존의 방법에서 고분자를 amine-PEG-maleimide로 변경함. 해당 고분자를 이용하게 되면 고분자의 말레아미드(maleimide)와 형광 분자 표지의 티올기가 pH 6.5~7.5 인 환경에서 자연스럽게 반응하기 때문에 추가적인 화학적 처리 없이 형광 분자 표지를 종이에 기능화할 수 있음.
- 변경한 고분자를 이용해 형광 분자 표지를 기능화한 종이에 10 mM MgCl<sub>2</sub>와 함께 5 μM target DNA를 흘려준 결과, 그림 64.(b)와 같이 형광 분자 표지를 그려준 부분의 형광이 감소하고 DNA를 흘려주었을 때 형광 분자 표지가 흐르지 않는 것을 확인함으로써 수정된 형광 분자 표지의 기능화 방법을 사용했을 때 형광 분자 표지가 안정적으로 기능화되었다는 것을 확인함.

■ Avidin을 이용한 형광 분자 표지 기능화

- 고분자를 종이 표면에 기능화하는 방법은 EDC-NHS 반응을 거쳐야 하는데 해당 반응을 하는데 있어서 오랜 시간이 소요된다는 단점이 존재함. 그 과정이 비교적 번거롭기 때문에 제 2 세부 연구기관에서 종이에 물리적인 처리를 통해 고분자 기능화 과정을 제시하였으며 해당 방법에 대해 평가를 진행함.
- 제 2 세부 연구기관에서 제시한 방법은 다음과 같음. Avidin과 BSA-biotin-avidin 분자를 각

각 사용하여 고분자인 biotin-PEG-maleimide를 기능화하고 여기에 형광 분자 표지를 기능화하고자 함.

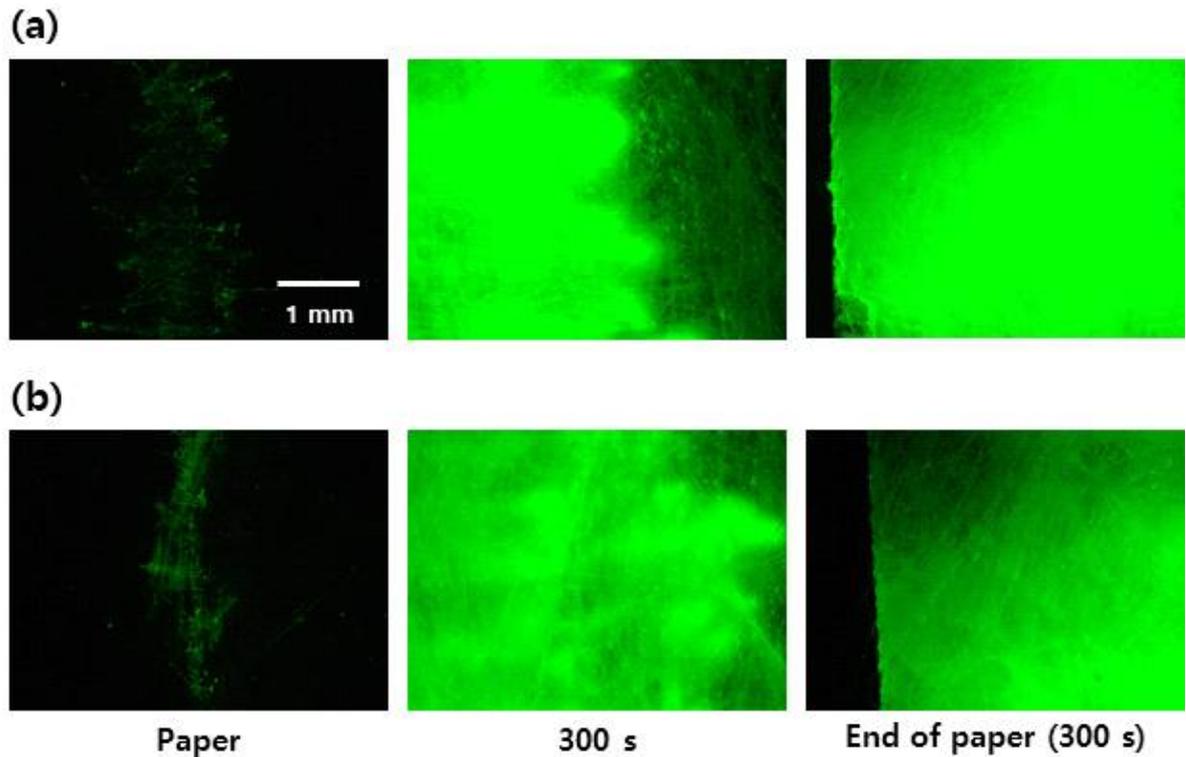


그림 65. 종이에 형광 분자 표지 기능화 성능 평가 결과

(a) Avidin 그리고 (b) BSA-biotin-avidin

- DNA를 흘려주어 형광의 거동을 확인함으로써 avidin 및 BSA-biotin-avidin을 이용한 두 가지 고분자 기능화 방법을 평가하였으며 결과는 그림 65와 같음. 만약, 기능화가 잘 되었다면 형광이 발현될 때, 선으로 나타나고 흘러가지 않고 기능화가 잘 되지 않았다면 형광이 흘러가는 결과가 관측됨.
- Avidin을 이용해 형광 분자 표지를 기능화한 종이에 10 mM MgCl<sub>2</sub>와 함께 5 μM target DNA를 흘려준 결과, 그림 65.(a)와 같이 형광이 흘러가는 것을 확인함, 또한, BSA-biotin-avidin을 이용해 형광 분자 표지를 기능화한 종이를 이용하여 동일한 실험을 진행한 결과, 그림 65.(b)와 같이 형광이 흘러가는 것을 확인함.
- 모든 경우 형광이 유체의 흐름에 따라 종이 끝까지 흘러간 것을 확인하였고, 이를 통해 avidin 및 BSA-biotin-avidin을 이용해 종이 표면에 형광 분자 표지를 기능화하는 것은 적합하지 않다고 판단함.

■ 형광 관찰 현미경을 이용한 lateral flow sheet에서의 적정 형광 분자 표지 농도 및 검지 한계 확인

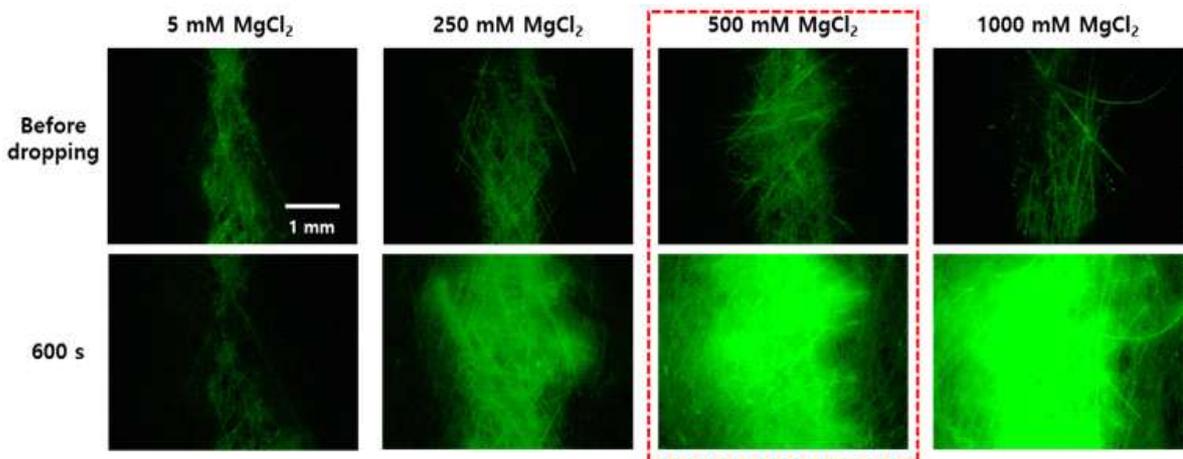


그림 66. MgCl<sub>2</sub>의 농도에 따른 형광 분자 표지 반응성 결과

- 그림 64.(b)에서 보이는 것과 같이 형광 분자 표지 기능화 방법을 개선함으로써 형광 분자 표지가 안정적으로 종이 표면에 기능함. 하지만, 형광 분자 표지가 안정적인 상태로 기능화됨에 따라 형광 분자 표지와 DNA의 반응성을 향상시켜주기 위해 사용되었던 10 mM MgCl<sub>2</sub>의 효과가 나타나지 않는 것을 확인함.
- 따라서, 형광 분자 표지의 반응성을 향상시키기 위하여 MgCl<sub>2</sub>의 적정 농도를 찾는 것이 필요하다고 판단되었으며 적정 농도를 찾기 위해 아래와 같은 실험을 진행함. 형광 분자 표지를 20 μM의 고농도로 고정시키고 음전하 스크리닝 역할을 해주는 MgCl<sub>2</sub> 농도를 높여가며 2.5 μM target DNA와 섞어 형광 실험을 진행해 최고의 반응성을 갖게 하는 최적의 MgCl<sub>2</sub> 농도를 찾아봄.
- 형광 실험 결과, 그림 66과 같이 target DNA의 농도가 모두 같을 때 MgCl<sub>2</sub>의 농도가 500 mM 이상인 경우에 형광 분자 표지의 형광 세기가 수렴하는 것을 확인하였으며 이 이상 높은 농도를 사용하는 것은 불필요하다고 판단함. 따라서, 500 mM를 최적의 MgCl<sub>2</sub> 농도로 결정함.

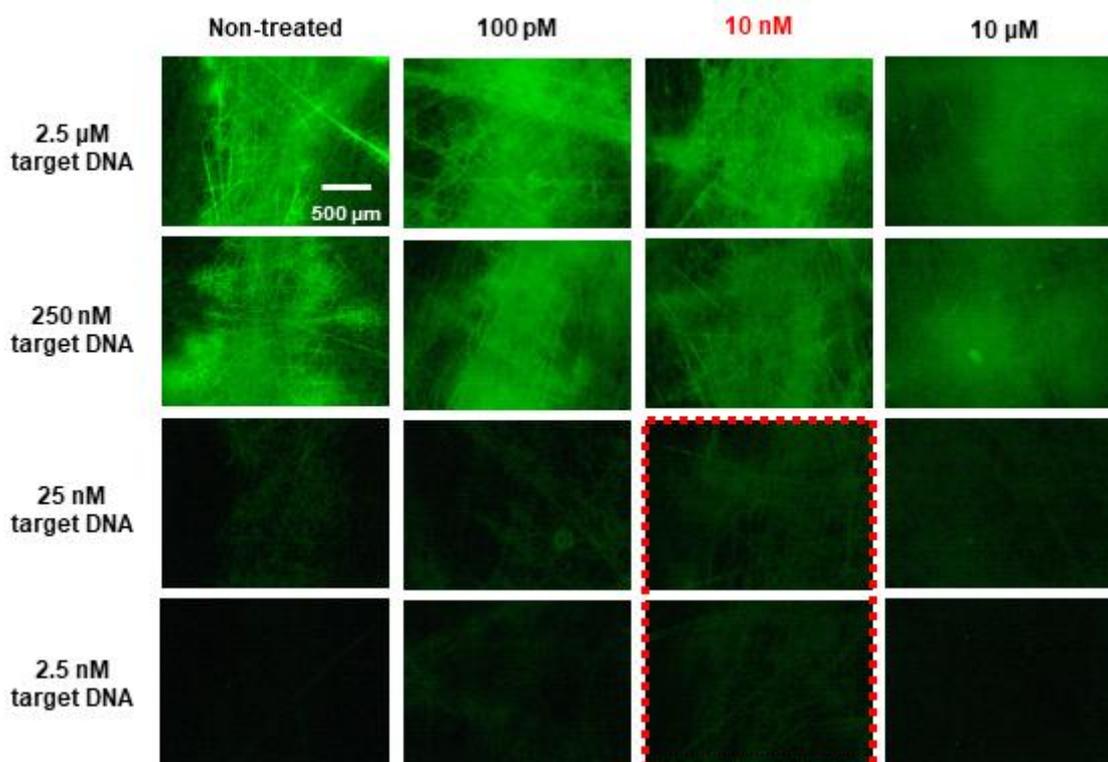


그림 67. 종이에 기능화하는 고분자의 농도에 따른 형광 분자 표지 반응성 결과

- 기존 실험에서는 종이에 고분자를 기능화할 때 10  $\mu\text{M}$  농도를 사용하였지만, 고분자의 농도에 따라 형광 분자 표지의 반응성이 다르기 때문에 최적의 반응성을 보여주는 고분자 농도를 찾기 위한 실험을 진행하였으며 결과는 그림 67과 같음.
- 형광 분자 표지의 농도는 0.5  $\mu\text{M}$ 로 고정시킨 뒤 종이 기능화해주는 고분자의 농도를 변경하면서 형광 실험을 진행한 결과, 고농도의 target DNA를 떨어뜨린 경우에 모든 종이에서 형광이 잘 발현되었음.
- 하지만, 저농도의 target DNA를 떨어뜨려 형광 세기를 비교해 본 결과, 고분자의 농도가 10 nM일 때 형광 분자 표지의 형광이 가장 밝은 것을 확인함. 따라서, 10 nM를 종이에 기능화하는 적정 고분자 농도로 결정함.

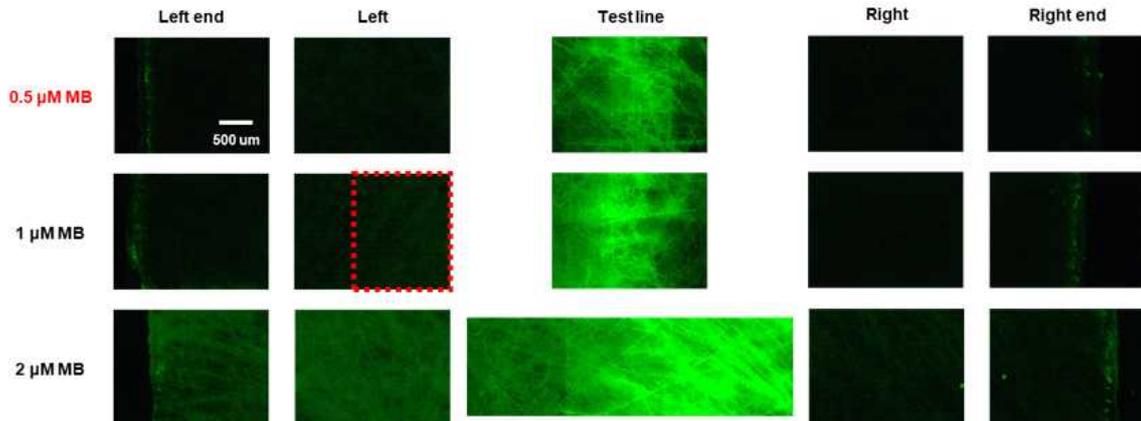


그림 68. 형광 분자 표지 농도에 따른 형광 분자 표지 반응성 결과

- 형광 분자 표지가 농도가 높으면 용액을 흘려줌에 따라서 형광이 흘러가는 문제가 발생하여 이를 해결하기 위해 종이에 그려주는 형광 분자 표지의 농도를 최적화하고자 하였으며 최적화를 위한 실험 결과는 그림 68과 같고 실험 조건은 아래와 같음. 앞서 결정한 10 nM의 고분자가 기능화된 종이에 그려주는 형광 분자 표지의 농도를 변경하였고 여기에 500 mM  $\text{MgCl}_2$ 가 섞인 2.5  $\mu\text{M}$  DNA를 흘려주고 형광의 거동을 확인함으로써 최적의 형광 분자 표지 농도를 선정함.
- 형광 실험 결과, 그림 68과 같이 test line에 그려준 형광 분자 표지의 농도가 0.5, 1, 2  $\mu\text{M}$  일 때 모두 형광이 잘 관측되는 것을 확인함. 하지만, 1 그리고 2  $\mu\text{M}$ 의 형광 분자 표지가 기능화된 종이에서는 형광이 흐르는 것을 확인함. 이는 종이에 기능화될 수 있는 형광 분자 표지의 최대양보다 과량을 그려주었기 때문으로 판단됨.
- 0.5  $\mu\text{M}$  형광 분자 표지가 기능화된 종이에 target DNA를 흘려주었을 때는 형광이 흐르지 않는 것을 확인함으로써 0.5  $\mu\text{M}$ 을 종이에 그려주는 최적의 형광 분자 표지의 농도로 결정함.

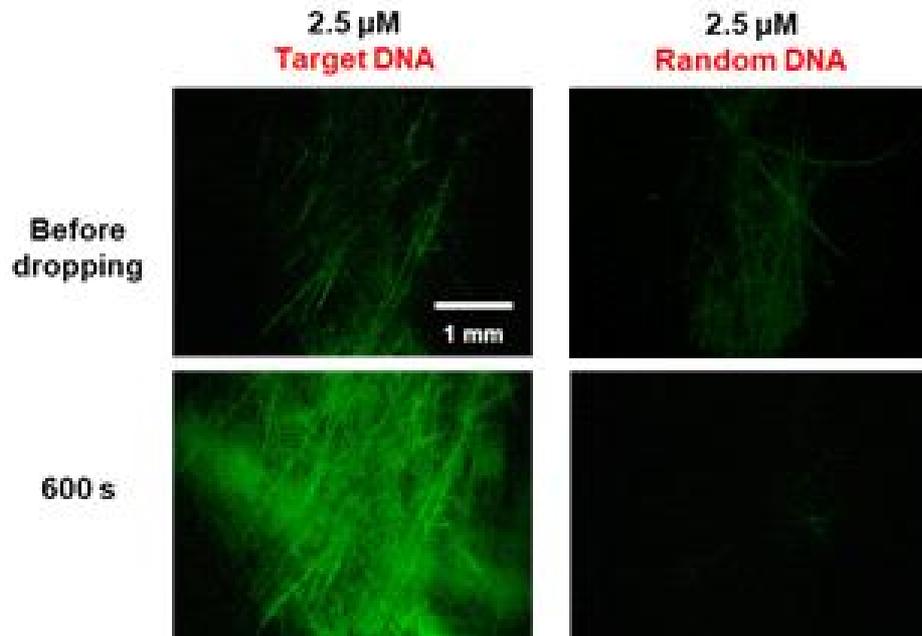


그림 69. 형광 분자 표지의 selectivity 확인 실험 결과

- 실험에서 사용하는 형광 분자 표지가 target으로 하는 DNA 이외에 다른 서열을 갖는 DNA 에도 반응하는지, 즉 형광 분자 표지의 selectivity를 확인하기 위해 target DNA와 target DNA의 서열을 포함하지 않은 random DNA를 이용해 형광 실험을 진행하였으며 결과는 그림 69와 같음.
- 그림 69와 같이 target DNA를 흘려주었을 때 형광이 강하게 발현하는 것을 확인하였지만, random DNA를 흘려주었을 때는 형광이 전혀 발현하지 않는 것을 확인함으로써 종이상에서 형광 분자 표지가 selectivity를 갖는 것을 확인함.

■ MPPC를 이용한 lateral flow sheet에서의 형광 발현 측정

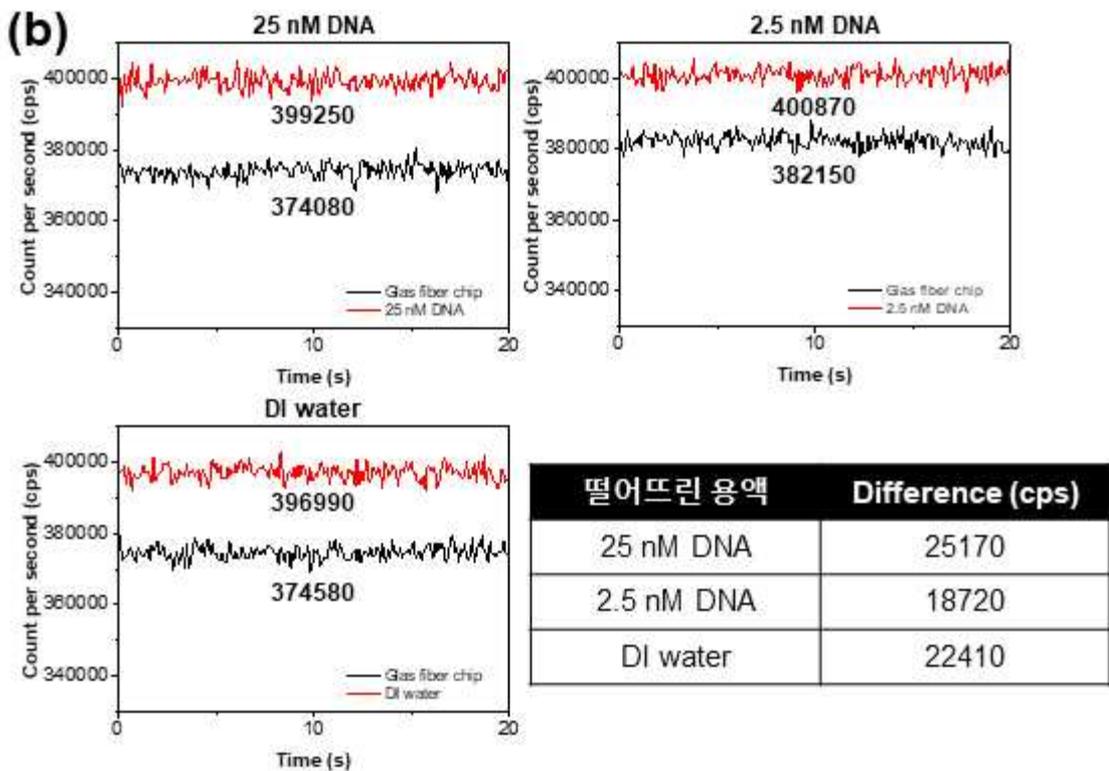
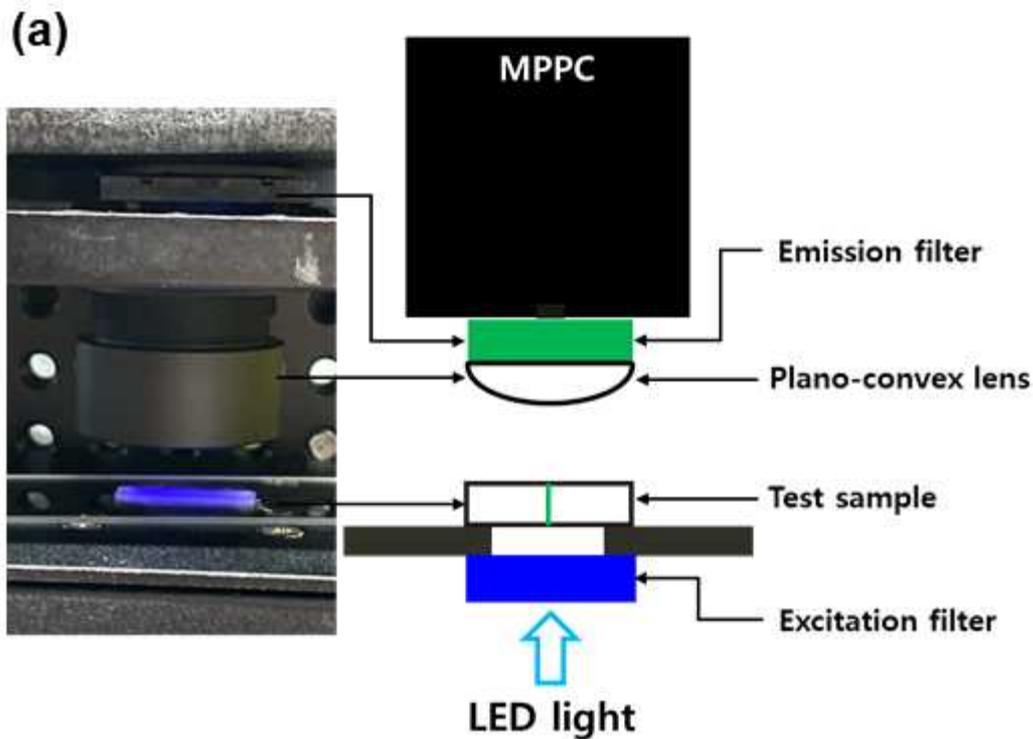


그림 70. (a) MPPC 실험 셋팅 모식도 및 (b) MPPC 형광 측정 결과  
(Emission filter: 550 nm cut on filter, Excitation filter: 460~490 nm bandpass filter)

- 형광 현미경을 이용하여 lateral flow sheet에서 최적의 형광 분자 표지 농도,  $MgCl_2$  농도 그리고 기능화하는 고분자 농도를 결정해 주었음. 하지만, 본 연구팀이 목표하는 저농도의 target DNA를 검지하기에 형광 현미경의 형광 검지 능력이 부족하다고 판단하여 수 개의 광자도 검지 할 수 있는 높은 민감도를 갖는 Multi-Pixel Photon Counter(MPPC)를 이용하여 이후의 실험을 진행함.
- MPPC 실험 셋팅 모식도는 그림 70.(a)와 같고 MPPC를 이용한 형광 측정 메커니즘을 설명하면 다음과 같음. 우선, LED에서 나온 빛 중 형광 분자 표지를 excitation 시킬 수 있는 빛

만 통과할 수 있도록 excitation filter를 test sample 밑에 설치함. 빛에 의하여 excitation된 형광 분자 표지가 특정 파장의 형광을(광자를) 모든 방향으로 방사하면 plano-convex lens 가 이 형광을(광자를) 한 점으로 모아 MPPC가 검지할 수 있는 형광을(광자를) 늘리고, 형광 분자 표지에서 방사하는 특정 파장만 통과시킬 수 있는 emission filter를 MPPC 센서 바로 앞에 설치하여 추가적인 신호를 제거함.

- 최종적으로 형광 분자 표지에서 방사하는 특정 파장의 형광이(광자가) MPPC를 통해 검지되고, 이때 시료를 흘려주기 전과 흘려준 후의 형광 세기(광자 개수)의 차이로 바이러스 감염 여부를 확인하며 그 단위는 count per second(cps)로 초당 감지된 광자 개수임.
- 프로토 타입의 MPPC를 이용해 앞선 실험에서 정한 형광 분자 표지,  $MgCl_2$ , 고분자 농도를 이용해 실험을 진행하였고 그 결과는 그림 70.(b)와 같음. 그래프의 검정색 선은 시료를 흘려주기 전 lateral flow sheet만 존재할 때의 형광 세기 결과이며 빨간색 선은 시료를 흘려주었을 때의 형광 세기 결과임. 실험 결과, target DNA가 없는 DI water를 떨어뜨렸을 때가 2.5 nM target DNA를 떨어뜨려 줬을 때보다 신호가 크게 나타나는 문제가 발생하였음.
- 실험 결과의 원인으로 판단되는 사항은 다음과 같음. 형광 분자 표지에 사용 중인 형광체는 FAM dye로 최대 발현하는 형광 파장은 520 nm이지만 프로토 타입 MPPC에서 사용하는 emission filter는 550 nm cut on filter를 사용해 550 nm 이상의 파장만 통과시킬 수 있어 형광 분자 표지에서 발현하는 형광을 검지하는데 적합하지 않음. 이를 해결하기 위하여 emission filter를 변경하기로 함.

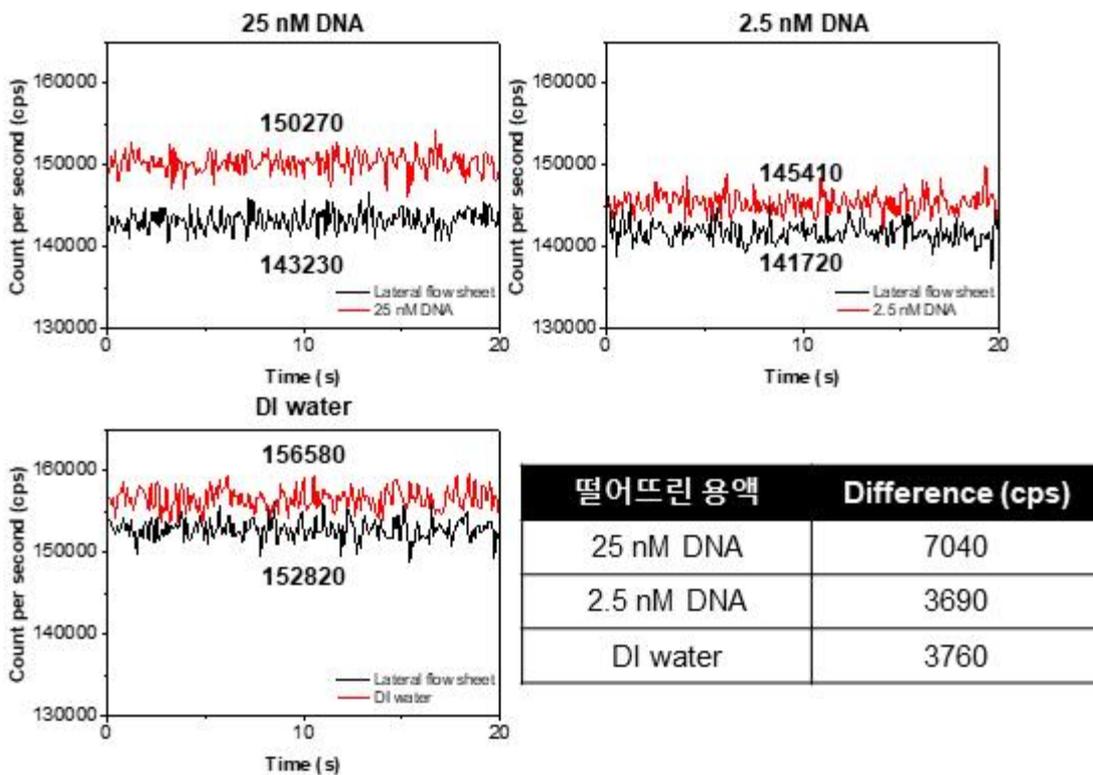


그림 71. Emission filter 교체 후 형광 측정 실험 결과  
(Emission filter: 550 nm cut on filter → 512~557 nm bandpass filter)

- Emission filter를 550 nm cut on filter에서 FAM dye의 형광의 세기가 강한 파장대를 포함하는 512~557 nm bandpass filter로 변경하여 실험을 진행하였으며 결과는 그림 71과 같음.
- 형광 실험 결과, 그림 71과 같이 DI water를 떨어뜨렸을 때 관측되는 형광 세기가 25 nM target DNA를 떨어뜨렸을 때의 형광 세기보다 작게 관측되어 형광 분자 표지의 형광 발현 여부를 알 수 있게 됨. 하지만, Emission filter를 교체하기 이전보다 검지되는 형광의 세기가 현저하게 줄어든 문제가 발생함.

- 이는, 현재 사용 중인 FAM dye가 최대로 excitation되는 파장은 495 nm이지만, 해당 실험에서 사용된 excitation filter는 495 nm를 포함하지 않는 460~490 nm bandpass filter를 사용하여 형광 분자 표지의 형광을 최대로 excitation 시킬 수 없음. 따라서, 495 nm의 빛을 통과시킬 수 있는 excitation filter로 변경하여 실험을 진행하기로 함.

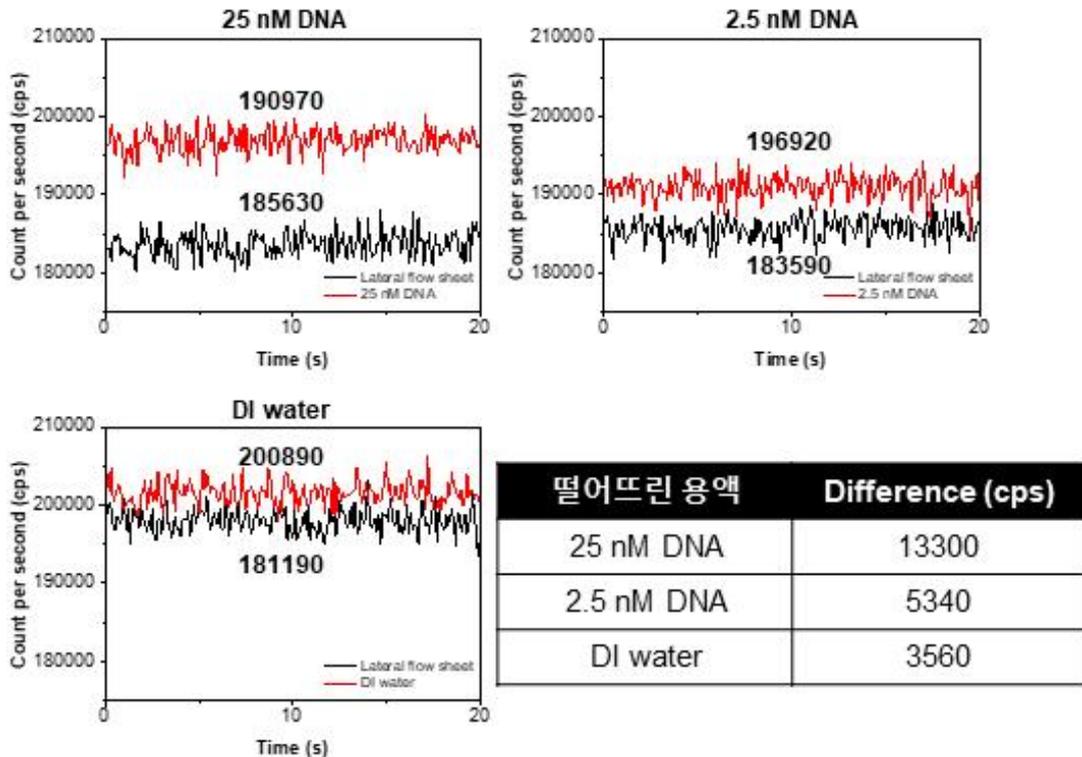
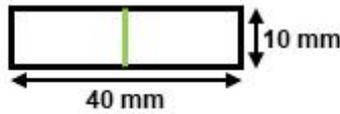


그림 72. Excitation filter 교체 후 형광 측정 실험 결과  
(Excitation filter: 460~490 nm bandpass filter → 465~500 nm bandpass filter)

- Excitation filter를 460~490 nm bandpass filter에서 465~500 nm bandpass filter로 교체하여 형광 실험을 진행한 결과는 그림 72와 같음. 그림 72와 같이 종이 자체의 형광과 DI water를 흘려주었을 때의 형광 세기는 동일하지만, target DNA를 흘려주었을 때는 형광이 발현되어 검지되는 형광의 세기가 증가하는 것을 확인함.
- 앞선 두 실험을 통해 emission filter는 512~557 nm bandpass filter로, excitation filter는 465~500 nm bandpass filter로 MPPC filter 조건을 결정함.

실험 조건



✓ Test line 으로 그려지는 형광분자표지의 양: 0.5  $\mu\text{M}$ , 0.44  $\mu\text{l}$

✓ 떨어뜨린 용액의 양: 150  $\mu\text{l}$

실험 결과

떨어뜨린 용액	Difference (cps)
500 mM $\text{MgCl}_2$	291
25 $\mu\text{M}$ DNA	11599
2.5 $\mu\text{M}$ DNA	9296
250 fM DNA	3718

✓ 직사각형 형태 test membrane 에서의 검지한계  
DNA 농도: 2.5  $\mu\text{M}$   
DNA 의 수: 225,825,000

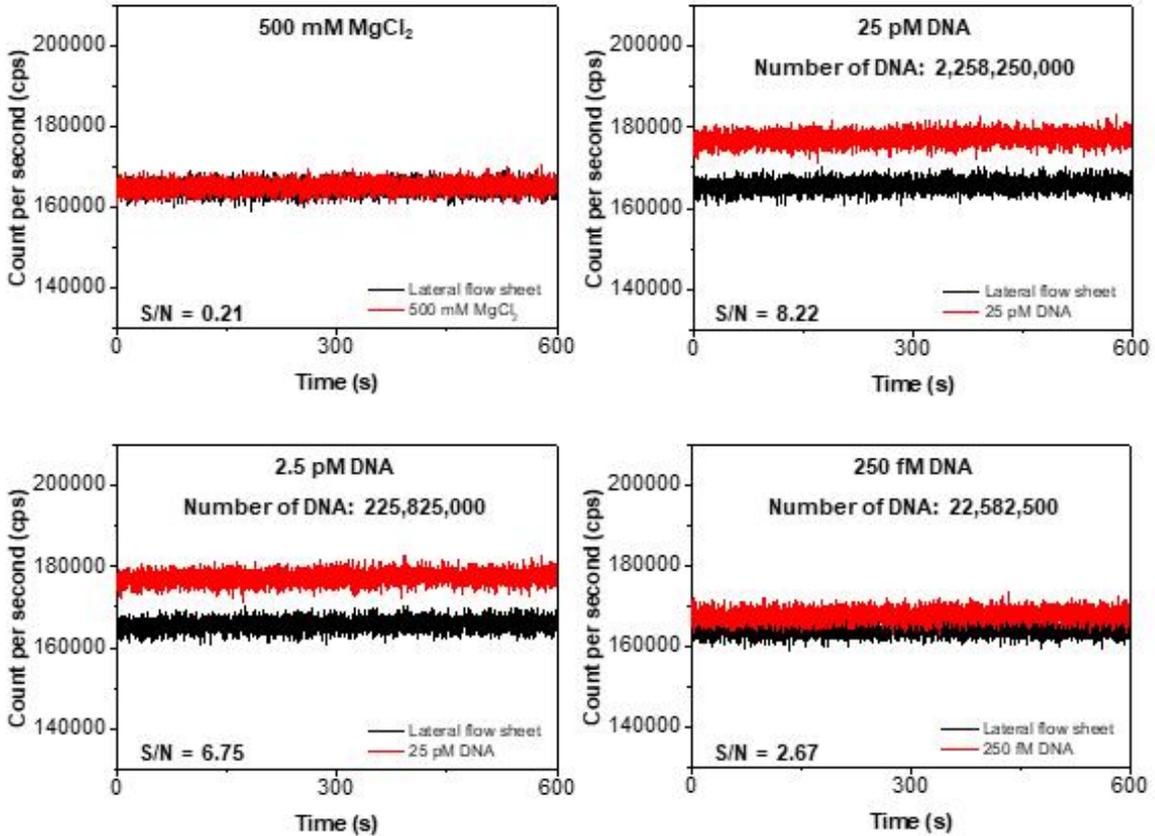


그림 73. MPPC를 이용한 직사각형 모양의 lateral flow sheet 형광 측정 실험 결과

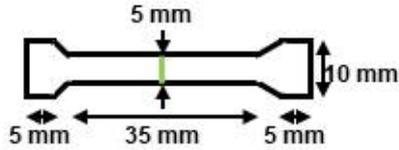
- 위 실험을 통해 결정된 MPPC 장비 셋업을 이용해 형광 분자 표지로 test line을 그린 직사각형 종이의 형광 측정 실험을 진행하였으며 결과는 그림 73과 같음. 0.5  $\mu\text{M}$ 의 형광 분자 표지를 그은 직사각형 모양의 lateral flow sheet가 충분히 젖을 수 있도록 150  $\mu\text{l}$ 의 시료를 흘려 주고 형광 분자 표지가 target DNA와 충분히 반응할 수 있도록 10 분 간 형광을 관측 하였음.
- 500 mM  $\text{MgCl}_2$  그리고 500 mM  $\text{MgCl}_2$ 와 여러 농도의 target DNA를 섞은 시료를 이용해 형광 실험을 진행한 결과, 그림 73과 같이  $\text{MgCl}_2$  단독으로 흘려주었을 경우 형광 세기의 변화가 없었고, target DNA를 흘려주었을 때 DNA 농도가 감소함에 따라 형광 세기 증가도 감소하는 경향을 보임.
- Target DNA로 인해 증가하는 형광 세기를 통해 바이러스 감염 여부를 확인할 수 있을 정도의 유의미한 데이터이기 위해서는 signal-to-noise ratio(S/N ratio)가 3보다 커야함. S/N ratio는 시료를 흘려주기 전과 후의 형광 세기 평균값의 차이를 시료를 흘려주기 전 형광의 표준편차로 나누어준 값으로 그 식은 다음과 같음.

$$S/N \text{ ratio} = \frac{\text{The average of the signal} - \text{The average of the background}}{\text{Standard deviation of the background}}$$

- Lateral flow sheet에 흘려주는 target DNA의 농도가 250 fM 일 때 S/N가 2.47로 3보다 작아 유의미한 데이터라 볼 수 없으며, 2.5  $\mu\text{M}$  일 때 S/N ratio가 6.75로 3 이상이기 때문에

직사각형 lateral flow sheet의 검지 한계는 수 억개 수준으로 매우 높은 것을 확인함.

실험 조건



- ✓ Test line 으로 그려지는 형광분자표지의 양: 0.5  $\mu\text{M}$ , 0.44  $\mu\text{l}$
- ✓ 떨어뜨린 용액의 양: 150  $\mu\text{l}$

실험 결과

떨어뜨린 용액	Difference (cps)
500 mM $\text{MgCl}_2$	1495
2.5 pM DNA	12742
250 fM DNA	8530
25 fM DNA	4369

- ✓ 모래시계 형태 test membrane 에서의 검지한계 DNA 농도: 25 fM  
DNA 의 수: 2,258,250

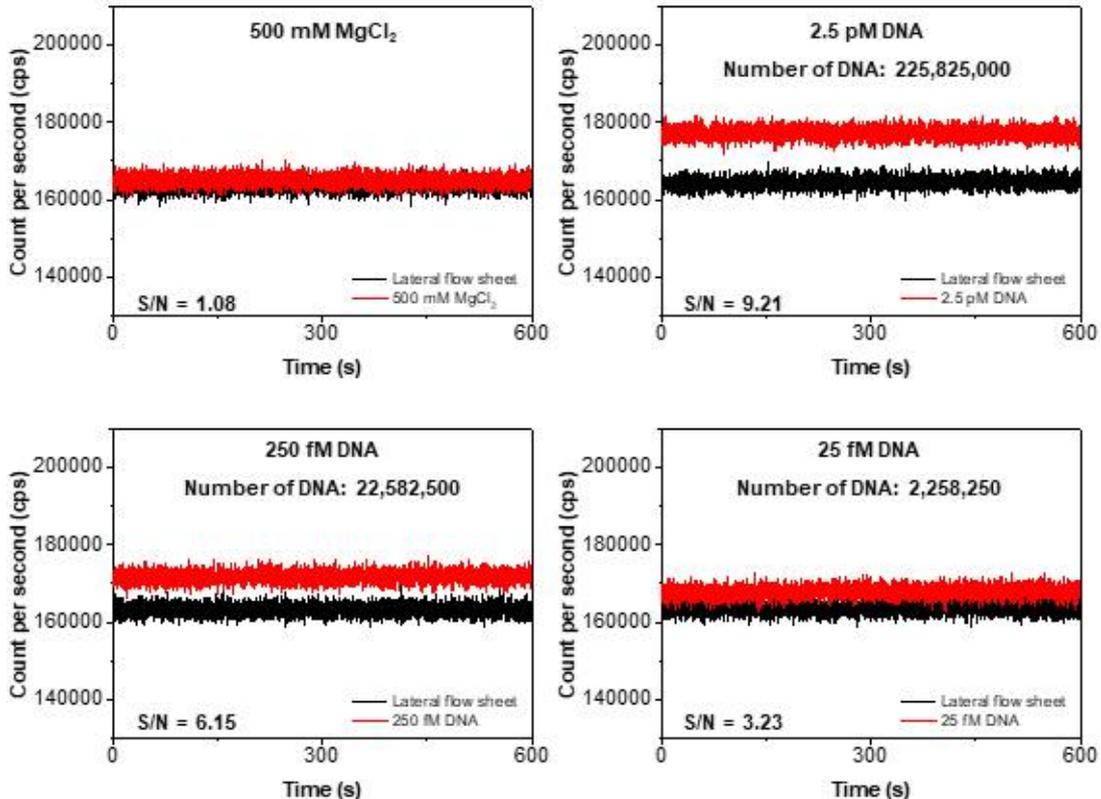


그림 74. MPPC를 이용한 모래시계 모양의 glass fiber chip 형광 실험 결과

- 형광 분자 표지의 검지 한계를 낮추기 위해 lateral flow sheet의 디자인을 직사각형에서 모래시계 모양으로 변경하여 형광 실험을 진행한 결과는 그림 74와 같음. 그림 74와 같이 target DNA의 농도가 25 fM일 때 S/N ratio가 3.23으로 검지 한계가 직사각형 모양의 lateral flow sheet보다 약 100배 정도 개선된 것을 확인함.
- Lateral flow sheet를 이용한 실험 결과, lateral flow sheet의 디자인을 변경했을 때 검지 한계가 기존보다 100 배 정도 개선되었지만 추가적으로 개선하는데 한계가 있고 낭비되는 시료의 양도 많은 상황임. 이러한 단점을 보완하고 높은 민감도를 갖는 새로운 형태의 종이칩의 필요성이 생김.

■ 높은 민감도를 갖는 종이칩 설계 및 제작

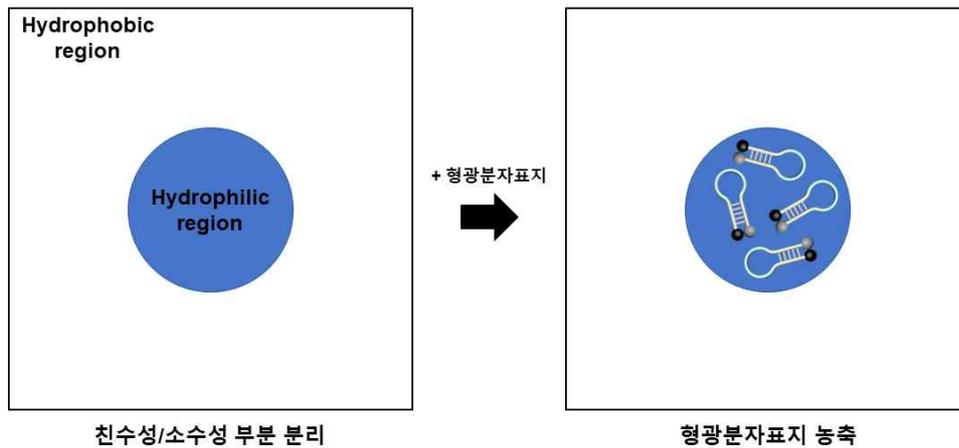


그림 75. 높은 민감도를 갖는 종이칩 디자인

- Lateral flow sheet의 낮은 민감도로 인해 검지 한계를 개선하는데 한계가 있다고 판단되어 높은 민감도를 갖을 수 있는 새로운 형태의 종이칩을 그림 75와 같이 설계함.
- 대부분의 종이는 친수성 물질로 구성되어 있는데 이를 화학적 처리를 이용하여 종이를 소수성으로 만들고 소수성을 부분적으로 제거해주는 방법을 이용하여 소수성 종이를 부분적으로 친수성으로 만들고 여기에 형광 분자 표지를 농축시킴으로써 높은 민감도를 갖게 설계함.

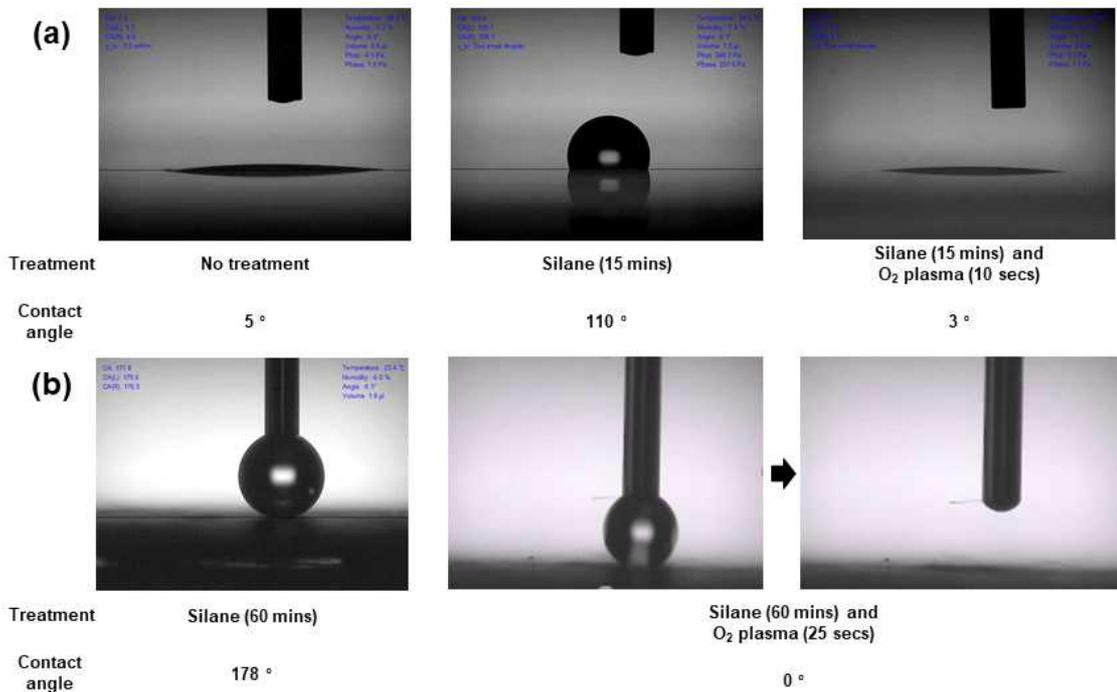


그림 76. 소수성 표면을 만들기 위한 화학적 처리 및 소수성의 제거 처리 결과  
(a) 유리 그리고 (b) glass fiber

- 유리와 glass fiber의 표면의 하이드록시기(-OH)가 존재하는 공통점을 가지고 있기 때문에 유리와 glass fiber를 이용하여 설계한 칩을 제작하고자 하였음.
- 설계한 디자인과 같이 먼저 소수성 표면을 만들어주기 위한 방법으로는 silane을 표면에 코팅하는 방법을 이용했음. Silane 용액과 표면을 동시에 데시케이터(desiccator)에 넣고 진공 조건을 잡아주면 silane 분자가 증발하여 표면에 코팅이 되는데 이를 이용하여 표면에 silane을 코팅함으로써 표면을 소수성으로 만들어줌. 소수성 표면을 제작한 후, O<sub>2</sub> plasma를 이용하여 표면의 소수성을 제거하고자 하였으며 이에 대한 테스트를 진행하였음.
- 소수성 표면을 만들기 위한 처리 및 소수성 제거 처리 결과는 그림 76과 같으며 그림에서 볼 수 있듯이 유리와 glass fiber에 silane을 이용한 소수성 표면이 만들어졌다는 것과 silane을

이용하여 제작한 소수성 표면이 O<sub>2</sub> plasma에 의해 잘 제거되었다는 것을 확인함.

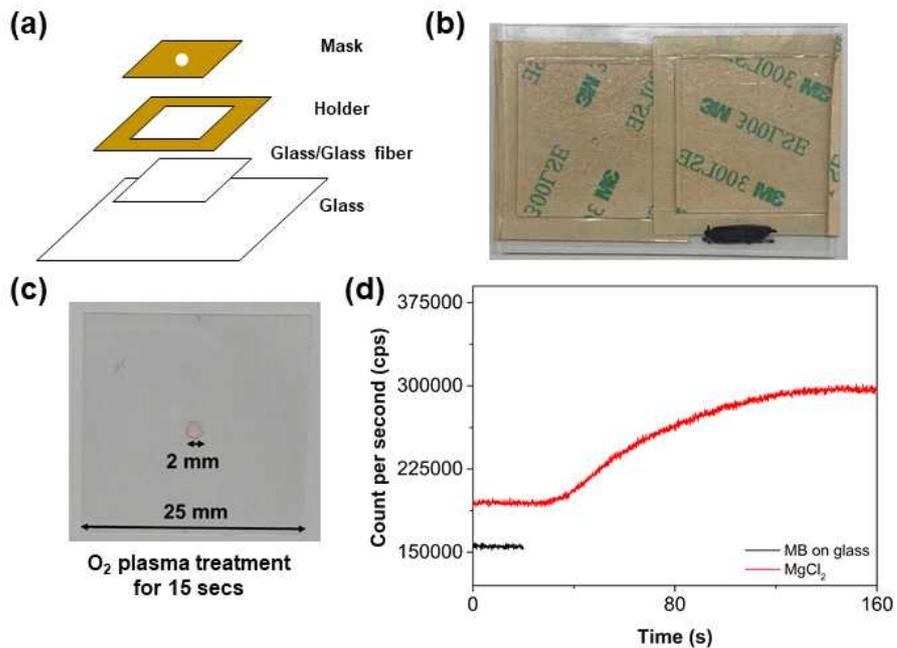


그림 77. 유리 표면에 부분적 친수성 영역의 제작 및 실험 결과  
 (a) 부분적 친수성 영역의 제작 방법 모식도, (b) 실제 제작을 위해 조립된 칩,  
 (c) 형광 분자 표지가 농축된 유리 칩 그리고 (d) 유리 칩에서의 실험 결과

- 먼저, 다루기 쉬운 유리의 표면을 소수성으로 만들어주고 이를 그림 77.(a)와 같이 조립을 하여 그림 77.(b)와 같이 만들고 여기서 구멍을 통해 O<sub>2</sub> plasma 처리를 해주면 부분적으로 친수성 표면이 만들어짐. 그리고 그림 77.(c)와 같이 유리의 친수성 부분에 형광 분자 표지를 떨어뜨려 말려줌으로써 농축을 하였음.
- 제작된 형광 분자 표지가 농축된 유리 칩에 MgCl<sub>2</sub> 500 mM을 떨어뜨려 형광 분자 표지가 안정적으로 농축되었는지를 확인함. 실험 결과는 그림 77.(d)와 같으며 그래프에서 알 수 있음. 형광 분자 표지의 형광이 target DNA 없이 발현되는 것을 통해 형광 분자 표지가 안정적으로 농축되지 않았다는 것을 확인함.
- 형광 분자 표지를 농축을 위해 부분적 친수성 영역을 갖는 표면을 만들고 친수성 영역에 형광 분자 표지를 농축하게 되면 형광 분자 표지가 coffee ring effect로 인해 그림 77.(c)와 같이 친수성 표면과 소수성 표면의 경계로 물리게 됨. 이때, 형광 분자 표지와 소수성 표면의 silane이 만나게 되는데 여기서 화학적 반응을 통해 형광 분자 표지의 구조가 망가지는 것으로 판단됨. 따라서, 형광 분자 표지를 농축하는 데 있어서 silane을 사용하는 것 대신 생체적합성을 갖는 소수성 폴리머인 PDMS(polydimethylsiloxane)을 이용하고자 함.

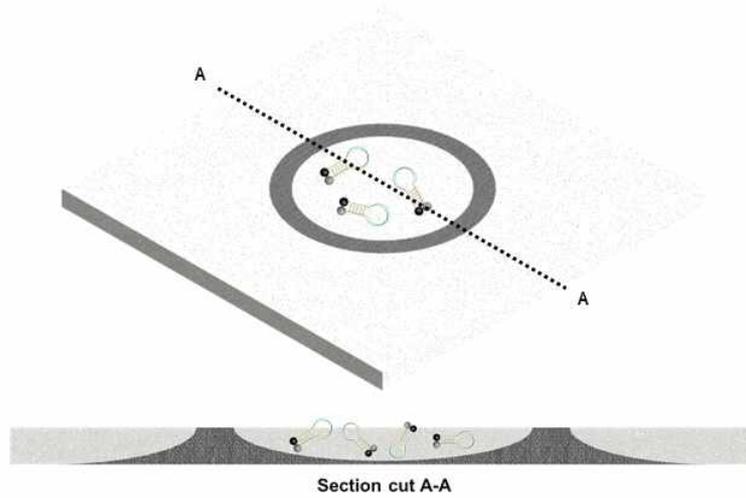


그림 78. PDMS를 이용하여 제작한 형광 분자 표지 농축 종이칩 모식도

- PDMS를 이용하여 glass fiber에 소수성 패턴을 만들고 이를 이용하여 형광 분자 표지를 농축하여 그림 78과 같이 형광 분자 표지가 농축된 종이칩을 제작하고자 함.
- 그림에서 어두운 부분이 PDMS를 의미하고 밝은 부분이 glass fiber를 의미함.

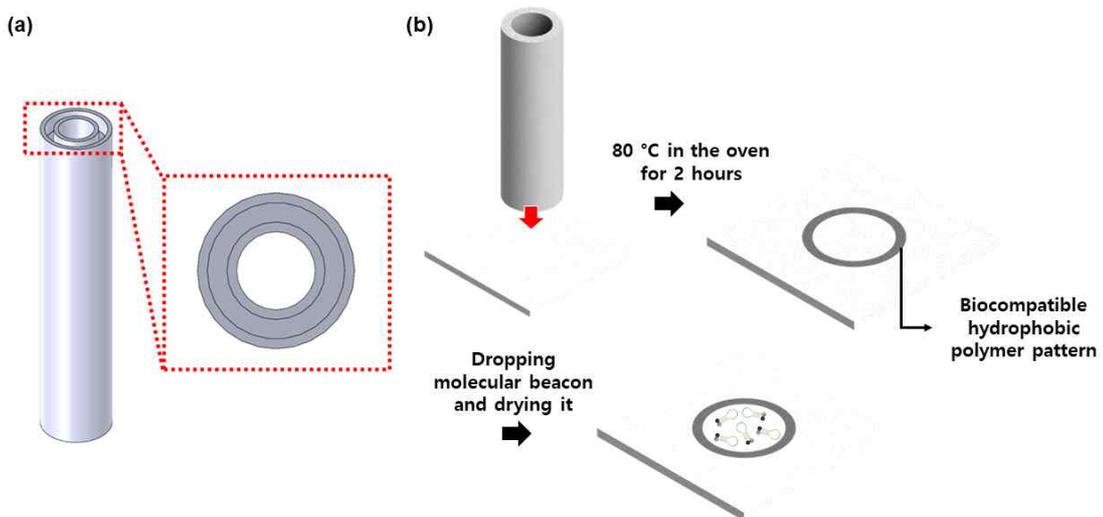


그림 79. (a) 3D 프린터를 이용하여 제작한 도장 그림 및  
(b) 도장과 PDMS를 이용한 형광 분자 표지 농축 종이칩 제작 과정

- PDMS를 이용하여 glass fiber에 소수성 패턴을 만들어주기 위해 3D 프린터를 이용하여 그림 79.(a)와 같이 홈이 있는 도장을 제작함.
- 도장의 홈에 PDMS를 로딩하고 이를 그림 79.(b)와 같이 glass fiber에 찍어주는 방식을 통해 glass fiber에 생체적합성을 갖는 소수성 폴리머 패턴을 만듦. 그리고 소수성 폴리머 패턴 내에 5  $\mu$ M 형광 분자 표지를 5  $\mu$ L 떨어뜨리고 말려줌으로써 형광분자표지를 농축하였으며 해당 과정을 통해서 형광 분자 표지 농축 종이칩을 제작함.

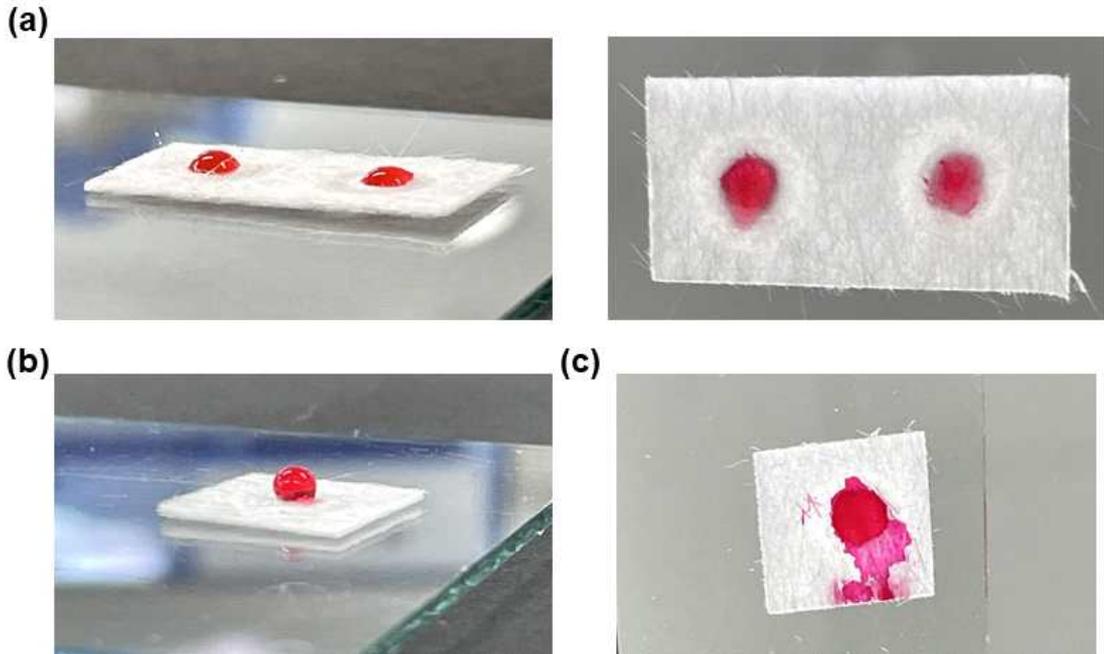


그림 80. (a) 형광 분자 표지 농축 종이칩에서의 물방울 모습  
 (b) 소수성 폴리머 패턴 내부가 소수성 폴리머로 가득 차 있는 칩에서의 물방울 모습  
 (c) 소수성 폴리머 패턴이 제대로 형성되지 않아 유체가 패턴 외부로 빠져나간 모습

- 실제 제작한 종이칩이 그림 78과 같이 디자인한 대로 제작되었는지 확인해주기 위해 빨간색 잉크를 섞은 용액을 떨어뜨려 이를 확인함. 만약 종이칩이 그림 78의 디자인과 같이 제작되었다면 용액을 떨어뜨렸을 때에 그림 80.(a)와 같이 용액이 종이칩으로 어느 정도 흡수될 뿐만 아니라 소수성 폴리머의 경계 부분에서 pinning되는 현상이 발생함.
- 하지만, 종이칩이 디자인한 대로 만들어지지 않아 소수성 폴리머가 소수성 패턴 내부를 가득 차 있는 경우나 소수성 폴리머 패턴 자체가 만들어지지 않을 경우에는 각각 그림 80.(b)와 같이 용액이 소수성 폴리머로 인해 둥근 형태로 폴리머 위에 존재하거나 그림 80.(c)와 같이 용액이 종이칩으로 흡수되지만 패턴 외부로 빠져나가는 모습을 확인할 수 있음.
- 제 1 세부, 제 2 세부 연구기관의 공동 연구를 통하여 본 핵산 검출 종이 기반 키트 특허를 출원함으로써 지적 재산을 확보함. 본 기술은 제 2 협동 연구기관인 팜스웰메디컬에 기술이전되어 사업화 진행 중에 있음.

관인생략	
<b>출원번호통지서</b>	
출원일자	2021.07.06
특기사항	심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(21384)
출원번호	10-2021-0088552 (접수번호 1-1-2021-0779401-72) (DAS접근코드DA40)
출원인명칭	성균관대학교산학협력단(2-2005-001360-4)
대리인성명	특허법인 아주(9-2001-100005-9)
발명자성명	이진기 문영광 문혁균 이정현 장준혁
발명의명칭	핵산 검출 키트 및 이의 제조 방법
<b>특 허 청 장</b>	

그림 81. 제 1 세부와 제 2 세부 연구기관의 공동 연구로 출원한 특허의 출원번호 통지서

■ 제작한 형광 분자 농축 종이칩의 검지 한계 확인

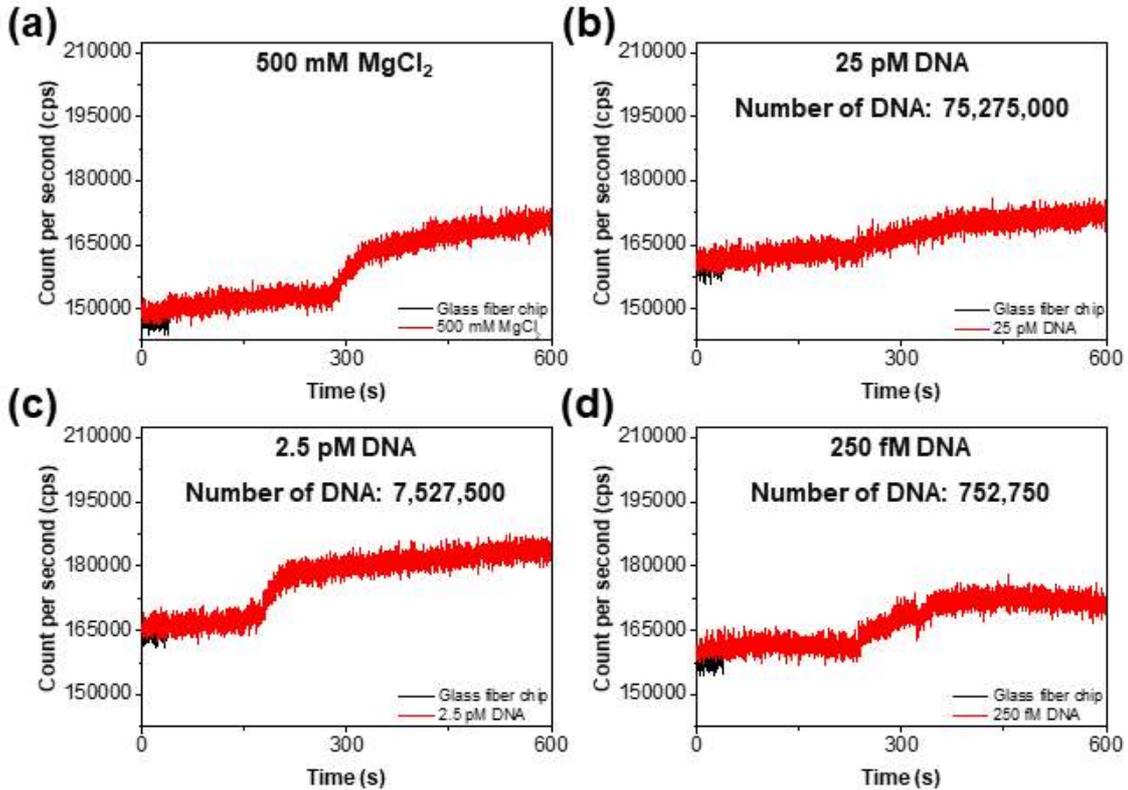


그림 82. Glass fiber 소재를 이용한 형광 분자 표지 농축 종이칩의 검지 한계 측정 결과  
(a) 500 mM MgCl<sub>2</sub>, (b) 25 pM DNA, (c) 2.5 pM DNA 그리고 (d) 250 fM DNA

- Glass fiber를 사용하여 형광 분자 표지 농축 종이칩을 제작한 후, 제작한 종이칩의 검지 한계를 확인 실험의 결과는 그림 82와 같음. 해당 실험은 MPPC를 이용하여 수행되었음.
- 제작한 농축 종이칩이 안정적으로 DNA를 잘 검지한다면 500 mM MgCl<sub>2</sub>에 대해서 형광 신호가 나타나지 않을 뿐만 아니라 떨어뜨려주는 DNA의 농도가 높아질수록 형광의 세기가 강하게 측정되어야함.
- 하지만, 그림 82.(a)와 같이 500 mM MgCl<sub>2</sub>를 떨어뜨렸을 때에 형광이 관측되며 또한, 그림 82.(b-d)를 보았을 때에 DNA의 농도가 높아짐에도 불구하고 형광의 세기가 일정하게 올라가는 것을 확인할 수 있었음.
- 해당 결과를 통해서 형광 분자 표지가 glass fiber와 상호 작용을 한다는 사실을 알 수 있었음. 이에 대한 해결을 위해 제 2 세부 연구기관인 성균관대학교 신소재공학부와 상의를 했고 고분자를 glass fiber에 기능화하여 형광 분자 표지와 glass fiber 사이의 상호 작용으로 인한 검지의 불안정성을 줄이고자 함.

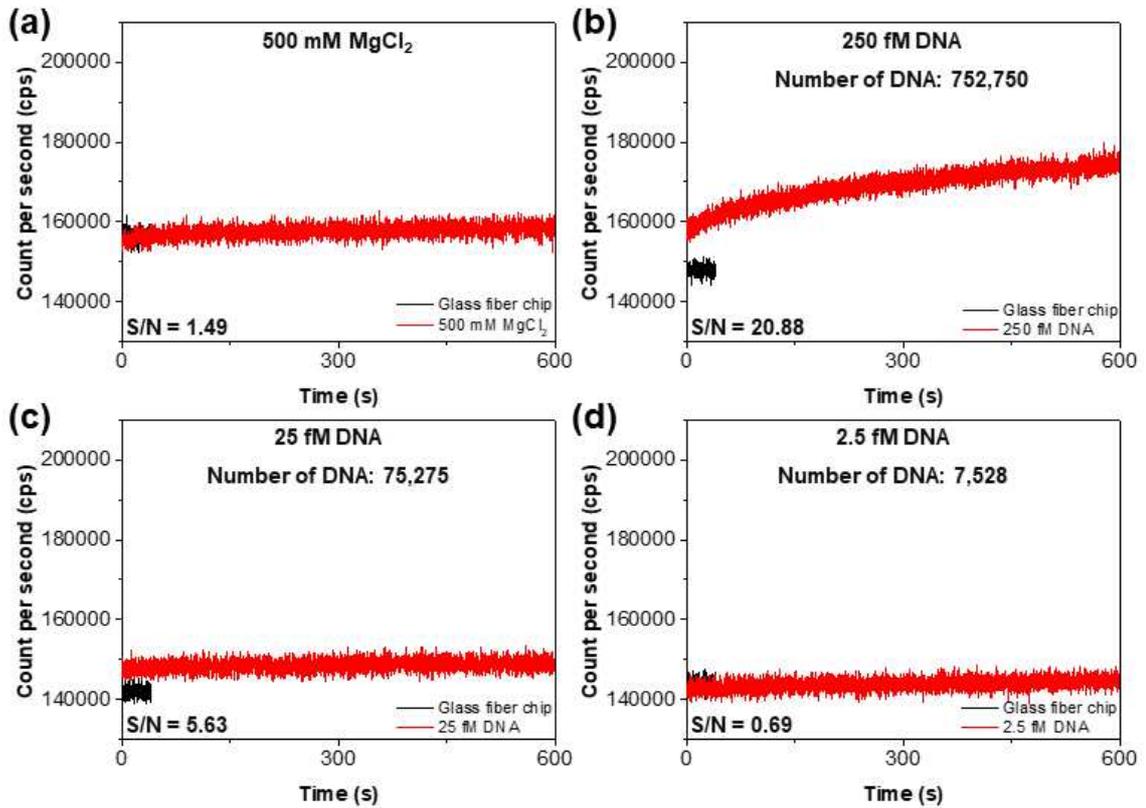


그림 83. 고분자를 기능화한 glass fiber 소재를 이용한  
 형광 분자 표지 농축 종이칩의 검지 한계 측정 결과  
 (a) 500 mM MgCl<sub>2</sub>, (b) 250 fM DNA, (c) 25 fM DNA 그리고 (d) 2.5 fM DNA

- Glass fiber에 고분자를 기능화하고 이를 이용하여 형광 분자 표지 농축 종이칩을 제작했음. 해당 종이칩의 검지 한계를 측정한 실험 결과는 그림 83과 같음.
- 그림 83.(a)와 83.(b-d)와 같이 고분자를 기능화하여 제작한 농축 종이칩은 고분자를 기능화하기 전과 다르게 500 mM MgCl<sub>2</sub>를 떨어뜨렸을 때에도 형광의 변화가 크지 않았으며 또한, DNA의 농도가 증가함에 따라 형광의 세기도 증가하는 결과를 확인할 수 있었음. 따라서, 고분자를 기능화한 glass fiber를 사용하여 형광 분자 표지 농축 종이칩을 제작하는 경우에는 종이칩이 안정적으로 작동한다고 판단할 수 있음.
- 위에서 설명했듯이 형광을 검지하는데 있어서 S/N ratio가 3 이상이어야 믿을 만한 데이터로 판단할 수 있음. 형광 분자 표지 농축 종이칩에 25 fM DNA를 5 μL 떨어뜨려 반응시켰을 때의 S/N ratio가 5.63으로 3 이상이기 때문에 형광 분자 표지 농축 종이칩의 검출 한계는 수만개 수준의 DNA로 판단할 수 있음.

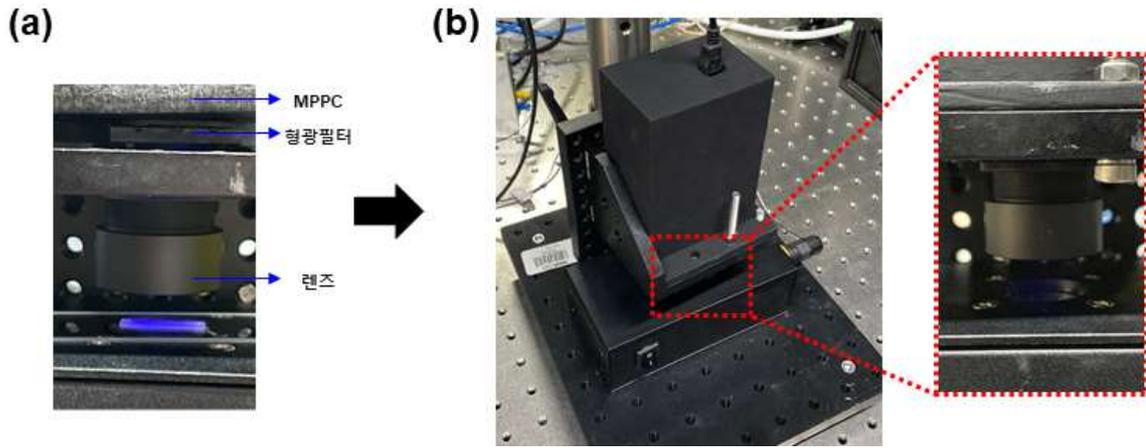


그림 84. 보다 개선된 검지를 위해 형광 검지 기기 설치 구조를 개조한 사진

(a) 구조를 개조하기 전 형광 검지 기기 정면사진

그리고 (b) 구조를 개조한 후 형광 검지 기기 사진

- MPPC를 이용하여 형광의 발현 정도를 측정할 때 사용되었던 MPPC 기기의 구조는 그림 84.(a)와 같음. 그림 84.(a)에서 알 수 있듯이 형광 필터가 외부로 노출이 되어있다는 것을 확인할 수 있음. 이에 따라 형광 필터 및 MPPC 기기의 고정이 완벽하게 되지 않았다는 문제점과 형광을 측정할 때에 진단 기기의 위치에 대한 이슈가 존재하였음.
- 분석되는 문제점과 이슈를 해결하여 보다 안정적으로 형광을 검지할 뿐만 아니라 이를 개선함으로써 종이칩에서 진단되는 검지 한계 역시 개선하고자 함.
- 그림 84.(b)와 같이 3D 프린터를 이용하여 MPPC 기기 고정틀을 제작함으로써 MPPC 기기의 위치가 일정하게 만들어주었으며 형광필터를 내부로 삽입시킴으로써 형광필터 역시 완벽하게 고정해줌으로 분석되는 문제점을 해결함. 이렇게 MPPC 기기와 형광필터를 고정함에 따라서 종이칩의 위치가 렌즈의 정중앙에 위치해야만 정확하게 형광을 검지할 수 있도록 하여 이슈도 해결함.

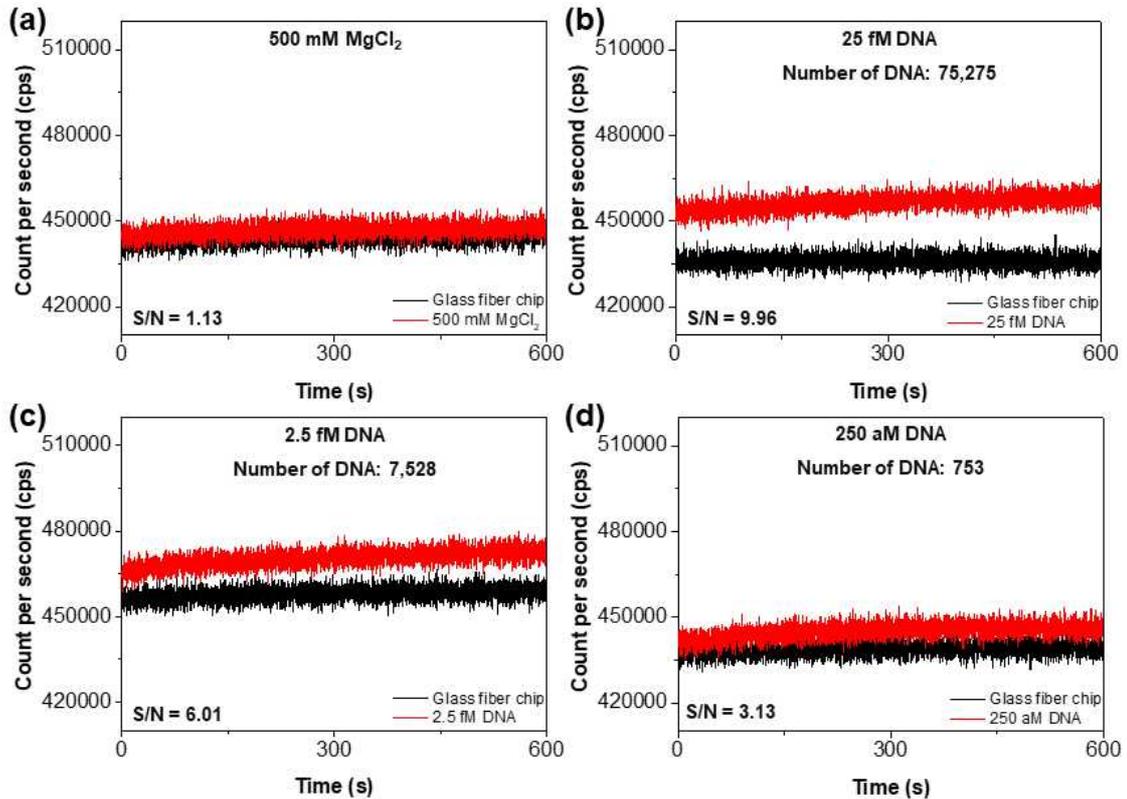


그림 85. 형광 검지 기기를 개선한 후, 고분자를 기능화한 glass fiber 소재를 이용한 형광 분자 표지 농축 종이칩의 검지 한계 측정 결과  
(a) 500 mM MgCl<sub>2</sub>, (b) 25 fM DNA, (c) 2.5 fM DNA 그리고 (d) 250 aM DNA

- 개선된 형광 검지 기기를 통해 형광 분자 표지 농축 종이칩의 검지 한계를 재측정하였으며 결과는 그림 85와 같음.
- 그림 85.(a)와 85.(b-d)에서 알 수 있듯이 형광 분자 표지 농축 종이칩이 안정적으로 작동한다는 것을 확인하였을 뿐만 아니라 종이칩의 검지 한계가 기존의 측정되었던 검지 한계인 25 fM DNA 보다 더 개선된 250 aM DNA까지 검지할 수 있다는 것을 확인하였음. 이를 통해서 형광 분자 표지 농축 종이칩을 사용하면 수 백개 수준의 DNA까지 검지할 수 있음을 확인함.

■ 형광 분자 표지 농축 종이칩에서의 구제역과 조류 인플루엔자 바이러스 핵산에 대한 검지 한계 확인

- 제 2 세부 연구기관인 성균관대학교 신소재공학부에서 설계한 구제역과 조류 인플루엔자 바이러스 검지를 위한 형광 분자 표지를 전달받아 형광 분자 표지 농축 종이칩에 도입하였음. 해당 형광 분자 표지를 사용하였을 때에 구제역과 조류 인플루엔자 바이러스 핵산에 대한 검지 한계 측정 실험을 진행함.

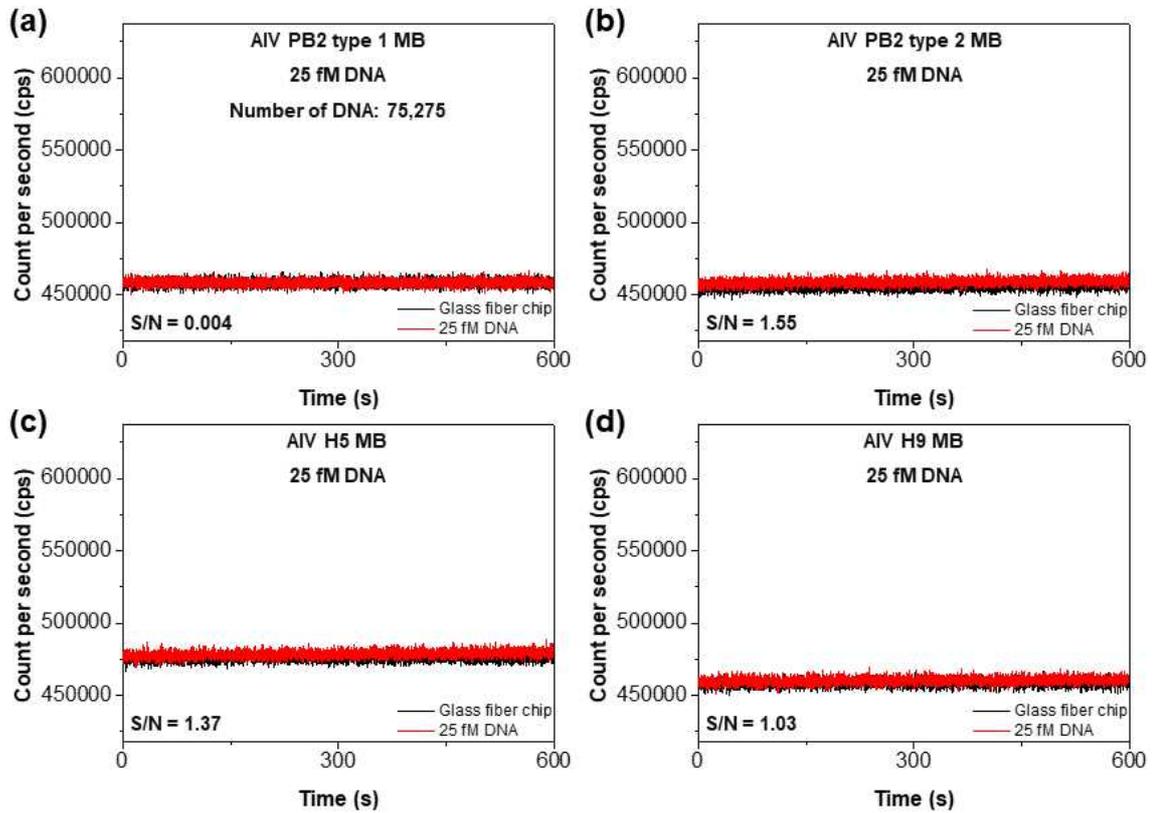


그림 86. 조류 인플루엔자 바이러스 검지를 위한 4 종류 형광 분자 표지를 이용하여 제작한 형광 분자 표지 농축 종이칩의 25 fM DNA에 대한 반응성 평가 결과  
(a) AIV PB2 type 1 MB, (b) AIV PB2 type 2 MB, (c) AIV H5 MB 그리고 (d) AIV H9 MB

- 조류 인플루엔자 바이러스 검지를 위해 총 4 가지의 형광 분자 표지를 전달받았으며 전달받은 형광 분자 표지는 AIV PB2 type 1 MB, AIV PB2 type 2 MB, AIV H5 MB 그리고 AIV H9 MB임.
- 4 종류의 형광 분자 표지를 이용하여 형광 분자 농축 종이칩을 제작하였고 여기에 25 fM DNA를 떨어뜨려 형광 발현 정도를 확인했으며 결과는 그림 86과 같음.
- 그림 86에서 알 수 있듯이 4 종류의 형광 분자 표지 모두 25 fM DNA에서는 S/N ratio가 3을 넘지 않아 해당 데이터를 토대로 검지 한계로 보기는 힘들지만 각 형광 분자 표지의 반응성은 평가를 할 수 있었음. S/N ratio가 큰 순서대로 반응성이 좋다고 할 수 있으며 AIV PB2 type 2 MB, AIV H5 MB, AIV H9 MB 그리고 AIV PB2 type 1 MB 순서로 반응성이 작아짐.

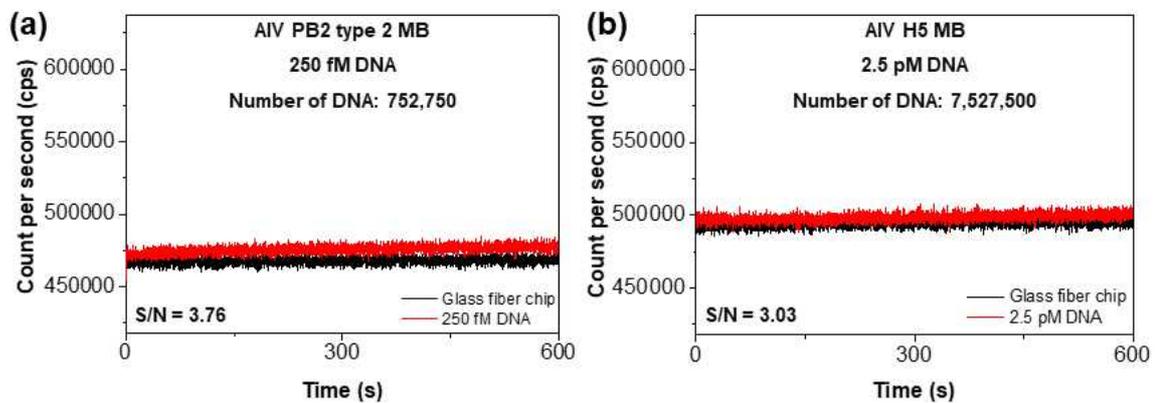


그림 87. (a) AIV PB2 type 2 MB 그리고 (b) AIV H5 MB를 이용하여 제작한 형광 분자 표지 농축 종이칩의 검지 한계 평가 결과

- 4 종류의 형광 분자 표지 중 반응성이 좋았던 두 개의 형광 분자 표지를 선정하여 형광 분자

표지 농축 종이칩을 제작하였으며 각각의 농축 종이칩의 검지 한계를 측정하였음.

- 측정 결과는 그림 87과 같으며 그림 87.(a)에서 알 수 있듯이 AIV PB2 type 2 MB를 이용하여 제작한 농축 종이칩의 검지 한계는 250 fM DNA 수준까지 검지 가능하며 AIV PB2 type 2 MB 농축 종이칩을 사용하면 수 십만개 수준의 DNA를 검지할 수 있음을 알 수 있음. AIV H5 MB 농축 종이칩을 사용할 경우에는 2.5 pM DNA 수준까지 검지 가능하며 AIV H5 MB 농축 종이칩을 사용하면 수 백만개 수준의 DNA를 검지할 수 있음을 알 수 있음.

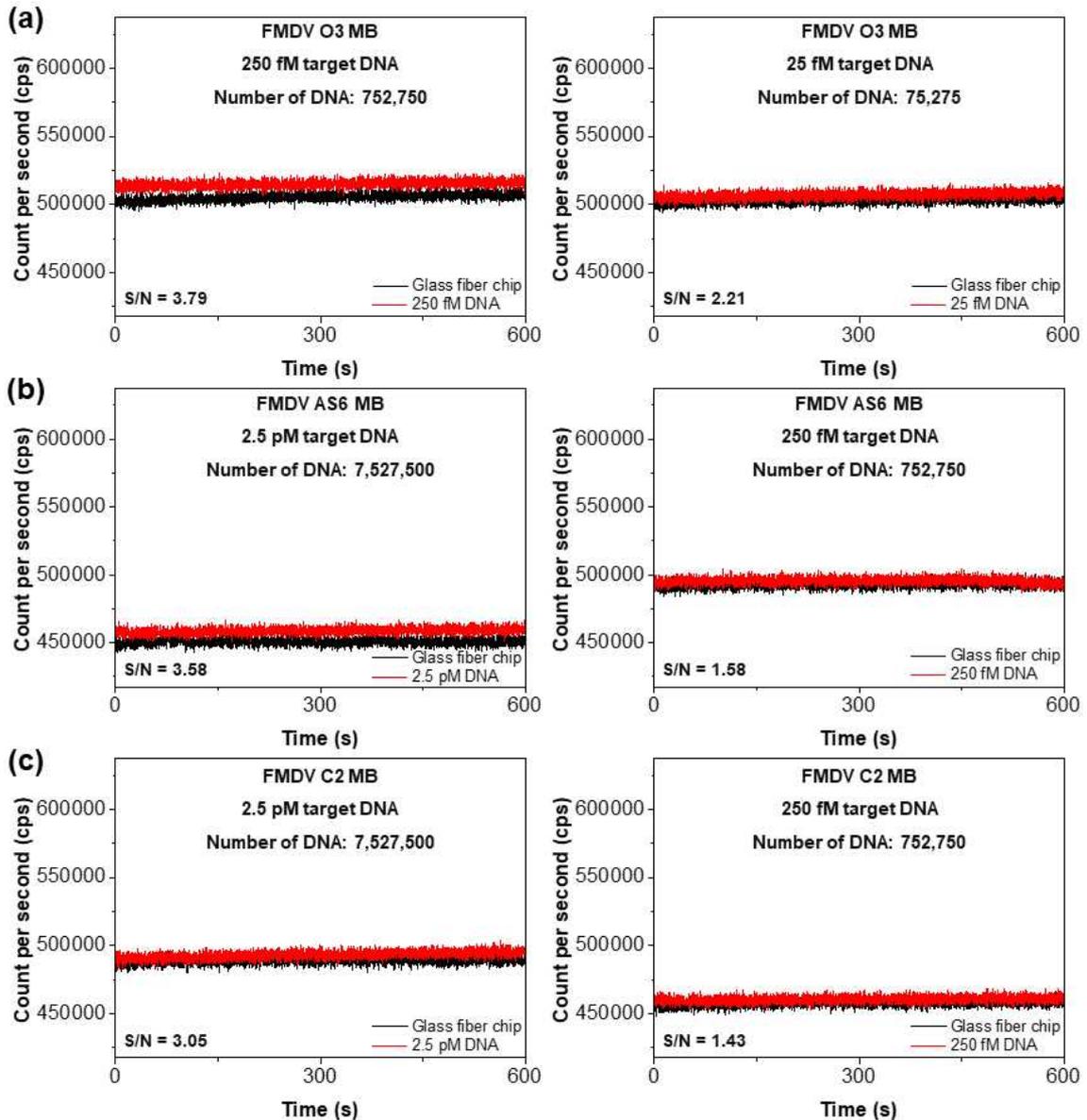


그림 88. 구제역 바이러스 검지를 위한 3 종류 형광 분자 표지를 이용하여 제작한 형광 분자 표지 농축 종이칩의 검지 한계 평가 결과

(a) FMDV O3 MB, (b) FMDV AS6 MB, 그리고 (c) FMDV C2 MB

- 구제역 바이러스 검지를 위해 총 3 가지의 형광 분자 표지를 전달받았으며 전달받은 형광 분자 표지는 FMDV O3 MB, FMDV AS6 MB 그리고 FMDV C2 MB임.
- 3 종류의 형광 분자 표지를 이용하여 형광 분자 농축 종이칩을 제작하였고 여기에 DNA를 농도 별로 떨어뜨려 형광 발현 정도를 확인했으며 이를 이용하여 검지 한계를 평가하였음. 검지 한계 평가 결과는 그림 88과 같음.
- 그림 88에서 알 수 있듯이 3 종류의 형광 분자 표지 중 FMDV O3 MB를 사용하여 제작한 농축 종이칩은 250 fM DNA(수 십만개 수준의 DNA)를 떨어뜨려도 S/N ratio가 3보다 크게 나와 반응성이 가장 좋다는 것을 알 수 있었음.

- 반면, FMDV AS6 MB와 FMDV C2 MB를 사용하여 제작한 농축 종이칩의 경우에는 2.5 pM (수 백만개 수준의 DNA)를 떨어뜨려야 S/N ratio가 3보다 크게 나와 반응성이 약간은 떨어진다는 것을 확인함.

