

120091-
02-1-
CG000

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

발간등록번호

11-1543000-004107-01

반도체센서 기반 POCT 시스템 개발
아프리카 돼지열병 신속진단을 위한

2021

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

아프리카돼지열병 신속진단을 위한 반도체센서 기반 POCT 시스템 개발

2022.6.9.

주관연구개발기관 / 포항공과대학교 산학협력단
공동연구개발기관 / 충남대학교 산학협력단
/ (주)씨맥

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "아프리카돼지열병 신속진단을 위한 반도체센서 기반 POCT 시스템 개발"(개발기간 : 2020.4.29 ~ 2021.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022.6.9

주관연구개발기관명 : 포항공과대학교 산학협력단 (대표자) 김상우
공동연구개발기관명 : 충남대학교 산학협력단 (대표자) 정종현
: (주)씨백 (대표자) 박종택

주관연구책임자 : 이경수
공동연구책임자 : 신현진
박종택

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서							보안등급			
							일반[], 보안[]			
중앙행정기관명	농림식품기술기획평가원			사업명	사업명		가축질병대응기술개발사업			
전문기관명 (해당 시 작성)				사업명	내역사업명 (해당 시 작성)					
공고번호	농축2020-110호			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)						
				연구개발과제번호		120091-02-1-CG000				
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0701	50%	LA0703	30%	EC0203	20%			
	농림식품과학기술분류	RB0201	50%	RB0103	30%	RB0202	20%			
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문									
	영문									
연구개발과제명	국문	아프리카돼지열병 신속진단을 위한 반도체센서 기반 POCT 시스템 개발								
	영문	Development of Semiconductor-based Rapid Point-of-Care Testing (POCT) System for African Swine Fever Virus								
주관연구개발기관	기관명	포항공과대학교 산학협력단		사업자등록번호	506-82-07303					
	주소	(우)37673 경북 포항시 남구 청암로 77 포항공대		법인등록번호	171771-0003550					
연구책임자	성명	이정수		직위	교수					
	연락처	직장전화			휴대전화					
		전자우편			국가연구자번호					
연구개발기간	전체	2020. 4. 29 - 2021. 12. 31. (1년 9개월)								
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계		연구개발비 외 지원금
	현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	
총계	513,000	17,200	154,800					530,200	154,800	685,000
1년차	220,000	7,400	66,600					227,400	66,600	294,000
2년차	293,000	9,800	88,200					302,800	88,200	391,000
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자		직위	휴대전화	전자우편	비고			
협동연구기관	충남대학교 산학협력단	신현진		교수			공동	대학		
참여기업	(주)씨맥	박종택		대표이사			공동	중소기업		
연구개발담당자 실무담당자	성명	최원영		직위	대학원생					
	연락처	직장전화			휴대전화					
		전자우편			국가연구자번호					

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

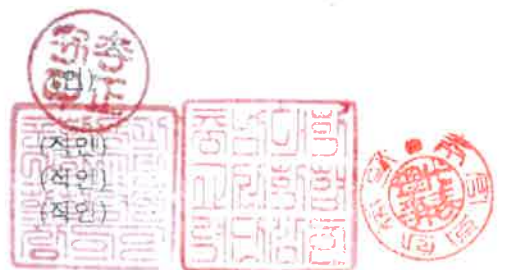
2022 년 06 월 09 일

연구책임자 이 정 수

주관연구개발기관의 장: 김 상 우 (직인)

협동연구기관의 장: 정 중 울 (직인)

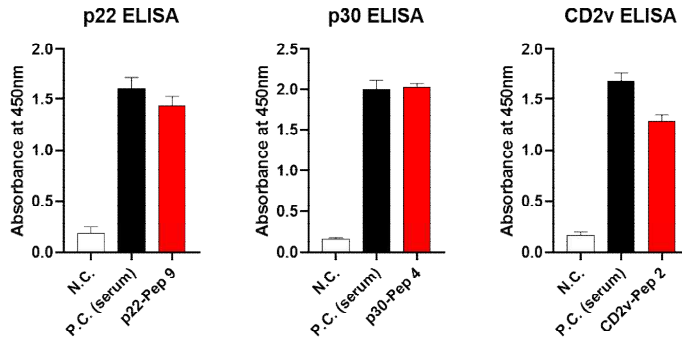
참여기업의 장: 박 중 택 (직인)



농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

사업명	가축질병대응기술개발사업	총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)	
내역사업명 (해당 시 작성)		연구개발과제번호	120091-02-1-CG000
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0701	50%
	농림식품 과학기술분류	RB0201	50%
연구개발과제명	아프리카돼지열병 신속진단을 위한 반도체센서 기반 POCT 시스템 개발		
전체 연구개발기간	2020. 4. 29. - 2021. 12. 31. (21개월)		
총 연구개발비	총 685,000 천원 (정부지원연구개발비: 513,000 천원, 기관부담연구개발비: 172,000 천원)		
연구개발단계	기초[] 응용[] 개발[v] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]	기술성숙도 (해당 시 기재)	착수시점 기준(4) 종료시점 목표(5)
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)			
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)			
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	<p>본 연구는 아프리카돼지열병 (ASF) 바이러스를 현장에서 진단할 수 있는 고민감도 진단기기 개발을 목표로 함. 이를 위해 반도체소자기반 전해질-게이트 트랜지스터 (EGT) 소자 양산, ASFV 특이적 단클론항체 개발, 센서 표면에 ASFV 항체를 고정하는 표면처리 공정, 현장현시 진단을 위한 정밀센서 리더기 등의 핵심요소 기술을 개발하고, 이들을 집적화하여 아프리카돼지열병을 20분 이내에 확진할 수 있는 신개념 휴대용 현장진단키트 제품을 개발함.</p>	
	연구개발내용	<p>[ASFV 진단용 항원·항체 개발]</p> <ul style="list-style-type: none"> - ASFV 항원 단백질 발현 및 정제 : 동물세포에서 ASFV 항원단백질 3종 (p22, p30, CD2v) 발현 및 항원단백질로써 정제 <div style="text-align: center;"> </div> <ul style="list-style-type: none"> - ASFV 항원단백질 3종 (p22, p30, CD2v)에 대한 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포 제작 <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>p22</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>p30</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>CD2v</p> </div> </div> <ul style="list-style-type: none"> - 하이브리도마 유래 단클론 항체 및 재조합 항체 유사체 peptibody의 항원에 대한 특이 반응성 확인 	



[ASFV 진단용 소자 개발]

- 전해질-게이트 트랜지스터(EGT) 8인치 제조공정 개발 및 90% 이상 수율을 확보한 양산공정 구축

Parameter	Mean	Std.	Cp	Cpk
SS (mV/dec)	74.8	3.93	1.13 (2급)	1.15 (2급)
V _{th} (V)	0.80	0.031	1.16 (2급)	1.19 (2급)

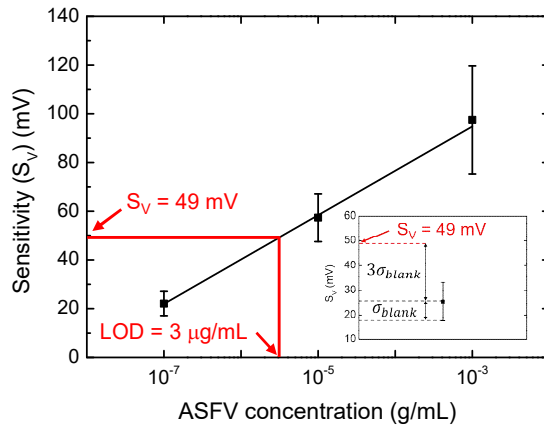
- 항체 표면처리 공정 개발 : 전해질게이트(EGT) 소자 감지부에 receptor를 부착하기 위한 표면개질화 조건 구축

과정	반응 온도	반응 시간	처리 방법
UV expose	상온 (27 °C)	1 min 30 s	Chamber
APTES	55 °C	1 min	Vapor
Glutaraldehyde	상온 (27 °C)	90 min	Soak

- 바이오 진단 기초 실험 : EGT소자의 검출특성 평가 및 성능 개선을 위해 다양한 바이오 물질의 검출실험 실시.

대상	진단범위	검출한계	검출시간
인플루엔자 바이러스	10 pg/mL - 100 ng/mL	10 pg/mL	20분
땅콩 알레르겐	70 pg/mL - 100 ng/mL	70 pg/mL	20분
SARS-CoV-2	300 pg/mL - 3 ug/mL	900 fg/mL	20분
Urea	1 mM - 19 mM	724 uM	15분

- ASFV 검출 : 충남대에서 제공받은 ASFV 진단용 항원·항체와 제작한 EGT 소자를 이용하여 ASFV 검출실험 실시. 검출시간 20분, 검출한계 3 ug/mL를 확보함.



[ASFV 진단용 스트립 및 시제품 제작]

- ASFV 진단기기 개발 (씨맥) : Linear Array Sensor를 이용해 광학부, 스트립 홀더 등과 연계된 시제품의 케이스를 설계 및 제작 후 테스트를 진행함.



- ASFV 진단용 일회용 스트립 제작 : EGT 소자와 저온에폭시 공정을 이용하여 일회용 스트립 제작 공정 개발. 이를 정밀리더기와 연결하면 비숙련자의 실시간 현장측정이 가능함.



- ASFV 진단용 리더기 설계 (포항공대) : 제작된 일회용스트립을 연결하여 정밀한 전류전압 변동을 측정할 수 있는 휴대용 정밀리더기 시제품을 제작함. 개발된 FET 소자의 성능 손실을 최소화하여 현장에서 고민감도 진단을 구현할 것으로 기대함.



연구개발성과	<p>[논문(SCI) : 6 건]</p> <ul style="list-style-type: none"> - Donghoon Kim, Bo Jin, Sol-A Kim, Wonyeong Choi, Seonghwan Shin, Jiwon Park, Won-Bo Shim, Kihyun Kim and Jeong-Soo Lee, "An Ultrasensitive Silicon-Based Electrolyte-Gated Transistor for the Detection of Peanut Allergens", <i>Biosensors</i>, vol.12, no.1, (2022) - Jae-Yeon Park, Jihoon Ryu, Jung-Eun Park, Eui-Ju Hong and Hyun-Jin Shin, "Heat shock protein 70 could enhance porcine epidemic diarrhoea virus replication by interacting with membrane proteins", <i>Veterinary Research</i>, vol.52 (2021) - Donghoon Kim, Wonyeong Choi, Seonghwan Shin, Jiwon Park, Kihyun Kim, Bo Jin and Jeong-Soo Lee, "Lumped-Capacitive Modeling and Sensing Characteristics of an Electrolyte-Gated FET Biosensor for the Detection of the Peanut Allergen", <i>IEEE Access</i>, vol. 9, pp.168922-168929 (2021) - Iksoo Park, Jae Bok Seol, Gilsang Yoon and Jeong-Soo Lee, "Three-Dimensional Imaging of Carbon Clusters in Thermally Stable Nickel Silicides by Carbon Pre-Implantation", <i>Applied Surface Science</i>, vol. 539, no.15, pp.148-152 (2020) - Gilsang Yoon, Donghoon Kim, Iksoo Park, Bo Jin and Jeong-Soo Lee, "Fabrication and Characterization of Nanonet-Channel LTPS TFTs Using a Nanosphere-Assisted Patterning Technique", <i>micromachines</i>, vol.12, p.741 (2021) - Jounghun Park, Gilsang Yoon, Donghyun Go, Jungsik Kim and Jeong-Soo Lee, "Extraction of Nitride Trap Profile in 3-D NAND Flash Memory Using Intercell Program Pattern", <i>IEEE Access</i>, vol.9, pp.118794-118800 (2021)
	<p>[특허 출원 : 4 건]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 바이오 센서 및 그 제조방법 (국가 : 대한민국, 출원일 : 2021.04.29, 출원번호 : 10-2021-0056032) - 표적물질 검출 센서 제조방법 (국가 : 대한민국, 출원일 : 2020.09.01, 출원번호 : 10-2020-0111123) - 표적물질 검출 센서 제조방법 (국가 : PCT, 출원일 : 2021.08.17, 출원번호 : PCT/KR2021/010898) - 바이오센서 및 이의 제조 방법 (국가 : 대한민국, 출원일 : 2021.11.23, 출원번호 : 10-2021-0162374)
	<p>[학술 발표 : 8 건]</p> <ul style="list-style-type: none"> - Seonghwan Shin, Donghoon Kim, Wonyeong Choi, Jiwon Park and Jeong-Soo Lee, "Influence of O₂ Plasma On Surface Functionalization And Electrical Characteristics For FET-based Biosensor Applications", <i>The 28th Korean Conference on Semiconductors</i>, Online, Jan. 25 - Jan. 29, 2021 - Gilsang Yoon, DongHyun Go, Jaeseok Jin, Jounghun Park and Jeong-Soo Lee, "Investigation of Trap Profiles of Tunneling and Blocking Layers after P/E Cycling Stress in 3-D VNAND Flash Memory", <i>The 28th Korean Conference on Semiconductors</i>, Online, Jan. 25 - Jan. 29, 2021 - Jounghun Park, GilSang Yoon, Jaeseok Jin, DongHyun Go and Jeong-Soo Lee, "Novel Trap Profiling in Nitride Layer Using Space Program for 3-D NAND Flash Memory", <i>The 28th Korean Conference on Semiconductors</i>, Online, Jan. 25 - Jan. 29, 2021 - Yea Jin Lee, and Hyun-Jin Shin, "Immune Responses Induced by Adenovirus Expressing Receptor Binding Motif of SARS-CoV2", <i>KSMCB International Conference 2021</i>, Jeju, Korea, Nov. 3 - Nov. 5, 2021 - Nipuna Tennakoon, Jihoon Ryu, Makoto Ujike, Fumihiko Taguchi, and Hyun-Jin Shin, "Enhancement of Cell Fusion by the Hypervariable Region (HVR) of the Spike Protein of Mouse Hepatitis Virus (MHV) as Revealed by Two Variants of MHV-JHM Strains", <i>KSMCB International Conference 2021</i>, Jeju, Korea, Nov. 3 - Nov. 5, 2021 - Jihoon Ryu, Nipuna Tennakoon, Jae-Yeon Park, Yea Jin Lee, and Hyun-Jin

	<p>Shin, "Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) spike S1 displayed on Self-assembled ferritin nanoparticles elicit neutralizing antibodies against PEDV", <i>KSMCB International Conference 2021</i>, Jeju, Korea, Nov. 3 - Nov. 5, 2021</p> <p>- Jae-Yeon Park, Jihoon Ryu, and Hyun-Jin Shin, "Development of cDNA infectious clone, Newly isolated Japanese encephalitis virus genotype V in South Korea", <i>KSMCB International Conference 2021</i>, Jeju, Korea, Nov. 3 - Nov. 5, 2021</p> <p>- Saori Kosaka, Jihoon Ryu, and Hyun-Jin Shin, "Evaluation of putative subunit vaccine using spike protein for SARS-CoV 2", <i>KSMCB International Conference 2021</i>, Jeju, Korea, Nov. 3 - Nov. 5, 2021</p> <p>[인력양성 : 12 명]</p> <p>- 박사 : 8명 (포항공대 : 5명, 충남대 : 3명)</p> <p>- 석사 : 4명 (포항공대 : 3명, 충남대 : 1명)</p> <p>[제품화 : 1 건]</p> <p>- (주)씨맥</p> <ul style="list-style-type: none"> • 제품명 : 휴대용 POCT 시스템 • 이용 분야 : 돼지 열병 진단 <p>[고용창출 : 4 명]</p> <p>- (주)씨맥 : 4명</p>
--	--