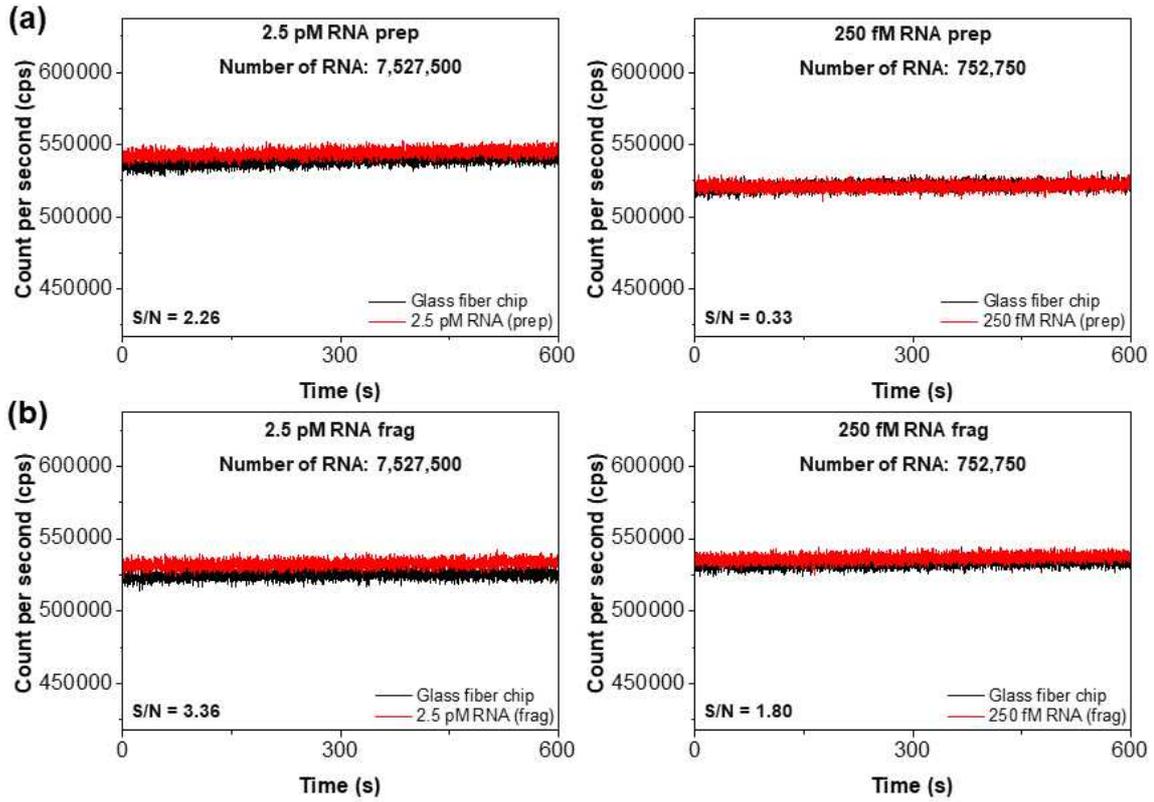


그림 89. 형광 분자 표지 농축 종이칩에서의 조류 인플루엔자 바이러스 RNA 검지 결과  
 (a) RNA preparation 그리고 (b) RNA fragment  
 (사용된 형광 분자 표지: AIV PB2 type2 MB)

- 구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스는 RNA 바이러스로 핵산을 추출했을 때 RNA만 추출 가능하기 때문에 RNA를 이용한 실험을 수행되어야함.
- 따라서, 제 1 협동 연구기관인 숙명여자대학교 화공생명공학부에서 제작한 모델 바이러스에서 추출한 RNA preparation(preparation)과 RNA preparation을 RNase III enzyme으로 무작위로 단편화시켜준 RNA fragment(fragment)를 사용하여 형광 분자 표지 농축 종이칩에서의 검지 실험을 진행하였으며 결과는 그림 89와 같음. 해당 실험에서 사용된 형광 분자 표지는 AIV PB2 type 2 MB로 반응성이 가장 좋은 형광 분자 표지를 사용하였음.
- 그림 89와 같이 형광 분자 표지 농축 종이칩에 같은 농도의 RNA preparation보다 RNA fragment를 떨어뜨려주었을 때 S/N ratio가 결과가 좋다는 것을 확인함.
- 이는 RNA preparation의 길이가 길어 형광 분자 표지의 loop 부분과 반응하기 어렵기 때문으로 판단됨. 반면, RNA fragment는 RNA preparation 보다 길이가 짧아 반응성이 높은 것으로 판단됨.
- 형광 분자 표지 농축 종이칩의 조류 인플루엔자 바이러스 RNA fragment에 대한 검지 한계는 2.5 pM RNA(수 백만개 수준의 RNA)로 확인되며 해당 결과를 토대로 형광 분자 표지 농축 종이칩을 이용하여 실제 바이러스를 검지할 때에는 RNA fragment를 사용해야 되는 것을 알 수 있음.

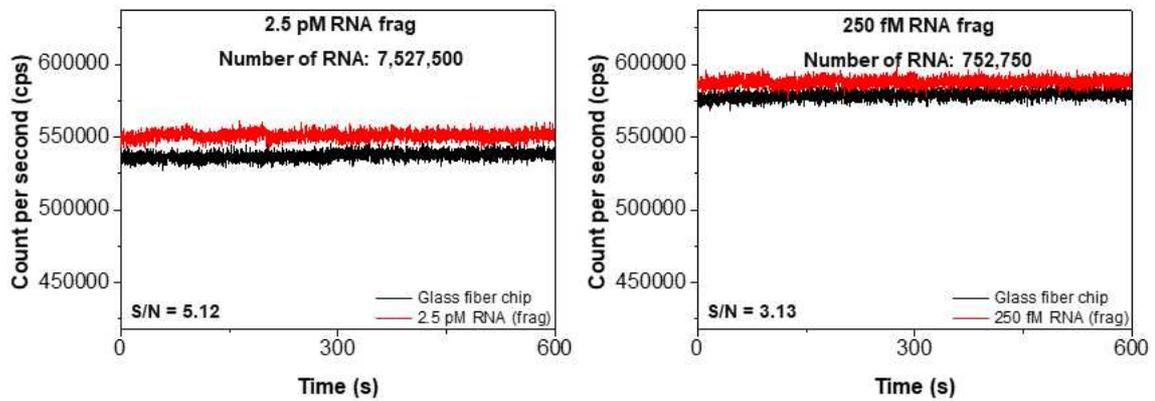


그림 90. 형광 분자 표지 농축 종이칩에서의 구제역 바이러스 RNA fragment 검지 결과  
(사용된 형광 분자 표지: FMDV O3 MB)

- 조류 인플루엔자 바이러스 RNA 실험을 통해 RNA fragment를 사용해야 된다는 결과를 토대로 구제역 바이러스 RNA 검지 실험을 진행할 때는 RNA fragment를 사용하여 실험을 진행하였으며 실험 결과는 그림 90과 같음.
- 실험 결과, 형광 분자 표지 농축 종이칩의 구제역 바이러스 RNA fragment에 대한 검지 한계는 250 fM RNA(수 십만개 수준의 RNA)로 확인되며 조류 인플루엔자 바이러스 RNA를 검지할 때보다 결과가 좋다는 것을 알 수 있음.
- 또한, 조류 인플루엔자 바이러스 RNA 실험에서는 DNA를 사용했을 때보다 검지 한계가 좋지 않은 결과를 확인할 수 있었지만 구제역 바이러스 RNA 실험에서는 DNA와 비슷한 결과를 갖는다는 것을 알 수 있음.
- 이는 조류 인플루엔자 검지를 위한 형광 분자 표지와 구제역 바이러스 검지를 위한 형광 분자 표지의 sequence 차이로 인해 발생한 현상을 판단됨.
- 조류 인플루엔자 바이러스 및 구제역 바이러스 검지를 위해 개발된 형광 분자 표지는 연구 종료 이후에도 추가적으로 개선될 계획임.

⑦ 시작품 제작을 위한 위탁연구기관과의 상호 협력 및 최적화

■ 형광 분자 농축 종이칩을 활용한 팜스웰메디컬 장비의 민감도 확인

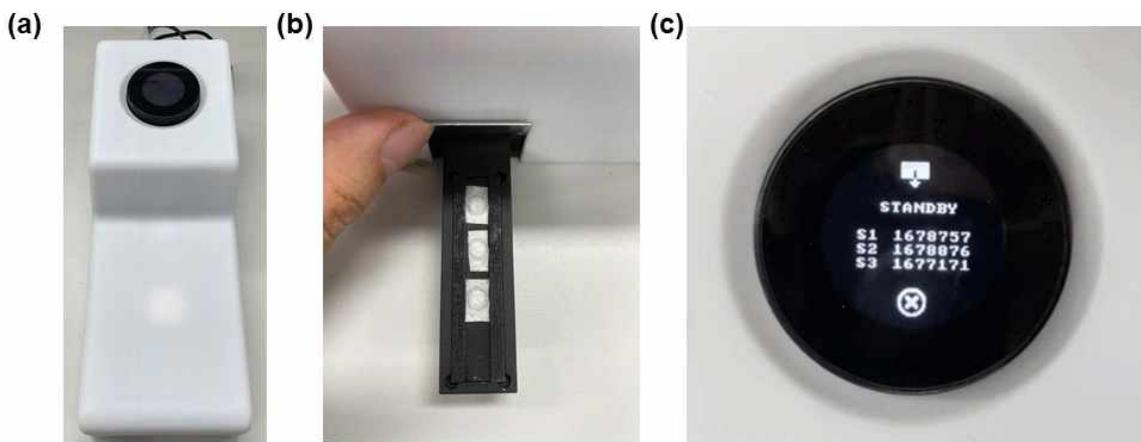


그림 91. (a) 팜스웰메디컬에서 제작한 형광 검지 기기,  
(b) 검지를 위해 형광 분자 표지 농축 종이칩을 넣은 사진 그리고  
(c) 형광 검지 기기에서 관측된 형광 데이터

- 제 2 협동 연구기관인 팜스웰메디컬에서 자체 제작한 형광 검지 기기는 그림 91.(a)와 같으며 바이러스 검지를 위해 형광 분자 표지 농축 종이칩을 검지 기기에 넣는 모습은 그림 91.(b)와 같음. 그리고 형광 검지 기기에 농축 종이칩을 넣은 후 형광을 검지했을 때 검지 기기의 화면에 나타나는 데이터는 그림 91.(c)와 같이 나타남.

- 검지 순서는 다음과 같음. 그림 91.(b)와 같이 농축 종이칩을 검지 기기에 넣고 형광을 관측하고 난 후, 용액 5  $\mu$ L를 떨어뜨리고 10 분 후 형광을 관측하여 종이칩만 관측한 결과와 용액을 떨어뜨리고 난 이후 관측 결과의 차이를 이용하여 바이러스 감염 여부를 판단할 수 있음.
- 팜스웰메디컬의 장비 평가는 HIV MB 농축 종이칩을 사용하여 평가를 진행하였음. 따라서, 평가에서 사용된 target DNA는 HIV MB와 상보 결합할 수 있는 DNA이며 other DNA는 HIV MB와 상보 결합할 수 없는 DNA임.

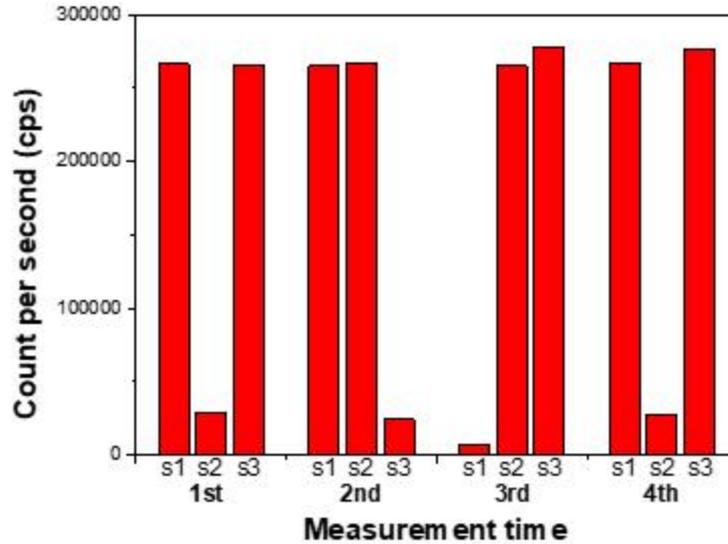


그림 92. 팜스웰메디컬 장비 평가 결과 1  
형광 분자 표지 농축 종이칩 만을 검지 기기에 넣고 평가한 결과

- 팜스웰메디컬에서 제작한 형광 검지 기기를 평가하기 위해 형광 분자 표지 농축 종이칩만 넣고 측정을 진행함. 형광 검지 기기가 제대로 작동한다면 매번 측정할 때마다 비슷한 값이 나와야 함.
- 하지만, 그림 92와 같이 동일한 샘플을 여러 번 측정했을 때의 측정 결과, 모든 부분에서 측정된 값이 매우 크게 차이가 나며 측정할 때마다 차이가 나는 부분이 달라지는 문제가 발생함.

표 8. 팜스웰메디컬 장비 평가 결과 2

	Glass fiber chip	After 10 mins	Difference	S/N ratio
25 nM target DNA	118833	124073	5240	2.10
	132247	136890	4643	1.86
	129960	135145	5185	2.07
25 pM target DNA	129732	135623	5891	2.36
	122600	127650	5050	2.02
	125248	130777	5530	2.21
2.5 pM target DNA	114091	119667	5576	2.23
	129214	134645	5432	2.17
	142102	147457	5356	2.14
25 fM target DNA	120070	126297	6226	2.49
	129606	134023	4417	1.77
	134791	141372	6581	2.63

- 형광 분자 표지 농축 종이칩만 여러 번 측정했을 때에 측정되는 값이 현격히 많이 차이 나는 문제점이 개선된 장비의 평가 결과는 표 8과 같음.
- 평가 방식은 다음과 같음. 형광분자표지 농축 종이칩만 넣고 3번 측정을 진행 후, target DNA를 농도별로 떨어뜨리고 10분 뒤 3번 측정을 진행하였으며 표 8에 들어간 데이터는 3번 측정된 값의 평균값임.

- 표 8에서 알 수 있듯이 형광 분자 표지 농축 종이칩만의 형광 측정 결과가 이전보다 많이 개선된 것을 확인할 수 있었음. 하지만, target DNA의 농도가 높아짐에 따라 S/N ratio가 증가해야 하는데 값이 일정한 경향을 보임.
- 해당 장비의 민감도가 떨어진다고 판단되며 이를 개선한 장비를 전달받아 평가를 진행함.

표 9. 팜스웰메디컬 장비 평가 결과 3

	Glass fiber chip	After 10 mins	Difference	S/N ratio
250 fM DNA	194065	219123	25058	10.02
	186315	211049	24734	9.89
	197344	244668	47324	18.93
25 fM DNA	202320	232244	29924	11.97
	180997	195063	14066	5.63
	182612	196698	14086	5.63
2.5 fM DNA	211972	281825	69853	27.94
	196076	229126	33050	13.22
	194110	233783	39673	15.87
25 aM DNA	206779	224327	17548	7.02
	201446	243525	42079	16.83
	199567	241122	41555	16.62

- 형광 검지 기기의 민감도를 개선하기 위해 기기 내부의 MPPC를 교체한 장비를 전달을 받았으며 해당 기기의 평가 결과는 표 9와 같음.
- 평가 방식은 이전 장비 평가와 같은 방식으로 진행됨. 평가 결과, 이전 평가에 비해 용액을 떨어뜨렸을 때와 떨어뜨리지 않았을 때의 S/N ratio가 훨씬 커진 것을 확인하였으나 용액의 농도에 따른 경향성이 나타나지 않음.
- 장비의 내부의 구조적인 문제가 있다고 판단하였으며 이에 대해 제 2 협동 연구기관인 팜스웰메디컬과 상의를 통해 장비의 내부 구조를 수정함.

표 10. 팜스웰메디컬 장비 평가 결과 4

	Glass fiber chip	After 10 mins	Difference	S/N ratio
2.5 pM target DNA	1664179	1678652	14473	5.79
	1660955	1678690	17735	7.09
	1664799	1677356	12558	5.02
250 fM target DNA	1663204	1669213	6009	2.40
	1661061	1667554	6493	2.60
	1661643	1668573	6930	2.77
25 pM other DNA	1665290	1668474	3184	1.27
	1662476	1665586	3110	1.24
	1661894	1665152	3259	1.30

- 장비의 내부 구조를 변경한 형광 검지 장비에 대한 평가를 진행하였으며 평가 방식은 이전과 동일하게 진행되었음. 평가 결과는 표 10과 같음.
- 표 10에서 알 수 있듯이 해당 장비를 통해 형광 분자 표지 농축 종이칩을 측정하였을 때에 종이칩 자체의 형광이 거의 일정하게 나온다는 것을 알 수 있었음. 또한, 용액의 농도에 따른 S/N ratio의 경향성이 나타났으며 이를 통해 장비의 검지 한계를 확인할 수 있었음.
- 제 2 협동 연구기관인 팜스웰메디컬에서 제작한 장비의 검지 한계는 현재 수 백만개 수준의 DNA를 검지할 수 있으며 이는 연구 기간 종료 이후에도 추가적인 연구를 통해 개선될 예정임.

① 형광 기반의 검지 시스템 개발을 위한 형광 나노재료 및 소광재료 설계 및 합성  
 ■ 형광 재료 및 소광재료의 조사 및 형광분자표지 제작을 위한 최적의 재료 선정

표 11. 형광분자표지 제작을 위한 형광 재료의 고유 파장 및 대응되는 소광 재료의 종류 조사

FL dye	Ex. Peak (nm)	Em. Peak (nm)	Compatible quenchers
6-FAM	495	520	Iowa Black-FQ, BHQ-1 and Dabcyl
HEX	525	554	BHQ-1, Iowa Black-FQ and Dabcyl
TET	490	535	BHQ-1, Iowa Black-FQ and Dabcyl
Cy3	550	605	BHQ-2 and Dabcyl
Cy5	640	675	BHQ-3 and Dabcyl
TAMRA	559	583	Dabcyl
Alexa Fluor®	492-753	517-782	Dabcyl

- 형광 분자 표지 제작을 위한 형광 재료 (fluorescence material)를 조사하고, 이에 대응되는 소광재료를 목록화 하였음. 사용 가능한 형광 물질 후보군으로는 1) 양자점과 같은 형광 나노입자, 2) 유기 형광 염료가 있으며, 종이에의 기능화 후에 바이러스 핵산 검출 과정에서 검체와 형광 분자 표지의 브라운 운동 (brownian motion)이 용이한 유기 형광 염료를 주요 대상으로 자체 선정하였음
- 조사한 형광재료를 바탕으로, 모델 형광분자표지 제작을 위한 형광 / 소광재료 조합으로써 6-FAM과 Dabcyl을 선정하였음. 발광파장을 고려하여 추가적인 형광재료를 사용하는 것이 가능하며, 이에 대응되는 소광재료 역시 1-3 종류로 선정할 수 있음을 확인하였음

■ 선정된 형광 / 소광 재료를 기반으로 모델 형광분자표지 디자인 선정

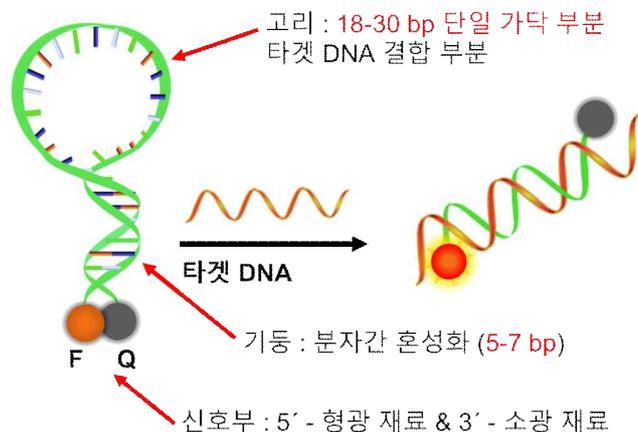
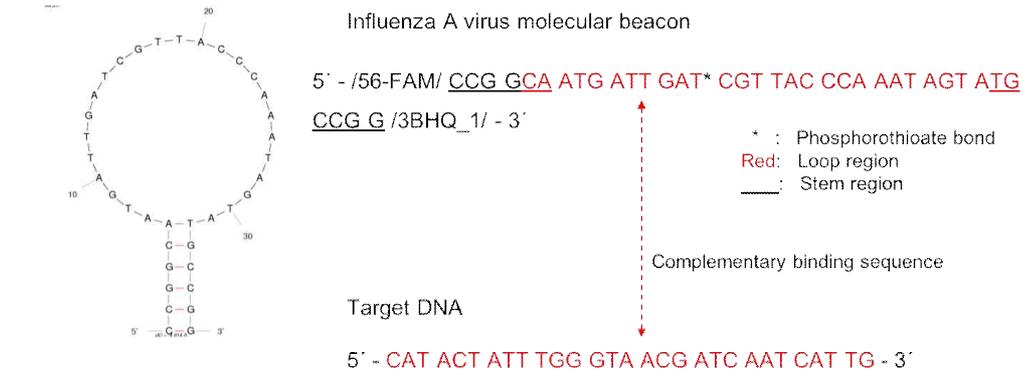


그림 93. 형광분자표지 디자인을 위해 고려해야하는 변수

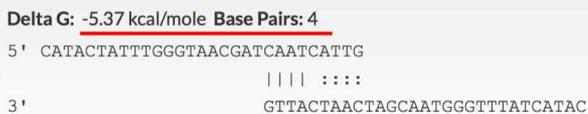
- 효과적인 형광분자표지 디자인을 위해, 형광분자표지를 구성하는 세 부분을 다음과 같은 조건을 고려하여 디자인하고자 하였음
- 고리 (loop)는 검지하고자 하는 타겟 DNA 또는 RNA와 반응할 수 있는 ssDNA 부분으로, 18-30 bp의 ssDNA로 디자인하는 것이 일반적임
- 줄기 (stem)는 형광분자표지의 구조를 유지해주는 부분으로, 타겟 DNA의 유무에 따라 혼성화 (hybridization)을 통해 형광분자표지의 2차원 구조를 유지하거나 선택적으로 탈혼성화

- (de-hybridization)가 일어날 수 있어야 함. 이에 5-7 bp의 dsDNA로 디자인하고자 하였음
- 형광신호부 (signal reporter)는 형광분자표지의 각 말단 (5' 및 3')에 결합하고 있는 형광재료 및 소광재료를 나타내며, 타겟 DNA 또는 RNA가 존재하지 않을 때 가까운 거리를 유지할 수 있도록 줄기의 길이 및 각 형광 / 소광재료의 특성을 고려하여 기능화되어야 함. 이에 5' 부분에 형광재료인 6-FAM을 기능화하고 3' 말단에 소광재료인 Dabcyl을 기능화하였음



Formation of self-dimer & complementary binding

Homo-dimer



Complementary binding

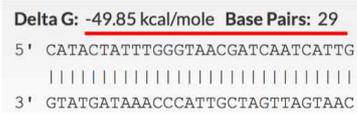
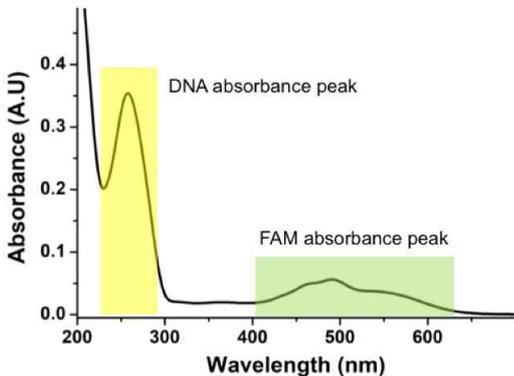


그림 94. 모델 형광분자표지의 구조 및 타겟 DNA와의 열역학적 반응성 평가

- 2차년도에 진행할 조류 인플루엔자 바이러스 및 구제역 바이러스 검지용 형광분자표지의 제작을 위해 1차년도에 형광분자표지의 반응 조건 등을 확인하고자 하였음, 이에 인플루엔자 A 바이러스 유래 염기서열을 활용하여 모델 형광분자표지를 제작하였음. 해당 형광분자표지는 1) 29 bp의 고리 부분, 2) 6 bp의 줄기 부분, 3) 종이에의 기능화를 위한 phosphothioate bond를 포함하고 있음
- 제작한 모델 시스템의 구동을 확인하기 위한 타겟 DNA를 준비하였으며, 열역학적 분석을 통해 형광분자표지와 타겟 DNA 간의 선택적 결합이 가능함을 확인하였음

■ 형광분자표지의 광학적 특성 분석 및 반응 최적화를 위한 타겟 DNA 검출 실험

형광분자표지의 흡광 스펙트럼



형광분자표지의 형광 스펙트럼

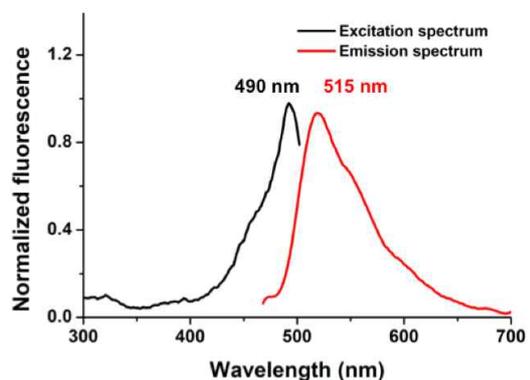


그림 95. 형광분자표지의 광학적 특성 (흡광 및 형광) 분석

- 준비한 모델 형광분자표지의 광학 특성을 관측하였으며, UV-vis 분석을 통한 흡광 스펙트럼 (absorbance spectrum) 관측을 통해 고리, 줄기를 구성하고 있는 DNA 특이적 흡광부 및 형광재료인 6-FAM의 흡광부가 관측되는 것을 확인하였음

- 또한 형광 측정기 (fluorescence spectrophotometer) 분석을 통한 형광 스펙트럼 (fluorescence spectrum) 관측을 통해 형광분자표지의 여기 (excitation) / 방사 (emission) 스펙트럼을 확인할 수 있었고, 최대 방사 파장 (maximum emission wavelength) 확인을 통해 약 510–530 nm의 파장 분석을 통해 바이러스 DNA 또는 RNA를 검출할 수 있음을 확인하였음

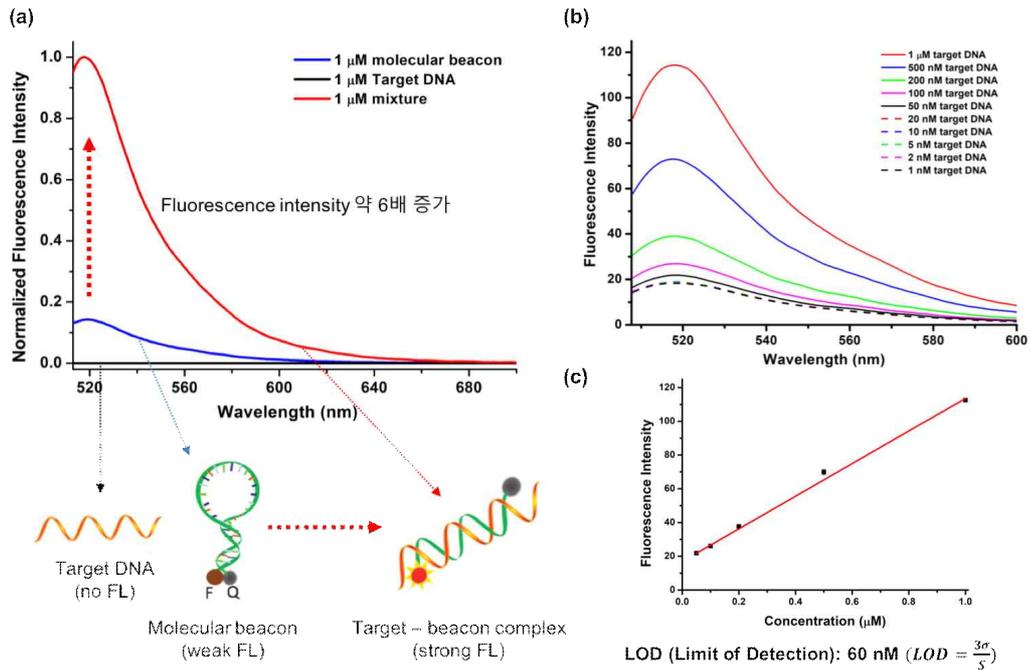


그림 96. 모델 형광분자표지의 형광 정량 분석 및 최소 검출능 확인

- 광학 특성을 확인한 모델 형광분자표지의 추가 형광 정량 분석을 통해, 형광분자표지와 결합할 수 있는 타겟 DNA의 처리 양에 따른 최대 발광 효율 변화를 관측하였음. 검출하고자 하는 시료에 타겟 DNA가 포함되어있을 경우, 대조군 대비 약 6배의 형광이 증가하는 것을 확인함으로써 (a), 형광분자표지가 타겟 DNA에 반응하여 효과적으로 작동하고 있음을 알 수 있었음
- 이에 시료에 포함된 타겟 DNA의 양을 조절하여 최대 형광값을 측정함으로써, 시료에 존재하는 바이러스 추출 DNA 또는 RNA의 양에 따라 형광 정량이 가능함을 확인하였고 (b), 이를 기반으로 실험에 사용된 형광분자표지의 농도 대비 타겟의 최소 검출능 (LOD, Limit of Detection)을 확인할 수 있었음.

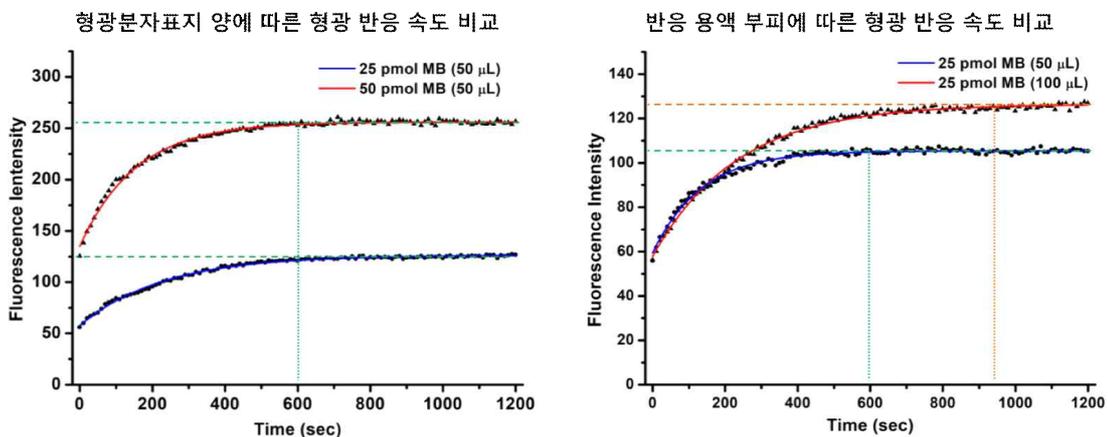


그림 97. 형광분자표지의 반응속도 확인 및 물리적 변수에 따른 차이 비교

- 검출하고자 하는 타겟 DNA를 형광분자표지 (molecular beacon, MB)에 처리한 후, 시간에

다른 형광 변화를 측정함으로써 형광분자표지의 반응 속도를 확인하였음

- 형광분자표지와 타겟 DNA가 1:1 반응을 할 수 있도록 같은 비율로 처리했을 경우, 형광분자표지의 농도는 반응속도에 영향을 주지 않는 것을 알 수 있었으며, 최대 형광 신호가 나올 때까지 약 10분의 시간이 소요되었음
- 또한, 반응 용액의 부피에 따른 반응 속도의 차이를 보이는 것을 확인함으로써, 검지 시스템에서의 처리 용액의 농도 및 부피를 고려하는 것이 중요하다는 결론을 얻을 수 있었음. 이는 2차년도에 진행할 바이러스 검지 시스템 개발 과정에서 물리적 지표로 활용할 예정임

② 작용기를 포함한 핵산 서열의 종이에의 기능화 연구

■ 종이 표면에서의 고분자 및 핵산 기능화 전략 수립

- 면역크로마토그래피, 효소결합면역흡착검사 (ELISA), 실시간 역전사 중합효소연쇄반응 (qRT-PCR) 등 기존에 사용되는 여러 장비 및 기술들의 단점을 보완하고 이를 통해 감염 여부 뿐 아니라, 각 아형을 손쉽게 빠르게 구별해내는 진단 시스템을 개발하고자 함

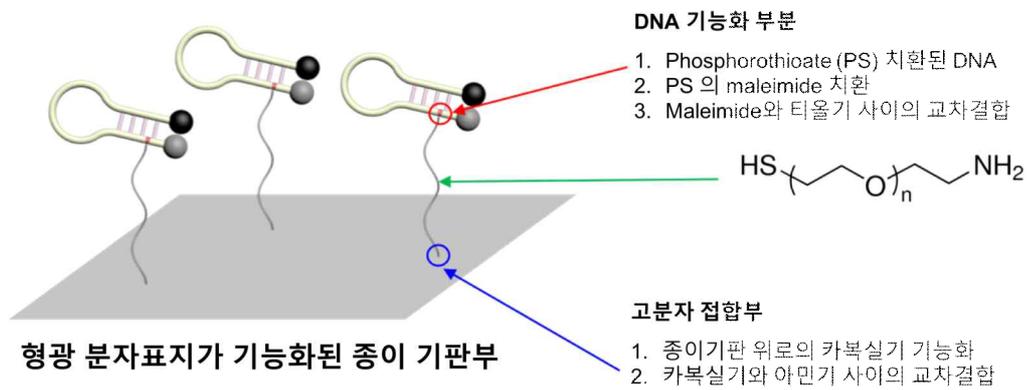


그림 98. 종이 표면에서의 고분자 및 형광분자표지 기능화 전략 수립

- 종이 기반의 센서 시스템은 종이의 셀룰로오즈 (cellulose) 성분을 여러 작용기로 기능화하여 형광분자표지를 종이 기판에 화학적으로 도입하고, 해당 형광분자표지가 바이러스 추출 DNA 또는 RNA와 반응하는 전략임. 따라서 셀룰로오즈에 다량으로 포함되어 있는 하이드록실기 (hydroxyl group, -OH)에 고분자 기능화를 위한 카르복실기 (carboxylic acid group, -COOH)를 도입하고, 추가적인 화학 처리를 통해 아마이드 본드 (amide bond)를 형성함으로써, 핵산이 기능화된 종이 키트 센서 플랫폼을 제작하고자 함

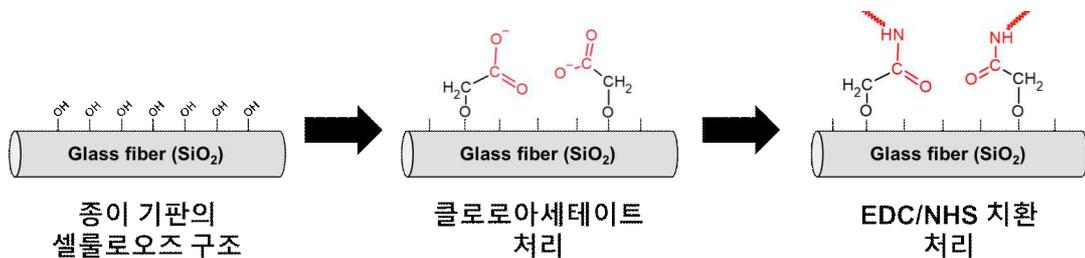


그림 99. 종이 기판 위의 화학적 처리를 통한 핵산의 기능화 연구 전체 모식도

■ 셀룰로오즈에의 카르복실기 도입 연구

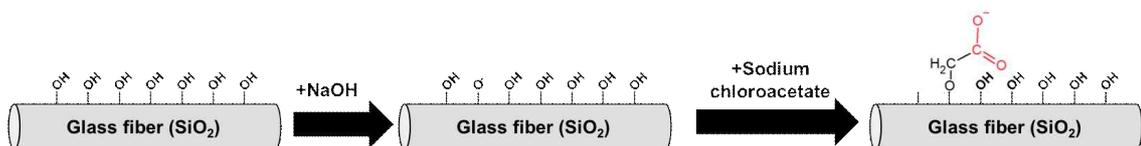


그림 100. 카르복실기 도입을 위한 종이 기판과 클로로아세테이트 반응 메커니즘

- 셀룰로오즈 표면의 카르복실기 기능화를 위하여 클로로아세테이트 (Sodium chloroacetate; CAA)를 이용하여 하이드록실기를 치환하였음. 클로로아세테이트의 클로라이드 이온이 있는 부분을 셀룰로오즈의 하이드록실기와 라디컬 중합반응 (radical polymerization)을 통해 치환함으로써 종이 기판 위에 카르복실기를 도입하였음
- 종이의 셀룰로오즈 성분에 존재하는 작용기인 하이드록실기를 카르복실 그룹으로 치환하기 위해 사용된 실험방법은 각종 논문과 특허를 참고하였으며, 다양한 농도의 클로로아세테이트 용액과 반응시킴
- 종이에 기능화된 클로로아세테이트를 확인하기 위해 푸리에 변환 적외선 분광법 (Fourier-transform infrared spectroscopy, FT-IR)을 이용하여 하이드록실기가 성공적으로 카르복실기로 치환되었는지 확인하였음

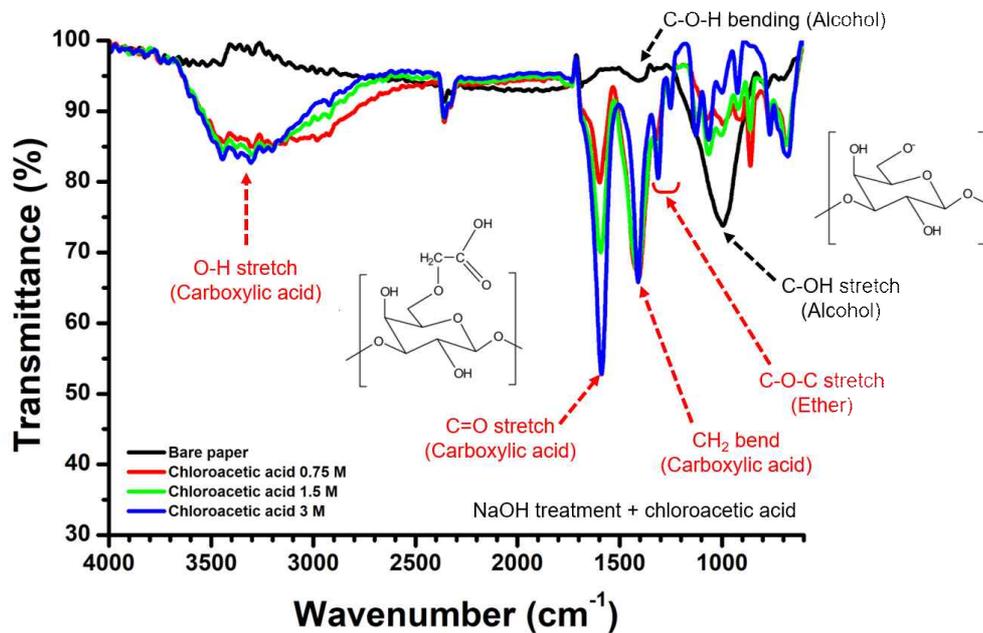


그림 101. 종이 기판위의 클로로아세테이트 농도별 처리 후 FT-IR 분석

- 푸리에 변환 적외선 분광법 분석을 진행한 결과, 기존의 종이 샘플 (검은색, bare paper)에서 관찰할 수 없었던 새로운 peak이 관찰되었음. 대표적으로  $1594\text{ cm}^{-1}$ 과  $1407\text{ cm}^{-1}$ 에서 새로운 peak이 확인되었는데, 이는 각각 카르복실기의 C=O 신축과 카르복실기의 CH<sub>2</sub> 굽힘을 나타내는 peak으로 예상됨. 또한, 카르복실기가 도입됨에 따라  $1247\text{ cm}^{-1}$ 에서 C-O-C 신축 peak이 형성되는 것을 확인함으로써, 클로로아세테이트에 의해 종이 표면의 하이드록실기가 효과적으로 카르복실기로 치환되었다는 결론을 얻을 수 있었음

■ 카르복실기로 치환된 종이의 아마이드 본드 형성을 통한 고분자 기능화 연구

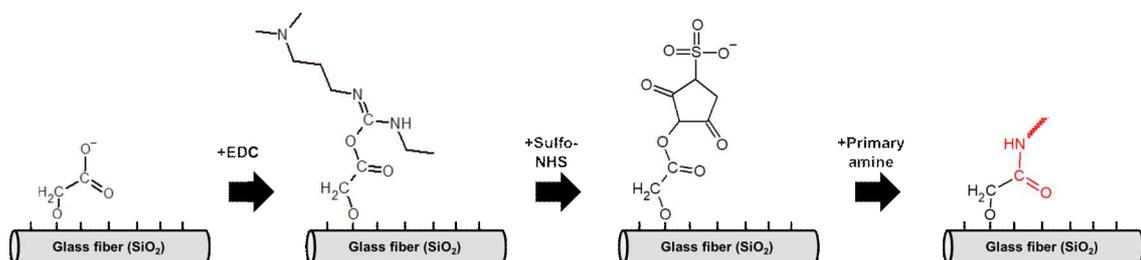


그림 102. 카르복실기가 치환된 종이의 추가 기능화 메커니즘

- 고분자 및 형광분자표지의 기능화를 위해 카르복실기가 도입된 종이 표면의 추가 기능화를 수행하였음. 카르복실기에 선택적으로 결합할 수 있는 화학 물질 (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC),

N-hydroxysuccinimide (NHS) or sulfo-NHS)을 처리함으로써 아민기 (amine group,  $-NH_2$ )와 공유결합을 형성할 수 있음. 이에 아민기를 포함하는 고분자 ( $NH_2$ -PEG-SH)를 처리함으로써 종이 표면에 형광분자표지를 기능화할 수 있는 고분자 부분을 추가 기능화하는 것이 가능함

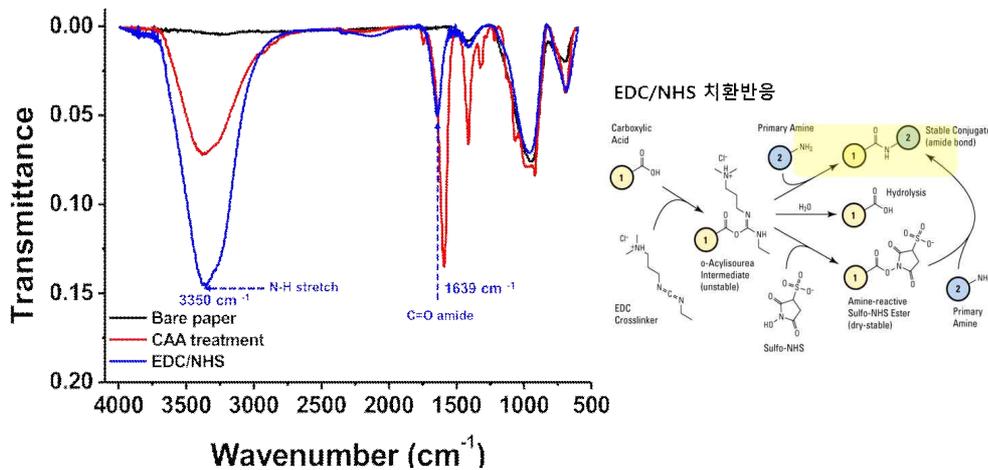


그림 103. 카르복실기가 기능화된 종이에의 EDC/NHS 처리 및 고분자 기능화 후의 FT-IR 분석 결과 및 결합 메커니즘

- 고분자 기능화를 마친 후의 종이 기판을 FT-IR로 분석한 결과,  $3350\text{ cm}^{-1}$ 과  $1639\text{ cm}^{-1}$  위치에서 새로운 peak이 형성되는 것을 확인하였음.  $3350\text{ cm}^{-1}$ 은 NH 신축에 대한 peak이며  $1639\text{ cm}^{-1}$ 은 C=O 아마이드 peak을 나타내며, 이를 통해 카르복실기로 치환된 종이 표면에 아민기를 포함한 고분자가 아마이드 본드를 형성하며 공유결합하였음을 유추할 수 있었음
- 이와 같이 종이 표면에 1) 클로로아세테이트를 이용한 카르복실기 도입, 2) EDC/NHS 처리를 통한 고분자의 기능화가 성공적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었고, 고분자 말단에 노출된 티올기 (thiol,  $-SH$ )에의 형광분자표지 기능화가 이루어질 수 있음을 확인하였음

■ 형광분자표지에의 화학적 기능화를 통한 작용기 도입 연구

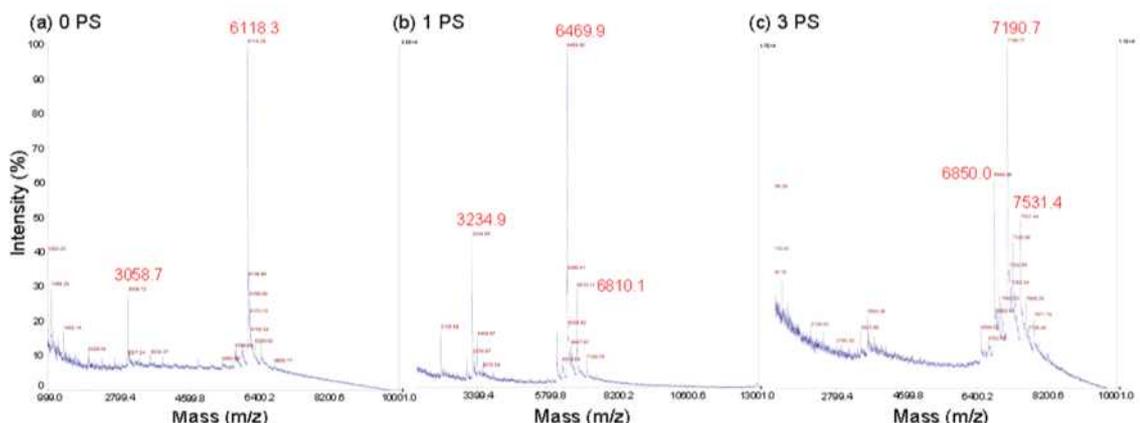


그림 104. 형광분자표지의 특정 작용기에 화학적 기능화를 통한 추가 기능화 연구

- 디자인된 형광분자표지에 존재하는 특정 작용기 (phosphorothiate)에 고분자와 결합할 수 있는 추가 작용기 (biotin 또는 maleimide)를 도입하는 연구를 수행하였으며, 화학적 처리를 통해 형광분자표지 내에 biotin이 포함된 작용기를 결합시켰음
- 화학적 기능화된 형광분자표지를 고분해능 거대질량 분석기 (MALDI-TOF)로 분자량 변화를 관찰하였음. 이를 통해 형광분자표지의 전체 분자량이 증가하는 것을 확인하였고, 이는 작용기가 화학적으로 결합하였음을 의미함. 또한 형광분자표지에 화학적으로 기능화된 작용

기는 앞서 종이에의 기능화를 진행한 고분자의 말단에 존재하는 특정 작용기에 선택적으로 결합할 수 있으므로 (biotin – streptavidin 또는 maleimide – thiol), 종이 기판에의 형광분자 표지의 기능화가 잘 수행될 수 있음

③ 상용 전처리 추출기술을 활용한 화학적 전처리 방법 연구

■ 상용 전처리 추출기술을 활용한 화학적 전처리 방법 연구

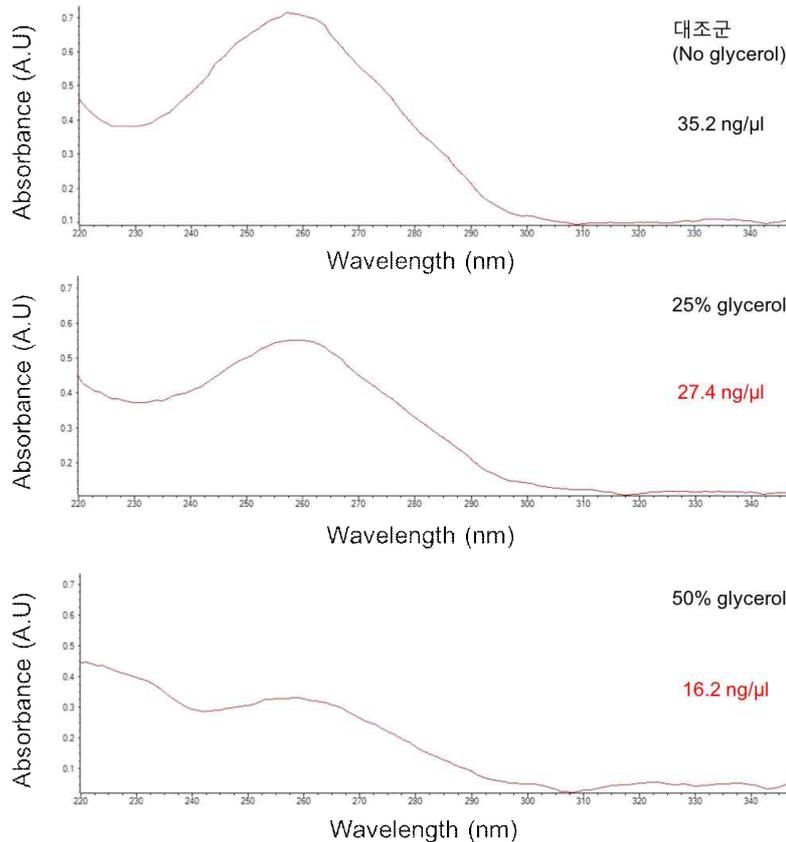


그림 105. 다양한 점도를 가지는 검체에 포함된 바이러스의 화학적 전처리를 통한 RNA 추출 확인

- 성균관대학교 기계공학과 연구팀에서 진행하는 물리적 전처리 방법 연구와 더불어, 숙명여자대학교 화공생명공학과 연구팀과 함께 바이러스로부터 RNA를 추출할 수 있는 화학적 전처리 방법을 연구하였음
- 바이러스 검체를 모사한 샘플에서 RNA의 추출 효율을 확인하기 위해, 글리세롤 (glycerol)을 포함하여 점도를 띄는 검체에 바이러스를 추가한 후, ZYMO RESEARCH 사의 Quick-RNA viral kit를 활용하여 바이러스 및 바이러스 RNA를 추출하였음
- 25%의 글리세롤이 포함된 검체 및 50%의 글리세롤이 포함된 검체에 바이러스를 포함시킨 후 화학적 전처리 과정을 수행한 결과, 점도를 가지지 않는 대조군 샘플과 같이 바이러스 RNA가 추출되는 것을 확인하였음
- 화학적 전처리를 통해 바이러스가 포함된 검체에서의 바이러스 RNA 추출이 가능함을 확인하였고, 점도가 높은 검체에서도 바이러스 RNA를 추출할 수 있음을 확인하였음

■ 물리적 전처리 샘플의 추가 화학적 전처리를 통한 전처리 효율 증가

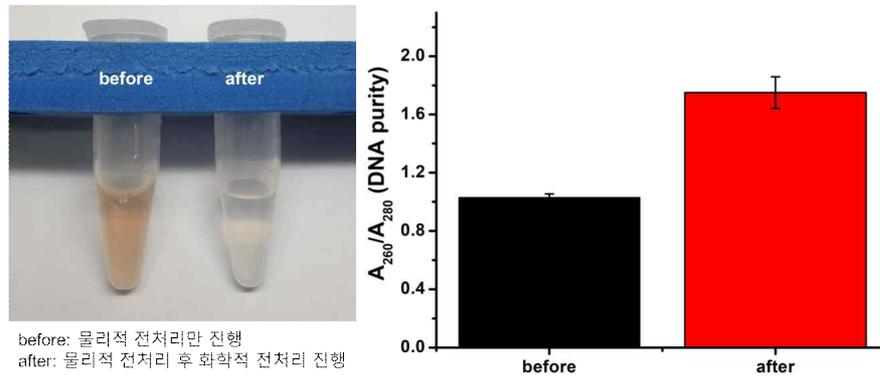


그림 106. 물리적 전처리를 진행한 시료의 추가 화학적 전처리를 통한 DNA 순도 개선 실험

- Bag mixer로 물리적 전처리를 진행한 조직시료의 추가 화학적 전처리를 통하여 DNA 또는 RNA의 추출 효율을 높이는 실험을 진행하였음. Bag mixer와 주사기 필터를 통해 물리적 전처리를 진행한 조직 시료의 경우, 전처리 후에 조직 시료에 포함되어 있는 혈장 (blood plasma) 등에 의해 결과물의 DNA 순도가 매우 낮은 상황임
- 이에 물리적 전처리를 진행한 시료에 추가적인 화학적 전처리 과정을 통해 검출 시료의 DNA 순도를 높이는 추가 공정을 수행하였으며, UV-vis를 통한 DNA의 순도 평가를 통해 전처리 시료에서 혈장이 제거되는 것을 확인하였음. 이를 통해, 물리적 전처리만으로 제거하기 어려웠던 혈장 등의 불순물을 화학적 전처리를 도입함으로써 제거할 수 있음을 확인하였음

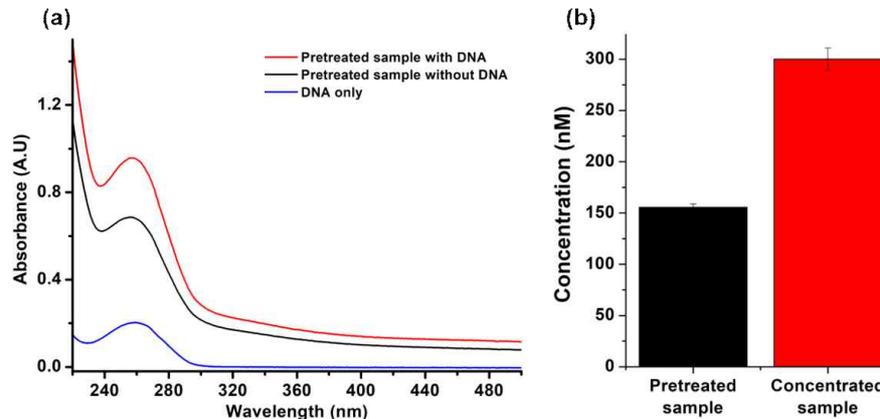


그림 107. 물리적 전처리를 진행한 시료의 추가 화학적 전처리를 통한 샘플 농도 농축 실험. (a) UV-vis를 통한 물리적 전처리 시료를 진행한 샘플 내에 존재하는 DNA의 양 측정, (b) 추가 화학적 전처리를 통해 물리적 전처리를 진행한 샘플 내의 DNA 농도 농축 실험

- 또한, 물리적 전처리를 마친 시료의 화학적 전처리를 통해 추출 DNA의 농도를 농축시킬 수 있음을 확인하였으며, 이를 통해 물리적 전처리 및 화학적 전처리를 통해 농축된 DNA를 차년도의 검출 시료로써 사용할 수 있음을 확인하였음
- 물리적 전처리와 더불어 진행한 화학적 전처리를 통해 1) 물리적 전처리만으로 제거하기 어려운 시료 내 불순물을 화학적 전처리를 통해 제거할 수 있으며, 2) 화학적 전처리를 통해 시료 내에 존재하는 DNA 및 RNA의 농도를 농축시킴으로써, 차년도에 진행할 추가 실험에서 해당 전처리 기법을 응용할 수 있을 것으로 예상됨

④ 바이러스 추출 핵산의 특정 염기서열과 결합할 수 있는 핵산을 이용한 형광 분자 표지 (fluorescence molecular beacon) 개발

■ 모델 바이러스 핵산 염기 서열과 잘 결합할 수 있는 형광 분자 표지 설계 및 제작

- 숙명여대에서 제공받은 Human immunodeficiency virus(HIV)의 viral RNA에 상보적인

sequence 중 U3 region을 참고하여 loop 부분과 stem 부분 염기서열을 먼저 설정하고, 이를 열역학적 분석을 통해 안정적인 이차구조를 갖는지 확인 후 일부 염기서열의 수정을 통해 target 핵산에 특이적으로 결합하고, 소광이 안정적으로 작동할 수 있는 형광 분자 표지를 제작함. 그 구조와 염기서열은 그림 108과 같음.

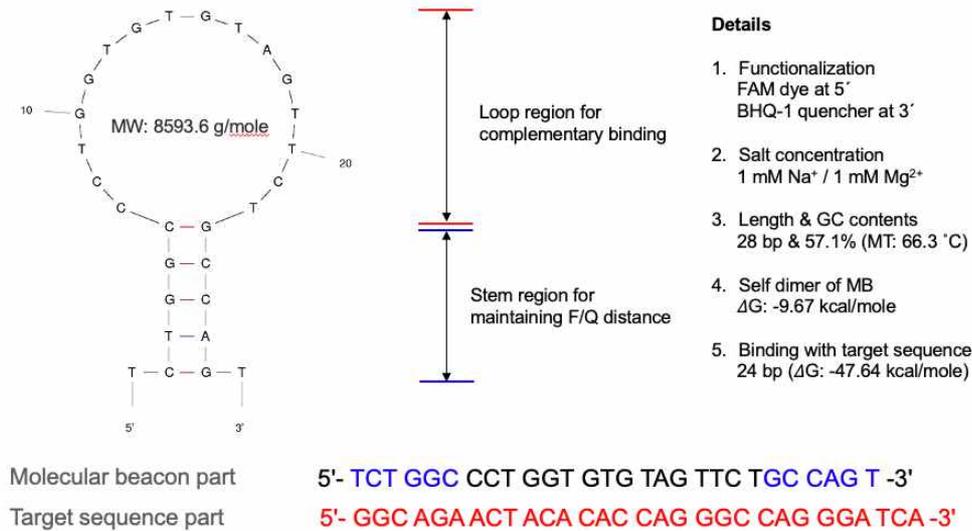


그림 108. 모델 바이러스를 이용해 제작한 형광 분자 표지의 염기서열과 구조

- 형광 분자 표지의 5' 말단에는 FAM dye를, 3' 말단에는 BHQ-1 quencher를 기능화 하였음. 또한, 염기 서열 중간 부분에 phosphothioate를 기능화하였는데, 이는 종이에의 기능화를 위해 1차년도에 수행했던 기능화 전략을 위한 internal modification임.

■ 용액 상에서의 형광 분자 표지의 target DNA에 대한 발광 거동 및 반응 특이성 확인

- 형광 분자 표지의 발광 거동을 평가하기 위하여 형광 테스트를 진행함. 모든 형광 테스트는 Thermofisher 사의 Varioskan Lux multimode microplate reader를 이용하였으며, 샘플은 96-well plate에 각 well 당 200  $\mu$ l volume으로 준비함. 형광 테스트에 사용된 형광 분자 표지와 target DNA의 농도는 각각 0.1  $\mu$ M로 동일함. 그림 109는 기능화되지 않은 제작 상태 그대로의 형광 분자 표지(pristine molecular beacon, p-MB)와, 기능화된 형광 분자 표지(functionalized molecular beacon, f-MB)를 각각 형광 테스트한 결과임.

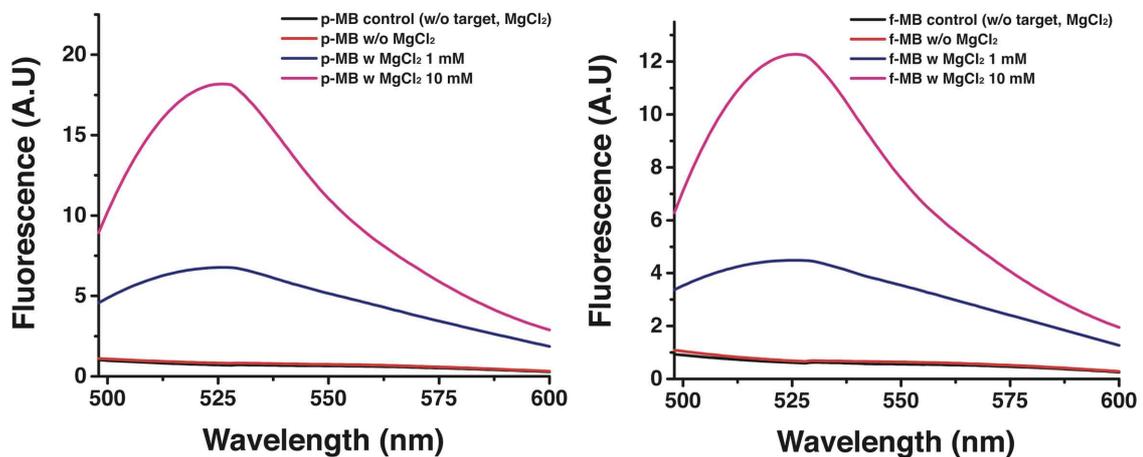


그림 109. 기능화 전 후 형광 분자 표지의 형광 테스트 결과

- 형광 테스트 결과를 보면, MgCl<sub>2</sub>가 들어가지 않은 형광 분자 표지의 경우 target DNA가 들어가더라도 control과 형광 세기 차이가 나타나지 않는 것으로 나타나 반응이 거의 일어나지

않는 것으로 보이며, 이는 molecular beacon이 안정적으로 이차구조를 유지하고 있어 salt concentration 없이는 쉽게 반응이 일어날 수 없는 것으로 해석됨.

- 이에 반해  $MgCl_2$ 를 사용한 조건에서는 형광 세기가 증폭된 것을 확인할 수 있는데, 이는  $Mg^{2+}$  이온의 charge screening 효과에 의해 molecular beacon과 target DNA가 거리를 유지하고 있는 원동력인 surface charge가 약화되어 debye length가 감소하고, 이로 인해 반응성이 향상되기 때문인 것으로 생각됨.
- 형광 분자 표지의 target DNA에 대한 반응 특이성을 확인하기 위해 target DNA와 같은 길이인 30 bp의 random control DNA를 제작하였음. Random control DNA의 염기 서열은 5'-GCT TTC CTT ACG TGA CGT CGA TCG GAG TCT-3'이며, 그림 110과 같이 열역학적 분석을 통해 제작했던 형광 분자 표지와 상호 인력이 없는 것을 미리 확인하였음.

Primary Sequence: 5'-GCTTTCCTTACGTGACGTCGATCGGAGTCT-3' → Random control DNA  
 Secondary Sequence: 5'-TCTGGCCCTGGTGTGTAGTTCTGCCAGT-3' → 제작한 형광 분자 표지