<p>연구개발성과 활용계획 및 기대 효과</p>	<p>- 본 연구를 통해 반도체센서, 스트립, 리더기 등을 포함한 최첨단 반도체기반 진단시스템을 개발함으로써 ASFV 감염을 현장에서 진단가능한 원천기술을 확보함.</p> <p>- 본 연구를 통해 개발한 진단시스템은 다양한 질병 원인체에 대한 진단이 가능한 진단플랫폼 기술임. 체외진단(IVD)시장 중에서 비중이 높은 면역화학, 분자진단, 임상 등의 주요 진단 시장 진출이 가능함.</p> <p>- 개발된 기술은 인체 뿐만 아니라 동물 질병 검출에도 적용이 가능한 범용기술이므로 수의/반려동물 분야의 시장 진입이 가능함. 신속하고 정확한 진단을 통하여 가금류 농장의 피해를 최소화 할 수 있음.</p> <p>- 반도체 기반 질병 진단 바이오센서는 다양한 분야의 나노기술이 융합된 분야로써 이를 위한 표면처리 기술, 생체분자 고정화 기술, 바이오마커 반응성 평가 등 새로운 연구분야 창출이 가능함.</p> <p>- 고민감도 반도체 스트립을 관련 연구분야에 안정적인 공급이 가능하게 됨으로써, 질병진단, 제약, 바이오마커개발 분야 등 반도체기반 진단시스템 분야 연구 활성화에 기여함.</p> <p>- 신속진단키트(RDT)의 고질적인 한계인 민감도 이슈를 대체할 수 있는 신기술임.</p>
------------------------------------	--

<p>연구개발성과의 비공개여부 및 사유</p>	- 해당사항 없음.
-------------------------------	------------

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신제품	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설 ·장비명	규격 (모델명)	수 량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	아프리카 돼지열병		단클론 항체		전계 효과 트랜지스터		전해질-게이트		현장 진단			
영문핵심어 (5개 이내)	African Swine Fever		Monoclonal antibodies		Field-effect transistor		Electrolyte-Gate		Point-of-Care Testing (POCT)			

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
4. 목표 미달 시 원인분석
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

별첨 자료

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구 목표

○ 본 과제는 중국을 포함하여 동아시아에 창궐한 제1종법정가축전염병으로, 특히 국제수의사무국 (OIE) 지정 A 등급 전염병인 아프리카돼지열병 (African Swine Fever, ASF)의 신속 확진 진단을 위하여 휴대용 ASF 신속진단시스템을 개발하는 것을 목표로 함 (그림 1). 이를 위해 ASF 바이러스의 특이적 단클론항체 개발, 항체를 센서 표면에 고정하는 표면개질 공정, 고민감도 나노그물 구조를 도입한 나노그물 FET 소자 양산 공정, 일회용 스트립 제작 공정, 현장진단 구현을 위한 휴대용 정밀센서 리더기 등의 핵심요소 기술을 개발하고, 이들을 집적화하여 **아프리카돼지열병을 20분 이내에 확진할 수 있는 신개념 휴대용 현장진단키트 제품을 개발**하는 것을 최종 목표로 함.

○ 본 기술은 저비용, 대량생산이 가능한 첨단 반도체 공정을 이용하여 실리콘기반 전해질-게이트 (Electrolyte-gate)전계 효과 트랜지스터(Field-Effect Transistor, 이하 FET) 소자와 ASF 바이러스에 대한 특이적 단클론항체를 개발하고, 이를 결합함으로써 ASF 바이러스를 감지할 수 있는 신기술임.

○ 반도체 FET 센서는 센서 표면에 표적 물질을 선택적으로 포획할 수 있는 생화학적 수용체(화학기, 항체, 앵타머 등)를 처리함으로써 다양한 표적물질을 검출할 수 있음. 첨단 반도체 공정을 이용하여 저비용 대량생산이 가능하며, 나노그물 구조를 적용하여 획기적인 감도 향상이 가능한 바이오센서 신기술임. 본 기술은 다양한 수용체를 이용할 수 있는 진단플랫폼 기술이므로 체외 진단시장의 8대 기술 분류 중에서 가장 큰 규모인 면역화학, 현장진단, 분자진단 등의 시장에 진출이 가능함.



[그림 1] 휴대용 ASF 바이러스 진단키트 개념도

1-2. 연구 필요성

○ ASF 바이러스 진단 필요성

- 최근 기후 변화 및 잦은 교역량 그리고 해외여행의 증가로 사람이나 동물의 열대-아열대 지역에서 만연하고 있는 풍토병 질환들의 국내 유입이 증가하는 추세임. 이러한 질병들 중 구제역과 같은 질병은 한국 내 존재하지 않았었지만, 다양한 요인들에 의하여 국내 유입이 되고 있고 심각한 경제적 피해를 유발하고 있음.

African swine fever – major outbreaks in Asia



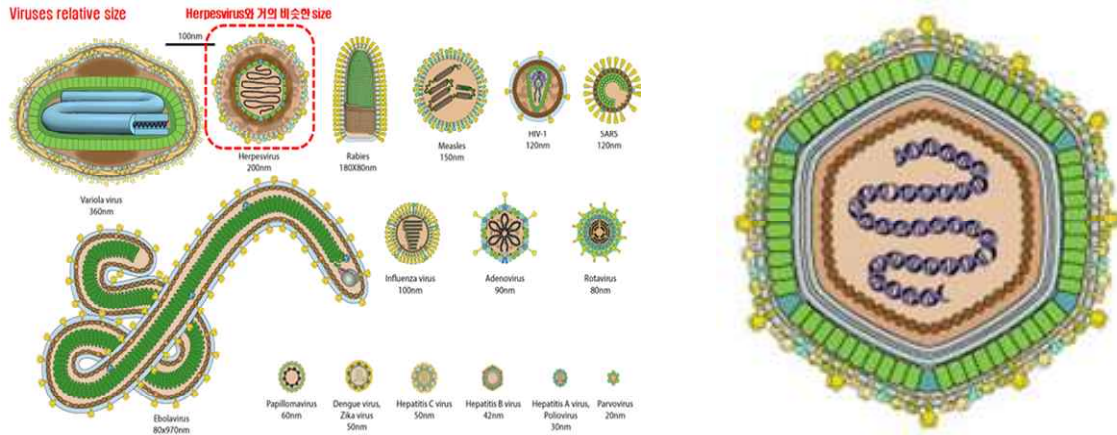
[그림 2] 아시아지역 아프리카 돼지열병 발병 현황

- 가장 중요한 국가적 대처방법은 감염성과 전염성이 높은 질병들에 대한 신속한 진단이며, 예방 백신이나 치료제 개발보다 신속 정확한 진단법의 중요성이 갈수록 중요해짐.

- 최근 ASF는 중국에서 엄청나게 빠른 속도로 전파가 이루어지고 있으며, 중국 내 모든 양돈 농가의 감염을 의심할 정도로 심각한 수준까지 이른 것으로 판단됨. 동남아 지역까지 전파가 되었으며 베트남, 홍콩 등을 포함한 동남아 국가에 심각한 경제적 피해 상황이 보고되고 있음.

- ASF 바이러스의 전파는 야생돼지에 감염하는 진드기에 의해 전파가 이루어진다고 알려져 있으며, 중국의 사례에서 보면 잔반의 섭취가 이 질병의 전파에 매우 중요하다고 보고 되고 있음.

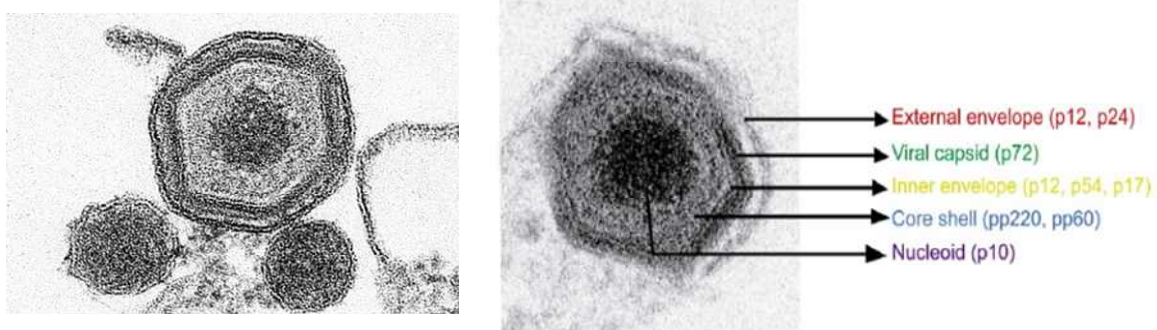
- 최근 북한 지역까지 질병 전파가 이루어지고 있는 실정에서 이러한 감염병 방역은 한국 뿐만 아니라 모든 국가들의 문제이며, 세계 각국은 해외유입 전염병에 대한 체계적인 대응감시체계를 구축하기 위해 노력 중임.



[그림 3] ASFV의 내, 외부구조 및 구성

- ASF 바이러스 (ASFV)는 Asfarviridae, Asfarviridae 속의 바이러스이며 크기가 매우 크고 피막단백질을 가진 double stranded DNA를 유전물질을 포함한 구형의 20면체 구조 형태를 가짐. ASF 바이러스 유전자 크기는 170-190Kbp로 구성되어 다른 바이러스에 비해 매우 크고, core shell의 특징적 구조를 가짐. 또한 최소한 151-167 개 이상의 유전자를 가지고 있다고 알려져있어 단백질 구조나 유전자 구조 또한 매우 복잡하여 연구난이도가 높은 바이러스로 알려짐.

- ASF 바이러스의 구조적 특성을 살펴보면, 두 개의 envelope (external/internal envelope)으로 이루어진 특이 구조로 이루어져 있으며, 그 안에 core shell 구조를 가짐. 이것은 core를 둘러싸고 있는 넓은 단백질 구조이며, viral protease에 의하여 processing되어 나타남. ASF 바이러스의 구조적 분석을 통한 주요 항원 단백질로는 p12, p24 단백질로 이들은 external envelope에 붙어 있음. ASF바이러스가 감염 세포 표면의 receptor 단백질과 결합할 때 가장 중요하게 작용하는 surface protein으로써 진단 및 백신 타겟 단백질로 연구가 되어 오고 있음.



[그림 4] ASFV 구조적 특징

- ASF 바이러스에 대한 혈청형에 대한 명확한 결과는 없으며, p72 유전자의 변화에 따라서 현재까지 약 22개의 유전형이 알려져 있으며, 모든 유전형의 ASFV는 동남아프리카 지역에서 유행을 하였으며 특히나 1형은 유럽 및 남아메리카 지역에서 발생하였지만 아직까지 국내에 유입된 적이 전혀 없는 바이러스로 알려져 있음.

○ FET센서 개발 필요성

- ASF 바이러스 확진 진단에는 혈청학적으로 ELISA 방법과 분자생물학적으로는 유전자 검사가 가장 신뢰도 있는 방법으로 사용되어지고 있음. 하지만 기존 돼지열병 (Classical swine fever, CSF)과의 선택적인 감별 진단이 요구되며, 신속, 정확하고

효율적인 진단기술이 필요한 상황임.

- 일반적인 면역크로마토그래피법을 이용한 간편진단키트(Rapid Kit)는 현장에서 바로 적용하여 30분 이내에 결과를 확인할 수 있는 장점이 있지만, 민감도와 특이도가 낮아 결과의 신뢰도가 떨어지고, 확진 검사법으로 사용이 불가함. 따라서 다양한 바이러스성 질병을 현장에서 신속 정확하게 확진할 수 있는 진단기기의 개발 및 도입이 시급함.

- 기존 실험실 기반 진단 기술은 PCR, ELISA로써 질병원인체의 유전자, 항원 및 항체를 진단하는 방식으로 고가의 외부 장비를 갖춘 실험실 내에서만이 가능하며, 또한 이들 진단 장비를 운용할 수 있는 숙련된 전문 인력이 필요하기 때문에, 질병 발생 현장에서의 신속 진단이 불가능함.

- 또한 기존 실험실 기반 진단 기술은 수일(3~22일)이 소요가 되므로 가축의 2차 감염으로 인하여 질병 전파가 빠르게 일어나는 문제점이 있으며, 이는 가축의 조기 대량 폐사 가능성을 매우 높이며 축산업자의 막대한 경제적 손실을 초래함.

진단기술	기술역량					
나노선 FET 센서	고민감도	고선택도	신속측정	저비용	POCT	신호 디지털화
형광 면역법	저민감도	저선택도	신속측정	저비용	POCT	Rapid Kit
효소결합 면역침강법	저민감도	저선택도	신속측정	저비용	POCT	
바이러스 중화시험법	고민감도	고선택도				

[그림 5] 기존 바이러스 진단법과 반도체 나노선 FET 센서의 비교

동물진단	인체 체외진단	환경 모니터링 시장
<p>전염병(구제역) 확산으로 피해 증가</p> <p>바이러스 잠복기시 임상진단 불가능</p> <p>초기진단 실패로 전염원 비분리시 질병 확산 증가</p> <p><small>*축종별 살처분 두수 X 표준농가 방역단계별 처리비용 (자료:장부연구용역보고서, 2014.02)</small></p>	<p>응급환자 진단 시간 지연</p> <p>검진 후 치료소견까지의 소요시간</p> <p>급성 질병 조기진단 후 진료까지 시간 단축 필요</p> <p><small>*질병진단키트 개발 및 상용화, 나노바이오시스템, 2011</small></p>	<p>장치위주의 환경센서</p> <p>장비 의존적 기술로 휴대 불가</p> <p>오염물질 현장 실시간 단속 및 검지 필요</p> <p><small>*공정해수의 발생과 처리, 2013</small></p>

Rapid 현장진단 (POCT) 수요 급증

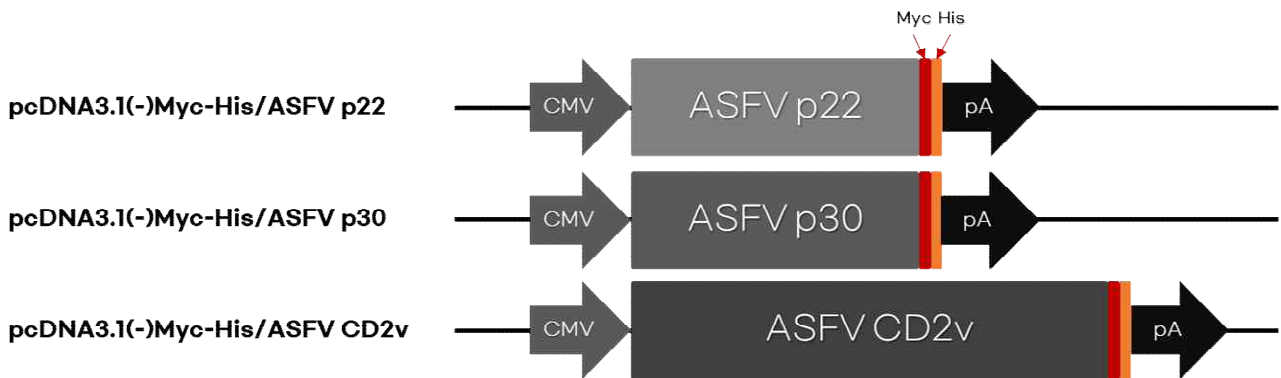
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