Maximum Delta G: -58.07 kcal/mole

---

Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5'           GCTTTCCTTACGTGACGTCGATCGGAGTCT
              ||
3' TGACCGTCTTGATGTGTGGTCCCGGTCT
  
```

그림 110. 열역학적 분석을 통한 형광 분자 표지와 random control DNA와의 상호 인력 확인

- 이렇게 제작한 random control DNA와 target DNA가 형광 분자 표지와 반응하였을 때의 형광 세기를 그림 111과 같이 비교하여 형광 분자 표지가 target DNA에 특이적으로 반응함을 보임. 반응 조건은 형광 분자 표지와 target DNA가 각각 0.1  $\mu M$ ,  $MgCl_2$  농도는 10 mM임.

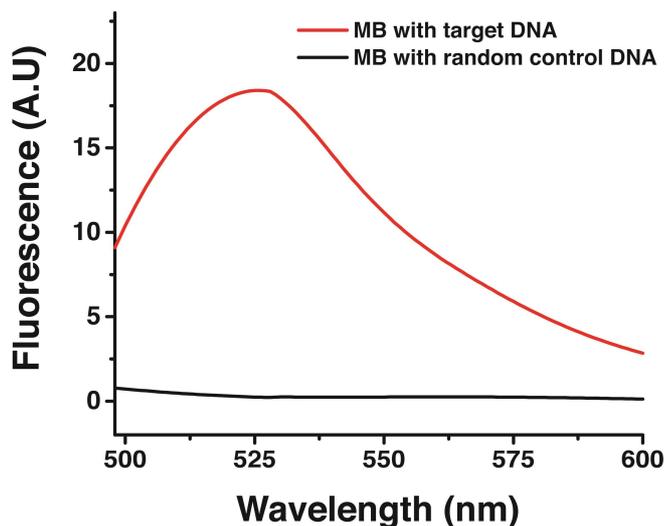


그림 111. Random control DNA를 이용한 형광 분자 표지의 반응 특이성 확인

- 형광 분자 표지에 random control DNA가 처리되었을 때는 형광 신호가 전혀 나타나지 않고, target DNA가 처리된 경우에는 뚜렷한 형광이 나타남을 알 수 있음. 이를 통해 제작한 형광 분자 표지가 target DNA에 특이적으로 반응함을 보임.

- 형광 분자 표지와 같이 target DNA를 형광 기반으로 검지 가능한 CNT@DNA 복합체 제작
- 형광 분자 표지는 높은 형광 세기와 target DNA에 대한 특이성을 보이지만, 고가의 제작비



어남에 따라 quenching effect가 사라져 형광이 발현되게 됨.

■ CNT@DNA의 target DNA에 대한 반응성 및 형광 효율 증강을 위한 short complementary sequence(SCS) 도입 - CNT@DNA-SCS 제작

- CNT@DNA를 이용해 간단한 형광 테스트를 진행하였으며, 그 결과는 그림 114와 같음. 형광 테스트 조건은 96-well plate를 이용하여 1 well에 200  $\mu$ l volume을 사용하였으며, CNT@DNA는 0.1 mg/ml 농도를 사용함. CNT@DNA의 농도는 UV-vis의 peak 측정을 통해 만든 standard curve를 통해 정량하여 사용함.

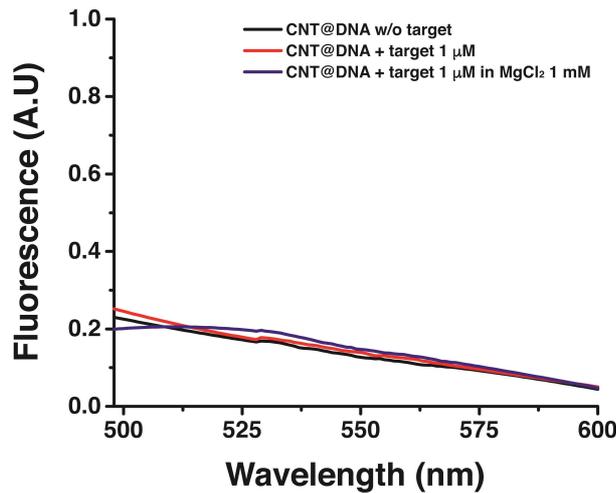


그림 114. CNT@DNA를 사용한 형광 테스트 결과

- 형광 테스트 결과를 보면, target DNA를 처리해주었을 때와 그렇지 않을 때, 그리고 MgCl<sub>2</sub>를 처리해주었을 때 모두 형광 세기의 큰 차이가 나타나지 않았음. 이는 낮은 target DNA의 농도 영향도 있을 수 있으나, 근본적으로 CNT와 binding DNA 간의 결합이 너무 견고하게 유지되어 target DNA에 의한 상보적 결합을 저해시키는 것으로 판단함.
- 따라서 CNT와 binding DNA 간의 결합을 조금 약화시킬 방법으로 short complementary sequence(SCS)를 도입하였고, 그림 115는 그 모식도임.

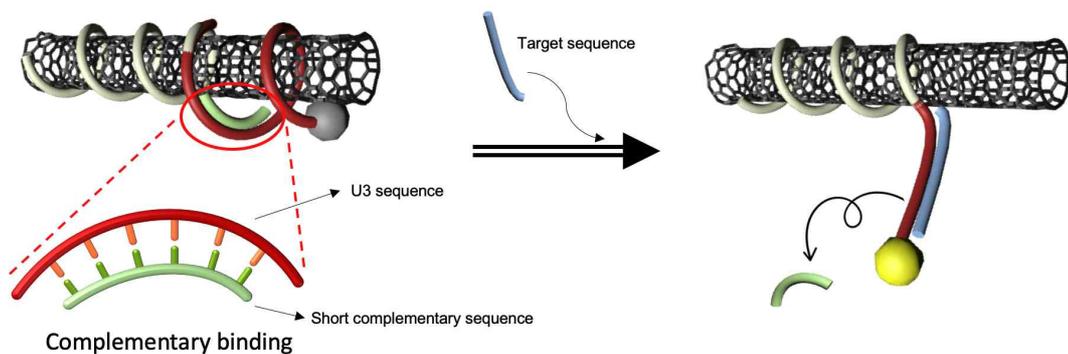


그림 115. Short complementary sequence를 도입한 CNT@DNA(CNT@DNA-SCS)의 제작 모식도

- SCS를 도입하여 CNT@DNA-SCS를 제작하는 공정의 경우, CNT에 결합시킬 binding DNA의 molecular beacon sequence 부분 염기서열 일부와 상보적인 염기서열을 갖는 짧은 oligonucleotide인 SCS를 용액 상에서 binding DNA에 먼저 결합시키고, 그 상태의 binding DNA를 CNT와 섞어 반응시키게 되면 일부 염기서열 부분이 CNT에 안정적으로 결합하지 못한 상태로 CNT@DNA 복합체가 형성되게 됨. 따라서 기존 CNT@DNA 복합체에 비해 molecular beacon sequence 부분의 결합이 약화되며, 반응성이 증대되는 효과를 가져올

것으로 기대함.

- 제작한 CNT@DNA 복합체의 정제 및 수용액 상에서의 안정성 확보를 위한 공정 최적화
  - CNT@DNA 복합체의 제작 공정은 CNT 용액과 DNA 용액을 섞은 후 tip sonication을 통해 결합을 유도하는 방식으로, 반응 이후 용액에 CNT@DNA 복합체, 반응하지 않은 DNA 잔여물, 반응하지 않은 CNT 잔여물이 남아있게 되므로 CNT@DNA 복합체만을 정제하여 사용하기 위해 정제과정을 거치게 됨. 이 중 반응하지 않은 CNT 잔여물의 경우 hydrophobic interaction에 의해 물에 분산되지 못하고 덩어리 형태로 존재하여 정제가 쉬운 반면, 반응하지 않은 DNA 잔여물은 일반적인 방법으로는 정제가 어려움.
  - 잔여 DNA를 제거하기 위하여 기존에는 높은 salt concentration을 이용한 charge screening을 통해 원심분리하는 방식으로 CNT@DNA만을 수득하였으나, 수득을 문제와 정제 이후 잔여 salt concentration을 무시할 수 없는 점 등 단점이 많아 정제 방식을 변경함.
  - 변경한 정제 방식은 Merck Millipore사의 Amicon Ultra tube를 이용하였으며, 이는 cellulose membrane를 이용하여 molecular weight cut-off 방식으로 가벼운 잔여 DNA는 필터를 통과해 걸러지고, 상대적으로 무거운 CNT@DNA는 필터에 걸려 재분산을 통해 정제하는 방식임. 이 방식을 통해 90퍼센트 이상의 수득율로 잔여 DNA로부터 자유로운 CNT@DNA 복합체 용액을 얻는 데에 성공함.
  - 또한, SCS를 사용하는 CNT@DNA 제작 과정에서 binding DNA와 SCS의 안정적인 결합을 담보하기 위해 일정 수준 이상의 salt concentration을 사용하고, 이 binding DNA 용액이 CNT@DNA의 제작 공정에 사용되므로 salt concentration이 CNT@DNA의 제작에 영향을 미칠 것으로 예상. 따라서 salt concentration을 변화시켜가며 CNT@DNA 복합체의 안정성을 평가하였으며, 그 결과는 그림 116과 같음. 결과를 통해 CNT@DNA 제작 공정 시 NaCl concentration을 final 기준 50 mM로 최적화하였음.

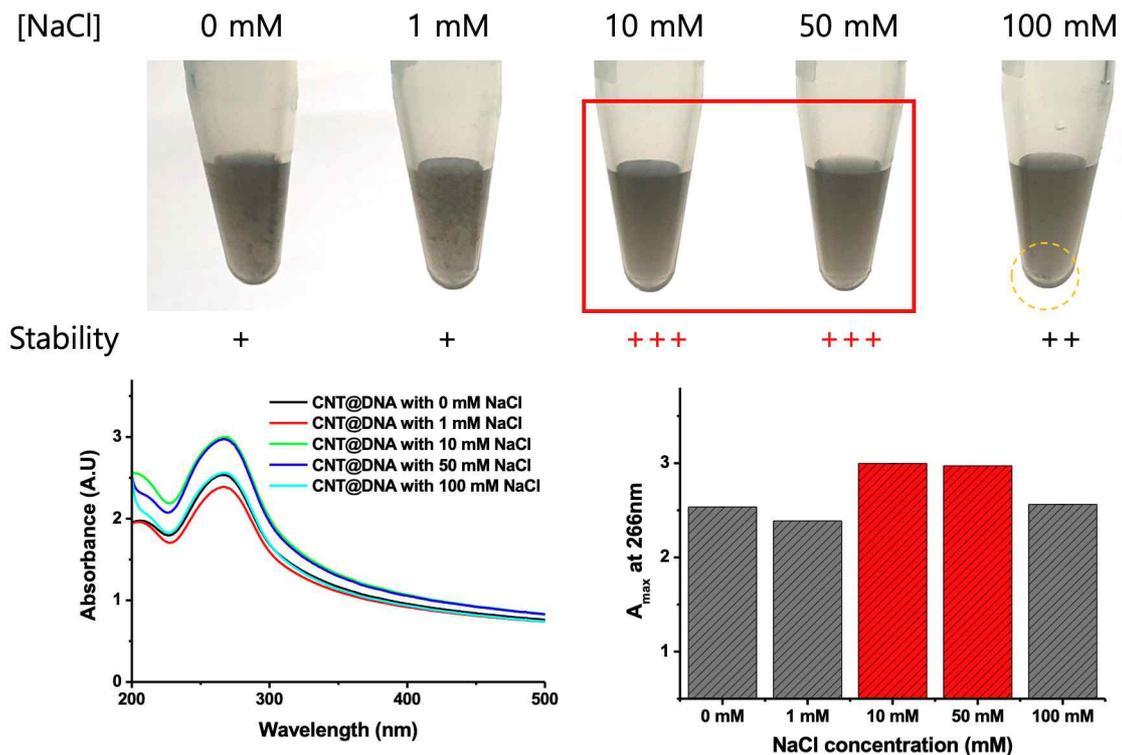


그림 116. NaCl concentration에 따른 CNT@DNA 복합체의 안정성 평가

- 제작한 CNT@DNA-SCS 복합체의 target DNA에 대한 발광 거동 및 특이성 확인
  - CNT@DNA-SCS 복합체의 target DNA에 대한 발광 거동을 확인하기 위하여 salt concentration, target DNA concentration을 변화시켜가며 발광 거동을 확인함. 그 결과는 그림 117과 같음.

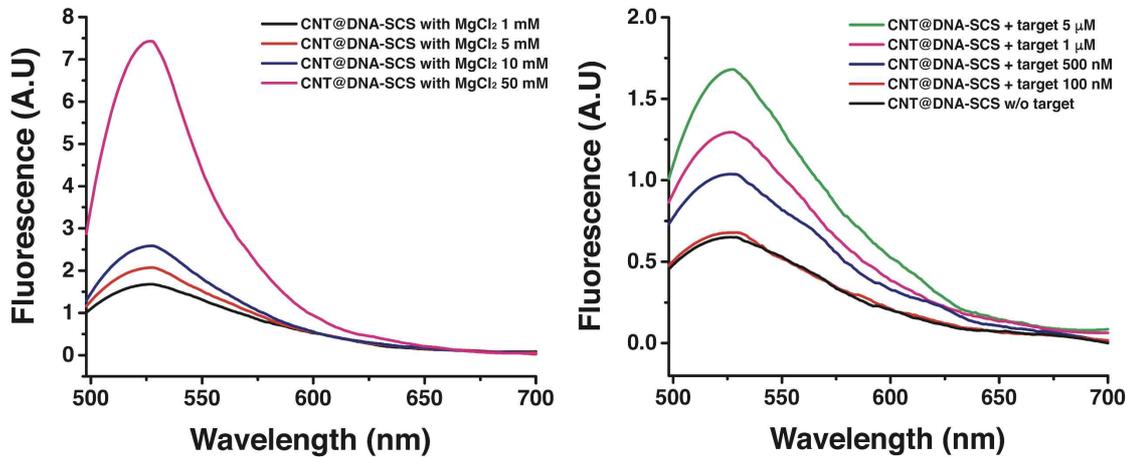


그림 117. MgCl<sub>2</sub> concentration 변화(왼쪽)와 target DNA concentration 변화(오른쪽)에 따른 CNT@DNA-SCS의 발광 거동 확인

- 그림 117의 왼쪽의 MgCl<sub>2</sub> concentration 변화에 따른 발광 거동 데이터(target DNA concentration은 5 μM로 고정)를 보면, MgCl<sub>2</sub> 농도가 증가함에 따라 형광 세기가 크게 증가함을 알 수 있음. 이는 형광 분자 표지를 사용했을 때와 같은 메커니즘에 의한 것으로 생각됨. 그러나 실제 CNT@DNA-SCS 용액의 상태를 육안으로 관찰하게 되면 MgCl<sub>2</sub> 농도가 5 mM 이상만 되더라도 CNT@DNA-SCS의 안정성이 확연하게 떨어지며, aggregation이 일어나는 것을 확인하였음. 이는 CNT@DNA의 분산 원동력인 electrostatic repulsion 효과가 salt의 charge screening 효과에 의해 약해져 분산성이 저해되어 일어나는 현상으로 볼 수 있음. 따라서 안정성이 담보되지 않은 형광의 증대는 신뢰할 수 없는 것으로 생각하여 용액 상에서 CNT@DNA를 이용한 형광 테스트를 할 때 1 mM 수준의 MgCl<sub>2</sub>를 최대 농도치로 설정함. 오른쪽의 target DNA concentration 변화 데이터(MgCl<sub>2</sub> 농도는 1 μM로 고정)를 통해 100 nM 수준에서는 용액 상에서 형광을 구분해 내기 어려움을 알 수 있음.
- 2가 양이온인 Mg<sup>2+</sup>와 비교했을 때, 상대적으로 1가 양이온인 Na<sup>+</sup>는 높은 농도를 사용하더라도 분산성이 크게 저해되지 않으므로 MgCl<sub>2</sub> 농도를 1 mM로, target DNA concentration은 1 μM로 고정하고 추가적으로 NaCl 농도를 변화시켜가며 발광 거동을 확인함. 이 형광 테스트 결과는 그림 118과 같음.

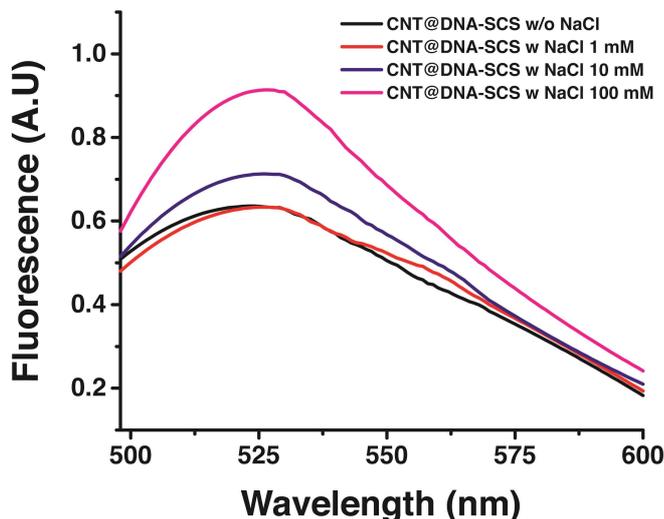


그림 118. 추가적인 NaCl concentration 변화에 따른 CNT@DNA-SCS의 발광 거동 확인

- 결과를 통해 같은 맥락으로 NaCl concentration이 증가함에 따라 형광 세기가 올라감을 알 수 있고, 그림 119와 같이 분산성도 크게 저해되지 않았음을 확인할 수 있음.



그림 119. 추가적인 NaCl concentration 변화에 따른 CNT@DNA-SCS의 분산성 저해 여부 확인

- CNT@DNA의 target DNA에 대한 반응 특이성을 확인하기 위하여 Random control DNA를 이용하여 형광 테스트를 진행하고, target DNA와 형광 테스트 결과를 비교함. 먼저 random control DNA와 CNT@DNA 복합체의 상호 인력을 그림 120의 열역학적 분석을 통해 확인하였고, 반응이 일어날만한 수준의 인력이 존재하지 않는 것으로 판단함. 이후 형광 테스트를 진행하였고, 그 결과는 그림 121과 같음. 반응 조건은 CNT@DNA 0.1 mg/ml, target DNA or random control DNA 1  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaCl 100 mM임. 결과를 통해 CNT@DNA는 target DNA에 특이적으로 반응하여 형광을 나타냄을 알 수 있음.



그림 120. 열역학적 분석을 통한 random control DNA와 CNT@DNA 복합체의 상호 인력 확인

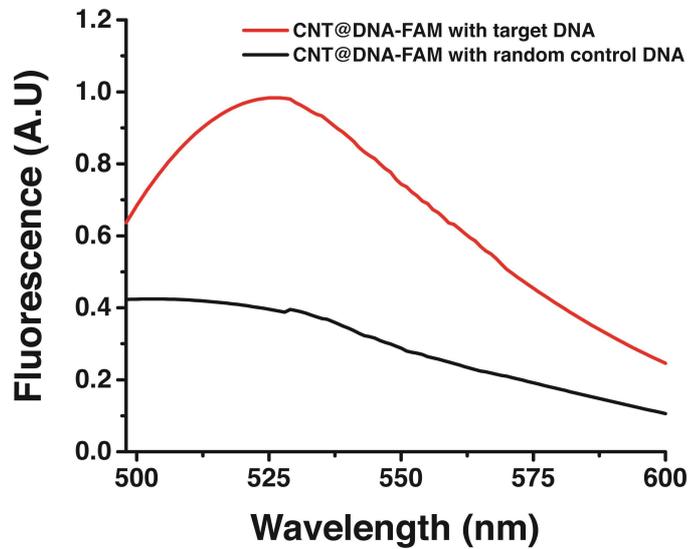


그림 121. Random control DNA를 이용한 CNT@DNA의 반응 특이성 확인

- 제 1 세부, 제 2 세부, 제 1 협동 연구기관의 공동 연구를 통하여 CNT@DNA를 기반의 핵산 형광 검지 기술 관련 특허를 출원하였으며 이를 통해 해당 기술에 대한 지적 재산을 확보함.

관인생략

## 출원번호통지서

출원일자	2020.06.12
특기사항	심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(R20200306KR1)
출원번호	10-2020-0071487 (접수번호 1-1-2020-0605991-62)
출원인명칭	성균관대학교산학협력단(2-2005-001360-4) 외 1명
대리인성명	남건필(9-2007-000723-1)
발명자성명	이정현 임광일 이진기 장준혁 김경일 김시현
발명의명칭	상보적 염기서열을 갖는 절편을 도입한 핵산-탄소 나노 튜브 구조체, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 형광 기반 핵산 검출 센서

### 특 허 청 장

그림 122. 제 1 세부와 제 2 세부 그리고 제 1 협동 연구기관의 공동 연구로 출원한 특허의 출원번호 통지서

- ⑤ 구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스 혈청형 또는 아형 구별을 위한 형광 기반의 다중 검지 시스템 개발
- 기존 분자 표지와 상호 인력 및 간섭이 없는 분자 표지 설계
  - 다중 검지 시스템 구축의 기반을 구축하기 위해 새로운 형광 분자 표지를 하나 더 제작하고, 두 개의 분자 표지가 각각 혹은 혼합되어 존재할 때에도 정상적인 형광 거동을 보이는지 분석함. 기존 분자 표지를 설계할 때 사용하였던 방식과 동일하게 열역학적 분석과 구조 최적화 과정을 거쳐 모델 바이러스 중 하나인 Murine leukemia virus (MLV)의 U5 region에 대응

하는 형광 분자 표지를 제작함. 제작한 형광 분자 표지는 형광체로 5'말단에 Cy5를, 소광체로 3'말단에 EBQ를 사용하였으며, 염기서열 및 구조는 그림 123과 같음.

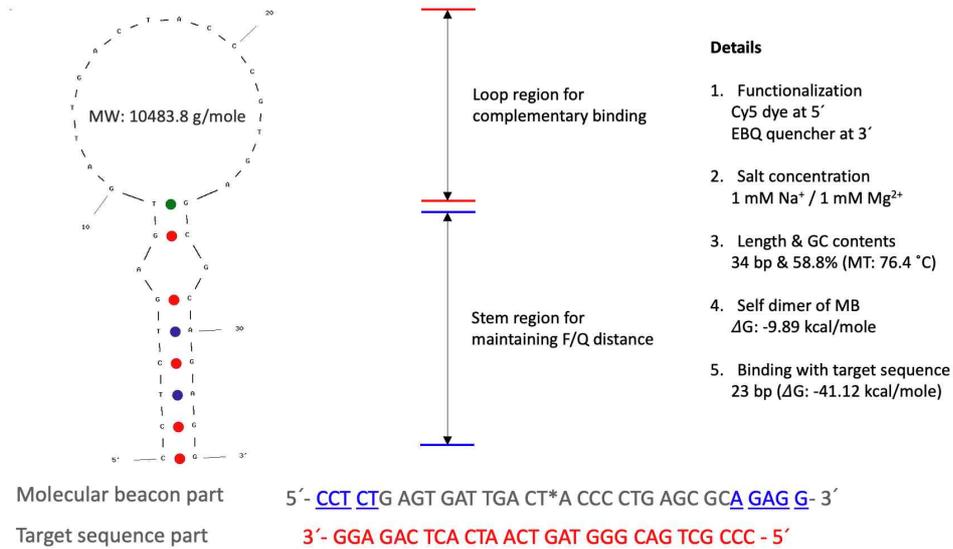


그림 123. 다중 검지를 위해 제작한 형광 분자 표지의 염기서열 및 구조

- 새롭게 제작한 형광 분자 표지의 형광 거동 및 반응 특이성을 확인하고, 이를 그림 124에 나타내었음. 사용 조건은 위에서 최적화 과정을 통해 확립한 조건과 동일함(형광 분자 표지, target DNA 농도는 동일하게 0.1  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 10 mM). 결과를 통해 제작한 형광 분자 표지 역시 MLV U5 region target DNA에 특이적으로 반응하며, 대조군과 비교했을 때 상대적으로 매우 강한 형광을 나타냄을 확인함.

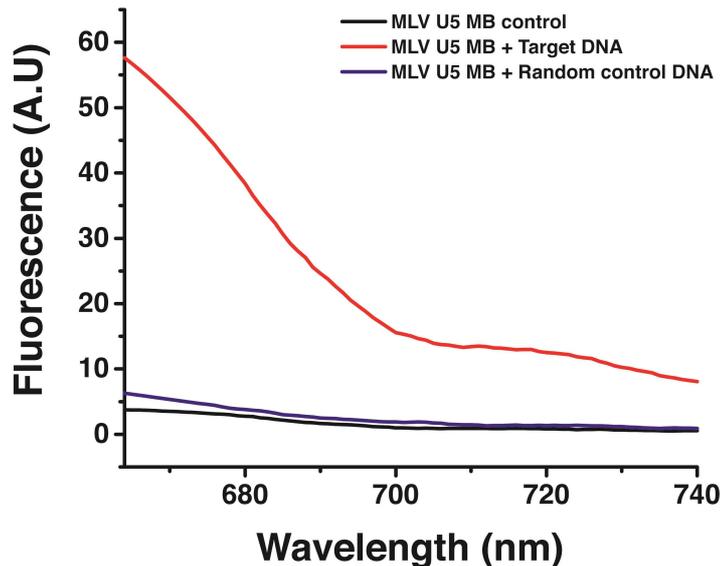


그림 124. MLV U5 region 형광 분자 표지의 형광 거동 및 반응 특이성 확인

- 또한, 기존의 형광 분자 표지와 새롭게 제작한 형광 분자 표지를 혼합한 용액인 형광 분자 표지 혼합액(Molecular beacon cocktail, MB cocktail)을 만들고, 각각의 target DNA인 HIV U3 target DNA (FAM)와 MLV U5 target DNA (Cy5)에 대한 형광 테스트를 진행함. 그 결과는 그림 125와 같음.

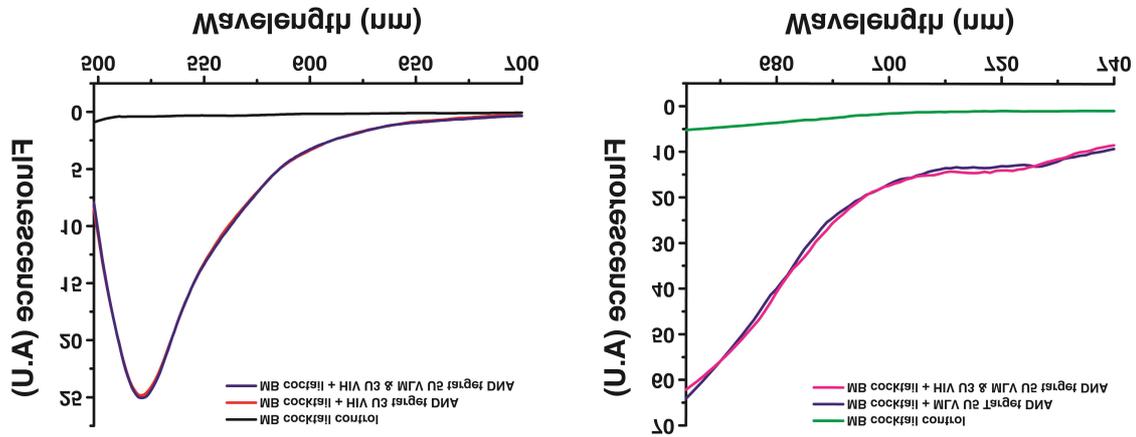


그림 125. MB cocktail을 사용한 HIV U3(왼쪽), MLV U5 target DNA(오른쪽) 형광 테스트

- MB cocktail을 사용한 경우에도 대조군과 비교했을 때 훨씬 높은 형광을 나타냄을 확인하였으며, HIV U3 target DNA와 MLV U5 target DNA를 같이 처리해주었을 때도 각각의 FAM, Cy5 각각의 형광체에 대해 정상적인 형광 거동을 나타냄을 확인하였음. 또한, 각각의 형광 분자 표지에 서로 다른 분자 표지의 표적 핵산을 처리해주었을 때도 random control DNA를 처리해주었을 때와 같이 명확한 형광 반응이 없음을 확인함. 이는 형광 분자 표지의 설계 단계에 열역학적 분석을 통해 확인한 상호 인력의 경향성과 일치함.

⑥ 바이러스 검출기기의 형광 신호 최적화 및 형광 신호와 바이러스 감염 여부간의 상호관계 해석

■ 용액 상에서의 형광 신호와 바이러스 농도의 관계 분석 및 정량화

- 검출기에 적용할 종이 기판위에서의 형광 신호 측정에 앞서, 먼저 형광 분자 표지의 타겟 핵산에 대한 반응성 및 검출한계를 점검하기 위하여 Varioskan Lux multimode microplate reader를 이용해 용액 상에서 형광 신호를 테스트 함. 사용된 형광 분자 표지의 농도는 0.1  $\mu\text{M}$ 이며, 타겟 바이러스 핵산은 농도를 변화시켜 가며 측정함. 그 결과는 아래 그림126과 같음.

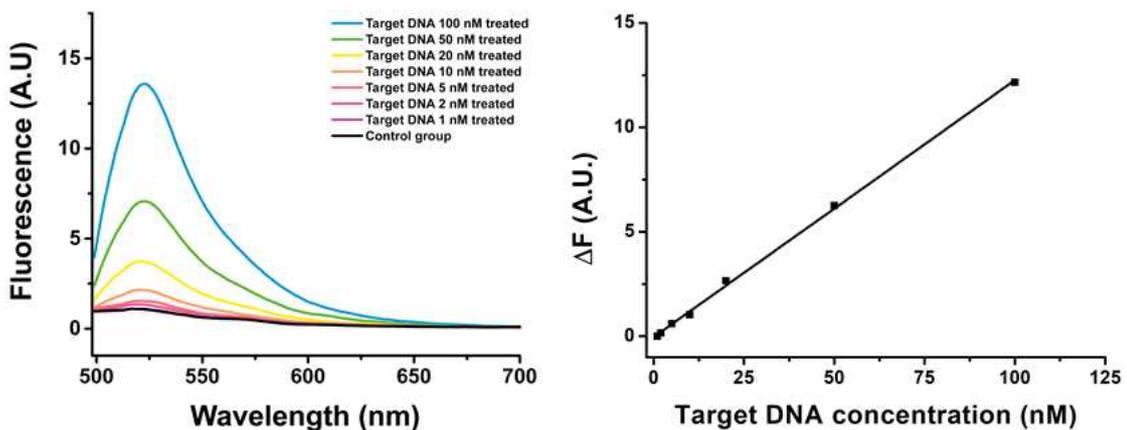


그림 126. 타겟 농도 변화에 따른 형광 거동의 변화 및 정량화를 위한 calibration curve

- 타겟 핵산 농도를 100 nM부터 1 nM까지 조절해 가며 테스트한 결과, 그림 126의 오른쪽 그래프와 같이 구간 내에서 타겟 핵산 농도에 따른 형광 신호가 선형적으로 나타남을 확인하였고 이를 통해 검출 시료에 타겟 핵산이 얼마나 있는지를 정량적으로 파악할 수 있는 calibration curve를 그릴 수 있었음. 그러나 microplate reader 상에서의 검출 한계(S/N ratio가 3이 되는 농도 경계)는 약 5 nM로 나타나며, 이는 목표하는 검출 한계에 크게 동떨어진 수준으로 판단되어 검출 민감도가 훨씬 뛰어난 장비를 통해 낮은 농도에서의 최적화를 추가로 진행해야 할 것으로 판단함. 하지만 용액 상에서의 테스트로도 제작한 형광 분자 표

지의 반응성 및 형광 거동에 대해서는 일정 수준 판단이 가능하여, 일차적으로 용액 상에서의 간단한 형광 거동 분석 이후 실제 종이기판(lateral flow sheet)위에서 다른 검출기기를 통한 추가적인 분석을 하는 단계적 분석이 이루어짐.

- 검출기상에서의 형광 신호 최적화를 위한 기판 기능화 과정 및 반응 조건의 최적화
- 제 1 세부인 성균관대 기계공학부와의 논의를 통해, 형광 현미경을 사용하여 lateral flow sheet의 형광 거동 및 검출 한계를 분석하고, 반응 최적화를 진행하기로 함. Lateral flow sheet 제작의 경우 앞선 차년도 연구에서 사용한 것과 마찬가지로 ‘표면 기능화-형광 분자 표지 고정화-타겟 핵산 처리-형광 분석’의 순서로 진행하였고, 각 단계별로 최적화를 진행하여 실험 과정에서의 문제가 없도록 개선하였음.

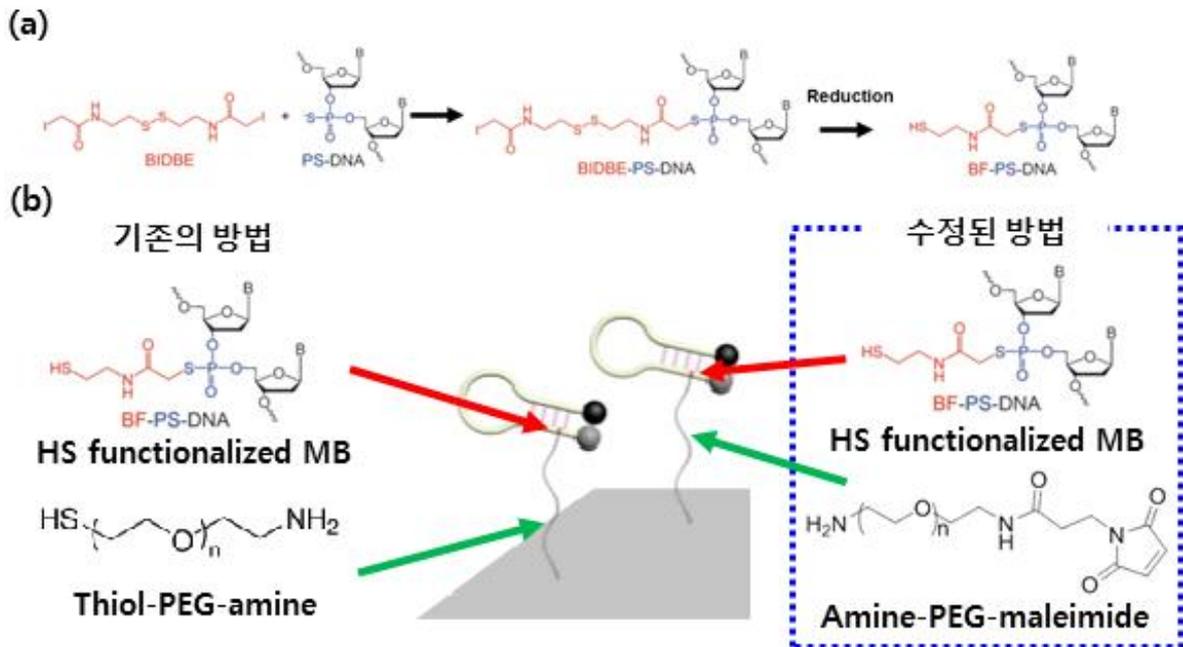


그림 127. 형광 분자 표지 기능화 방법과 종이 표면에 고분자 기능화 방법  
 (a) 고분자와 기능화하기 위한 형광 분자 표지의 자체의 기능화 방법 및  
 (b) 종이 상에서의 고분자 및 형광 분자 표지 기능화 방법

- 먼저 기존 2차년도 lateral flow sheet의 표면 기능화는 그림 127.(b)의 왼쪽과 같이 ‘1. carboxyl group 기능화 - 2. EDC-NHS 반응을 통한 Thiol-PEG-amine crosslinking - 3. Thiol-thiol 간의 disulfide bond 형성 유도’ 와 같은 방식을 이용했었음. 여기서 EDC-NHS 반응이란, carboxyl group에 반응하는 carbodiimide(EDC)와 그 둘 간의 반응에 경쟁적으로 작용하며 결과적으로 amine group를 갖는 분자를 결합시켜주는 역할을 하는 N-hydroxysuccinimide(NHS)를 사용하여 각각 carboxyl group와 amine group을 갖는 분자를 crosslinking 시키는 반응임. 이를 통해 우리는 carboxyl group을 갖는 종이 표면에 한쪽 말단이 amine group으로 치환된 고분자(spacer 및 crosslinker 역할 수행, 여기서는 PEG)를 연결하고, 연결된 고분자의 반대편 말단의 기능기를 형광 분자 표지를 기능화 하는 용도로 사용함.
- 형광 분자 표지의 기능화의 경우, 형광 분자 표지의 제작 과정에서 염기서열 하나에 기능화된 phosphorothioate(PS)에 합성된 N,N’-bis(a-iodo-acetyl)-2,2’-dithiobis(ethylamine) (BIDBE)라는 물질을 열처리와 함께 공유 결합 시킨 후, 이 BIDBE에 있는 disulfide bond(S-S)를 Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride(TCEP)으로 끊어 thiol group(-SH)을 활성화 하게 되면 thiol이 기능화 된 형광 분자 표지를 얻을 수 있음.

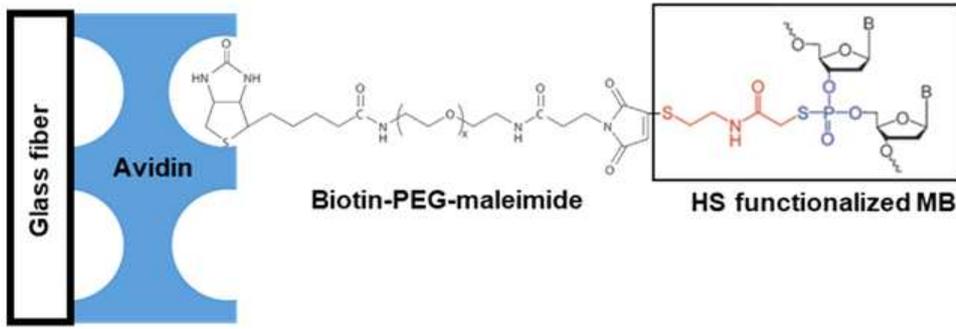


그림 128. Avidin을 이용한 고분자 및 형광 분자 표지 기능화

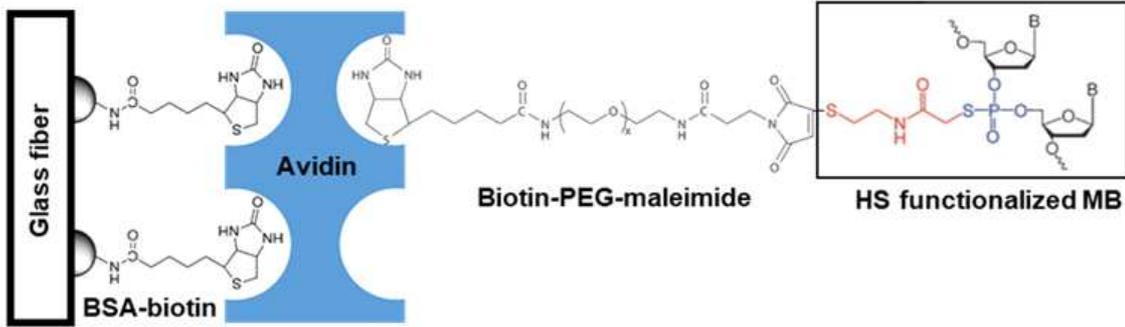


그림 129. BSA-biotin-Avidin을 이용한 고분자 및 형광 분자 표지 기능화

- 실험 초기에 형광 분자 표지가 lateral flow sheet 위에 제대로 고정되지 않는 문제점이 존재했고, 이는 2차년도에 사용했던 고정화 방식인 thiol-thiol 간의 결합이 iodine(I<sub>2</sub>)과 같은 촉매가 없고 특정 pH 조건을 만족시키지 못하는 우리의 실험 조건에서는 자발적으로 일어나기 어려운 것으로 판단되어 고정화 방식의 변화를 시도함. 첫 번째로, 기존 방식 대신 그림 128과 같이 '1. Avidin 기능화 - 2. Biotin-PEG-maleimide 기능화' 혹은 그림 129와 같이 '1. BSA-biotin 기능화 - 2. Avidin 기능화 - 3. Biotin-PEG-maleimide 기능화'의 방식을 도입하여 표면 기능화를 진행하였음.
- 위의 두 방식은 모두 avidin-biotin의 강한 결합력을 이용함과 동시에, 표면 기능화 말단의 maleimide와 형광 분자 표지의 thiol group간의 자발적인 반응을 통한 형광 분자표지의 고정화를 목표로 함. 또한 가장 첫 번째 이루어지는 기능화인 glass fiber와 avidin 혹은 BSA-biotin의 결합의 경우 glass와의 자연적인 affinity를 이용하여 결합시킬 수 있는 장점이 있어 매개체로 적합하다고 판단하였음.
- 그러나 결과적으로 형광 현미경을 사용한 분석에서 형광 분자 표지가 유체의 흐름에 따라 밀려가는 것으로 나타나 고정화가 정상적으로 진행되지 않았다고 판단하였고, 다른 기능화 방식을 시도하였음.
- 두 번째 사용한 기능화 방식은 그림 127.(b)의 오른쪽에 표현된 것과 같이 기존의 carboxyl group 기능화 및 EDC-NHS 반응을 사용하되, spacer 역할을 하는 고분자만 'Thiol-PEG-amine'에서 'Amine-PEG-maleimide'로 변경하는 방식으로, 확실한 carboxyl group 기능화와 EDC-NHS 반응을 통한 공유결합이 가능해 더욱 안정적으로 작동 할 것으로 기대하였음. 위 기능화 방식을 사용하였을 때, background signal(noise)의 감소 및 형광 분자 표지의 안정적인 고정화가 이루어졌음을 확인함.
- 또한 우리는 carboxyl group만 기능화 한 종이 기판과 고분자 까지 기능화 한 종이 기판을 비교하였는데, carboxyl group만 기능화 한 경우 표면의 - 전하에 의해 타겟 핵산이 종이 표면에 비특이적으로 결합하지 않고 잘 유동할 수 있도록 하는 역할은 수행할 수 있으나, 형광 분자 표지가 제대로 고정되지 않는 문제점이 있어 양쪽 말단에 기능기를 가진 고분자를 도입해 공유결합을 유도하였음. 또한 고분자는 종이 표면과 실제로 타겟 핵산과 반응이 일어나는 지점 사이의 거리를 일정 수준 이상 멀어지게 해 입체적(구조적)인 영향에 의한 반응성의 저하를 방지해 주는 역할도 수행할 수 있음.
- 또한 반응이 일어나는 물리적/화학적 환경이 용액 상과 종이 기판 상에서 상이하야 같은 조

건에서 같은 반응이 일어날 것으로 생각할 수 없기 때문에, 형광 분자 표지와 타겟 핵산간의 반응 최적화를 위해 용액 상에서는 10 mM 농도로 사용했던 MgCl<sub>2</sub>를 최대 1 M까지 높여가며 반응성을 테스트하였음. 테스트 결과에서 최적의 MgCl<sub>2</sub> 농도를 500 mM로 결정하고, 이후 실험에서 모두 500 mM로 사용함.

⑦ 바이러스 검출 성능 개선 연구 및 센서 안정도와 신뢰성 개선 연구

■ 여러 region의 HIV 형광 분자 표지를 동시에 사용하여 성능 개선

- 매우 긴 길이를 갖는 실제 바이러스 핵산의 경우 특이적인 서열이 하나가 아닌 여러 region에서 가지고 있고, 하나의 바이러스 핵산이 포함하는 여러 특이적 region에 대한 형광 분자 표지를 동시에 사용할 경우 형광 신호를 몇 배로 증가시킬 수 있을 것으로 예상함. 이는 fragmentation을 통해 긴 핵산 서열을 짧게 자르더라도 적용 될 수 있음.
- 염기서열에 대한 형광 분자 표지를 각각 제작하고, 모든 종류의 분자 표지를 섞어 만든 용액을 종이 기판 표면에 기능화 하여 성능 개선을 시도함. 제작한 HIV 대응 형광 분자 표지의 염기서열, 구조, 열역학적 정보를 아래 그림 130에 나타냄. 제작된 형광 분자 표지들은 서로간의 hetero-dimer 형성 평가를 통해 유의한 interaction이 없는 것을 확인하였음.

• MB Sequence, delta G, bp, structure information

Region	Sequence	ΔG	Length
HIV U3	<u>CTG GCC</u> CTG GTG TGT AGT TCT <u>GCC AG</u>	-1.69	26 bp
HIV PSI	<u>GCA CCC</u> ATC TCT CTC CTT CTA <u>GGT GC</u>	-1.97	26 bp
HIV cPPT	<u>GGC GAC</u> TAT TCT TTC CCC TGC ACT <u>TCG CC</u>	-1.88	29 bp

\*NaCl 5 mM condition

- Red colored: stem을 이루는 서열
- Underlined: stem 제작을 위해 추가한 서열, target에 상보적이지 않은 서열
- ex) Red colored w/o underline: stem을 이루면서, 동시에 target에 상보적인 sequence

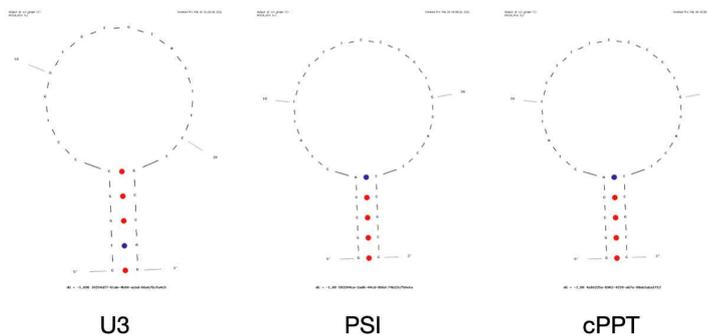


그림 130. 제작한 HIV 형광 분자 표지의 서열과 구조, 열역학적 정보

또한 각 region별 타겟 핵산과 결합하는 염기서열의 개수 및 깃스 자유에너지를 통해 반응성 및 안정성을 검증하였으며, 이는 아래 그림 131과 같음.

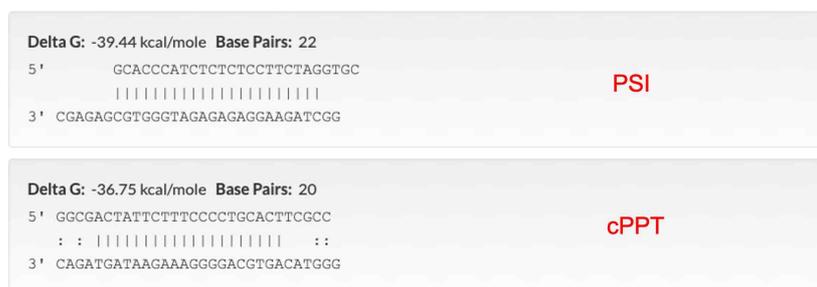


그림 131. 열역학적 분석을 통한 HIV 형광 분자 표지의 타겟 핵산과의 반응성 평가

- 실제 바이러스에 대응되는 조류독감(AIV) 및 구제역(FMDV) 형광 분자 표지의 제작 및 평가
- 모델 바이러스를 이용한 테스트에 이어, 실제 타겟 바이러스인 조류독감 및 구제역에 대응

되는 형광 분자 표지를 제작함. 제작한 조류독감 형광 분자 표지의 구조와 염기서열, 타겟 핵산과의 반응성 및 안정성은 다음 그림 132, 그림 133, 그림 134, 그림 135와 같음.

• AIV MB Sequence, delta G, bp, structure information

Region	Sequence	$\Delta G$	Length
AIV PB2 (conserved)	<b>CCT GCT</b> CTA AGA ATG AAA TGG ATG <b>CAG G</b>	-1.81	28 bp
AIV H5	<b>GCT CCA</b> GAA TAT GCA TAC AAA ATA <b>GGA GC</b>	-1.65	29 bp
AIV H9	<b>CAG GCC</b> AGA CAT TGC GAA TAA <b>GCC TG</b>	-1.79	26 bp

\*NaCl 5 mM condition

- Red colored: stem을 이루는 서열
- Underlined: stem 제작을 위해 임의로 추가한 서열, target에 상보적이지 않은 서열
- ex) Red colored w/o underline: stem을 이루면서, 동시에 target에 상보적인 sequence

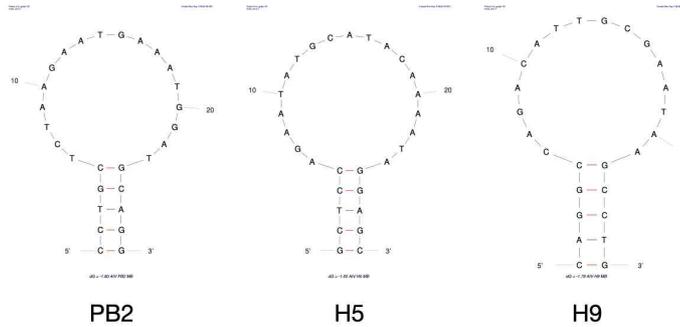


그림 132. 제작한 AIV 형광 분자 표지의 서열과 구조, 열역학적 정보

<p><b>Delta G: -42.95 kcal/mole Base Pairs: 24</b></p> <p>5' CCTGCTCTAAGAATGAAATGGATGCAGG</p> <p>     </p> <p>3' TTCTTGGGACGAGATTCTTACTTTACCTAC</p>	<b>PB2</b>
<p><b>Delta G: -43.01 kcal/mole Base Pairs: 25</b></p> <p>5' GCTCCAGAATATGCATACAAAATAGGAGC</p> <p>     </p> <p>3' AATAACGAGGCTTATACGTATGTTTATC</p>	<b>H5</b>
<p><b>Delta G: -42.87 kcal/mole Base Pairs: 22</b></p> <p>5' CAGGCCAGACATTGCGAATAAGCCTG</p> <p>     </p> <p>3' TGATTTCCGGTCCGGTCTGTAACGCTTATC</p>	<b>H9</b>

그림 133. 열역학적 분석을 통한 AIV 형광 분자 표지의 타겟 핵산과의 반응성 평가

• FMDV MB Sequence, delta G, bp, structure information

Region	Sequence	$\Delta G$	Length
FMDV conserved	<b>GTG GGC CGA ATA GTC CAC ATC CCA C</b>	-1.55	25 bp
FMDV O/BE/2017	<b>GGG ACA CCA AGA UGA CAG AAG TCC C</b>	-1.66	25 bp
FMDV Asia1 shamir	<b>GTG CCT GAT CGA CTT TGA GAA CGG CAC</b>	-1.71	27 bp

\*NaCl 5 mM condition

- Red colored: stem을 이루는 서열
- Underlined: stem 제작을 위해 임의로 추가한 서열, target에 상보적이지 않은 서열
- ex) Red colored w/o underline: stem을 이루면서, 동시에 target에 상보적인 sequence

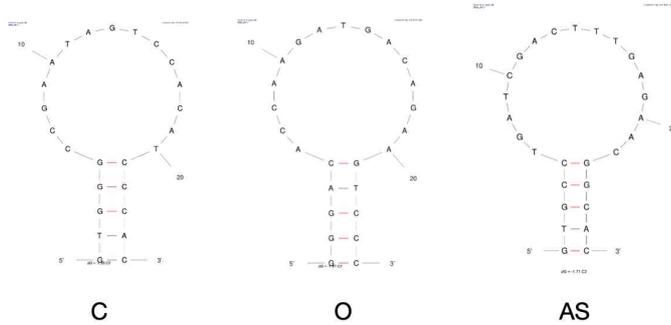


그림 134. 제작한 FMDV 형광 분자 표지의 서열과 구조, 열역학적 정보

<p><b>Delta G: -44.16 kcal/mole Base Pairs: 22</b></p> <p>5' GTGGGCCGAATAGTCCACATCCCAC</p> <p>     </p> <p>3' CGTAGTTCCGGCTTATCAGGTGTAGGGTG</p> <p style="text-align: right;"><b>Conserved</b></p>
<p><b>Delta G: -37.51 kcal/mole Base Pairs: 21</b></p> <p>5' GGGACACCAAGATGACAGAAGTCCC</p> <p>     </p> <p>3' CCCTGTGGTCTACTGTCTTCTTCTTCT</p> <p style="text-align: right;"><b>O</b></p>
<p><b>Delta G: -43.3 kcal/mole Base Pairs: 23</b></p> <p>5' GTGCCTGATCGACTTGAGAACGGCAC</p> <p>     </p> <p>3' ACCGCTGACTAGCTGAAACTCTTGCCGTG</p> <p style="text-align: right;"><b>AS</b></p>

그림 135. 열역학적 분석을 통한 FMDV 형광 분자 표지의 타겟 핵산과의 반응성 평가

- 추가로 제작한 HIV, AIV, FMDV 형광 분자 표지의 반응성 및 형광 거동을 용액 상에서 평가함. 조건은 이전에 사용하던 조건과 동일하며, 타겟 핵산은 1  $\mu$ M로 고정하였고 excitation wavelength는 480 nm, emission wavelength는 520 nm를 사용함. 그 결과는 아래 그림 136, 그림 137, 그림 138과 같음.

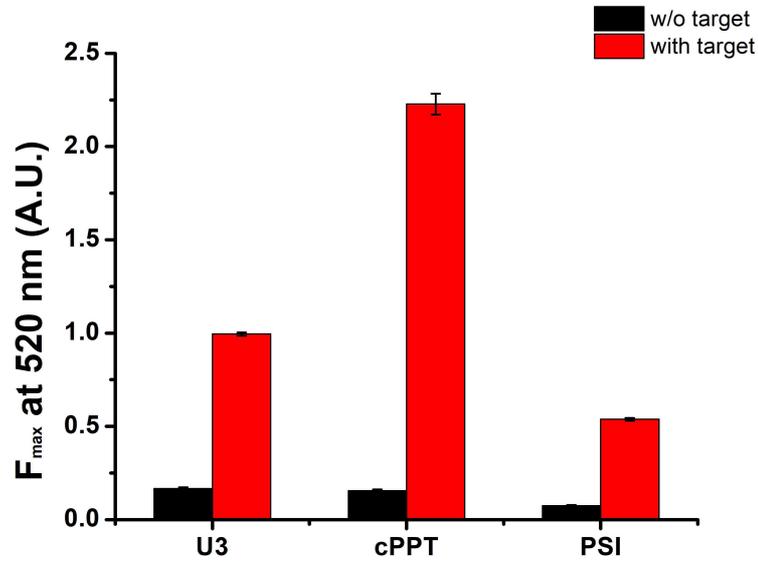


그림 136. 용액 상에서의 HIV 형광 분자 표지의 형광 거동

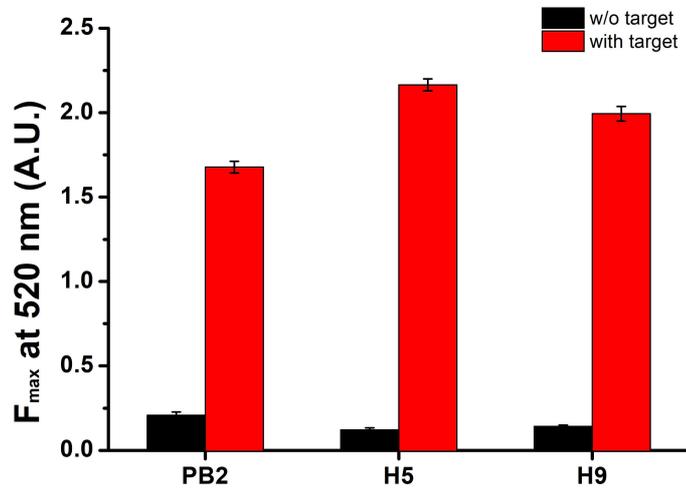


그림 137. 용액 상에서의 AIV 형광 분자 표지의 형광 거동

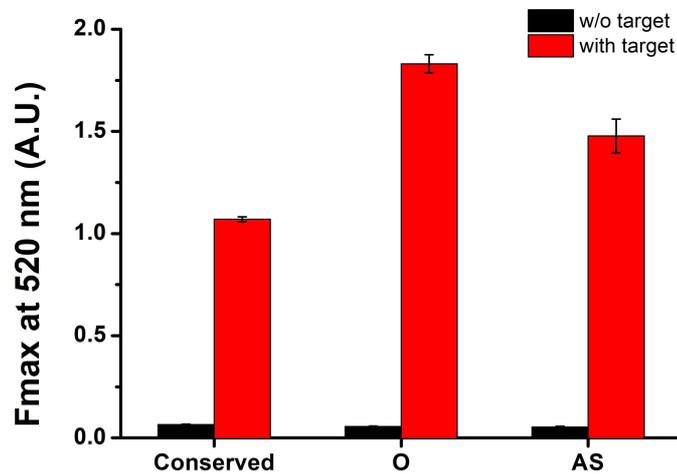


그림 138. 용액 상에서의 FMDV 형광 분자 표지의 형광 거동

- 형광 분자 표지 제작 과정에서 확인한 것과 마찬가지로, 용액 상에서 제작된 형광 분자 표지들이 타겟 핵산에 정상적으로 반응하여 형광 신호를 잘 나타냄을 확인할 수 있음.

- 종이 칩의 작동 방식 및 검출 기기의 변경을 통한 성능 개선 원리 분석과 이에 따른 표면 기능화의 영향 재평가

  - 기존의 lateral flow sheet 및 형광 현미경을 사용해서 얻은 결과를 통해, 검출 한계가 목표치에 도달하기 어려울 것으로 판단하여 검출 방식의 변경 및 종이 기판 샘플을 다른 형태로 제작하도록 함. 기존 액체의 유동을 이용한 lateral flow sheet에 형광 분자 표지를 기능화하는 경우 좁은 영역에 많은 양의 형광 분자 표지를 고정화하기가 어렵고, 따라서 적은 양의 타겟 핵산에 대해 높은 반응성 및 형광 신호를 기대하기 어려움. 또한 용액이 유동할 때 형광 분자 표지가 기능화 된 부분을 지나가며 반응이 일어나기 때문에, 반응이 일어날 수 있는 시간이 매우 짧아 반응 효율이 낮고, 높은 형광 신호를 얻을 수 없었음.
  - 따라서 lateral flow sheet의 형태 대신, 종이 바닥면에 소수성 물질이 벽으로 작용하는 well의 형태를 갖는 종이 칩을 기계공학부와 협업을 통해 설계하여 좁은 영역에 높은 농도의 형광 분자 표지가 농축될 수 있도록 함. 이러한 높은 형광 분자 표지의 농도는 적은 타겟 핵산 농도에도 분자 표지가 충분히 반응할 수 있는 반응성을 담보하며, 유동하지 않는 방식으로 반응 시간이 충분히 주어질 수 있어 더 뛰어난 반응성을 기대할 수 있음.
  - 또한 검출기기의 경우 형광 현미경에서 광자 검출(Multi pixel photon counter, MPPC) 기반의 검출 기기로 변경하여 민감도를 크게 향상시킴. 이 경우 형광에만 반응하는 것이 아닌 광자의 출입 전체에 신호를 나타내기 때문에 신호를 선별적으로 걸러내고 암실이 필요하다는 단점이 있었으나, 렌즈와 형광 필터를 도입하고 기기 자체의 검지 부분을 빛이 차단된 형태로 제작하여 문제를 해결할 수 있었음. 형광 현미경과 비교했을 때, MPPC를 이용하게 되면 근본적인 검출 민감도 차이뿐만 아니라, 정량적으로 광자 검출 신호를 표시해 주기 때문에 이미지를 직접 판별해야 하는 형광 현미경에 비해 낮은 농도 구간에서 이점이 있으며 이는 곧 검출 한계의 개선으로 이어짐.
  - 기존 lateral flow sheet에서는 종이 표면 기능화가 형광 분자 표지가 흘러가는 것을 막기 위해 고정화 용도로 사용되었다면, 바뀐 종이 칩에서는 종이 표면과의 상호작용을 최소화하고 타겟 핵산과 안정적으로 반응할 수 있도록 하는 역할을 수행함. 우리는 이전의 다양한 표면 기능화 방식과 기능화의 유무에 따른 형광 분자 표지의 종이 표면과의 상호작용에 대한 분석을 토대로, 새로운 종이 칩에 대해서도 기존의 기능화를 유지하는 것이 안정적으로 구동함에 이점이 있을 것으로 판단하고 이를 실험을 통해 평가함. 실험 결과 예상했던 것과 마찬가지로 기능화를 하지 않거나 혹은 carboxyl group만 기능화 한 종이 칩에 농축된 고농도의 형광 분자 표지가 안정적으로 형태를 유지하지 못해 타겟 핵산이 없음에도 형광이 나타나거나, 타겟 핵산(용액) 처리 시 불안정하게 작동하는 경향을 보여 기존의 기능화 방식을 새로운 종이 칩의 형태에도 그대로 적용하여 사용하는 것으로 결론 내림.

■ 종이 칩에 건조시킨 나노입자의 재분산 거동 및 광학적 특성 연구

- 종이 소자 위에 광학 나노 입자를 건조시킨 상태에서 장기간 보관한 후 용액을 떨어뜨려 사용시 나노입자가 응집한 상태로 잘 재분산 되지 않아 나노입자의 광학적 특성이 제대로 구현하지 못하는 문제가 있음. 이러한 이유로 본 연구에서는 광학 나노입자의 안정성, 재분산성 및 기능성을 건조한 상태로 장기간 보관할 수 있는 새로운 기술을 개발하고자 하였음.
- 종이의 표면을 혈청 알부민과 자당으로 처리하고 그 위에 금 나노입자를 안정화할 수 있는 stabilization agent로 처리한 후 소수성 폴리비닐 부티랄 층으로 코팅된 나노입자를 건조시키는 경우 금 나노입자를 100%의 수준까지 완전히 재분산 시킬 수 있었음.

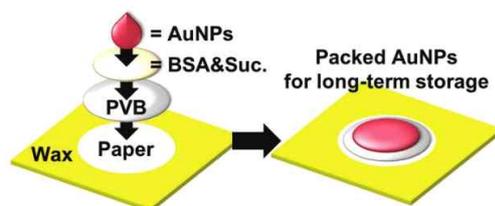


그림 139. 재분산이 가능한 나노입자의 건조 기술

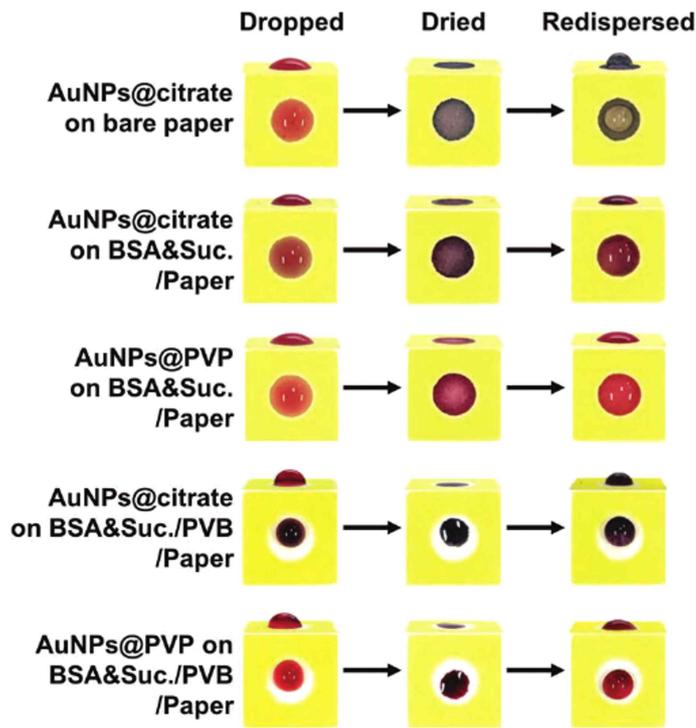


그림 140. 종이칩 위 나노입자의 건조 및 재분산

- 본 기술을 통하여 10 ~ 90 nm 크기의 구형 금 나노입자, 금 나노막대, 은나노입자, 자성나노입자 등 다양한 크기 및 조성의 나노입자에 동일하게 적용하여 나노입자를 재분산 시킬 수 있음.

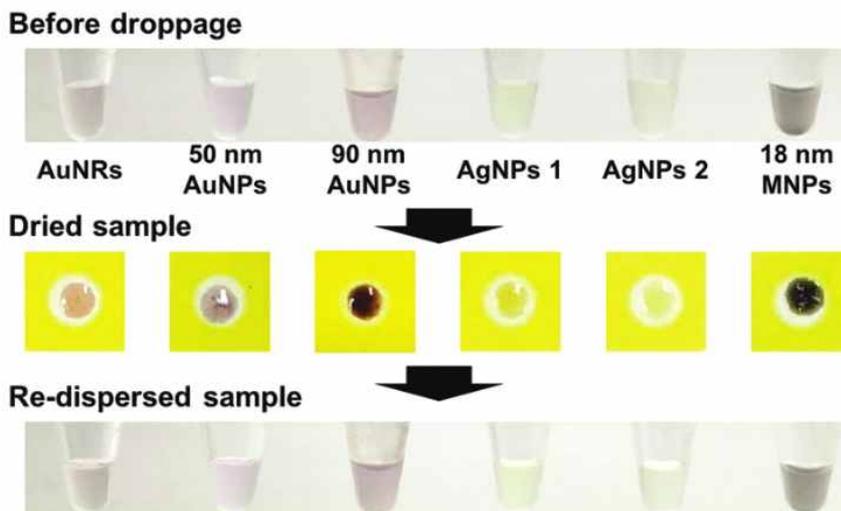


그림 141. 다양한 나노입자의 건조 및 재분산

- 또한, 이렇게 재분산 된 금 나노입자에 1,4-디티오프레이톨(DTT)과 같은 티올 함유 화합물을 처리할 경우 용액상으로 존재하던 나노입자와 동일한 정도의 색깔변화가 일어나는 것을 확인할 수 있었음.

- 본 연구는 제 1 세부와 제 2 세부 연구기관의 공동 연구로 이루어진 것으로 2019년도에 'Particle & Particle Systems Characterization'에 게재되었음.

**FULL PAPER**

Nanoparticle Packaging

**Particle**

Particle Systems Characterization

www.particle-journal.com

## A Paper-Based Platform for Long-Term Deposition of Nanoparticles with Exceptional Redispersibility, Stability, and Functionality

Hui Hun Cho, Su Ji Kim, Ali Turab Jafry, Byoungsang Lee, Jun Hyuk Heo, Seokyoung Yoon, Sun Hwan Jeong, Seong-Il Kang, Jung Heon Lee,\* and Jinkee Lee\*

Although nanoparticles (NPs) can be carefully engineered to have maximal stability and functionality desirable for use in diverse applications, they are generally not suitable for long-term storage in solution. It is also difficult to store NPs in a dry state because dried NPs generally become aggregated and cannot easily be redispersed. Thus, a new strategy allowing long-term storage of NPs with high stability, redispersibility, and functionality is highly demanded. By passivating the 13 nm gold nanoparticle (AuNP) surface with stabilizing agents and treating a paper substrate with both bovine serum albumin and sucrose after coating with a hydrophobic polyvinyl butyral layer, it is possible to fully redisperse ( $\approx 100\%$ ) dried AuNPs with colloidal stability comparable to that of as-prepared AuNPs. Furthermore, AuNPs physically stabilized with polyvinylpyrrolidone can react with thiol-containing compounds, such as 1,4-dithiothreitol (DTT). Taking advantage of the oxidation reaction of hypochlorous acid with DTT, it is possible to demonstrate a paper-based colorimetric sensor for detection of residual chlorine in water. Since this strategy is applicable to large-sized AuNPs (30–90 nm), silver NPs, oleic acid-capped magnetic NPs, and cetrimonium bromide-passivated gold nanorods, it can be used for diverse NPs requiring long-term storage for many applications.

quantum-confinement-effect-driven optical, electronic, magnetic, and chemical properties.<sup>[1–4]</sup> Coupled with their nanometer-scale size, extremely high surface area to volume ratio, and high reactivity, NPs are actively used for diverse applications in biological, environmental, analytical, medicinal, and energy-related fields.<sup>[5–11]</sup>

Although NPs are frequently employed for the aforementioned applications, there are some critical issues regarding their long-term storability that must be resolved. Whereas as-prepared NPs can be carefully engineered to have maximal stability and functionality for immediate use, they are generally not desirable for long-term storage in solutions because their properties can easily be altered.<sup>[12,13]</sup> It is also difficult to store the NPs in a dry state because dried NPs generally become aggregated and cannot easily be redispersed.<sup>[14,15]</sup>

Research on the storage of NPs has been performed for many years via the lyophilization process using a lyoprotectant and it has become commercially available.<sup>[16–18]</sup> Hackley and co-workers reported the development of lyophilization process for reconstituting of 20 nm sized silver NPs (AgNPs).<sup>[17]</sup> Fessi and co-workers reported the lyophilization of polycaprolactone nanocapsules for long-term stability.<sup>[19]</sup> However, lyophilization still requires a time-consuming (24–72 h) multistep procedure, a sample-dependent preparation process, and costly and specialized equipment with a sub-

### 1. Introduction

Colloidal nanoparticles (NPs) have been widely investigated for the last several decades because of their unique

H. H. Cho, S. J. Kim, S. Yoon, Prof. J. H. Lee  
SKKU Advanced Institute of Nanotechnology (SAINT)  
Sungkyunkwan University (SKKU)  
Suwon 16419, Republic of Korea  
E-mail: ihlee7@skku.ac.kr

그림 142. 제 1 세부와 제 2 세부 연구기관의 공동 연구로 게재된 논문

### - 제 1 협동 연구기관(숙명여자대학교 화공생명공학부)

#### ① 구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스의 염기서열 분석

■ 한국에 미치는 영향이 크거나 향후 감염을 유발할 가능성이 높은 바이러스 혈청형 및 아형 선정

- 구제역 바이러스 혈청형 7 가지 중 지금까지 한국에서 감염을 유발한 혈청형은 O-type과 A-type으로 (표 12) 우선 검출 대상으로 선정. 그 외 혈청형 중 인접 국가인 중국에서 감염이 발생한 적이 있는 Asia1 type은 향후 검출 시스템의 개발 및 성능 테스트 후 검출 대상으로 추가 고려하고자 함.
- HA, NA는 인플루엔자 바이러스 표면에 드러나는 바이러스 단백질로 (그림 143), 조류 인플루엔자 바이러스를 포함한 인플루엔자 바이러스 아형은 HA 단백질과 NA 단백질 종류에 따라 분류함. 많은 아형이 존재하는데 조류가 숙주이므로 감염 확산이 매우 빠를 수 있고 감염 지역의 범위도 매우 넓을 수 있으며 유전체 재조합 (그림 144)으로 변종이 쉽게 만들어져 한국에 큰 영향을 주거나 줄 것으로 예상되는 아형의 선정이 쉽지 않음.
- 한국에서 감염을 유발한 조류 인플루엔자 바이러스 발생에 영향을 끼친 것으로 알려져 있는 N1, N2, N3, N5, N6, N8 아형 (NA 기준으로 분류)을 검출 대상으로 고려함. 향후 진단 키트에 바이러스의 혈청형 또는 아형을 타겟으로 하는 탐침 분자를 몇 개까지 도입할 수 있는지 검토 후 검출 대상 조류 인플루엔자 바이러스 아형 종류를 최종 결정하고자함.

표 12. 최근 한국과 중국에서 분리된 구제역 바이러스 혈청형

Korea				China			
#	Accession	Year	Serotype	#	Accession	Year	Serotype
1	KY086465	2000	O	1	DQ533483	1958	Asia1
2	AF377945	2000	O	2	EF149010	2005	Asia1
3	EF614457	2002	O	3	GU931682	2005	Asia1
4	AH012984	2002	O	4	HM008917	2005	O
5	KF112886	2010	O	5	FJ906802	2006	Asia1
6	KR401159	2010	O	6	HQ631363	2006	Asia1
7	KF112887	2010	O	7	KR073010	2006	Asia1
8	KC588943	2010	A	8	KU360085	2006	Asia1
9	KR401160	2011	O	9	JN998086	2010	O
10	KY322674	2014	O	10	KY234501	2011	O
11	KY086466	2016	O	11	KT968663	2013	A
12	AJ539139	2016	O	12	KY234502	2015	O
13	MG983730	2017	O	13	MF461724	2017	O

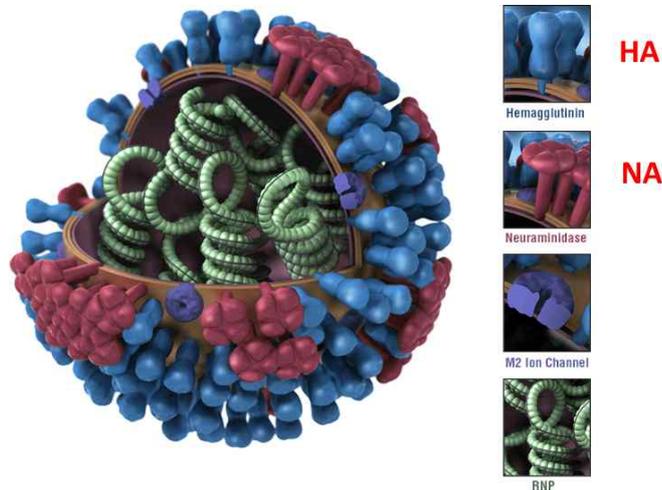


그림 143. 인플루엔자 바이러스 표면

- 또한 조류 인플루엔자 바이러스의 많은 아형 중 병원성을 고려하여 검출 대상 아형을 선정
  - H5 와 H7 아형 (HA 단백질을 기준으로 분류)의 조류 인플루엔자 바이러스가 고병원성 특성을 가지는 것으로 알려져 있어, 검출 대상으로 선정함.
- 구제역 바이러스의 혈청형 또는 조류 인플루엔자 바이러스의 아형에 관계없이 각 바이러스의 존재를 검출하기 위한 탐침 설계도 시도하였음.

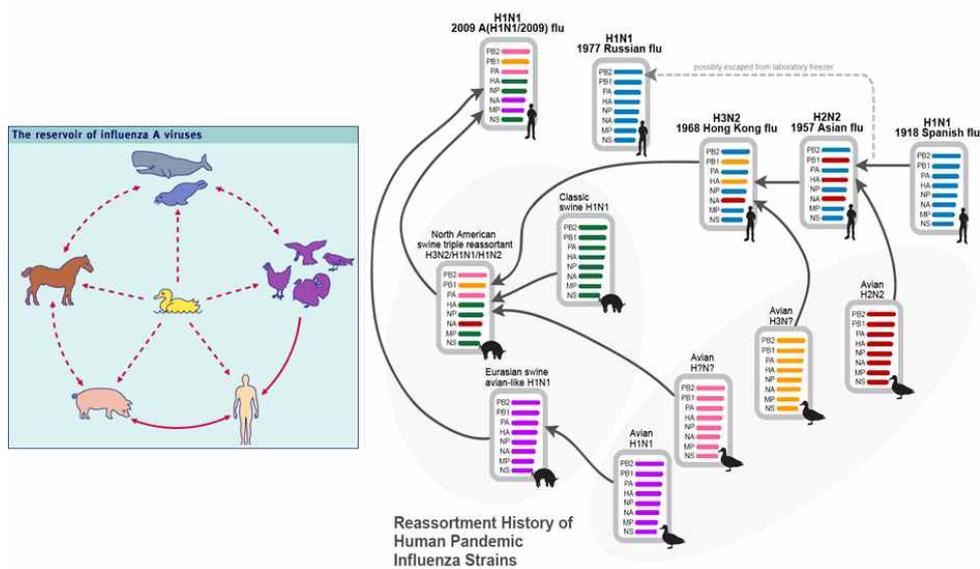
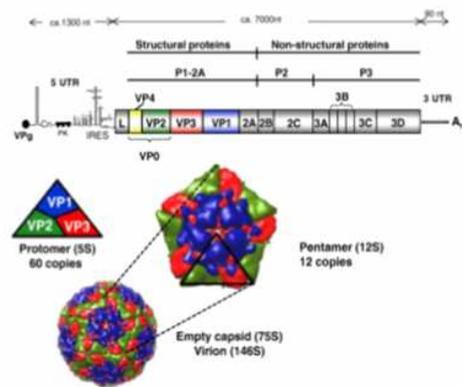


그림 144. 인플루엔자 바이러스 유전체 재조합의 예

- 구제역 바이러스의 경우 한 개의 유전체 분자를 가지고 있고 조류 인플루엔자의 경우 보통 8개의 개별 유전자를 포함하는 분절된 유전체를 가지고 있음 (그림 145).

구제역 바이러스의 형태 및 유전체 구조



조류 인플루엔자 바이러스의 형태 및 유전체 구조

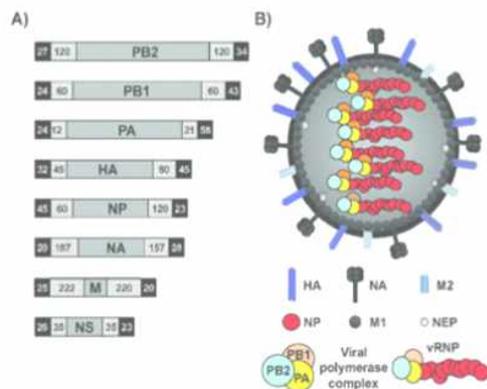


그림 145. 구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스의 형태 및 유전체 구조 비교

- 두 바이러스 모두, 구조단백질을 암호화하는 유전자들 대비, 비구조단백질을 암호화 하는 유전자의 염기서열이 혈청형 또는 아형에 따라 작은 차이를 보임.
- 비구조단백질 유전자 중에서 구제역 바이러스의 혈청형과 조류 인플루엔자 바이러스의 아형에 관계없이 유사도가 특히 높은 2B, 3C, 3D 유전자 (구제역 바이러스)의 서열 일부와 PB2, NP (조류 인플루엔자 바이러스) 유전자의 일부를 탐침 후보 서열로 선정.
- 탐침 서열 선정을 위해 한국에서 분리되거나 또는 향후 한국에서 감염을 유발할 수 있는 바이러스들의 해당 유전자 전체를 서열 비교하여 공통적인 부분을 찾아서 탐침 설계에 반영함 (그림 146, 147).

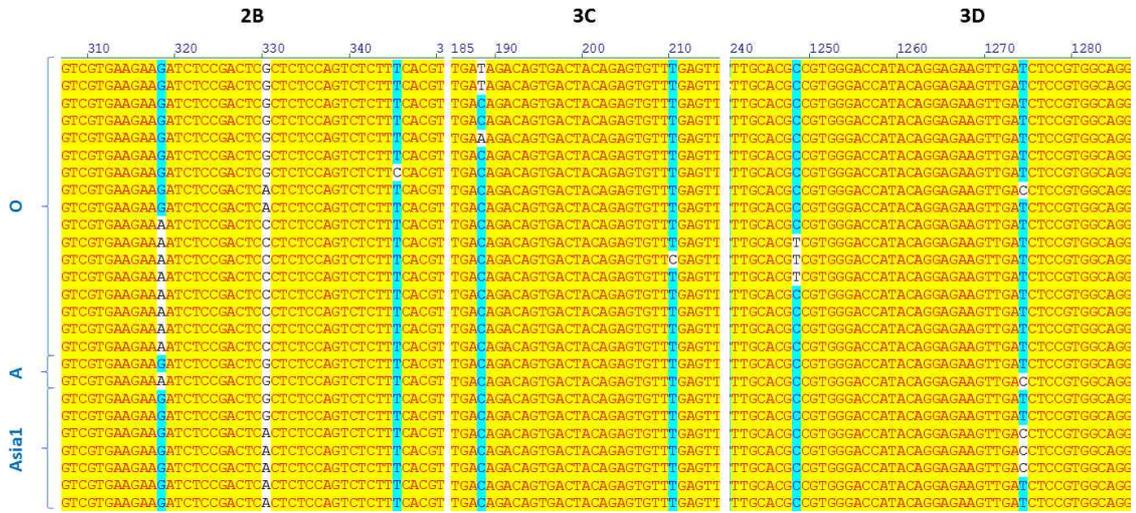


그림 146. 구제역 바이러스의 혈청형에 관계없이 유사도가 높은 2B, 3C, 3D 유전자의 서열 일부

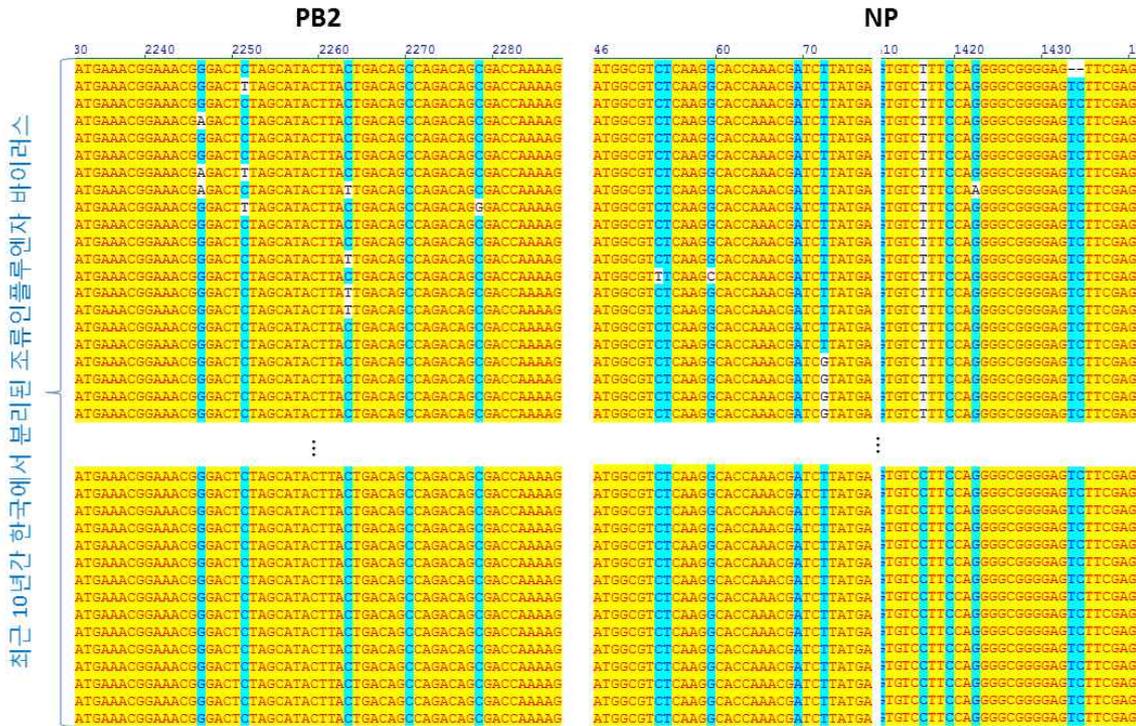


그림 147. 조류 인플루엔자 바이러스의 아형에 관계없이 유사도가 높은 PB2, NP 유전자의 서열 일부

- 최근 한국에서 분리된, 구제역 바이러스의 유전체 염기서열과 조류 인플루엔자 바이러스의 유전체 중 PB2와 NP 유전자의 염기서열을 확보하여 (표 13) 서열 비교에 적용함. 구제역 바이러스의 경우, 유전자 및 유전체 서열 정보가 다소 부족하여 중국에서 분리된 바이러스 유전체 염기 서열도 포함하여 분석함.

표 13. 최근 10년간 한국에서 분리되었으며, PB2 및 NP 유전체의 염기서열이 분석된 조류 인플루엔자 바이러스 자료수를 아형별로 나타냄. 관련 데이터베이스가 잘 구축되어 있어 많은 수의 서열 정보를 얻을 수 있었음.

<b>PB2</b>	Count	<b>NP</b>	Count
H5N6	9	H5N6	9
H7N1	1	H7N1	1
H5N8	66	H5N8	66
H9N2	2	H5N1	20
H5N1	12	H9N2	2
H7N7	6	H7N7	6
H1N1	3	H3N6	1
H10N8	2	H1N1	3
H10N6	1	H10N8	1
H13N2	1	H10N6	1
H10N1	2	H13N2	1
H4N6	1	H7N3	2
H7N9	9	H7N9	5
H2N8	6	H10N4	2
<b>SUM</b>	<b>121</b>	H10N1	2
		H4N6	1
		H2N8	6
		<b>SUM</b>	<b>129</b>

- 염기서열 분석으로 구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스의 혈청형 및 아형에 관계 없이 공통적인 유전체 부분을 기준으로 바이러스 탐침 분자의 염기 서열을 확정하였음 (표 14, 15).

표 14. 구제역 바이러스 보존 염기 서열에 기반한 탐침 분자. Tm = melting temperature; GC% = percent of G or C in sequence; R = A or G; Y = C or T; H = A, C or T; V = A, G or C; N = any nucleotide; M = A or C; W = A or T; S = G or C.

FMDV-Conserved Sequences					
#	Gene	Sequence	Length	Tm	GC%
1	2B	GACATGTCAACRAAACACGGRCC	23	59	52.2
2	2B	GACACCGGYCTYGAGATHCTGGACAG	26	63.8	59
3	2B	GTCGTGAAGAARATCTCCGACTCVCTCTCCAGTC TCTTYCACGTRCCGGCCCCCG	55	87.3	60.3
4	2B	TCGCCTCGAVYTTCTTCCGGTC	22	62	59.8
5	3C	TGAHAGACAGTGACTACAGAGTGTTYGAG TT	31	58.8	41.4
6	3C	GTRAAAGGRCAGGACATGCT	20	49.9	50
7	3C	CTCATGGTYTNCACCGTGGGAA	23	62.3	56.5
8	3C	GAGGCCCTHACYTACAARGACAT	23	53.5	49.3
9	3D	CAAATGCACTCMAAYAACGGVCCGCAAA TTGG	32	73.6	49
10	3D	AAYGTTGTGGGAYGTRGACTA	20	47	47.5
11	3D	GAGCTGGAYWCTTAYACCATGATCTCCTA	29	58.6	44.8
12	3D	CACATGGAYTAYGGRACTGGGTTTTA	26	59	44.2
13	3D	ATCCTCTCCYTTGCACGYCGTGGGACCATACAG GAGAAGTTGAYCTCCGTGGCAGG	56	87.2	58
14	3D	GTCCACTCTGGACCYGAYGAGTAYCGGCG TCT	32	72.5	60.9
15	3D	CTCTTYGAGATTCCAAGCTACAGRTCACCTTACC TGCGYTGGGTGAACSTGGGTGAACSCCGTGTGY GGYGACGC	75	91.8	55.7

표 15. 조류 인플루엔자 바이러스 보존 염기 서열에 기반한 탐침 분자.

AIV-Conserved Sequences					
#	Gene	Sequence	Length	Tm	GC%
1	PB2	TGGATGATGGCAATGAA	17	44.7	41.2
2	PB2	GTRATGAAACGGAAACG	17	41.7	44.1
3	PB2	TAGCATACTTAYTGACAG	18	31.1	36.1
4	PB2	CAGACAGSGACCAAAG	17	42.8	52.9
5	NP	ATGGCGTYCAAGSCACCAAACG	23	65	56.5
6	NP	TTYCARGGGCGGGGAG	16	53.8	68.8
7	NP	GATGGARARTGCC	13	28.2	53.8

② 각 바이러스의 혈청형과 아형을 구분할 수 있는 핵산 탐침 (Probe) 염기서열 설계

■ 구제역 바이러스 혈청형을 구분할 수 있는 유전체 부분 선정 및 탐침 분자 설계.

- 바이러스 유전체 서열을 정렬하여 비교한 결과 구제역 바이러스의 경우 혈청형에 따라 VP1 유전자의 염기 서열에서 차이가 컸으며 특히 특정 부분의 서열들이 혈청형에 따라 매우 달라 이 부분을 혈청형 구분을 위한 탐침 분자의 염기서열로 선택함 (표 16, 17). VP1 유전자의 일부 서열은 동일 혈청형 내에서 매우 유사하였으나 다른 혈청형에서는 상당한 차이가

있음 (그림 148).

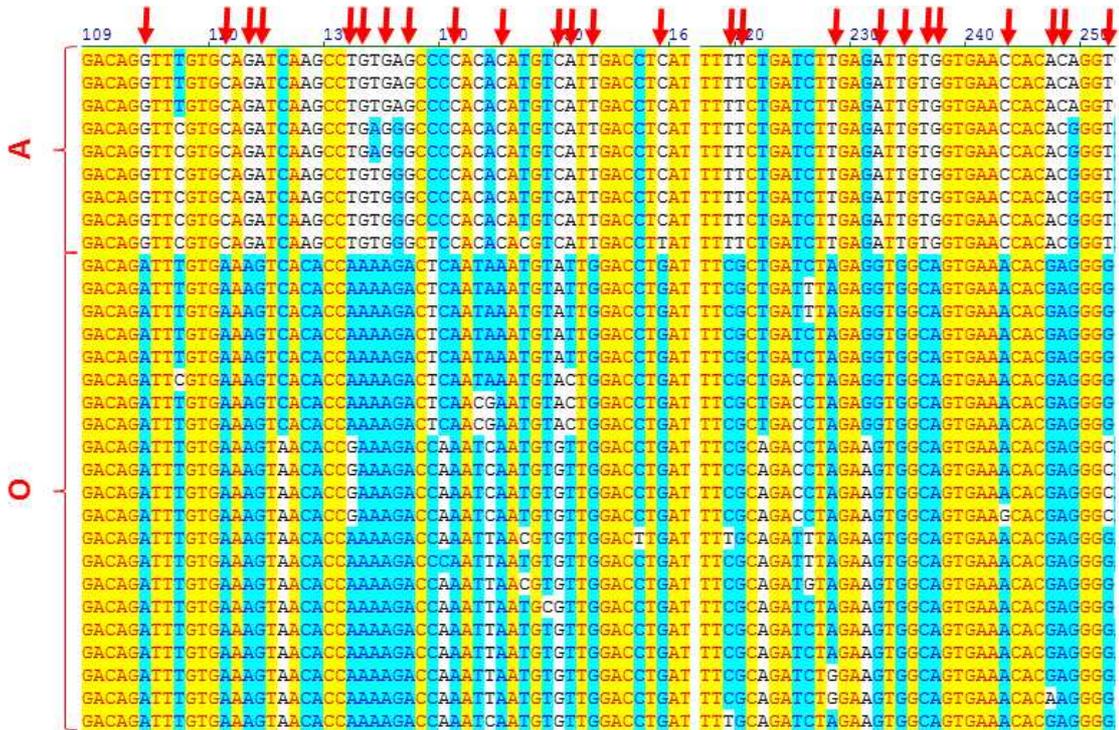


그림 148. 한국에서 발생한 구제역 바이러스의 혈청형에 따른 VP1 유전자 염기서열 비교

- 한국에서 발생한 구제역 바이러스 혈청형은 O형과 A형으로, 이들을 구별하는데 필요한 유전체 전체 서열 정보는 확보되지 않았지만 VP1 유전자 염기서열 정보가 있는 경우, 해당 서열 데이터를 탐침 분자 설계 과정에서 반영하였음 (표 16).

표 16. 구제역 바이러스 유전체 염기서열 중 VP1 서열이 알려진 경우

Korea				China			
#	Accession	Year	Serotype	#	Accession	Year	Serotype
1	JQ070331	2010	A	1	KF450794	2013	A
2	MK463490	2010	A	2	MG840802	2018	A
3	KY766148	2017	A				
4	MG972599	2017	O				
5	MG972600	2017	O				
6	MK463491	2017	A				
7	MK463492	2018	A				

표 17. 구제역 바이러스 혈청형 (O형 또는 A형)을 판별할 수 있는  
 탐침 분자의 염기서열 정보. K = G or T

Serotype O-specific					
#	Gene	Sequence	Length	Tm	GC%
1	VP1	GACAGATTYGTGAAAGTMACACCR <sup>K</sup> AAAG AC	30	60.9	41.7
2	VP1	GTGGCAGTGAAR <sup>K</sup> CACRAGGG <sup>S</sup>	21	59.1	61.9
3	VP1	TGGACAACACCACMAAYCCRACG	23	62.3	54.3
4	VP1	TGCCYTACACRGCACCR <sup>K</sup> CACCGTGT	25	68.7	62
5	VP1	GAAGTCTKTACCGYRTGAAGAGGGC	26	63.2	55.8

Serotype A-specific					
#	Gene	Sequence	Length	Tm	GC%
1	VP1	ACCRCCACCGGGGAATCAGCRGACCC	26	73.6	69.2
2	VP1	TAATGGACAGGTTYGTGCAGATCAAGCCT G	30	67.2	48.3
3	VP1	CACACAYGTCATTGACCTYATGCARACACA CCAACACGGGC	41	79.6	52.4
4	VP1	GGTRGGCGCYATGTTGCGCGCGGCCAC	27	79.1	74.1
5	VP1	CTTTTCTGATCTTGAGATTGTGGTGAACCA CAC	33	65.3	42.4
6	VP1	TMRCCTAACGTGGGTACCCAAYGGAGCA	28	68	55.4
7	VP1	GAGCAACCCCACTGCTTACCACAAA	25	62.1	52
8	VP1	AGCRCCGTTACRAGGCTTGCRCTC	25	68.7	62
9	VP1	CGGCGAGGTGACTYGGGKYCTCTCGYGG	28	75.9	71.4
10	VP1	CGRGCCACSGAGATCCR <sup>K</sup> HGAATC	24	66.1	63.9
11	VP1	CTACTGCCCCAGGCCRCTGYTGGCGRTGG AGGTGWCGTCVCAAGAC	46	86.8	65.6
12	VP1	AAAATCATTGCCCTGCAAA	20	54.5	40

■ 조류 인플루엔자 바이러스 아형을 구별할 수 있는 유전체 부분 선정 및 탐침 설계.

- 최근 10년간 한국에서 분리된 조류 인플루엔자 바이러스의 HA 유전자 서열과 NA 유전자 서열을 확보함.
- 바이러스가 갖는 HA 단백질과 NA 단백질의 조합으로 조류 인플루엔자 바이러스 아형이 결정되므로 해당 바이러스 아형 구분을 위해 HA, NA 유전자의 염기서열을 고려함 (표 18).
- 서열들을 정렬하고 비교하여 각 아형에서 특이적으로 나타나는, 아형 판별을 위한 탐침 분자로 사용할만한 염기 서열들을 선정함 (그림 149, 그림 150, 표 19).

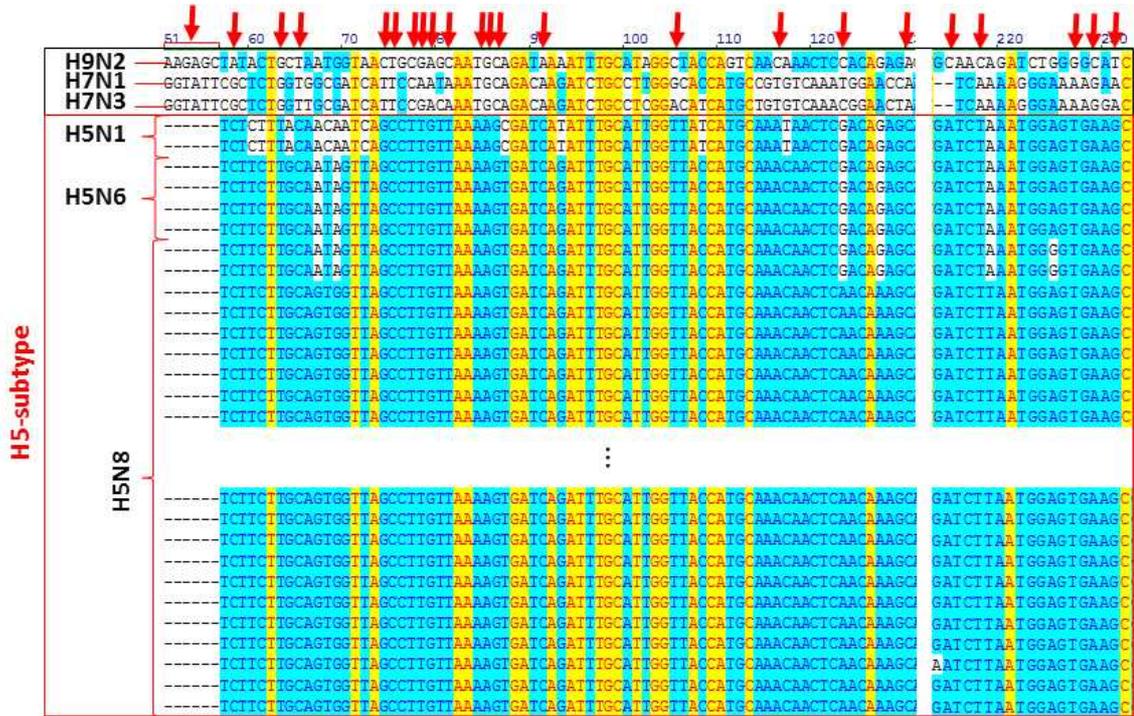


그림 149. 최근 한국에서 발생한 조류 인플루엔자 바이러스의 HA 유전자 염기서열 비교. 빨간색 화살표는 아형간 HA 유전자 서열 차이가 많이 있는 영역을 가리킴.

표 18. 조류 인플루엔자 바이러스 아형 구분을 위해 반영한 HA 유전자 및 NA 유전자 염기 서열 수

HA	Count	NA	Count
H5N6	4	H5N6	9
H7N3	1	H7N3	1
H7N1	1	H7N1	1
H5N8	41	H5N8	68
H5N1	2	H9N2	2
H9N2	1	H5N1	8
SUM	50	H1N1	3
		H13N2	1
		H7N9	3
		H4N6	1
		H2N8	6
		SUM	103

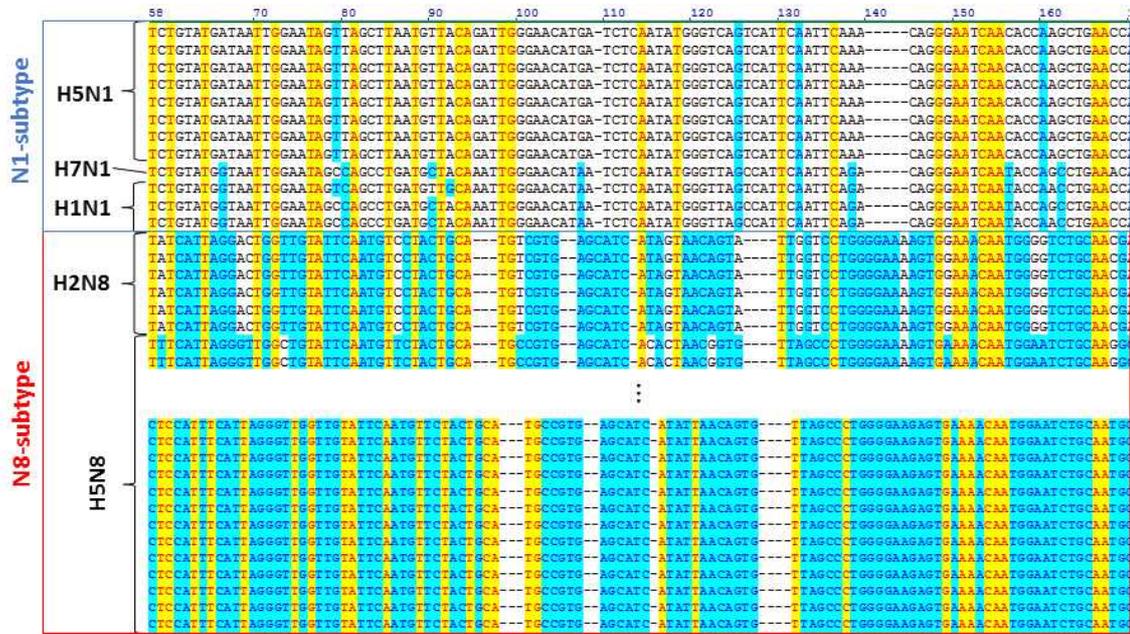


그림 150. 한국에서 발생한 조류 인플루엔자 바이러스 중 N1 또는 N8을 갖는 바이러스 아형의 NA 유전자 염기서열 비교

표 19. 조류 인플루엔자 바이러스 아형 (H5, N1, N8)을 판별할 수 있는 탐침 분자의 염기 서열

Subtype H5-specific					
#	Gene	Sequence	Length	Tm	GC%
1	HA	ACTGTTACACATGCCCAAGACATACT	26	55	42.3
2	HA	TTCAGAAATGTGGTATGGCT	20	47.1	40
3	HA	CTACAATAATACCAA	15	20.6	26.7