2-1. ASFV 진단용 항원·항체 개발

2-1-1. ASFV 항원 단백질 발현 및 정제

○ ASFV p22, p30, CD2v 유전자 클로닝

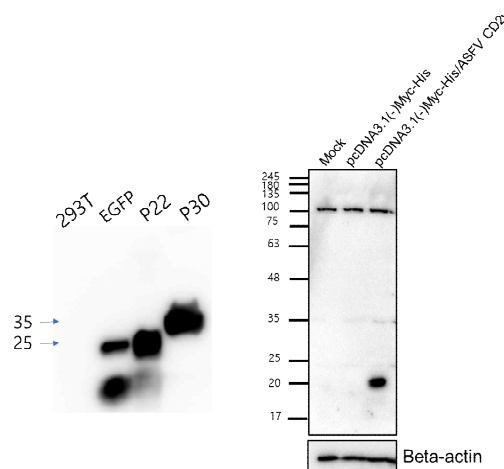
- ASFV(NCBI Reference Sequence: NC_044947.1) p22, p30, CD2v 유전자 합성 및 발현벡터를 구축함. ASFV의 대표적인 항원단백질 3종에 대한 아미노산 서열을 이용하여 human codon usage로 codon-optimization을 한 후 유전자를 합성하였음.
- 합성된 유전자는 eukaryotic expression vector인 pcDNA3.1(-)Myc-His vector에 XhoI과 BamHI 제한효소 자리에 EZ-fusion™ HT cloning kit (Enzymomics)를 사용하여 클로닝하였음.



[그림 8] 항원단백질발현을 위한 동물세포발현 벡터의 expression cassette

○ ASFV p22, p30, CD2v 단백질 발현 정제

- 293T 세포에서 ASFV p22, p30, CD2v 단백질 발현 확인 및 정제함. 구축된 pcDNA3.1(-)Myc-His/ASFV p22, pcDNA3.1(-)Myc-His/ASFV p30, pcDNA3.1(-)Myc-His /ASFV CD2v plasmid를 6 well plate에 seeding 된 293T 세포에 PEI를 이용하여 transfection하고 48시간 후에 세포를 harvest 한 후 lysis 하여 western blotting sample로 준비하였음.
- 10 μ g의 whole lysate를 SDS-PAGE에 loading 하고 단백질을 PVDF membrane으로 transfer 한 후 Myc-Tag antibody를 이용하여 각각의 단백질 발현을 확인하였음.

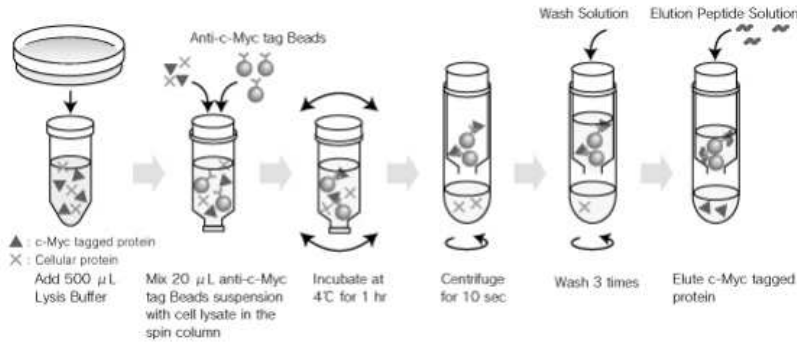


[그림 9] ASFV 항원단백질 p22, p30, CD2v 발현 확인

- ASFV p22, p30, CD2v 단백질의 정제를 위하여 각각 3장씩의 10 cm dish에

293T 세포를 seeding 하고 구축된 plasmid를 trasfection 하였음. 48시간 후 세포를 모두 harvest 하여 lysis하고 Myc-tag purification kit (MBL)를 이용하여 단백질을 정제하였음.

Procedure Summary



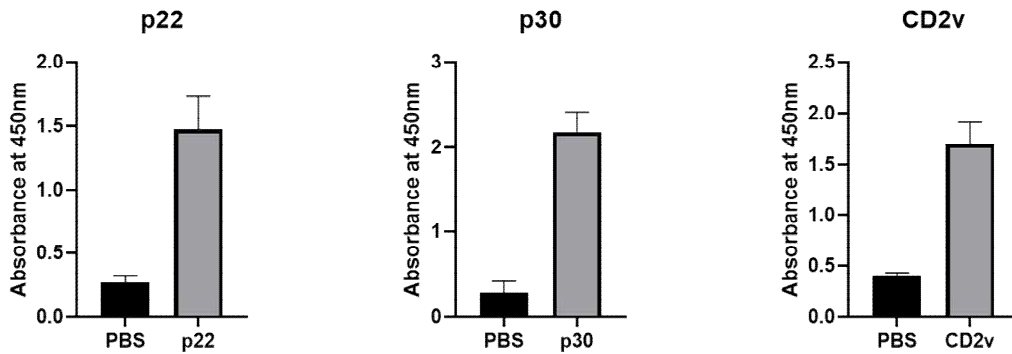
[그림 10] Myc-Tag을 이용한 ASFV 항원단백질 정제 과정

2-1-2. ASFV 항원에 대한 하이브리도마 세포 제작

○ ASFV p22, p30, CD2v 단백질의 마우스 면역화

- 정제하여 준비한 ASFV p22, p30, CD2v 단백질 각각 250 µg씩을 4주령된 암컷 Balb/c 마우스의 복강으로 2주간격 3회 면역화하였음. 2번째 면역화 이후 채혈하여 ELISA를 통해 각각의 항원에 대한 특이항체 생성여부를 확인하였음.

- 각각의 항원단백질(ASFV p22, p30, CD2v)을 immunoplate에 coating 한 후 면역화한 마우스의 혈청을 반응하여 혈청 내 특이 항체의 유무를 확인한 결과 각각의 항원에 대한 특이항체가 생성되고 있음을 확인한 후 3번째 면역화를 수행하였음.



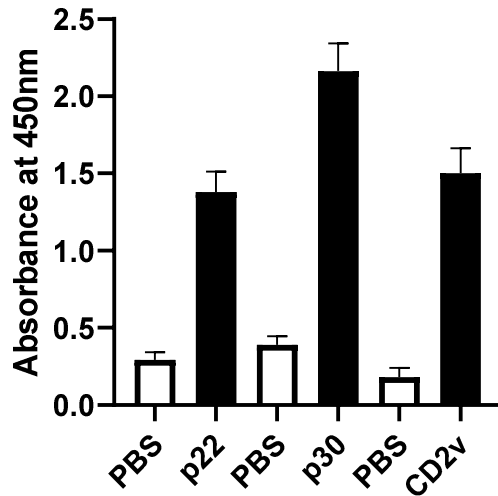
[그림 11] 마우스 2차 면역화 후 혈청내 각각의 항원단백질에 대한 특이항체 생성 확인

○ ASFV p22, p30, CD2v에 대한 polyclonal antibody 확보

- 각각의 항원단백질로 면역화한 마우스에서 채혈한 후 혈청을 분리하여 각각의 항원 단백질에 대한 polyclonal antibody로써 확보함. 확보된 혈청을 이용한 각각의 항원단백질에 대한 ELISA를 수행하여 확보한 polyclonal antibody의 항원특이성을 검증함. (2번째 면역화 후 수행한 ELISA와 동일한 방법으로 수행)

- ELISA 결과를 통하여 확보한 혈청 내 각각의 항원에 대한 특이항체가 생성되었음을 확인한 후 적정한 양으로 분주하여 -80°C에 보관함.

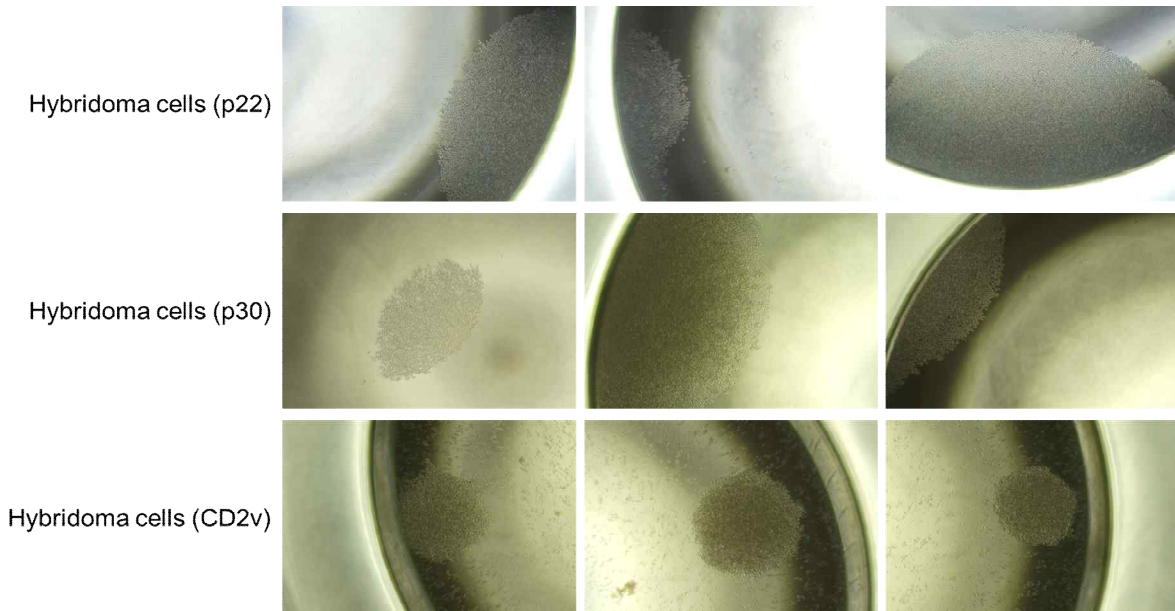
p22, p30, CD2v ELISA



[그림 12] 각각의 항원단백질로 면역화한 마우스의 혈청 내 polyclonal antibody 특이성 검증

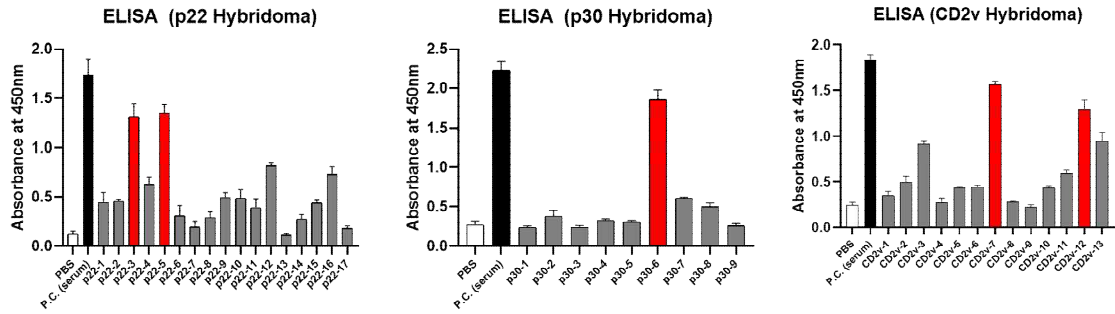
○ ASFV p22, p30, CD2v에 대한 특이항체를 생산하는 하이브리도마 세포 제작

- 각각의 항원단백질로 면역화한 마우스에서 spleen을 harvest 하여 cell strainer를 이용하여 splenocyte를 준비함. Mouse myeloma cell인 Sp2/0 (KCLB No. 21581)을 culture하여 splenocyte와 fusion할 cell로 준비함. PEG를 이용하여 harvest한 splenocyte와 Sp2/0를 fusion 한 후 HAT (hypoxanthine-aminopterin-thymidine)가 포함된 media에서 fusion된 하이브리도마 세포를 선별함. 1~2주간 HAT selection을 통해 선별된 hybridoma 세포의 colony를 확인함.



[그림 13] ASFV 항원단백질 p22, p30, CD2v에 대한 특이항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 colony 형성 확인

- 각각의 항원에 대해 특이적인 monoclonal 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 선별하기 위하여 배양중인 하이브리도마의 배양액을 harvest 하여 ELISA를 수행함.



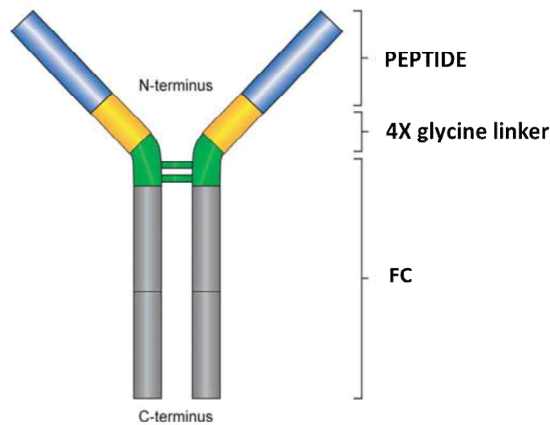
[그림 14] 각각의 항원단백질에 대한 특이항체를 생산하는 최적의 하이브리도마 선별을 위한 ELISA

- 하이브리도마 세포 배양액을 이용한 ELISA 결과를 통하여 각각의 항원에 가장 반응성이 좋은 하이브리도마 세포를 선별 (p22-3, p22-5, p30-6, CD2v-7, CD2v-12) 하고 배양하여 freezing stock을 만들어 보관함.

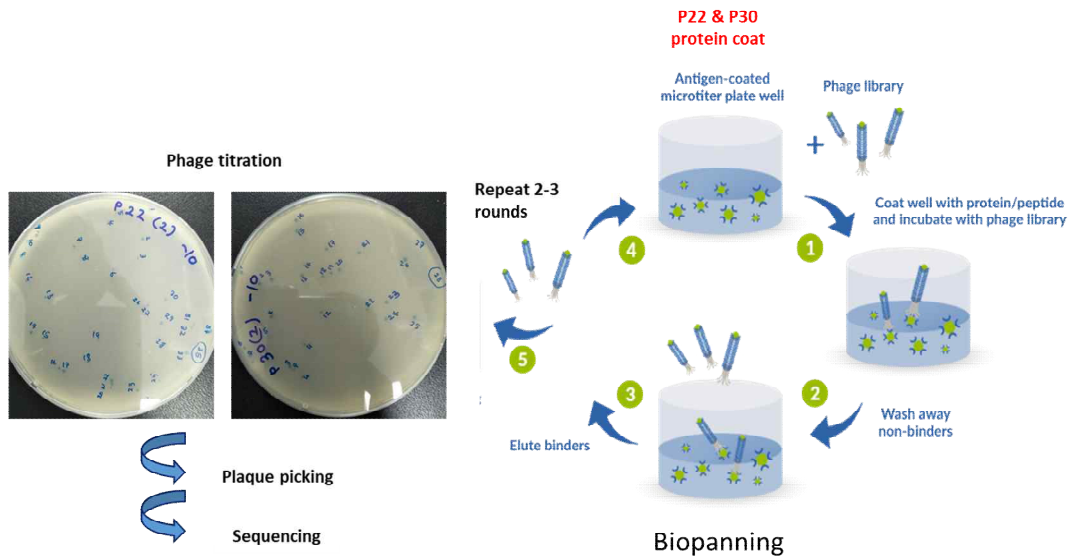
2-1-3. ASFV 항원에 대한 peptibody 제작

○ ASFV p22, p30, CD2v 단백질 특이적 펩타이드 발굴

- Peptibody는 항원에 특이적인 펩타이드와 항체 Fc 영역을 결합시킨 재조합 항체 유사체로써 본 과제에서는 하이브리도마 제작을 통한 진단항체 개발과 peptibody를 통한 진단항체 개발을 동시에 진행하였음.
- Immunoplate에 ASFV p22, p30, CD2v 단백질을 coating 한 후 random phage display libraries (NEB; Ph.D.™ Phage Display Libraries)를 10회 biopanning 하여 각각의 항원 단백질에 특이적으로 결합하는 phage를 선별함.