4	HA	CAATTTTAAACCGAATGATGCAAT	25	55.5	28
5	HA	TACAAAATTGTCAAGAAAGG	20	42.2	30
6	HA	TTTATAGAGGGAGGATGGC	19	45.9	47.4
7	HA	AATGAGCAGGGGAGTGGGTAC	21	54.4	57.1
8	HA	ATCATTGACAAAATGAACACTCA	23	49	30.4

Subtype N1-specific					
#	Gene	Sequence	Length	Tm	GC%
1	NA	AAGATAATAACCATTGGATCA	21	43.4	28.6
2	NA	TCTGTATGRTAATTGGAATAG	21	40.2	31
3	NA	ATTGGGAACATRATCTCAAT	20	44.1	32.5
4	NA	CATTAGCGGGYAATTCATCTCTTTGCC	28	65.4	48.2
5	NA	ATTGGRTCCAAGGGGGATGT	20	55.4	52.5
6	NA	TGTGTAATGGCTCTTGCTTTACTGTAATGAC	32	61	37.5
7	NA	GATGGACCAAGTAATGG	17	38.9	47.1
8	NA	ATAGAAAAGGRAAAGTAGT	20	37.9	27.5

Subtype N8-specific					
#	Gene	Sequence	Length	Tm	GC%
1	NA	CAATATGTGATGTCAAGGGCTTTGC	25	58.6	44
2	NA	CAATCACCCAATGTATA	17	34.5	35.3
3	NA	TTTGAAGCTGTRGCATGGTCAGCAAC	26	62.7	48.1
4	NA	TATTGGGTAATGACTGA	17	34	35.3

5	NA	CAGTATAGAATATACAAAGC	20	33.7	30
6	NA	ACAATTAGTCGAACCTC	17	34.9	41.2
7	NA	TAAAGAATGGTTGGAC	16	33.1	37.5

③ 역유전학 기법으로 증식 능력이 제거된 모델 바이러스 생산

- 동물 바이러스 검출용 키트 개발 과정에서 다량의 바이러스 입자 확보하고, 새로운 동물 감염 유발 위험을 줄이며, 실험자 안전을 향상시킬 방안 필요.
- 구제역 바이러스 또는 조류 인플루엔자 바이러스 유전자들을 포함한 타바이러스 기반 증식 능력이 제거된 모델 바이러스 입자를 생산하였음. 이를 통해 충분한 실험용 시료 및 실험자 안전을 확보하였고 새로운 동물 감염의 위험도 제거하였음.

■ 구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스 유전자 DNA 확보.

- 실제 발생했던 3가지 혈청형 (O, A, Asia1) 구제역 바이러스 3D 유전자 DNA (pMD20 vector 내 삽입된 형태) 를 농림축산검역본부로부터 확보함. 해당 O형 바이러스는 한국에서, A형은 이라크에서, Asia1형은 이스라엘에서 분리되었음.
- 구제역 바이러스 혈청형 구분을 위해 혈청형간 차이가 많은 VP1 유전자를 검출 타겟으로 계획하였으나 상대적으로 혈청형 간 차이가 적은 3D 유전자만 확보되어 해당 유전자 내 혈청형간 차이가 많은 부분을 새롭게 찾아냄 (그림 151).
- 그림 151에서 보듯이 빨간 박스로 표시한 부분을 탐침 분자 타겟으로 정하면 구제역 바이러스 혈청형 구분이 가능하고 파란 박스로 표시한 부분을 타겟으로 하면 혈청형에 상관없이 구제역 바이러스 존재 여부를 판별할 수 있을 것임.

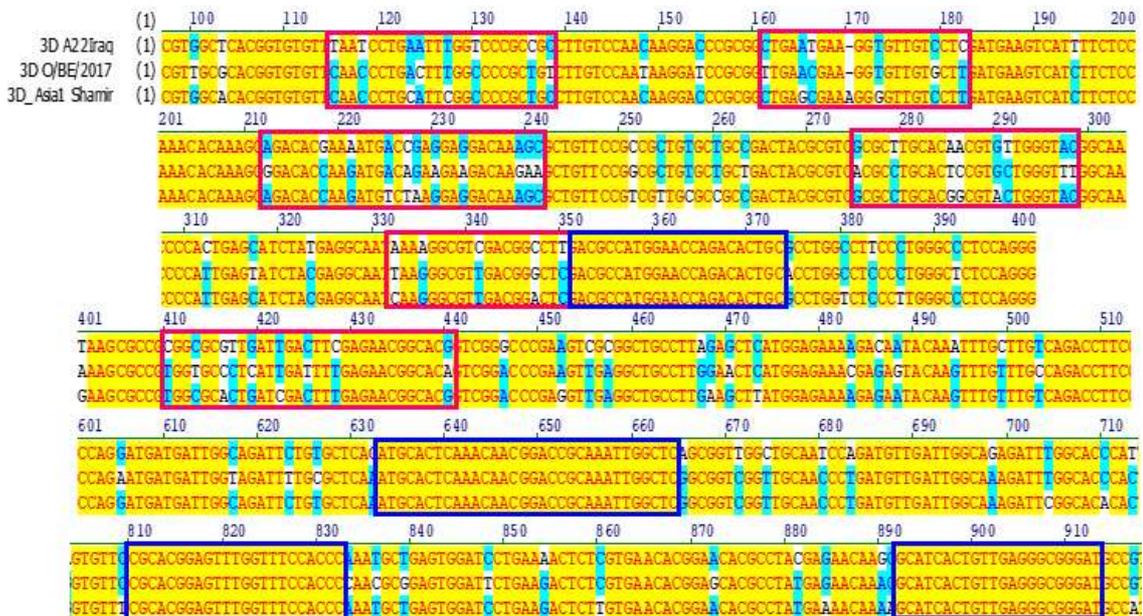


그림 151. 구제역 바이러스 3가지 혈청형 3D 유전자 염기서열 일부.

3가지 혈청형 간 염기서열이 보존된 부분은 파란색 박스로 표시를,

상대적으로 크게 차이가 나는 부분은 빨간색 박스로 표시함.

- 실제 감염 발생했었던 2가지 아형 (H5N8, H9N2)의 조류 인플루엔자 바이러스 HA, NA 유전자 DNA와 해당 염기서열 정보를 건국대 수의대로부터 확보. H5N8의 경우, 병원성을 제거하기 위해 HA 유전자의 일부 염기서열이 치환되었음. H9N2의 경우 PB2 유전자 DNA와 해당 염기서열 정보를 추가로 얻음. H5N8의 HA, NA DNA는 pHW2000 vector에, H9N2의 PB2, HA, NA DNA는 pGEM-T vector에 포함됨.
- 위 두가지 아형간 HA와 NA 유전자 염기서열 차이는 뚜렷함. 아형에 상관없이 조류 인플루엔자 바이러스를 검출하기 위해서는 아형 간 염기서열 차이가 크지 않은 PB2 유전자를 검

출 타겟으로 하는 것이 바람직함. 확보된 H9N2형 바이러스의 PB2 유전자 DNA를 H9N2형, H5N8형 모델 바이러스 유전체에 도입함.

■ 모델 바이러스 생산을 위한 유전체 발현용 벡터 플라스미드 구축

- 모델 바이러스 생산을 위해 계획된 MLV 대신 기능성 입자가 더 많이 만들어지는 유사 레트로바이러스인 Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) 플랫폼을 사용하였음. HIV-1 유전체 발현용 플라스미드 DNA (pFCGW)에 확보된 구제역 및 조류 인플루엔자 바이러스 유전자 DNA를 분자생물학적 방법을 통해 삽입함 (그림 152). HIV-1의 증식을 위한 유전자 전부가 제거된 HIV-1 유전체 플라스미드를 사용하여 실험자 안전을 확보하였음.
- 구축한 유전체 발현용 플라스미드 종류는 총 7개로, 구제역 바이러스 혈청형 세종류 (O, A, Asia1) 모델 바이러스를 위한 3개와 조류 인플루엔자 바이러스 2가지 아형 (H5N8, H9N2) 모델 바이러스를 위한 플라스미드 각 2개씩 총 4개를 설계하고 제작함 (그림 153).
- 유전자 발현 분석으로 생산된 모델 바이러스 입자를 정량하기 위해 모델 바이러스 유전체에 eGFP (녹색 형광 단백질) 유전자를 도입하였음 (그림 152, 153).

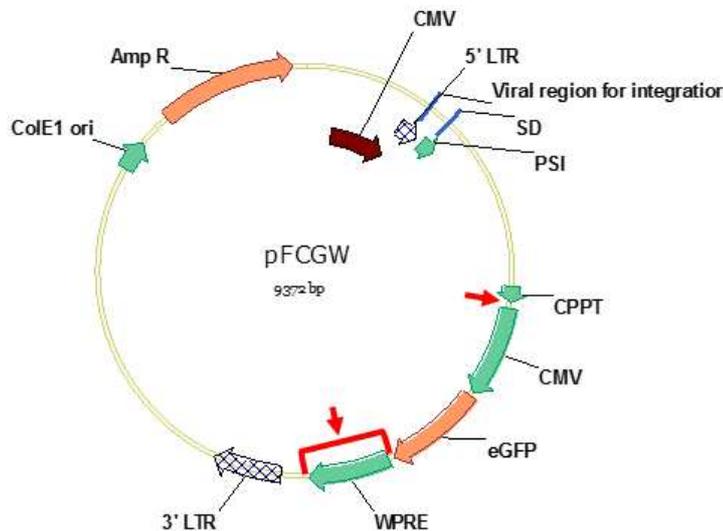


그림 152. 증식 능력이 제거된 HIV-1 유전체 생산을 위한 플라스미드.

cPPT Downstream 위치와 WPRE 위치에

구제역 바이러스 또는 조류 인플루엔자 바이러스 유전자를 삽입함.

생산된 모델바이러스 정량을 위해 eGFP와 이의 발현을 제어할 CMV promoter도 삽입함.

CMV promoter는 최적의 발현 강도를 보이는 promoter로 평가되어 선택하였음.

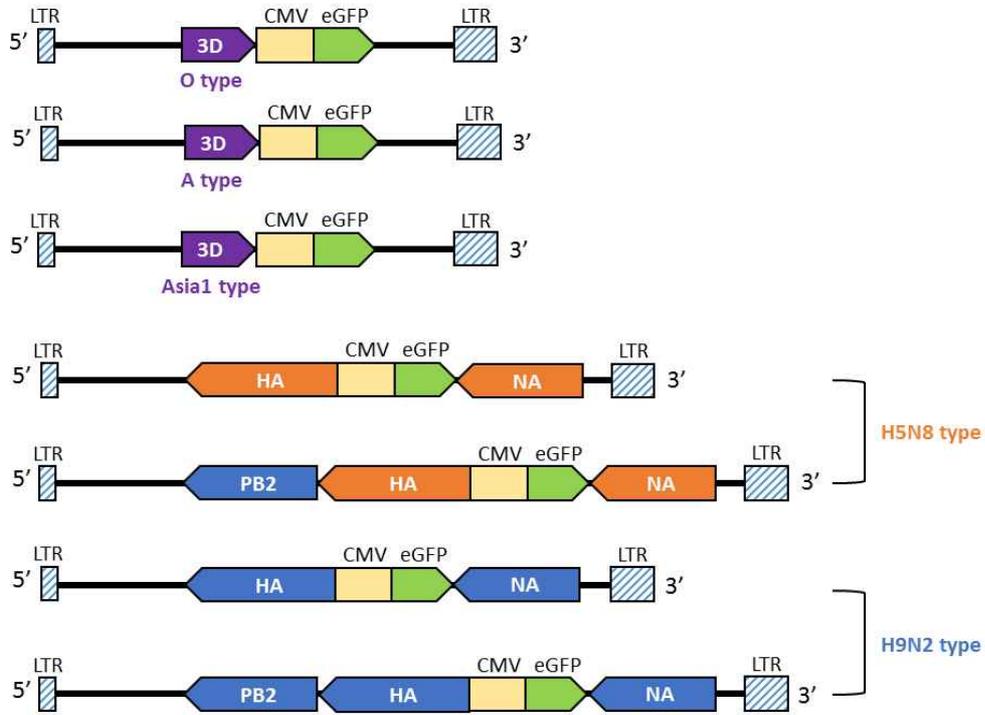


그림 153. 구제역 모델 바이러스 및 조류 인플루엔자 모델 바이러스 유전체 발현용 플라스미드 구조. LTR: Long terminal repeat.

■ 구제역 및 조류 인플루엔자 바이러스 모델 생산.

- 구제역 및 조류 인플루엔자 바이러스 유전자를 포함하는 HIV-1 유전체 발현용 플라스미드와 나머지 바이러스 단백질 발현을 위한 플라스미드를 생산 세포인 HEK293T에 도입함 (그림 154).
- 플라스미드 도입 2-3일 후 세포 배양액으로 방출된 바이러스 입자를 수확하고 초원심분리 과정을 통해 정제/농축함 (그림 154).
- 최종적으로 구제역 바이러스 3가지 혈청형의 모델 바이러스 3종과 조류 인플루엔자 바이러스 2가지 아형의 모델 바이러스 4종을 생산하였음.

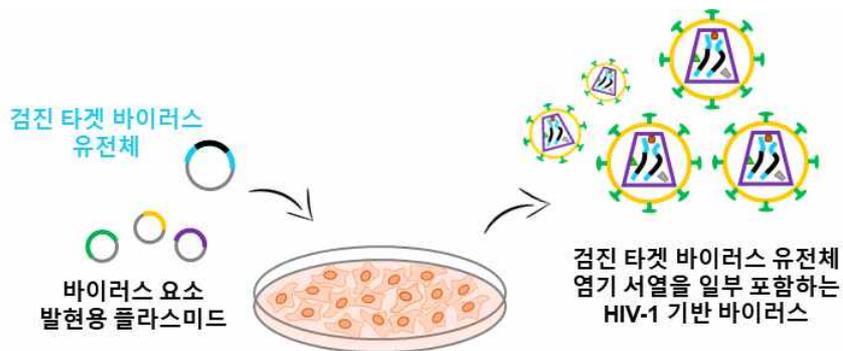


그림 154. 증식 능력이 제거된 검출 실험용 모델 바이러스 제작.

바이러스 입자를 구성하는 유전체, 단백질 요소를 발현할 수 있도록 설계된 플라스미드를 세포에 도입하여 검출 실험에 사용할 바이러스 입자 생산.

■ 생산된 시료내 물리적 바이러스 입자수와 기능적 입자수의 정량.

- 생산된 시료내 구제역 및 조류 인플루엔자 모델 바이러스의 물리적 입자수는 바이러스 입자가 가지는 핵산 정량을 통해 측정함.
- 이를 위해 실시간 중합효소연쇄반응을 적용함 (결과: 표 20).

표 20. 생산된 시료 내 모델 바이러스 물리적 입자수  
(1 $\mu$ L 시료 내 입자 개수로 농도 정의)

Virus particle number / $\mu$ L		
구제역 모델 바이러스	O	3.64E+ 07
	A	7.60E+ 06
	Asia1	2.12E+ 07
조류 인플루엔자 모델 바이러스	H5N8	1.65E+ 07
	PB2H5N8	2.52E+ 07
	H9N2	1.49E+ 07
	PB2H9N2	2.29E+ 07

- 시료내 기능적 모델 바이러스 입자수는, 시료 용액으로 HEK293T 세포를 형질 전환하고 그 결과로 관찰되는 eGFP 발현 세포를 정량하여 분석함 (그림 155).

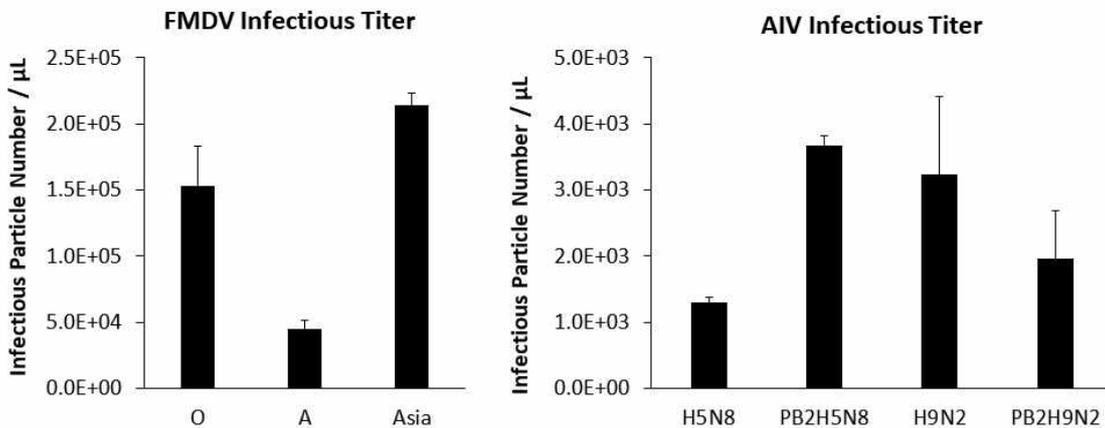


그림 155. 모델 바이러스 시료 내 기능적 바이러스 입자수 정량.

바이러스 입자에 의해 형질 전환된 세포는 녹색 형광 단백질을 발현하고 이를 유세포 분석기를 사용하여 정량, 시료내 기능적 바이러스 입자수를 결정하였음. 농도의 단위는 시료 1  $\mu$ L 내, 감염능이 있는 기능적 바이러스 입자의 수로 나타내었음.

- 물리적 입자수, 기능적 입자수 정량과 바이러스 입자에 의한 세포 형질 전환 확인을 통해 모델 바이러스 입자의 효율적 생산을 검증하였음.
- ④ 모델 바이러스 RNA 유전체 추출 및 검체 안정성 극대화 연구
- RNA 유전체 기반 바이러스 검출 실험 과정에서 바이러스 입자에 포함된 단백질, 지방 성분이 분석 정확도를 감소시킬 수 있음. 이에 검체 시료에 포함된 단백질, 지방 등 분자들을 용제를 적용하여 제거함으로써 바이러스 검체로부터 유전체 RNA만을 추출하였음.

■ 바이러스 입자로부터의 RNA 유전체 추출 효율 비교

- Zymo Research 사의 Quick RNA viral kit를 사용하여 시료로부터 바이러스 RNA를 추출하는 시도를 하였음. HIV-1, influenza A virus 등을 대상으로 RNA 추출을 테스트하였음. DNA/RNA Shield reagent 버퍼로 바이러스 입자의 lysis가 수행되었고 최종적으로 RNA binding을 통해 바이러스 입자 유래 RNA를 확보하였음.
- Zymo Research 사의 Direct-zol RNA kit도 다양한 시료로부터 RNA를 정제할 수 있는 것으로 알려져 있으며 특히, 작은 크기의 RNA까지 정제 가능한 것으로 보임. Trizol solution

(acid-guanidinium-phenol based solution)이 적용되며 시료 내의 단백질과 지질을 파괴하고 결과적으로 바이러스 입자도 분해됨.

- 위 두 가지 kit를 이용하여 바이러스 RNA 유전체를 추출하고 분리 효율을 평가하였음.
- 두가지 kit를 사용하여, 동일 종류, 동일 양 바이러스 시료로부터 바이러스 RNA를 추출했을 때 거의 동일 양의 RNA (약 3 µg)가 얻어짐 (그림 156).
- 두가지 kit로 바이러스 유전체 RNA 추출 후 얻어진 시료 내 기타 잔존 부산물 양을 핵산 순도로 평가하였음. 모든 정제 실험 결과, 높은 RNA purity를 얻었고 (230 nm, 260 nm, 280 nm 파장의 빛에 대한 흡광도로 판단; 260 nm, 280 nm 파장의 빛에 대한 흡광도의 비가 1.8-2.0 범위에 있는 경우 이상적임) 이로부터 단백질, 지방 등의 바이러스 유래 부산물이 거의 없음을 확인하였음 (그림 156).
- 얻어진 RNA가 바이러스 유전체로부터 유래한 것인지 평가하기 위해 M-MuLV 역전사 효소를 이용, 추출한 RNA 시료 2µL로부터 cDNA를 합성함. 합성된 cDNA를 실시간 중합효소연쇄반응을 통해 바이러스 유전체 부분에 붙는 프라이머와 함께 증폭 정량하였음. 두가지 kit로부터 분리된 RNA로부터 얻어진 바이러스 유전체 부분 카피수는 비슷하게 측정되었음 (그림 156).

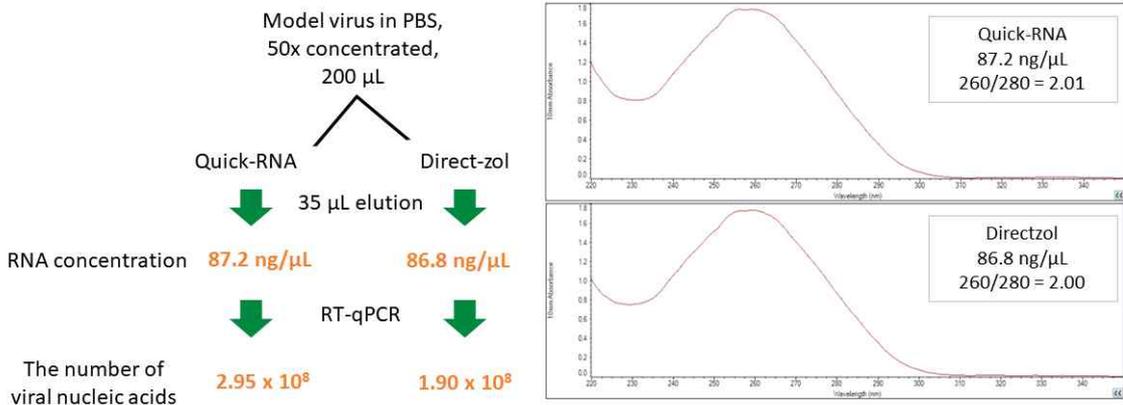


그림 156. 상용 kit를 이용한 바이러스 유전체 RNA 추출 결과.

왼쪽 그림은 전체적인 실험 순서 및 결과를 요약.

두 가지 kit로 바이러스로부터 RNA를 추출하여 RNA 농도를 측정하고 역전사 과정과 실시간 중합효소연쇄반응을 통해 실제 바이러스 유전체 유래 RNA양을 정량함.

오른쪽 그림은 kit 이용하여 바이러스 입자로부터 추출 후 측정된 RNA 순도 분석 결과.

잔존하는 화학 물질 오염 (230nm 파장의 빛에 대한 흡광 특성 있음) 또는 단백질 오염 (280nm 파장의 빛에 흡광이 관찰되는 경우)이 거의 없는 것을 나타내는 빛 흡광 특성 확인하였음.

- 결론적으로 테스트한 두 가지 kit 모두, 사용시 높은 순도의 바이러스 RNA 추출이 가능하였음.

■ 물리적·화학적·생물학적 처리를 통해 바이러스 유전체 RNA 단편화 시도

- 바이러스 유전체 RNA 단편화를 통해 검출 반응 과정에서 탐침 분자와 바이러스 유래 RNA 간의 확산 한계에 의한 검출 반응 제한을 최소화하기 위해 노력하였음.
- 전체 바이러스 유전체 RNA 중 탐침 분자 (molecular beacon)와 상보 관계를 갖는 타겟영역은 약 30 nucleotides 정도로 비율상 작은 부분임. 긴 바이러스 유전체 RNA는 자체 염기 간에 수소 결합을 이루어 2차원, 3차원의 복잡한 구조를 가질 수 있고 이러한 분자 구조는 탐침 분자가 Random motion을 통해 타겟 영역 근처에 가는데 심각한 방해 효과를 줄 수 있음. 바이러스 유전체 RNA가 복잡한 다차원의 구조를 가지지 못하도록 짧게 절편화하는

것이 바이러스 검출 효율을 올리는데 중요하다고 판단함. 이에 2가 양이온 처리 또는 RNase III enzyme 처리를 통해 유전체 RNA 단편화를 시도하였음.

- 먼저, New England Biolabs 사의 Next magnesium RNA fragmentation module을 이용하여 RNA 단편화를 시도하였음. 가이드라인을 따라 바이러스 RNA 260ng에 해당 제품에 포함된 fragmentation buffer를 넣고 94 °C에서 5 분 동안 incubation 하였음 (그림 157).
- 다음으로, RNase III를 이용하여 RNA를 단편화하였음. RNase III는 이중가닥의 RNA를 자르는 효소이지만 sodium ion의 양을 일반 버퍼보다 10 배 낮추면 단일가닥의 RNA도 자르는 것으로 알려져 있음. RNA 260ng에 RNase III 0.7 μL 넣고 37 °C에서 7 분 동안 incubation 함으로써 바이러스 유전체 RNA를 절편화하였음. 위 방식으로 절편화된 RNA는 정제과정을 거친 후 bioanalyzer 2.1을 이용, 길이 분포를 분석하였음 (그림 157).

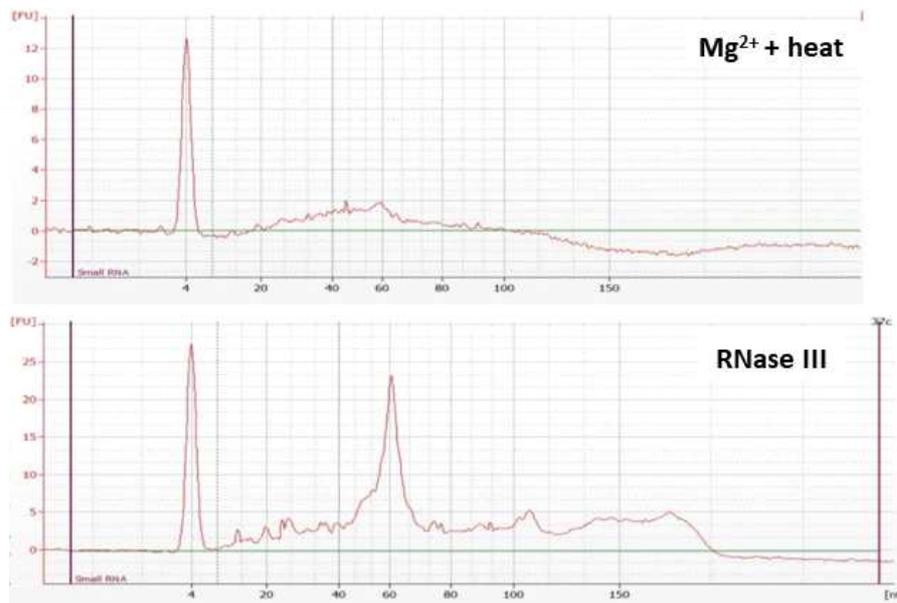


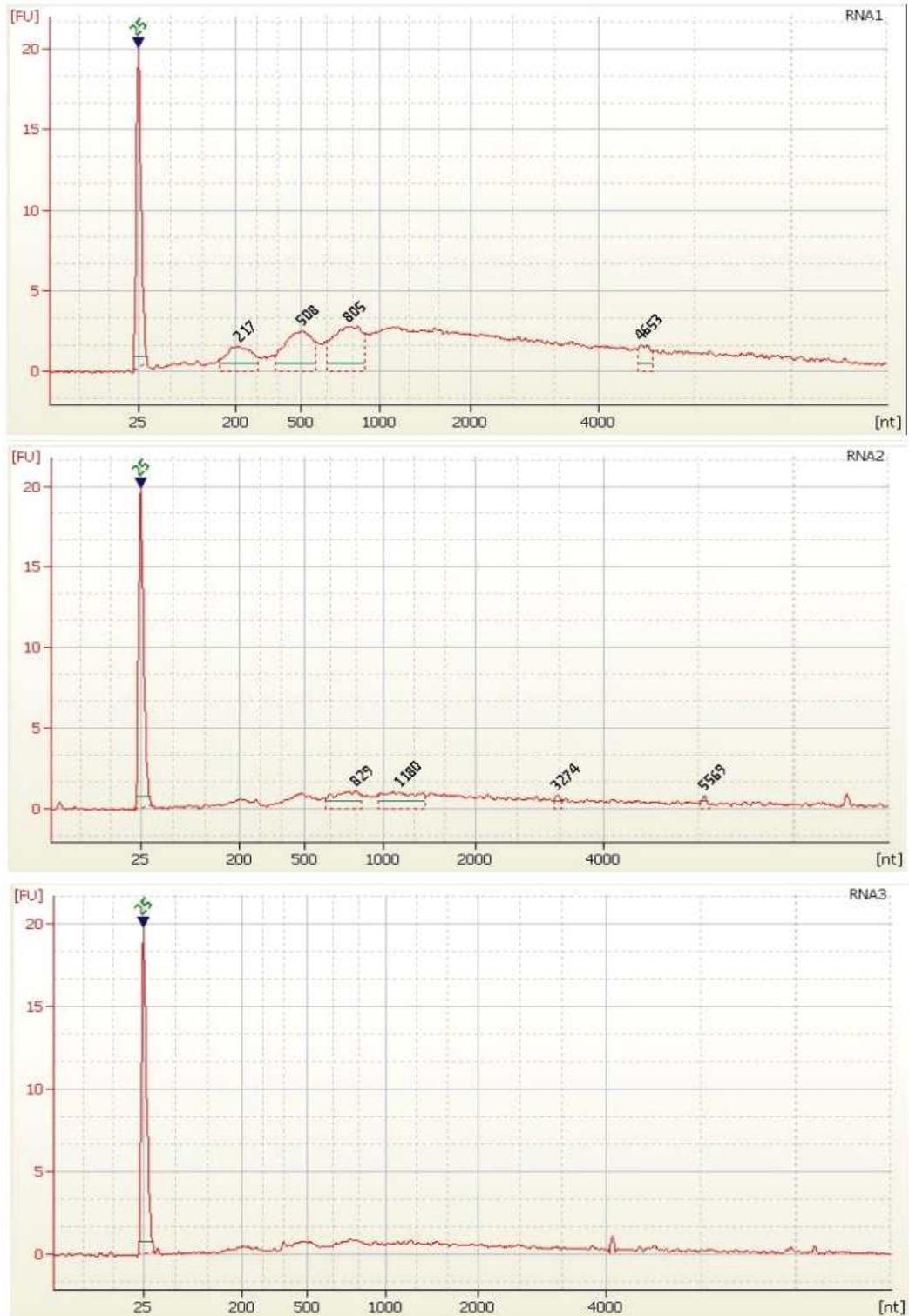
그림 157. Bioanalyzer 2.1을 이용한 바이러스 RNA 길이 분포 분석.

- 결과 Mg<sup>2+</sup>를 이용하여 바이러스 유전체 RNA를 절편했을 때보다 RNase III 효소로 처리했을 때 작은 RNA 분자의 비율이 더 높음을 확인하였음 (그림 157). 특히 60 base 범위의 길이를 가진 RNA 산물이 높은 비율로 확인되었음 (그림 157). 탐침 분자와 상호 작용할 수 있는 바이러스 유전체 부분의 길이가 30 base 정도이므로 바이러스 유전체 RNA 절편은 최소 30 base 이상이 되어야 함.
- 결과적으로 RNase III 효소 처리에 의한 바이러스 RNA 단편화 방식이 검출 반응에 필요한 최소 RNA 절편 길이인 30 base 이상, 2, 3차 구조의 생성이 급격하게 늘어나는 1000 base 이하의 적정 크기의 RNA 조각을 만들어내는데 더 적합하다고 판단하였음.

#### ■ 바이러스 RNA 절편화를 위한 RNase III 효소 반응 최적화

- 바이러스에서 유전체 RNA를 추출한 후 크기를 확인하고 RNase III를 처리했을 때 어느 정도 크기로 단편화되는지 비교하였음. 위에서와 마찬가지로 먼저 bioanalyzer 2.1을 이용하여 RNA 길이를 분석하였으나, 얻어진 RNA 양이 너무 적어 신뢰할 수준의 분석 결과를 얻지 못하였음 (그림 158). 따라서 더 낮은 농도의 RNA 길이를 분석할 수 있는 Tapestation 장비를 이용하여 RNA 길이 분석을 진행함.
- RNA 길이 분포 분석 결과, 바이러스에서 RNA를 추출하는 과정에서도 RNA가 일부 조각 날 수 있음을 확인함. 해당 실험에서 사용한 조류 인플루엔자 바이러스 모델의 유전체 길이는 8.6 kb인데, 바이러스에서 RNA를 추출하여 길이 분석한 결과를 보면 추출 후 대부분의 RNA 길이가 6 kb 이하였음 (그림 159, RNA1).
- RNA 2번 샘플은 바이러스 유전체 RNA 2 μg 당 RNase III 0.5 μL로 처리하였고, 3번 샘플

은 2 $\mu$ L로 처리했는데 처리 후 두 샘플의 RNA 분자 길이 분포상 차이가 크지 않았음. 두 샘플 모두 RNase III 처리는 37 °C에서 12 분 동안 incubation 하였음. 또한, 필요한 수준 만큼 RNA의 절편화가 이뤄지지 않아 큰 조각 (수천 base 길이)들이 많이 관찰되었음. 바이러스 RNA의 양이 효소의 양에 비해 너무 많아서 이런 결과를 얻은 것으로 추정하여 바이러스 RNA 양을 20 배 낮춰 RNase III 처리를 수행하고 결과로 얻은 샘플 내 RNA 길이를 분석하였음 (그림 160).



BioAnalyzer RNA nano chip  
(Fig.1>Chip picture sample:1ul)

그림 158. Bioanalyzer 2.1을 이용한 모델 인플루엔자 바이러스 RNA 길이 분포 분석. RNA1은 바이러스에서 추출한 RNA 샘플, RNA2는 바이러스 RNA 2  $\mu$ g을 RNase III 0.5  $\mu$ L로 처리한 샘플, RNA3는 바이러스 RNA 2  $\mu$ g을 RNase III 2  $\mu$ L로 처리한 샘플임.

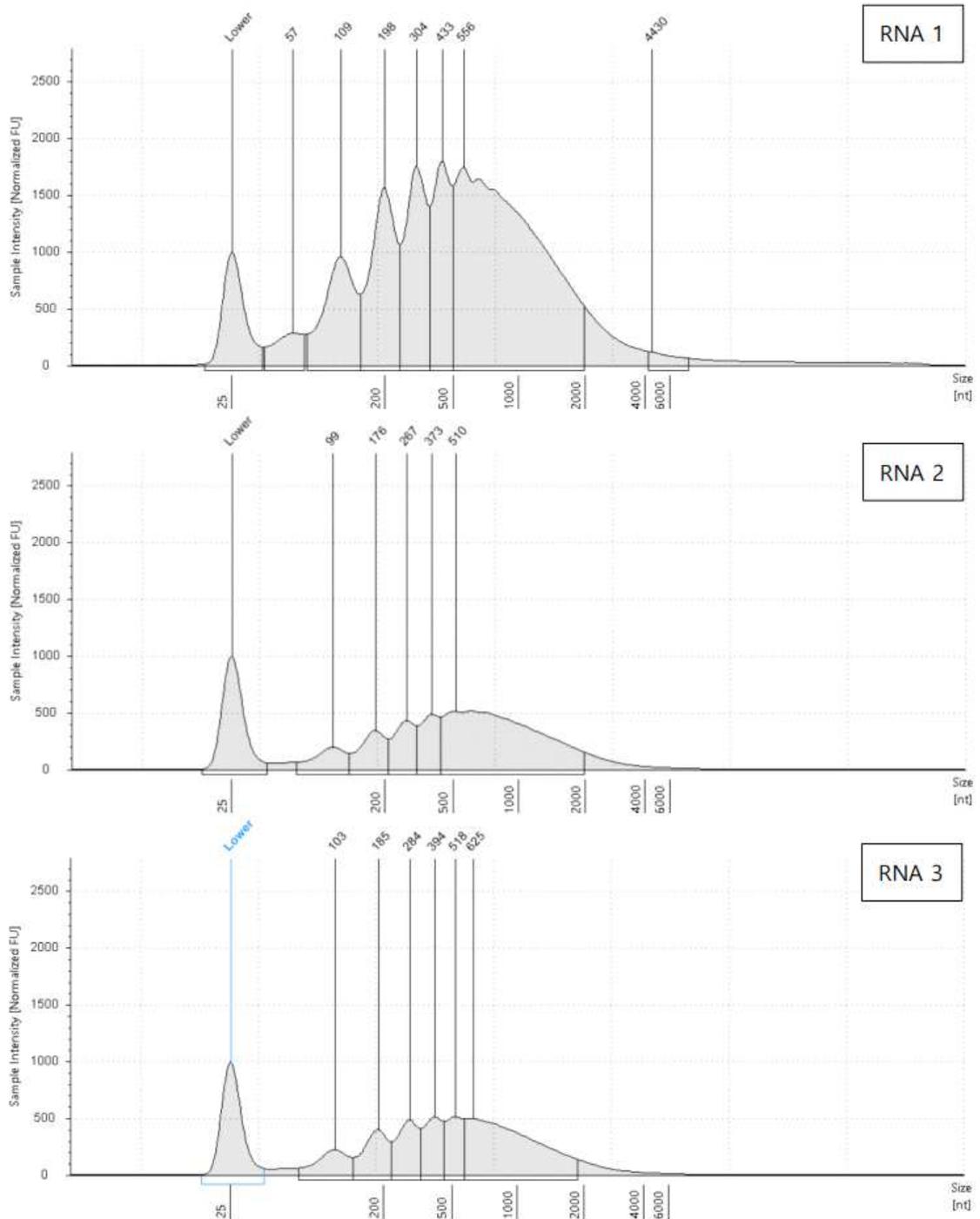


그림 159. Tapestation을 이용한 바이러스 RNA 길이 분포 분석 결과.

RNA1은 바이러스에서 추출한 RNA, RNA2는 바이러스 RNA 2  $\mu\text{g}$ 을 RNase III 0.5  $\mu\text{L}$ 로 처리한 샘플, RNA3는 바이러스 RNA 2  $\mu\text{g}$ 을 RNase III 2  $\mu\text{L}$ 로 처리한 샘플임.

- 바이러스 유전체 RNA 양은 20 배 낮추고, RNase III 양은 4 배 낮추어 절편화 반응을 수행하였고 얻은 반응물 내 RNA 길이를 Tapestation을 이용하여 분석하였음. 전체적으로 앞의 조건에서 얻은 결과 대비 더 작은 바이러스 RNA 조각 분포가 확인되었음 (그림 160). 그림 160에서 보여지듯이, 20 배 적은 바이러스 유전체 RNA를 RNase III로 처리한 경우 절편화 정도가 상당히 향상되었음. 더 많은 바이러스 유전체 RNA 처리 경우에서 관찰되었던 2000 base 이상 길이의 RNA 산물의 양 (그림 159)이 상당히 줄어들었음.

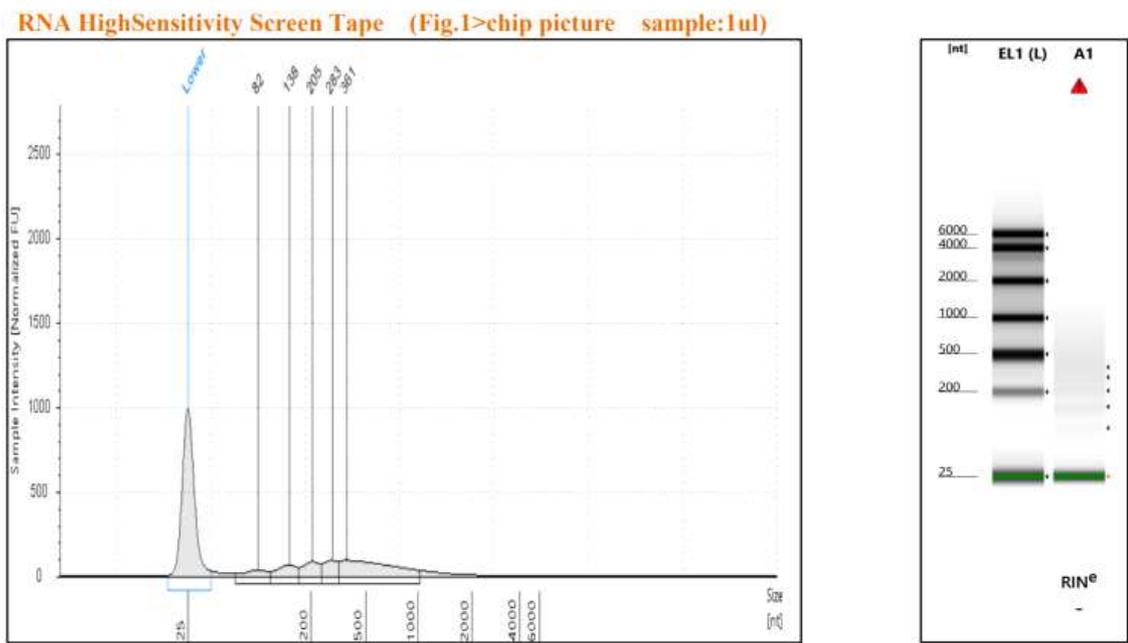


그림 160. 더 적은 양의 바이러스 유전체 RNA를 RNase III로 처리하고 Tapestation을 이용하여 RNA 산물의 길이 분포를 분석함. 바이러스 RNA 100 ng을 RNase III 0.5 µL로 처리한 결과로, 그림 159에 해당하는 조건에서처럼 많은 양의 바이러스 유전체 RNA 처리 경우에 비해 더 작게 조각난 RNA 산물이 확인되었음.

⑤ 실제 검지 상황 모사를 위한 야생 바이러스 생산

■ 야생 바이러스 생산 방법 구축

- 모델 바이러스 적용 실험을 통해 얻은 최적화된 탐침 분자와 검출 조건을 실제 바이러스에 검출에 적용하기 위해 야생 바이러스 (wild type virus)가 필요함.
- T7 프로모터로 바이러스 유전체 서열의 전사를 유도할 수 있는 플라스미드와 바이러스 입자 형성에 필요한 단백질 발현용 플라스미드들을 함께 생산 세포에 도입하면 바이러스 유전체 RNA와 단백질이 생성되고 이들의 자기조립을 거쳐 바이러스 입자가 만들어질 수 있음 (그림 161).
- 구제역 바이러스의 경우 허가된 극소수의 연구기관에서만 바이러스를 생산하고 관련 실험을 수행할 수 있음. 본 연구에서 충분한 민감도와 정확도를 가지는 바이러스 검출시스템이 구축되는 시점에 검출 실험을 진행할 수 있도록 농림축산검역본부 해당 부서에 협조를 요청하였음.
- 야생 인플루엔자 바이러스의 경우, 분절된 RNA 유전체를 각각 발현할 수 있는 8종의 플라스미드 및 바이러스 단백질 생산용 플라스미드 시스템을 세포에 도입함으로써 야생 바이러스를 생산하고자 하였음 (그림 162).

### 야생 구제역 바이러스 생산을 위한 유전체 cDNA



### 세포를 이용한 야생 구제역 바이러스 생산 과정

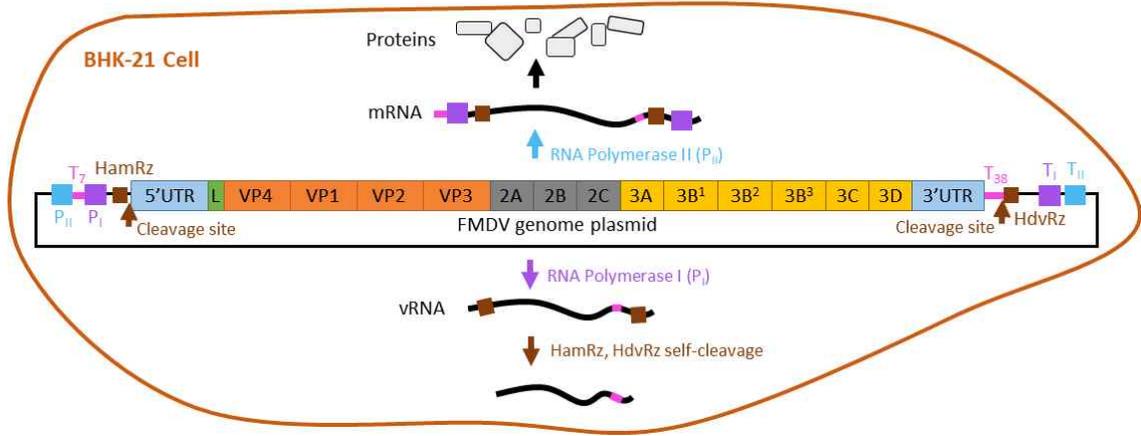


그림 161. 역유전학 기법을 이용한 야생 구제역 바이러스 생산. 모델 바이러스와 달리 복제 능력을 포함하고 있기 때문에 실제 바이러스와 동일하며, 해당 바이러스를 이용하여 실제 검지 상황을 모사한 실험 및 최적화 연구를 진행할 수 있음.

### 세포를 이용한 야생 조류 인플루엔자 바이러스 생산 과정

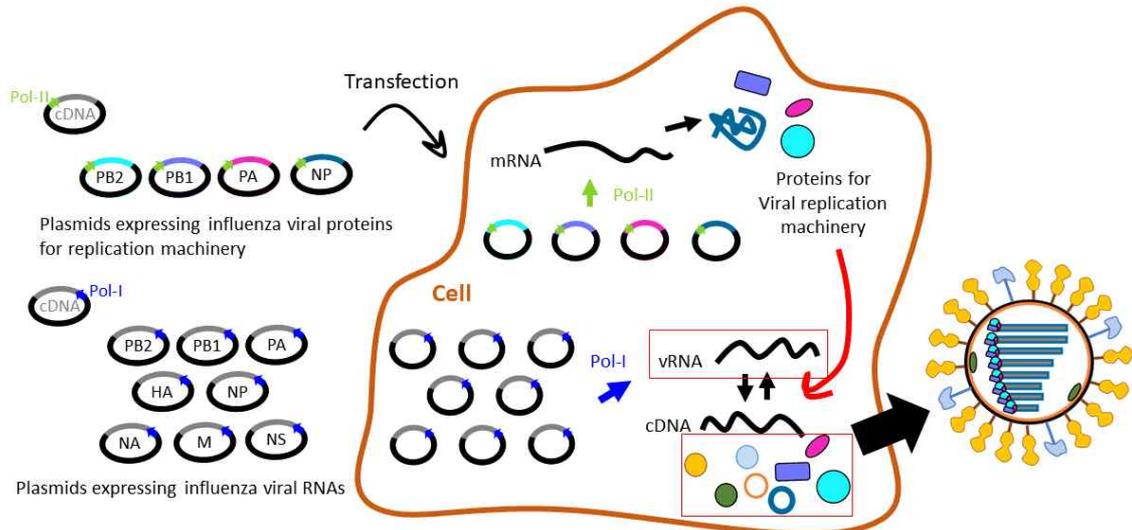


그림 162. 역유전학 기법을 이용한 야생 인플루엔자 바이러스 생산. 모델 바이러스와 달리 복제 능력을 포함하고 있기 때문에 실제 바이러스와 동일하며, 해당 바이러스를 이용하여 실제 검지 상황을 모사한 실험 및 최적화 연구를 진행할 수 있음.

#### ■ 야생 바이러스 생산

- 증식 능력을 가진 야생 구제역 바이러스와 병원성을 가지는 야생 조류 인플루엔자 바이러스의 경우, 감염 발생을 방지하기 위하여 BSL3 이상 수준의 특별한 시설에서만 바이러스를 다

를 수 있음. 앞서 언급한 바와 같이 개발하고 있는 검출 시스템이 충분한 성능을 보이게 될 때, 관련 시설과 바이러스를 가지고 있는 건국대 수의대, 농림축산검역본부와 협업을 통해 검출 테스트를 할 계획임.

- BSL2 시설에서 실험이 가능하며 조류 인플루엔자 바이러스와 매우 유사한 유전체 구조와 서열을 가지는 야생 인간 인플루엔자 바이러스를 생산, 검출 실험에 적용하였음. 숙명여대 연구실은 정부로부터 허가 받은 BSL2 실험 시설을 보유하고 있음. 야생 인간 인플루엔자 바이러스는 앞서 설명한 역유전학 방법으로 생산이 가능함. 인플루엔자 바이러스 연구를 선도하고 있는 가와오카 그룹으로부터 인플루엔자 바이러스 유전체 및 단백질을 발현시킬 수 있는 플라스미드를 공여 받아, 플라스미드 도입 비율 최적화 과정을 거친 후 바이러스 입자 생산에 적용하였음.
- 그림 162에 나타난 방식에 따라, 인플루엔자 바이러스 유전체 및 단백질 발현을 위한 총 12-13가지 플라스미드를 세포에 동시 도입하여 바이러스를 생산하였음.
- 바이러스 생산 여부를 검증하기 위해 세포 감염을 통한 바이러스 유래 세포 사멸 현상을 확인하였음. 이와 함께 바이러스 입자로부터의 유전체 RNA를 cDNA로 전환한 후 중합효소연쇄반응을 통해 정량하여 바이러스 생산 여부를 추가 확인하였음 (그림 163).

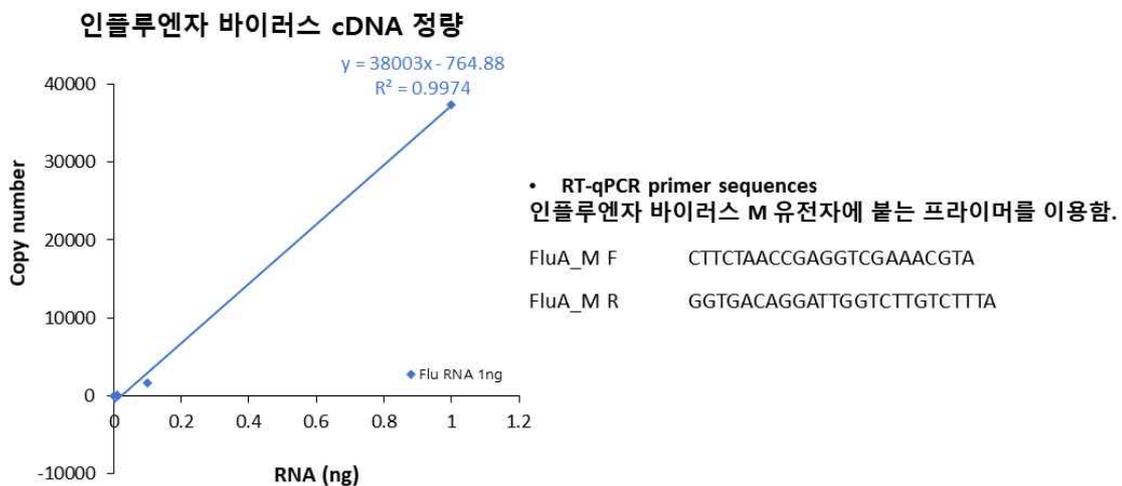


그림 163. 역전사 반응 및 실시간 중합효소연쇄반응을 이용한 바이러스 유전체 RNA 정량.

- 바이러스의 M 유전자와 상보 관계에 있는 프라이머를 이용하여 바이러스 유전체 RNA의 cDNA를 대상으로 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하였음. 상당한 수준에서 인플루엔자 바이러스 특이적 프라이머에 의한 핵산 증폭이 관찰되었음. 이 결과는 야생 인간 인플루엔자 바이러스가 생산되었음을 나타냄. 야생 바이러스 입자로부터 추출로 얻어진 RNA 1ng 당 38,000개의 유전체 cDNA가 생성되었음.

#### ⑥ 야생 바이러스 RNA 유전체 추출 기술 개발

##### ■ 야생 바이러스 RNA 유전체 추출

- 역전사유전학 기법을 적용하여 생산한 인간 인플루엔자 바이러스 입자로부터 RNA 유전체를 위에서 언급한 상용화 kit로 분리하였음.
- 분리한 RNA 유전체를 RNase III 처리를 통해 절편화하여 검출 .
- 가축이 구제역 바이러스에 감염되었는지 진단할 때 주로 사용되는 시료로 타액, 수포, 조직, 혈액 등이 있음. 위에서 언급한대로, 구제역 바이러스에 감염된 시료는 법적으로 허가 받은 극소수 연구시설에서만 다룰 수 있음. 혈액을 포함한 이와 같은 시료로부터 얻은 구제역 바이러스 입자에서 RNA 유전체를 추출할 수 있는지 모사하기 위해 인간 혈액에 존재하는 HIV-1 (인간면역결핍 바이러스)로부터 RNA 유전체를 추출하였음 (그림 164).
- 해당 바이러스 유전체는 아산병원 IRB 허가 과정을 거쳐 확보한 시료임.

- 기존에 사용했던 상용 kit (Zymo Research 사의 Direct-zol RNA miniprep kit)를 이용하여 1mL의 혈액 시료로부터 바이러스 유래 RNA를 추출하였으며, 높은 순도를 확인하였음. 추출하는 과정에서 DNase I을 처리함으로써 오염물질로 작용할 수 있는 혈액세포의 DNA들을 제거함.
- 분리된 RNA에 바이러스 RNA가 존재함을 역전사 반응과 실시간 중합효소연쇄반응을 통해 확인하였음.

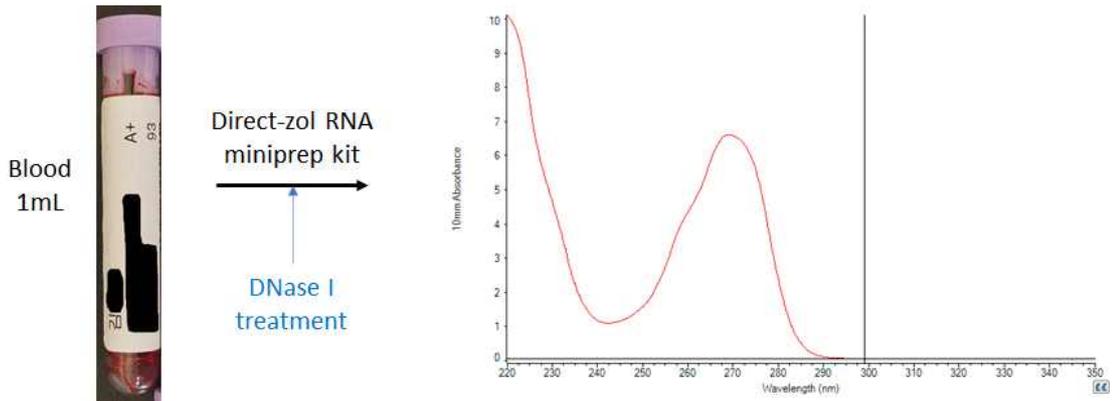


그림 164. 혈액 시료로부터 바이러스 유전체 RNA 추출 결과.

상용 kit를 이용하여 혈액에서 바이러스 유래 RNA를 추출하여, RNA 농도 및 순도를 측정하고 역전사 과정과 실시간 중합효소연쇄반응을 통해 실제 바이러스 유래 RNA 양을 정량함.

오른쪽 그림은 kit 이용하여 RNA 추출 후 측정한 RNA 순도 분석 결과.

잔존하는 화학 물질 또는 단백질 오염이 거의 없음을 나타내는 흡광도 결과를 얻음.

- 유사하게, 역전사 방법으로 생산한 인간 인플루엔자 바이러스 입자로부터 바이러스 RNA 유전체를 추출하여 검출 실험에 적용하였음.

■ 검출 시스템 성능 최종 검증 수 실제 바이러스 추가 검출 테스트

- 증식 능력이 있는 야생 바이러스의 경우 감염 발생 및 확대 우려로 허가 받은 BSL3 수준의 시설에서 검출 실험이 가능함. 이에 현재 진행되고 있는 검출 시스템 성능 검증이 완료되는 시점에 건국대 수의대, 농림축산검역본부 소속 관련 시설을 보유하고 있는 연구팀과 검출 시험 협업을 추진하고자 함.

- 제 2 협동 연구기관(팜스웰메디컬)

① 종이기반 lateral Flow kit에의 검지기 형광 검출 알고리즘 설계

■ 협동기관에서 1차 지정한 파장대를 기준으로 내부 광학 검출 알고리즘을 구축

- 형광 분석 방법은 한 개 내지는 두 개의 광원을 사용할 경우에는 시료의 경우에는 시료 install한 뒤에 시료에 light source를 scanning 하고, 이 light source를 ON 한 후 20microsecond에 한 번 더 측정함.
- (T1) 두 가지 측정을 통해서 빠른 시간 내 측정 한 후 두 번 측정 한 후 (T2)을 이 두 가지를 ratio metric fluorescence (율계량형광)방법으로 계산 한 후 결과 값을 표시 하도록 함.

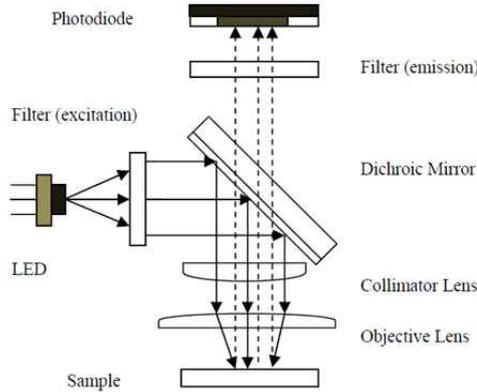


그림 165. 형광 검출기 기본 구조

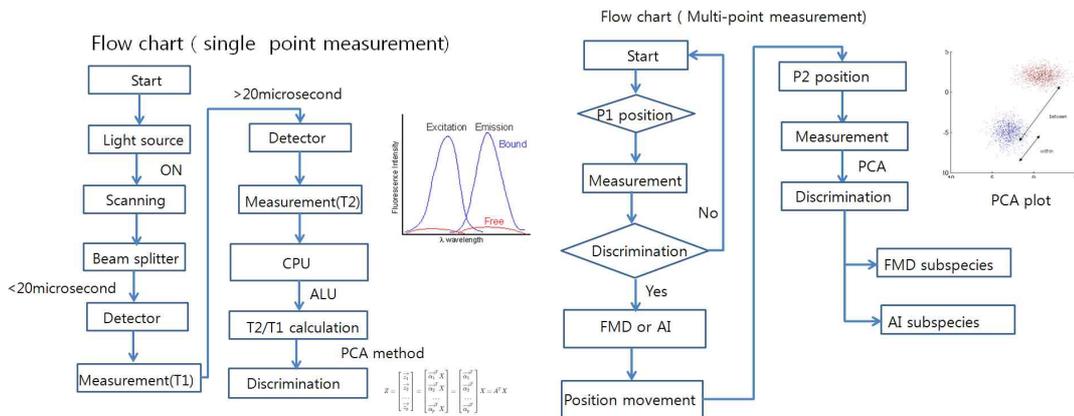


그림 166. 측정 체계도

- 형광 분석기는 구제역과 AI가 있는 sheet를 측정하는 데 있어 1차 (P1 지점)에서는 구제역 과 AI 두 가지 중 하나를 판별하고, 구제역과 AI를 판별한 후 2차 (P2지점)에서는 구제역 종 과 AI종에 세부적인 아종을 판별 하는 방식을 측정함
- 이때 판별 방법을 형광 데이터를 가지고 주성분 분석 기법인 PCA 기법을 사용하여 판별 하 게 되는 데 기존의 신호 분석 기법에 비해 측정 정확도를 높여주는 방식으로 처리함

② 의료기기 등록을 위한 절차 관련 적용한 체계도 작성 및 설계

■ 현행 동물용의료기기 및 동물용체외진단시약의 인허가를 위한 기술문서 및 심사자료의 기준들을 검토 및 단계별 실행계획 수립

- 현행 동물용의료기기 및 동물용체외진단시약의 인허가를 위한 기술문서 및 심사자료의 기준들을 검토하여 향후 사업화 단계에서 체계적으로 대응하기 위한 전략을 수립하는 것이 필요하며 이러한 목표를 기준으로 아래와 같이 단계별 체계도를 작성함
- 관련법령은 아래와 같음.

가. 동물용의료기기 기준규역 농림축산검역본부 고시 2018-12호

나. 동물용의료기기의 범위 및 지정에 관한 규정 2017-85호

다. 동물용 체외진단시약의 선능 및 안전서시험 가이드라인 2019.1월

- 위 근거들을 기준으로 본 과제에서 수행할 진단장비의 경우 진단시약의 범위와 성능, 안전성 시험 등에 사업화 과정에서 적용 되어야 하기 때문에 연구 단계별 준비 작업을 진행하여야 함
- 장비기준 : 동물용의료기기의 범위 및 등급분류에 의해서 신설된 코드 분류에 적용되며 본 과제의 장비는 3등급에 해당함

현행 (대분류/중분류/소분류)	개정안 (대분류/중분류/소분류)
1. 동물의료용 기구·기계(대분류) - 동물의료용 진료대와 수술대(중분류) - 범용수동식진료대(소분류:품목명) ↓	1. 동물의료용 기구·기계(LA) - 동물의료용 진료대와 수술대(LA10) - 범용수동식진료대(LA1000100) ↓
2. 동물의료용품(대분류) - 동물의료용 정형용품(중분류) - 골접합용판(소분류:품목명) ↓	2. 동물의료용품(LB) - 동물의료용 정형용품(LB12) - 골접합용판(LB1200100) ↓
3. 동물용체외진단용시약(대분류) - 동물혈액검사용시약(중분류) - 혈구검사시약(소분류:품목명) ↓	3. 동물용체외진단용시약(LC) - 동물혈액검사용시약(LC01) - 혈구검사시약(LC0100100) ↓
4. 동물전용의료기기(대분류) - 동물산과용 기구 및 기계(중분류) - 발정탐지기(소분류:품목명) ↓	4. 동물전용의료기기(LD) - 동물산과용 기구 및 기계(LD01) - 발정탐지기(LD0100100) ↓

- LA2803900 : 형광분광기 [1] Fluorometer, for clinical use 서로 다른 파장을 물질에 투사하여 그 형광도에 따라 정량 분석하는 장치임
- 체외진단시약의 기준 : 분자유전 검사용 시약은 아래의 분류 코드에 준함
- 분자유전 검사용 시약 IVD reagents for molecular genetics for veterinary use
- LC0600500 : 고위험성동물전염병유전검사용시약 [3] IVD reagents of molecular genetics for legally designated infectious pathogens by OIE. 동물의 전염성 질병의 진단을 위하여 감염원 등의 유전자를 검출하는데 사용되는 시약임
- 이외에 완제품의 경우 시약과 함께 sheet과 장비로 인허가를 추진하여야 하는 관계로 단계별로 추진전략을 수립하여야 함
- 위의 정부 인허가 관련 해당 자료에 근거하여 단계별 실행계획서를 도출함

③ 소형 형광 검지기 설계를 위한 소자 선정 및 검출 모듈 성능 테스트

■ 1차 설계된 optic 디자인을 table에 장착하여 부품별 성능 및 기초 데이터를 수집

- 빛의 흡수에 의해 여기상태에 도달한 분자는 에너지를 잃어 다시 안정된 기저상태로 돌아감
- 이 에너지 변환의 과정은 분자의 충돌 등에 의해 열로 에너지를 방출하는 무방사 전이 또는 분자간 에너지 이동에 의하는 것이 일반적임
- 그러나 어떤 일정한 구조를 갖는 분자에 있어서는 에너지를 다시 빛으로 방출하는 방사 과정을 갖는 것이 있음
- 이러한 전이들이 같은 다중도 사이에서 일어나는 경우, 이 분자들을 형광 물질이라 하고 방출되는 빛을 형광이라고 함
- 형광은 동일한 다중도 사이의 전자 전이이므로 허용 전이에서의 확률도 크고 그 방사 과정은 신속함
- 흡수한 빛에너지는 방사변환 시 진동 에너지로서 일부 손실되므로 형광의 파장은 일반적으로

- 로 흡수한 빛 (여기광)보다도 장파장 쪽으로 이행하는 일이 대부분임
- 형광분석에서는 분석하고자 하는 성분 자체가 형광성이거나 적당한 형광시약을 반응시켜 형광물질로 바꿀 필요가 있음
  - 형광물질로는 공역 이중결합을 다수 갖고 있는 평면 분자가 많고 반대로 형광물질과의 상호 작용에 의해 그 형광 강도를 크게 감소시키는 물질이 있는데 그것을 소광 (消光)분자라 지칭함

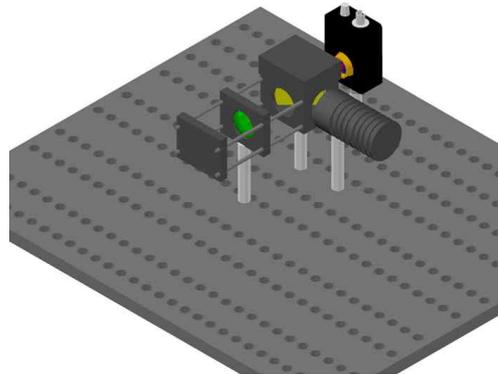


그림 167. 형광 광 기본 구조

- 먼저 광원(light source)으로 부터 나온 광선(beam)이 광선 분할기(beam splitter)에 의해 반사되어 광선이 대물렌즈(objective lens)를 향함
- 대물렌즈를 통과한 광선은 시료에 있는 초점면(focal plane)에 멎히게 되며 초점면에 멎힌 광선은 시료의 특성에 따라 반사, 투과 혹은 굴절을 하게 됨
- 이러한 광학 현상에 의해 초점면이 아닌 다른 위치에서도 광선이 나오게 됨
- 시료상에서 반사되는 광선들은 다시 광선 분할기를 통과하여 검출기(detector) 방향으로 가도록 구성함

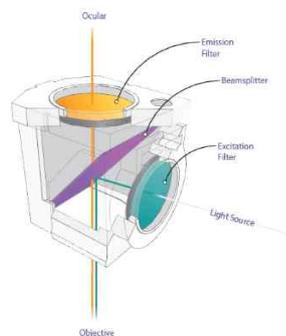


그림 168. 형광 검출기 기본 구조 및 원리

- Excitation filter : 광원(Light source)에서 발생하는 빛에서 샘플을 자극하고자 하는 파장대역의 빛(光) 만을 투과함
- Dichroic Mirror : Beam splitter라고도 불리며, Excitation filter를 투과한 빛을 반사시키고, 자극광에 의해 샘플에서 발현된 형광을 투과시키는 역할을 함
- Emission filter : Dichroic mirror는 자극광을 100% 반사시키지 못하기 때문에 자극광 중에서 일부는 mirror를 투과하게 됨. 이러한 자극광을 한번 더 차단하고, 관찰자가 보고 싶어하는 파장 대역(형광)만을 투과시키는 역할을 함

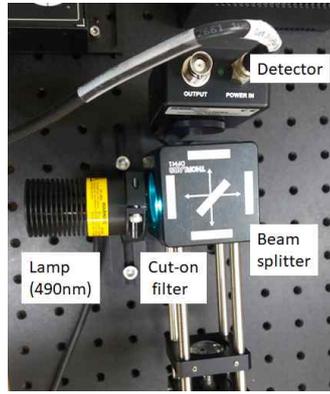


그림 169. 형광 검출기 기본 설계

- 사용된 부품의 사양은 아래와 같음.

M490L4 - 490 nm, 205 mW (Min) Mounted LED, 350 mA

MINTL5 - 554 nm, 650 mW (Min) Mounted LED, 1225 mA

Dichroic Mirror housing

Dichroic Mirror - GFP Dichroic Filter, Refl. Band = 452-490 nm, Trans. Band = 505-800 nm

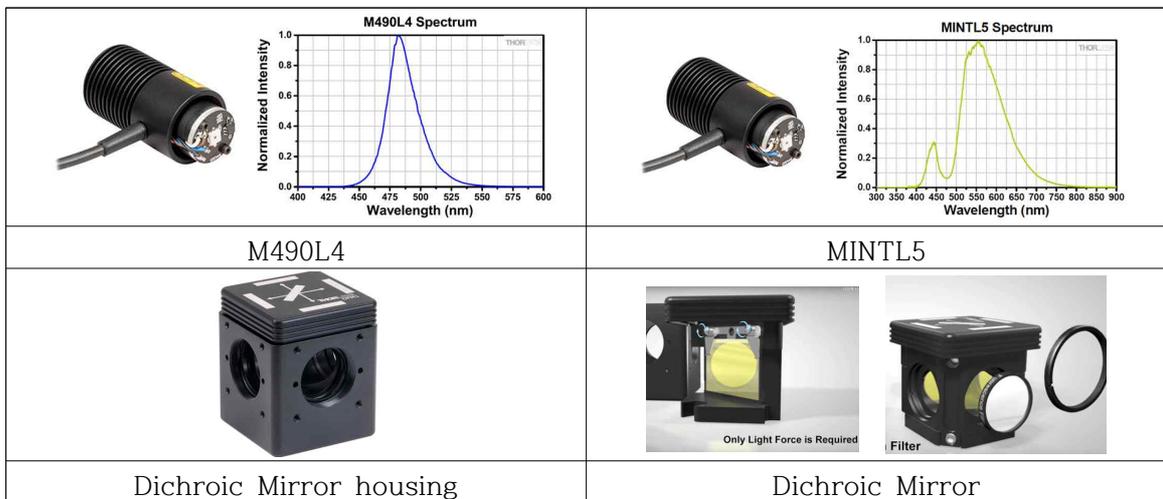


그림 170. 형광 검출기 사용 부품

- Spectrometer를 이용한 기초 테스트를 진행하기 위해 광파이버를 활용하여 형광 신호를 확인함

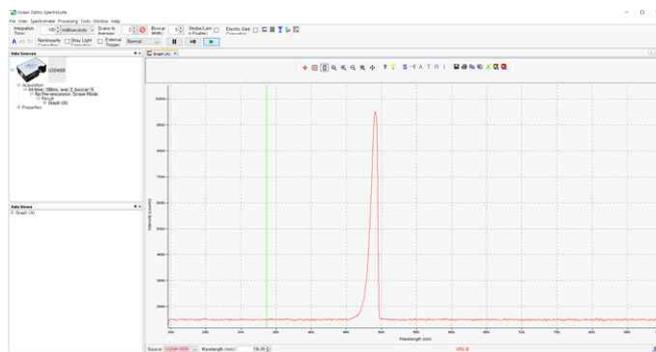


그림 171. Light source에서 Beam splitter를 지나서 광 경로에서 측정된 스펙트럼

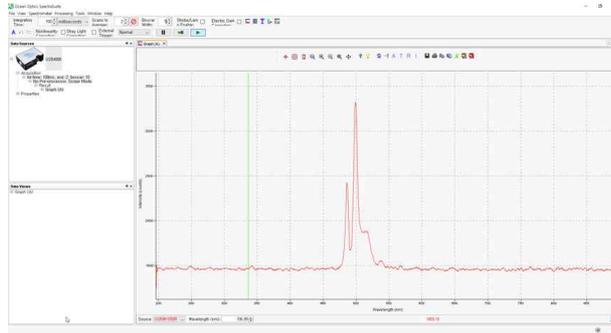


그림 172. Beam splitter를 지나 detector 부분의 광 경로에서 측정된 스펙트럼

- 결과에서 light source 반사 신호를 감소하는 것으로 볼 수 있다. 감소된 신호는 10,000 counts에서 필터를 통과하면서 3,500 counts 로 감소하여 형광 신호를 볼 수 있는 기본 광 구조를 확인 할 수 있음

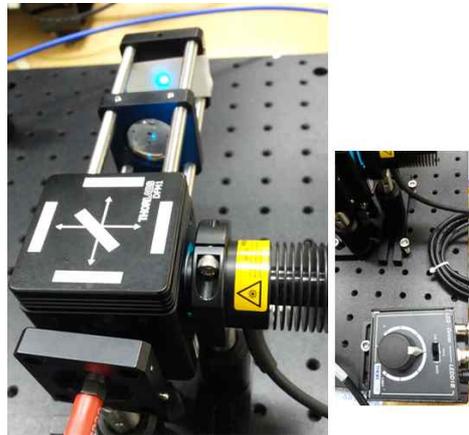


그림 173. 종이 형광 측정을 위한 실험 구성

- Lateral flow sheet 기반이 되는 재료인 종이에 반사 및 형광 피크 영향을 현재 광 구조를 통해 개선 사항 파악을 위한 테스트 진행함
- 주로 현재 광 구조상으로는 형광 세기가 영향을 주기 보다는 반사 신호가 더 큰 영향을 주는 것으로 확인됨. 이 반사와 형광 신호를 혼합해서 보기 때문에 현재의 결과는 A4이 종지와 Glass fiber sheet가 유사한 결과를 확인함

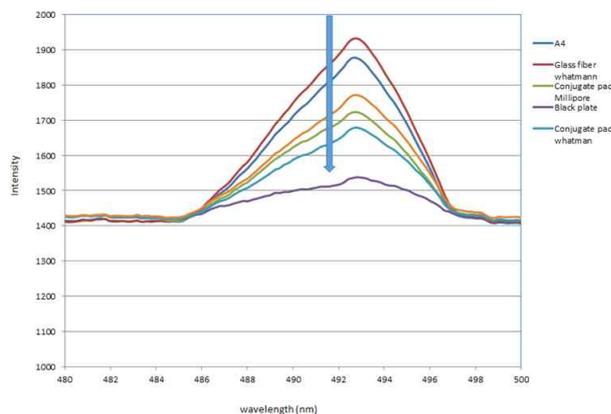


그림 174. 종이 형광 측정 결과

- 향후에는 excitation filter와 emission filter가 서로 중첩되지 않도록 한뒤에 측정할 수 있도록 할 예정이고, 특히 형광체가 excitation 파장과 emission 파장이 가까울수록 반사신호도

영향을 주기 때문에 형광체의 결정에도 중요한 변수 중 하나라고 볼 수 있음

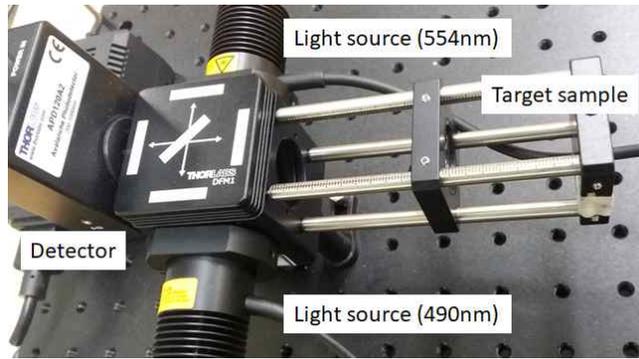


그림 175. 3차 광 구조 셋팅

- 3차 광 구조는 광원 두 가지를 사용하여 동시에 분석이 가능하도록 광 구조를 추가 진행 하였으며, 광원을 두 가지를 셋팅함
- 검출기 부분은 다 중 검출 방식으로 향후에 채택하도록 하고, 현재에는 하나의 검출기로 단계적으로 측정할 수 있도록 시간 차 측정 방법을 채택하는 광 구조로 구성함

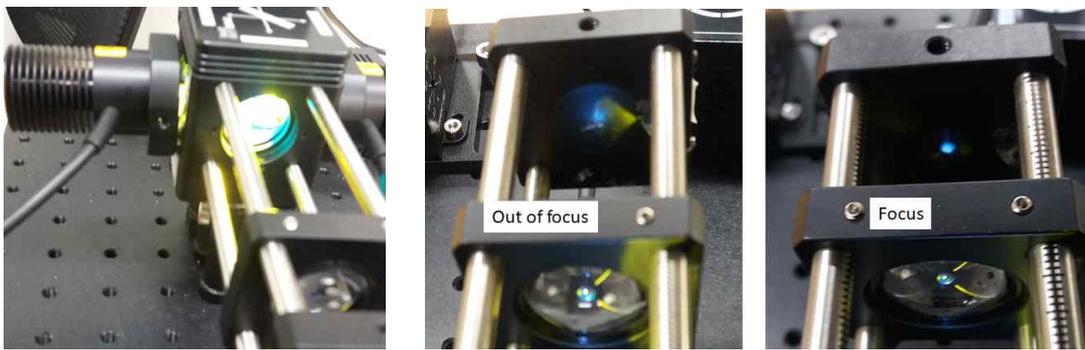


그림 176. 3차 광 구조 테스트 결과

- Beam splitter을 이용한 두 가지 light source가 동시에 출력이 되는 것으로 확인됨
- 초점이 맞지 않으면 두 가지 파장 대역이 따로 구성 되지만 렌즈를 통해서 초점을 맞추게 되면 두 개의 파장을 지난 light source point로 되어 target sample에 형광 신호를 검출기로 보낼 수 있음

④ 소형 형광 검출 모듈 설계 및 제작

■ 소형 형광 검출 장비의 구성 요소 및 구동 방법

- 형광의 기본 요소를 기반으로 하면서, flow sheet에 측정이 용이하도록 광학 초기 설계함.

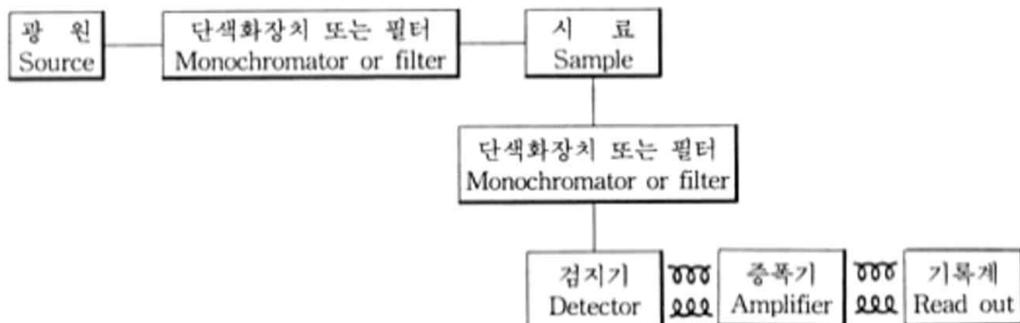
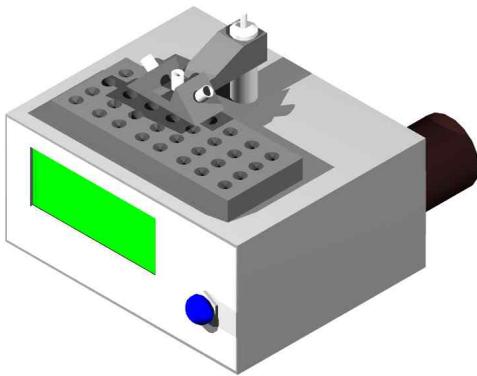


그림 177. 형광 검출 장비의 기본 구성 요소

- 소형 형광 검출 장비의 주요 성분으로는 단색화 부품으로써 LED 광원을 사용하였으며, bandpass filter와 photodiode을 적용하여 단일 파장만 검출할 수 있도록 구성함.
- 측정 방식은 광원인 LED는 본체에 있으며, 광파이버를 통해서 flow sheet를 광을 주사하도록 하였고, 이 광은 flow sheet의 반사를 통해서 반사광을 다른 광 케이블을 통해서 본체에 있는 검출기를 전달하도록 구성됨. 전달된 광은 bandpass filter를 통해서 LED 광을 모두 제거한 후에 형광 신호만 photodiode에 전달되도록 함.

a) 소형 검출 장비 개념도



b) 소형 검출 장비 사진

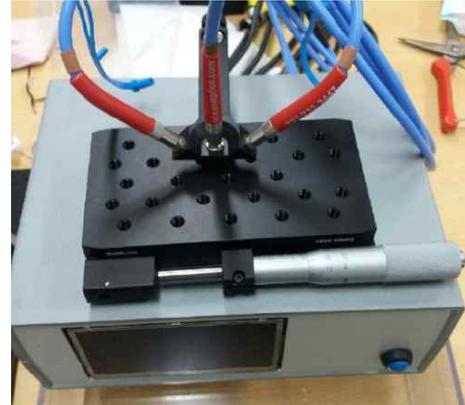


그림 178. 소형 형광 검출 장비의 개념도 및 사진

- Flow sheet는 반사광 모듈 하단에 있는 Black optical plate 설치하도록 하였으며, Flow sheet가 특정 장소에서 확인할 수 있도록 수동형으로 구성함.

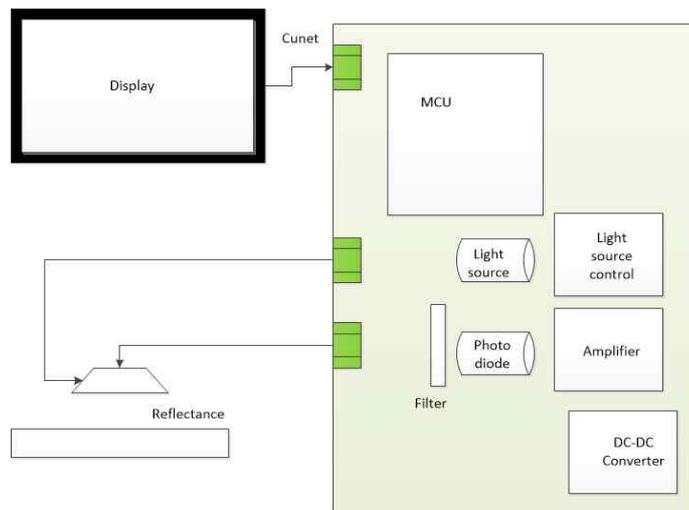


그림 179. 소형 형광 검출 장비의 내부 구성도

#### ■ 측정 메커니즘

- 측정 메커니즘은 시료인 flow sheet를 고정 한 후에 flow sheet 형광 특정 지점으로 고정하거나 아니면 고정 한 flow sheet를 정밀하게 이동하면서 측정할 수 있음.
- Flow sheet를 고정 내지는 수동으로 이동하면서 일정한 특정 지점에서 LED 광원의 단색광은 ON 시킨 후에 이 형광 및 단색광이 광파이버를 통해서 포토다이오드를 전달되고 최종적으로 MCU에서 전압값으로 측정된 후에 최종 모니터로 표현함.

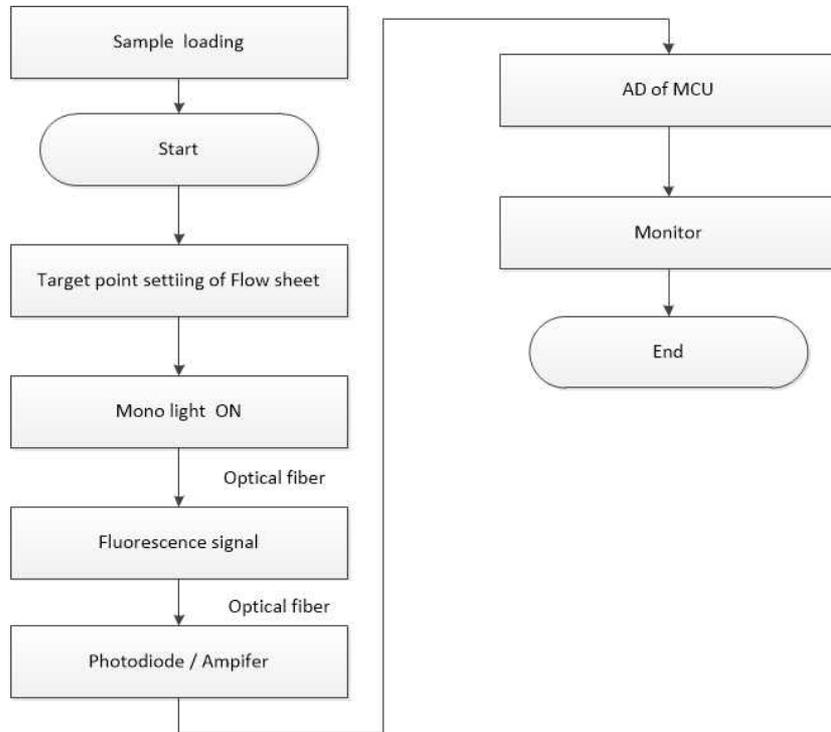


그림 180. 소형 형광 검출 장비의 측정 메커니즘

■ 소형 형광 검출 장비의 각 부품별 설명

(가) 포토다이오드

- 광 검출기로서 Mounted Silicon Photodiode로 하여 고정용을 채택함. 그리고 이 광 검출기의 spectral range는 200~1100 nm까지 반응하고, Cathode Grounded의 전기적인 특성을 가짐. Active Area(Dimensions)는 0.8 mm<sup>2</sup> (Ø1.0 mm)로써 최대한 넓은 면적으로 받는 것으로 선택함.

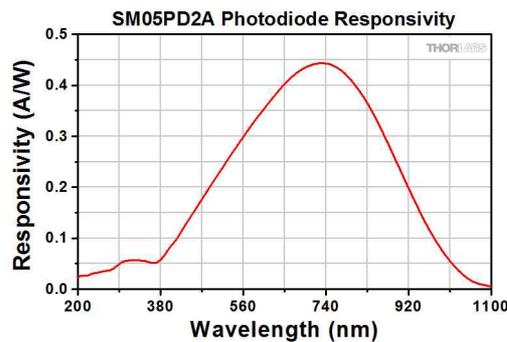


그림 181. 포토다이오드 파장별 responsivity

- 그리고 광 검출기는 SMA 커넥터로 방식으로 되어 있어서 BNC 케이블 연결이 가능하도록 함.

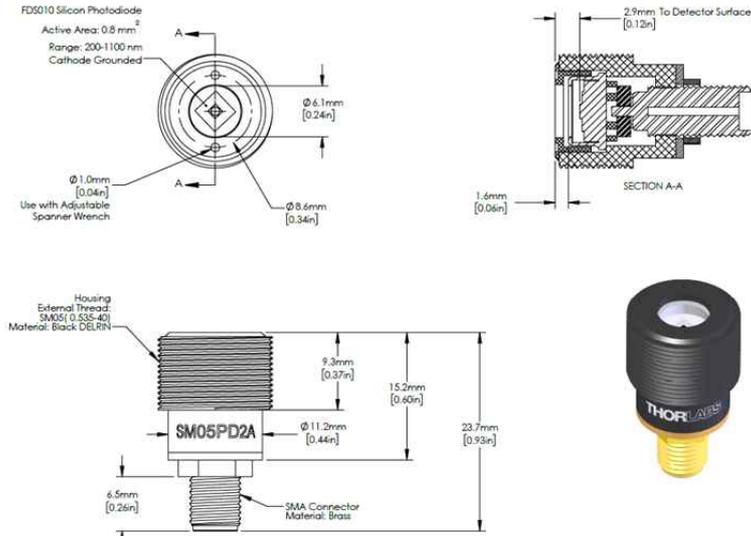


그림 182. 포토다이오드 schematic diagram

(나) Reflectance 모듈

- 채택한 Replacement Arm을 통해서 높이 조절이 가능하도록 한 Adjustable Fiber Optic Probe Stand을 채택함. 그리고 광 케이블과 연결이 가능한 SMA Connectors 방식을 채택함.

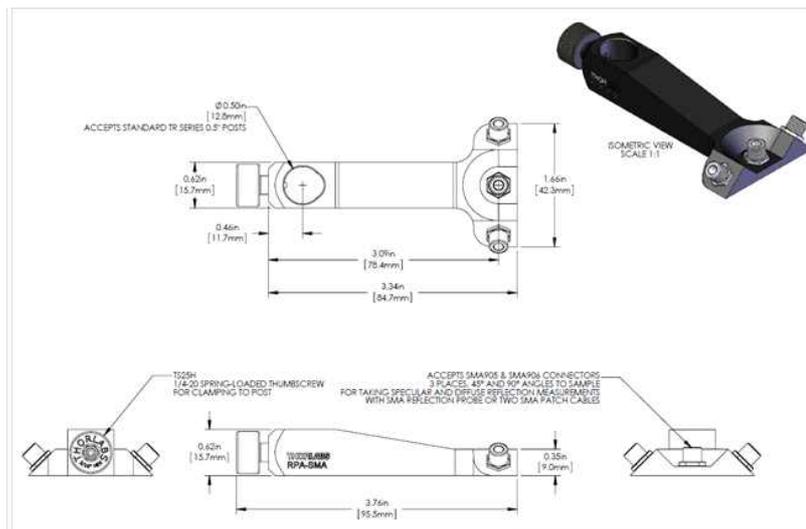


그림 183. Reflectance module 디자인 및 설계

(다) LED 발광 다이오드와 회로 제어 모듈

- 발광 다이오드는 순방향으로 전압을 가했을 때 발광하는 반도체 소자임. LED라고도 불린다. 발광 원리는 전계 발광 효과를 이용하고 있음.
- LED의 주요 사양을 보면 다음과 같음.

Specifications	
Color	Blue
Nominal Wavelength	470 nm
Bandwidth (FWHM)	25 nm
Viewing Angle (Full Angle)	80°
Test Current for Typical Power	1000 mA
Maximum Current (CW)	1000 mA
Electrical Power (Max)	3200 mW
Typical Lifetime	100 000 h
Chip Size	1 mm x 1 mm
MCPCB Thickness	1.6 mm
Operating Temperature (Non-Condensing)	0 to 40 °C
Storage Temperature	-40 to 70 °C
Risk Group <sup>a</sup>	RG2 - Moderate Risk Group

표 21. LED 발광 다이오드 주요 specification

- 470 nm가 가장 센 신호이고, 480 nm 파장 대역도 같이 포함된 부분이기 때문에 형광도 충분히 확인되면서 형광인 520 nm부터 530 nm에서 파장 영향이 없기 때문에 480 nm 광원으로 사용하기 적합한 광원으로 볼 수 있음.

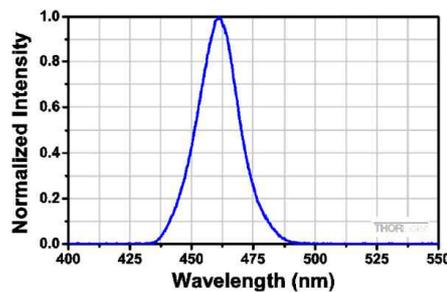


그림 184. LED 발광 다이오드의 스펙트럼 특성

- LED가 포함된 드라이버는 +극과 -극 연결이 가능하도록 함. 그리고, 조립이 가능하도록 하기 위해서는 드라이버 양 단에 M3가 들어갈 수 있는 홀이 있도록 함.

### Drawings

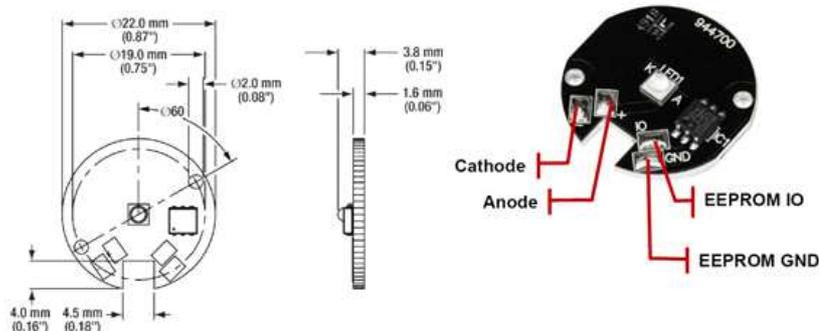


그림 185. LED 발광 다이오드의 회로 모듈 포함된 디자인 및 설계

(라) Flow sheet 고정 및 이동 모듈

- 주요 사항으로 보면
    - Side- or End-Mounted Metric Micrometer
    - Mounting Surface has Twenty-Six 1/4"-20 (M6) Tapped Blind Holes
    - Create Multi-Axis Configurations Using Dovetail Locking Screw
- 을 특징으로 이동 모듈로써 flow sheet을 올려서 확인할 수 있도록 함.

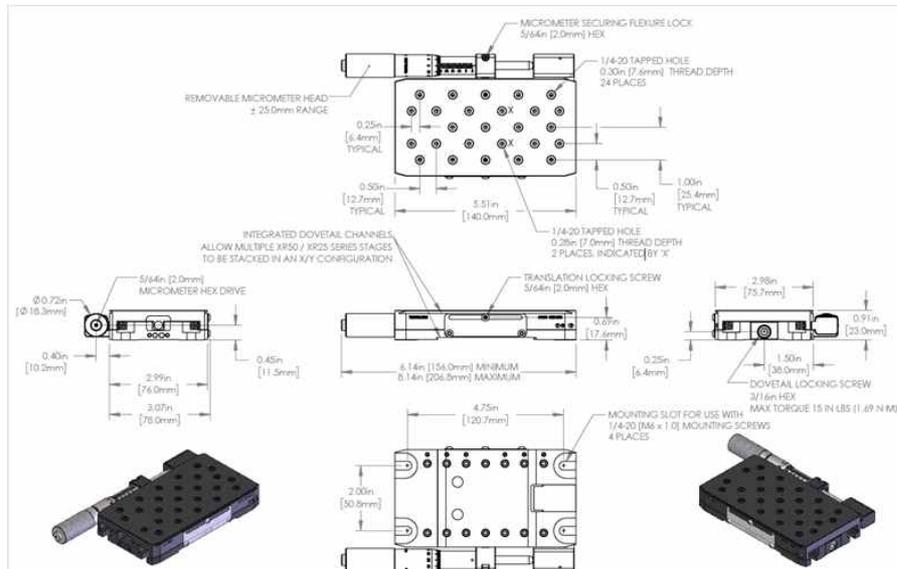


그림 186. Flow sheet 고정 및 이동 모듈 디자인 및 설계

(마) 고정형 아답터

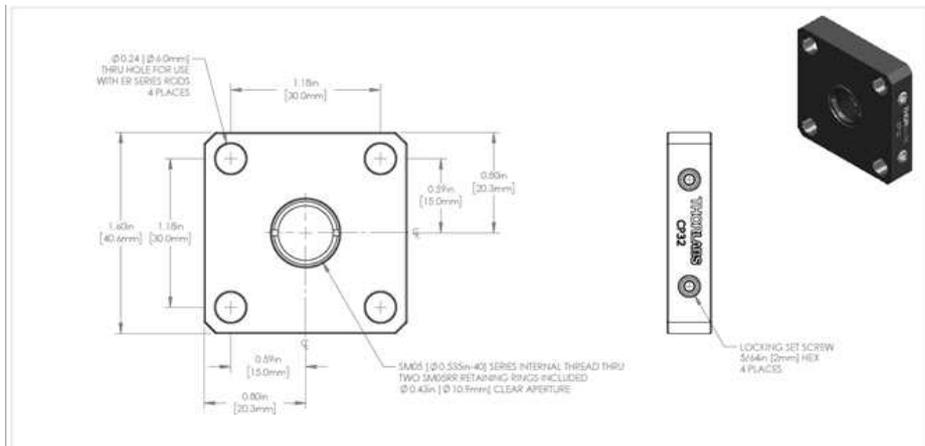


그림 187. 고정형 아답터 디자인 및 설계

(바) Optical fiber

- 전자기파의 일종인 빛을 전파하는 도파관임.
- 코어의 굴절율을 클래드의 굴절율 보다 높게 하면 코어에 들어온 광은 코어와 클래드의 경계에서 전반사(Total Reflection)를 반복하며 코어 속을 진행함.

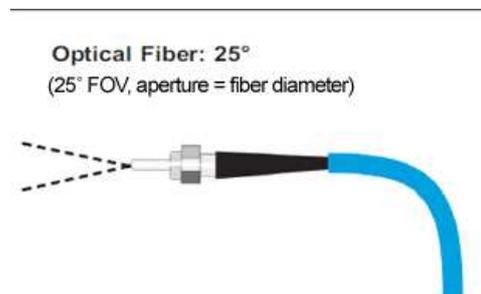
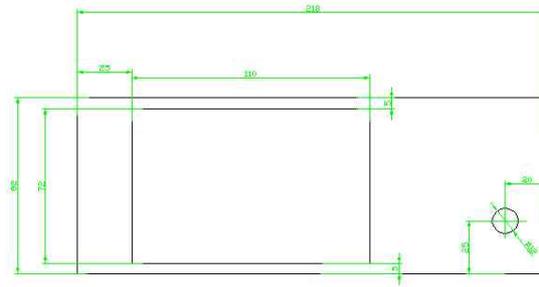


그림 188. Optical fiber의 FOV 디자인

- 코어 600 μm, 광케이블 1 meter로 해서 시스템에 적용함.

(사) 케이스 앞면 부분과 뒷면 가공 도면



Front view



Rear view

그림 189. 케이스 앞 부분과 뒷 부분 설계

(아) 플라스틱 케이스 본체 도면

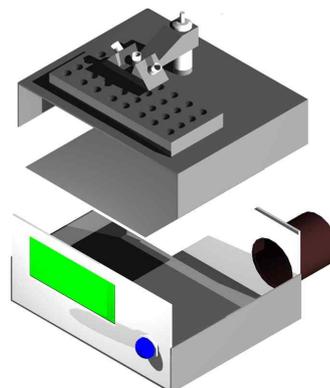


그림 190. 플라스틱 케이스 본체 구성도

- 기본적으로 플라스틱 케이스 기반하고 크기는 225 X 165 X 90 크기를 기반하고 상 하부 케이스 분리가 가능하도록 채택함.

- ① 상부 케이스 (CASE COVER): 1개
- ② 하부 케이스 (CASE BOTTOM): 1개
- ③ 전·후면 판넬 (Front, Rear Panel): 2개
- ④ 고무발: 4개
- ⑤ 고정볼트 (케이스 상·하부 조립볼트): 4개

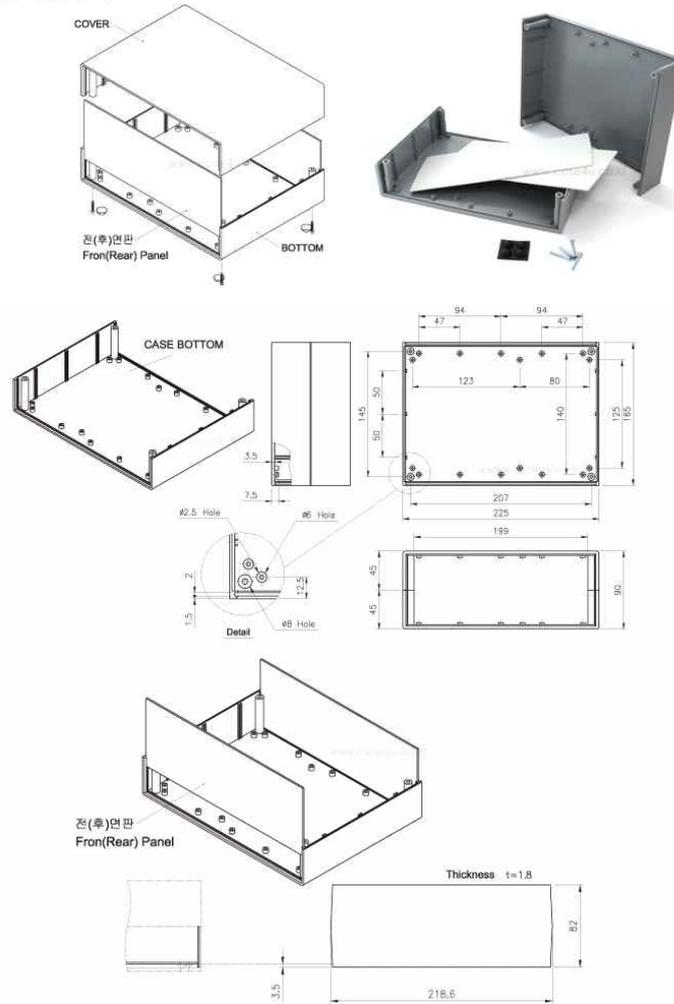


그림 191. 플라스틱 케이스 본체 디자인 및 설계

⑤ 종이 기반 키트 적용한 연동 테스트 및 성능 평가

■ 종이 기반 flow sheet와 측정 키트의 연동 테스트를 위한 하드웨어

- 종이 기반 flow sheet의 형광 직접 측정을 진행함.

(가) 직접 시 광학 측정 조건

- 직접 측정을 위해서 복합광원인 White LED (12 Volt)에 480 nm band pass filter를 사용하였으며, 분광기를 전단에는 520부터 550 nm 까지 투과할 수 있는 band pass filter를 사용하여 측정함.

(나) 분광기

- 분광기 측정 범위는 200부터 850 nm 임.
- 검출기는 linear silicon CCD array 임.
- 전기적 A/D 분해능은 16 bits 임.
- 광학적 분해능은 1.34 nm FWHM (typical) 임.

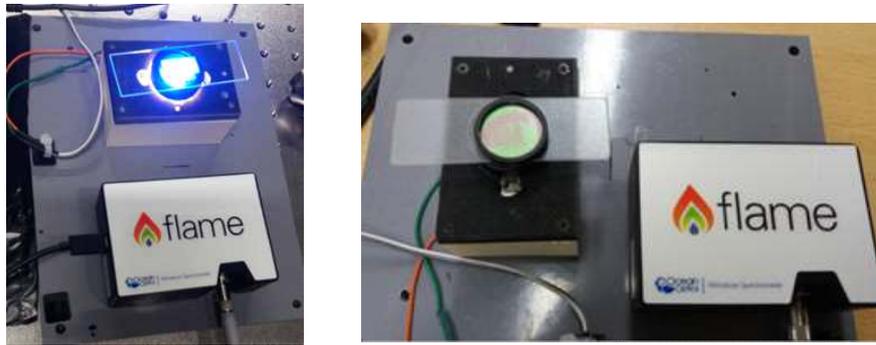


그림 192. 종이 기반 키트 연동 테스트를 위한 하드웨어 set up

■ 바이러스 탐침물에 의한 형광 측정결과

- 각종 바이러스의 검출용 조직과 배양 세포에서 유전자의 발현을 탐색하기 위한 방법으로 첫 번째로 형광 분자 표지(molecular beacon)를 사용함.
- (가) 형광 분자 표지(molecular beacon)는 특정 핵산의 존재를 알려 주는 올리고뉴클레오티드 혼성화 프로브로서, 양 말단에 각각 형광체와 소광체가 결합되어 있는 헤어핀(hairpin) 형태를 갖는 것으로 알려져 있음.
- 형광 분자 표지를 종이 기반 Flow sheet 위에서 반응을 시킨 전후로 해서 측정함.
- 형광 분자 표지의 반응 전 Flow sheet에 광원이 제대로 투과되는지 확인하였으며, 측정 결과에서 480 nm 하나만 직접 측정되는 것으로 볼 수 있음.

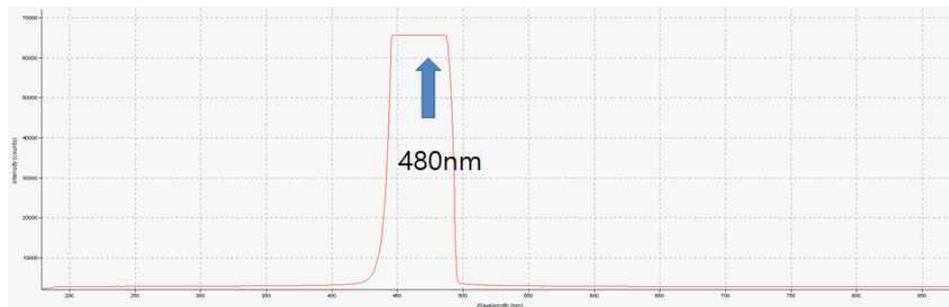


그림 193. 종이 기반 키트 연동 테스트를 위한 단색광 스펙트럼

- 520부터 550 nm 형광 신호를 확인할 수 있었음. 초기부터 확인되었으며, 10 분 정도도 계속 측정되는 것으로 보임.



그림 194. 반응 직후 형광 스펙트럼과 단색광 스펙트럼

- 10 분 후에는 좀 더 많은 형광 신호를 확인됨.

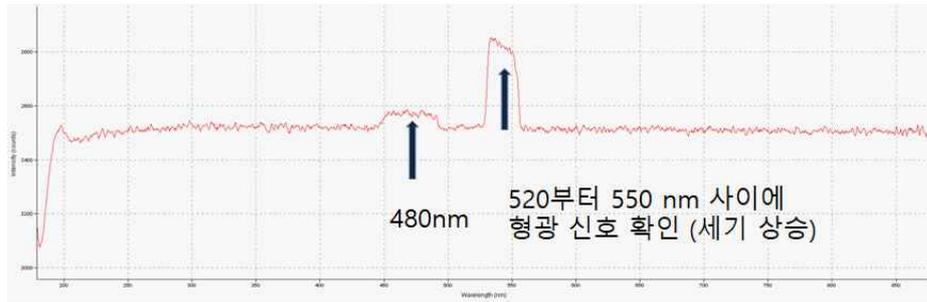


그림 195. 반응 후 10 분 후의 형광 스펙트럼과 단색광 스펙트럼

(나) 탄소나노튜브 정량검출용 프로브는, 프로브 내 랜덤(Random) 염기서열을 갖는 ssDNA (단일 가닥 DNA)에 탄소나노튜브가 캡처(Capture) 되는 현상으로 이용하여 형광 검출하는 것으로 알려져 있음.

- 탄소나노튜브(CNT)프로브를 이용한 형광 측정에 있어서는 초기에는 상대적으로 낮은 형광 세기가 측정됨.

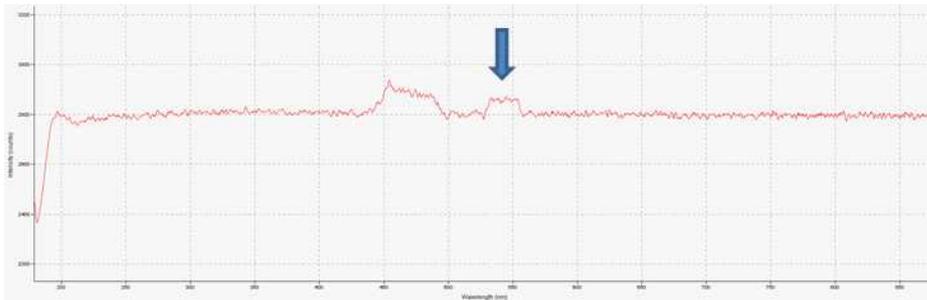


그림 196. 반응 직후 형광 스펙트럼과 단색광 스펙트럼

- 10 분 후, 탄소나노튜브 (CNT)프로브를 이용한 형광 측정에 있어서는 초기 비해서는 형광 세기가 높이는 것으로 확인할 수 있었음.

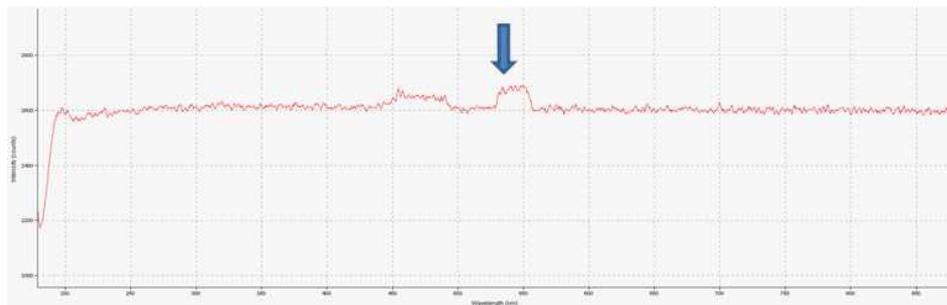


그림 197. 반응 후 10 분 후의 형광 스펙트럼과 단색광 스펙트럼

## ■ 바이러스 탐침물에 대한 하드웨어 파라미터 확인

(가) 검출기 증폭에 따른 형광 세기 변화 측정

- 위와 같이 flow sheet를 이용하여 탐침물인 형광 분자 표지의 형광 세기를 확인함. 이때 형광 세기는 좀 더 최적화시키기 위해서는 연구에서는 검출기의 증폭에 따른 세기 변화를 확인할 수 있었음.



그림 198. 검출기 증폭을 위한 하드웨어 set up

- 검출기 증폭을 위해서 검출기 증폭을 50, 100, 200, 300 msec로 올리면서 동시에 광파이버를 통해서 측정함.

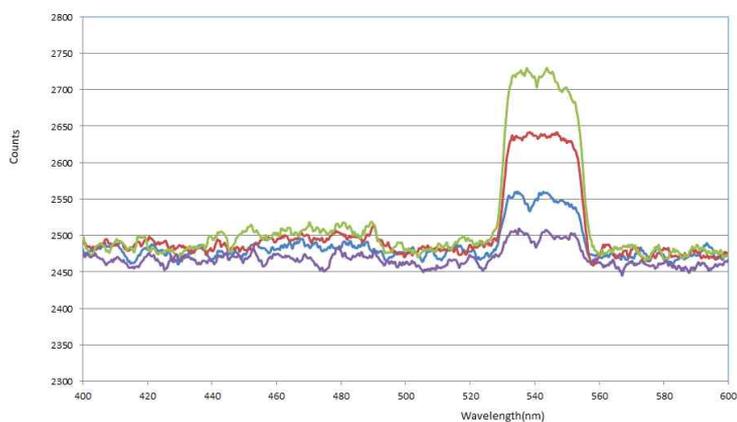


그림 199. 검출기 증폭에 따른 형광 스펙트럼 경향

- 형광 분자 표지의 형광 세기를 검출하는 데 있어 신호를 증폭함. 그 결과 높은 증폭도일수록 높은 형광 세기를 확인할 수 있었음.
- (나) 시간에 따른 바이러스 탐침물인 형광 분자 표지의 형광 세기 변화 확인
- 시간에 따른 총 7 번을 측정함. 7 번 동안 측정한 결과는 총 세기는 변화하지 않는 것 같이 보이지만 이외에 파장 대역을 확인하면 연속으로 측정할수록 파장 대역은 세기가 감소하고 형광 피크인 540 nm만 비슷하였으며, 7 번의 경우에는 세기가 감소하는 것으로 보임.

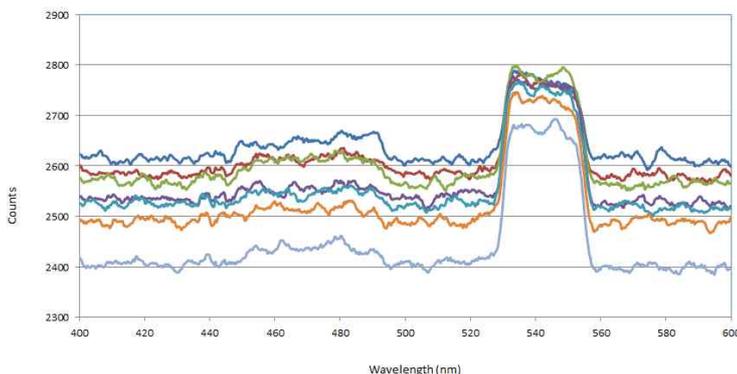


그림 200. 10 분 동안 형광 스펙트럼 세기 경향

- 이 결과를 기반으로 해서 형광 세기 파장 이외에 다른 파장대역을 바탕값 보정 통해서 세기를 계산하게 되면 다음과 같은 결과가 나오게 됨. 바탕값 보정은 형광 세기의 파장 대역과 다른 가까운 파장 대역으로 보정하게 되는 데 이때 사용한 파장 대역은 516 nm 파장 대역을 선택함.

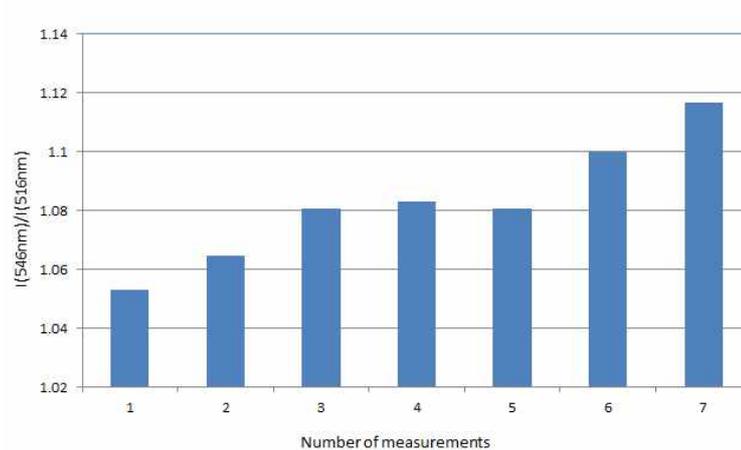


그림 201. 바탕값 보정에 의한 형광 세기 경향

- 이 결과 바탕값 보정하게 되면 시간이 흐를수록 세기가 높아지는 것으로 확인할 수 있음.

⑥ 기반 기술을 이용한 최적의 광학 및 제어회로 설계와 제작

■ 광학 설계 및 제작

- 광학 설계는 기본적으로 형광 검출할 수 있는 형광 기본 요소는 사용하는 데 있어 480 nm 을 적용하고, Flow sheet의 특정 부위에 고정해서 측정할 수 있도록 구현함.

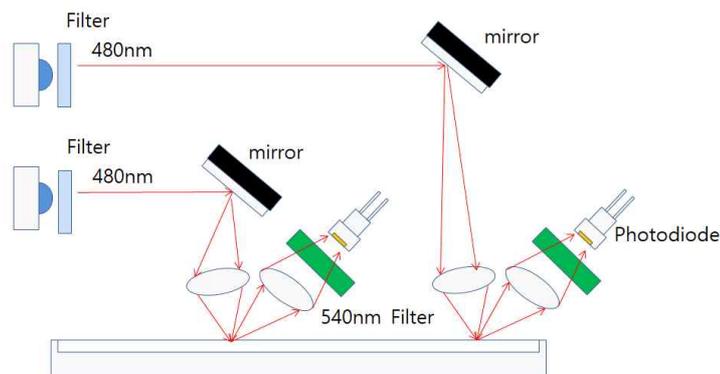


그림 202. Flow sheet에 적합한 광학 디자인

- 광학적으로 다중 측정이 가능하도록 하였고, 검출기는 반사 방식 적용함. 검출기는 540 nm 만 검출될 수 있도록 하였고, 광 손실을 최소화하기 위해서 렌즈를 이용하여 광을 최대한 입력되도록 함.

■ 제어회로 설계와 제작

- 제어기 회로는 MCU를 중심으로 검출기의 신호를 증폭하는 preamp, 이를 디지털화 하는 ADC, 주변장치로 LED driver 및 CAN, RS232, RS485 통신을 지원하는 기능을 가지도록 함.

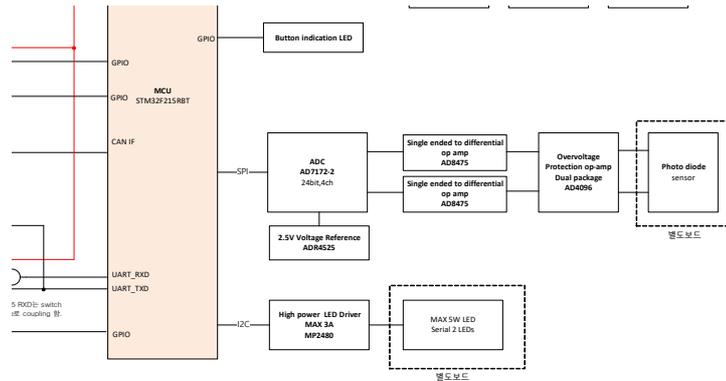


그림 203. 형광 검출기에 적합한 제어회로 개념도

- MCU

MCU는 ST사의 고성능 MCU인 STM32F215RBT를 사용하고 있으며, 주요 제원은 아래와 같음.

- (가) Core : ARM® 32-bit Cortex®-M3 CPU (120 MHz max)
- (나) Flash memory : 1 MB
- (다) SRAM : 128+8 KB
- (라) 140 GPIOs
- (마) I2 C, UART, SPI, CAN, SDIO 인터페이스 지원

- ADC

ADC는 ADI사의 고정밀 24bit ADC 인 AD7172-2 를 사용함.

Delta-sigma 방식의 ADC이며 SPI 방식으로 MCU와 통신함. 칩 내부에 발진기와 voltage reference를 내장하고 있으며, 총 4 channel 입력이 가능하며 rail to rail differential input을 지원함. 주요 제원은 아래와 같음.

- (가) Fast and flexible output rate: 1.25 SPS to 31.25 kSPS
- (나) Channel scan data rate of 6.21 kSPS/channel (161  $\mu$ s settling)
- (다) Performance specifications
- (라) 17.2 noise free bits at 31.25 kSPS
- (마) 24 noise free bits at 5 SPS
- (바) INL:  $\pm 2$  ppm of FSR
- (사) 85 dB rejection of 50 Hz and 60 Hz with 50 ms settling
- (아) User configurable input channels
- (자) 2 fully differential channels or 4 single-ended channels
- (차) Crosspoint multiplexer
- (카) On-chip 2.5 V reference ( $\pm 2$  ppm/ $^{\circ}$ C drift)
- (타) True rail-to-rail analog and reference input buffers

- LED driver (MP2580)

MP2580 high power LED driver는 36 V와 3 A 까지 지원하는 정전류 방식의 LED 드라이버임. 주요 제원은 아래와 같음.

- (가) Wide 5 V to 36 V Operating Input Range
- (나) Up to 95 % Efficiency
- (다) Hysteretic Control with No Compensation

- (라) No Output Capacitor Required
- (마)  $\pm 3\%$  LED Current Accuracy
- (바) Up to 2 MHz Switching Frequency
- (사) Up to 20 kHz Dimming Frequency

Figure 4. STM32F21x block diagram

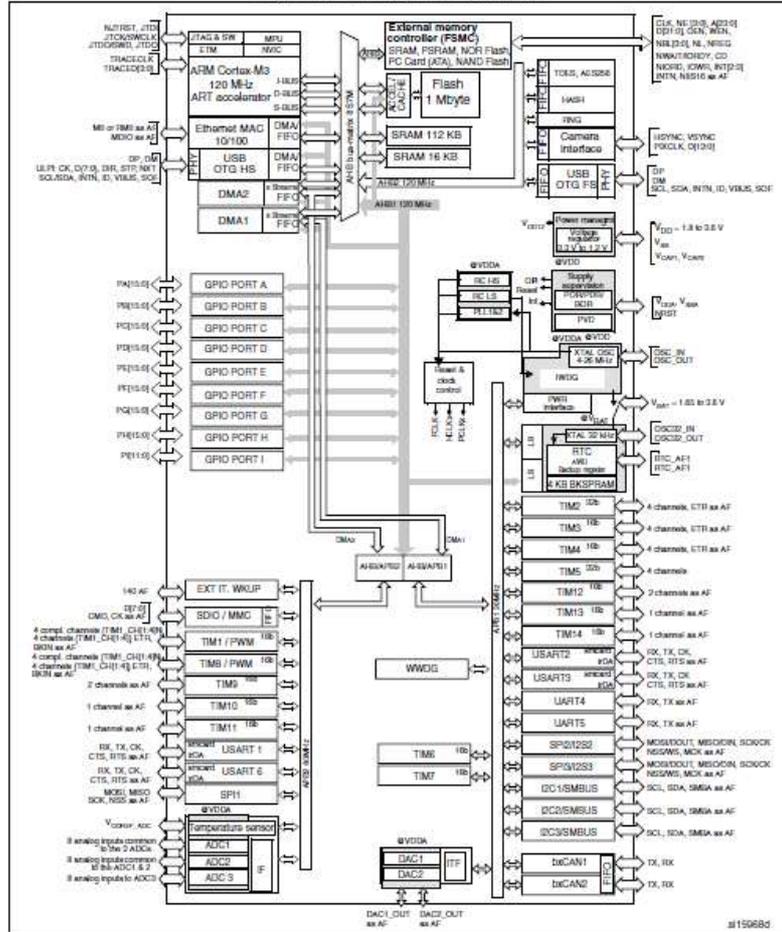


그림 204. 제어회로의 MCU 개념도

• 회로 구성 특징

위의 부품을 기반으로 하여 형광 광원 제어 및 형광 검출기에 대한 증폭기 등이 포함된 아날로그 제어 부분과 MCU를 중심으로 한 디지털 제어회로로 통합 한 제어회로를 제작하였으며, 특히 이 MCU 부분에는 USB 연결 및 RS232 통신 연결을 통해서 신호를 받을 수 있도록 함. 그리고 전원 부분은 12V DC로 구성하여, 배터리 및 220 AC 등 다양한 방법의 전원 연결이 가능하도록 구현함.

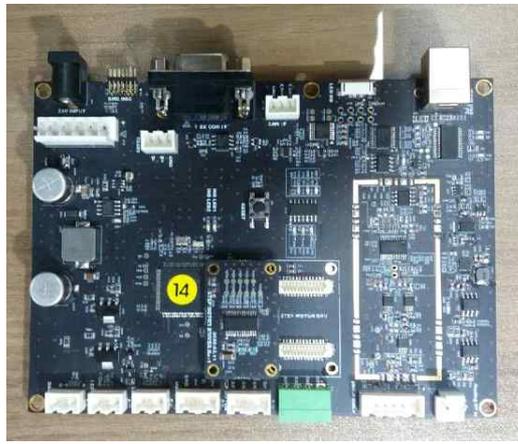


그림 205. 형광 검출기에 적합한 제어보드



그림 206. 좌측(스텝모터 드라이브), 중앙(LED 드라이브) 우측(검출모듈)

- 회로 외부 특징

회로 외부 특징으로는 전원 연결 단자와 통신 연결 단자가 한 쪽 방향을 둔 상태에서 제어 부분이 다른 한 쪽 방향이 두어서 양 방향에서 구분함으로 해서 연결 시 최적의 효율을 두었으며, 직사각형으로 크기를 최소화하였고, 각 모서리에는 M3 나사로 외형 케이스와 연결될 수 있도록 하여 케이스 부착이 가능하도록 개발함.

이를 통해 소형 모듈 기본 모듈을 제작함.

- ⑦ Lateral Flow sheet Kit를 적용하여 검출 성능 확인

- Lateral flow sheet 모듈 제작

- Lateral flow sheet를 이동할 수 있는 이동 모듈을 제작하여 Lateral flow sheet을 이동하면서 측정되도록 구현함.

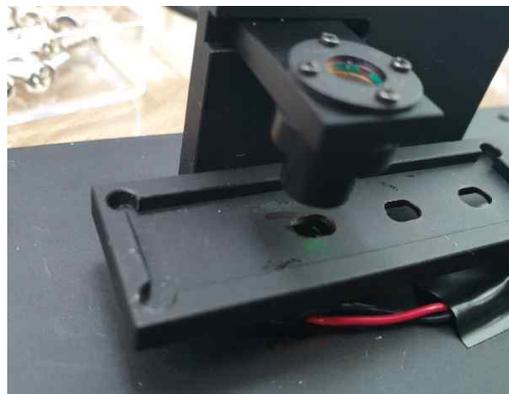


그림 207. Lateral flow sheet 모듈

- Lateral flow sheet는 샘플링 부분 한 부분과 아종까지 합쳐서 총 3군데를 측정할 수 있도록 구현하였으며, 이에 맞추어서 총 4개 부분 중 3부분에 광이 관통되도록 구현함.



그림 208. Lateral flow sheet

■ MPPC 검출기를 이용한 성능평가

- MPPC 검출 모듈을 사용하여 바이러스 검출 관련 데이터를 확보함.



C. Specifications(Ta=25 °C, unless otherwise noted)

Parameter	Condition	Min.	Typ.	Max.	Unit	
Spectral response range		320 to 900			nm	
Peak sensitivity wavelength		440			nm	
Element temperature <sup>*2*3</sup> (setting temperature)		-10			°C	
Photon detection efficiency <sup>*4</sup>	*5	$\lambda=440$ nm 0.5 p.e. (threshold level)	-	20	-	%
	*6		-	40	-	
	*7		-	50	-	
Dark count	*5	0.5 p.e. (threshold level)	-	20	30	kcps
	*6		-	30	40	
	*7		-	40	50	
Analog output voltage <sup>*3*8</sup>		80	100	120	mV/p.e.	
Temperature stability of analog output voltage	0 to 35 °C	-	-	±4	%	
Comparator output		TTL compatible			-	
Comparator threshold level		0.5 to 7.5 and Disable (adjustable in 9 steps)			p.e.	
Interface		USB1.1			-	

그림 209. MPPC specification

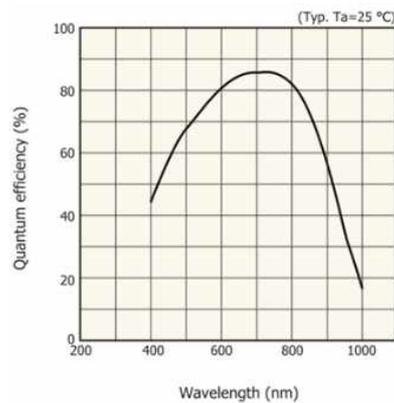


그림 210. MPPC QE trend

■ 하드웨어 성능평가를 위한 기초 측정

- MPPC 모듈을 사용하여 lateral flow sheet의 DNA가 감지가 되는지 확인함
- 소프트웨어 구동하여 온도 조절 등 window 소프트웨어로 모니터링 가능하도록 구현함. (1차 데이터)

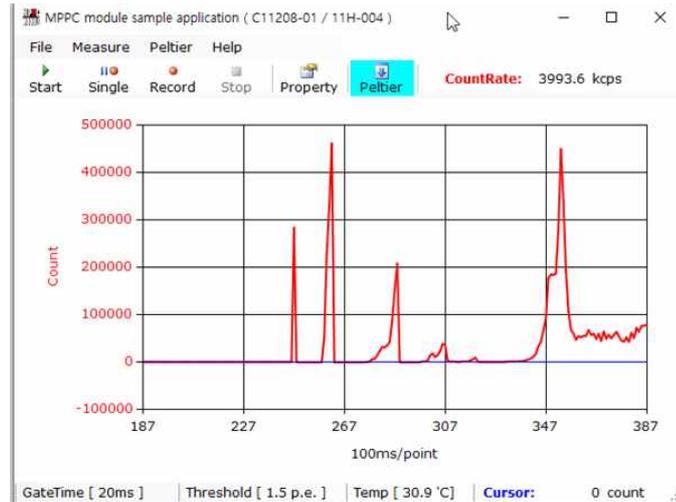


그림 211. 소프트웨어 구동을 통한 모니터링 데이터

- Glass/paper와 시료 없을 때의 신호 차이를 확인함



그림 212. Glass/paper 신호와 시료가 없을 때의 신호

- 2차 데이터에서는 Background (시료 없는 sheet에 대한 데이터) 와 2.5 microM DNA일 때의 형광 신호를 비교함 (2차 데이터)

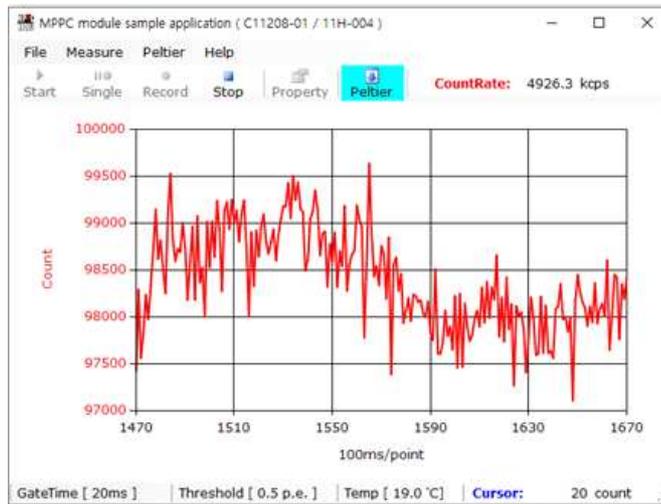


그림 213. Background 형광 신호

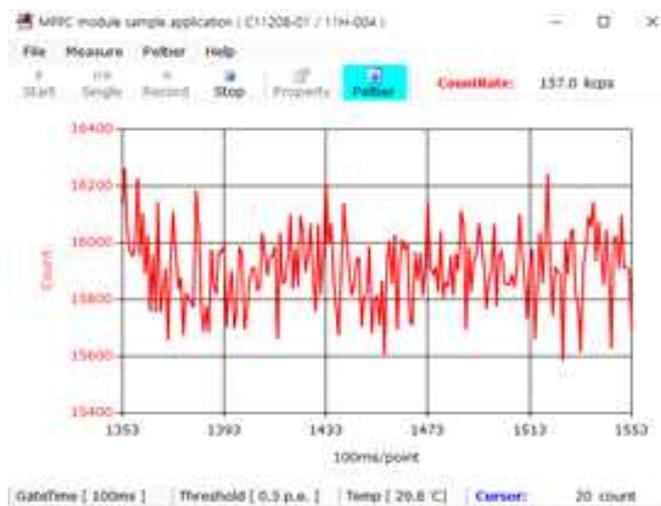


그림 214. Fluorescence light intensity 2.5 microM target DNA

- 3차 데이터에서는 Background (시료 없는 sheet에 대한 데이터) 와 25 nanoM DNA일 때의 형광 신호를 비교함 (3차 데이터)

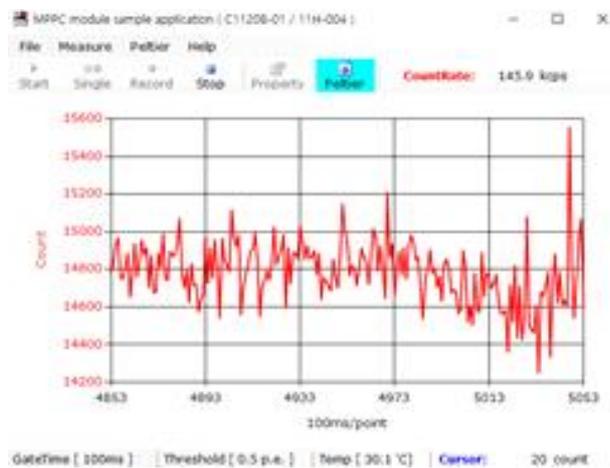


그림 215. Background 형광 신호

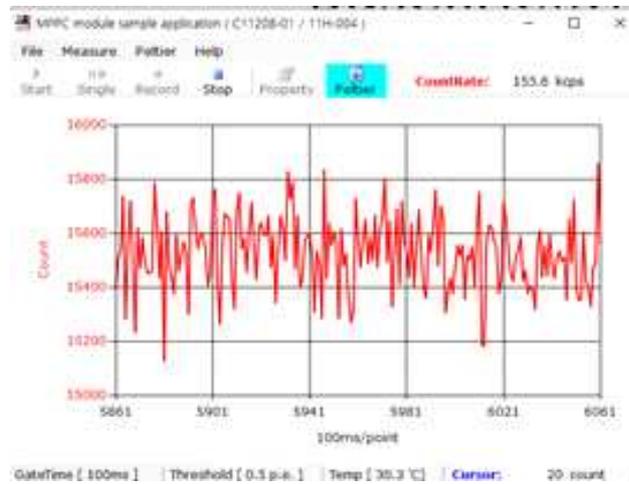


그림 216. Fluorescence light intensity 2.5 nanoM target DNA

⑧ 통신/GPS 모듈이 추가된 바이러스 검지용 소형 형광 검출 장비 개발

■ 소형 형광 검출 장비 개요