[그림 15] Peptibody 모식도



[그림 16] ASFV p22, p30, CD2v 단백질에 특이적인 펩타이드를 발굴하기 위한 random phage이용 biopanning

- 각각의 항원에 특이적 결합을 하는 phage를 sequencing 하여 펩타이드 유전자 염기서열을 확인함.

P22 Specific peptides

PEPTIDE no.	Nucleotide & Amino acid seq.
#1	CAGATGGGTTTATGACGAGTCCTAAGCATAGTGTT QMGFMTSPKHSV
#2	GCTATGGGGGTTTCCGATTTGGTGAATGGGCGT AMGGLPYWVNGR
#4	GGTAAGTGGACGGGTATGGTGGTATTTCATGAT GKWTGYGGVIHD
#7	TATCCGGCGGCGTATCATACTTTGACTCGGGACCT YPAAYHTLTREP
#9	ATTTATGCGTCAATCATTCTCATCCGGCTAGTTAT IYASNSHPASY

P30 Specific peptides

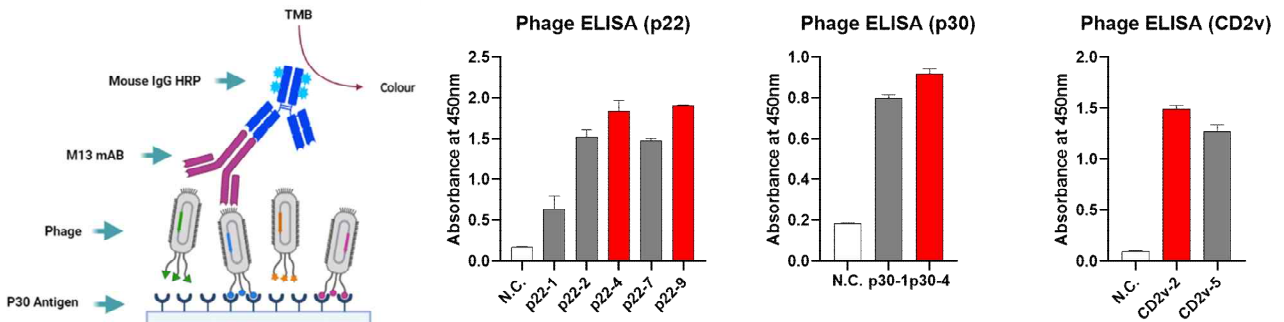
PEPTIDE no.	Nucleotide & Amino acid seq.
#1	GATCATGCTCAGCGTTATGGTCTGGTCATTCTGGT DHAQRYGAGHSG
#4	CAGATGGGTTTATGACGAGTCCTAAGCATAGTGTT QMGFMTSPKHSV

CD2v

PEPTIDE no.	Amino acid seq.
#1	TPPRVPLVLTSGS
#5, #10, #14, #15, #20	TPPRVPLTFFGS #5
#12	TPPRVPLRLLG
#16	TPPRVPLLSPGS
#2, #6, #18	WHFNWYGALSDL #2
#9	WHFNGYGASSE
#11	WHFNGHGATSE
#13	WHFNW-GA-VR
#17	FHWNLWYPSPLL

[그림 17] ASFV p22, p30, CD2v에 특이적인 결합을 하는 펩타이드 아미노산 서열

- 선별된 펩타이드 중 가장 항원 단백질에 강하게 결합하는 펩타이드를 찾기 위해 phage를 이용한 ELISA를 수행함.



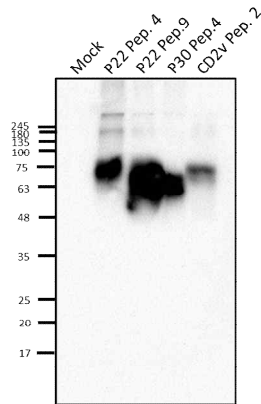
[그림 18] 최적의 항원단백질 결합 펩타이드를 확인하기 위한 phage ELISA

- Phage ELISA를 통해 발굴한 각각의 항원에 특이적인 결합을 하는 펩타이드 유전자와 마우스 항체 Fc영역 유전자를 연결하여 peptibody 발현을 위한 eukaryotic expression vector를 구축함.



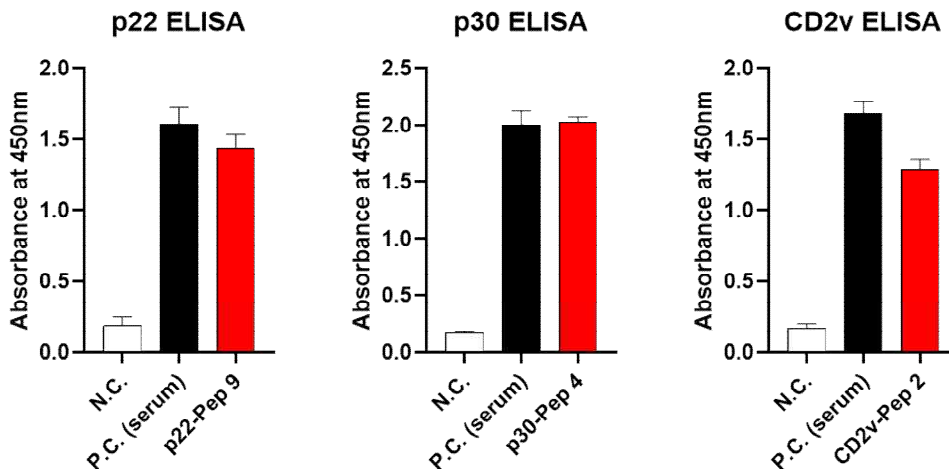
[그림 19] 항원단백질 특이적인 peptibody를 발현하기 위한 동물세포 발현 벡터 expression cassette

- 구축된 pcDNA3.1(-)Myc-HIS/p22/Pep-Fc (#4 and #9), pcDNA3.1(-)Myc-HIS /p30/Pep-Fc (#4), pcDNA3.1(-)Myc-HIS/CD2v/Pep-Fc (#2)를 CHO cell에 transfection 하고 72시간 후 배양액을 harvest 하여 peptibody의 발현을 western blotting을 통해 확인함.



[그림 20] ASFV p22, p30, CD2v 각각에 특이적인 peptibody의 발현 확인

- 발현한 각각의 peptibody의 항원 특이성을 확인하기 위하여 peptibody를 이용한 ELISA를 수행함.
 - 각각의 항원단백질과 peptibody를 이용한 ELISA를 통하여 생산한 peptibody가 각각의 항원에 특이적으로 결합함을 확인하였음.