- 2차년도 개발된 소형 형광 검출 장비에서 추가적인 미광의 형광을 감지하기 위한 검출기를 개선하여 새로운 소형 형광 검출 장비 제작함
- 새로운 검출 장비 도입  
Silicon Photomultiplier (SiPM) 또는 Multi-pixel Photon Counter (MPPC) 로써 기존 PMT로 대체 하기 위해 개발된 검출기  
Lateral flow sheet 이송 장비 도입  
GPS 도입

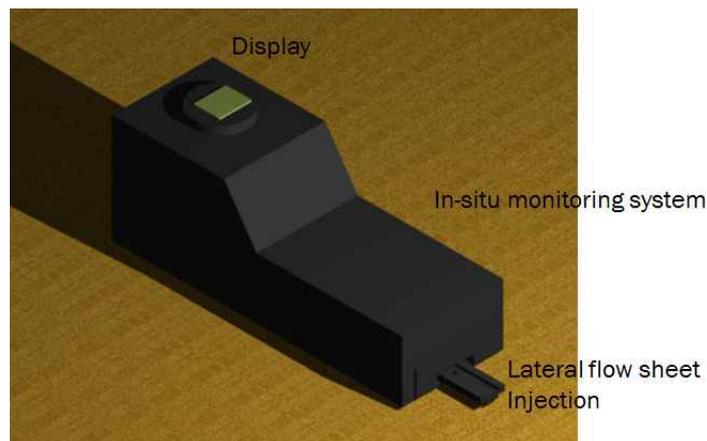


그림 217. 소형 형광 검출 장비 디자인

- 소형 형광 검출 장비를 개발하기 위해서 기본적으로 두 가지로 분리하여 제작함. 소형 형광 검출 장비의 커버에 해당하는 부분과 하단에 해당하는 부분 두 가지로 나누었으며, 이 두 가지 부분에서는 재질을 분리하여 제작하여 무게의 경량화 부분과 장비의 안정화를 달성함.

■ 소형 형광 검지기를 위한 소자 선정

(가) MPPC

(가-1) MPPC -1

- 낮은 광 신호를 검출 할 수 있는 모듈로써 구성품으로는 검출기인 MPPC, signal amplifier circuit, high voltage power supply circuit, temperature compensation circuit가 포함됨 .
- Photosensitive area는 3X3 mm 임.
- Signal output은 analog임.
- Power는 +5VDC 임.

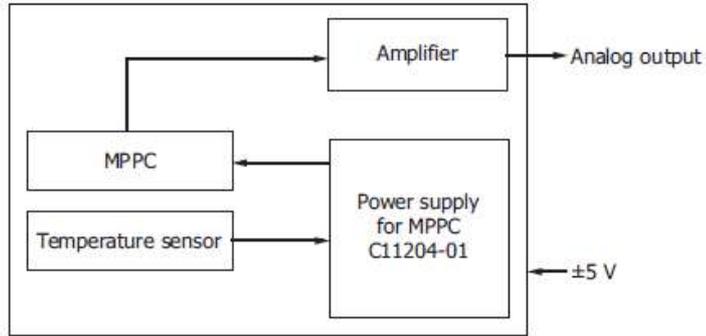


그림 218. Block diagram (MPPC 모듈-1)

Parameter	Symbol	Condition	C13365-1350SA			C13365-3050SA			Unit
			Min.	Typ.	Max.	Min.	Typ.	Max.	
Spectral response range	$\lambda$		270 to 900			270 to 900			nm
Peak sensitivity wavelength	$\lambda_p$		-	500	-	-	500	-	nm
Temperature stability of output voltage	-	$T_a=25 \pm 10 \text{ }^\circ\text{C}$	-	-	$\pm 5$	-	-	$\pm 5$	%
Photoelectric sensitivity	-		$0.7 \times 10^9$	$1.0 \times 10^9$	$1.3 \times 10^9$	$0.7 \times 10^9$	$1.0 \times 10^9$	$1.3 \times 10^9$	V/W
Cutoff frequency	High band	-3 dB, sine wave	3.5	5	-	3.5	5	-	MHz
	Low band		DC			DC			-
Rise time	$t_r$	10% to 90%, 1 p.e.	-	5	-	-	9	-	ns
Noise equivalent power	NEP	Dark state	-	0.5	1.0	-	1.2	2.0	$\text{fW}/\text{Hz}^{1/2}$
Minimum detection limit	-	Dark state	-	1	2	-	2.7	4.5	$\text{pW rms}$
Maximum output voltage	-		-	4.7	-	-	4.7	-	V

그림 219. Electrical and optical characteristics (MPPC 모듈-1)

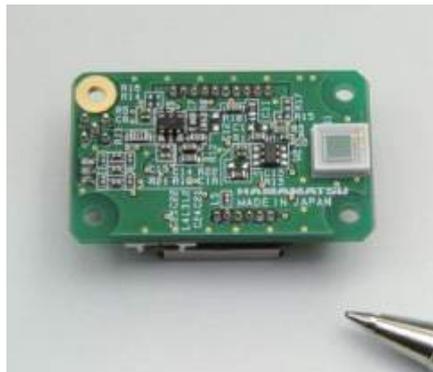


그림 220. MPPC 모듈-1

(가-2) MPPC -2

- Optical measurement modules for very-low-level light detection, digital output



그림 221. MPPC 모듈-2

Parameter	Symbol	Condition	C14456-1550GD			C14456-3050GD			Unit
			Min.	Typ.	Max.	Min.	Typ.	Max.	
Spectral response range	$\lambda$		350 to 1000			350 to 1000			nm
Peak sensitivity wavelength	$\lambda_p$		-	600	-	-	600	-	nm
Chip temperature (setting temperature) <sup>*3 *4</sup>	Tchip		-	-20	-	-	-20	-	°C
Photon detection efficiency	PDE	Threshold: 0.5 p.e.	-	40	-	-	40	-	%
Dark count	CD	Threshold: 0.5 p.e.	-	15	40	-	60	150	kcps
Comparator output	-		TTL compatible						-
Comparator threshold level	-		0.5			0.5			p.e.
Current consumption	Ic	+5 V	-	+200	+1500	-	+200	+1500	mA
		-5 V	-	-20	-40	-	-20	-40	

그림 222. Electrical and optical characteristics (MPPC 모듈-2)

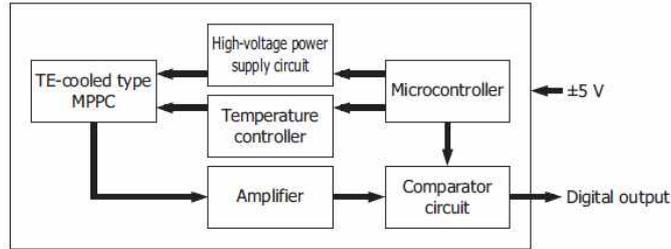


그림 223. Block diagram (MPPC 모듈-2)

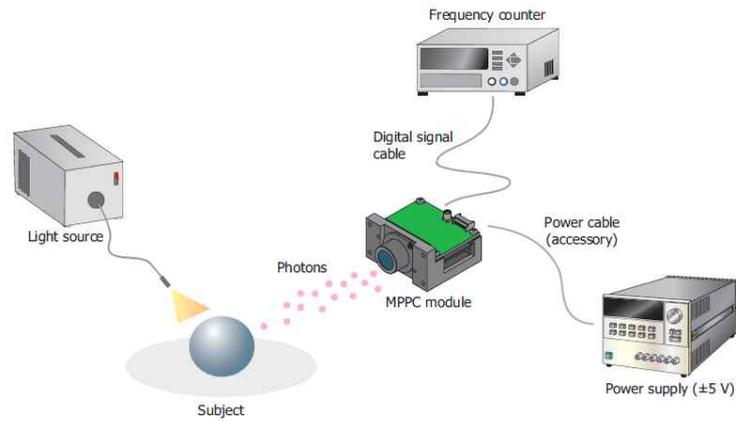


그림 224. Connection example (MPPC 모듈-2)

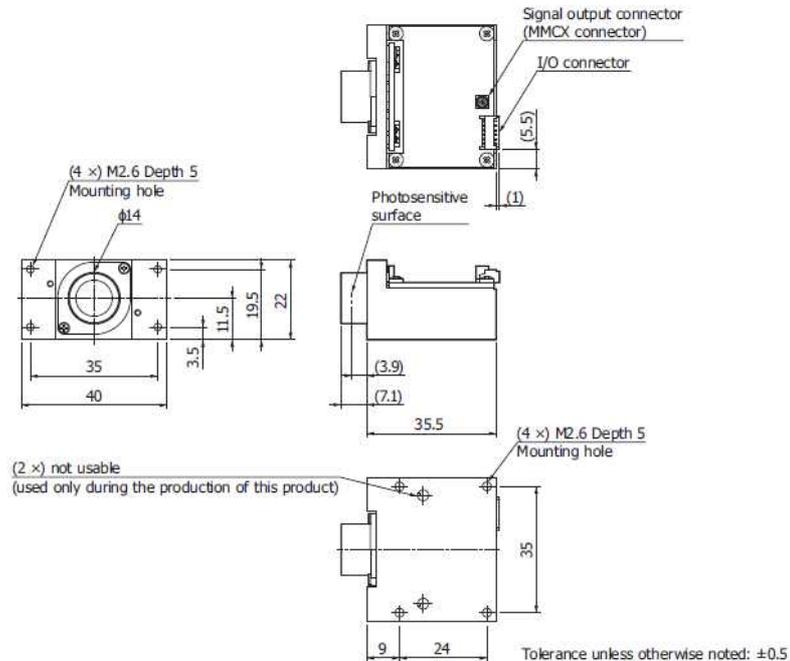


그림 225. Dimension (MPPC 모듈-2)

(나) 이송 장치

- 기본원리 (LM가이드)

LM가이드는 직역하면 "직동안내(Guide)"를 뜻하며, 레일 방향으로 매끄럽게 운동시키는 기계부품으로써 베어링과 마찬가지로 강구를 사용하는 것은 직동 운동이 매끄럽게 진행되어 마찰이 최소화되도록 하기 위함

- LM 가이드를 사용하여 여러 position 이동이 가능하도록 제작함

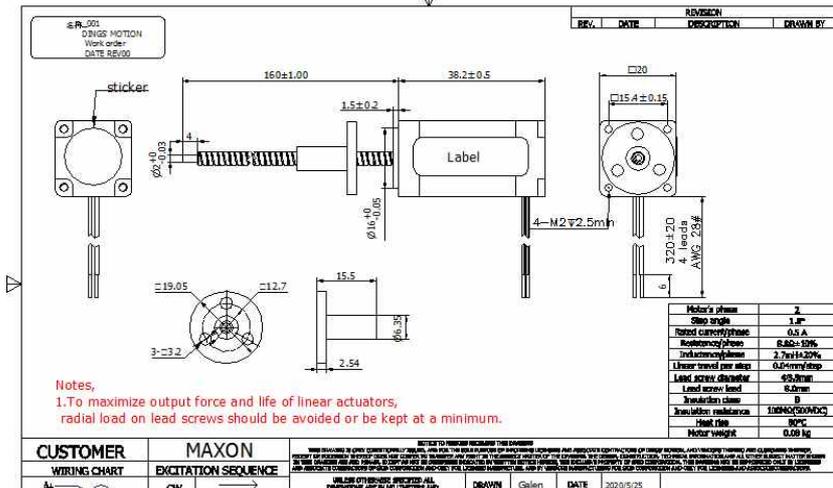


그림 226. Motor/actuator module

Motor's phase	2
Step angle	1.8°
Rated current/phase	0.5 A
Resistance/phase	8.8Ω±10%
Inductance/phase	2.7mH±20%
Linear travel per step	0.04mm/step
Lead screw diameter	3.5mm
Lead screw lead	8.0mm
Insulation class	B
Insulation resistance	100MΩ(500VDC)
Heat rise	80°C
Motor weight	0.08 kg

그림 227. Motor 부품 사양

(다) N-BK7 Plano-Convex Lens, Ø6.0 mm, f = 10 mm

- 재질 : BK7으로 500nm에서 투과율 90%이상으로 투과되는 재질을 사용함

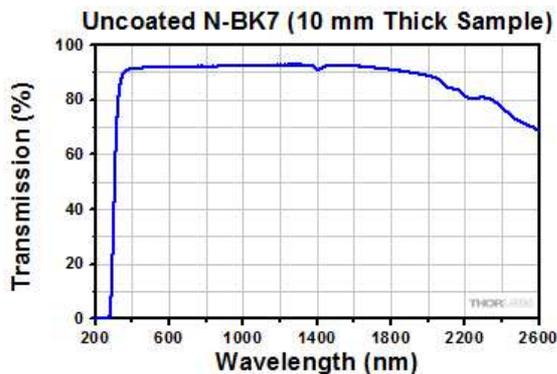


그림 228. N-BK7 plano-convex 렌즈 투과도

- 광 특성 : 한쪽으로 평면광이고 다른 한쪽은 초점이 되는 수렴렌즈를 사용함

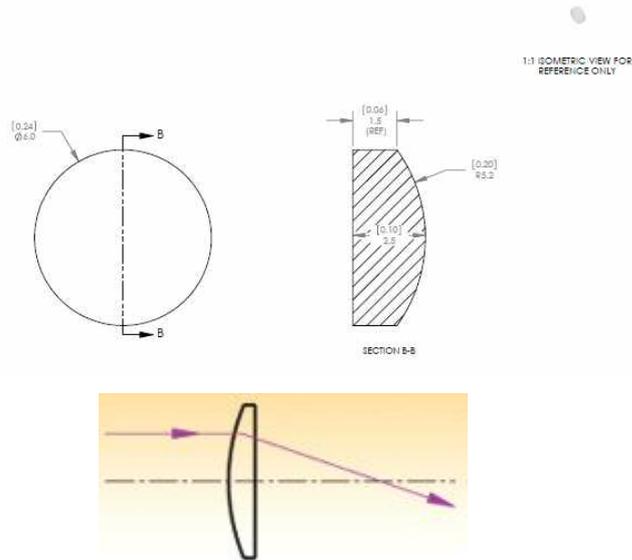


그림 229. Plano-convex 렌즈 빛 경로

(라) 여기광으로써 LED 사용

- 여기광의 LED의 부품 사양으로써 시야각이 매우 좁게 하여 다른 부분에 영향을 미치지 않도록 함.

컬러수: Single Color

렌즈색상: 투명

파장: 470nm

램프색상: 파란색

파장-피크: 465nm

렌즈투명도: 투명

시야각: 25°

밀리칸델라등급: 800mcd

크기/치수: 1.80mm(L) x 1.50mm(W)

전압-순방향(VF)(통상): 3.3V

**Kingbright**



**APDA1806VBC/D**

1.8 x 1.5 mm Right Angle SMD Chip LED Lamp

**DESCRIPTIONS**

- The Blue source color devices are made with InGaN Light Emitting Diode
- Electrostatic discharge and power surge could damage the LEDs
- It is recommended to use a wrist band or anti-electrostatic glove when handling the LEDs
- All devices, equipments and machineries must be electrically grounded

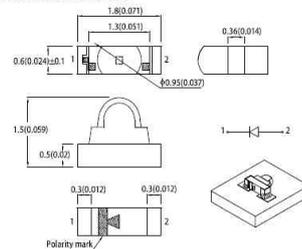
**FEATURES**

- 1.8 x 1.5 x 0.6 mm right angle SMD LED, 0.6 mm thickness
- Low power consumption
- Ideal for backlight and indicator
- Package: 4000 pcs / reel
- Moisture sensitivity level: 3
- Halogen-free
- Tinned pads for improved solderability
- RoHS compliant

**APPLICATIONS**

- Backlight
- Indicator

**PACKAGE DIMENSIONS**



**RECOMMENDED SOLDERING PATTERN**

(units: mm, tolerance: ±0.1)



그림 230. LED 부품 사양

## TECHNICAL DATA

### RELATIVE INTENSITY vs. WAVELENGTH

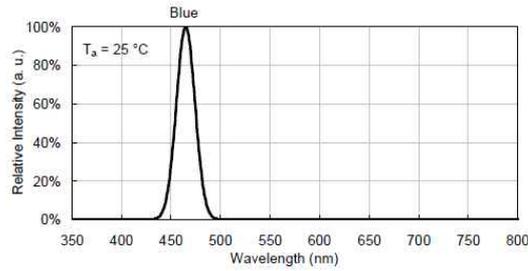


그림 231. 여기광 파장 정보

#### (마) GPS모듈

- 여기광의 LED의 부품 사양으로써 시야각이 매우 좁게 하여 다른 부분에 영향을 미치지 않도록 함.

#### • 제품특징

동작전압 : DC 3V- 5V

본체 크기 : 25mm X 35mm

안테나 크기 : 25mm X 25mm X 8mm

Parameter	Specification			
Receiver type	50 Channels GPS L1 frequency, C/A Code SBAS: WAAS, EGNOS, MSAS			
Time-To-First-Fix <sup>1</sup>		NEO-6G/Q/T	NEO-6MV	NEO-6P
	Cold Start <sup>2</sup>	26 s	27 s	32 s
	Warm Start <sup>2</sup>	26 s	27 s	32 s
	Hot Start <sup>2</sup>	1 s	1 s	1 s
	Aided Starts <sup>3</sup>	1 s	<3 s	<3 s
Sensitivity <sup>4</sup>		NEO-6G/Q/T	NEO-6MV	NEO-6P
	Tracking & Navigation	-162 dBm	-161 dBm	-160 dBm
	Reacquisition <sup>5</sup>	-160 dBm	-160 dBm	-160 dBm
	Cold Start (without aiding)	-148 dBm	-147 dBm	-146 dBm
	Hot Start	-157 dBm	-156 dBm	-155 dBm
Maximum Navigation update rate		NEO-6G/Q/MT	NEO-6PV	
		5Hz	1 Hz	
Horizontal position accuracy <sup>6</sup>	GPS	2.5 m		
	SBAS	2.0 m		
	SBAS + PPP <sup>7</sup>	< 1 m (2D, R50) <sup>8</sup>		
	SBAS + PPP <sup>9</sup>	< 2 m (3D, R50) <sup>8</sup>		
Configurable Timepulse frequency range		NEO-6G/Q/MPW	NEO-6T	
		0.25 Hz to 1 kHz	0.25 Hz to 10 MHz	
Accuracy for Timepulse signal	RMS	30 ns		
	99%	<60 ns		
	Granularity	21 ns		
	Compensated <sup>8</sup>	15 ns		
Velocity accuracy <sup>6</sup>		0.1m/s		
Heading accuracy <sup>6</sup>		0.5 degrees		
Operational Limits	Dynamics	≤ 4 g		
	Altitude <sup>10</sup>	50,000 m		
	Velocity <sup>10</sup>	500 m/s		

그림 232. GPS 모듈 사양 정보

#### (바) 충전 배터리

- 18650 충전지/직렬연결 리튬이온배터리(접지선) 2200mAh 7.4v / KC인증제품

모델명	UB870
전압	7.4V
용량	2200mAh
크기	약 35mm X 69.5mm
충전조건	최대충전 전류 : 2A / 지속사용 전류 : 0.5A



그림 233. 리튬이온배터리 사양 정보

(사) 디스플레이 (OLED)

- 소자 하나하나가 스스로 빛을 내는 OLED 패널의 특성상 명암비가 무한대로 표현됨. 이 때문에 선명하고 입체감 있는 화질을 구현할 수 있음. 또 고성능 콘솔 게임에서 가장 중요한 응답속도는 0.1ms(밀리세컨드·1000분의 1초)에 불과함. 화면재생률은 1초당 120장에 달함

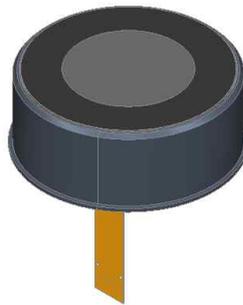


그림 234. 설계된 디스플레이 이미지

Item	Dimension	Unit
Dot Matrix	128 x 128 Dots	—
Module dimension	ø56 x 21.56	mm
Active Area	ø30.0	mm
Pixel Size	0.210 x 0.210	mm
Pixel Pitch	0.235 x 0.235	mm
Display Mode	Passive Matrix	
Display Color	White	
Drive Duty	1/128 Duty	
Gray Scale	4 bits	
IC	SSD1327	
Interface	4-line SPI , I2C	
Size	1.18 inch	

CTP IC	IT7259
Detect Point	1
CTP Interface	I2C
CTP Surface Hardness	6H

그림 235. 디스플레이(OLED) 사양 정보

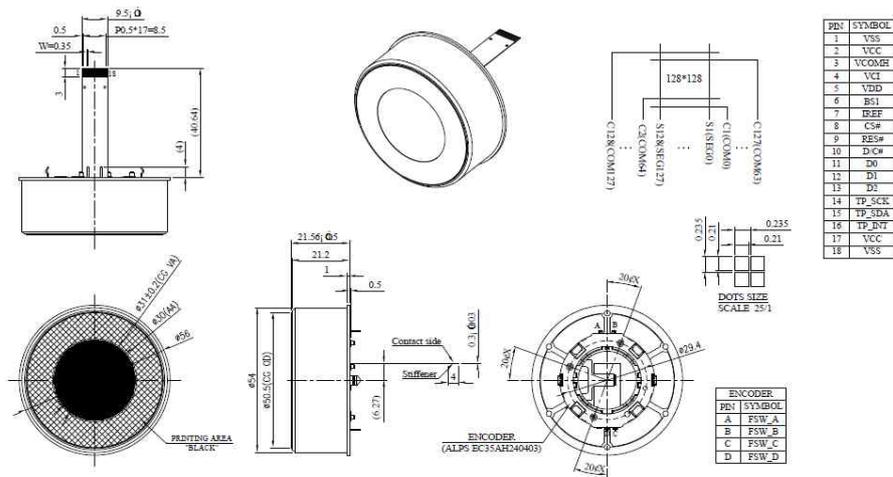


그림 236. 디스플레이(OLED) 크기 및 설계도

(아) bandpass filter (535nm/ 40m)

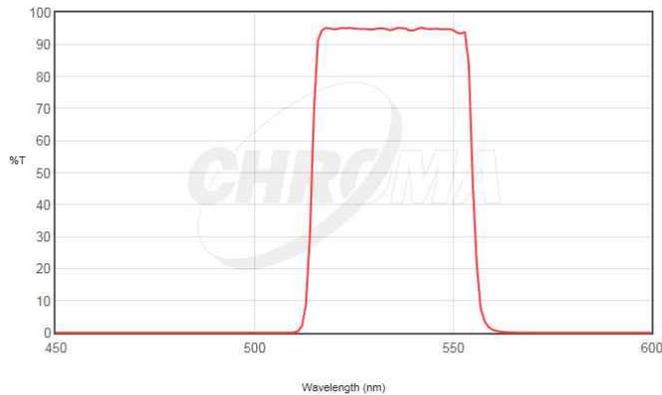


그림 237. Bandpass filter 파장대 정보

■ 형광 검출 모듈의 광학 구조

- MPPC와 LED 부분을 투과형 구조로 하여 매우 높은 광 신호가 수신될 수 있도록 하였으며, LED 부분에는 LED 파장 대역의 bandpass filter로 좁은 여기광이 출력될 수 있도록 하였고, lateral flow sheet 상단에는 수렴 렌즈와 bandpass filter를 통해서 형광 방출광만 MPPC로 입력될 수 있도록 광 구조를 최소화하도록 개발함
- 렌즈와 필터 부품은 MPPC 검출 소자 면적과 유사한 5mm 또는 6mm로 렌즈를 선택하여 초점 거리가 6 mm로 짧게 초점을 맞출 수 있도록 함
- 짧은 초점 거리 및 평면광 거리는 전체 광 alignment에 유리하여 alignment에 의한 광손실을 최소화함

(가) 소형 형광 검출 장비 광학 부품

- 형광 검출기의 광학적인 구성 요소로서 여기광 부분과 방출광 측정 부분으로 나누어짐. 여기광의 LED로서 Blue light LED를 사용하였으며, 여기광 앞에는 Bandpass filter를 사용하여 좁은 광파장 대역만 여기 될 수 있도록 함.

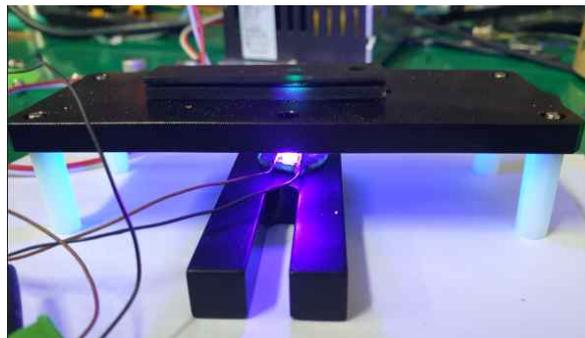


그림 238. 여기광 모듈 부분 사진

- 방출광에는 Green 필터를 사용하여 방출광 중 Green 파장 대역을 측정되도록 하였으며, 이러한 방출광 필터 부분 상단에 MPPC 검출기를 조립함

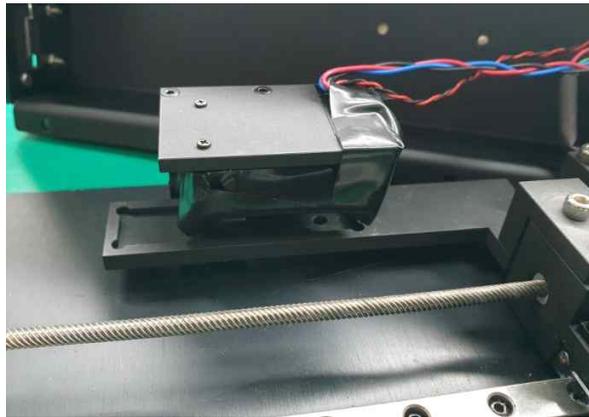
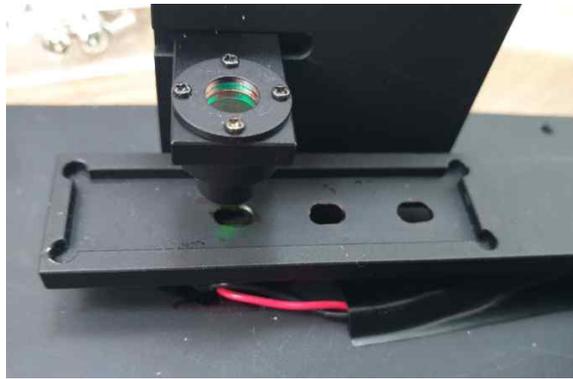


그림 239. 방출광 광학 모듈 부분 사진

(나) 소형 형광 검출 장비 광학 구조

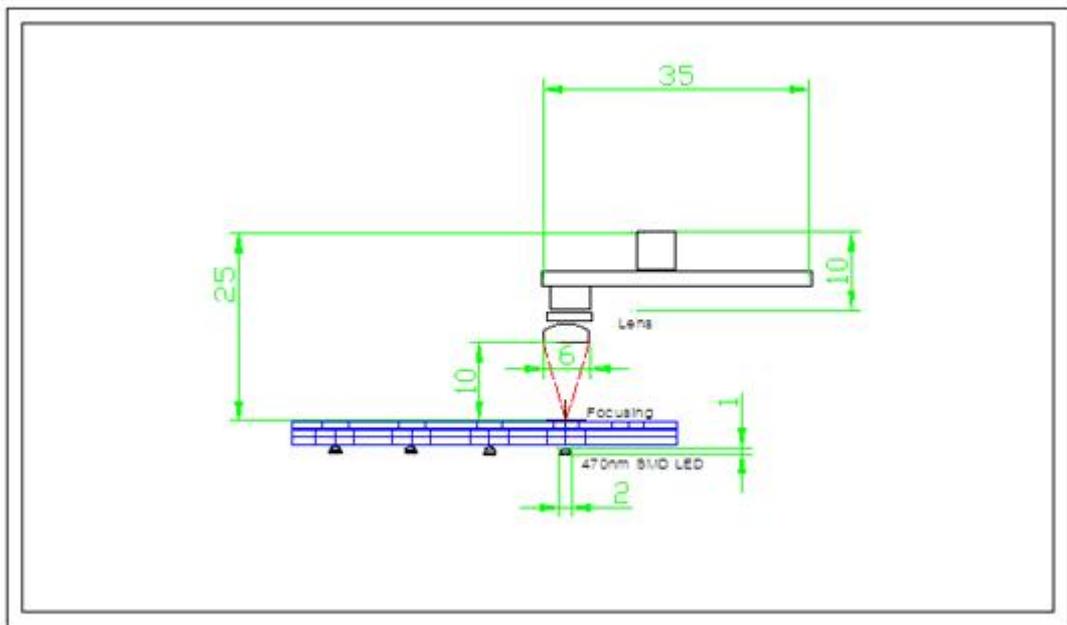


그림 240. 소형 형광 검출 장비 광학 구조

■ 형광 검출 모듈 설계

- 전체적으로 검출 모듈은 두 부분으로 나누어 지는 데 상판은 커버 케이스만 있으며, 하단에는 측정의 무게 중심을 하단에 두어 측정 및 이송장치에 흔들림 등이 없도록 구성함. 하단에는 주로 알루미늄 등 메탈 재질과 이를 기반으로 PCB 제어 보드 등을 하판에서 지지해서 올라가서 하판에 무게를 집중하도록 함.

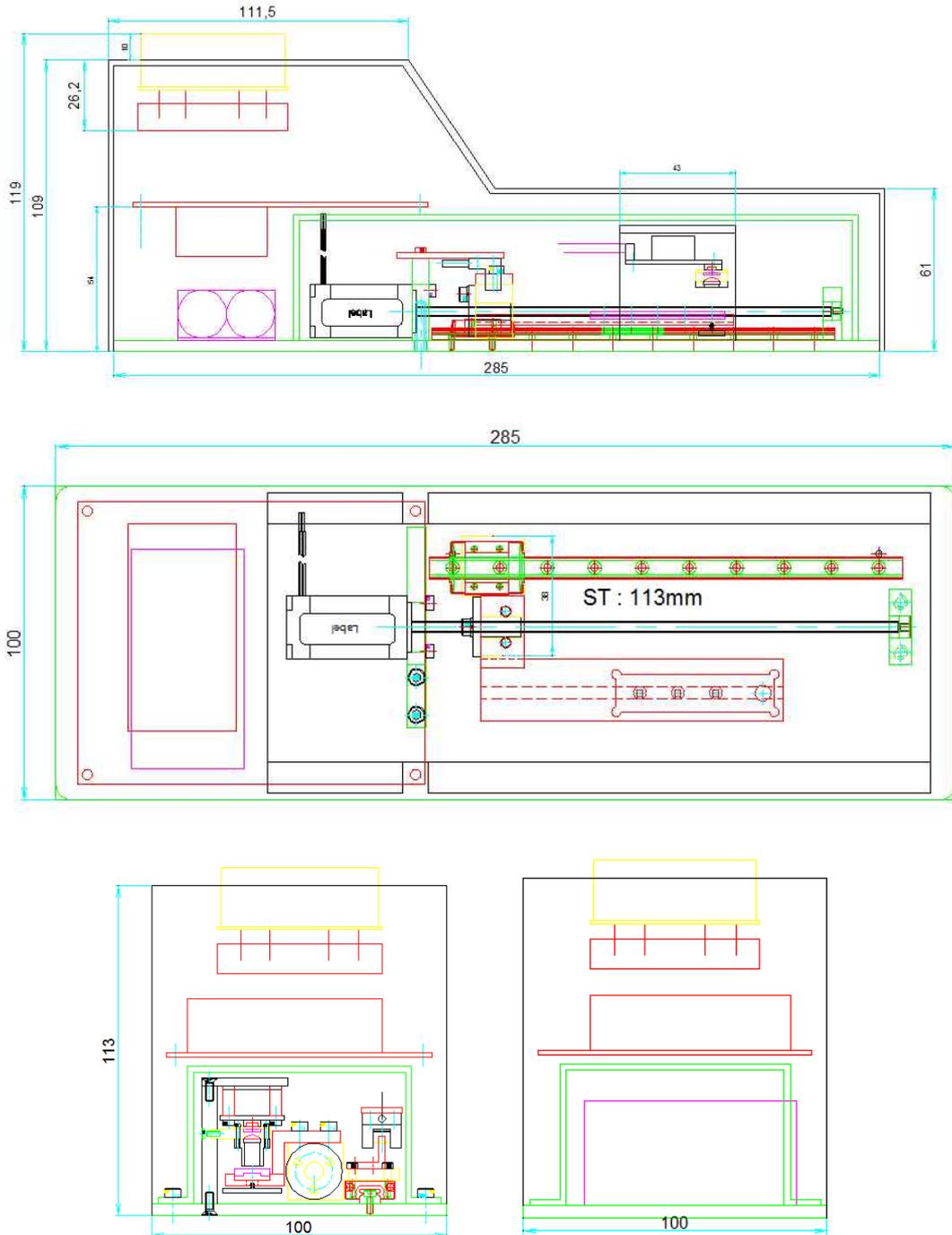


그림 241. 소형 형광 검출 장비의 설계도

■ 형광 검출 모듈 제작 (하드웨어)

(가) 케이스 상단 부분

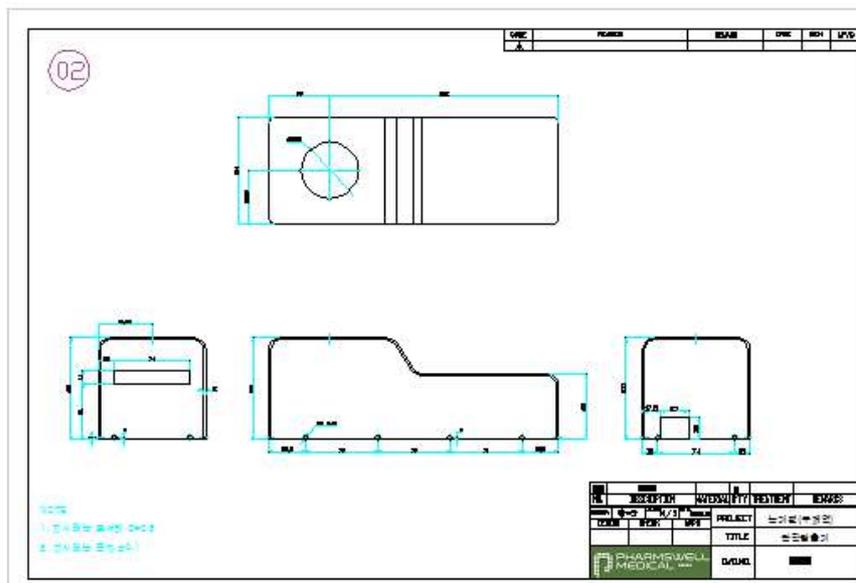
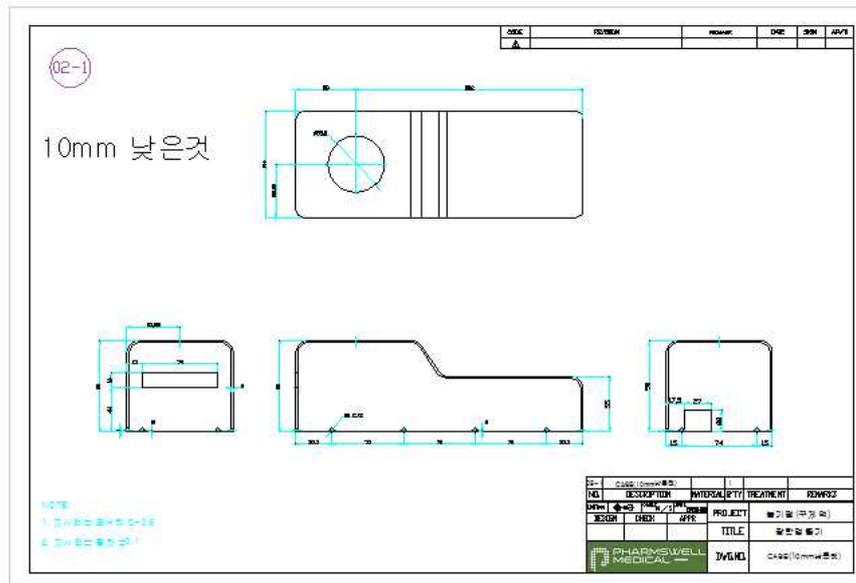


그림 242. 소형 형광 검출 장비 케이스 상단 부분 사진 및 설계도

(나) 케이스 하단 부분

- 케이스 하단 부분은 안정성을 도모하기 위하여 하단을 알루미늄으로 하였으며, 알루미늄의 광 반사를 최소화하기 위하여 Black anodizing을 함.
- 케이스 특징  
케이스 하단으로부터 각 부품을 모듈을 장착 하는 적층 방식을 채택하여 커버는 하중을 최

소화할 수 있도록 함

케이스는 총 두 가지로써 10mm 낮은 것 시스템과 상대적으로 10mm 높은 시스템이지만  
본 내용에서는 시스템과 10mm 낮은 것으로 표기하여 설명함

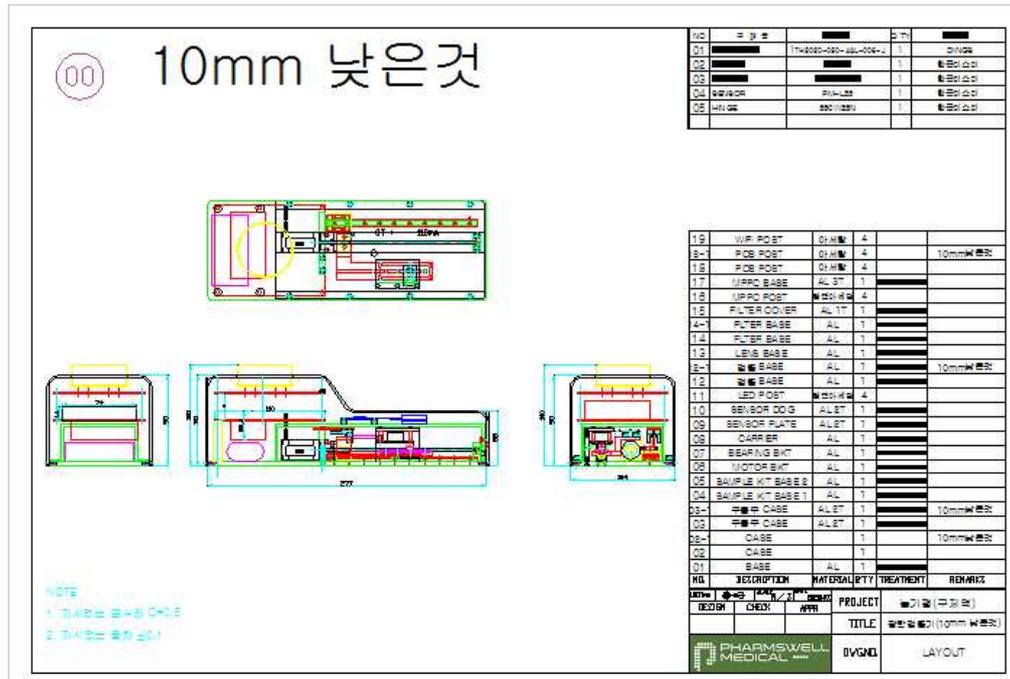


그림 243. 높이가 10mm 낮은 시스템 모듈 설계도

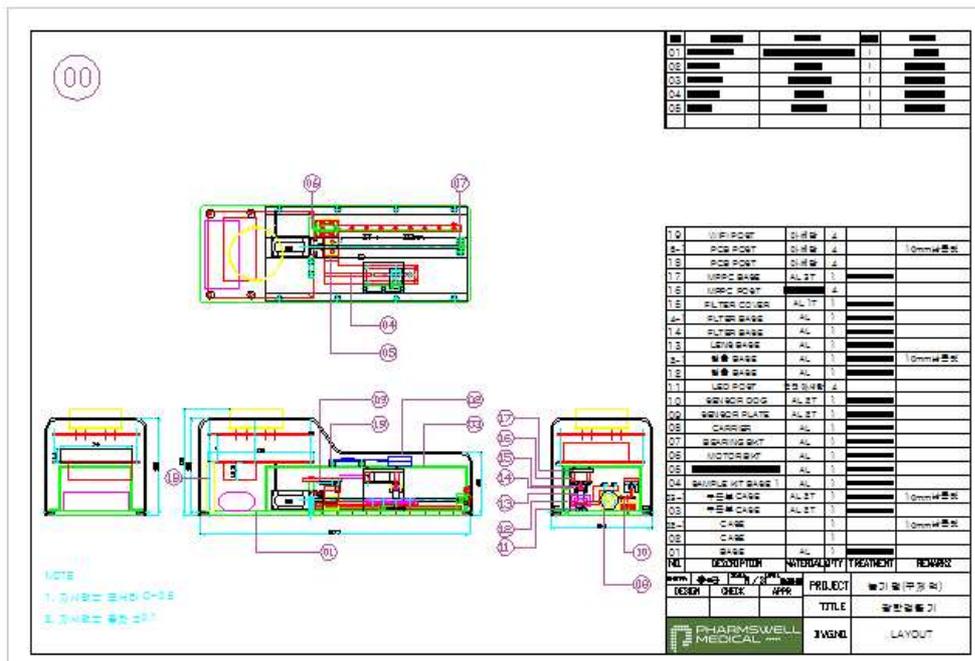


그림 244. 시스템 모듈 설계도

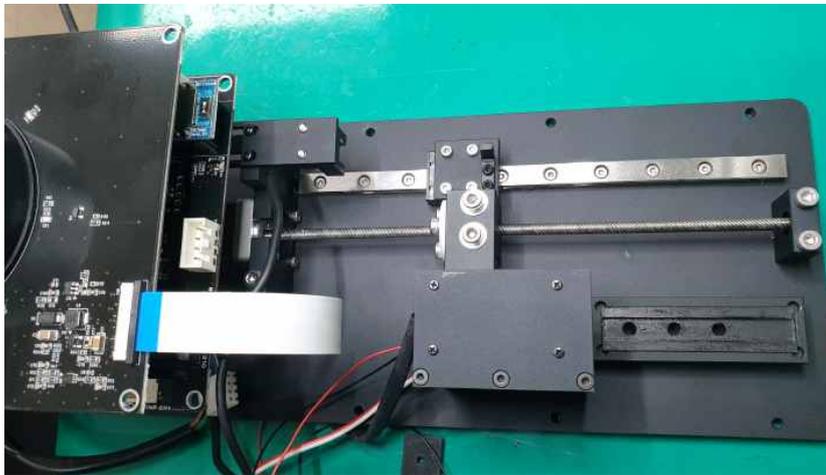


그림 245. 소형 형광 검출기 내부

- 하단 부분의 광 노출을 최소화하기 위하여 광 측정 부분에는 추가 커버를 제작하여 이중 커버 부분과 내부 커버는 Black anodizing을 처리함

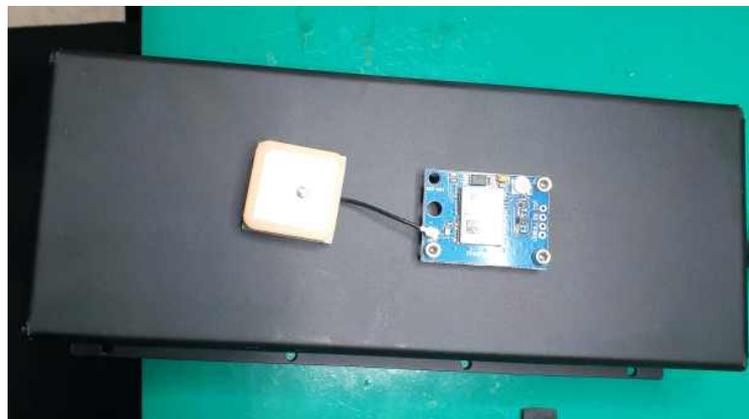


그림 246. 소형 형광 검출기 하단 부분 사진

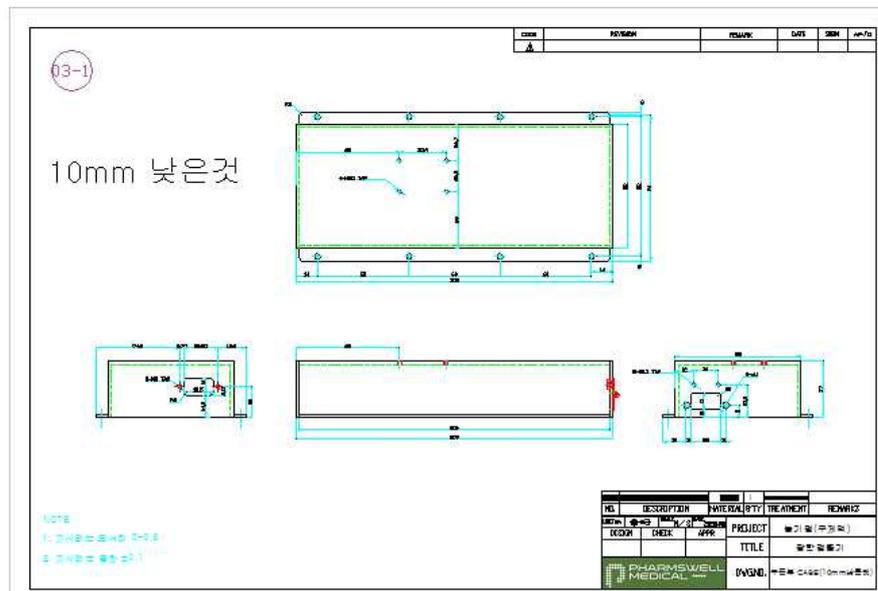


그림 247. 소형 형광 검출기 하단 부분 설계도 1



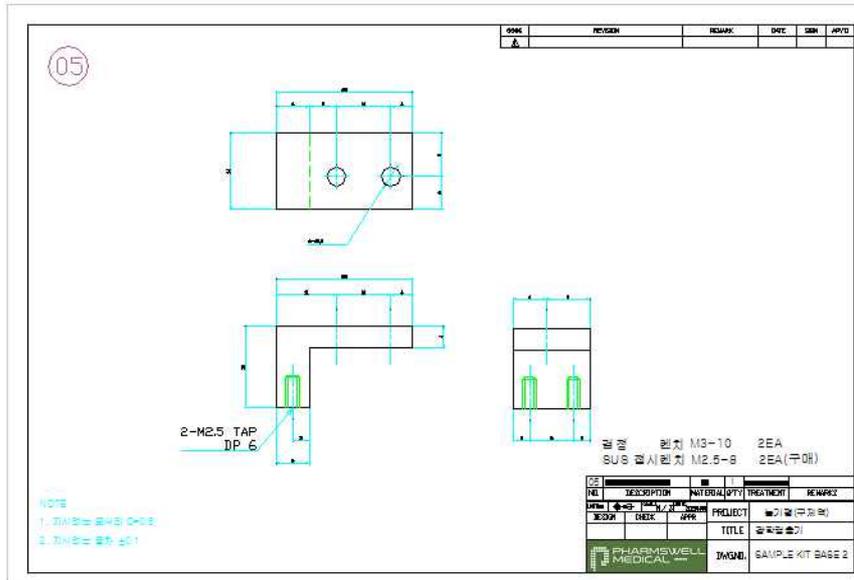


그림 251. 소형 형광 검출기 하단 부분 설계도 5

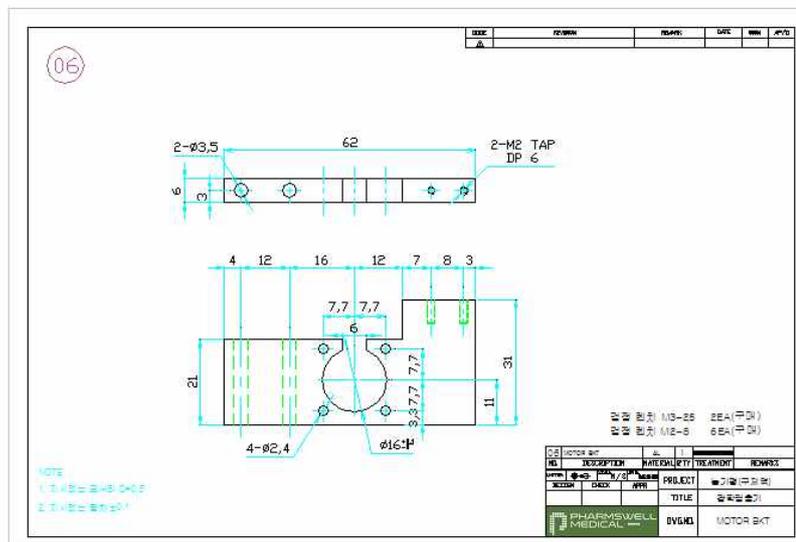


그림 252. 소형 형광 검출기 하단 부분 설계도 6

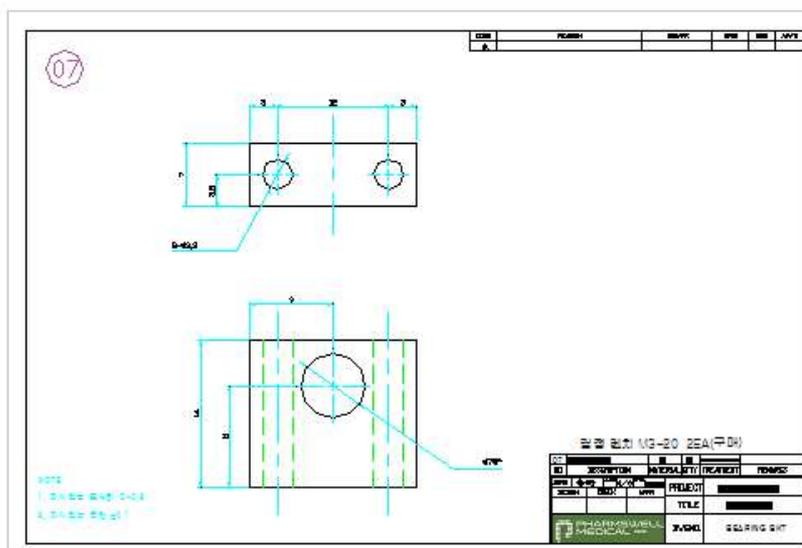


그림 253. 소형 형광 검출기 하단 부분 설계도 7



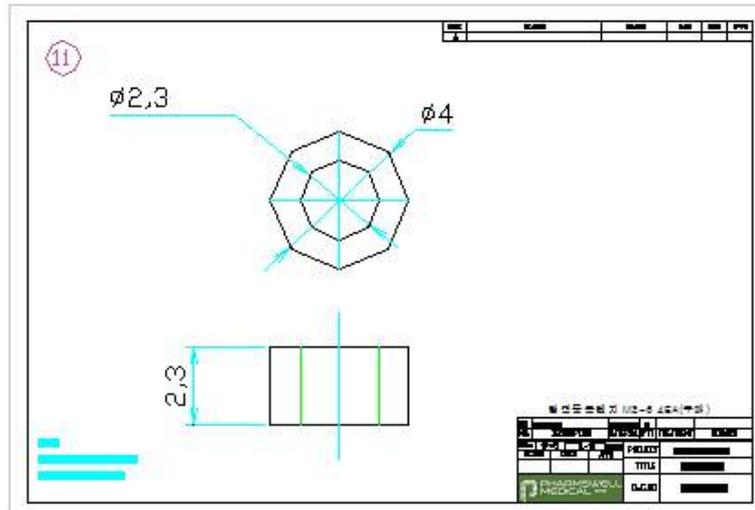


그림 257. 소형 형광 검출기 하단 부분 설계도 11

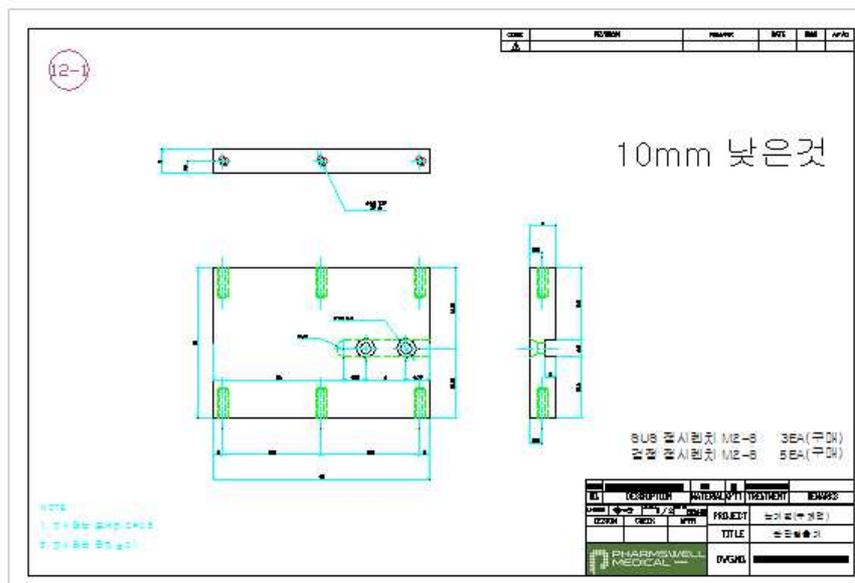


그림 258. 소형 형광 검출기 하단 부분 설계도 12

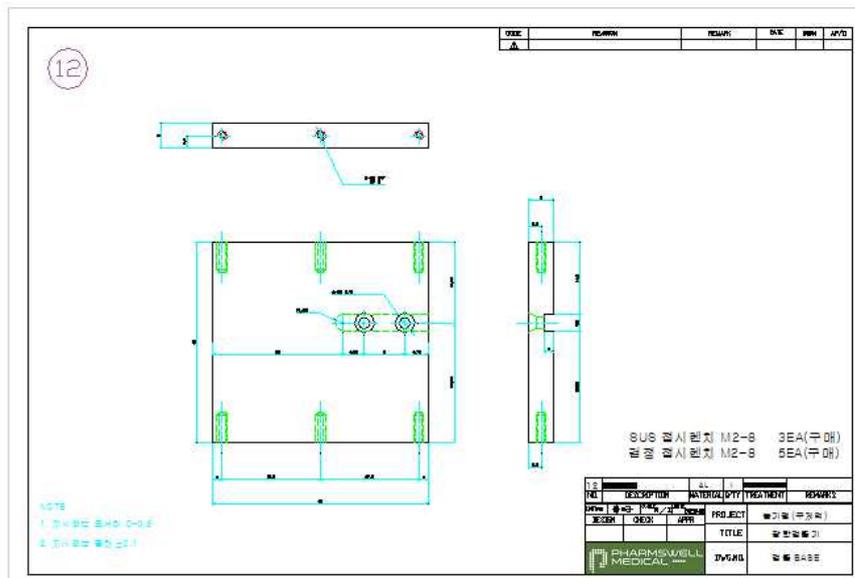


그림 259. 소형 형광 검출기 하단 부분 설계도 13

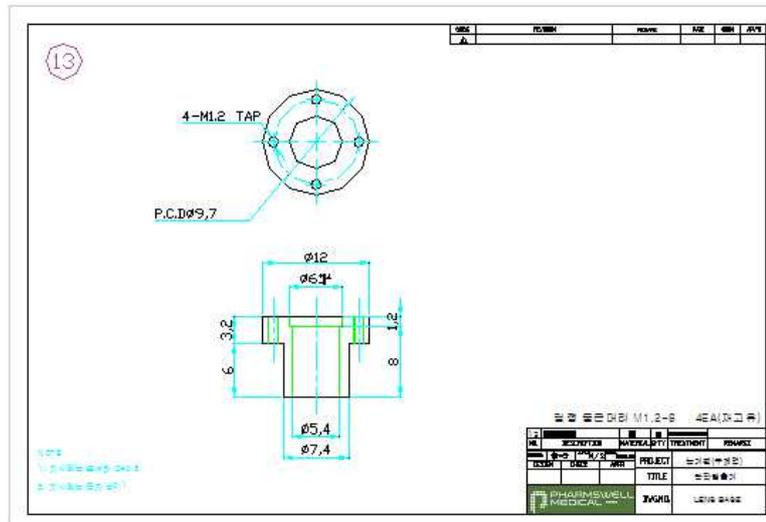


그림 260. 소형 형광 검출기 하단 부분 설계도 14

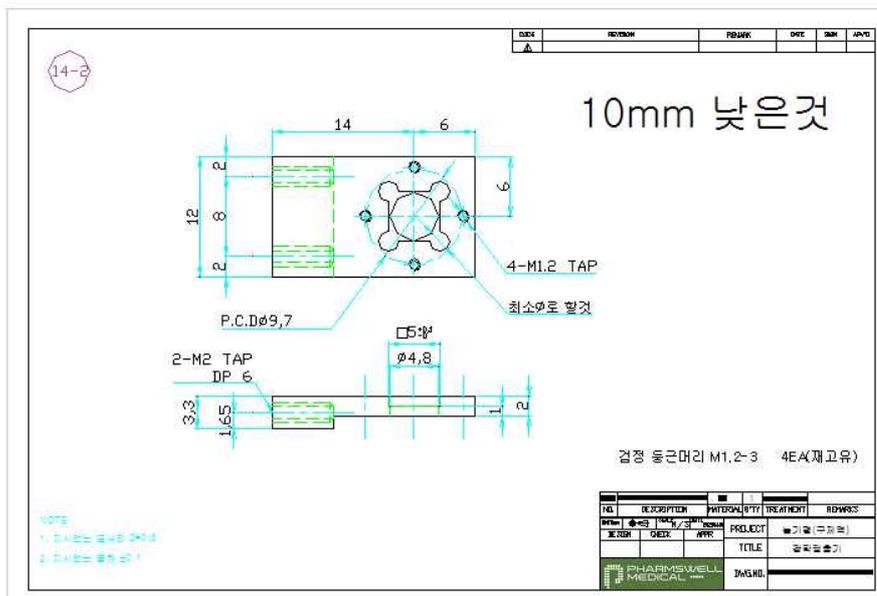


그림 261. 소형 형광 검출기 하단 부분 설계도 15

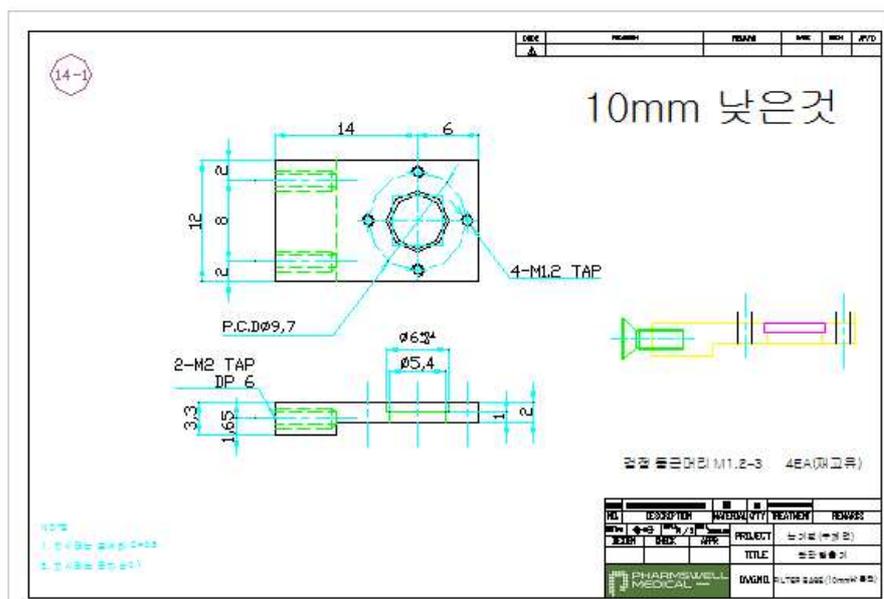


그림 262. 소형 형광 검출기 하단 부분 설계도 16



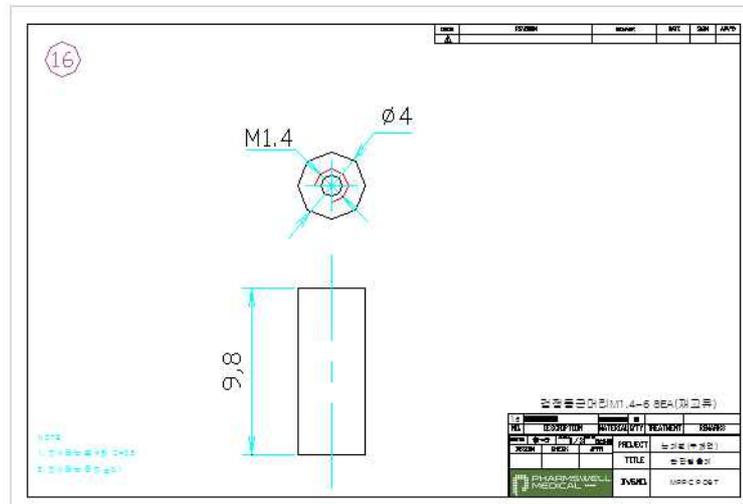


그림 266. 소형 형광 검출기 하단 부분 설계도 20

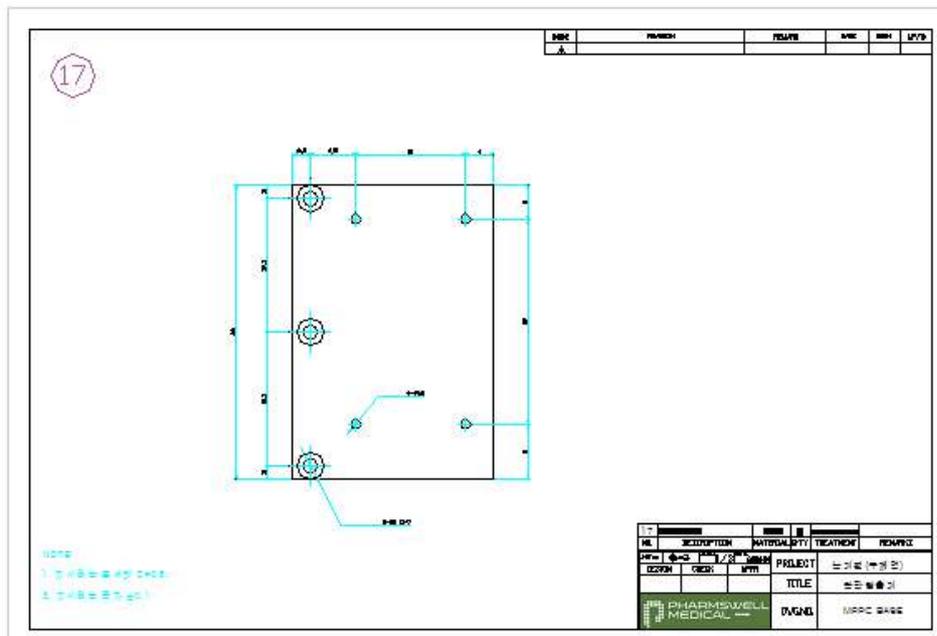


그림 267. 소형 형광 검출기 하단 부분 설계도 21

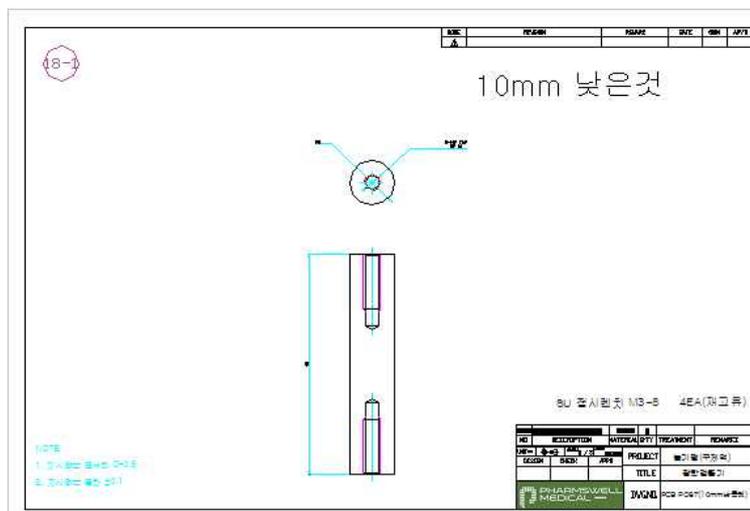


그림 268. 소형 형광 검출기 하단 부분 설계도 22

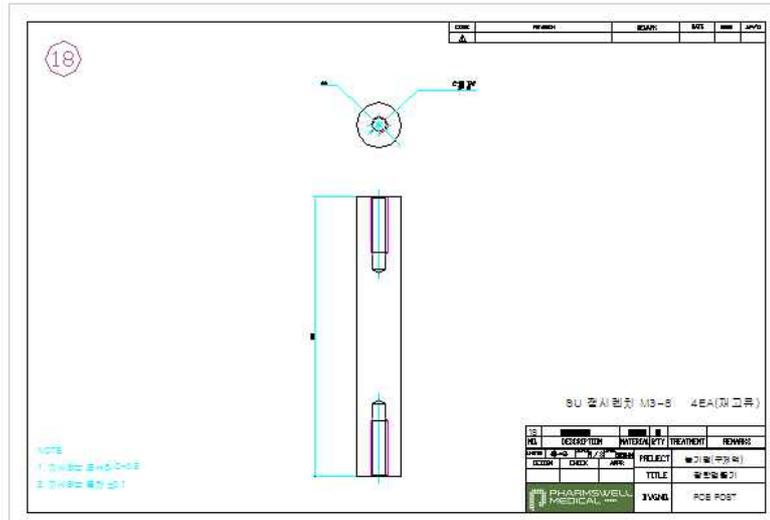


그림 269. 소형 형광 검출기 하단 부분 설계도 23

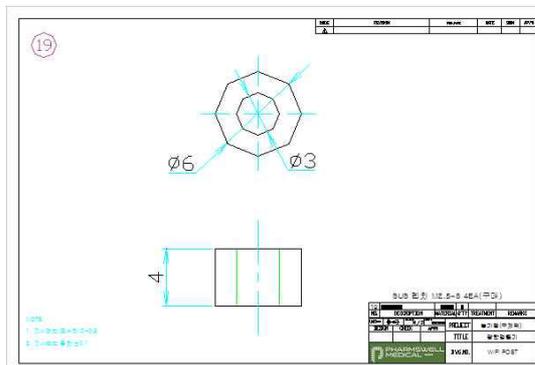


그림 270. 소형 형광 검출기 하단 부분 설계도 24

■ 형광 검출 모듈 제작 전자 제어 부분

- ARM 마이크로컨트롤러 - MCU 16/32-BITS인 STM32F746VGT6을 기반으로 한 구제역 제어 보드로 제작함
- 주요사양
  - 패밀리: ARM® Cortex®-M7
  - 코어 크기: 32비트
  - CPU 속도: 216MHz
  - 프로그램 메모리 크기: 1MB
  - 데이터 RAM 크기: 320KB
  - I/O 개수: 82
  - 데이터 컨버터: A/D 16x12b; D/A 2x12b
  - 동작전압: 1.7V ~ 3.6V
  - 동작온도: -40°C ~ 85°C
  - 실장 유형: 표면실장(SMD)
  - 패키지/케이스: 100-LQFP

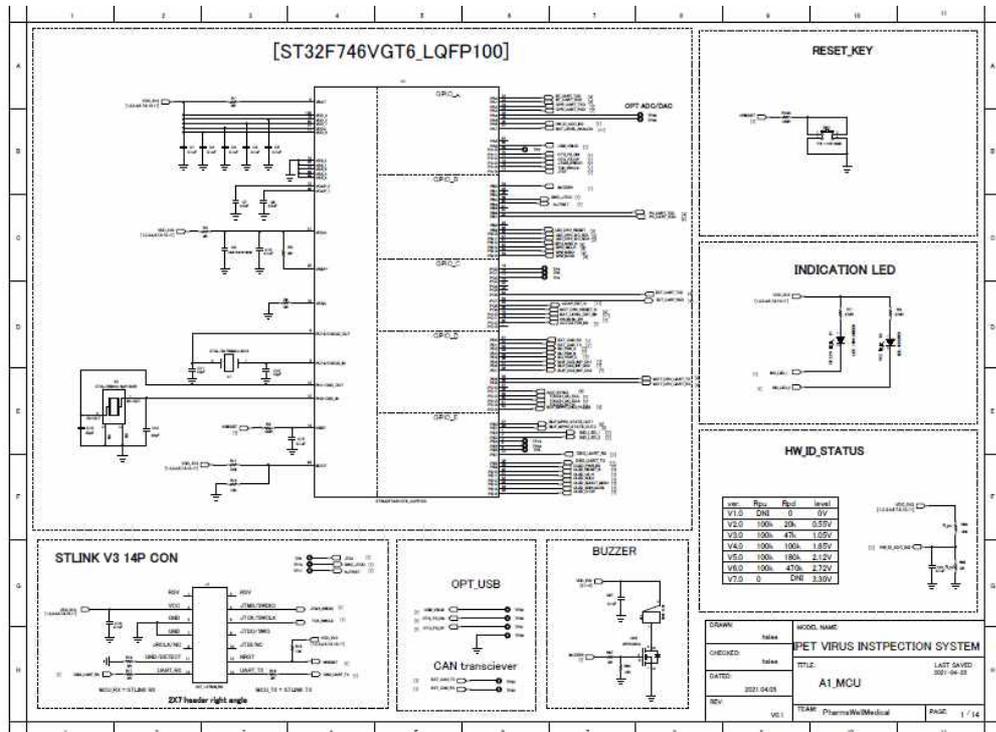


그림 271. 형광 검출 모듈 전자 제어 부분 1

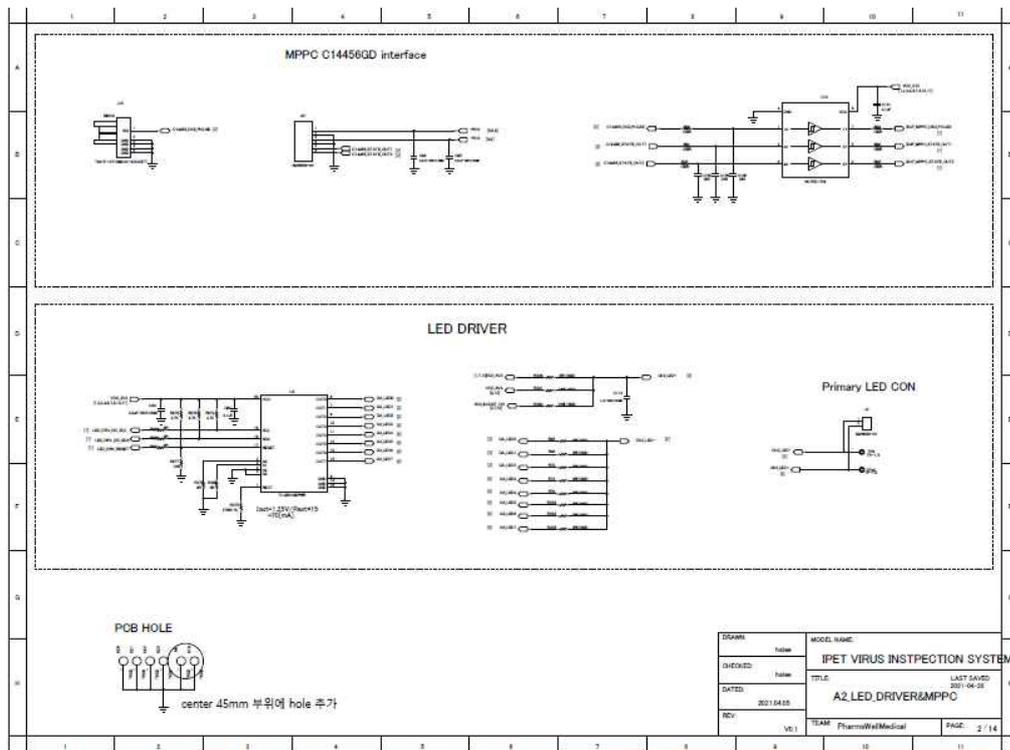


그림 272. 형광 검출 모듈 전자 제어 부분 2

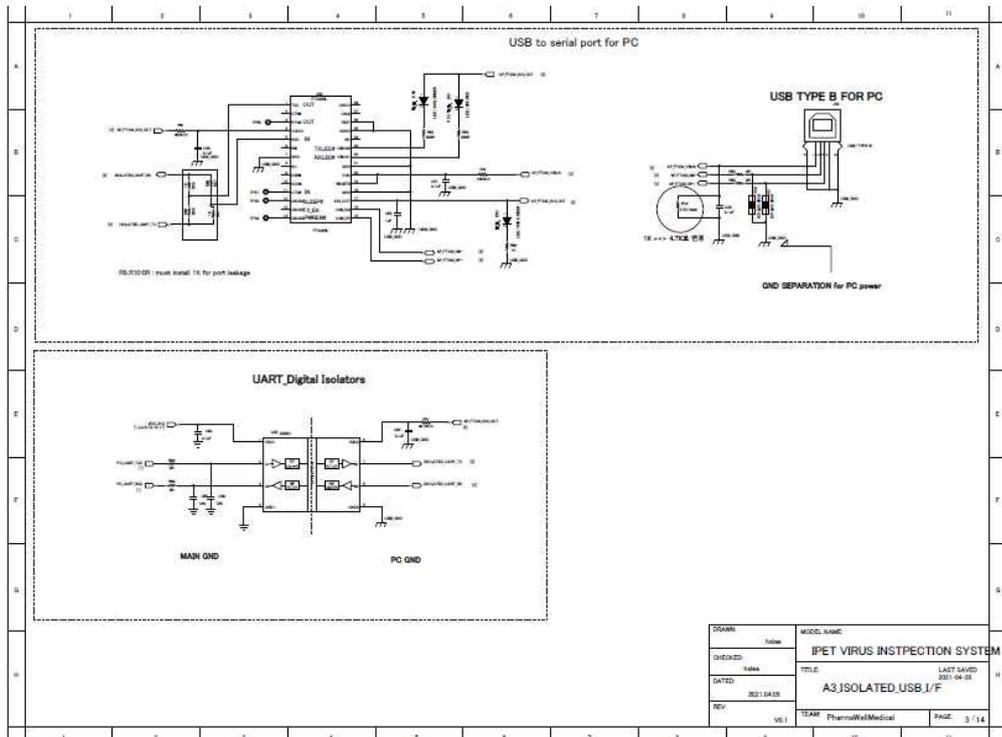


그림 273. 형광 검출 모듈 전자 제어 부분 3

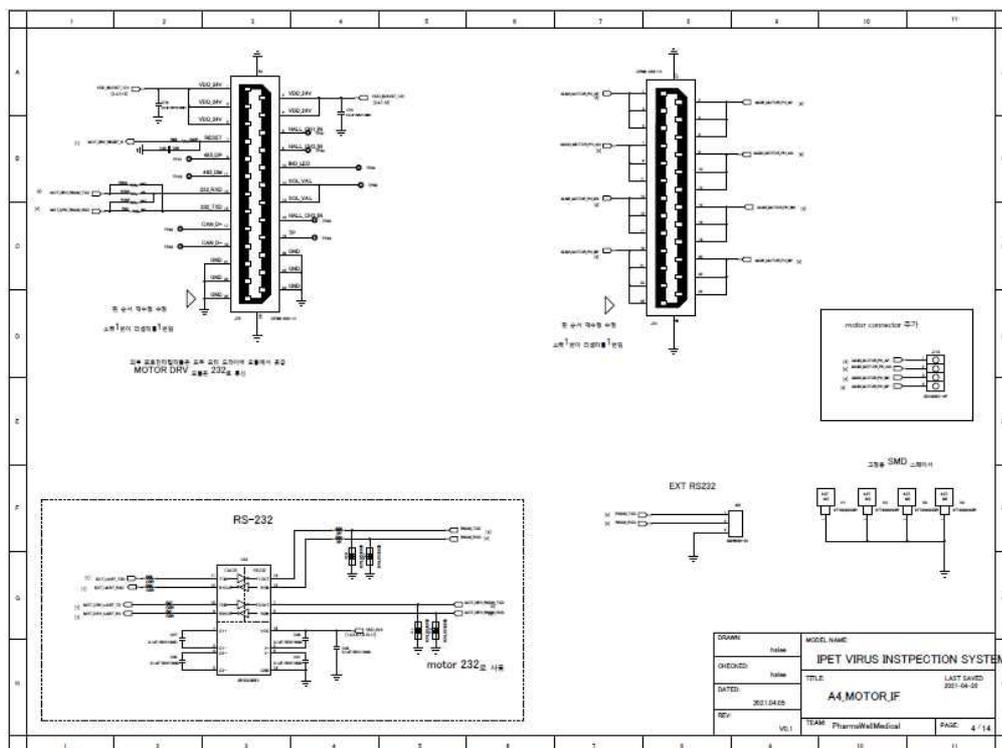


그림 274. 형광 검출 모듈 전자 제어 부분 4

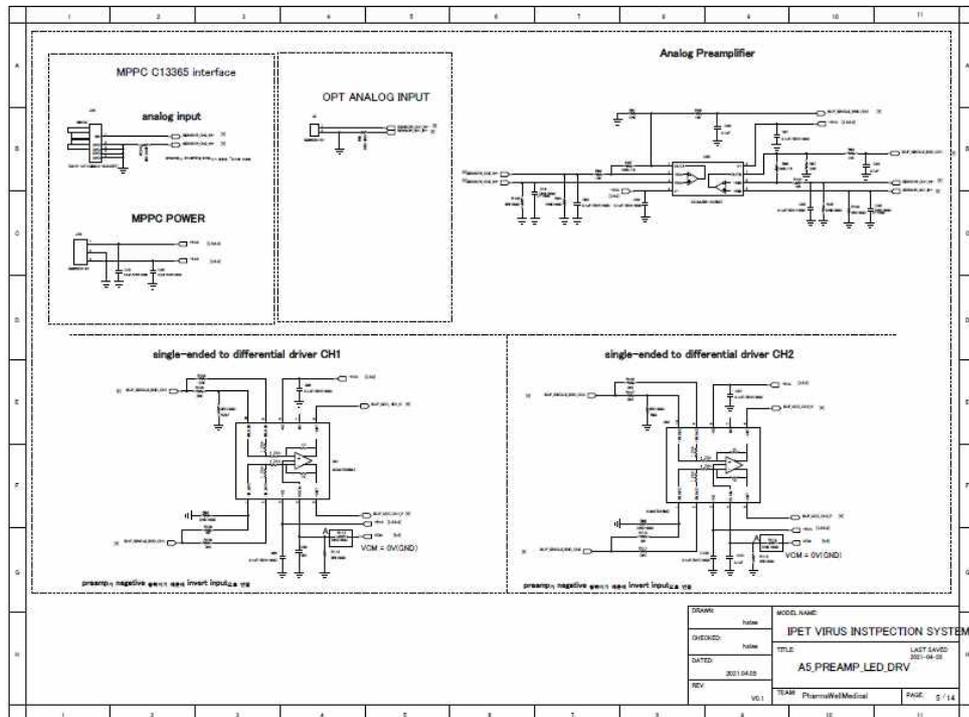


그림 275. 형광 검출 모듈 전자 제어 부분 5

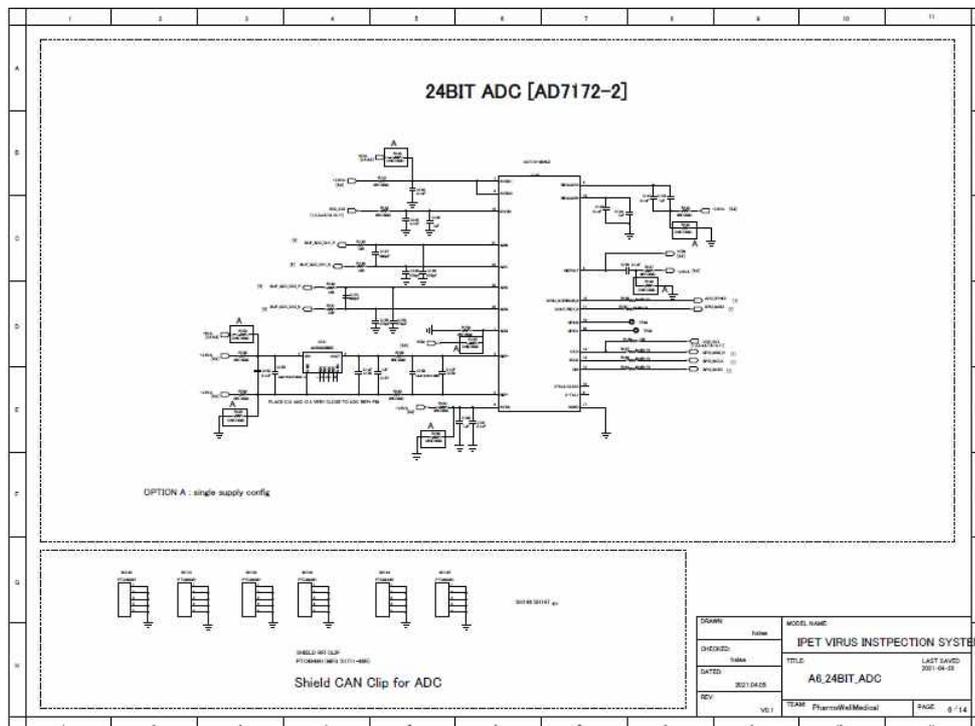


그림 276. 형광 검출 모듈 전자 제어 부분 6

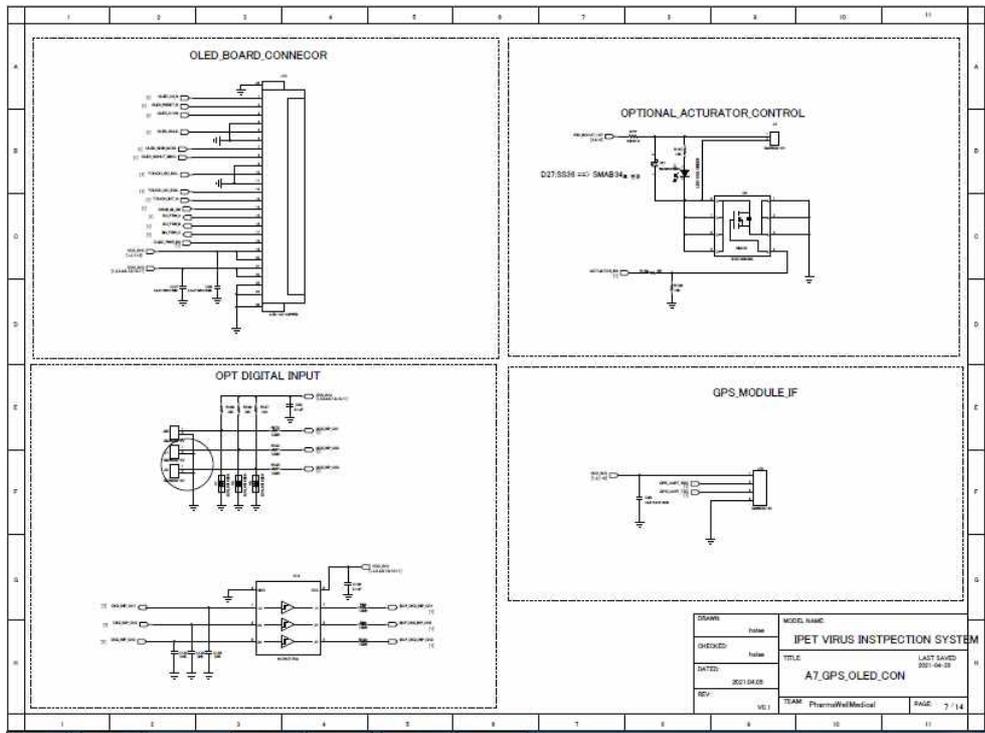


그림 277. 형광 검출 모듈 전자 제어 부분 7

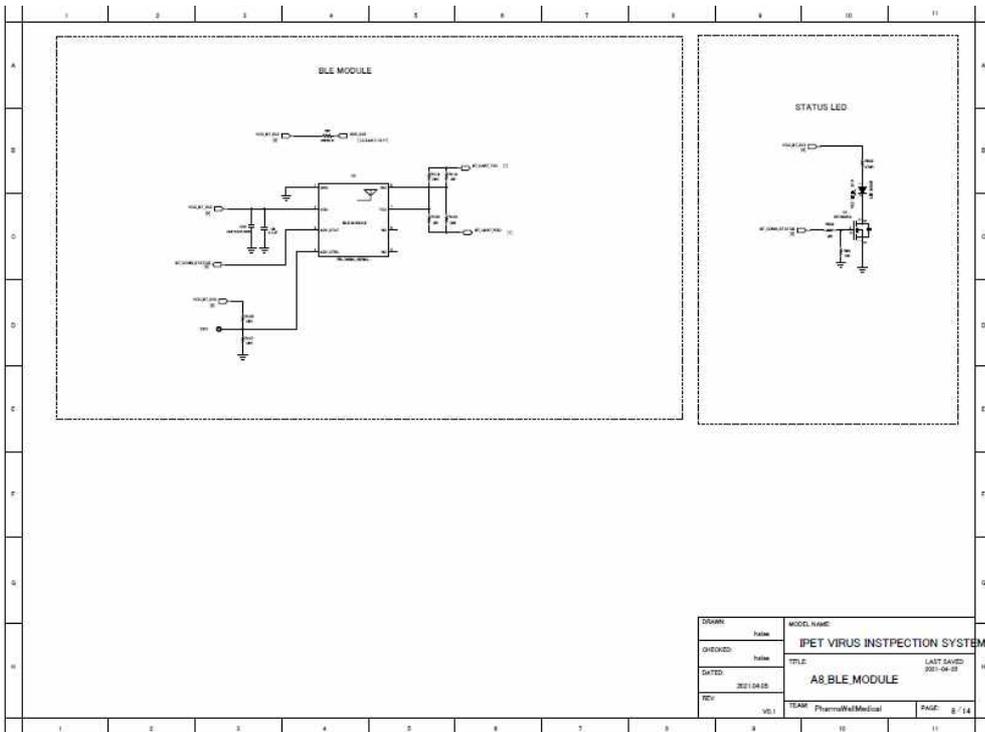


그림 278. 형광 검출 모듈 전자 제어 부분 8

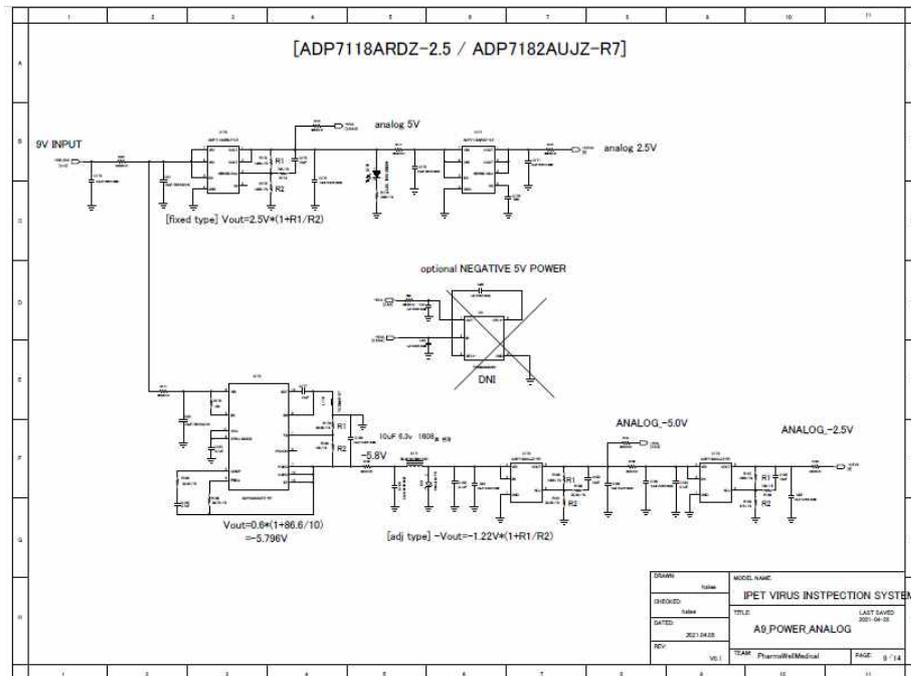


그림 279. 형광 검출 모듈 전자 제어 부분 9

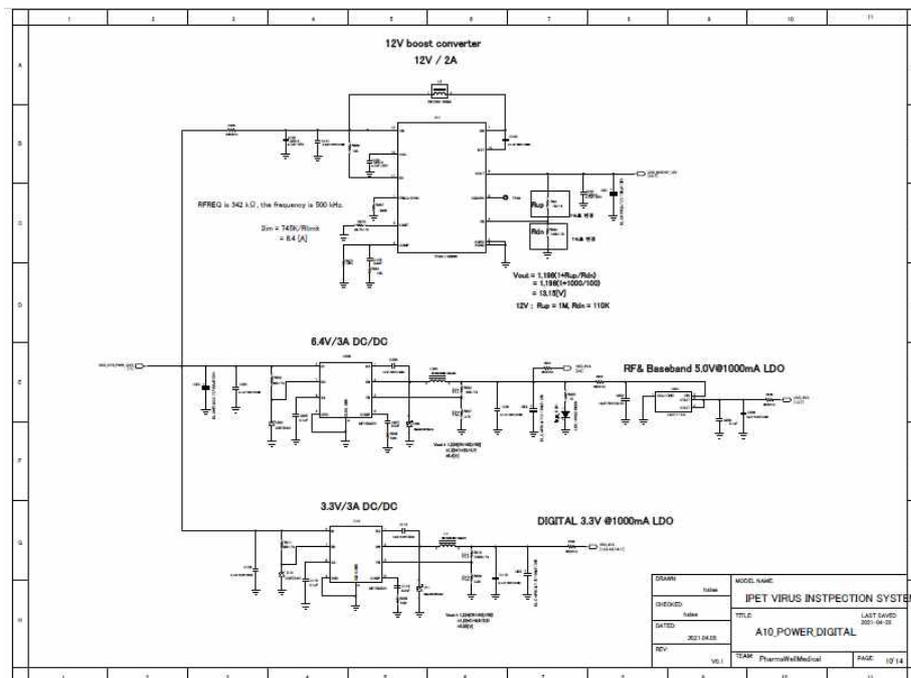


그림 280. 형광 검출 모듈 전자 제어 부분 10

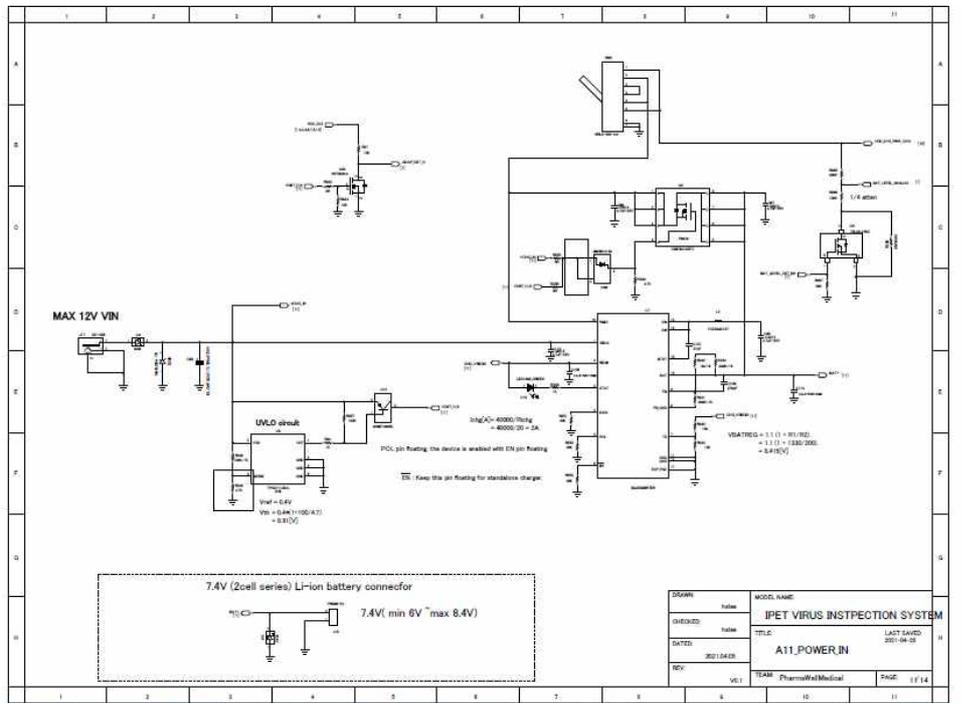


그림 281. 형광 검출 모듈 전자 제어 부분 11

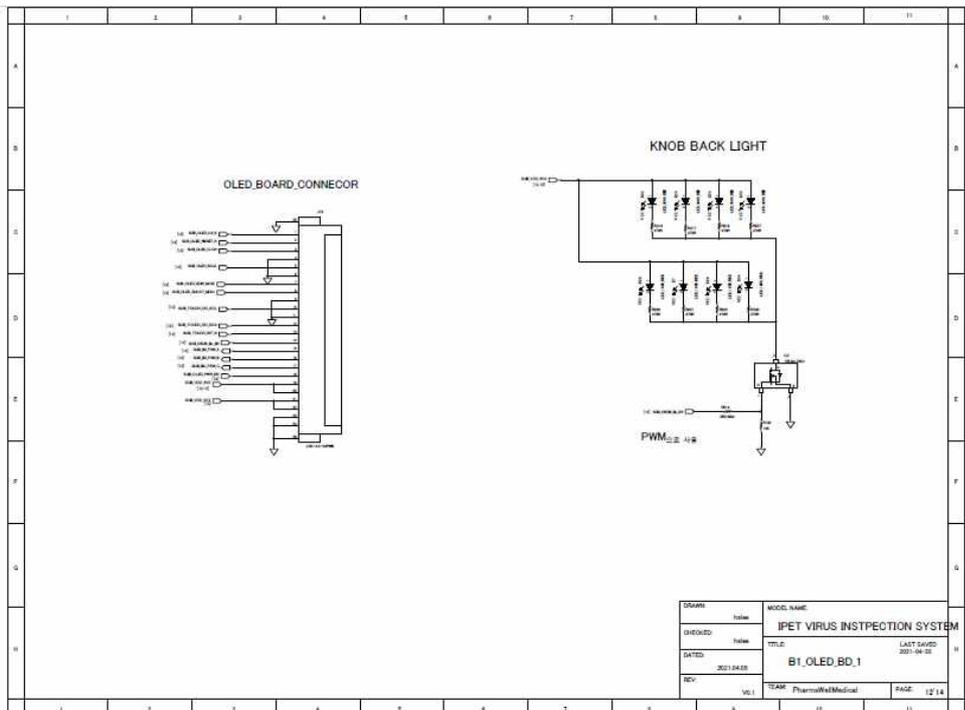


그림 282. 형광 검출 모듈 전자 제어 부분 12

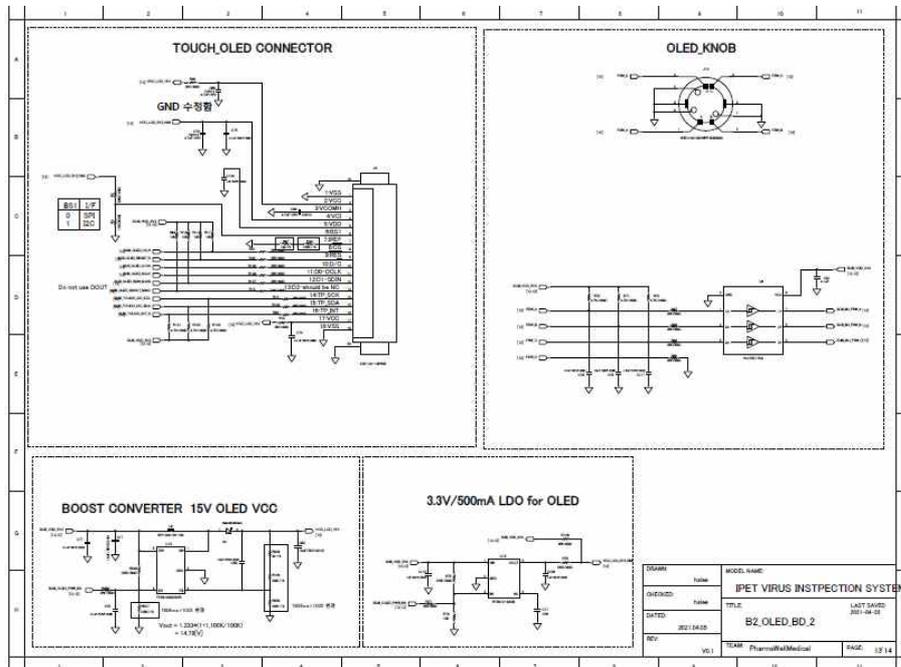


그림 283. 형광 검출 모듈 전자 제어 부분 13

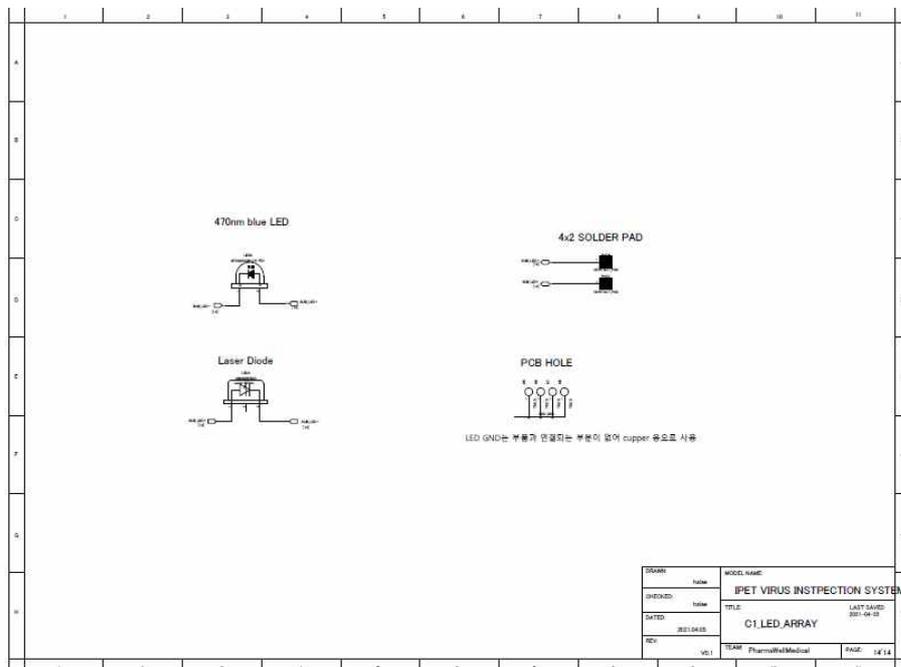


그림 284. 형광 검출 모듈 전자 제어 부분 14

■ 소형 형광 검출 장비 제작

- OLED 기반 모니터와 신호 버튼에 일체형을 사용하며, 내부에 GPS가 있어 측정 장소가 어디를 확인할 수 있는 기능을 가지고 있음
- 그리고 소형 형광 검출 장비에 배터리를 부여하여 현장 진단 키트를 사용할 수 있도록 개발 함

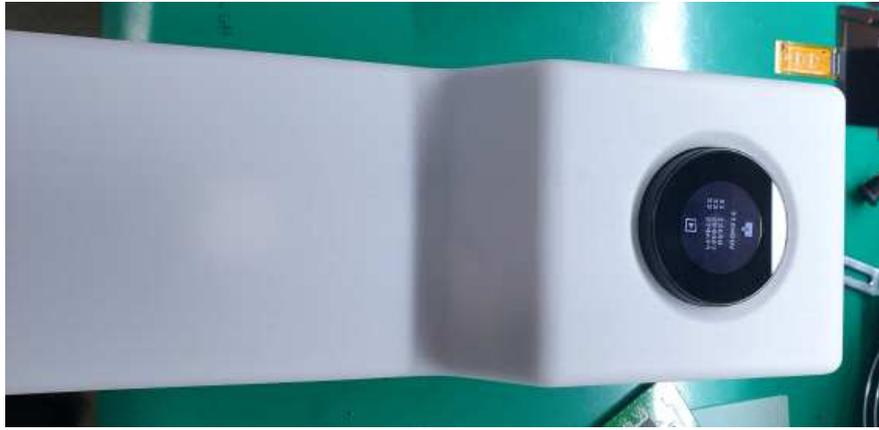


그림 285. 제작한 소형 형광 검출 장비 사진

- 측정할 때 lateral flow sheet를 자동으로 loading 될 수 있도록 하며, 측정 결과는 그 자리에서 바로 확인할 수 있도록 함



그림 286. 제작한 소형 형광 검출 장비를 이용하여 형광을 측정 사진

■ 소형 형광 검출 장비의 모니터링 소프트웨어

- 측정 소프트웨어는 두 가지로 나누어지는 데 소형 형광 검출 장비 자체 소프트웨어에 대한 부분으로써 자체 내에서도 측정 및 GPS 데이터를 받을 수 있도록 함.
- 전원을 켜 상태에서 OLED 패널 및 knob으로 되어 있기 때문에 회전하면서 각종 메뉴를 선택할 수 있도록 함.

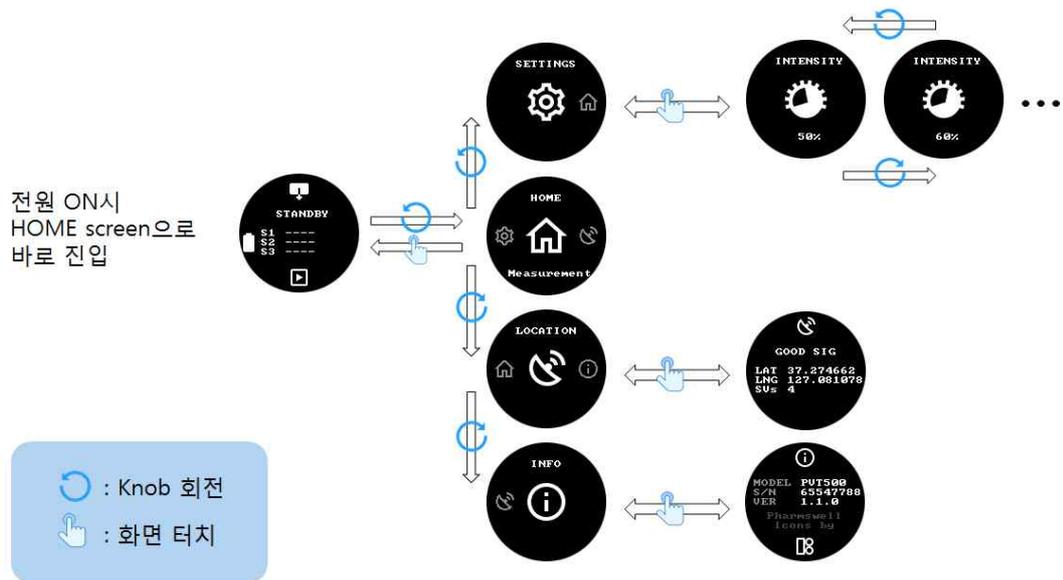


그림 287. 소형 형광 검출 장비의 모니터링 소프트웨어 메뉴

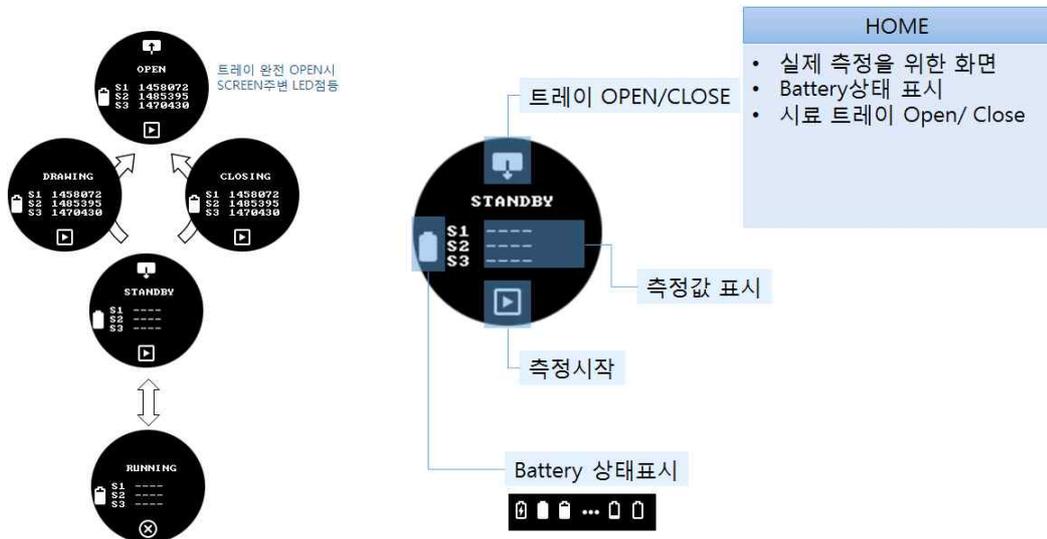


그림 288. 소형 형광 검출 장비의 형광 측정 시 디스플레이

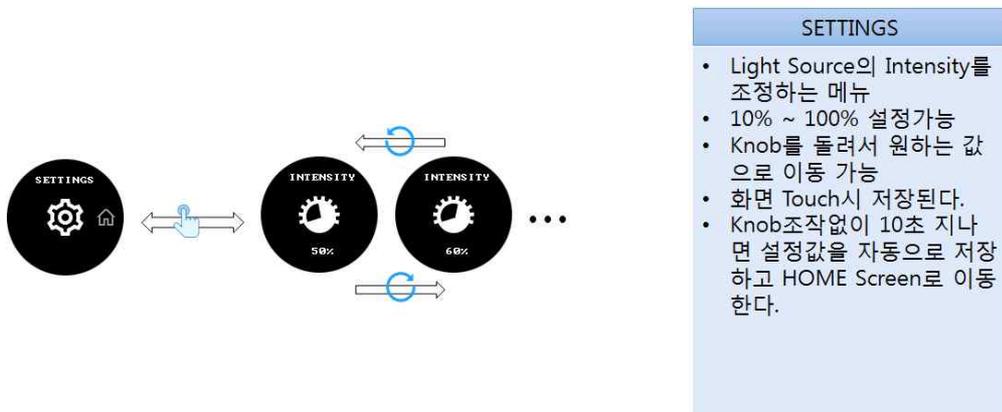


그림 289. 소형 형광 검출 장비의 설정 메뉴 디스플레이

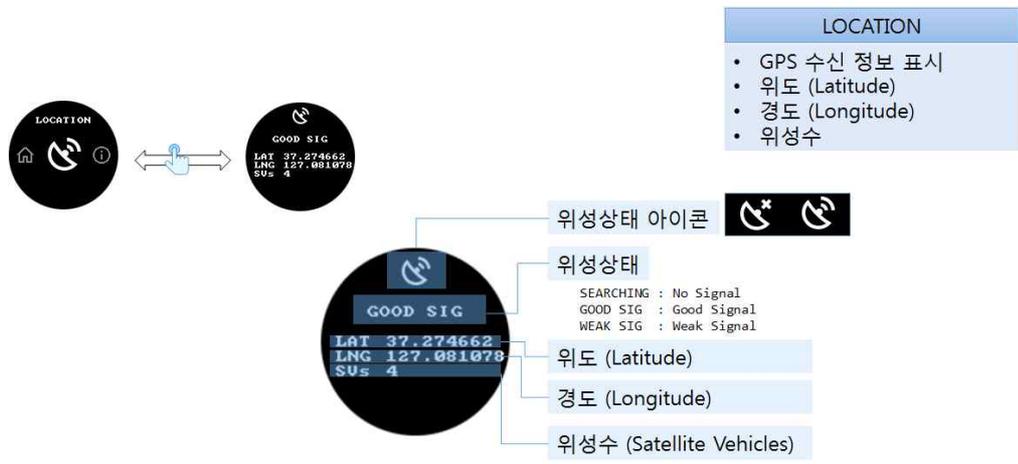


그림 290. 소형 형광 검출 장비의 통신/GPS 모듈 디스플레이

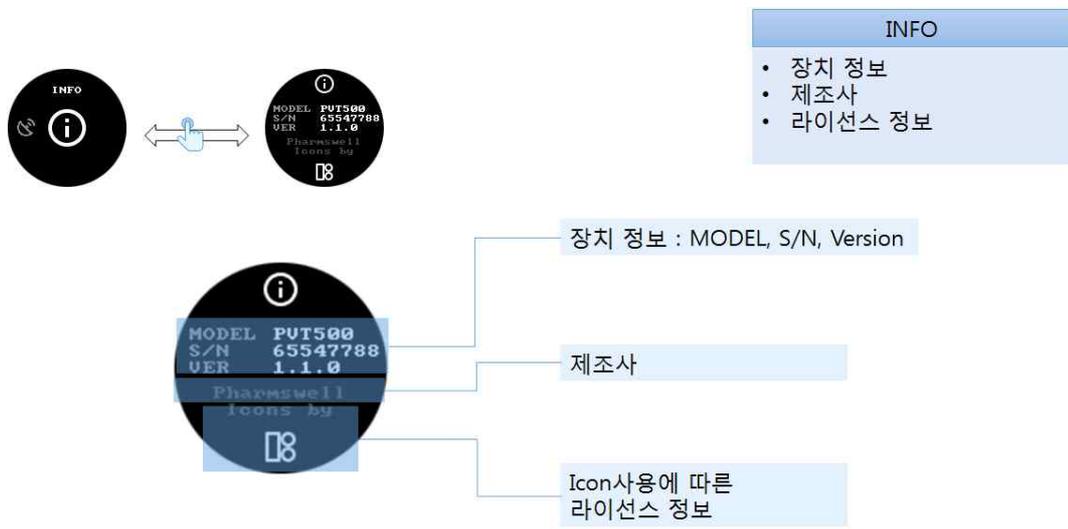


그림 291. 소형 형광 검출 장비의 정보 디스플레이

- 무선 통신을 사용하여 모니터링에서 볼 수 있는 기능이 가지도록 함.
- 모니터링 소프트웨어를 구동할 수 있는 컴퓨터에서 가능한데, Window 10이상 되는 컴퓨터에서 가능하며, Net Framework 4.7.2 이상 인스톨 되어있어야 가능하도록 제작함.

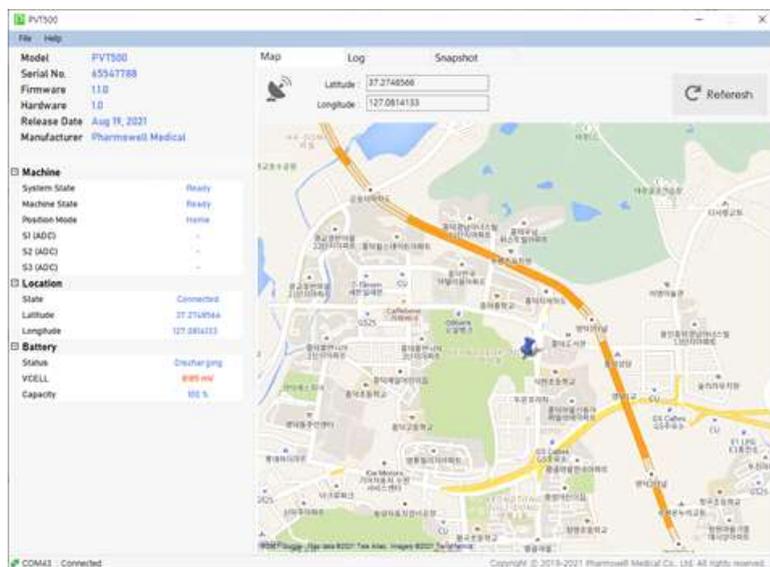


그림 292. 소형 형광 검출 장비의 실시간 모니터링 프로그램

- 설치 프로그램을 통해서 인스톨하게 되면 바탕화면에 아래와 같은 아이콘이 자동 설치됨.

- 설치파일 내려받기 : [PVT500 v1.0.0.zip](#)
- .zip 압축해제 후 .msi 실행하여 아래와 같이 설치



- 설치완료 후 아래와 같이 바탕화면의 PVT500 실행



그림 293. 실시간 모니터링 프로그램 설치 방법

- 소형 형광 검출기와는 무선 통신 방법 중 블루투스를 사용하여 무선 통신을 하게 되면 이 무선 통신을 통해서 장치와 연결 하도록 하며, 통신 연결은 블루투스 시리얼 모듈을 통해서 인식하도록 제작함.



장치관리자에서 연결된 COM 를 선택 후 "Save" 버튼 클릭



선택된 COM port는 저장되어 다음 실행 시 자동으로 연결

**장치 연결방법**

- 원격 연결 : 장치와 연동된 블루투스-시리얼 동글(\*) 사용
- 직접 연결 : 장치의 USB Cable을 PC와 연결



\* 블루투스-시리얼 동글

그림 294. 장치와 통신 연결 방법

- 통신이 완료되었으으며, 아래와 같은 메인 메뉴가 만들어지는데 메인 메뉴에는 측정 지도까지 나타나게 되는 데 위성 상태, 위치 좌표 그리고 장치 상태와 장치 정보가 확인할 수 있음.
- 장비 상태는 소형 형광 검출기 장비에 측정된 값이 그대로 전달되도록 함.

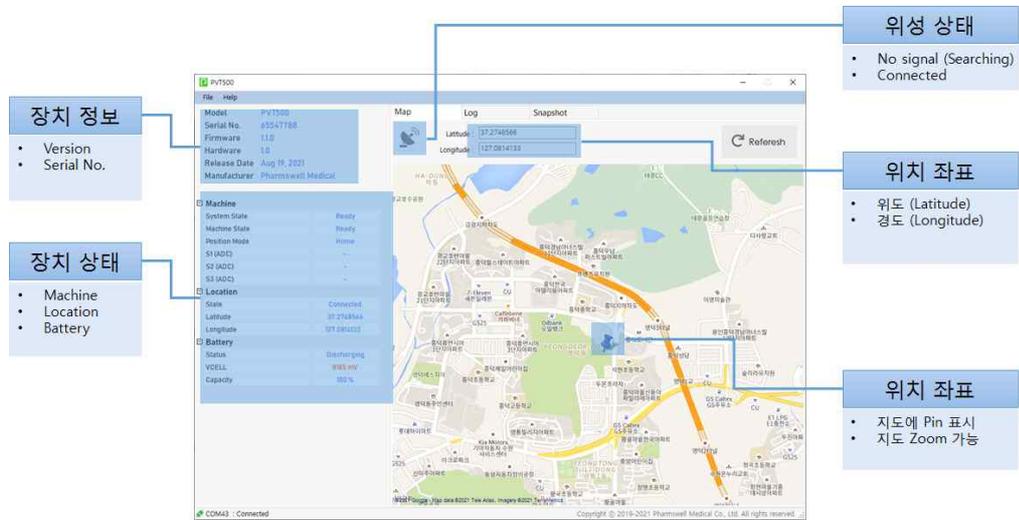
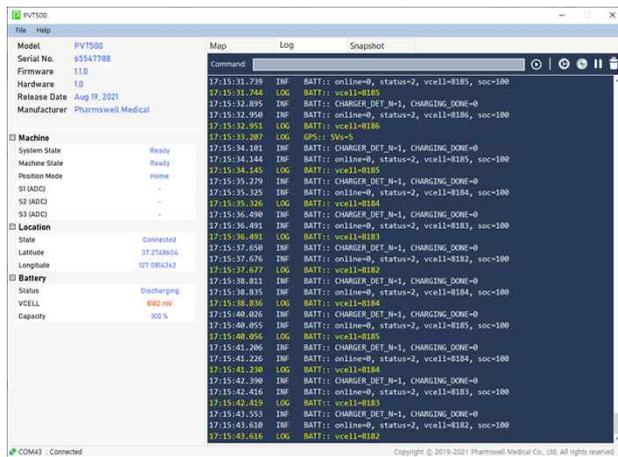


그림 295. 소형 형광 검출 장비의 상태 및 위치 정보가 포함된 실시간 모니터링 프로그램 창

- 로그뷰어를 통해서 측정된 장치 결과 및 GPS 값 등이 실시간으로 확인 가능하며 자동 저장도 가능하도록 제작함.



- Log Viewer**
- 장치내 로그를 실시간 확인.
  - 로그 저장 기능
  - 메시지 필터 기능
  - 장치 개발/분석에 활용

그림 296. 프로그램 내 로그 뷰어 창

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

###### ① 역유전학 기법을 통한 증식 능력이 제거된 모델 바이러스 생산 기술 개발

- 동물 바이러스 검출용 키트 개발 과정에서 다량의 바이러스 입자 확보하고, 새로운 동물 감염 유발 위험을 줄이며, 실험자 안전을 향상시킬 방안으로 구제역 바이러스 또는 조류 인플루엔자 바이러스 유전자들을 포함한 증식 능력이 제거된 모델 바이러스를 생산하였음. 이를 통해 충분한 실험용 시료 및 실험자 안전을 확보하였고 새로운 동물 감염의 위험도 제거하였음.

###### ■ 모델 바이러스 생산을 위한 유전체 발현용 벡터 플라스미드 구축

- 모델 바이러스 생산을 위해 기능성 입자가 더 많이 만들어지는 유사 레트로바이러스인 Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) 플랫폼을 사용하였음. 그림 297과 같이 HIV-1 유전체 발현용 플라스미드 DNA (pFCGW)에 확보된 구제역 및 조류 인플루엔자 바이러스 유전자 DNA를 분자생물학적 방법을 통해 삽입하였고, 증식을 위한 유전자 전부가 제거된 HIV-1 유전체 플라스미드를 사용하여 실험자 안전을 확보하였음.
- 유전자 발현 분석으로 생산된 모델 바이러스 입자를 정량하기 위해 모델 바이러스 유전체에 eGFP (녹색 형광 단백질) 유전자를 도입하였음.
- 구축한 유전체 발현용 플라스미드 종류는 총 7개로, 구제역 바이러스 혈청형 세종류 (O, A, Asia1) 모델 바이러스를 위한 3개와 조류 인플루엔자 바이러스 2가지 아형 (H5N8, H9N2) 모델 바이러스를 위한 플라스미드 각 2개씩 총 4개를 설계하고 제작함 (그림 298).

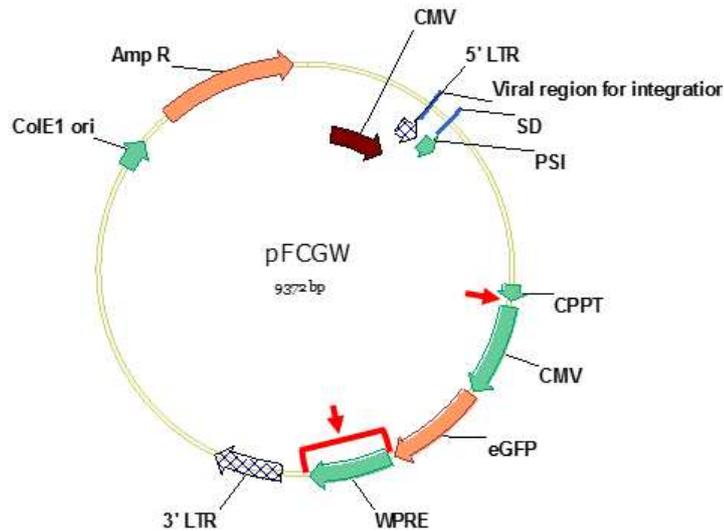


그림 297. 증식 능력이 제거된 HIV-1 유전체 생산을 위한 플라스미드.

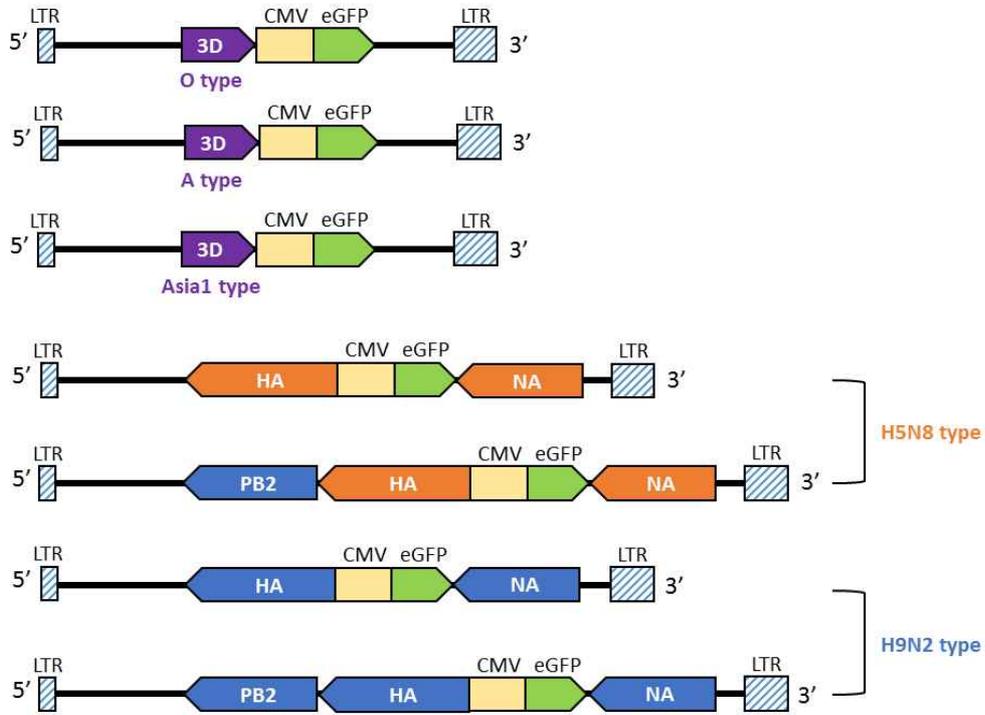


그림 298. 구제역 모델 바이러스 및 조류 인플루엔자 모델 바이러스 유전체 발현용 플라스미드 구조. LTR: Long terminal repeat.

■ 구제역 및 조류 인플루엔자 모델 바이러스 생산.

- 증식 능력이 제거된 모델 바이러스를 생산하기 위해 그림 299와 같이 구제역 및 조류 인플루엔자 바이러스 유전자를 포함하는 HIV-1 유전체 발현용 플라스미드와 나머지 바이러스 단백질 발현을 위한 플라스미드를 생산 세포인 HEK293T에 도입함. 플라스미드 도입 2-3일 후 세포 배양액으로 방출된 바이러스 입자를 수확하고 초원심분리 과정을 통해 정제/농축함
- 최종적으로 구제역 바이러스 3가지 혈청형의 모델 바이러스 3종과 조류 인플루엔자 바이러스 2가지 아형의 모델 바이러스 4종을 생산하였음.

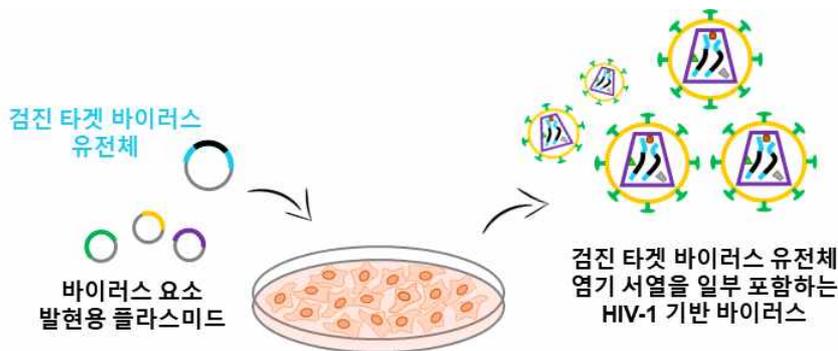


그림 299. 증식 능력이 제거된 검출 실험용 모델 바이러스 제작.

■ 생산된 시료내 물리적 바이러스 입자수와 기능적 입자수의 정량.

- 생산된 시료내 구제역 및 조류 인플루엔자 모델 바이러스의 물리적 입자수는 바이러스 입자가 가지는 핵산 정량을 통해 측정하였고, 이를 위해 실시간 중합효소연쇄반응을 적용했으며 그 결과는 표 21과 같음

표 21. 생산된 시료 내 모델 바이러스 물리적 입자수  
(1 $\mu$ L 시료 내 입자 개수로 농도 정의)

Virus particle number / $\mu$ L		
구제역 모델 바이러스	O	3.64E+07
	A	7.60E+06
	Asia1	2.12E+07
조류 인플루엔자 모델 바이러스	H5N8	1.65E+07
	PB2H5N8	2.52E+07
	H9N2	1.49E+07
	PB2H9N2	2.29E+07

- 시료 내 기능적 모델 바이러스 입자수는 시료 용액으로 HEK293T 세포를 형질 전환하고 그 결과로 관찰되는 eGFP 발현 세포를 정량하여 분석하였고 그 결과는 그림 300과 같다.

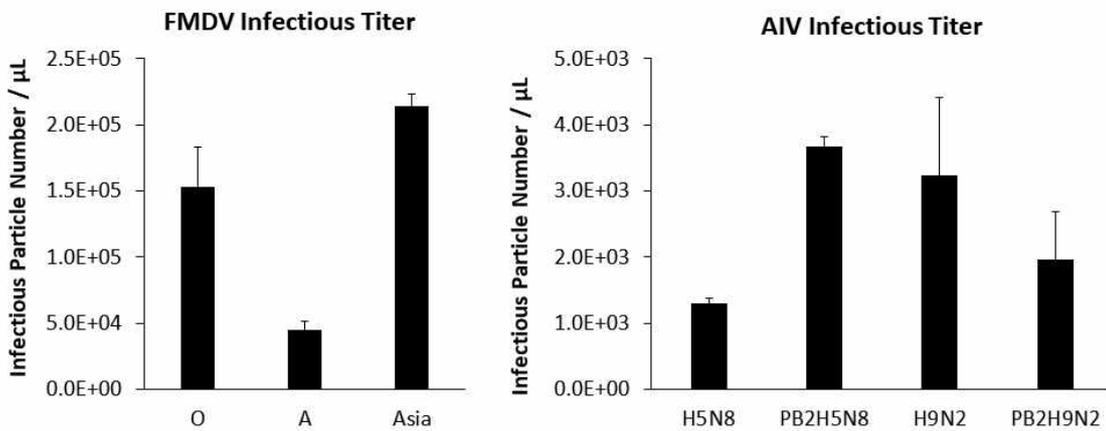


그림 300. 모델 바이러스 시료 내 기능적 바이러스 입자수 정량.

바이러스 입자에 의해 형질 전환된 세포는 녹색 형광 단백질을 발현하고 이를 유세포 분석기를 사용하여 정량, 시료내 기능적 바이러스 입자수를 결정하였음. 농도의 단위는 시료 1  $\mu$ L 내, 감염능이 있는 기능적 바이러스 입자의 수로 나타내었음.

- 물리적 입자수, 기능적 입자수 정량과 바이러스 입자에 의한 세포 형질 전환 확인을 통해 모델 바이러스 입자의 효율적 생산을 검증하였음.

② 야생 바이러스 생산 방법 구축 및 RNA 유전체 추출 기술 개발

■ 야생 바이러스 생산 방법 구축

- 모델 바이러스 적용 실험을 통해 얻은 최적화된 탐침 분자와 검출 조건을 실제 바이러스에 검출에 적용하기 위해 야생 바이러스 (wild type virus)가 필요함.
- 야생 구제역 바이러스의 경우, T7 프로모터로 바이러스 유전체 서열의 전사를 유도할 수 있는 플라스미드와 바이러스 입자 형성에 필요한 단백질 발현용 플라스미드들을 함께 생산 세포에 도입하면 바이러스 유전체 RNA와 단백질이 생성되고 이들의 자기조립을 거쳐 바이러스 입자가 만들어질 수 있음 (그림 301).
- 야생 인플루엔자 바이러스의 경우, 분절된 RNA 유전체를 각각 발현할 수 있는 8종의 플라스미드 및 바이러스 단백질 생산용 플라스미드 시스템을 세포에 도입함으로써 야생 바이러스를 생산하고자 하였음 (그림 302).

### 야생 구제역 바이러스 생산을 위한 유전체 cDNA



### 세포를 이용한 야생 구제역 바이러스 생산 과정

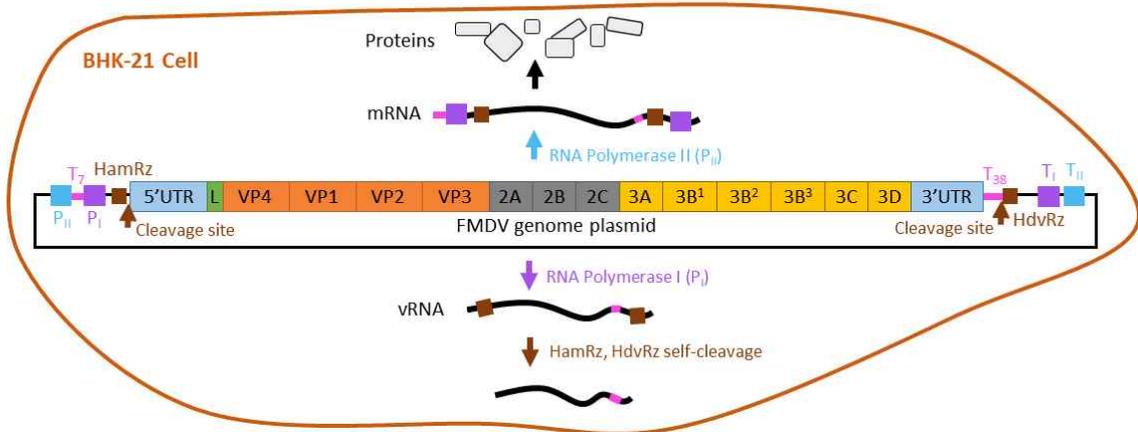


그림 301. 역유전학 기법을 이용한 야생 구제역 바이러스 생산.

### 세포를 이용한 야생 조류 인플루엔자 바이러스 생산 과정

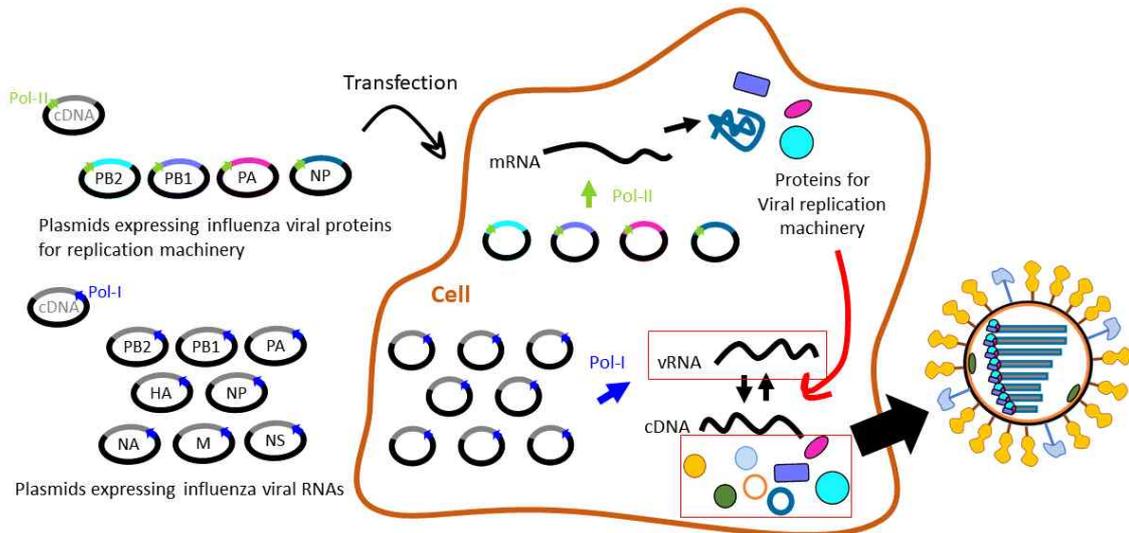


그림 302. 역유전학 기법을 이용한 야생 인플루엔자 바이러스 생산.

#### ■ 야생 바이러스 생산

- 증식 능력을 가진 야생 구제역 바이러스와 병원성을 가지는 야생 조류 인플루엔자 바이러스의 경우, 감염 발생을 방지하기 위하여 BSL3 이상 수준의 특별한 시설에서만 바이러스를 다룰 수 있음. 이를 대체하기 위해, 조류 인플루엔자 바이러스와 매우 유사한 유전체 구조와 서열을 갖고 BSL2 시설 (숙명 여대)에서 실험이 가능한 야생 인간 인플루엔자 바이러스를 생산, 검출 실험에 적용하였음. 야생 인간 인플루엔자 바이러스는 그림 302에 나타난 방식에 따라, 인플루엔자 바이러스 유전체 및 단백질 발현을 위한 총 12-13가지

플라스미드를 세포에 동시에 도입하여 생산하였음.

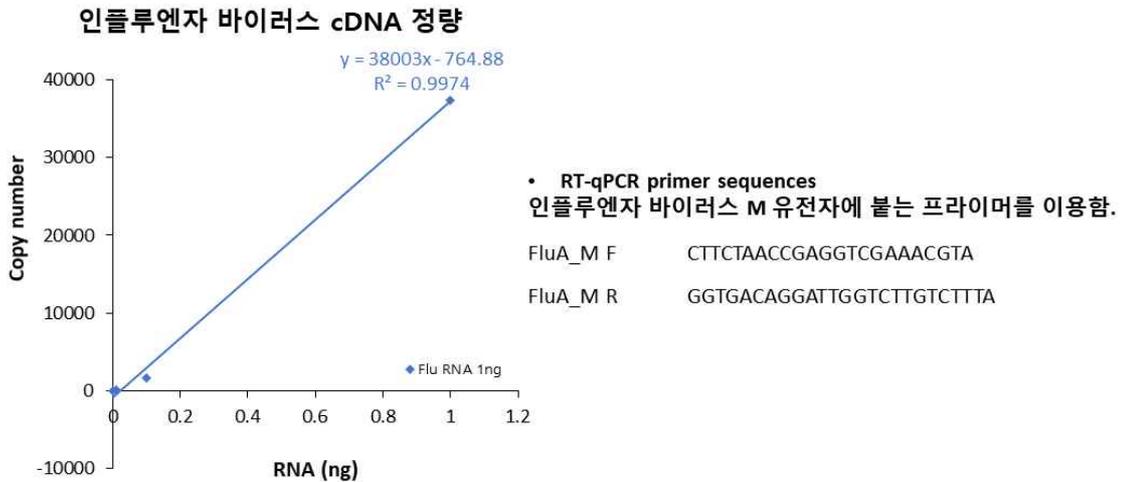


그림 303. 역전사 반응 및 실시간 중합효소연쇄반응을 이용한 바이러스 유전체 RNA 정량.

- 바이러스 생산 여부를 검증하기 위해 세포 감염을 통한 바이러스 유래 세포 사멸 현상을 확인하였고, 그림 303과 같이 바이러스 입자로부터의 유전체 RNA를 cDNA로 전환한 후 중합효소연쇄반응을 통해 바이러스를 정량하여 바이러스 생산 여부를 추가 확인하였음.
- 바이러스의 M 유전자와 상보 관계에 있는 프라이머를 이용하여 바이러스 유전체 RNA의 cDNA를 대상으로 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하였음. 상당한 수준에서 인플루엔자 바이러스 특이적 프라이머에 의한 핵산 증폭이 관찰되었음. 이 결과는 야생 인간 인플루엔자 바이러스가 생산되었음을 나타냄. 야생 바이러스 입자로부터 추출로 얻어진 RNA 1 ng 당 38,000개의 유전체 cDNA가 생성되었음.

#### ■ 야생 바이러스 RNA 유전체 추출

- 가축이 구제역 바이러스에 감염되었는지 진단할 때 주로 사용되는 시료로 타액, 수포, 조직, 혈액 등이 있음. 위에서 언급한대로, 구제역 바이러스에 감염된 시료는 법적으로 허가 받은 극소수 연구시설에서만 다룰 수 있음. 혈액을 포함한 이와 같은 시료로부터 얻은 구제역 바이러스 입자에서 RNA 유전체를 추출할 수 있는지 모사하기 위해 그림 304와 같이 인간 혈액에 존재하는 HIV-1 (인간면역결핍 바이러스)로부터 RNA 유전체를 추출하였음.
- 기존에 사용했던 상용 kit (Zymo Research 사의 Direct-zol RNA miniprep kit)를 이용하여 1 mL의 혈액 시료로부터 바이러스 유래 RNA를 추출하였으며, 추출하는 과정에서 DNase I을 처리함으로써 오염물질로 작용할 수 있는 혈액세포의 DNA들을 제거함. RNA 추출 결과 그림 304의 오른쪽 그래프와 같이 높은 RNA 순도를 확인하였고, 잔존하는 화학 물질 또는 단백질 오염이 거의 없음을 나타내는 흡광도 결과를 얻음.
- 분리된 RNA에 바이러스 RNA가 존재함을 역전사 반응과 실시간 중합효소연쇄반응을 통해 확인하였음.

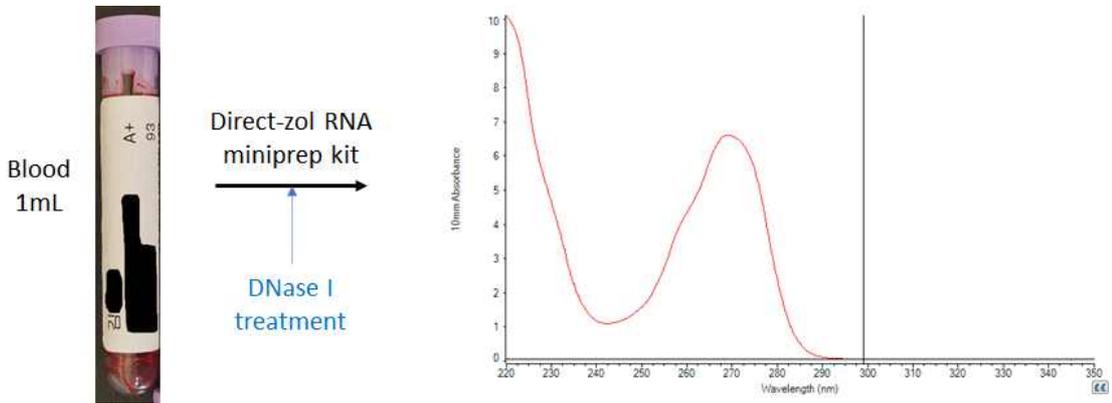


그림 304. 혈액 시료로부터 바이러스 유전체 RNA 추출 결과.

- 유사하게, 역전사 방법으로 생산한 인간 인플루엔자 바이러스 입자로부터 바이러스 RNA 유전체를 추출하여 검출 실험에 적용하였음.

③ 조류 인플루엔자 바이러스 및 구제역 바이러스의 존재를 검지할 수 있는 형광 분자 표지 (fluorescence molecular beacon) 설계 및 개발

■ 모델 바이러스 핵산 염기 서열과 잘 결합할 수 있는 형광 분자 표지 설계 및 제작

- 숙명여대에서 제공받은 HIV-1의 viral RNA에 상보적인 sequence 중 U3 region을 참고하여 loop 부분과 stem 부분 염기서열을 먼저 설정하고, 이를 열역학적 분석을 통해 안정적인 이차구조를 갖는지 확인 후 일부 염기서열의 수정을 통해 target 핵산에 특이적으로 결합하고, 소광이 안정적으로 작동할 수 있는 형광 분자 표지를 제작함. 그 구조와 염기 서열은 그림 305와 같음.

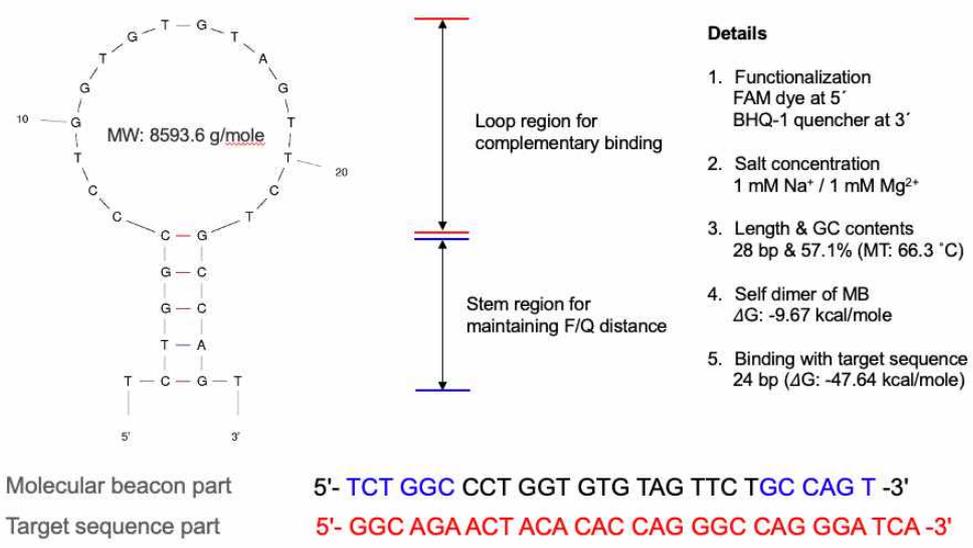


그림 305. 모델 바이러스를 이용해 제작한 형광 분자 표지의 염기서열과 구조

- 형광 분자 표지의 5' 말단에는 FAM dye를, 3' 말단에는 BHQ-1 quencher을 기능화 하였음. 또한, 염기 서열 중간 부분에 phosphothioate를 기능화하였는데, 이는 종이에의 기능화를 위한 internal modification임.

■ 용액 상에서의 형광 분자 표지의 target DNA에 대한 발광 거동 및 반응 특이성 확인

- 그림 306은 기능화되지 않은 제작 상태 그대로의 형광 분자 표지(pristine molecular beacon, p-MB)와, 기능화된 형광 분자 표지(functionalized molecular beacon, f-MB)

를 각각 형광 테스트한 결과임.

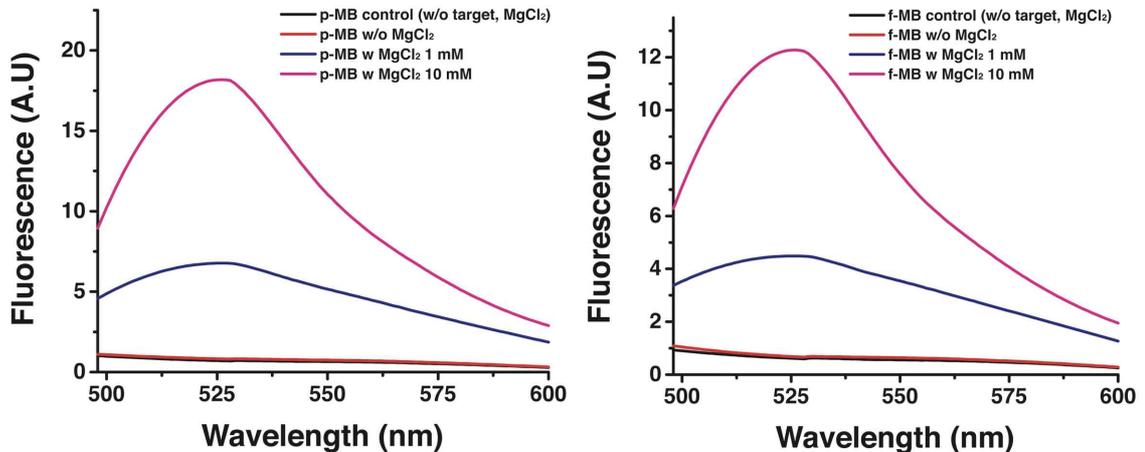


그림 306. 기능화 전 후 형광 분자 표지의 형광 테스트 결과

- 형광 테스트 결과를 보면,  $MgCl_2$ 가 들어가지 않은 형광 분자 표지의 경우 target DNA가 들어가더라도 control과 형광 세기 차이가 나타나지 않는 것으로 나타나 반응이 거의 일어나지 않는 것으로 보이며, 이는 molecular beacon이 안정적으로 이차구조를 유지하고 있어 salt concentration 없이는 쉽게 반응이 일어날 수 없는 것으로 해석됨.
- 이에 반해  $MgCl_2$ 를 사용한 조건에서는 형광 세기가 증폭된 것을 확인할 수 있는데, 이는  $Mg^{2+}$  이온의 charge screening 효과에 의해 molecular beacon과 target DNA가 거리를 유지하고 있는 원동력인 surface charge가 약화되어 debye length가 감소하고, 이로 인해 반응성이 향상되기 때문인 것으로 생각됨.

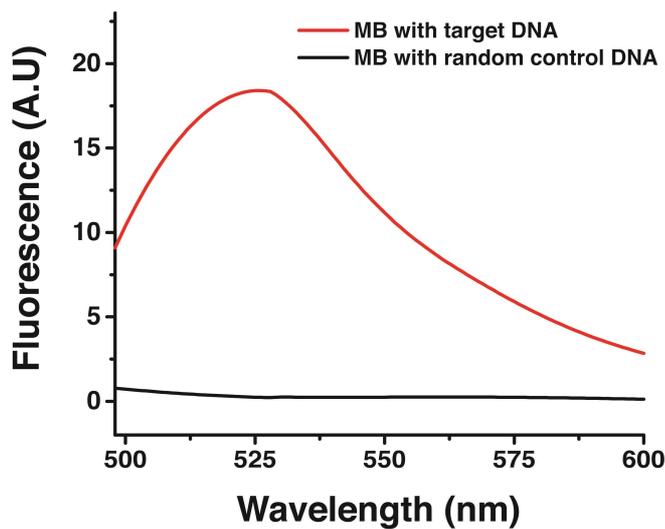


그림 307. Random control DNA를 이용한 형광 분자 표지의 반응 특이성 확인

- 형광 분자 표지의 target DNA에 대한 반응 특이성을 확인하기 위해 target DNA와 같은 길이인 30 bp의 random control DNA를 제작하였음.
- 그림 307에서 형광 분자 표지에 random control DNA가 처리되었을 때는 형광 신호가 전혀 나타나지 않고, target DNA가 처리된 경우에는 뚜렷한 형광이 나타남을 알 수 있음. 이를 통해 제작한 형광 분자 표지가 target DNA에 특이적으로 반응함을 보임.

■ 여러 region의 HIV 형광 분자 표지를 동시에 사용하여 성능 개선

- 매우 긴 길이를 갖는 실제 바이러스 핵산의 경우 특이적인 서열이 하나가 아닌 여러

region에서 가지고 있고, 하나의 바이러스 핵산이 포함하는 여러 특이적 region에 대한 형광 분자 표지를 동시에 사용할 경우 형광 신호를 몇 배로 증가시킬 수 있을 것으로 예상함. 이는 fragmentation을 통해 긴 핵산 서열을 짧게 자르더라도 적용 될 수 있음.

- 염기서열에 대한 형광 분자 표지를 각각 제작하고, 모든 종류의 분자 표지를 섞어 만든 용액을 종이 기판 표면에 기능화 하여 성능 개선을 시도함. 제작한 HIV 대응 형광 분자 표지의 염기서열, 구조, 열역학적 정보를 아래 그림 308에 나타냄. 제작된 형광 분자 표지들은 서로간의 hetero-dimer 형성 평가를 통해 유의한 interaction이 없는 것을 확인하였음. 또한 각 region별 타겟 핵산과 결합하는 염기서열의 개수 및 길스 자유에너지를 통해 반응성 및 안정성을 검증하였음.

• MB Sequence, delta G, bp, structure information

Region	Sequence	$\Delta G$	Length
HIV U3	<u>CTG GCC</u> CTG GTG TGT AGT TCT <u>GCC AG</u>	-1.69	26 bp
HIV PSI	<u>GCA CCC</u> ATC TCT CTC CTT CTA <u>GGT GC</u>	-1.97	26 bp
HIV cPPT	<u>GGC GAC</u> TAT TCT TTC CCC TGC ACT <u>TCG CC</u>	-1.88	29 bp

\*NaCl 5 mM condition

- Red colored: stem을 이루는 서열
- Underlined: stem 제작을 위해 추가한 서열, target에 상보적이지 않은 서열
- ex) Red colored w/o underline: stem을 이루면서, 동시에 target에 상보적인 sequence

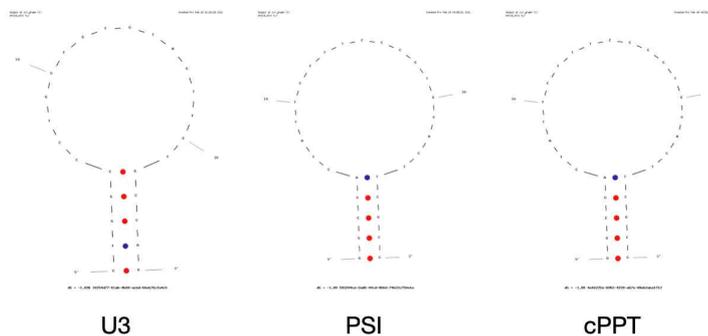


그림 308. 제작한 HIV 형광 분자 표지의 서열과 구조, 열역학적 정보

■ 실제 바이러스에 대응되는 조류독감(AIV) 및 구제역(FMDV) 형광 분자 표지의 제작 및 평가

- 모델 바이러스를 이용한 테스트에 이어, 실제 타겟 바이러스인 조류독감 및 구제역에 대응되는 형광 분자 표지를 제작함. 제작한 조류독감 형광 분자 표지의 구조와 염기서열은 다음 그림 309, 그림 310과 같음.

• AIV MB Sequence, delta G, bp, structure information

Region	Sequence	$\Delta G$	Length
AIV PB2 (conserved)	<b>CCT GCT</b> CTA AGA ATG AAA TGG ATG <b>CAG G</b>	-1.81	28 bp
AIV H5	<b>GCT CCA</b> GAA TAT GCA TAC AAA ATA <b>GGA GC</b>	-1.65	29 bp
AIV H9	<b>CAG GCC</b> AGA CAT TGC GAA TAA <b>GCC TG</b>	-1.79	26 bp

\*NaCl 5 mM condition

- **Red colored:** stem을 이루는 서열
- **Underlined:** stem 제작을 위해 임의로 추가한 서열, target에 상보적이지 않은 서열
- ex) Red colored w/o underline: stem을 이루면서, 동시에 target에 상보적인 sequence

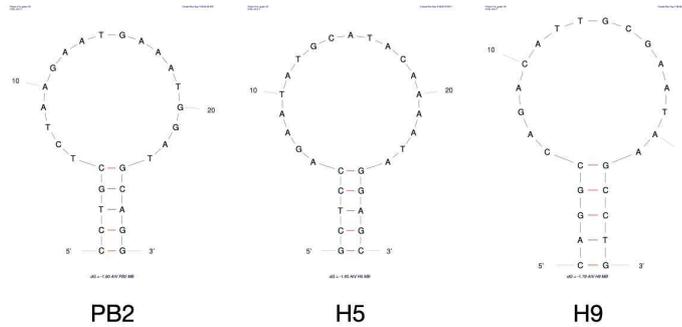


그림 309. 제작한 AIV 형광 분자 표지의 서열과 구조, 열역학적 정보

• FMDV MB Sequence, delta G, bp, structure information

Region	Sequence	$\Delta G$	Length
FMDV conserved	<b>GTG GGC</b> CGA ATA GTC CAC ATC <b>CCA C</b>	-1.55	25 bp
FMDV O/BE/2017	<b>GGG ACA</b> CCA AGA UGA CAG AAG <b>TCC C</b>	-1.66	25 bp
FMDV Asia1 shamir	<b>GTG CCT</b> GAT CGA CTT TGA GAA <b>CGG CAC</b>	-1.71	27 bp

\*NaCl 5 mM condition

- **Red colored:** stem을 이루는 서열
- **Underlined:** stem 제작을 위해 임의로 추가한 서열, target에 상보적이지 않은 서열
- ex) Red colored w/o underline: stem을 이루면서, 동시에 target에 상보적인 sequence

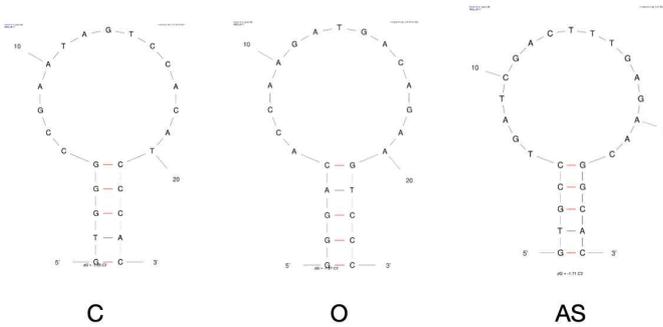


그림 310. 제작한 FMDV 형광 분자 표지의 서열과 구조, 열역학적 정보

- 추가로 제작한 HIV, AIV, FMDV 형광 분자 표지의 반응성 및 형광 거동을 용액 상에서 평가하였고, 그 결과는 아래 그림 311, 그림 312, 그림 313과 같음.

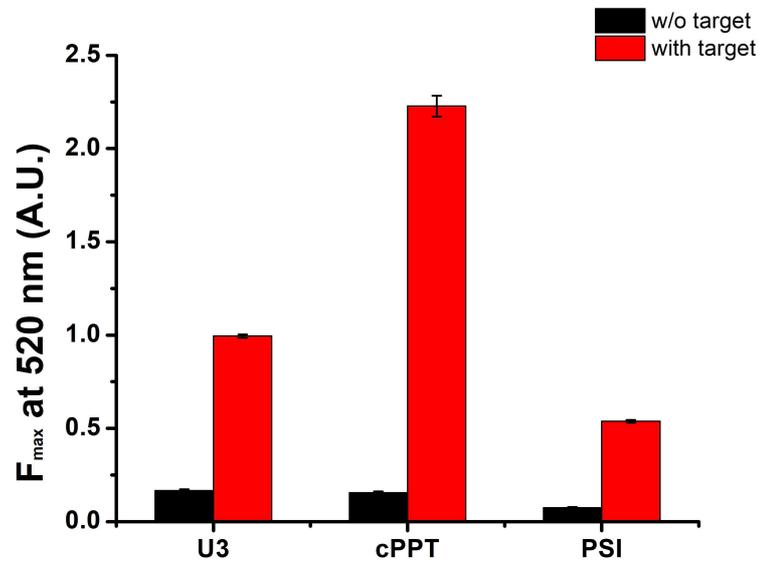


그림 311. 용액 상에서의 HIV 형광 분자 표지의 형광 거동

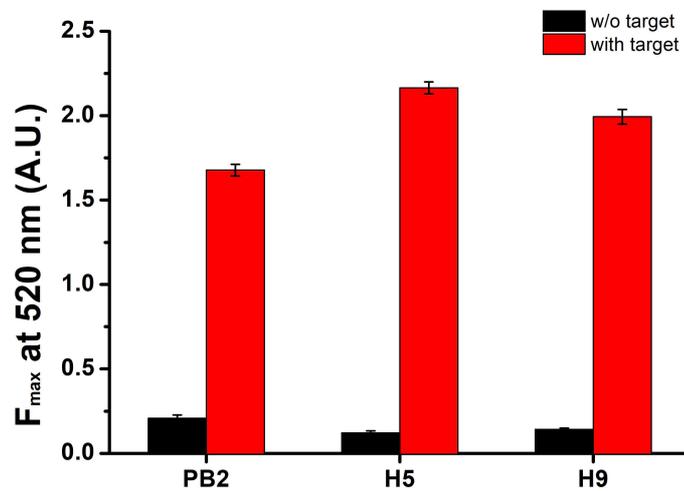


그림 312. 용액 상에서의 AIV 형광 분자 표지의 형광 거동

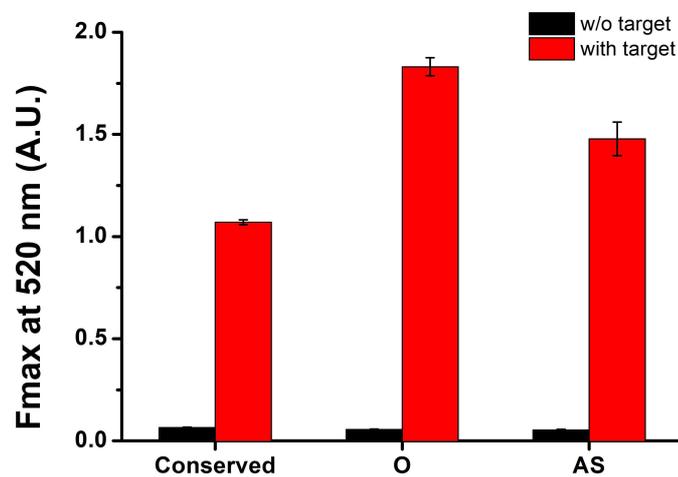


그림 313. 용액 상에서의 FMDV 형광 분자 표지의 형광 거동

- 형광 분자 표지 제작 과정에서 확인 한 것과 마찬가지로, 용액 상에서 제작된 형광 분자 표지들이 타겟 핵산에 정상적으로 반응하여 형광 신호를 잘 나타냄을 확인할 수 있음.

④ 형광 분자 표지 기능화 방법 확립

■ 종이 표면에서의 고분자 및 핵산 기능화 전략 수립

- 면역크로마토그래피, 효소결합면역흡착검사 (ELISA), 실시간 역전사 중합효소연쇄반응 (qRT-PCR) 등 기존에 사용되는 여러 장비 및 기술들의 단점을 보완하고 이를 통해 감염 여부 뿐 아니라, 각 아형을 손쉽게 빠르게 구별해내는 진단 시스템을 개발하고자 함

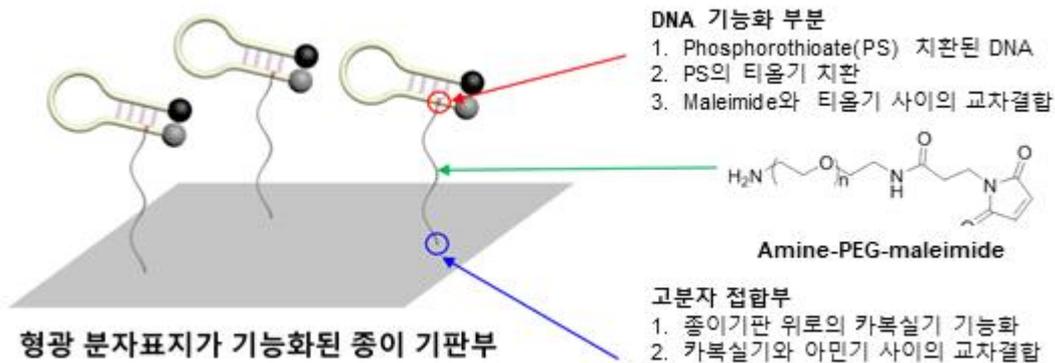


그림 314. 종이 표면에서의 고분자 및 형광분자표지 기능화 전략 수립

- 종이 기반의 센서 시스템은 종이의 셀룰로오스 (cellulose) 성분을 여러 작용기로 기능화하여 형광분자표지를 종이 기판에 화학적으로 도입하고, 해당 형광분자표지가 바이러스 추출 DNA 또는 RNA와 반응하는 전략임. 따라서 셀룰로오스에 다량으로 포함되어 있는 하이드록실기 (hydroxyl group, -OH)에 고분자 기능화를 위한 카르복실기 (carboxylic acid group, -COOH)를 도입하고, 추가적인 화학 처리를 통해 아마이드 본드 (amide bond)를 형성함으로써, 핵산이 기능화된 종이 키트 센서 플랫폼을 제작하고자 함

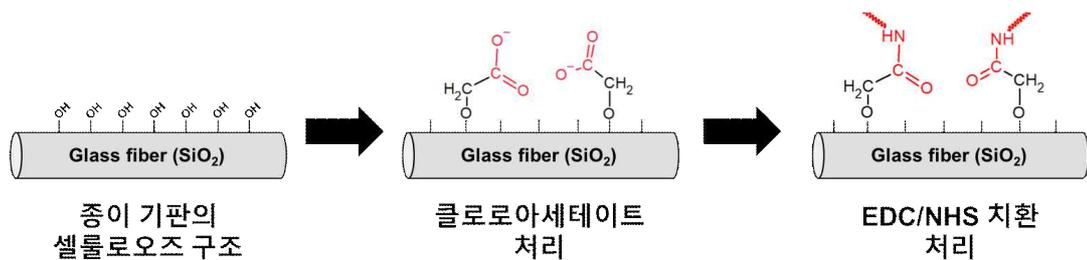


그림 315. 종이 기판 위의 화학적 처리를 통한 핵산의 기능화 연구 전체 모식도

- 그림 315와 같이 셀룰로오스 표면의 하이드록실기를 클로로아세테이트 (Sodium chloroacetate; CAA)를 이용하여 카르복실기로 기능화한 뒤, 카르복실기에 선택적으로 결합할 수 있는 화학 물질 (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS) or sulfo-NHS)을 처리함으로써 아민기 (amine group, -NH<sub>2</sub>)와 공유결합을 형성할 수 있음. 이에 아민기를 포함하는 고분자 (Amine-PEG-maleimide)를 처리함으로써 종이 표면에 형광분자표지를 기능화할 수 있는 고분자를 추가 기능화하는 것이 가능함. 그림 316, 317과 같이 FT-IR 분석 결과를 통해 카르복실기 도입과 EDC/NHS 처리를 통한 고분자의 기능화가 성공적으로 이루어졌음을 확인함.

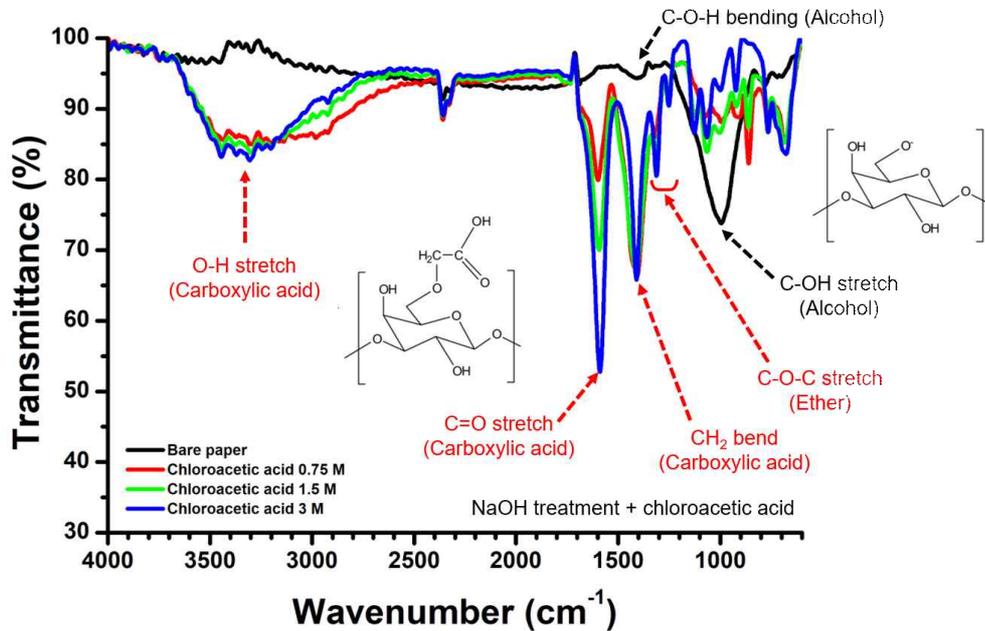


그림 316. 종이 기판위의 클로로아세트레이트 농도별 처리 후 FT-IR 분석

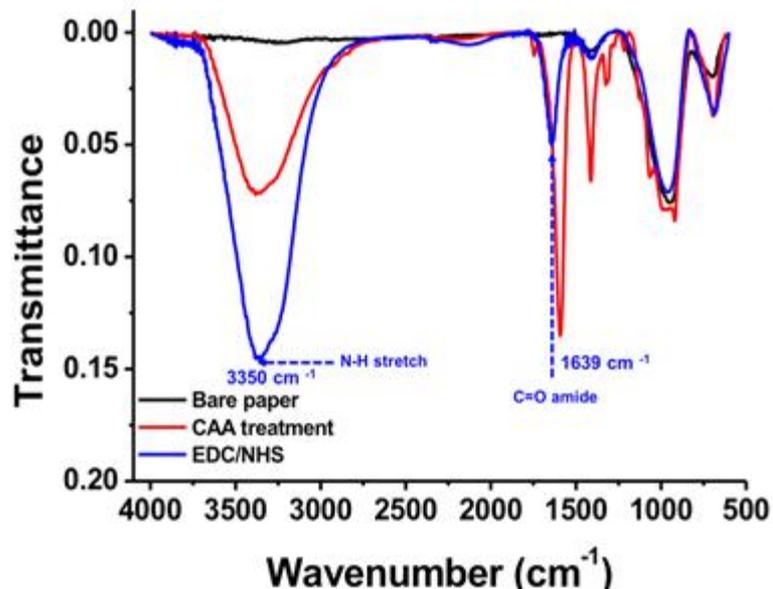


그림 317. 카르복실기가 기능화된 종이에의 EDC/NHS 처리 및 고분자 기능화 후의 FT-IR 분석 결과

- 형광 분자 표지의 기능화의 경우, 형광 분자 표지의 제작 과정에서 염기서열 하나에 기능화된 phosphorothioate(PS)에 합성된 N,N'-bis(a-iodo-acetyl)-2,2'-dithiobis(ethylamine) (BIDBE)라는 물질을 열처리와 함께 공유 결합 시킨 후, 이 BIDBE에 있는 disulfide bond(S-S)를 Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride(TCEP)으로 끊어 thiol group(-SH)을 활성화 하게 되면 thiol이 기능화 된 형광 분자 표지를 얻을 수 있음.
- 최종적으로 형광 분자 표지 말단의 thiol기와 고분자 말단의 maleimide사이의 교차결합을 통해 형광 분자 표지를 종이 표면에 기능화시킴.

⑤ 바이러스 검지할 수 있는 lateral flow sheet 개발

■ 종이 기반 미세유체 소자 구성 및 설계를 위한 최적의 재료 선정

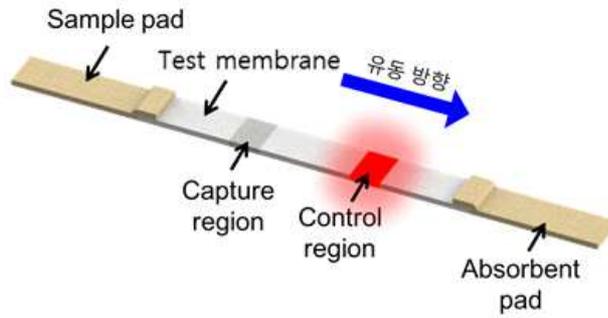


그림 318. 종이 기반 미세유체 소자의 구성

- 본 연구에서 사용될 종이 기반 미세유체 소자의 구성은 그림 318과 같이 용액을 흘려 주는 부분인 sample pad, capture region과 control region을 통해 결과를 분석하는 test membrane 그리고 흐른 용액이 저장되는 absorbent pad로 구성됨.

CF3 (Whatman)	CF5 (Whatman)	Standard17 (Whatman)	Chromatography paper(Whatman)
Glass fiber filter (Whatman)	Nitrocellulose membrane (Whatman)	Absorbent pad (Millipore)	Conjugate pad (Millipore)

그림 319. 다양한 종이의 SEM image

표 22. Sample pad, absorbent pad 그리고 test membrane의 후보군 및 물성

	제품명 (회사명)	공극률	공극의 크기 (μm)	Total intrusion volume (mL/g)
Sample pad	CF3 (Whatman)	0.589	3.195	1.0502
	CF5 (Whatman)	0.716	4.851	1.7929
	Chromatography Paper (Whatman)	0.585	11	1.1814
Absorbent pad	CF3 (Whatman)	0.589	3.195	1.0502
	CF5 (Whatman)	0.716	4.851	1.7929
	Chromatography Paper (Whatman)	0.585	11	1.1814
	Absorbent pad (Millipore)	0.767	7.739	2.2811
Test membrane	CF3 (Whatman)	0.589	3.195	1.0502
	CF5 (Whatman)	0.716	4.851	1.7929
	Standard17 (Whatman)	0.875	34.74	7.4013
	Chromatography Paper (Whatman)	0.585	11	1.1814
	Glass fiber filter (Whatman)	0.864	3.882	6.4702
	Nitrocellulose membrane (Whatman)	0.454	0.191	0.5975
	Absorbent pad (Millipore)	0.767	7.739	2.2811
	Conjugate pad (Millipore)	0.909	68.24	6.7564

- 종이 기반 미세유체 소자의 각 부분에서 사용될 재료 후보군을 선정하기 위해 그림 319와 같이 다양한 종이의 섬유 구조를 SEM 이미지를 통해 확인함.
- Sample pad와 absorbent pad 그리고 test membrane을 선정하기 위해 표 22와 같이 후보군의 공극률, 공극의 크기, total intrusion volume을 automatic porosimeter를 이용해 측정함.
- Sample pad는 용액을 흘려주는 데에 목적이 있으므로 total intrusion volume이 작은 Whatman 사의 CF3로 선정하였고, absorbent pad는 용액을 흡수하는 데에 목적이 있으므로 total intrusion volume이 큰 Millipore 사의 absorbent pad로 선정함.

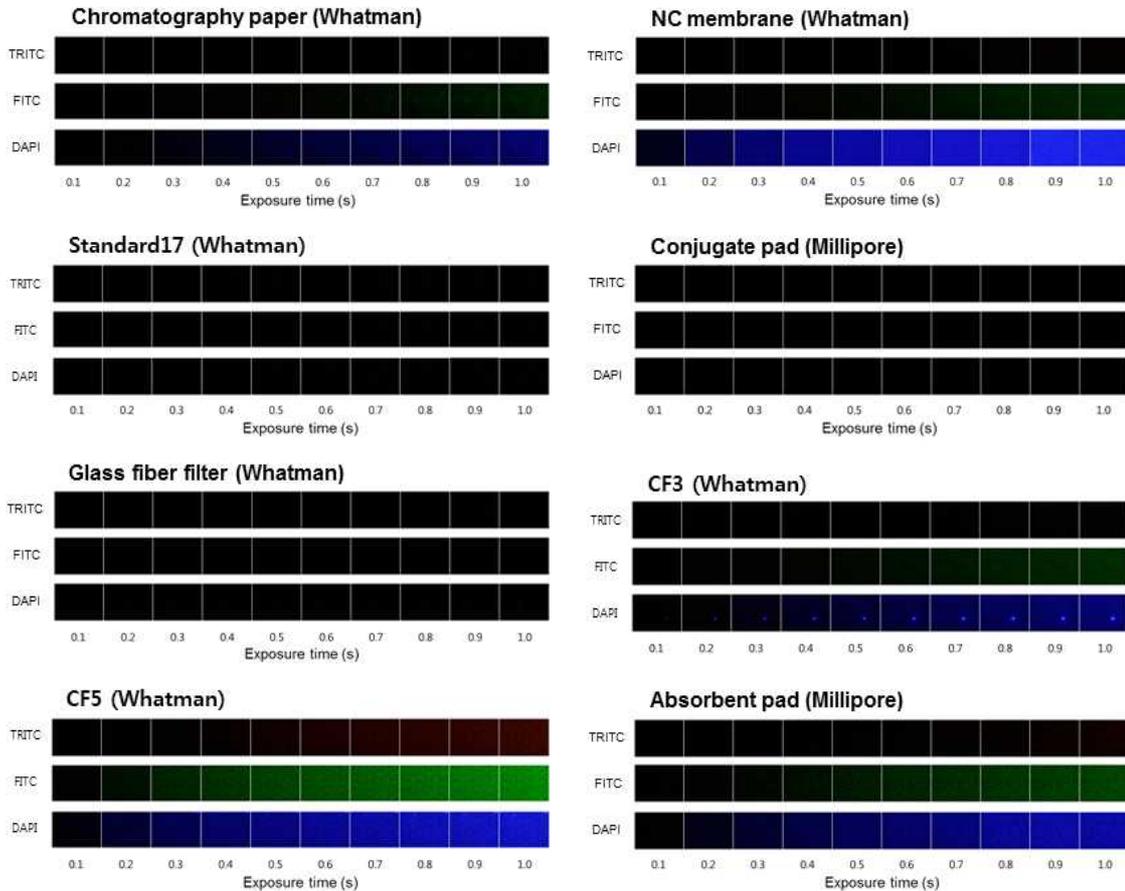


그림 320. 다양한 종이의 형광 특성

- Test membrane은 종이에 고분자 및 형광 분자 표지의 기능화가 용이하고 자체적인 형광이 없어야 하는 종이로 선정해야함.
- Test membrane을 선정하기 전에 test membrane 자체의 형광이 capture region과 control region에서 발광되는 형광과 간섭을 일으킬 수 있기 때문에 형광 관찰용 현미경을 이용하여 종이 자체의 형광 특성을 측정함.
- 그림 320과 같이 빛 노출시간에 따라 종이 형광을 측정하였으며 Whatman 사의 CF3, CF5 그리고 Millipore 사의 absorbent pad는 종이 자체의 형광이 뚜렷하게 드러나서 test membrane의 후보군에서 제외함.

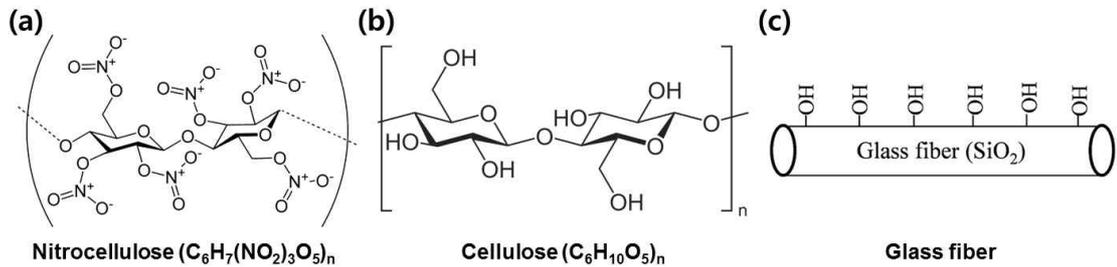


그림 321. 종이 구성섬유의 화학구조 (a) NC membrane, (b) chromatography paper, (c) glass fiber filter, conjugate pad 그리고 standard17

- 종이의 구성섬유의 화학구조는 그림 321과 같으며 종이에 형광분자표지 기능화를 위한 고분자를 종이표면에 기능화하는 과정에는 종이의 하이드록실기(-OH)를 클로로아세트산 ( $ClCH_2CO_2H$ )과 수산화나트륨(NaOH)를 이용하여 카르복실기(-COOH)로 치환이 필요함.
- 하지만 NC membrane은 구성 섬유가 nitrocellulose로 종이 표면이 -OH가 아닌  $-ONO_2$ 로 구성되어 (그림 321.(a)) 기능화가 불가능하여 후보군에서 제외함.
- Chromatography paper의 종이 구성 섬유는 cellulose (그림 321.(b)) 그리고 glass fiber filter, conjugate pad 그리고 standard17은 glass fiber (그림 321.(c))로 구성되어 있기 때문에 고분자 기능화가 가능함.
- 또한, 고분자를 기능화하는 과정마다 종이 표면에 남은 화학물질을 제거하기 위해 washing 과정이 있는데 chromatography paper는 washing 과정에서 종이가 형상을 유지하지 못하기 때문에 test membrane 후보군에서 제외함.
- 따라서, test membrane의 최종 후보군은 Whatman 사의 standard17과 glass fiber filter 그리고 Millipore 사의 conjugate pad로 선정됨.

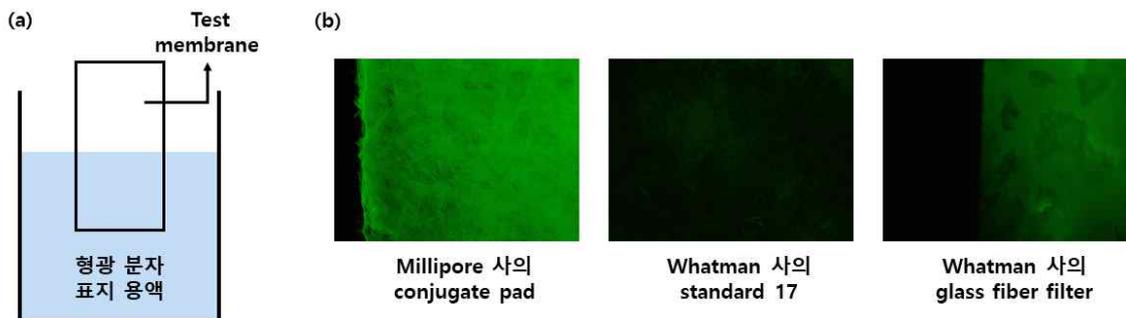


그림 322. (a) Test membrane의 형광 분자 표지 기능화 방법 및 (b) 각 후보군에서의 형광 분자 표지의 형광 발현 실험 결과

- 최종 후보군에서의 형광 분자 표지의 형광 발현 실험 결과는 그림 322.(b)와 같으며 실험 결과와 같이 Whatman 사의 standard 17에서는 형광 분자 표지가 기능화되지 않아 형광이 나타나지 않았으며 Millipore 사의 conjugate pad와 Whatman 사의 glass fiber filter에서는 형광이 나타났으나 Millipore 사의 conjugate pad에서의 형광 발현 분포가 가장 좋게 나타남.
- 실험 결과에 따라 Millipore 사의 conjugate pad를 test membrane으로 선정함.

■ 종이 기반 미세유체 소자에서 capture/control region의 제작을 위한 시스템 구축

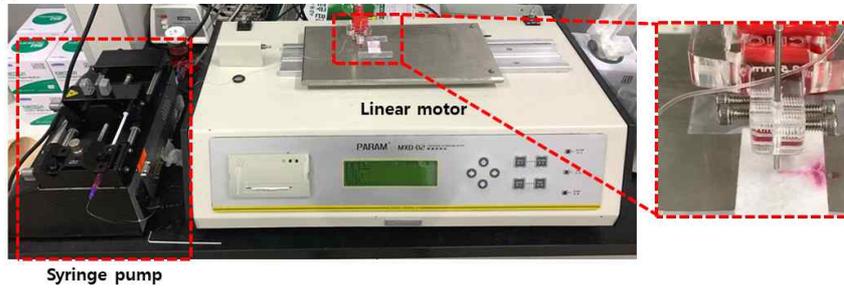


그림 323. Capture 및 control region 제작을 위해 구축한 dispensing system

- 그림 323과 같이 test membrane에서 형광 분자 표지를 기능화한 특정 부분에서만 바이러스 핵산의 유무에 따라 형광이 발현되어야 함. 따라서, test membrane의 특정 부분에만 형광 분자 표지를 기능화하기 위한 실험을 진행함.
- 이를 위해 주사기 펌프와 linear motor를 이용하여 그림 323과 같이 linear motor 위의 판에 종이를 고정하고 이 판이 움직임에 따라 line을 그려줄 수 있는 dispensing system을 구축함. 해당 시스템을 이용하여 test membrane에 capture region 및 control region을 제작함.

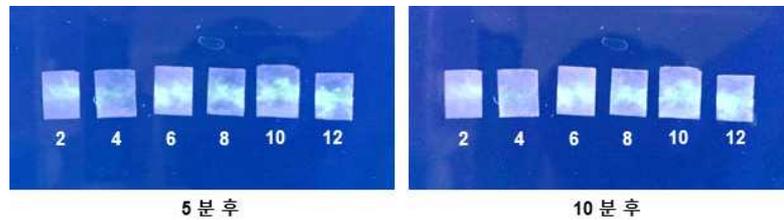


그림 324. 자외선 발광기를 이용한 종이 위의 형광 분자 표지 기능화 확인 실험 결과

- Dispensing system을 이용하여 고분자가 기능화된 test membrane의 중간 부분에 2, 4, 6, 8, 10 그리고 12 번 중복으로 line을 그려주고 해당 종이에 5  $\mu$ M target DNA 용액 50  $\mu$ L를 떨어뜨리고 자외선 발광기를 이용하여 형광 분자 표지가 잘 기능화 되었는지를 확인함.
- 자외선 발광기를 이용하여 확인한 결과는 그림 324와 같으며 target DNA 용액을 떨어뜨리고 5 분 후와 10 분 후를 확인해주었을 때에 test membrane의 가운데 부분에만 형광이 발현되는 결과를 확인함으로써 구축한 dispensing system을 이용하여 test membrane의 특정 부분에 형광 분자 표지를 기능화 할 수 있다는 것을 확인함.

⑥ 개발한 lateral flow sheet의 민감도를 개선하여 현장에서 사용 가능한 형광 분자 표지 농축 종이 칩 개발

■ 높은 민감도를 갖는 종이칩 설계 및 제작

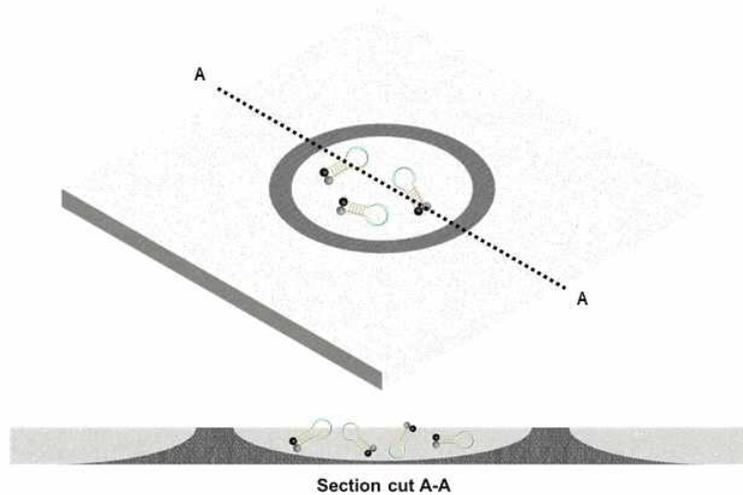


그림 325. PDMS를 이용하여 제작한 형광 분자 표지 농축 종이칩 모식도

- Lateral flow sheet의 낮은 민감도로 인해 검지 한계를 개선하는데 한계가 있다고 판단되어 높은 민감도를 갖을 수 있는 새로운 형태의 종이칩을 설계함.
- PDMS를 이용하여 glass fiber에 소수성 패턴을 만들고 이를 이용하여 형광 분자 표지를 농축하여 그림 325와 같이 형광 분자 표지가 농축된 종이칩을 제작하고자 함.
- 그림에서 어두운 부분이 PDMS를 의미하고 밝은 부분이 glass fiber를 의미함.

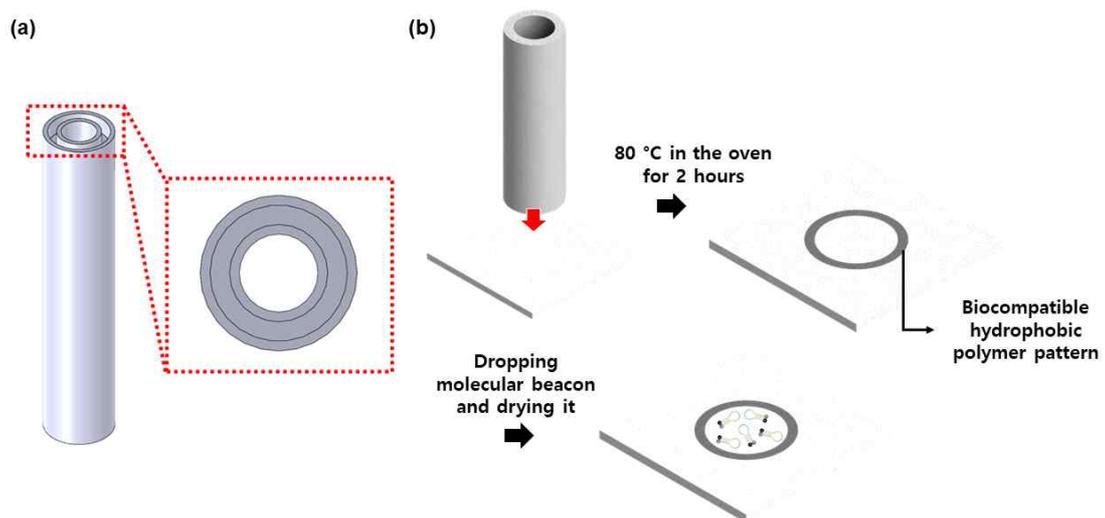


그림 326. (a) 3D 프린터를 이용하여 제작한 도장 그림 및 (b) 도장과 PDMS를 이용한 형광 분자 표지 농축 종이칩 제작 과정

- PDMS를 이용하여 glass fiber에 소수성 패턴을 만들어주기 위해 3D 프린터를 이용하여 그림 326.(a)와 같이 홈이 있는 도장을 제작함.
- 도장의 홈에 PDMS를 로딩하고 이를 그림 326.(b)와 같이 glass fiber에 찍어주는 방식을 통해 glass fiber에 생체적합성을 갖는 소수성 폴리머 패턴을 만듦. 그리고 소수성 폴리머 패턴 내에  $5\ \mu\text{M}$  형광 분자 표지를  $5\ \mu\text{L}$  떨어뜨리고 말려줌으로써 형광 분자 표지를 농축하였으며 해당 과정을 통해서 형광 분자 표지 농축 종이칩을 제작함.
- 제 1 세부, 제 2 세부 연구기관의 공동 연구를 통하여 본 핵산 검출 종이 기반 키트 특허를 출원함으로써 해당 기술에 대해 지적 재산을 확보함. 본 기술은 제 1 협동 연구기관인 팜스웰메디컬에 기술이전되어 사업화 진행 중에 있음.

관인생략

## 출원번호통지서

출원일자 2021.07.06  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(21384)  
출원번호 10-2021-0088552 (접수번호 1-1-2021-0779401-72)  
(DAS접근코드DA40)  
출원인명칭 성균관대학교산학협력단(2-2005-001360-4)  
대리인성명 특허법인 아주(9-2001-100005-9)  
발명자성명 이진기 문영광 문혁균 이정현 장준혁  
발명의명칭 핵산 검출 키트 및 이의 제조 방법

특 허 청 장

그림 327. 제 1 세부와 제 2 세부 연구기관의 공동 연구를 통해 출원된 특허의 출원번호통지서

⑦ 소형 형광 검출 장비 설계 및 개발

■ 소형 형광 검지기를 위한 소자 선정

(가) MPPC

(가-1) MPPC -1

- 낮은 광 신호를 검출 할 수 있는 모듈로써 구성품으로는 검출기인 MPPC, signal amplifier circuit, high voltage power supply circuit, temperatire compensation circuit 가 포함됨 .
- Photosensitive area는 3X3 mm 임.
- Signal output은 analog암.
- Power는 +5VDC 임.

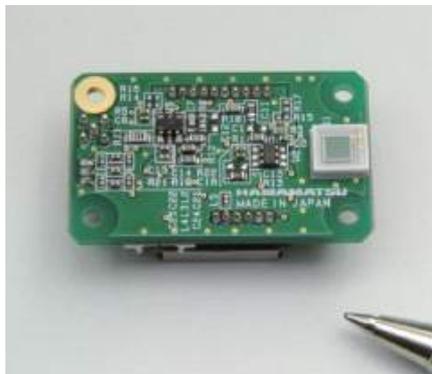


그림 328. MPPC 모듈-1

(가-2) MPPC -2

- Optical measurment modules for very-low-level light detection, digital output



그림 329. MPPC 모듈-2

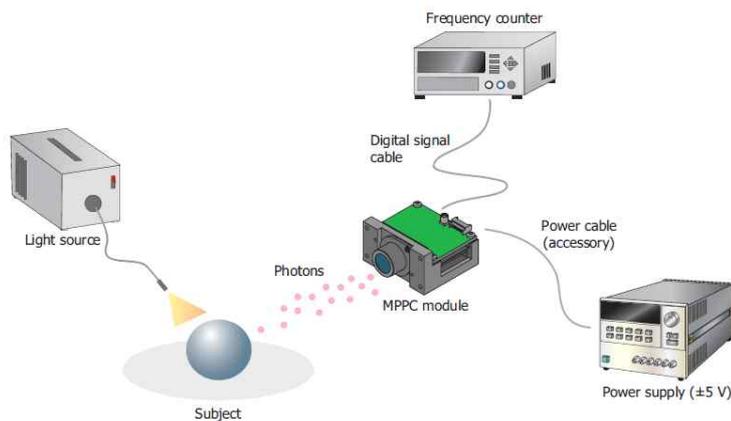


그림 330. Connection example (MPPC 모듈-2)

(나) 이송 장치

- 기본원리 (LM가이드)

LM가이드는 직역하면 "직동안내(Guide)"를 뜻하며, 레일 방향으로 매끄럽게 운동시키는 기계부품으로써 베어링과 마찬가지로 강구를 사용하는 것은 직동 운동이 매끄럽게 진행 되어 마찰이 최소화되도록 하기 위함

- LM 가이드를 사용하여 여러 position 이동이 가능하도록 제작함

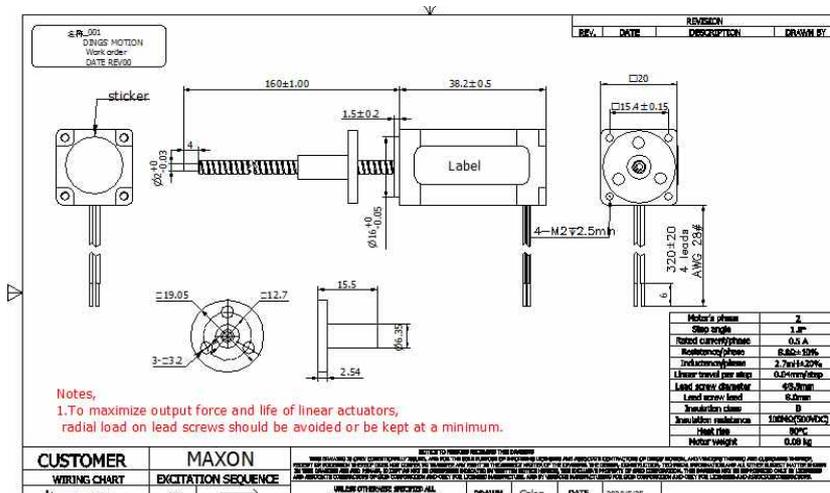


그림 331. Motor/actuator module

(다) N-BK7 Plano-Convex Lens, Ø6.0 mm, f = 10 mm

- 재질 : BK7으로 500nm에서 투과율 90%이상으로 투과되는 재질을 사용함

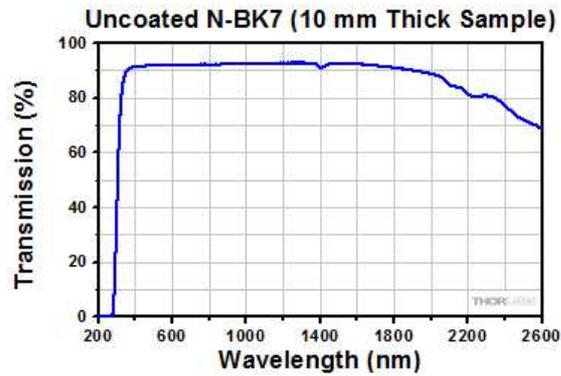


그림 332. N-BK7 plano-convex 렌즈 투과도

- 광 특성 : 한쪽으로 평면광이고 다른 한쪽은 초점이 되는 수렴렌즈를 사용함

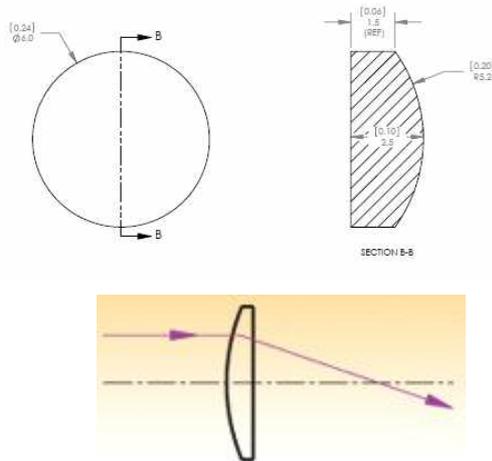


그림 333. Plano-convex 렌즈 빛 경로

(라) 여기광으로써 LED 사용

- 여기광의 LED의 부품 사양으로써 시야각이 매우 좁게 하여 다른 부분에 영향을 미치지 않도록 함.  
 컬러수: Single Color  
 렌즈색상: 투명  
 파장: 470nm  
 램프색상: 파란색  
 파장-피크: 465nm  
 렌즈투명도: 투명  
 시야각: 25°  
 밀리칸델라등급: 800mcd  
 크기/치수: 1.80mm(L) x 1.50mm(W)  
 전압-순방향(VF)(통상): 3.3V



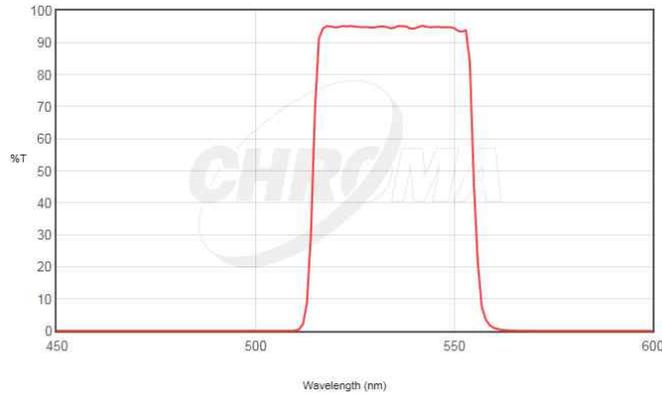


그림 337. Bandpass filter 파장대 정보

■ 형광 검출 모듈의 광학 구조 설계 및 제작

- MPPC와 LED 부분을 투과형 구조로 하여 매우 높은 광 신호가 수신될 수 있도록 하였으며, LED 부분에는 LED 파장 대역의 bandpass filter로 좁은 여기광이 출력될 수 있도록 하였고, lateral flow sheet 상단에는 수렴 렌즈와 bandpass filter를 통해서 형광 방출광만 MPPC로 입력될 수 있도록 광 구조를 최소화하도록 개발함
- 렌즈와 필터 부품은 MPPC 검출 소자 면적과 유사한 5mm 또는 6mm로 렌즈를 선택하여 초점 거리가 6 mm로 짧게 초점을 맞출 수 있도록 함
- 짧은 초점 거리 및 평면광 거리는 전체 광 alignment에 유리하여 alignment에 의한 광손실을 최소화함

(가) 소형 형광 검출 장비 광학 부품

- 형광 검출기의 광학적인 구성 요소로서 여기광 부분과 방출광 측정 부분으로 나누어짐. 여기광의 LED로써 Blue light LED를 사용하였으며, 여기광 앞에는 Bandpass filter를 사용하여 좁은 광파장 대역만 여기 될 수 있도록 함.

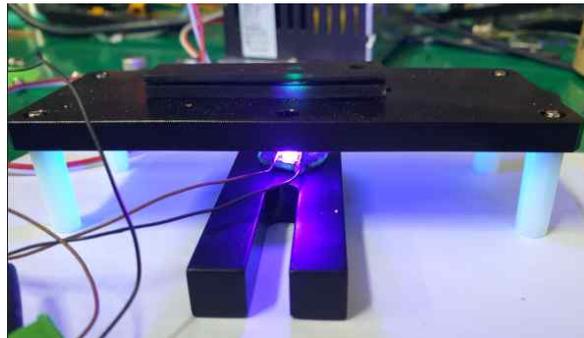


그림 338. 여기광 모듈 부분 사진

- 방출광에는 Green 필터를 사용하여 방출광 중 Green 파장 대역을 측정되도록 하였으며, 이러한 방출광 필터 부분 상단에 MPPC 검출기를 조립함

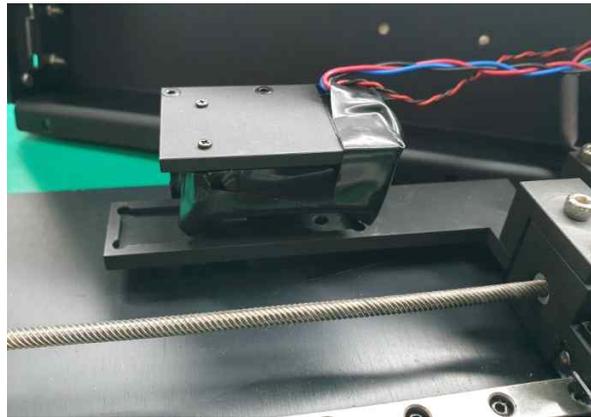
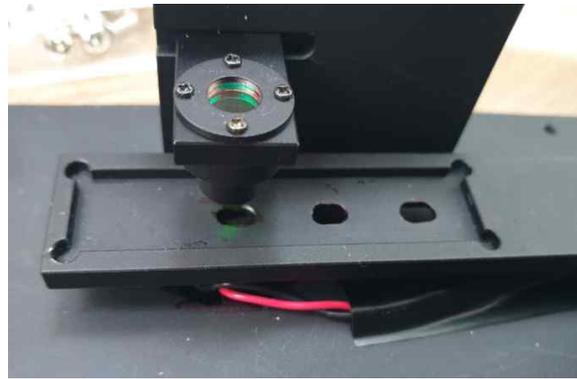


그림 339. 방출광 광학 모듈 부분 사진

(나) 소형 형광 검출 장비 광학 구조

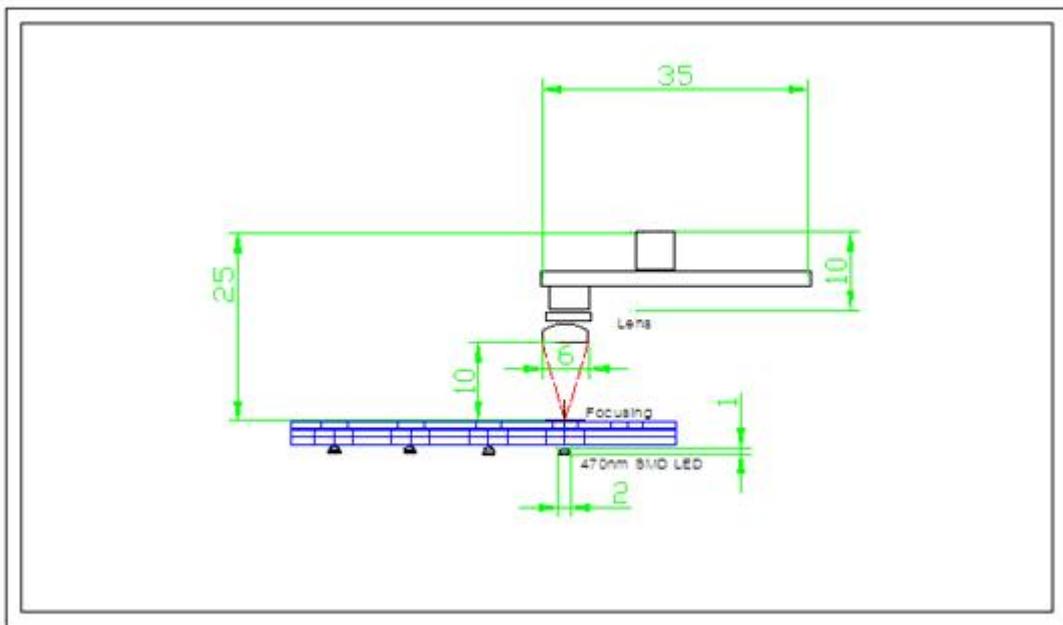


그림 340. 소형 형광 검출 장비 광학 구조

■ 형광 검출 모듈 제작 (하드웨어)

(가) 케이스 상단 부분



그림 341. 소형 형광 검출 장비 케이스 상단 부분 사진

(나) 케이스 하단 부분

- 케이스 하단 부분은 안정성을 도모하기 위하여 하단을 알루미늄으로 하였으며, 알루미늄의 광 반사를 최소화하기 위하여 Black anodizing을 함.

• 케이스 특징

케이스 하단으로부터 각 부품을 모듈을 장착 하는 적층 방식을 채택하여 커버는 하중을 최소화할 수 있도록 함

케이스는 총 두 가지로써 10mm 낮은 것 시스템과 상대적으로 10mm 높은 시스템이지만 본 내용에서는 시스템과 10mm 낮은 것으로 표기하여 설명함

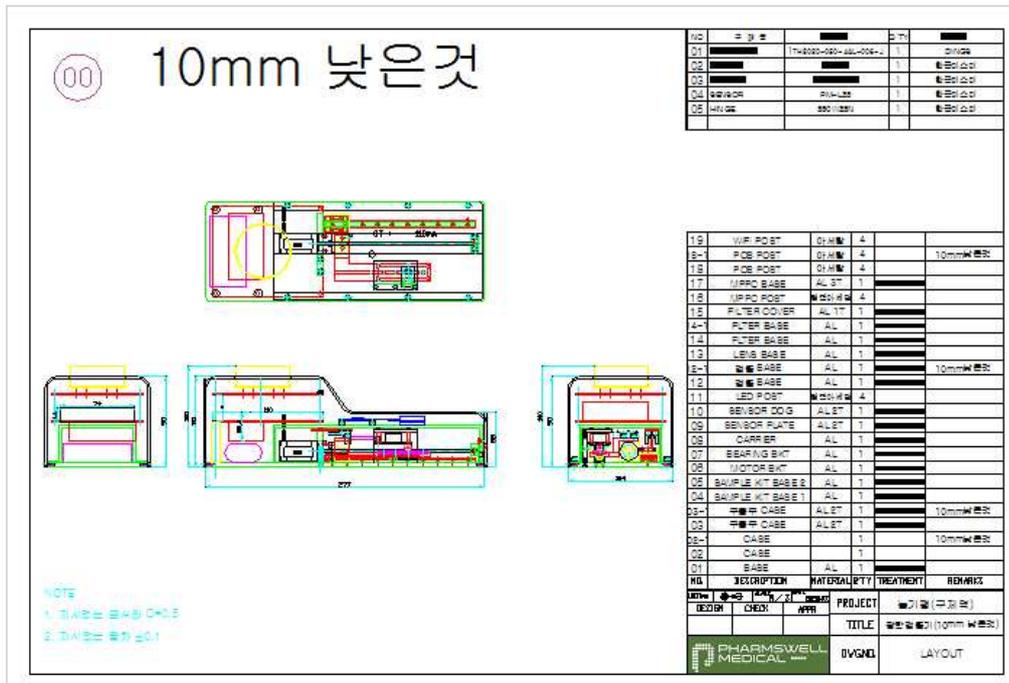


그림 342. 높이가 10mm 낮은 시스템 모듈 설계도

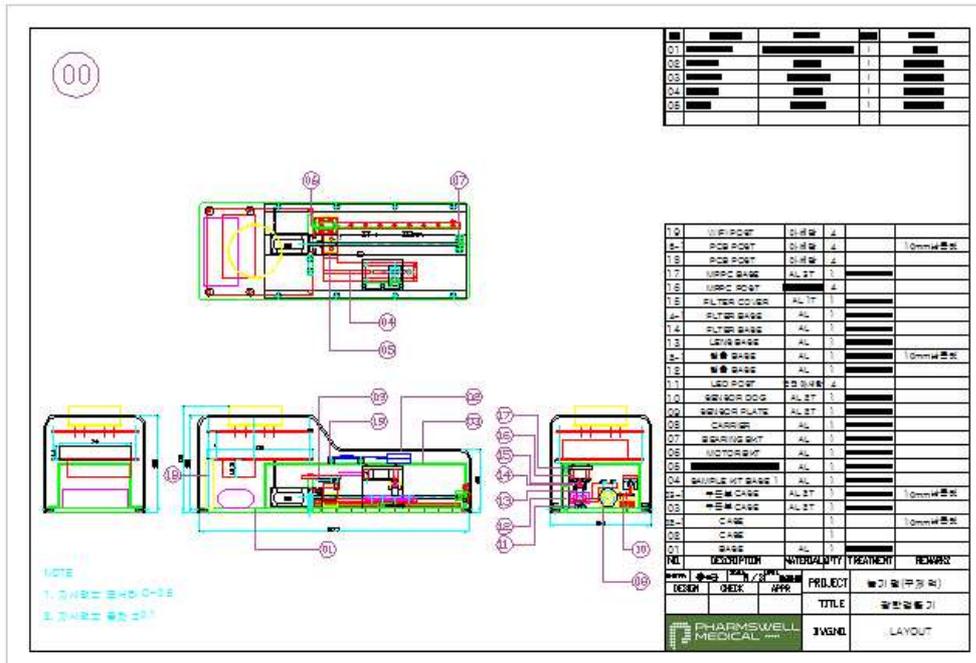


그림 343. 시스템 모듈 설계도

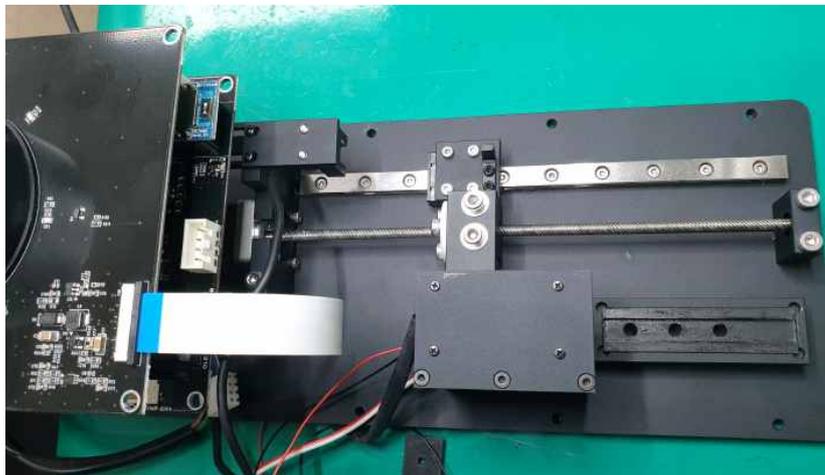


그림 344. 소형 형광 검출기 내부

- 하단 부분의 광 누출을 최소화하기 위하여 광 측정 부분에는 추가 커버를 제작하여 이중 커버 부분과 내부 커버는 Black anodizing을 처리함



그림 345. 소형 형광 검출기 하단 부분 사진

■ 형광 검출 모듈 제작 전자 제어 부분

- ARM 마이크로컨트롤러 - MCU 16/32-BITS인 STM32F746VGT6을 기반으로 한 구제역 제어 보드로 제작함
- 주요사양

패밀리: ARM® Cortex®-M7

코어 크기: 32비트

CPU 속도: 216MHz

프로그램 메모리 크기: 1MB

데이터 RAM 크기: 320KB

I/O 개수: 82

데이터 컨버터: A/D 16x12b; D/A 2x12b

동작전압: 1.7V ~ 3.6V

동작온도: -40°C ~ 85°C

실장 유형: 표면실장(SMD)

패키지/케이스: 100-LQFP

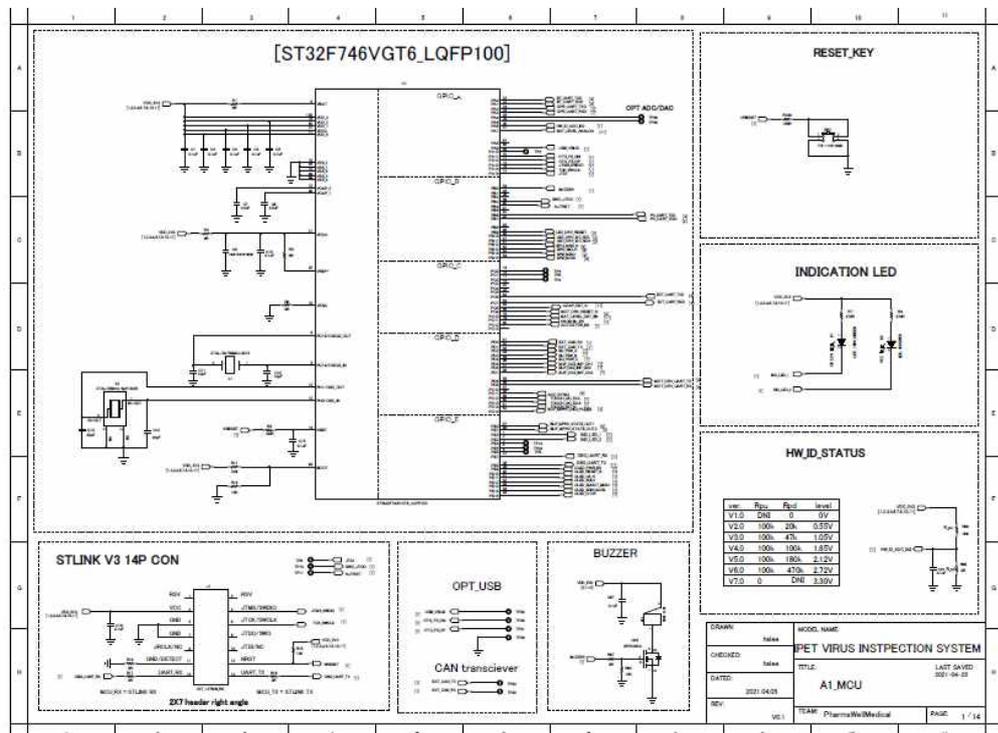


그림 346. 형광 검출 모듈 전자 제어 부분

■ 소형 형광 검출 장비 제작

- OLED 기반 모니터와 신호 버튼에 일체형을 사용하며, 소형 형광 검출 장비에 배터리를 부여하여 현장 진단 키트를 사용할 수 있도록 개발함

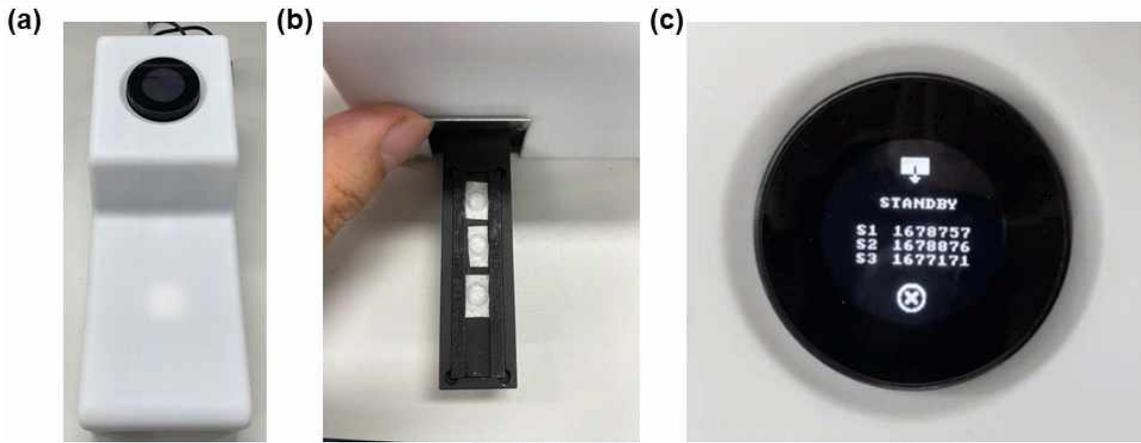


그림 347. (a) 팜스웰메디컬에서 제작한 형광 검지 기기,  
 (b) 검지를 위해 형광 분자 표지 농축 종이칩을 넣은 사진 그리고  
 (c) 형광 검지 기기에서 관측된 형광 데이터

- 측정할 때 검지 기기를 자동으로 loading 될 수 있도록 하며, 측정 결과는 그 자리에서 바로 확인할 수 있도록 함

⑧ 개발한 lateral flow sheet 및 형광 분자 표지 농축 종이 칩의 핵산 검지 테스트  
 ■ MPPC를 이용한 lateral flow sheet에서의 형광 발현 측정

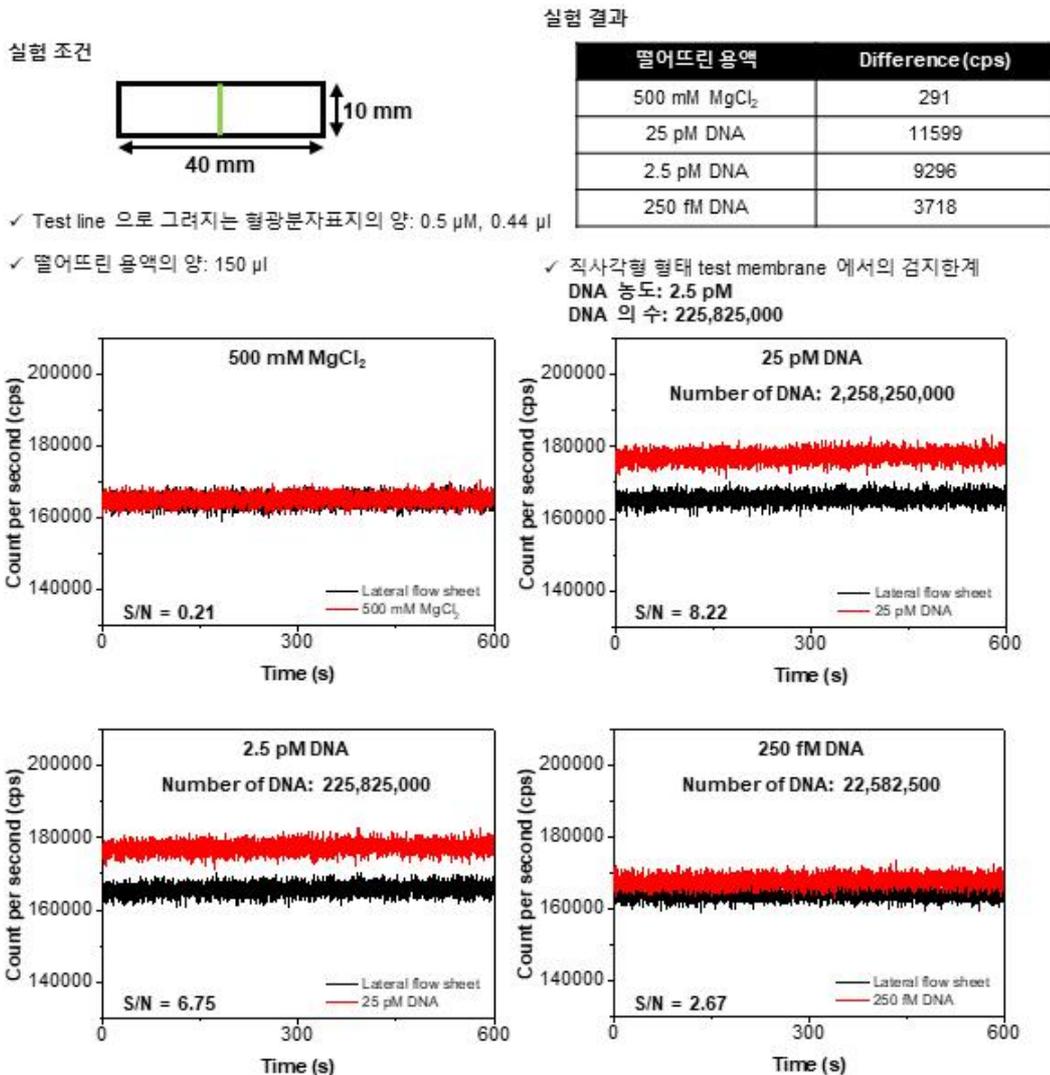


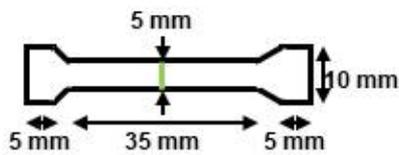
그림 348. MPPC를 이용한 직사각형 모양의 lateral flow sheet 형광 측정 실험 결과

- 위 실험을 통해 결정된 MPPC 장비 셋업을 이용해 형광 분자 표지로 test line을 그린 직사각형 종이의 형광 측정 실험을 진행함.
- 500 mM MgCl<sub>2</sub> 그리고 500 mM MgCl<sub>2</sub>와 여러 농도의 target DNA를 섞은 시료를 이용해 형광 실험을 진행한 결과, 그림 348과 같이 MgCl<sub>2</sub> 단독으로 흘려주었을 경우 형광 세기의 변화가 없었고, target DNA를 흘려주었을 때 DNA 농도가 감소함에 따라 형광 세기 증가도 감소하는 경향을 보임.
- Target DNA로 인해 증가하는 형광 세기를 통해 바이러스 감염 여부를 확인할 수 있을 정도의 유의미한 데이터이기 위해서는 signal-to-noise ratio(S/N ratio)가 3보다 커야함. S/N ratio는 시료를 흘려주기 전과 후의 형광 세기 평균값의 차이를 시료를 흘려주기 전 형광의 표준편차로 나누어준 값으로 그 식은 다음과 같음.

$$S/N \text{ ratio} = \frac{\text{The average of the signal} - \text{The average of the background}}{\text{Standard deviation of the background}}$$

- Lateral flow sheet에 흘려주는 target DNA의 농도가 250 fM 일 때 S/N가 2.47로 3보다 작아 유의미한 데이터라 볼 수 없으며, 2.5 pM 일 때 S/N ratio가 6.75로 3 이상이기 때문에 직사각형 lateral flow sheet의 검지 한계는 수 억개 수준으로 매우 높은 것을 확인함.

실험 조건



- ✓ Test line 으로 그려지는 형광분자표지의 양: 0.5 μM, 0.44 μl
- ✓ 떨어뜨린 용액의 양: 150 μl

실험 결과

떨어뜨린 용액	Difference (cps)
500 mM MgCl <sub>2</sub>	1495
2.5 pM DNA	12742
250 fM DNA	8530
25 fM DNA	4369

- ✓ 모래시계 형태 test membrane 에서의 검지한계 DNA 농도: 25 fM  
DNA 의 수: 2,258,250

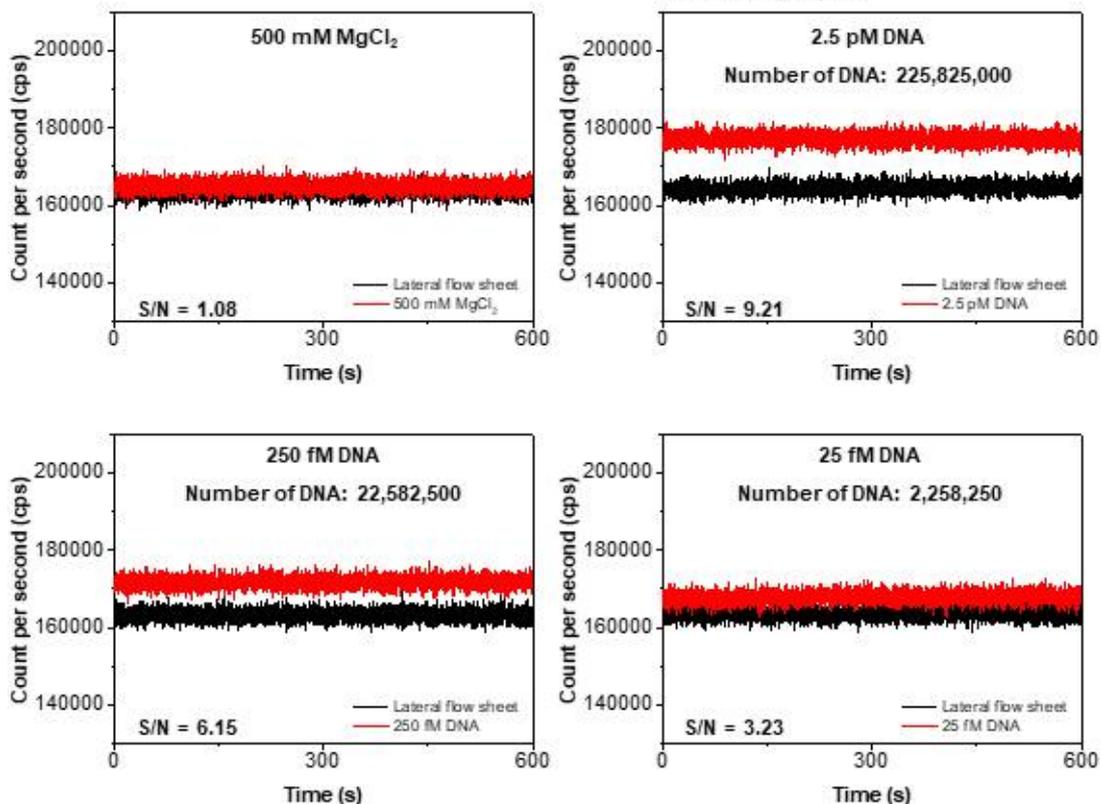


그림 349. MPPC를 이용한 모래시계 모양의 glass fiber chip 형광 실험 결과

- 형광 분자 표지의 검지 한계를 낮추기 위해 lateral flow sheet의 디자인을 직사각형에서

모래시계 모양으로 변경하여 형광 실험을 진행한 결과는 그림 349와 같음. Target DNA의 농도가 25 fM일 때 S/N ratio가 3.23으로 검지 한계가 직사각형 모양의 lateral flow sheet보다 약 100배 정도 개선된 것을 확인함.

- Lateral flow sheet를 이용한 실험 결과, lateral flow sheet의 디자인을 변경했을 때 검지 한계가 기존보다 100 배 정도 개선되었지만 추가적으로 개선하는데 한계가 있고 낭비되는 시료의 양도 많은 상황임. 이러한 단점을 보완하고 높은 민감도를 갖는 새로운 형태의 종이칩의 필요성이 생김.

■ 형광 분자 표지 농축 종이칩에서의 구제역과 조류 인플루엔자 바이러스 핵산에 대한 검지 한계 확인

- 구제역과 조류 인플루엔자 바이러스 검지를 위한 형광 분자 표지를 형광 분자 표지 농축 종이칩에 도입하였음. 해당 형광 분자 표지를 사용하였을 때에 구제역과 조류 인플루엔자 바이러스 핵산에 대한 검지 한계 측정 실험을 진행함.

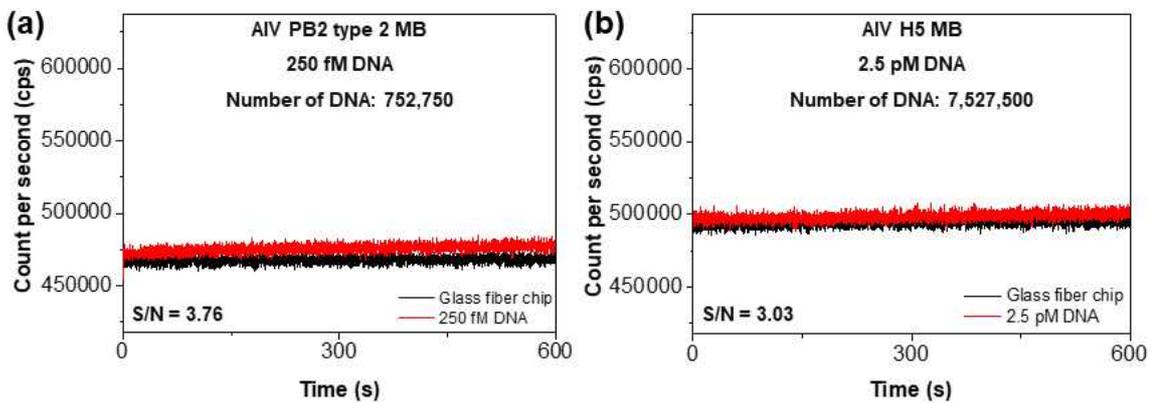


그림 350. (a) AIV PB2 type 2 MB 그리고 (b) AIV H5 MB를 이용하여 제작한 형광 분자 표지 농축 종이칩의 검지 한계 평가 결과

- 조류 인플루엔자 바이러스 검지를 위해 총 4 가지의 형광 분자 표지 AIV PB2 type 1 MB, AIV PB2 type 2 MB, AIV H5 MB 그리고 AIV H9 MB를 이용하여 형광 분자 농축 종이칩을 제작하였고, 여기에 25 fM DNA를 떨어뜨려 형광 발현 정도를 확인한 결과 AIV PB2 type 2 MB, AIV H5 MB, AIV H9 MB 그리고 AIV PB2 type 2 MB 순서로 반응성이 작아짐.
- 4 종류의 형광 분자 표지 중 반응성이 좋았던 두 개의 형광 분자 표지를 선정하여 형광 분자 표지 농축 종이칩을 제작하였으며 각각의 농축 종이칩의 검지 한계를 측정하였음.
- 측정 결과는 그림 350과 같으며 그림 350.(a)에서 알 수 있듯이 AIV PB2 type 2 MB를 이용하여 제작한 농축 종이칩의 검지 한계는 250 fM DNA으로 수 십만개 수준의 DNA를 검지할 수 있음을 알 수 있음. AIV H5 MB 농축 종이칩을 사용할 경우에는 2.5 pM DNA으로 수 백만개 수준의 DNA를 검지할 수 있음을 알 수 있음.

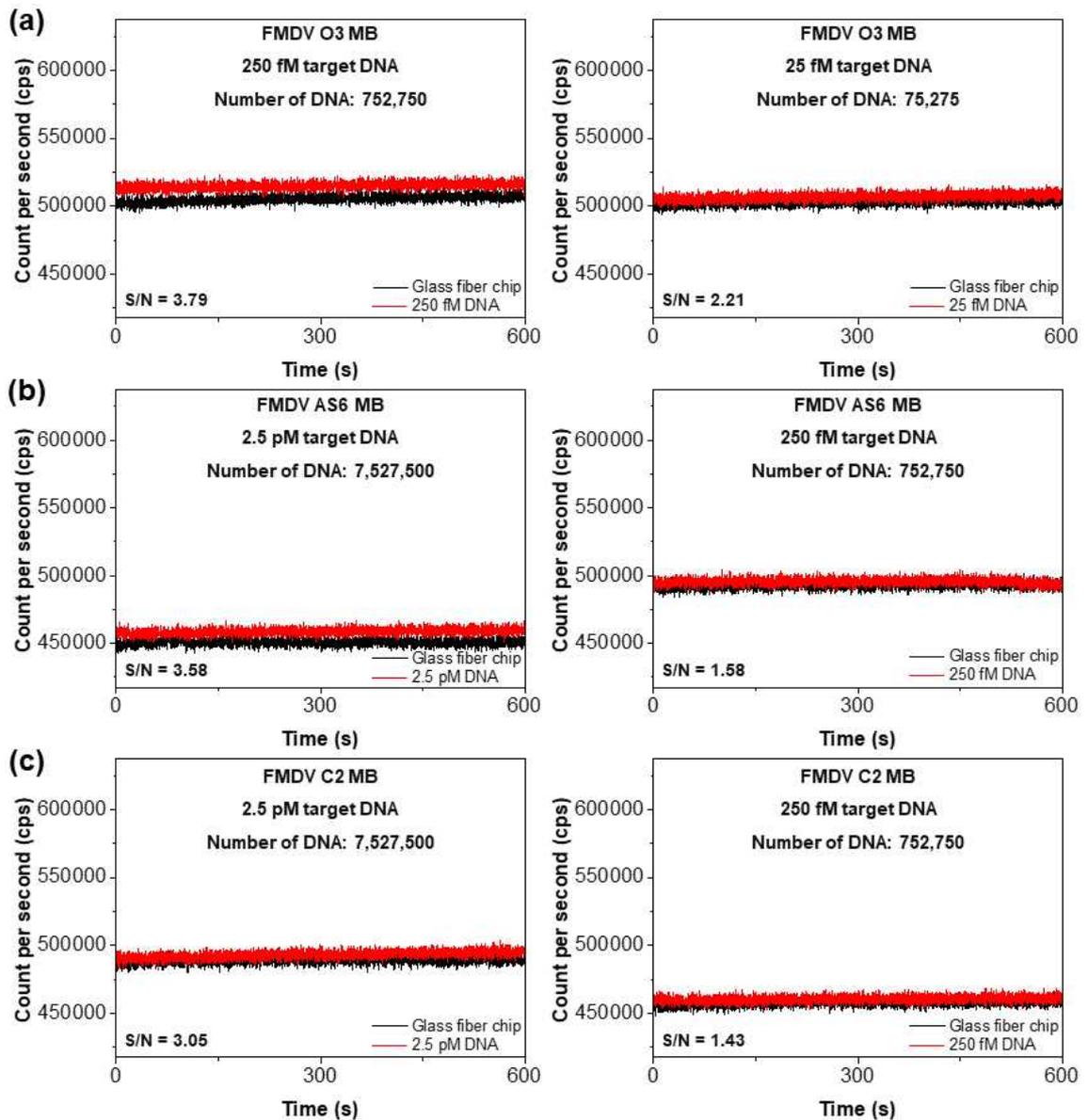


그림 351. 구제역 바이러스 검지를 위한 3 종류 형광 분자 표지를 이용하여 제작한 형광 분자 표지 농축 종이칩의 검지 한계 평가 결과  
(a) FMDV O3 MB, (b) FMDV AS6 MB, 그리고 (c) FMDV C2 MB

- 구제역 바이러스 검지를 위해 총 3 가지의 형광 분자 표지를 전달받았으며 전달받은 형광 분자 표지는 FMDV O3 MB, FMDV AS6 MB 그리고 FMDV C2 MB임.
- 3 종류의 형광 분자 표지를 이용하여 형광 분자 농축 종이칩을 제작하였고 여기에 DNA를 농도 별로 떨어뜨려 형광 발현 정도를 확인했으며 이를 이용하여 검지 한계를 평가하였음. 검지 한계 평가 결과는 그림 351과 같음.
- 그림 351에서 알 수 있듯이 3 종류의 형광 분자 표지 중 FMDV O3 MB를 사용하여 제작한 농축 종이칩은 250 fM DNA(수 십만개 수준의 DNA)를 떨어뜨려도 S/N ratio가 3보다 크게 나와 반응성이 가장 좋다는 것을 알 수 있었음.
- 반면, FMDV AS6 MB와 FMDV C2 MB를 사용하여 제작한 농축 종이칩의 경우에는 2.5 pM(수 백만개 수준의 DNA)를 떨어뜨려야 S/N ratio가 3보다 크게 나와 반응성이 약간은 떨어진다는 것을 확인함.

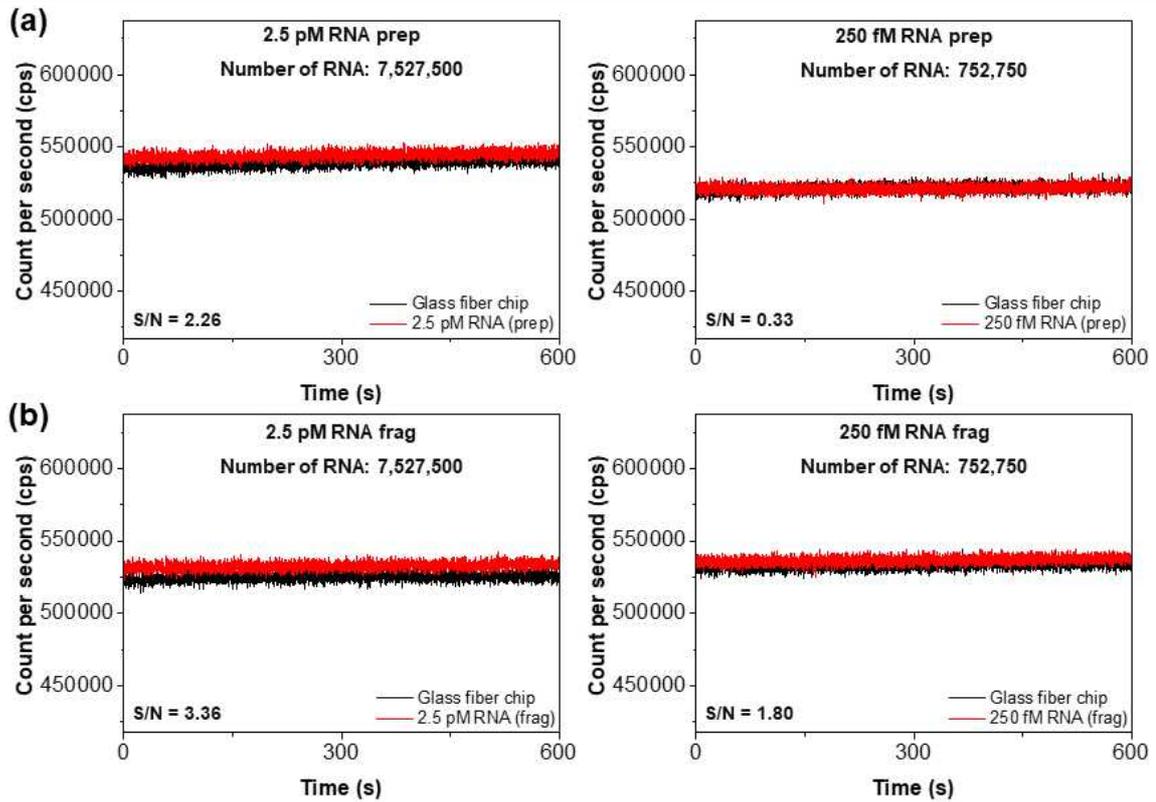


그림 352. 형광 분자 표지 농축 종이칩에서의 조류 인플루엔자 바이러스 RNA 검지 결과  
 (a) RNA preparation 그리고 (b) RNA fragment  
 (사용된 형광 분자 표지: AIV PB2 type2 MB)

- 구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스는 RNA 바이러스로 핵산을 추출했을 때에 RNA만 추출 가능하기 때문에 RNA를 이용한 실험을 수행되어야 함.
- 따라서, 제 1 협동 연구기관인 숙명여자대학교 화공생명공학부에서 제작한 모델 바이러스에서 추출한 RNA preparation(preparation)과 RNA preparation을 RNase III enzyme으로 무작위로 단편화시켜준 RNA fragment(fragment)를 사용하여 형광 분자 표지 농축 종이칩에서의 검지 실험을 진행하였으며 결과는 그림 352와 같음. 해당 실험에서 사용된 형광 분자 표지는 AIV PB2 type 2 MB로 반응성이 가장 좋은 형광 분자 표지를 사용하였음.
- 그림 352와 같이 형광 분자 표지 농축 종이칩에 같은 농도의 RNA preparation보다 RNA fragment를 떨어뜨려주었을 때에 S/N ratio가 결과가 좋다는 것을 확인함.
- 이는 RNA preparation의 길이가 길어 형광 분자 표지의 loop 부분과 반응하기 어렵기 때문으로 판단됨. 반면, RNA fragment는 RNA preparation 보다 길이가 짧아 반응성이 높은 것으로 판단됨.
- 형광 분자 표지 농축 종이칩의 조류 인플루엔자 바이러스 RNA fragment에 대한 검지 한계는 2.5 pM RNA(수 백만개 수준의 RNA)로 확인되며 해당 결과를 토대로 형광 분자 표지 농축 종이칩을 이용하여 실제 바이러스를 검지할 때에는 RNA fragment를 사용해야 되는 것을 알 수 있음.

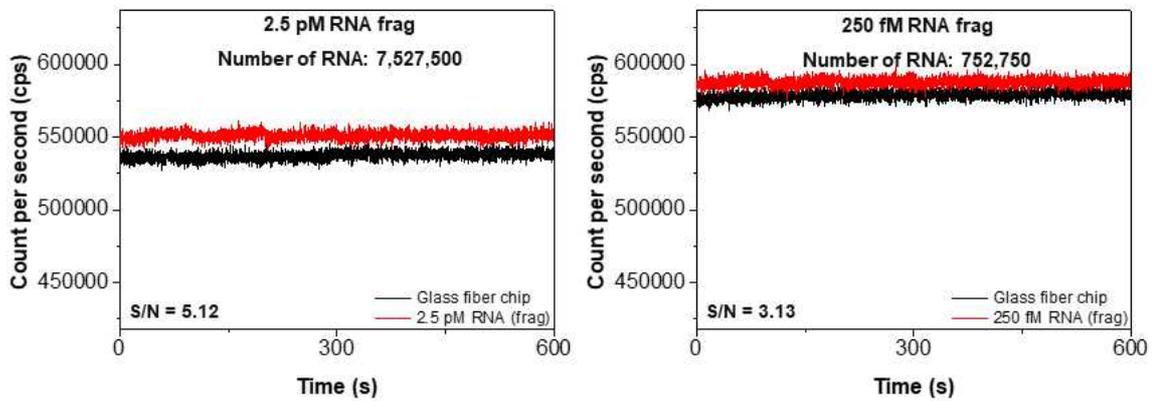


그림 353. 형광 분자 표지 농축 종이칩에서의 구제역 바이러스 RNA fragment 검지 결과  
(사용된 형광 분자 표지: FMDV O3 MB)

- 조류 인플루엔자 바이러스 RNA 실험을 통해 RNA fragment를 사용해야 된다는 결과를 토대로 구제역 바이러스 RNA 검지 실험을 진행할 때는 RNA fragment를 사용하여 실험을 진행하였으며 실험 결과는 그림 353과 같음.
- 실험 결과, 형광 분자 표지 농축 종이칩의 구제역 바이러스 RNA fragment에 대한 검지 한계는 250 fM RNA(수 십만개 수준의 RNA)로 확인되며 조류 인플루엔자 바이러스 RNA를 검지할 때보다 결과가 좋다는 것을 알 수 있음.
- 또한, 조류 인플루엔자 바이러스 RNA 실험에서는 DNA를 사용했을 때보다 검지 한계가 좋지 않은 결과를 확인할 수 있었지만 구제역 바이러스 RNA 실험에서는 DNA와 비슷한 결과를 갖는다는 것을 알 수 있음.
- 이는 조류 인플루엔자 검지를 위한 형광 분자 표지와 구제역 바이러스 검지를 위한 형광 분자 표지의 sequence 차이로 인해 발생한 현상을 판단됨.
- 조류 인플루엔자 바이러스 및 구제역 바이러스 검지를 위해 개발된 형광 분자 표지는 연구 종료 이후에도 추가적으로 개선될 계획임.

⑨ 통신/GPS 모듈을 추가하여 바이러스 검지용 소형 형광 검출 장비 개발 및 제작

- GPS모듈 제품특징  
동작전압 : DC 3V- 5V  
본체 크기 : 25mm X 35mm  
안테나 크기 : 25mm X 25mm X 8mm

■ 소형 형광 검출 장비의 모니터링 소프트웨어

- 측정 소프트웨어는 두 가지로 나누어지는데 소형 형광 검출 장비 자체 소프트웨어에 대한 부분으로써 자체 내에서도 측정 및 GPS 데이터를 받을 수 있도록 함.
- 전원을 켜 상태에서 OLED 패널 및 knob으로 되어 있기 때문에 회전하면서 각종 메뉴를 선택할 수 있도록 함.

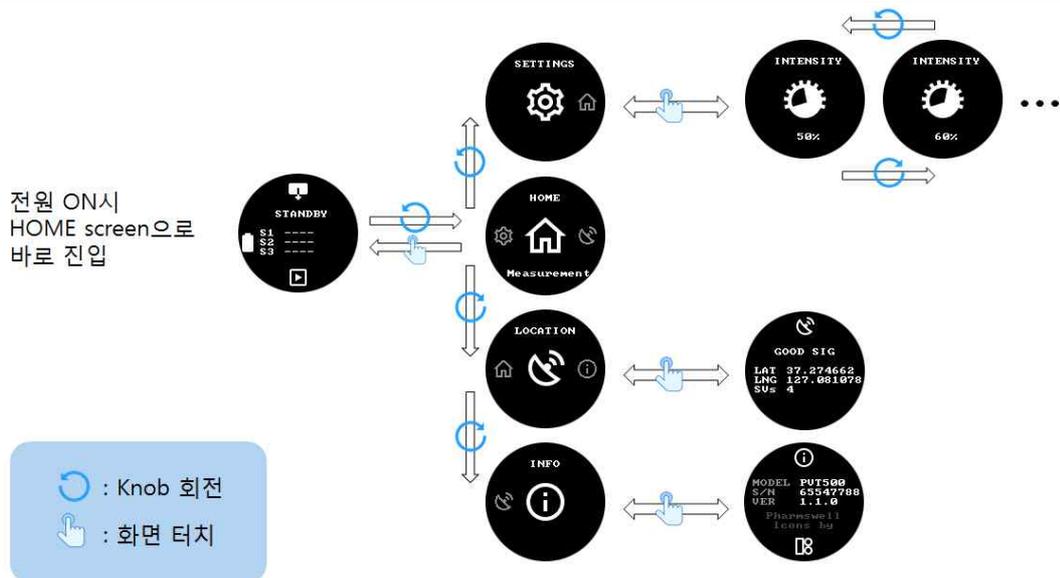


그림 354. 소형 형광 검출 장비의 모니터링 소프트웨어 메뉴

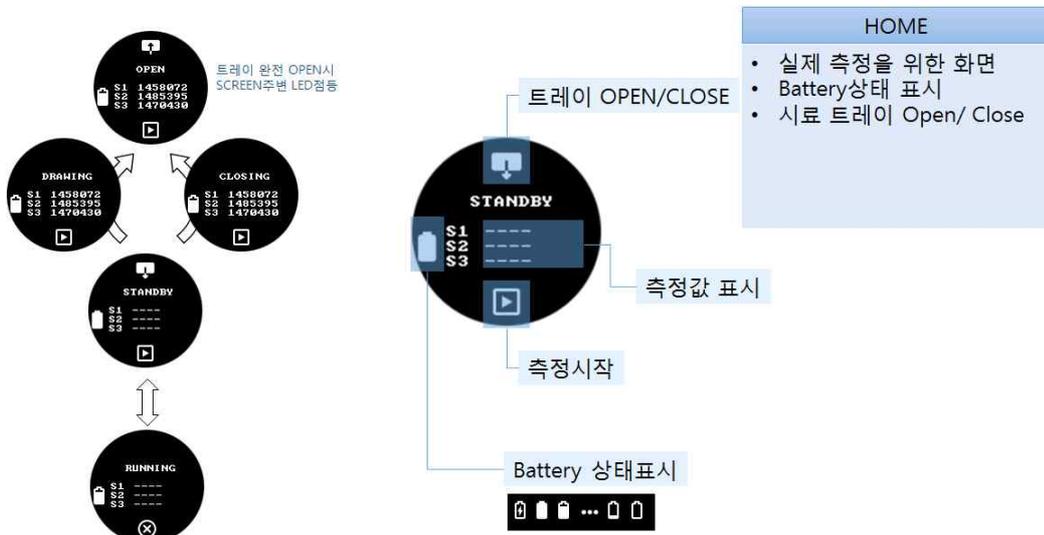


그림 355. 소형 형광 검출 장비의 형광 측정 시 디스플레이



그림 356. 소형 형광 검출 장비의 통신/GPS 모듈 디스플레이

- 무선 통신을 사용하여 모니터링에서 볼 수 있는 기능이 가지도록 함.
- 모니터링 소프트웨어를 구동할 수 있는 컴퓨터에서 가능한데, Window 10이상 되는 컴퓨터에서 가능하며, Net Framework 4.7.2 이상 인스톨 되어있어야 가능하도록 제작함.

- 소형 형광 검출기와는 무선 통신 방법 중 블루투스를 사용하여 무선 통신을 하게 되면 이 무선 통신을 통해서 장치와 연결 하도록 하며, 통신 연결은 블루투스 시리얼 모듈을 통해서 인식하도록 제작함.
- 통신이 완료되었으며, 아래와 같은 메인 메뉴가 만들어지는데 메인 메뉴에는 측정 지도까지 나타나게 되는 데 위성 상태, 위치 좌표 그리고 장치 상태와 장치 정보가 확인할 수 있음.
- 장비 상태는 소형 형광 검출기 장비에 측정된 값이 그대로 전달되도록 함.

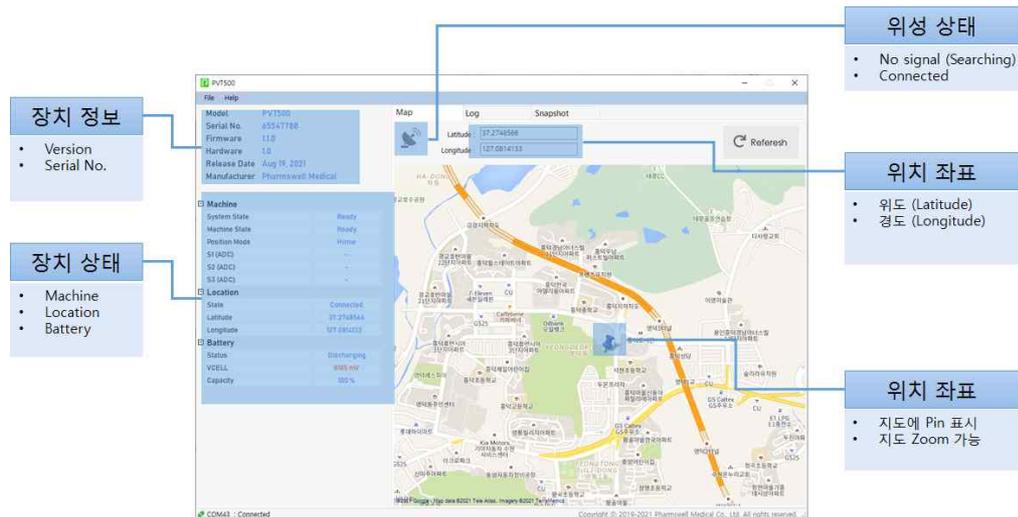


그림 357. 소형 형광 검출 장비의 상태 및 위치 정보가 포함된 실시간 모니터링 프로그램 창

- 로그뷰어를 통해서 측정된 장치 결과 및 GPS 값 등이 실시간으로 확인 가능하며 자동 저장도 가능하도록 제작함.
- 해당 장비를 이용하여 바이러스가 검출될 시, GPS 모듈을 통해 바이러스 감염 여부가 보고됨에 따라 바이러스의 실시간 모니터링하는 것을 가능하게 함.
- 따라서, 해당 모듈을 이용할 시 바이러스의 감염 여부를 파악함에 따라 보다 신속하게 바이러스에 대처할 수 있으며 이를 통해 보다 쉽게 바이러스의 전파 경로를 파악하고 통제할 수 있음.

#### <정성적 연구 결과 요약>

- 기존의 바이러스 진단 기술은 크게 면역크로마토그래피(신속 항원 진단법), 효소결합면역흡착검사(ELISA) 그리고 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)이 있으며 해당 진단 기술들의 특징은 표 23과 같음.

표 23. 기존 바이러스 진단 기술의 장·단점 및 검출 한계

	면역크로마토그래피 (신속 항원 진단법)	효소결합 면역 침강 분석법 (ELISA)	실시간 역전사 중합효소 연쇄반응 (qRT-PCR)
장점	<ul style="list-style-type: none"> <li>짧은 시간에 바이러스 감염 여부를 확인할 수 있음.</li> <li>타 기술에 비해 비교적 가격이 저렴해 실제 임상에서 유용한 경우가 많음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>특정한 항체만 고정시킴으로써 결과의 민감도가 증가하기 때문에 제어가 쉬움.</li> <li>높은 감도와 정확성을 가짐.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>특이적이고 다량의 검체에 있어서 정확히 진단할 수 있음.</li> </ul>
단점	<ul style="list-style-type: none"> <li>타 기술에 비해 정확도나 민감도가 떨어지며, 아형이나 혈청형 구분에 있어서 제한적임.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>항원의 농도가 낮은 경우에는 기저값과 비교하여 형광세기의 변화를 측정하기가 어려움.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>검사과정이 복잡하고 검사 소요시간이 길어 진단이 늦어지는 단점이 있음.</li> </ul>
검사시간	15~20 분	2~3 시간	6 시간 이상
검출 한계	약 $1.2 \times 10^7$ copies/ $\mu$ L (검출한계 농도: 약 2 pM) (시료 양: 약 200 $\mu$ L)	약 $2.3 \times 10^4$ copies/ $\mu$ L (검출한계 농도: 약 38 fM) (시료 양: 약 100 $\mu$ L)	약 5 copies/ $\mu$ L (시료 양: 약 25 $\mu$ L)
	약 $2.4 \times 10^9$ copies/회	약 $2.3 \times 10^6$ copies/회	약 125 copies/회

- 본 연구에서 개발된 형광 분자 표지 농축 종이칩의 경우에는 **검사시간은 약 10~15 분** 정도로 매우 짧은 시간에 바이러스 감염 여부를 확인할 수 있으며 **검출 한계는 약  $1.15 \times 10^6$  copies/회**(검출한계 농도: 250 fM, 시료 양: 약 5  $\mu$ L;  $2.3 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L)으로 같은 종이 기반 검출 기기인 면역크로마토그래피의 검출 한계를 약 2100 배 정도 개선하였고 ELISA와 유사한 정도의 검출한계를 보임.
- HIV를 검지할 수 있는 형광 분자 표지를 사용하여 모델 바이러스 DNA를 검지했을 때에 검출 한계는 약  $1.15 \times 10^3$  copies/회(검출한계 농도: 250 aM, 시료 양: 약 5  $\mu$ L;  $2.3 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L)로 형광 분자 표지를 추가적으로 개선함으로써 더 낮은 검출 한계를 갖는 종이 칩을 제작할 수 있음.

표 24. 연구개발의 기술적 달성 목표의 달성 결과

연구개발의 성능 목표	연구개발의 기술적 달성 목표	목표 달성 결과
검출 가능한 대상 또는 바이러스의 종류	<ul style="list-style-type: none"> <li>구제역 바이러스 (2 종 이상)</li> <li>조류 인플루엔자 바이러스 (2 종 이상)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>구제역 바이러스 3종 (FMDV O3, AS6, C2)</li> <li>조류 인플루엔자 바이러스 2종 (AIV PB2, H5)</li> </ul>
분석 소요 시간	<ul style="list-style-type: none"> <li>30 분 (면역크로마토그래피와 동일)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>약 10~15분</li> </ul>
검출 신뢰도	<ul style="list-style-type: none"> <li>95% 이상의 검출 신뢰도 (ELISA 수준 이상)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ELISA 수준을 달성함.</li> </ul>
검출 민감도	<ul style="list-style-type: none"> <li>~100 EID<sub>50</sub>/mL (면역크로마토그래피 검출 한계의 10배)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>약 <math>1.15 \times 10^6</math> copies/회 (면역크로마토그래피 검출 한계의 약 2100배로 ELISA와 유사함)</li> </ul>
검출 키트의 크기	<ul style="list-style-type: none"> <li>개발 검출 키트의 크기 종이 기반 진단 기기: ~40×80 (mm) 형광 검출기: ~160×160×60 (mm)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>종이 기반 진단 기기: 5×5 (mm)</li> <li>형광 검출기: 280×110×100 (mm)</li> </ul>

- 본 연구개발의 기술적 달성 목표의 달성 결과는 표 24와 같으며 목표로 했던 수치를 달성하였음.

(2) 정량적 연구개발성과

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	25			35		10							10	10	5	2	3		
최종목표 (연차내)	4			1	10	1							4	2.5	8		8	1	1
1차년도	목표														2		2		
	실적							1					3	4.6	5		2		2
2차년도	목표	2											2	2.5	3		3		
	실적	2											2	3.8	11		4		
3차년도	목표	2			1	10	1						2	2.5	3		3	1	1
	실적	2			1	10	1						3	4.5	5		5	2	2
소계	목표	4			1	10	1						4	2.5	8		8	1	1
	실적	4			1	10	1		1				8	4.4	21		11	2	4
달성율 (%)	100			100	100	100							200	176	263		138	200	400

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Identification of Newly Emerging Influenza Viruses by Detecting the Virally Infected Cells Based on Surface Enhanced Raman Spectroscopy and	Analytical chemistry	Jae-young Lim, Jung-soo Nam, Hyunku Shin	87(23)	미국	American Chemical Society	SCIE	2019.03.04	0003-2700	25

	Principal Component Analysis									
2	Paper-Based Platform for Long-Term Deposition of Nanoparticles with Exceptional Redispersibility, Stability, and Functionality	Particle & particle systems characterization	Hui Hun Cho, Su Ji Kim, Ali Turab Jafry	36(6)	독일	WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim	SCIE	2019.04.05	0934-0866	20
3	Fabrication, Flow Control, and Applications of Microfluidic Paper-Based Analytical Devices	Molecules	Hosub Lim	24(16)	스위스	MDPI	SCIE	2019.08.07	1420-3049	50
4	Molecular-Level Interactions between Engineered Materials and Cells	International journal of molecular sciences	Yoon-ha Jang, Xuelin Jin, Prabakaran Shankar	20(17)	스위스	MDPI	SCIE	2019.08.25	1422-0067	50
5	Humidity responsive single-layered film fabricated by hydrophilic titanium oxide nanotubes	Applied physics letters	Minki Lee	115(9)	미국	American Institute of Physics	SCIE	2019.08.26	0003-6951	50
6	Highly sensitive humidity-responsive actuator comprising aligned electrospun fibers containing metal-organic framework nanoparticles	Sensors and Actuators B: Chemical	Saebom Lee, Minki Lee	332	스위스	Elsevier Science SA	SCIE	2021.04.01	0925-4005	25
7	Engineering Genetic Systems for Treating Mitochond	Pharmaceutics	Yoon-ha Jang, Sae Ryun Ahn	13(6)	스위스	MDPI	SCIE	2021.05.28	1999-4923	33

	rial Diseases Portable Au Nanoparticle-Based Colorimetric Sensor Strip for Rapid On-Site Detection of Cd <sup>2+</sup> Ions in Potable Water	BioChip Journal	Hui Hun Cho	15	대한민국	KOREAN BIOCHIP SOCIETY-KBCS	SCIE	2021.06.18	1976-0280	33
--	--	-----------------	-------------	----	------	-----------------------------	------	------------	-----------	----

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2019 한국세라믹학회 추계학술대회 및 총회	조희훈	2019.04.10	제주라마다 프라자호텔	대한민국
2	2019 대한기계학회 바이오공학부문 추계학술대회	임호섭	2019.04.26	해운대 한화리조트 마나톨라홀	대한민국
3	2019 한국바이오칩학회 추계학술대회	임호섭	2019.05.16	그랜드 힐튼 서울 컨벤션센터	대한민국
4	2019 한국바이오칩학회 추계학술대회	조희훈	2019.05.16	그랜드 힐튼 서울 컨벤션센터	대한민국
5	2019 대한기계학회 마이크로/나노공학부 문 추계학술대회	임호섭	2019.05.24	부산대학교 통합기계관	대한민국
6	2019 한국생물공학회 추계학술발표대회 및 국제심포지엄	장윤하	2019.10.10	대구 엑스코	대한민국
7	Asia 3 Roundtable of Nucleic Acids 2019	이정현	2019.10.13	일본 히메지	일본
8	The 7th International Workshop on Nanotechnology and Application IWNA 2019	이정현	2019.11.07	베트남 판 티엣	베트남
9	2019 한국세라믹학회 추계학술대회	정순환	2019.11.14	서울 코엑스	대한민국
10	IEEE-NANOMED 2019	이정현	2019.11.24	광주	대한민국
11	72nd Annual Meeting of the APS Division of Fluid Dynamics 2019년	이민기	2019.11.25	미국 시애틀	미국
12	한국가시화정보학회 추계학술대회	문영광	2019.12.06	계명대학교 동산병원	대한민국
13	The 1st International Symposium on Applied Plasma Science and Engineering 2020	이정현	2020.01.31	태국	태국
14	2020 한국바이오칩학회 추계학술대회	장준혁	2020.07.09	소노캄 여수 호텔	대한민국
15	2020 한국바이오칩학회 추계학술대회	조희훈	2020.07.09	소노캄 여수 호텔	대한민국
16	제11회 한국유체공학학술대회	문영광	2020.08.13	라마다 프라자 제주호텔, 제주도	대한민국
17	2020년 한국가시화정보학회 추계학술대회	문혁균	2020.11.06	조선대학교 제 1공학관	대한민국
18	2020 한국세라믹학회 추계학술대회	장준혁	2020.11.23	대전컨벤션센터/온라인	대한민국
19	2020 한국세라믹학회 추계학술대회	정순환	2020.11.23	대전컨벤션센터/온라인	대한민국
20	The 8th ICMAP & The 9th ISFM	장준혁	2021.01.19	온라인 학회	대한민국

21	The 8th ICMAP & The 9th ISFM	정순환	2021.01.19	온라인 학회	대한민국
----	------------------------------	-----	------------	--------	------

기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	측방 유동 분석 장치의 제조 방법	대한민국	성균관대학교산학협력단	2020.06.08	10-2020-0069106					100	
2	상보적 염기서열을 갖는 절편을 도입한 핵산-탄소 나노 튜브 구조체, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 형광 기반 핵산 검출 센서	대한민국	성균관대학교산학협력단, 숙명여자대학교산학협력단	2020.06.12	10-2020-0071487					50	
3	나노입자가 탑재된 하이드로겔 마이크로비드 및 이의 제조 방법	대한민국	성균관대학교산학협력단	2020.09.08	10-2020-0114432					33	
4	핵산 검출 키트 및 이의 제조 방법	대한민국	성균관대학교산학협력단	2021.07.06	10-2021-0088552					100	

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 <sup>1)</sup>	인증여부 <sup>2)</sup>	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 <sup>3)</sup>	제안/인증일자

- \* 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제표준

번호	표준화단계구분 <sup>1)</sup>	표준명	표준기구명 <sup>2)</sup>	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 <sup>3)</sup>	제안자	표준화 번호	제안일자

- \* 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	FLPS-1000 형광 검출기	2021.06.28	팜스웰메디컬	휴대용	바이러스 현장 진단 검사 키트 검출용	5년		

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	통상실시권	핵산 검출 키트 및 이의 제조 방법	성균관대학교 산학협력단	2021.08.12	10,000,000 원	5,000,000원

- \* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 <sup>1)</sup>	사업화 형태 <sup>2)</sup>	지역 <sup>3)</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

- \* 1) 기술이전 또는 자기실시
- \* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- \* 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내 국외			
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2019년	2019년	
1	김정은	(주)팜스웰메디컬	1	1	1
합계					

고용 효과

구분			고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력		
		생산인력		
	개발 후	연구인력		
		생산인력		

비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용
1	제안	21년도 농림축산식품 연구개발사업 신규 과제기획위원회	농림식품기술기획평가 원	2020	농림식품기술기획평가 원 가축질병대응기술개발 사업 신규과제 기획위원회로 참석하여 동물약품 개발 관련한 신규과제를 기획함.
2	채택	2021년도 가축질병대응기술개 발사업 신규과제 기획	농림식품기술기획평가 원	2020	농림식품기술기획평가 원 가축질병대응기술개발 사업 신규과제 기획위원회로 참석하여 동물약품 개발 관련하여 기획한 신규과제가 채택되어 시행됨.

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	1	2019			2		2		2					
2	2	2020	2	2			2	2	4					
3	3	2021	2	1	2		4	1	5					

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	지방일간지	팍스경제TV	팍스웰바이오, 자회사 팍스웰메디컬 구제역·AI	2019.04.03

			신속진단키트 개발업체로 '선정' [리포트][단독]	
2	지방TV방송	팍스경제TV	팜스웰바이오, 세계최초 '다차원 바이러스 검출기기' 개발 착수	2019.04.04
3	Internet/PC통신	기계로봇 연구정보센터 연구자 인터뷰	한 손안에 들어오는 유체 역학	2021.04.05
4	Internet/PC통신	기계로봇연구센터 웨비나(Webinar)	마이크로 유체역학기기를 활용한 조류독감, 구제역 등 감염병 조기진단 기기의 개발	2021.04.30

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

\* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

---



---

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

---



---



### ③ Fabrication, Flow Control, and Applications of Microfluidic Paper-Based Analytical Devices

#### Fabrication, Flow Control, and Applications of Microfluidic Paper-Based Analytical Devices

Hosub Lim <sup>1</sup>, Ali Turab Jafry <sup>2,3</sup> and Jinke Lee <sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup> School of Mechanical Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon, Gyeonggi-do 16419, Korea  
<sup>2</sup> Faculty of Mechanical Engineering, Ghulam Ishaq Khan Institute of Engineering Sciences and Technology, Topi 23640, Pakistan  
<sup>3</sup> Institute of Quantum Biophysics, Sungkyunkwan University, Suwon, Gyeonggi-do 16419, Korea

\* Correspondence: lee.jinke@skku.edu (J.L.); aliturb@iqt.skku.ac.kr (A.T.)

Academic Editor: Sangsu Park

Received: 20 July 2019; Accepted: 1 August 2019; Published: 7 August 2019



**Abstract:** Paper-based microfluidic devices have advanced significantly in recent years as they are affordable, automated with capillary action, portable, and biodegradable diagnostic platforms for a variety of health, environmental, and food quality applications. In terms of commercialization, however, paper-based microfluidics still have to overcome significant challenges to become an authentic point-of-care testing format with the advanced capabilities of analyte purification, multiplex analysis, quantification, and detection with high sensitivity and selectivity. Moreover, fluid flow manipulation for multiplex integration, which involves valving and flow velocity control, is also a critical parameter to achieve high-performance devices. Considering these limitations, the aim of this review is to (i) comprehensively analyze the fabrication techniques of microfluidic paper-based analytical devices, (ii) provide a theoretical background and various methods for fluid flow manipulation, and (iii) highlight the recent detection techniques developed for various applications, including their advantages and disadvantages.

**Keywords:** microfluidics;  $\mu$ PAD; 2D  $\mu$ PADs; 3D  $\mu$ PADs; fabrication; paper-based analytical device

#### 1. Introduction

Analytical testing using paper has a long history, such as the litmus test dating back to the early 18<sup>th</sup> century [1]. Paper patterning with hydrophobic materials can be traced back to the early 19<sup>th</sup> century where reaction zones were fabricated with paraffin [2,3]. However, it was only in 2007 [4] that the field of paper-based microfluidics emerged as a promising alternative to the conventional microfluidic devices for disease diagnostics, drug analysis, environmental monitoring, and food quality control, offering affordable, portable, and biodegradable analytical devices [5,6]. The inherent advantage in using paper lies in its capillary action, which results in an effortless fluid flow without the requirement for external pumping [7]. A paper channel circumvents the air bubble issue faced by conventional microfluidic channels and it can also serve as a pumping source for these channels [8–12].

Microfluidic paper-based analytical devices ( $\mu$ PADs) can analyze not only simple lateral flow tests but also perform complex analysis requiring multiple stage reactions using only small amounts of biochemical samples. The fabrication techniques, fluid manipulation, and detection capabilities for low concentrations of analytes have improved considerably in the past decade involving 1D, 2D, and 3D devices for a variety of applications [13].

This review focuses on the recent advancements in the areas of novel fabrication techniques, fluid handling, and detection methodologies for biomedical, environmental, and food quality control applications (Figure 1). The fabrication techniques are analyzed extensively in this article. Fluid handling is a crucial element in achieving an authentic point-of-care (POC) device; hence, it merits

possess the complex problem-solving capability for multiple sequential reactions. Other advantages of 3D  $\mu$ PADs include increasing reaction speed and sequential delivery of reagents with free direction. The simple fabrication steps require stacking, folding, and a combination of 2D fabrication techniques. Furthermore, a variety of flow control methods were developed, permitting useful analytical platforms to be used in a wide range of applications related with health diagnostics, environmental monitoring, and drug analysis.

The future directions of various fabrication techniques will include commercially available mass production methods for convenient product development. In this field, we expect inkjet printing, flexographic printing, screen printing, and laser cutting at first to achieve rapid device fabrication and throughput as well as diversity in the use of various hydrophobic inks or chemicals for deposition on the  $\mu$ PADs. Additionally, the cost of fabrication will be reduced further with improvement in the resolution of patterning.

In terms of fluid handling, the flow control techniques, whether they are geometric, chemical or mechanical, need to be matured further for use in a variety of flow situations. The flow control systems at the moment either lack in sensitivity and reproducibility, or are complicated and expensive to produce.

In terms of commercialization and industrialization of  $\mu$ PADs, paper-fluidics is still in its transition stage. Although the recent growth of this field was at a tremendous pace, it still lacks a rapid and simple high-throughput manufacturing process without expensive chemicals or extra equipment to be successfully mass produced in the industry. Additionally, a full understanding of the fluid flow for both water and organic fluids on a variety of surfaces ranging from hydrophilic/hydrophobic to omniphobic and omniophobic should be well understood for producing an effective, high-performance device. Finally, the detection methods used must be low cost with higher sensitivity for achieving true POC diagnostics applications in resource-limited settings. Therefore, the focus should be on the development of  $\mu$ PADs with integrated flow control methods, which have advanced characterization with accuracy and precision of flow manipulation that is compatible with high-volume fabrication.

**Author Contributions:** H.L. and A.T. wrote the manuscript; J.L. revised the manuscript; H.L., A.T., and J.L. improved the revision of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by Animal Disease Management Technology Development Program funded by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) (grant number 118004-3), and the Korea Environment Industry & Technology Institute (KETI) through its Ecological Inhibition-based Environmental Pollution Management Technology Development Project funded by the Korea Ministry of Environment (MOE) (grant number 20190270003).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest with this work.

#### References

1. Davy, H. An account of some analytical experiments on a mineral production from Devonshire, consisting principally of alumina and water. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **1808**, *95*, 155–162. [CrossRef]
2. Dietrich, K. Testing Paper and Method of Making Same. U.S. Patent US560129A, 14 January 1902.
3. Yagci, H. Applications of Confined Spot Tests in Analytical Chemistry. *Preliminary Paper Int. Eng. Chem. Anal. Ed.* **1937**, *9*, 79–82. [CrossRef]
4. Martinez, A.W.; Phillips, S.F.; Butte, M.J.; Whitesides, G.M. Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low Volume, Portable Biosays. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1318–1320. [CrossRef] [PubMed]
5. Yekimov, A.K.; Akram, M.S.; Lowe, C.R. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab Chip* **2013**, *13*, 2210. [CrossRef] [PubMed]
6. Gale, D.M.; Adams, J.A.; Metakoskepitak, J.; Henry, C.S. Recent Developments in Paper-Based Microfluidic Devices. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 19–41. [CrossRef] [PubMed]
7. Noh, H.; Phillips, S.F. Metering the Capillary-Driven Flow of Fluids in Paper-Based Microfluidic Devices. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 4181–4187. [CrossRef] [PubMed]
8. Osborn, J.L.; Lutz, R.; Fu, E.; Kaultman, P.; Stevens, D.Y.; Yager, P. Microfluidics without pumps: Reinventing the T-junction and H-filter in paper networks. *Lab Chip* **2010**, *10*, 2659–2665. [CrossRef]

### ④ Molecular-Level Interactions between Engineered Materials and Cells

#### Molecular-Level Interactions between Engineered Materials and Cells

Yoon-ha Jang <sup>1,†</sup>, Xuelin Jin <sup>2,†</sup>, Prabakaran Shankar <sup>1,3,\*</sup>, Jung Heon Lee <sup>1,3,\*</sup>, Kyubong Jo <sup>2,3</sup> and Kwang-il Lim <sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemical and Biological Engineering, Sookmyung Women's University, Seoul 04310, Korea  
<sup>2</sup> Department of Chemistry and Integrated Biotechnology, Soongsil University, Seoul 01070, Korea  
<sup>3</sup> School of Advanced Materials Science and Engineering, Sungkyunkwan University (SKKU), Suwon 16419, Korea

\* Correspondence: jkbe78@skku.edu (J.H.L.); jkysub@soongsil.ac.kr (K.I.L.); khl@sookmyung.ac.kr (K.-I.L.)  
† These authors contributed equally to this work.

Received: 15 July 2019; Accepted: 21 August 2019; Published: 25 August 2019



**Abstract:** Various recent experimental observations indicate that growing cells on engineered materials can alter their physiology, function, and fate. This finding suggests that better molecular-level understanding of the interactions between cells and materials may guide the design and construction of sophisticated artificial substrates, potentially enabling control of cells for use in various biomedical applications. In this review, we introduce recent research results that shed light on molecular events and mechanisms involved in the interactions between cells and materials. We discuss the development of materials with distinct physical, chemical, and biological features, cellular sensing of the engineered materials, transfer of the sensing information to the cell nucleus, subsequent changes in physical and chemical states of genomic DNA, and finally the resulting cellular behavior changes. Ongoing efforts to advance materials engineering and the cell-material interface will eventually expand the cell-based applications in therapies and tissue regeneration.

**Keywords:** mechanotransduction; materials engineering; cell surface sensors; genome status; cellular responses

#### 1. Introduction

Biological molecules, including DNA, RNA, and proteins, are introduced into mammalian cells to control the physiology, function, behavior, and fate of the cells [1–3]. These molecular treatments lead to the expression of the external genes or changes in endogenous gene expression. These genetic manipulations subsequently alter interactions between cellular molecules involved in the targeted cellular pathways, eventually enabling the control of mammalian cells. However, the introduced biological molecules may also eventually alter other cellular processes that were not targeted, via cross-talking with multiple intracellular pathways at the same time or unspecified and random interactions with cellular components, thereby causing unwanted side effects [4–6]. In addition, this conventional method may be less than ideal in realizing the intended cellular state.

Recent attempts to improve the control of mammalian cells have explored inducing cellular responses to materials [7–9]. This new approach may eliminate the need to introduce biological molecules into cells or enable better control of mammalian cells when combined with currently used biological methods. In the present review, we introduce multiple studies concerning material science and engineering applications to control cells. This review covers the construction of diverse forms of materials with varied physical and chemical characteristics such as stiffness, viscosity, morphology, and chemical structure, molecular mechanisms underlying cellular sensing of engineered materials

uncover the controlling effects of engineered materials on cellular processes will eventually advance cell-based biomedical applications by adding new physical and chemical tools to the conventional sets of biological cell-tuning tools.

**Funding:** This research is funded by a grant from the National Research Foundation of Korea (NRF2016M3A9B90647031). This work was also made of funding by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Animal Disease Management Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (Grant number: 118094-03).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Park, J.H.; Ierova, P.H.; Zhao, R.; Huo, H.; Daley, G.Q. Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1160–1168. [CrossRef] [PubMed]
2. Liu, X.; Costanzo, L.; Rutherford-Beard, J.; Al-Ayoub, A.M.; Thompson-Bradley, A.; Zheng, H.; Wied, S.A.; Eblen, S.T. Phosphorylation of the alternative mRNA splicing factor 45 (SFR45) by CB1 regulates its splice site utilization, cell migration and invasion. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 4949–4962. [CrossRef] [PubMed]
3. Fu, X.; Zhang, H.; Chen, Z.; Yang, Z.; Shi, D.; Liu, T.; Chen, W.; Yao, F.; Su, X.; Deng, W.; et al. TPAP2B overexpression contributes to tumor growth and progression of thyroid cancer through the COX-2 signaling pathway. *Cel. Death Dis.* **2019**, *10*, 307. [CrossRef] [PubMed]
4. Cullaa, G.; Bostin, J.; Bostin, J.; Prati, F.; Pennanen, P.; Rooyack, C.; Trichianesi, M.; Rousseau, E.; Lamirou-Garcia, I.; Gaynon-Daperat, V.; et al. CRISPR-Cas9 genome editing induces megabase-scale chromosomal translocations. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1136. [CrossRef] [PubMed]
5. Yao, C.H.; Liu, G.Y.; Wang, R.; Moon, S.H.; Gross, R.W.; Patis, G.J. Identifying off-target effects of stemoxin reveals that carnitine palmitoyltransferase 1 is essential for cancer cell proliferation independent of beta-oxidation. *PLoS Biol.* **2018**, *16*, e200792. [CrossRef]
6. Hassan-Bey-Ahmed, S.; Van Kalle, C.; Schmidt, M.; McCormack, M.P.; Wulffraat, N.; Leboldus, P.; Lim, A.; Osborne, C.S.; Pawlak, R.; Morillon, E.; et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **2003**, *302*, 415–419. [CrossRef] [PubMed]
7. Park, J.; Kim, D.H.; Kim, H.N.; Wang, C.J.; Kwak, M.K.; Huh, E.; Suh, K.Y.; An, S.S.; Levchenko, A. Directed migration of cancer cells guided by the graded texture of the underlying matrix. *Nat. Mater.* **2016**, *15*, 792–801. [CrossRef]
8. Engler, A.J.; Sen, S.; Sweeney, H.L.; Descher, D.E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **2006**, *126*, 677–689. [CrossRef]
9. Jang, Y.H.; Park, Y.S.; Nam, J.S.; Yang, Y.; Lee, J.E.; Lee, K.H.; Kang, M.; Chialastri, A.; Noh, H.; Park, J.; et al. Nanotopography-based engineering of reticular DNA integration patterns. *Nanoscale* **2019**, *11*, 5603–5704. [CrossRef]
10. Zhang, C.; Xie, B.; Zou, Y.; Zhu, D.; Lu, L.; Zhao, D.; Nie, H. Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional biomaterials for cell fate regulation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *132*, 33–56. [CrossRef]
11. Xi, W.; Saw, T.B.; Delacour, D.; Lim, C.T.; Ladoux, B. Material properties to active tissue mechanics. *Nat. Rev. Mater.* **2018**, *4*, 23–44. [CrossRef]
12. Mahamed, I.; Chowdhury, F.; Maruthamuthu, V. Biophysical Tools to Study Cellular Mechanotransduction. *Bioengineering* **2017**, *4*, 12. [CrossRef] [PubMed]
13. Kang, P.; Kumar, S.; Schaefer, D. Novel biomaterials to study neural stem cell mechanobiology and improve  $\alpha$ 2-macroglobulin therapies. *Curr. Opin. Biomed. Eng.* **2017**, *4*, 13–20. [CrossRef] [PubMed]
14. Yining, K.H.; Mooney, D.J. Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 728–742. [CrossRef] [PubMed]
15. Du, C.; Goulet, J.E. Cell sensing of physical properties at the nanoscale: Mechanisms and control of cell adhesion and phenotype. *Acta Biomater.* **2016**, *30*, 26–46. [CrossRef] [PubMed]
16. Chatterji, G.; Yap, A.S. Focal Foci and Mechanotransduction at Cell-Cell Junctions. *Curr. Biol.* **2018**, *28*, R445–R457. [CrossRef] [PubMed]
17. Ingber, D.E. Mechanotransduction through integrins: Cells act locally but think globally. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 1472–1474. [CrossRef] [PubMed]



Review  
**Engineering Genetic Systems for Treating Mitochondrial Diseases**

Yoon-ha Jang <sup>1,†</sup>, Sae Ryun Ahn <sup>2,†</sup>, Ji-yeon Shim <sup>1</sup> and Kwang-il Lim <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemical and Biological Engineering, Soongsil Women's University, Yongso-gu, Seoul 04310, Korea; min\_jy@soongsil.ac.kr (Y.-S.); sra@swu.ac.kr (J.-Y.); kwangil@swu.ac.kr (K.-I.)  
<sup>2</sup> Industry-Collaboration Center, Industry-Academic Cooperation Foundation, Soongsil Women's University, Yongso-gu, Seoul 04310, Korea; saeryun@soongsil.ac.kr  
\* Correspondence: kwangil@soongsil.ac.kr; Tel.: +82-2-710-7627  
† These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Mitochondria are intracellular energy generators involved in various cellular processes. Therefore, mitochondrial dysfunction often leads to multiple serious diseases, including neurodegenerative and cardiovascular diseases. A better understanding of the underlying mitochondrial dysfunctions of the molecular mechanism will provide important hints on how to mitigate the symptoms of mitochondrial diseases and eventually cure them. In this review, we first summarize the key parts of the genetic processes that control the physiology and functions of mitochondria and discuss how alterations of the processes cause mitochondrial diseases. We then list up the relevant cost genetic components involved in these processes and explore the mutations of the components that link to the diseases. Lastly, we discuss recent attempts to apply multiple genetic methods to alleviate and further reverse the adverse effects of the cost component mutations on the physiology and functions of mitochondria.

**Keywords:** mitochondrial disease; gene therapy; mitochondrial DNA; heteroplasmy; mitochondrial gene delivery



Citation: Jang, Y.-h.; Ahn, S.R.; Shim, J.-y.; Lim, K.-i. Engineering Genetic Systems for Treating Mitochondrial Diseases. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 810. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060810>

Academic Editor: Joanna Kopecka

Received: 30 April 2021  
Accepted: 24 May 2021  
Published: 29 May 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

*Pharmaceutics* **2021**, *13*, 810. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060810>

<https://www.mdpi.com/journal/pharmaceutics>

**1. Introduction**

Mitochondria are intracellular organelles that produce cellular energy in the form of adenosine triphosphate (ATP) through oxidative phosphorylation. Mitochondria have their own genomes as circular forms of DNA. Mitochondrial DNA (mtDNA) encodes 13 messenger RNAs (mRNAs), 2 ribosomal RNAs (rRNAs), and 22 transfer RNAs (tRNAs) required for the production of 13 protein subunits of the electron transport chain that performs oxidative phosphorylation [1]. Most cells have hundreds of mitochondria containing 2–10 copies of mtDNA [2]. More than one type of mtDNA molecule coexist in a cell. The resulting mitochondrial genome sequence heterogeneity represents a state of mitochondrial heteroplasmy [1].

Hundreds of mutations at different mtDNA sites have been reported to reduce the expression of the functional gene products required for oxidative phosphorylation [4]. When the portion of mtDNAs with such mutations out of the total mtDNAs in a cell exceeds a threshold, typically ranging from 0.6 to 0.8, the corresponding cell can be in a disease state [1]. For example, when the portion of mtDNA with the m.3291C>G mutation within the MT-ATP6 gene is higher than 0.7, neurogenic muscle weakness, ataxia, and retinitis pigmentosa (NARP) syndrome can develop. A proportion of the mutant mtDNA > 0.9 links to the development of Leigh syndrome [5].

Mutations in protein-coding mitochondrial genes can cause diseases, including Leber's hereditary optic neuropathy (LHON), mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes (MELAS) syndrome, and cardiomyopathy, by resulting in the production of non-functional proteins that cannot perform oxidative phosphorylation or interfere

with the mitochondrial respiratory chain [6]. MITO-Porter can also mediate the delivery of relatively large mRNA [19]. The synthesis of ND3 mRNA was achieved by T7 promoter-driven *in vitro* transcription. ND3 mRNA formed a complex with positively charged protamine for encapsulation into MITO-Porter nanoparticles. MITO-Porters carrying normal ND3 mRNAs were introduced into fibroblasts from a Leigh syndrome patient harboring the m.310158T>C mutation in the ND3 gene. To confirm the mitochondrial delivery of ND3, the proportion of mutant ND3 mRNA in the mitochondria of fibroblasts, which were obtained from a patient with Leigh syndrome caused by the m.310158T>C mutation in mtDNA, and the oxygen consumption rate indicating the mitochondrial respiratory activities were both evaluated. Compared with non-treated cells showing the mutant proportion of approximately 0.8, the mutant proportion of the treated cells was significantly decreased to 0.1 in a dose-dependent manner. In addition, the maximal oxygen consumption rate of the cells treated with the MITO-Porter carrying normal ND3 mRNAs was about 1.46-fold higher than that of the untreated cells. These data indicate that mitochondrial respiratory activity can be improved by the introduction of normal mRNAs into mitochondria [19]. The use of MITO-Porters can be a potential therapeutic strategy for mitochondrial diseases caused by mutations in mtDNA because of their ability to encapsulate various forms of nucleic acids and pass through biological membranes, if the basal cytotoxicity of the liposome-based carriers can be overcome.

**4. Concluding Remarks**

Mutations in mitochondrial genomes can cause diseases involving malfunction of various organs, including the brain, nerves, eyes, and heart, due to impaired energy production. Correction of the mutations or introduction of functional genetic components into mitochondria can be a reasonable strategy to cure mitochondrial diseases. However, two separate lipid membranes of mitochondria do not allow easy access of the genetic components to the matrix space where the mitochondrial genes and proteins mainly operate. The mixed and heterogeneous nature of mitochondrial DNAs in a cell complicates the design and applications of the gene therapy strategy. In this review, we introduced multiple aspects of basic regulations of mitochondrial DNA replication and transcription. Mutations of the genetic components that affect the physiology and functions of mitochondria and linkages between the mutations and diseases have been also discussed. Various studies targeted to reduce the number of mutant DNAs in mitochondria and enhance the delivery system for the introduction of therapeutic genetic components into mitochondria. To reach the goal of treating and eventually curing mitochondrial diseases, various approaches, employing physical forces, newly constructed chemical complexes, and recombinant proteins, have been applied. Partial success in the studies encourages future ambitious attempts to effectively cure mitochondrial disease. A better understanding of molecular and genetic mechanisms involved in mitochondrial diseases and the fusion of multidisciplinary approaches will further fuel the advances in mitochondrial gene therapy.

**Funding:** This work was supported by grants from the National Research Foundation of Korea (NRF) (Grant numbers: 2018R1A6A1A1008703 and 2020R1A2C2A1A1010001), and was also supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Animal Disease Management Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (Grant number: 118094-03), and Technology Development Program (Grant number: S2038432) funded by the Ministry of SMEs and Startups (MSS, Korea).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Abbreviation**

ATP: adenosine triphosphate  
AAV: adeno-associated virus  
AD: Alzheimer's disease

⑧ Portable Au Nanoparticle-Based Colorimetric Sensor Strip for Rapid On-Site Detection of Cd<sup>2+</sup> Ions in Potable Water

BiChp Journal  
<https://doi.org/10.1007/s13206-021-00029-w>

**ORIGINAL ARTICLE**



**Portable Au Nanoparticle-Based Colorimetric Sensor Strip for Rapid On-Site Detection of Cd<sup>2+</sup> Ions in Potable Water**

Hui Hun Cho<sup>1</sup>, Jun Hyuk Heo<sup>1,2,†</sup>, Do Hyeon Jung<sup>1</sup>, So Hui Kim<sup>1</sup>, Se-Jueng Suh<sup>1</sup>, Kwon Hoon Han<sup>1,3</sup>, Jung Heon Lee<sup>1,2,4,5,\*</sup>

Received: 28 April 2021 / Revised: 31 May 2021 / Accepted: 3 June 2021  
© The Author(s), under exclusive license to The Korean BiChp Society 2021

**Abstract**

Simple, rapid, and instrument-free detection of cadmium ions (Cd<sup>2+</sup>) with a portable device is essential to prevent the contamination of potable water. Herein, we propose a simple, fast, and low-cost method for the real-time/on-site detection of Cd<sup>2+</sup> using glutathione-modified Au nanoparticles (GSH-AuNPs) deposited on a polyethylene terephthalate (PET) sensor strip. To fabricate the sensor strip, a paint composed of GSH-AuNPs and polyvinylpyrrolidone was prepared. Subsequently, the GSH-AuNP paint was deposited on a mold fixed on the PET substrate and dried in ambient air. The GSH-AuNPs deposited on the PET substrate quickly redispersed in water, turning the water blue. However, the GSH-AuNPs aggregated in water samples containing Cd<sup>2+</sup>, turning the water blue. The limit of detection of this Cd<sup>2+</sup> sensor strip is 18.8 nM, which is comparable to the maximum contamination level of 44.5 nM Cd<sup>2+</sup> in potable water stipulated by the US Environmental Protection Agency. Finally, we demonstrate that the GSH-AuNP-based sensor strip can be used in the on-site detection of Cd<sup>2+</sup> in real samples such as tap water.

**Keywords:** Colorimetric sensor strips · Cadmium · Real-time/on-site detection · Gold nanoparticles (AuNPs) · Solid-type

**1. Introduction**

Contamination of the environment with heavy metals is one of the most serious environmental issues because of the several adverse effects of these metals on the human health and environment [1–3]. Among the heavy metals, cadmium is one of the metals that severely affect human health, and is associated with many illnesses such as kidney disease, hypertension, and cardiovascular diseases [6–8]. As cadmium ions (Cd<sup>2+</sup>) are relatively more soluble in water compared to other heavy metals, they can easily enter the soil and water from anthropogenic activities such as mining, smelting, excessive withdrawal of groundwater, and manufacturing of batteries [9, 10]. Thus, stringent regulations have been issued on the limit of the concentration of Cd<sup>2+</sup>, specifically in potable water. The United States Environmental Protection Agency (USEPA) has set a quality guideline of 0.005 mg/L, the World Health Organization (WHO) has stipulated a maximum contaminant concentration of 0.003 mg/L, the European Union (EU) has stipulated a regulated value of 0.005 mg/L, and the National Health and Medical Research Council (NHMRC) has established a guideline value of 0.002 mg/L for

Hui Hun Cho and Jun Hyuk Heo contributed equally to this work.

† Jun Hyuk Heo  
[hheo@skku.edu](mailto:hheo@skku.edu)

† Kwon Hoon Han  
[hhan@skku.edu](mailto:hhan@skku.edu)

† Jung Heon Lee  
[jlee7@skku.edu](mailto:jlee7@skku.edu)

<sup>1</sup> School of Advanced Materials Science and Engineering, Sungkyunkwan University (SKKU), Suwon 16419, Republic of Korea

<sup>2</sup> Research Center for Advanced Materials Technology (RCAMT), Sungkyunkwan University (SKKU), Suwon 16419, Republic of Korea

<sup>3</sup> SKKU Advanced Institute of Nanotechnology (SAINT), Sungkyunkwan University (SKKU), Suwon 16419, Republic of Korea

<sup>4</sup> Biomedical Institute for Convergence at SKKU (BICS), Sungkyunkwan University (SKKU), Suwon 16419, Republic of Korea

Published online: 18 June 2021

Springer **MDPI**

BiChp Journal  
<https://doi.org/10.1007/s13206-021-00029-w>

**4.4 Colorimetric Detection of Cd<sup>2+</sup> with GSH-AuNPs and GSH-AuNP-Based PET Sensor Strips**

In the case of ion detection using GSH-AuNPs, 450 µL of a GSH-AuNP suspension was first prepared, and then 50 µL of a Cd<sup>2+</sup> solution (500 nM) was added to it. For ion detection using the GSH-AuNP sensor strips, a series of stock solutions (1 mL) having different concentrations of metal ions (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, and Cd<sup>2+</sup>) was used. The sensor strips were dipped in centrifuge tubes containing DI water as the controlling factor and other water samples with each of the metal ions. Each experiment for the detection of Cd<sup>2+</sup> and analysis of the selectivity was conducted five times with dried GSH-AuNP-based PET sensor strips.

**4.5 Characterization**

To confirm the loading of GSH-AuNPs on the PET substrate, the surface morphology of the sample was observed with high resolution transmission electron microscope (JEM-2100F, JEOL, Japan) and field-emission scanning electron microscope (JSM-7600F, JEOL, Japan) at the MEMS Sensor Platform Center of Sungkyunkwan University (SKKU). The variation in the color of water was monitored with a digital camera (Sony A6000). The absorbance and extinction spectra of the samples were recorded with a UV-Vis spectrometer (Hewlett-Packard 8453) and CM-2500Q spectrophotometer (Konica Minolta), respectively.

**Supplementary Information:** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s13206-021-00029-w>

**Acknowledgments:** This research was supported by Animal Disease Management Technology Development Program funded by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) (Grant No. 118094-03) and GRRC program of Gyeonggi Province (Grant No. GRRC-Sungkyunkwan 2017-B02). J.H.H. appreciates the support from the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF-2019R1A6A1A1003608).

**Declarations**

**Conflict of Interest:** There are no conflicts to declare.

**References**

- Masinda, V.; Maedi, K.L. Environmental contamination by heavy metals. *IntechOpen* **(2018)**. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76082>
- Wiana, R.A.; Oskiem, F.E. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available

- strategies for remediation. *ISRN Ecol.* **2011**, *1*–20 (2011). <https://doi.org/10.5402/2011/927647>
- Tchounweng, P.B.; Yedjou, C.G.; Patino, A.K.; Sutton, D.J.; Heavy metal toxicity and the environment. In: *Encyclopedia of Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, 3rd edn., pp. 133–164. Basel, Springer Basel (2012)
- Jiang, L. Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull.* **68**, 167–182 (2010). <https://doi.org/10.1093/bmb/68/3>
- Nagayama, P.C.; Lee, K.D.; Srekanth, T.V.M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ. Chem. Lett.* **8**, 199–216 (2010). <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
- Johri, N.; Jacquinet, G.; Urwin, R. Heavy metal poisoning: the effects of cadmium on the kidney. *Biometals* **23**, 783–792 (2010). <https://doi.org/10.1007/s12272-010-9238-y>
- Satarug, S.; Baker, J.R.; Urbenjat, S.; Haswell-Edkins, M.; Reilly, P.E.B.; Williams, D.J.; Moore, M.R. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in an increasingly exposed population. *Toxicol. Ind. Health* **17**, 65–83 (2001). [https://doi.org/10.1166/0378-4274\(2001\)017:065:1:1](https://doi.org/10.1166/0378-4274(2001)017:065:1:1)
- Fowler, B.A. Monitoring of human populations for early markers of cadmium toxicity: a review. *Environ. Health Perspect.* **28**, 294–300 (2009). <https://doi.org/10.1289/ehp.2009.117.294>
- Dong, J.; Mao, W.H.; Zhang, G.P.; Wu, F.B.; Cai, Y. Root-uptake and plant tolerance to cadmium toxicity—a review. *Plant Soil Environ.* **53**, 193–200 (2008). <https://doi.org/10.17221/2305/PSE>
- Bern, A.; Egeberg, N.O. Assessment of trace elements in canned tubes (mackerel, tuna, salmon, sardines and herrings) marketed in Georgia and Alabama (United States of America). *J. Food Compos. Anal.* **18**, 771–787 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.11.002>
- United States Environmental Protection Agency. National primary drinking water regulations. <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations> (2015). Accessed 21 May 2021
- World Health Organization. Cadmium in drinking water. pp. 1–21. [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/cadmium\\_drinking\\_water.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/cadmium_drinking_water.pdf) (2011). Accessed 21 May 2021
- World Health Organization. Europe. Drinking water parameter cooperation project. [https://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/pdf/WHO\\_parameter\\_report.pdf](https://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/pdf/WHO_parameter_report.pdf) (2017). Accessed 21 May 2021
- National Health and Medical Research Council. Australian drinking water guidelines. <https://www.nhmrc.gov.au/about-us/publications/australian-drinking-water-guidelines#book-view-block-the-attachment-content-block-1> (2018). Accessed 21 May 2021
- Sulko, R.; Turek, E.; Zavisla, B.; Madela, E.; Tlask, J.; Holman, J.; Gager, A.; Feist, B.; Wzrak, R. Adsorption of divalent metal ions from aqueous solutions using graphitic oxide. *Diaton. Trans.* **42**, 5682–5689 (2013). <https://doi.org/10.1039/c3dt33071a>
- Hwang, G.-H.; Han, W.-K.; Park, J.-S.; Kang, S.-G. An electrochemical sensor based on the reduction of screen-printed bis-muth oxide for the determination of trace lead and cadmium. *Sens. Actuators B* **135**, 309–316 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.08.039>
- Jalroni, E.Z.; Badari, A.; Assadi, Y.; Hosseini, M.R.M.; Jamal, M.R. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry: ultra trace determination of cadmium in water samples. *Anal. Chim. Acta* **585**, 305–311 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.01.007>
- García, M.L.; Muñoz-Guerra, R.; Cámara, C. Determination of cadmium in aqueous media by flow injection cold vapour atomic absorption spectrometry. Application to natural water samples. *J. Anal. Atom. Spectrom.* **13**, 295–300 (1998). <https://doi.org/10.1039/A807419K>

Springer **MDPI**

Springer **MDPI**

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

① 측방 유동 분석 장치의 제조 방법



특허출원서

【출원구분】 특허출원

【출원인】

【명칭】 성균관대학교 산학협력단

【특허고려번호】 2-2005-001360-4

【대리인】

【성명】 조영현

【대리인번호】 9-2004-000363-4

【포괄위임등록번호】 2009-039454-9

【발명의 국문명칭】 측방 유동 분석 장치의 제조 방법

【발명의 영문명칭】 METHOD FOR MANUFACTURING LATERAL FLOW ANALYSIS DEVICE

【발명자】

【성명의 국문표기】 문영광

【성명의 영문표기】 Moon YoungKwang

【주민등록번호】 950112-1-XXXXXXXXXX

【우편번호】 16419

【주소】 경기도 수원시 장안구 서부로 2066 성균관대학교  
자연과학캠퍼스 N센터 86616

【발명자】

【성명의 국문표기】 임호섭

【성명의 영문표기】 LIMHOSUB

【주민등록번호】 910618-1-XXXXXXXXXX

【우편번호】 16419

【주소】 경기도 수원시 장안구 서부로 2066 성균관대학교  
자연과학캠퍼스 N센터 86616

3-1



【발명자】

【성명의 국문표기】 이진기

【성명의 영문표기】 LEE JINKEE

【주민등록번호】 750129-1-XXXXXXXXXX

【우편번호】 16419

【주소】 경기도 수원시 장안구 서부로 2066 성균관대학교  
자연과학캠퍼스 제 1공학관 23332

【출원언어】 국어

【심사청구】 청구

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 118094-03

【과제번호】 118094-03

【부처명】 농림축산식품부

【과제관리(전문)기관명】 농림수산식품기술기획평가원

【연구사업명】 가축질병대응기술개발사업 2/3

【연구과제명】 [주관(1세부)-성대]구제역과 조류독감 바이러스 감염 진단 및 월형형 또는 아형을 구별하기 위한 중이 기반 검지 기기 개발

【기여율】 1/1

【과제수행기관명】 성균관대학교 산학협력단

【연구기간】 2019.08.15 ~ 2020.08.14

위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 조영현 (서명 또는 인)

【수수료】

【기본출원료】	0 면	46,000 원
【가산출원료】	18 면	0 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	7 항	451,000 원

3-2

② 상보적 염기서열을 갖는 절편을 도입한 핵산-탄소 나노 튜브 구조체, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 형광 기반 핵산 검출 센서



특허출원서

【합조번호】 R20200306KR1  
 【출원구분】 특허출원  
 【출원인】  
 【명칭】 성균관대학교산학협력단  
 【특허고격번호】 2-2005-001360-4  
 【지분】 85.00/100  
 【출원인】  
 【명칭】 숙명여자대학교산학협력단  
 【특허고격번호】 2-2005-009297-7  
 【지분】 15.00/100  
 【대리인】  
 【성명】 남건필  
 【대리인번호】 9-2007-000723-1  
 【포괄위임등록번호】 2012-035002-3  
 【대리인】  
 【성명】 차상운  
 【대리인번호】 9-2007-000724-8  
 【포괄위임등록번호】 2012-035003-1  
 【대리인】  
 【성명】 박종수  
 【대리인번호】 9-2009-001703-8  
 【포괄위임등록번호】 2011-048733-4  
 【발명의 국문명칭】 상보적 염기서열을 갖는 절편을 도입한 핵산-탄소 나노 튜브 구조체, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 핵광 기반

5-1



【성명의 영문표기】 CHANG, Jun Hyuck  
 【주민등록번호】 950729-1  
 【우편번호】 16869  
 【주소】 경기도 용인시 수지구 용구대로2753번길 27, 114동 901호(죽전동, 한솔 노블빌리지)  
 【발명자】  
 【성명의 국문표기】 김경일  
 【성명의 영문표기】 KIM, Kyung Il  
 【주민등록번호】 870208-1  
 【우편번호】 07791  
 【주소】 서울특별시 강서구 양천로 344, 에이-1205호(마곡동)  
 【발명자】  
 【성명의 국문표기】 김시현  
 【성명의 영문표기】 KIM, Si Hyun  
 【주민등록번호】 910114-1  
 【우편번호】 37837  
 【주소】 경상북도 포항시 남구 새천년대로 306, 105동 1002호(효자동, 포항호자웰빙타운에스케이뷰)  
 【출원언어】 국어  
 【심사청구】 청구  
 【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】  
 【과제고유번호】 1545020292  
 【과제번호】 118094-03  
 【부처명】 농림축산식품부  
 【과제관리(전문)기관명】 농림식품기술기획평가원  
 【연구사업명】 가축질병대응기술개발(R&D)  
 【연구과제명】 바이러스 추출 핵산과 결합할 수 있는 핵광 분자 표지 (fluorescence molecular beacon)의 개발 및 이를

5-3

핵산 검출 센서

【발명의 영문명칭】 Nucleic acid-carbon nanotube structure incorporating fragments with short complementary sequences, and a method for manufacturing the same, and a fluorescence-based nucleic acid detection sensor using the same

【발명자】  
 【성명의 국문표기】 이종현  
 【성명의 영문표기】 LEE, Jung Heon  
 【주민등록번호】 760210-1  
 【우편번호】 06690  
 【주소】 서울특별시 서초구 청두로4길 14-17, 401호(방배동)  
 【발명자】  
 【성명의 국문표기】 임광일  
 【성명의 영문표기】 LIM, Kwang Il  
 【주민등록번호】 700705-1  
 【우편번호】 13589  
 【주소】 경기도 성남시 분당구 중앙공원로 20, 425동 1303호(서현동, 시범단지현대아파트)  
 【발명자】  
 【성명의 국문표기】 이진기  
 【성명의 영문표기】 LEE, Jin Kee  
 【주민등록번호】 750129-1  
 【우편번호】 16420  
 【주소】 경기도 수원시 장안구 화산로 85, 103동 2504호(원천동, 원천 푸르지오)  
 【발명자】  
 【성명의 국문표기】 장준혁

5-2



기반으로 한 바이러스 검지 기술 개발  
 【기여율】 35/100  
 【과제수행기관명】 성균관대학교 산학협력단  
 【연구기간】 2019.08.15 - 2020.08.14  
 【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】  
 【과제고유번호】 1545020305  
 【과제번호】 118094-03  
 【부처명】 농림축산식품부  
 【과제관리(전문)기관명】 농림식품기술기획평가원  
 【연구사업명】 가축질병대응기술개발(R&D)  
 【연구과제명】 바이러스 다중 검출용 분자 탐침 설계 및 성능평가를 위한 바이러스 제작  
 【기여율】 15/100  
 【과제수행기관명】 숙명여자대학교 산학협력단  
 【연구기간】 2019.08.15 - 2020.08.14  
 【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】  
 【과제고유번호】 1345315536  
 【과제번호】 2019R1A6A1A03033215  
 【부처명】 교육부  
 【과제관리(전문)기관명】 한국연구재단  
 【연구사업명】 대학중점연구소  
 【연구과제명】 첨단소재기술연구소  
 【기여율】 50/100  
 【과제수행기관명】 성균관대학교 산학협력단  
 【연구기간】 2020.03.01 - 2021.02.28  
 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.  
 대리인 남건필 (서명 또는 인)  
 대리인 차상운 (서명 또는 인)

5-4

### ③ 나노입자가 탑재된 하이드로겔 마이크로비드 및 이의 제조 방법



**특허출원서**

【발조번호】 DP20200359  
 【출원구분】 특허출원  
 【출원인】  
 【명칭】 성공관대학교산학협력단  
 【특허고려번호】 2-2005-001380-4  
 【과리인】  
 【성명】 한성희  
 【대리인번호】 9-2010-000491-9  
 【도출위실등록번호】 2016-123894-3  
 【발명의 국문명칭】 나노입자가 탑재된 하이드로겔 마이크로비드 및 이의 제조 방법  
 【발명의 영문명칭】 NANOPARTICLES-LOADED HYDROGEL MICROBEAD AND PREPARING METHOD OF THE SAME  
 【발명자】  
 【성명의 국문표기】 이장현  
 【성명의 영문표기】 LEE, JUNG HEON  
 【주민등록번호】 760210-1  
 【우편번호】 06690  
 【주소】 서울시 서초구 청두로4길 14-17, 401호  
 【발명자】  
 【성명의 국문표기】 김시현  
 【성명의 영문표기】 Kim, Si Hyun  
 【주민등록번호】 910114-1  
 【우편번호】 37836

4-1



【주소】 경상북도 포항시 남구 호성로63번길 17(호자동, 효자동방탄은 에스케이뷰 2차아파트) 105동 1002호

【발명자】  
 【성명의 국문표기】 허준혁  
 【성명의 영문표기】 Heo, Jun Hyuk  
 【주민등록번호】 870917-1  
 【우편번호】 16490  
 【주소】 경기도 수원시 팔달구 효원로235번길 46-16 402호 (인계동)  
 【발명자】  
 【성명의 국문표기】 윤석영  
 【성명의 영문표기】 Yoon, Seokyoung  
 【주민등록번호】 900217-1  
 【우편번호】 46242  
 【주소】 부산광역시 금정구 수월로 72번길 160 8동 1003호 (구서동, 대포드빌저)  
 【발명자】  
 【성명의 국문표기】 이병산  
 【성명의 영문표기】 Byoungsang Lee  
 【주민등록번호】 850603-1  
 【우편번호】 16362  
 【주소】 경기도 수원시 장안구 읍전로 64번길 41-3 금강빌라 8 202 호  
 【출원언어】 국어  
 【실사청구】 청구  
 【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】  
 【과제고유번호】 1345315536  
 【과제번호】 2019R1A6A1A03033215  
 【부처명】 교육부  
 【과제관리(장문)기관명】 한국연구재단

4-2



【연구사업명】 이공혁신기술연구기반구축(R&D)  
 【연구과제명】 첨단소재기술연구소  
 【기여율】 34/100  
 【과제수행기관명】 성공관대학교  
 【연구기간】 2020.03.01 - 2021.02.28  
 【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】  
 【과제고유번호】 1711105883  
 【과제번호】 2018M3C1B7021997  
 【부처명】 과학기술정보통신부  
 【과제관리(장문)기관명】 한국연구재단  
 【연구사업명】 STEAM연구(RGD)  
 【연구과제명】 생물학적 활성과 계층적 구조를 지닌 자연모사 인공 골 조직 공장 기술 개발  
 【기여율】 33/100  
 【과제수행기관명】 성공관대학교  
 【연구기간】 2020.01.01 - 2020.12.31  
 【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】  
 【과제고유번호】 1545022441  
 【과제번호】 1180940338B020  
 【부처명】 농림축산식품부  
 【과제관리(장문)기관명】 농림축산식품기술훈영가련  
 【연구사업명】 가축질병 대응기술개발(RGD)  
 【연구과제명】 바이러스 추출 핵산과 결합할 수 있는 형광 분자 표지 (fluorescence molecular beacon)의 개발 및 이를 기반으로 한 바이러스 검지 기술 개발  
 【기여율】 33/100  
 【과제수행기관명】 성공관대학교 산학협력단  
 【연구기간】 2020.08.15 - 2021.08.14

4-3

### ④ 핵산 검출 키트 및 이의 제조 방법

【서지사항】	
【서류명】	특허출원서
【참조번호】	21384
【출원구분】	특허출원
【출원인】	
【명칭】	성균관대학교산학협력단
【특허고객번호】	2-2005-001360-4
【대리인】	
【명칭】	특허법인 아주
【대리인번호】	9-2001-100005-9
【지정원변리사】	장은섭, 이윤우, 이혜진
【포괄위임등록번호】	2018-123753-1
【발명의 국문명칭】	핵산 검출 키트 및 이의 제조 방법
【발명의 영문명칭】	KIT FOR DETECTING NUCLEIC ACID AND METHOD FOR PREPARING THE SAME
【발명자】	
【성명】	이진기
【성명의 영문표기】	LEE JINKEE
【주민등록번호】	750129-1XXXXXX
【우편번호】	16419
【주소】	경기도 수원시 장안구 서부로 2066 성균관대학교 자연과학 캠퍼스 제1공학관 23332
【발명자】	

【성명】	문영광
【성명의 영문표기】	Moon Youngkwang
【주민등록번호】	950112-1XXXXXX
【우편번호】	16419
【주소】	경기도 수원시 장안구 서부로 2066 성균관대학교 자연과학 캠퍼스 N센터 86616
【발명자】	
【성명】	문혁균
【성명의 영문표기】	Moon Hyeokgyun
【주민등록번호】	960401-1XXXXXX
【우편번호】	16419
【주소】	경기도 수원시 장안구 서부로 2066 성균관대학교 자연과학 캠퍼스 제1공학관 22103
【발명자】	
【성명】	이정현
【성명의 영문표기】	LEE, JUNG HEON
【주민등록번호】	760210-1XXXXXX
【우편번호】	16419
【주소】	경기도 수원시 장안구 서부로 2066 성균관대학교 자연과학 캠퍼스 제2공학관 25111
【발명자】	
【성명】	장준혁

34-1

34-2

【성명의 영문표기】	Chang, Junhyuck
【주민등록번호】	950729-1XXXXXX
【우편번호】	16419
【주소】	경기도 수원시 장안구 서부로 2066 성균관대학교 자연과학 캠퍼스 제2공학관 26203
【출원언어】	국어
【실사청구】	청구
【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】	
【과제고유번호】	1545022424
【과제번호】	1180940338B010
【부처명】	농림축산식품부
【과제관리(전문)기관명】	농림식품기술기획평가원
【연구사업명】	가축질병대응기술개발(R&D)
【연구과제명】	구제역과 조류독감 바이러스 감염 진단 및 유행형 또는 아형을 구별하기 위한 종이 기반 검지 기기 개발
【기여율】	1/2
【과제수행기관명】	성균관대학교 산학협력단
【연구기간】	2020.08.15 ~ 2021.08.14
【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】	
【과제고유번호】	1545022441
【과제번호】	1180940338B020
【부처명】	농림축산식품부

【과제관리(전문)기관명】	농림식품기술기획평가원
【연구사업명】	가축질병대응기술개발(R&D)
【연구과제명】	바이러스 추출 핵산과 결합할 수 있는 형광 분자 표지 (fluorescence molecular beacon)의 개발 및 이를 기반으로 한 바이러스 검지 기술 개발
【기여율】	1/2
【과제수행기관명】	성균관대학교 산학협력단
【연구기간】	2020.08.15 ~ 2021.08.14
【취지】	위와 같이 특허청장에게 제출합니다.  대리인 특허법인 아주 (서명 또는 인)
【수수료】	
【출원료】	0 면 46,000 원
【가산출원료】	29 면 0 원
【우선권주장료】	0 건 0 원
【실사청구료】	7 항 451,000 원
【합계】	497,000 원
【감면사유】	전담조직(50%감면)[1]
【감면후 수수료】	248,500 원

34-4

□ 시제품 제작

① FLPS-1000 형광 검출기

<첨부3>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과제명	구제역 바이러스 및 조류 인플루엔자 바이러스 동시 검출을 위한 신속 진단 키트 개발			
주관연구기관	성균관대학교 신학협력단	참여기관	(주)팜스웰메디컬	
연구책임자	이진기	연구기간	2018년 11월 ~ 2021년 08월(총 2년 9개월)	
총 정부출연금	702,000,000 원			
해당 기술의 제품출시 유형				
시제품(제품출시 예정)	( ○ )	기존 제품 공정개선	(   )	
신제품(제품출시 완료)	(   )	기 타	(   )	
제품 출시 실적				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
FLPS-1000		구제역 및 조류 독감 바이러스 현장 진단용 검출기	2024년	100%
<p>* 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등)          **식품R&amp;D는 품목제조보고서 제출 필수</p> <p style="text-align: center;"><b>상기와 같이 R&amp;D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.</b></p>				

2021년 06월 28일

연구책임자 : 이진기 (서명 또는 인)

## □ 기술 실시(이전)

### ① 핵산 검출 키트 및 이의 제조 방법

#### 기술이전 계약서

□ 계약기술명: 핵산 검출 키트 및 이의 제조 방법  
 □ 계약기관: 성균관대학교산학협력단 - 팜스텔메디컬

2021년 08월 12일

\*성균관대\*  
 경기도 수원시 장안구 서부로 2066  
 성균관대학교 산학협력단  
 (사업자등록번호 101-87-1100000)  
 단장 박진규

\*실시자\*  
 경기도 용인시 기흥구 흥덕 중영로 120 유티워  
 1609호  
 팜스텔메디컬  
 207-88-01215  
 대표이사 정원기

"성균관대" 기술이전 책임자  
 성균관대학교 공보대학  
 교수 이진기

"성균관대" 기술이전 계약담당자  
 성균관대학교 산학사업팀 한진미

성균관대학교산학협력단(이하 "성균관대")과 팜스텔메디컬(이하 "실시자"라 한다)는 "성균관대"가 보유한 특허를 "실시자"에 실시허락하고자 다음과 같이 합의하고 계약을 체결한다.

#### 제1조 (용어의 정의)

본 계약의 적용을 위한 용어는 다른 특별한 언급이 없는 한 다음 각 호의 의미로 사용된다.  
 1. 본 계약에서 "계약기술"이라 함은 "성균관대"가 보유하고 있는 아래의 산업재산권을 말하며, 본 계약 기술 이외의 파생기술이나 개발기술은 포함되지 아니한다.  
 ■ 발명의 명칭: 핵산 검출 키트 및 이의 제조 방법

대한민국 특허 출원(또는 등록)번호 제10-2021-0088552호

2. 본 계약에서 "실시"라 함은 대한민국 특허법 제2조 제3호 각목의 1에 해당하는 것을 말한다.  
 3. 본 계약에서 "계약기술"이라 함은 계약기술을 개발, 대체, 확장 또는 추가한 기술을 의미 한다.

#### 제2조 (실시권 유형)

"성균관대"는 "실시자"에게 본 계약기술을 국내에서 실시할 수 있는 독점실시권을 부여한다.

#### 제3조 (실시기간)

본 계약에 따른 실시기간은 2021년 8월12일부터 2027년 8월 11일(만 72개월)까지로 한다.

#### 제4조 (기술료)

"실시자"는 본 계약기술 양도 대가로 정액기술료인 금 1,000,000,000원(₩1,000,000,000, 부가세 별도)을 계약 체결일 6개월 이내에 "성균관대"가 지정한 계좌로 지급한다.

회차	납부기한	납부금액	은행/계좌	예금주
1	2021년 08월 31일	총 기술료의 50% 5,000,000 (50%)	우리은행 1005-001-161242	성균관대학교 산학협력단
2	2022년 02월 31일	총 기술료의 50% 5,000,000 (50%)		

#### 제5조 (신의성실)

① "성균관대"와 "실시자"는 신의준거와 각 조항을 성실히 이행하여야 한다.  
 ② "성균관대"는 "실시자"가 요청하는 기술정보 제공에 협조하여야 하며, "실시자" 또한 "성균관대"가 계약이행을 위해 요청하는 사항에 적극 협조하여야 한다.

#### 제6조 (기술의 개발 등)

① "실시자"가 "계약기술"의 "계약기술"을 개발하여 이윤 근거로 새로운 산업재산권을 취득하는 경우 "실시자"는 "성균관대"에게 통보하여 상호 협의하여 추진하여야 하며, 취득된 산업재산권은 양말의 공동소유로 하며, 이에 대한 일체의 비용은 "실시자"가 부담한다. 특약이 없는 한 "계약기술"에 대한 실시는 역시 본 계약에 의하여 실시되는 것으로 보고 본 계약기술과 동일한 조건으로 실시권을 갖는다.

## 2) 목표 달성 수준

### (1) 1차년도 연구개발 목표 달성 수준

연 도	세부과제명	추진 목표	달성 내용	달성도 (%)
1차년도 (2018.11 ~ 2019.08)	제 1 세부 구제역과 조류 독감 바이러스 감염 진단 및 혈청형 또는 아형을 구별하 기 위한 종이 기반 검지 기 기 개발	○ 종이 기반 미세유체 소자의 설 계 및 이차원 lateral flow sheet의 유동 조건 분석	○ 종이 기반 미세유체 소자 구성 및 설계를 위한 최적의 재료 선정 ○ 이차원 lateral flow sheet의 유 동 조건 및 재료별 형광 특성 분석	100
		○ 형광 나노재료 및 핵산 용액의 물성 파악 연구 및 종이 기반 기기와 시료간의 상호작용 연 구	○ 종이 기반 기기에서의 핵산 용 액과 핵산의 거동 관측 ○ 형광 나노재료의 기능화에 따른 test membrane 선정	100
		○ 상용 전처리 추출기술을 활용 한 물리적 전처리 방법 연구	○ 상용화 전처리 제품 조사 그리 고 전처리 기기 및 시료 선정 ○ 선정된 전처리 기기와 시료를 이용한 물리적 전처리	100
	제 2 세부 바이러스 추출 핵산과 결합할 수 있는 형광 분자 표지 (fluorescence molecular beacon)의 개 발 및 이를 기 반으로 한 바 이러스 검지 기술 개발	○ 형광 나노재료 및 소광재료 설 계 및 합성	○ 형광 재료 및 소광재료의 선정 및 광학특성 평가 ○ 모델 형광분자표지 디자인 및 이를 위한 반응 조건 확인	100
		○ 핵산 서열의 종이에의 기능화 연구	○ 셀룰로오즈 표면의 작용기 치환 및 확인 ○ 치환된 작용기에의 고분자 기능 화 연구	100
	제 1 협동 바이러스 다중 검출용 분자 탐침 설계 및 성능평가를 위 한 바이러스 제작	○ 구제역바이러스와 조류 인플루 엔자 바이러스의 염기서열 분 석 및 이를 바탕으로 한 바이 러스 검출용 핵산 탐침 (Probe) 서열 설계	○ 바이러스의 상용화 전처리 키트 를 활용하여 RNA를 추출하는 연구 수행	100
		○ 구제역 바이러스 및 조류 인플 루엔자 바이러스 각각의 혈청 형과 아형을 구분할 수 있는 핵산 탐침 염기서열 설계	○ 한국에 미치는 영향이 크거나 향후 감염을 유발할 가능성이 높은 혈청형 및 아형 선정 ○ 모든 구제역 바이러스 혈청형 유전체의 공통 부분 분석 ○ 모든 조류 인플루엔자 바이러스 아형 유전체의 공통 부분 분석	100
		○ 구제역 바이러스 및 조류 인플 루엔자 바이러스 각각의 혈청 형과 아형을 구분할 수 있는 핵산 탐침 염기서열 설계	○ 구제역 바이러스 혈청형을 구분 할 수 있는 유전체 부분 분석 및 탐침 분자 설계 ○ 조류 인플루엔자 바이러스 아형 을 구분할 수 있는 유전체 부 분 분석 및 탐침 설계	100
	제 2 협동 통신/GPS 모 듈이 추가된	○ 종이기반 lateral flow kit에의 검지기기 형광 검출 알고리즘 설계	○ 협동기관에서 1차 지정한 파장 대를 기준으로 내부 광학 검출 알고리즘을 구축	100

바이러스 검지용 소형 형광 검출 장비 개발	○ 설계단계 초기부터 의료기기 등록을 위한 절차 관련 사항을 적용한 체계도 작성 및 설계	○ 현행 동물용의료기기 및 동물용 체외진단시약의 인허가를 위한 기술문서 및 심사자료의 기준들을 검토 및 단계별 실행계획 수립	100
	○ 소형 형광 검지기기 설계를 위한 소자 선정 및 검출 모듈 성능 테스트	○ 1차 설계된 optic 디자인을 table에 장착하여 부품별 성능 및 기초 데이터를 수집	100

(2) 2차년도 연구개발 목표 달성 수준

연 도	세부과제명	추진 목표	달성 내용	달성도 (%)
2차년도 (2019.08 ~ 2020.08)	제 1 세부 구제역과 조류독감 바이러스 감염 진단 및 혈청형 또는 아형을 구별하기 위한 종이 기반 검지 기기 개발	○ 실험실에서 종이기반 기기를 평가할 수 있는 실시간 모니터링 시스템 개발	○ 형광 분자 표지(fluorescence molecular beacon)의 형광 발현 분포에 따른 test membrane 선정 ○ 종이 기반 미세유체 소자에서 capture/control region의 제작을 위한 시스템 구축 ○ 제작한 형광 분자 표지의 모니터링을 위한 형광 관찰용 현미경 조건 설정 ○ CNT@DNA의 형광 발현 모니터링을 위한 형광 관찰용 현미경 조건 설정 ○ 종이 상에서의 CNT@DNA의 형광 발현 거동 및 메커니즘 확인 ○ CNT@DNA를 종이에 고정화하는 방법 고안	100
		○ 구제역과 조류독감 바이러스 검지 lateral flow sheet의 원천 기술 확보 및 발광에 따른 검지 메커니즘 연구	○ 형광 분자 표지의 발광 메커니즘 및 검지 한계 확인 ○ 검지 한계를 향상시키기 위한 test membrane 디자인 및 검지 한계 확인	100
	제 2 세부 바이러스 추출 핵산과 결합할 수 있는 형광 분자 표지 (fluorescence molecular beacon)의 개발 및 이를 기반으로 한 바이러스 검지 기술 개발	○ 바이러스 추출 핵산의 특정 염기서열과 결합할 수 있는 핵산을 이용한 형광 분자 표지 (fluorescence molecular beacon) 개발	○ 모델 바이러스 핵산 염기 서열과 특이적으로 결합할 수 있는 형광 분자 표지 설계 및 제작 ○ 형광 분자 표지와 같이 target DNA를 형광 기반으로 검지 가능한 CNT@DNA 복합체 제작 ○ 제작한 CNT@DNA 복합체의 target DNA에 대한 특이성 및 발광 거동 확인	100
		○ 구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스 혈청형 또는 아형 구별을 위한 형광 기반	○ 각기 다른 바이러스의 혈청형에 반응하는 형광 분자 표지를 서로간의 간섭이 없도록 설계 및	100

		의 다중 검지 시스템 개발	개발	
제 1 협동 바이러스 다중 검출용 분자 탐침 설계 및 성능평가를 위 한 바이러스 제작		○ 역유전학 기법으로 복제 능력 이 제거된 모델 바이러스 생 산	○ 타바이러스인 HIV-1 유전체 일 부에 구제역 바이러스 유전자 를 도입하여 모델바이러스 생 산 ○ HIV-1 유전체 일부에 조류 인플 루엔자 바이러스 유전자를 도 입하여 모델바이러스 생산	100
		○ 모델 바이러스 RNA 유전체 추 출 및 검체 안정성 극대화 연 구	○ 몇가지 상용 키트를 사용하여 모델 바이러스 유전체 RNA를 추출 ○ 고온 처리, 화학 처리 및 제한 효소 반응을 통한 유전체 RNA 단편화 ○ Bioanalyzer를 이용, RNA 단편 크기 분포 분석	100
제 2 협동 통신/GPS 모 듈이 추가된 바이러스 검지 용 소형 형광 검출 장비 개 발		○ 소형 형광 검출 모듈 설계 및 제작	○ 소형 형광 검출기 장비개발 위 하여 소형 형광 광학기술인 광 파이버 기술 적용 및 고출력 발광 다이오드를 특징으로 한 반사형 방식 채택한 검출기 개 발	100
		○ 종이 기반 키트 적용한 연동 테스트 및 성능 평가	○ 종이 기반 키트를 테스트를 하 기 위하여 발광 다이오드와 광 다이오드 어레이 방식의 단색 화 장치를 사용하여 측정	100

### (3) 3차년도 연구개발 목표 달성 수준

연 도	세부과제명	추진목표	달성내용	달성도 (%)
3차년도 (2020.08 ~ 2021.08)	제 1 세부 구제역과 조류 독감 바이러스 감염 진단 및 혈청형 또는 아형을 구별하 기 위한 종이 기반 검지 기 기 개발	○ 구제역과 조류독감 바이러스 감염 여부 및 아종 바이러스 구별을 위한 lateral flow sheet 검출기기 개발	○ 형광 분자 표지의 기능화 방법 개선 ○ Avidin을 이용한 형광 분자 표 지 기능화 ○ 형광 관찰 현미경을 이용한 lateral flow sheet에서의 적정 형광 분자 표지 농도 및 검지 한계 확인 ○ MPPC를 이용한 lateral flow sheet에서의 형광 발현 측정 ○ 높은 민감도를 갖는 종이칩 설 계 및 제작 ○ 제작한 형광 분자 농축 종이칩 의 검지 한계 확인 ○ 형광 분자 표지 농축 종이칩에 서의 구제역과 조류 인플루엔 자 바이러스 핵산에 대한 검지	100

		한계 확인	
	○ 시작품 제작을 위한 위탁연구 기관과의 상호 협력 및 최적화	○ 형광 분자 표지 농축 종이칩을 활용한 팜스웰메디컬 장비의 민감도 확인	100
제 2 세부 바이러스 추출 핵산과 결합할 수 있는 형광 분자 표지 (fluorescence molecular beacon)의 개 발 및 이를 기 반으로 한 바 이러스 검지 기술 개발	○ 바이러스 검출기기의 형광 신호 최적화 및 형광 신호와 바이러스 감염 여부간의 상호관계 해석	○ 용액 상에서의 형광 신호와 바이러스 농도의 관계 분석 및 정량화 ○ 검출기기상에서의 형광 신호 최적화를 위한 기판 기능화 과정 및 반응 조건의 최적화	100
	○ 바이러스 검출 성능 개선 연구 및 센서 안정도와 신뢰성 개선 연구	○ 여러 region의 HIV 형광 분자 표지를 동시에 사용하여 성능 개선 ○ 실제 바이러스에 대응되는 조류 인플루엔자 및 구제역 바이러스 형광 분자 표지의 제작 및 평가 ○ 종이 칩의 작동 방식 및 검출기기의 변경을 통한 성능 개선 원리 분석과 이에 따른 표면 기능화의 영향 재평가	100
제 1 협동 바이러스 다중 검출용 분자 탐침 설계 및 성능평가를 위 한 바이러스 제작	○ 실제 검지 상황을 모사한 야생 바이러스 생산	○ 역유전학 기법을 이용한 야생 바이러스 생산 방법 구축 ○ 야생 바이러스 생산 시도 및 생산 결과 확인	100
	○ 전처리 기술을 바탕으로 한 야생 바이러스 RNA 추출 기술 개발	○ 역전사유전학 기법을 적용하여 인간 인플루엔자 바이러스(HIV)에서 RNA 유전체 추출 및 확인 ○ 모델 조류 인플루엔자 바이러스 및 구제역 바이러스의 RNA 유전체 추출 및 확인	100
제 2 협동 통신/GPS 모 듈이 추가된 바이러스 검지 용 소형 형광 검출 장비 개 발	○ Lateral flow sheet kit를 적용하여 검출 성능 확인	○ Lateral flow sheet 홀더 제작 ○ MPPC 검출 모듈의 성능 평가 ○ MPPC 검출 모듈을 활용한 형광 검출 테스트	100
	○ 통신/GPS 모듈이 추가된 바이러스 검지용 소형 형광 검출 장비 개발	○ 소형 형광 검출 장비 제작을 위한 디자인 ○ 형광 검출 기기의 소자 선정 ○ 형광 검출 기기의 광학 구조 설계 ○ 소형 형광 검출 기기의 모듈 구조 설계 및 제작 ○ 소형 형광 검출 기기의 통신/GPS 모듈을 추가한 모니터링 소프트웨어 디자인	100

#### 4. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

##### ① 형광 분자 농축 종이칩 개발의 관련 분야 기여도

(가) 바이러스 진단의 기존 상용화 기술과의 비교 및 본 기술의 우월성 및 차별성

(1) 기존의 바이러스 진단 기술의 종류 및 장·단점

- 기존의 바이러스 진단 기술은 크게 면역크로마토그래피(신속 항원 진단법), 효소결합면역흡착검사(ELISA) 그리고 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)이 있으며 해당 진단 기술들의 특징은 표 25와 같음.

표 25. 기존 바이러스 진단 기술의 장·단점 및 검출 한계

	면역크로마토그래피 (신속 항원 진단법)	효소결합 면역 침강 분석법 (ELISA)	실시간 역전사 중합효소 연쇄반응 (qRT-PCR)
장점	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 짧은 시간에 바이러스 감염 여부를 확인할 수 있음.</li> <li>• 타 기술에 비해 비교적 가격이 저렴해 실제 임상에서 유용한 경우가 많음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 특정한 항체만 고정시키면 결과의 민감도가 증가하기 때문에 제어가 쉬움.</li> <li>• 높은 감도와 정확성을 가짐.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 특이적이고 다량의 검체에 있어서 정확히 진단할 수 있음.</li> </ul>
단점	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 타 기술에 비해 정확도나 민감도가 떨어지며, 아형이나 혈청형 구분에 있어서 제한적임.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 항원의 농도가 낮은 경우에는 기저값과 비교하여 형광세기의 변화를 측정하기가 어려움.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 검사과정이 복잡하고 검사 소요시간이 길어 진단이 늦어지는 단점이 있음.</li> </ul>
검사시간	15~20 분	2~3 시간	6 시간 이상
검출 한계	약 $1.2 \times 10^7$ copies/ $\mu$ L (검출한계 농도: 약 2 pM) (시료 양: 약 200 $\mu$ L)	약 $2.3 \times 10^4$ copies/ $\mu$ L (검출한계 농도: 약 38 fM) (시료 양: 약 100 $\mu$ L)	약 5 copies/ $\mu$ L (시료 양: 약 25 $\mu$ L)
	약 $2.4 \times 10^9$ copies/회	약 $2.3 \times 10^6$ copies/회	약 125 copies/회

(2) 형광 분자 농축 종이칩의 우월성 및 차별성

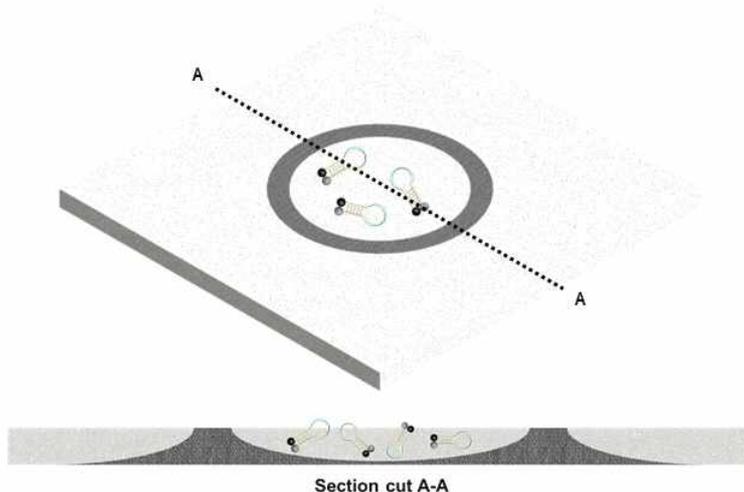


그림 358. PDMS를 이용하여 제작한 형광 분자 표지 농축 종이칩 모식도

- 검사시간은 약 10~15 분 정도로 매우 짧은 시간에 바이러스 감염 여부를 확인할 수 있음.
- 생체적합한 소수성 폴리머와 glass fiber로 구성된 종이를 사용하여 제작한 진단기기로 제조단가가 저렴함.
- 검사 시 필요한 시료의 양은 5  $\mu$ L로 기존의 기술에 비해 매우 적은 양의 시료가 있어도

진단이 가능함.

- 개발한 형광 분자 농축 종이칩의 검출 한계는 약  $1.15 \times 10^6$  copies/회(검출한계 농도: 250 fM, 시료 양: 약 5  $\mu$ L;  $2.3 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L)으로 같은 종이 기반 검출 기기인 면역크로마토그래피의 검출 한계를 약 2100 배 정도 개선하였고 ELISA와 유사한 정도의 검출한계를 보임.
- 매우 적은 핵산을 검출할 수 있는 진단기기로 현장에서 신속진단할 수 있는 종이 기반 진단 기기임.
- HIV를 검지할 수 있는 형광 분자 표지를 사용하여 모델 바이러스 DNA를 검지했을 때에 검출 한계는 약  $1.15 \times 10^3$  copies/회(검출한계 농도: 250 aM, 시료 양: 약 5  $\mu$ L;  $2.3 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L)로 형광 분자 표지를 추가적으로 개선함으로써 더 낮은 검출 한계를 갖는 종이 칩을 제작할 수 있음.
- 해당 기술은 ‘핵산 검출 키트 및 이의 제조 방법’(출원 번호: 10-2021-0088552)로 출원된 특허이며 또한 제 2 협동기관인 팜스웰메디컬로의 기술 이전을 진행한 상태로 향후 5년 이내에 제품화가 완료될 예정에 있음.
- 제품화를 진행하는 과정에서 다양한 조건에서의 추가적인 종이 칩 평가를 진행하여 최적화를 진행할 예정임.
- 또한, 최적화를 진행하는 과정에서 필요하다면 농림축산검역본부 또는 수의학과와의 협력을 진행하려 함.

## ② 소형 형광 검출 장비 개발의 관련 분야 기여도

### (1) 상용화 형광 검출 장비 현황

- 대다수의 상용 형광 검출 장비는 매우 정밀하게 형광을 검출할 수 있으나 장비의 크기가 매우 커서 휴대성이 떨어짐.
- 또한, 검출 장비를 사용하는데 있어 컴퓨터와의 연결은 필수적인 요소임.
- 형광 검출 장비의 가격은 수 천만원대의 매우 높은 가격대를 형성하고 있어 일반 사람들이 사용하는데에 적합하지 않음.

### (2) 소형 형광 검출 장비의 우월성

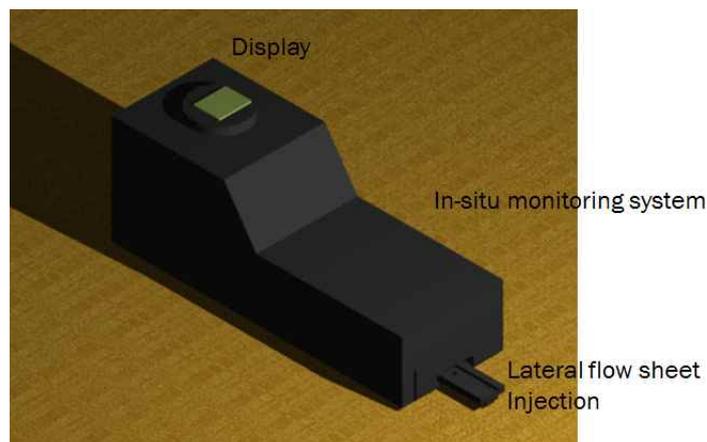


그림 359. 소형 형광 검출 장비 디자인

- 미광의 형광을 감지할 수 있는 장비로 한 손에 휴대할 수 있는 크기로 제작됨.
- 최대 세 가지 샘플을 측정할 수 있는 장비로 휴대 검출 장비 최초로 여러 샘플을 한 번에 측정하게 해주는 장비임.
- 휴대 장비의 안전성을 높여주기 위해 하단에는 주로 알루미늄 등 메탈 재질과 이를 기반하여 PCB 제어 보드 등을 하판에서 지지함으로써 측정의 무게 중심을 하단에 두어 측정 및 이송 장치에 흔들림 등이 없도록 구성함.

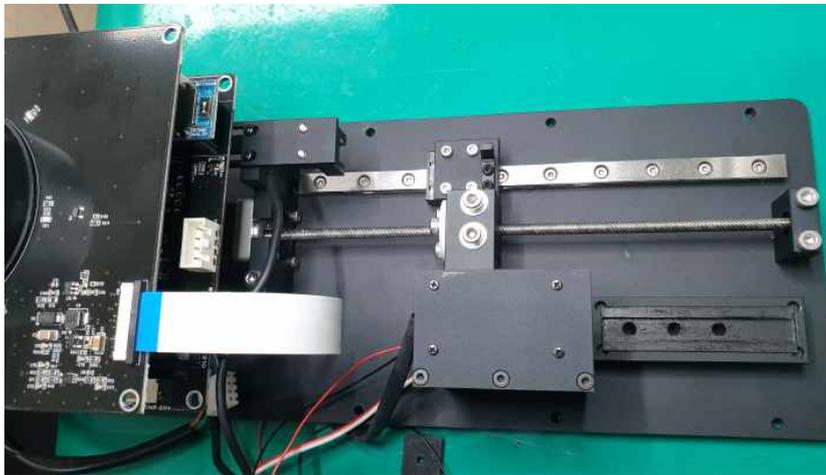


그림 360. 소형 형광 검출기 내부

- 형광 기반의 바이러스 진단 기기로 바이러스 감염 여부를 진단할 때 기존 장비의 크기가 크고 비싸다는 점 때문에 현장 진단이 불가능했지만 개발된 소형 형광 검출 장비는 높은 휴대성을 갖는 제품으로 바이러스 진단 분야에 있어서 현장에서 신속하게 진단하는 것을 가능하게 할 수 있음.

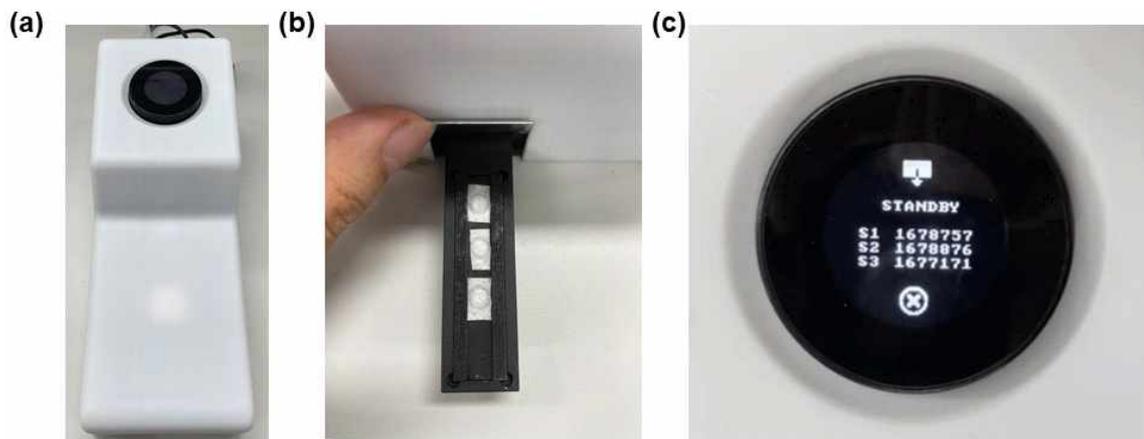


그림 361. (a) 팜스웰메디컬에서 제작한 형광 검지 기기,  
(b) 검지를 위해 형광 분자 표지 농축 종이칩을 넣은 사진 그리고  
(c) 형광 검지 기기에서 관측된 형광 데이터

- ③ 통신/GPS 모듈을 이용한 바이러스의 실시간 모니터링 시스템의 관련 분야 기여도
- (3) 바이러스의 실시간 모니터링 시스템의 우월성
- 통신/GPS 모듈을 이용한 실시간 모니터링 시스템은 국내에서 최초로 개발된 시스템임.
  - 현재 바이러스를 진단하는 데에 시간이 소요되기 때문에 실시간으로 모니터링하는 데에 어려움이 존재했음.

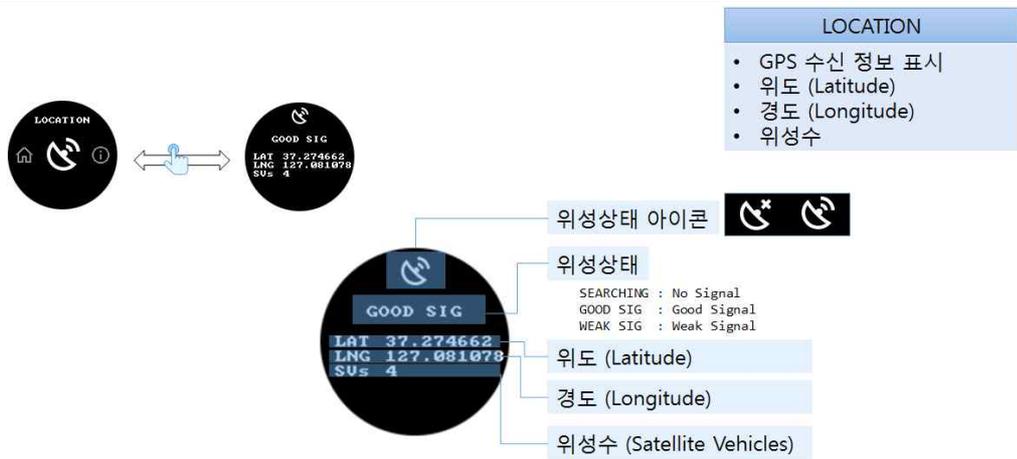


그림 362. 소형 형광 검출 장비의 통신/GPS 모듈 디스플레이

- 하지만, 해당 장비를 이용하여 바이러스가 검출될 시, GPS 모듈을 통해 바이러스 감염 여부 보고됨에 따라 바이러스의 실시간 모니터링하는 것을 가능하게 함.

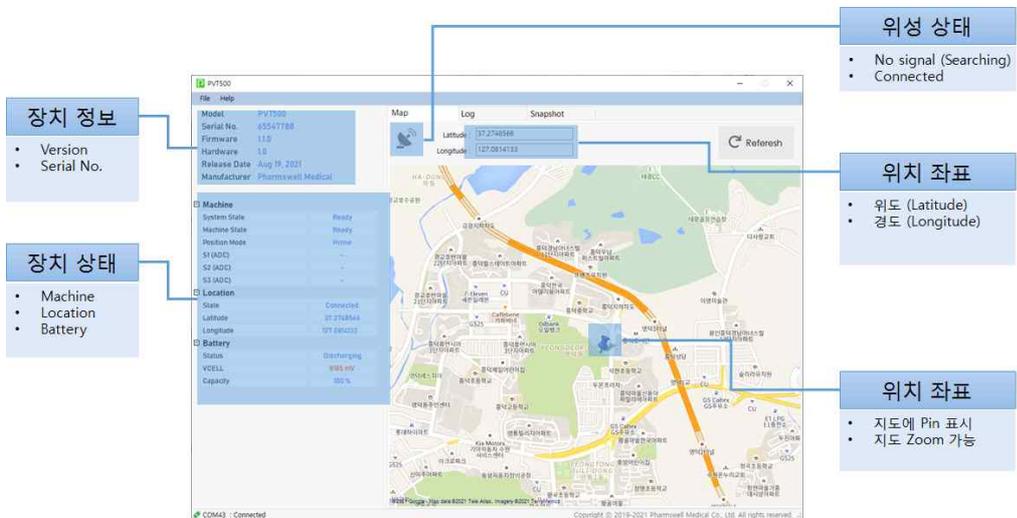


그림 363. 소형 형광 검출 장비의 상태 및 위치 정보가 포함된 실시간 모니터링 프로그램 창

- 따라서, 해당 모듈을 이용할 시 바이러스의 감염 여부를 파악함에 따라 보다 신속하게 바이러스에 대처할 수 있으며 이를 통해 보다 쉽게 바이러스의 전파 경로를 파악하고 통제할 수 있음.

### 5. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전 시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	25			35		10							10	10		5	2	3	
최종목표 (종료후)		4				1	830		5		1	3			2	1	3		2
종료 1차년도		1					30					3			1	1	2		1
종료 2차년도		1				1	100				1				1		1		1
종료 3차년도		2					150		1										
종료 4차년도							250		2										
종료 5차년도							300		2										
소계 (%)		4				1	830		5		1	3			2	1	3		2

#### < 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서 2) 연구성과 활용계획서
2.	1) 2)

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호	118094-03		
사업구분	가축질병대응기술개발사업				
연구분야	검역방역기술		과제구분	단위	
사업명	가축질병대응기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	구제역 바이러스 및 조류 인플루엔자 바이러스 동시 검출을 위한 신속 진단 키트 개발		과제유형	개발	
연구개발기관	성균관대학교 산학협력단		연구책임자	이진기	
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2018.11.15.~ 2019.08.14.	192,000	64,000	256,000
	2차년도	2019.08.15.~ 2020.08.14	255,000	85,000	340,000
	3차년도	2020.08.15.~ 2021.08.14	255,000	85,000	340,000
	계	2018.11.15.~ 2021.08.14	702,000	234,000	936,000
참여기업	팜스웰에디션				
상대국			상대국연구개발기관		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

### 2. 평가일 :

### 3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
성균관대학교	부교수	이진기

### 4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

학 약	
-----	---

## I. 연구개발실적

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

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

본 연구개발을 통하여 현장에서 구제역 및 조류 인플루엔자 바이러스를 검지할 수 있는 민감도가 매우 높은 형광 분자 표지 농축 종이칩과 종이칩에서 나오는 형광을 검출하는 형광 검출 기기를 개발하였다. 또한, 형광 분자 표지 농축 종이칩은 매우 간단한 방법으로 종이 내에 3차원 구조를 만드는 혁신적인 기술을 이용하여 제작된 종이칩으로 기존에 없던 기술이 탑재된 종이칩을 개발하였다.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

형광 분자 표지 농축 종이칩은 종이 내에 3차원 구조를 만들고 핵산을 검지할 수 있는 형광 분자 표지를 농축하여 만든 칩으로 기존 종이 기반 핵산 검지기기의 낮은 민감도를 매우 개선하였으며 매우 적은 양의 시료를 이용하더라도 바이러스를 검지할 수 있어 기존의 바이러스 검출 시스템 모델에 변화를 줄 수 있을 것으로 예상된다. 또한, 개발한 소형 형광 검출 기기는 휴대가 가능하여 실험실에서만 가능했던 바이러스 검지를 현장으로 가지고 옴으로써 검출 시간을 현저하게 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

개발한 형광 분자 표지 농축 종이칩은 형광 분자 표지 이외의 핵산을 검지할 수 있는 타 형광 물질에도 도입이 가능하며 다른 바이러스를 검지하는데에도 사용이 가능하여 가축질병 이외의 분야에서도 활용될 가능성이 매우 높다고 판단된다. 또한, 소형 형광 검출 기기의 경우, 기기 내에 통신/GPS 모듈이 탑재되어 있어 감염 질병 발생 시 그 위치 정보를 실시간으로 모니터링할 수 있고 해당 정보는 확산 모니터링 기술의 위치 정보 자료 제공하는 등 바이러스 모니터링 분야에 활용 가능성이 매우 높다고 할 수 있다.

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

3년의 연구 기간동안 모든 연구팀은 계획한 연구 목표에 따라서 연구 과제를 수행하였으며 연구 과제를 수행하는데 있어서 2개월마다 자체적인 진도점검회의를 진행함으로써 상호 간의 긴밀한 협업이 이루어질 수 있도록 했다. 또한, 코로나 19로 인한 팬데믹 사태로 인하여 연구를 진행하는데에 어려운 점이 있었으나 각 연구팀이 세부과제의 역할에 최선을 다해서 수행해주어 총 3년의 연구계획에 따른 연구성과 및 연구목표를 모두 달성 할 수 있었다.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

3년의 연구 기간동안 다음과 같은 연구개발성과는 발표하였다.

1. Lim, J. Y., Nam, J. S., Shin, H., Park, J., Song, H. I., Kang, M., Lim, K. I., & Choi, Y. (2019). Identification of newly emerging influenza viruses by detecting the virally infected cells based on surface enhanced Raman spectroscopy and principal component analysis. *Analytical chemistry*, 91(9), 5677–5684.
2. Cho, H. H., Kim, S. J., Jafry, A. T., Lee, B., Heo, J. H., Yoon, S., Jeong, S. H., Kang, S. I., Lee, J. H., & Lee, J. (2019). A Paper-Based Platform for Long-Term Deposition of Nanoparticles with Exceptional Redispersibility, Stability, and Functionality. *Particle & Particle Systems Characterization*, 36(6), 1800483.
3. Lim, H., Jafry, A. T., & Lee, J. (2019). Fabrication, flow control, and applications of microfluidic paper-based analytical devices. *Molecules*, 24(16), 2869.
4. Jang, Y. H., Jin, X., Shankar, P., Lee, J. H., Jo, K., & Lim, K. I. (2019). Molecular-Level Interactions between Engineered Materials and Cells. *International journal of molecular sciences*, 20(17), 4142.
5. Lee, M., Han, G., & Lee, J. (2019). Humidity responsive single-layered film fabricated by hydrophilic titanium oxide nanotubes. *Applied Physics Letters*, 115(9), 091601.
6. Lee, S., Lee, M., & Lee, J. (2021). Highly sensitive humidity-responsive actuator comprising aligned electrospun fibers containing metal-organic framework nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 332, 129520.
7. Jang, Y. H., Ahn, S. R., Shim, J. Y., & Lim, K. I. (2021). Engineering Genetic Systems for Treating Mitochondrial Diseases. *Pharmaceutics*, 13(6), 810.
8. Cho, H. H., Heo, J. H., Jung, D. H., Kim, S. H., Suh, S. J., Han, K. H., & Lee, J. H. (2021). Portable Au Nanoparticle-Based Colorimetric Sensor Strip for Rapid On-Site Detection of Cd<sup>2+</sup> Ions in Potable Water. *BioChip Journal*, 1–11.
9. 2019 한국세라믹학회 춘계학술대회 및 총회 “A Paper-based Platform for Long-term Deposition of Nanoparticles with Exceptional Redispersibility, Stability, and Functionality”
10. 2019 대한기계학회 바이오공학부문 춘계학술대회 “Development of Paper-Based Digital Microfluidics Chip using Double-Sided Electrohydrodynamic Jet Printing”
11. 2019 한국바이오칩학회 춘계학술대회 “Multilayered Electrohydrodynamic Jet Printing Fabrication of Paper-based Digital Microfluidic Chip”
12. 2019 한국바이오칩학회 춘계학술대회 “A Paper-based Platform for Long-term Deposition of Nanoparticles with Exceptional Redispersibility, Stability, and Functionality”
13. 2019 대한기계학회 마이크로/나노공학부문 춘계학술대회 “종이 기반 삼차원 전기 회로를 이용한 이차원 전극 배열 디지털 미세유체역학 칩 개발”
14. 2019 한국생물공학회 추계학술발표대회 및 국제심포지엄 “Engineering of Retroviral DNA Integration Patterns Using Nanotopography”
15. 2019 Asia 3 Roundtable of Nucleic Acids “Multifunctional Heterogeneous Carbon Nanotube Nanocomposites Assembled by DNA Binding Peptide Anchors”
16. 2019 The 7th International Workshop on Nanotechnology and Application IWNA “Chemical Functionalization of Carbon Nanotubes using DNA Binding Peptides”
17. 2019 한국세라믹학회 추계학술대회 “Long-term Deposition of Nanoparticles on Paper Substrates”

18. 2019 IEEE-NANOMED “From DNA to Smart Materials for Biosensing Applications”
19. 2019 72nd Annual Meeting of the APS Division of Fluid Dynamics “Novel humidity responsive film fabricated by hydrophilic nanostructured titanium oxide”
20. 2019 한국가시화정보학회 추계학술대회 “곰팡이 독소 검지를 위한 종이기반 다중 검지기 개발”
21. 2020 The 1st International Symposium on Applied Plasma Science and Engineering “Multifunctional Heterogeneous Carbon Nanotube Nanocomposites Assembled by DNA Binding Peptide Anchors”
22. 2020 한국바이오칩학회 춘계학술대회 “Multifunctional Heterogeneous Carbon Nanotube Nanocomposites Assembled by DNA Binding Peptide Anchors”
23. 2020 한국바이오칩학회 춘계학술대회 “A Simple, Fast and Low-cost on-site Detection of Cadmium ions in Drinking Water with Gold Nanoparticles based Portable PET Colorimetric Sensor Strip”
24. 2020 제11회 한국유체공학학술대회 “Paper-based multi-detector for sensing tumor markers”
25. 2020 한국가시화정보학회 추계학술대회 “Development of paper-based multi-detector for detecting lung cancer tumor maker”
26. 2020 한국세라믹학회 추계학술대회 “생체모사 기술을 통한 탄소나노튜브 나노복합체의 합성”
27. 2020 한국세라믹학회 추계학술대회 “탁월한 재분산성, 안정성 및 기능성을 갖춘 건조된 나노입자 장기간 보관 기술”
28. 2021 The 8th ICMAP & The 9th ISFM “Bioinspired Assmby of Multifunctional Carbon Nanotube Nanocomposites”
29. 2021 The 8th ICMAP & The 9th ISFM “Long-Term Deposition of Dried Nanoparticles on Substrates with Exceptional Redispersibility, Stability, and Functionality”
30. 출원번호 10-2020-0069106 “측방 유동 분석 장치의 제조 방법”
31. 출원번호 10-2020-0071487 “상보적 염기서열을 갖는 절편을 도입한 핵산-탄소 나노 튜브 구조체, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 형광 기반 핵산 검출 센서”
32. 출원번호 10-2020-0114432 “나노입자가 탑재된 하이드로겔 마이크로비드 및 이의 제조 방법”
33. 출원번호 10-2021-0088552 “핵산 검출 키트 및 이의 제조 방법”
34. 2020 정책 건의 “21년도 농림축산식품 연구개발사업 신규 과제기획위원회”
35. 2020 정책 시행 “2021년도 가축질병대응기술개발사업 신규과제 기획”
36. 2019 팍스경제TV “팜스웰바이오, 자회사 팜스웰메디컬 구제역·AI 신속진단키트 개발업체로 '선정'”
37. 2019 팍스경제TV “[리포트][단독] 팜스웰바이오, 세계최초 '다차원 바이러스 검출기기' 개발 착수”
38. 2021 기계로봇 연구정보센터 연구자 인터뷰 “한 손안에 들어오는 유체 역학”
39. 2021 기계로봇연구센터 웨비나(Webinar) “마이크로 유체역학기기를 활용한 조류독감, 구제역 등 감염병 조기진단 기기의 개발”
40. 학사 인력 양성 2019 “성균관대학교 조성수”
41. 학사 인력 양성 2019 “성균관대학교 이태운”
42. 석사 인력 양성 2020 “숙명여자대학교 심지연”
43. 석사 인력 양성 2020 “숙명여자대학교 정혜영”
44. 박사 인력 양성 2020 “성균관대학교 김경일”
45. 박사 인력 양성 2020 “성균관대학교 임호섭”
46. 학사 인력 양성 2021 “성균관대학교 이지형”
47. 학사 인력 양성 2021 “성균관대학교 문혁균”
48. 석사 인력 양성 2021 “성균관대학교 어솔”
49. 박사 인력 양성 2021 “성균관대학교 윤석영”
50. 박사 인력 양성 2021 “성균관대학교 이민기”

## II. 연구목표 달성도

### 1. 1차년도 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
종이 기반 미세유체 소자의 설계 및 이차원 lateral flow sheet의 유동 조건 분석	10	100	종이 기반 미세유체 소자의 설계 및 이차원 lateral flow sheet의 유동 조건 분석 완료
형광 나노재료 및 핵산 용액의 물성 파악 연구 및 종이 기반 기기와 시료간의 상호작용 연구	10	100	형광 나노재료 및 핵산 용액의 물성 파악 연구 및 종이 기반 기기와 시료간의 상호작용 연구 완료
상용 전처리 추출기술을 활용한 물리적 전처리 방법 연구	5	100	상용 전처리 추출기술을 활용한 물리적 전처리 방법 연구 완료
형광 기반의 검지 시스템 개발을 위한 형광 나노재료 및 소광재료 설계 및 합성	10	100	형광 기반의 검지 시스템 개발을 위한 형광 나노재료 및 소광재료 설계 및 합성 완료
작용기를 포함한 핵산 서열의 종이에의 기능화 연구	10	100	작용기를 포함한 핵산 서열의 종이에의 기능화 연구 완료
상용 전처리 추출기술을 활용한 화학적 전처리 방법 연구	5	100	상용 전처리 추출기술을 활용한 화학적 전처리 방법 연구 완료
구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스의 염기서열 분석	10	100	구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스의 염기서열 분석 완료
각 바이러스의 혈청형과 아형을 구분할 수 있는 핵산 탐침 (Probe) 염기서열 설계	15	100	각 바이러스의 혈청형과 아형을 구분할 수 있는 핵산 탐침 (Probe) 염기서열 설계 완료
종이 기반 Lateral Flow kit에의 검지기 형광 검출 알고리즘 설계	10	100	종이 기반 Lateral Flow kit에의 검지기 형광 검출 알고리즘 설계 완료
설계단계 초기부터 의료기기 등록을 위한 절차 관련 사항을 적용한 체계도 작성 및 설계	5	100	설계단계 초기부터 의료기기 등록을 위한 절차 관련 사항을 적용한 체계도 작성 및 설계 완료
소형 형광 검지기 설계를 위한 소자 선정 및 검출 모듈 성능 테스트	10	100	소형 형광 검지기 설계를 위한 소자 선정 및 검출 모듈 성능 테스트 완료
합계	100		

### 2. 2차년도 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
실험실에서 종이 기반 기기를 평가할 수 있는 실시간 모니터링 시스템 개발	10	100	실험실에서 종이 기반 기기를 평가할 수 있는 실시간 모니터링 시스템 개발 완료
구제역과 조류독감 바이러스 검지 lateral flow sheet의 원천 기술 확보 및 발광에 따른 검지 메커니즘 연구	15	100	구제역과 조류독감 바이러스 검지 lateral flow sheet의 원천 기술 확보 및 발광에 따른 검지 메커니즘 연구 완료
바이러스 추출 핵산의 특정 염기서열과 결합할 수 있는 핵산을 이용한 형광 분자 표지 (fluorescence molecular	15	100	바이러스 추출 핵산의 특정 염기서열과 결합할 수 있는 핵산을 이용한 형광 분자 표지 (fluorescence molecular

beacon) 개발			beacon) 개발 완료
구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스 혈청형 또는 아형 구별을 위한 형광 기반의 다중 검지 시스템 개발	10	100	구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스 혈청형 또는 아형 구별을 위한 형광 기반의 다중 검지 시스템 개발 완료
역유전학 (Reverse genetics) 기법을 이용한 복제 능력이 제거된 모델 바이러스 생산	15	100	역유전학 (Reverse genetics) 기법을 이용한 복제 능력이 제거된 모델 바이러스 생산 완료
모델 바이러스 RNA 유전체 추출 및 바이러스 검지 안정성 극대화 연구	10	100	모델 바이러스 RNA 유전체 추출 및 바이러스 검지 안정성 극대화 연구 완료
소형 형광 검출 모듈 설계 및 제작	15	100	소형 형광 검출 모듈 설계 및 제작 완료
종이 기반 키트 적용한 연동 테스트 및 성능 평가	10	100	종이 기반 키트 적용한 연동 테스트 및 성능 평가 완료
합계	100		

### 3. 3차년도 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
구제역과 조류독감 바이러스 감염 여부 및 아종 바이러스 구별을 위한 lateral flow sheet 검출기기 개발	15	100	구제역과 조류독감 바이러스 감염 여부 및 아종 바이러스 구별을 위한 lateral flow sheet 검출기기 개발 완료
시작품 제작을 위한 위탁연구기관과의 상호 협력 및 최적화	10	100	시작품 제작을 위한 위탁연구기관과의 상호 협력 및 최적화 완료
바이러스 검출기기의 형광 신호 최적화 및 형광 신호와 바이러스 감염 여부 간의 상호관계 해석	10	100	바이러스 검출기기의 형광 신호 최적화 및 형광 신호와 바이러스 감염 여부 간의 상호관계 해석 완료
바이러스 검출 성능 개선 연구 및 센서 안정도와 신뢰성 개선 연구	15	100	바이러스 검출 성능 개선 연구 및 센서 안정도와 신뢰성 개선 연구 완료
실제 검지 상황을 모사한 야생 바이러스 생산	10	100	실제 검지 상황을 모사한 야생 바이러스 생산 완료
전처리 기술을 바탕으로 한 야생 바이러스 RNA 유전체 추출 기술 개발	15	100	전처리 기술을 바탕으로 한 야생 바이러스 RNA 유전체 추출 기술 개발 완료
Lateral Flow sheet Kit를 적용하여 검출 성능 확인	15	100	Lateral Flow sheet Kit를 적용하여 검출 성능 확인 완료
통신/GPS 모듈이 추가된 바이러스 검지용 소형 형광 검출 장비 개발	10	100	통신/GPS 모듈이 추가된 바이러스 검지용 소형 형광 검출 장비 개발 완료
합계	100		

### III. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구개발을 통하여 현장에서 구제역 및 조류 인플루엔자 바이러스를 검지할 수 있는 민감도가 매우 높은 형광 분자 표지 농축 종이칩과 종이칩에서 나오는 형광을 검출하는 형광 검출 기기를 개발하였다. 또한, 형광 분자 표지 농축 종이칩은 매우 간단한 방법으로 종이 내에 3차원 구조를 만드는 혁신적인 기술을 이용하여 제작된 종이칩으로 기존에 없던 기술이 탑재된 종이칩을 개발하였다.

#### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

특별한 요구사항 없음.

#### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

형광 분자 표지 농축 종이칩은 종이 내에 3차원 구조를 만들고 핵산을 검지할 수 있는 형광 분자 표지를 농축하여 만든 칩으로 기존 종이 기반 핵산 검지기기의 낮은 민감도를 매우 개선하였으며 매우 적은 양의 시료를 이용하더라도 바이러스를 검지할 수 있어 기존의 바이러스 검출 시스템 모델에 변화를 줄 수 있을 것으로 예상된다. 또한, 개발한 소형 형광 검출 기기는 휴대가 가능하여 실험실에서만 가능했던 바이러스 검지를 현장으로 가지고 옴으로써 검출 시간을 현저하게 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

개발한 형광 분자 표지 농축 종이칩은 형광 분자 표지 이외의 핵산을 검지할 수 있는 타 형광 물질에도 도입이 가능하며 다른 바이러스를 검지하는데에도 사용이 가능하여 가축질병 이외의 분야에서도 활용될 가능성이 매우 높다고 판단된다. 또한, 소형 형광 검출 기기의 경우, 기기 내에 통신/GPS 모듈이 탑재되어 있어 감염 질병 발생 시 그 위치 정보를 실시간으로 모니터링할 수 있고 해당 정보는 확산 모니터링 기술의 위치 정보 자료 제공하는 등 바이러스 모니터링 분야에 활용 가능성이 매우 높다고 할 수 있다.

### IV. 보안성 검토

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

#### 1. 연구책임자의 의견

#### 2. 연구개발기관 자체의 검토결과

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	검역방역기술
연구과제명	구제역 바이러스 및 조류 인플루엔자 바이러스 동시 검출을 위한 신속 진단 키트 개발			
주관연구개발기관	성균관대학교 산학협력단		주관연구책임자	이진기
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	702,000,000	234,000,000		936,000,000
연구개발기간	2018.11.15. ~ 2021.08.15.			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(                      ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:                      )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 구제역과 조류독감 바이러스 감염 진단 및 혈청형 또는 아형을 구별하기 위한 종이 기반 검지 기기 개발	<p>바이러스 감염 여부를 검지할 수 있는 lateral flow sheet를 개발하였으며 lateral flow sheet의 구조를 변형하여 검지 한계를 개선함.</p> <p>현장 진단이 가능한 높은 민감도를 갖는 형광 분자 표지 농축 종이칩을 개발하였으며 종이칩의 구제역과 조류 인플루엔자 바이러스 검지 대한 테스트를 진행함.</p>
② 바이러스 추출 핵산과 결합할 수 있는 형광 분자 표지 (fluorescence molecular beacon)의 개발 및 이를 기반으로 한 바이러스 검지 기술 개발	<p>형광 분자 표지 개발을 위해 형광 재료 및 소광 재료의 선정하였으며 재료의 광학 특성을 평가함.</p> <p>모델 바이러스 핵산 염기 서열과 특이적으로 결합할 수 있는 형광 분자 표지 설계 및 제작함.</p> <p>실제 바이러스에 대응되는 구제역 바이러스 및 조류 인플루엔자 바이러스 검지를 위한 형광 분자 표지를 개발 및 평가함.</p>
③ 바이러스 다중 검출용 분자 탐침 설계 및 성능평가를 위한 바이러스 제작	<p>모든 구제역 바이러스 혈청형 및 조류 인플루엔자 바이러스 아형의 유전체의 공통 부분을 분석함으로써 바이러스 검지용 탐침 분자를 설계함.</p> <p>역유전학 기법을 이용하여 복제 능력이 제거된 모델 바이러스 생산하는 기술을 개발하여 모델 구제역 바이러스 및 조류 인플루엔자 바이러스를 생산함.</p>
④ 통신/GPS 모듈이 추가된 바이러스 검지용 소형 형광 검출 장비 개발	<p>형광 검출 기기의 소자를 선정하고 광학 구조를 설계하고 최종적으로 형광 검출 기기의 모듈 구조를 설계함으로써 소형 형광 검출 장비를 개발함.</p> <p>통신/GPS 모듈을 이용한 모니터링 소프트웨어를 디자인하여 소형 형광 검출 장비에 도입함.</p>

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구 활용(명))
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
													S C I	비 S C I						논 문 평 균 I F	
단위	건	건	건	평균 건/년	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건				
가중치	25				35		10							10	10	5	2	3			
최종 목표 (연차내)	4				1	10	1					4		2.5	8	8	1	1			
1차 년도	목표													2	2						
	실적								1			3		4.6	5	2	2				
2차 년도	목표	2										2		2.5	3	3					
	실적	2										2		3.8	11	4					
3차 년도	목표	2			1	10	1					2		2.5	3	3	1	1			
	실적	2			1	10	1					3		4.5	5	5	2	2			
소계	목표	4			1	10	1					4		2.5	8	8	1	1			
	실적	4			1	10	1		1			8		4.4	21	11	2	4			
달성률 (%)	100				100	100	100					200		176	263	138	200	400			

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	Paper-based microfluidic 디자인 기술
②	핵산 검출 키트 및 이의 제조 방법
③	종이 섬유 표면의 작용기 치환을 통한 고분자 기능화 방법
④	구제역 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스 혈청형 또는 아형 구별을 위한 형광 분자 표지 설계 방법
⑤	복제 능력이 제거된 모델 바이러스 생산 방법
⑥	전처리 기술을 바탕으로 한 야생 바이러스 RNA 추출 기술
⑦	형광 검출 기기의 소형화 기술
⑧	모니터링 소프트웨어 디자인하여 개발된 통신/GPS 모듈

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술					√	√				
②의 기술	√	√				√	√			
③의 기술				√						
④의 기술					√					
⑤의 기술				√						
⑥의 기술				√						
⑦의 기술		√					√	√		
⑧의 기술	√	√					√			

\* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	종이 기반 검지기기를 설계하는 데 각 소자에 적합한 재료를 선정하는데에 참고할 수 있는 자료로 제공될 수 있음.
②의 기술	높은 민감도를 갖는 형광 분자 표지 농축 종이칩의 제작 방법으로 최초로 종이 내부에 3차원 구조를 만들 수 있는 기술임. 해당 기술은 검지 분야에 있어 다양한 물질을 검지하는데에 활용될 것으로 기대함.
③의 기술	종이 표면을 작용기를 치환함으로써 고분자를 기능화하는 방법으로 종이를 활용하여 기기를 개발할 때에 활용될 수 있을 것으로 기대함.
④의 기술	모든 구제역 및 조류 인플루엔자 RNA의 유전 정보를 분석하여 특이점을 찾아 형광 분자 표지를 개발한 기술로 다양한 구제역 바이러스 혈청형 및 조류 인플루엔자 바이러스 아형을 검지하는 물질을 개발할 때 활용될 수 있음.
⑤의 기술	복제 능력이 제거된 바이러스를 획득함으로써 실험실에서 다른 핵산 검지 기기를 개발할 때 활용될 수 있음.
⑥의 기술	순도 높은 야생 바이러스 RNA를 획득할 수 있음.
⑦의 기술	소형화된 형광 검출 장비를 이용하여 현장에서 진단이 가능해질 것으로 기대됨.
⑧의 기술	통신/GPS 모듈을 이용하여 바이러스 검지현황을 실시간으로 모니터링하여 바이러스 방역에 있어 큰 기여를 할 것으로 기대됨.



## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원)에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.