[그림 21] ASFV p22, p30, CD2v 각각에 특이적인 peptibody의 항원단백질에 대한 특이성 확인

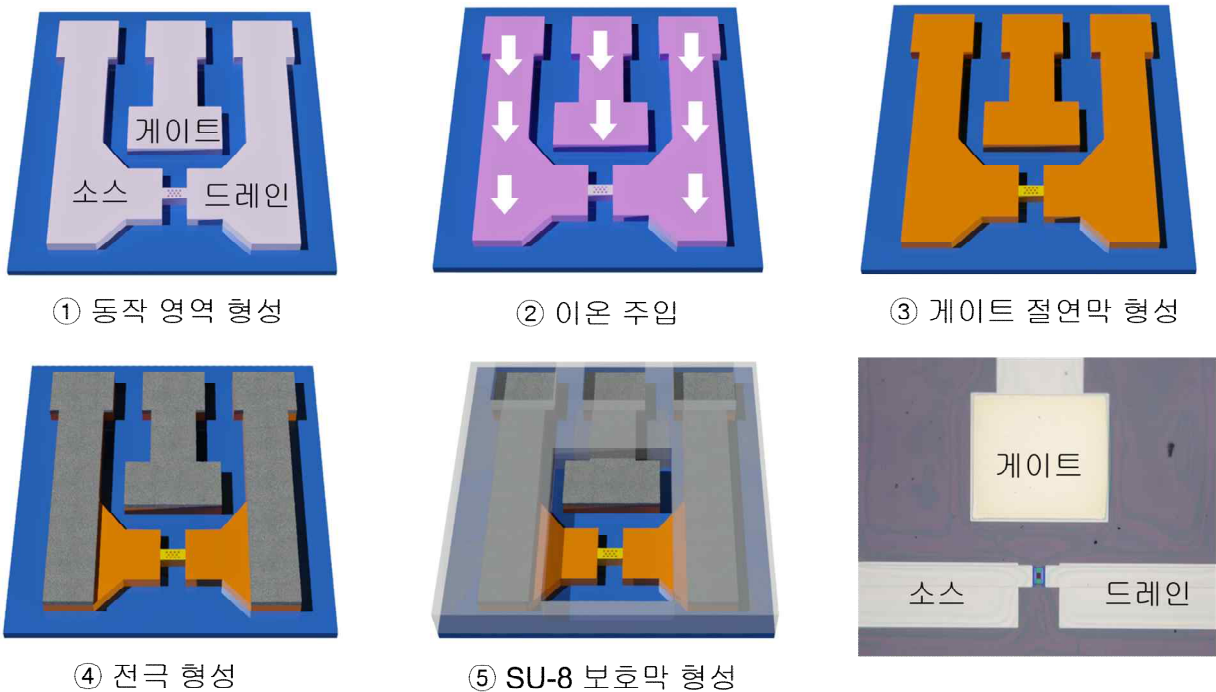
2-2. ASFV 진단용 소자 개발

2-2-1. 전계효과트랜지스터(Field-Effect Transistor, FET) 바이오 소자 양산 공정

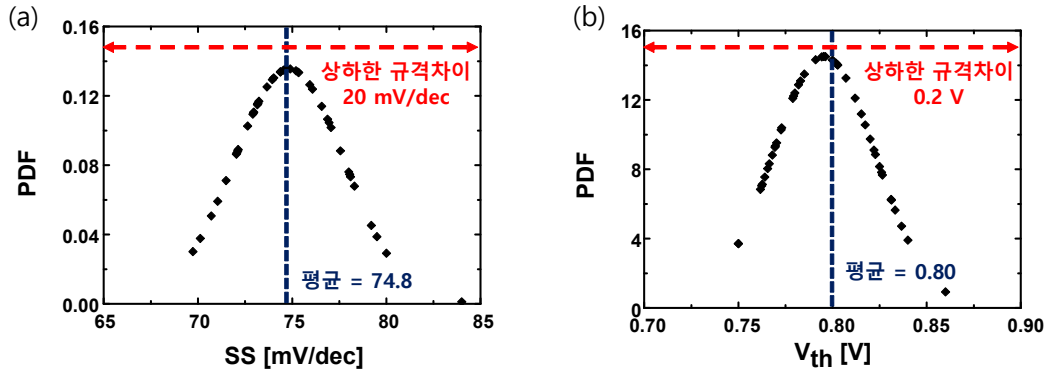
○ 8인치웨이퍼 제작공정 개발

- 바이오 FET 소자의 8인치 양산 공정을 최적화하고 저비용 공정을 확보함. 기존 이온주입을 위해 날장으로 진행되는 산화막 증착 공정은 열산화막 형성 방식으로 대체하였고, 열산화막 형성 과정은 100 나노급 나노선을 thinning하는 과정과 동일하므로 나노선 형성 공정과 이온주입 전처리 공정을 일원화하였음. 주요 공정으로 thinning, active region formation, S/D ion implantation, gate oxidation, metallization, passivation 등이 있음. 간략한 공정 과정을 아래에 기술함.

- Thinning: Furnace의 thermal oxidation을 통해 SOI wafer의 top si을 100 nm 이하로 thinning 함.
- Active formation: Scanner 장비를 이용해 source, drain 영역과 나노그물 채널 영역을 패터닝하고 건식 식각을 통해 형성함.
- Gate formation: Thermal oxidation으로 건식 식각 과정에서 채널에 발생한 손상을 없애주고(sacrificial oxidation), 동시에 나노그물 두께를 100 nm 이하로 thinning함.
- Ion Implantation: Photoresistor (PR)를 이용하여 channel 영역을 마스크킹하고 source와 drain에 이온 주입함.
- Gate oxidation: Furnace의 thermal oxidation을 통해 gate oxide 5 nm를 형성함.
- Passivation: SU-8으로 contact pad와 channel, 그리고 게이트 전극 영역을 제외한 영역에 보호막 형성.



[그림 22] 바이오 FET 소자 제작공정 과정



[그림 23] 바이오 FET 소자의 SS 및 Vth 분포

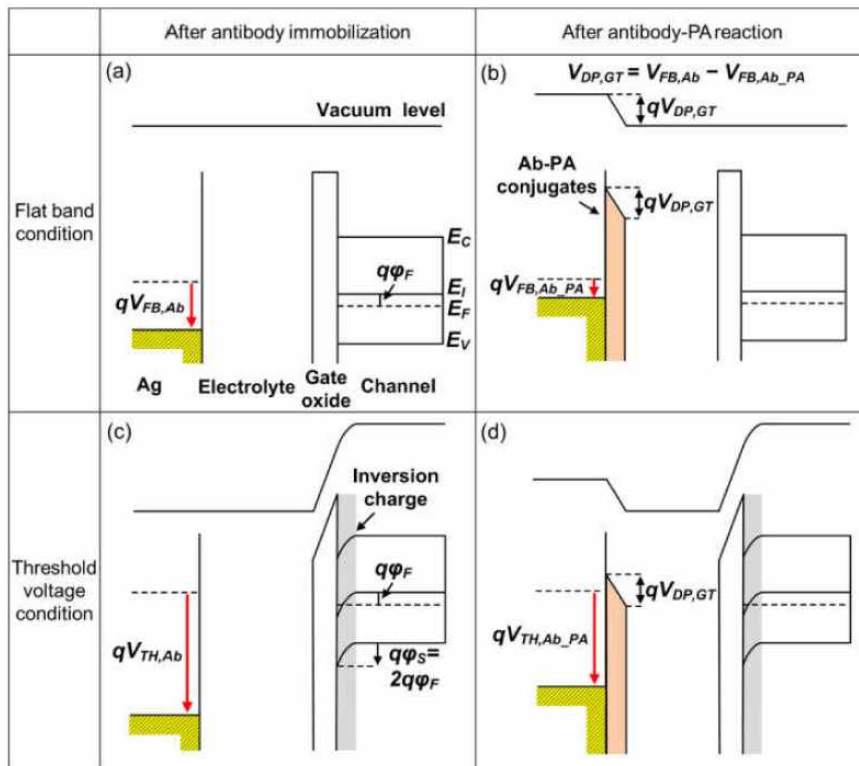
Parameter	Mean	Std.	Cp	Cpk
SS (mV/dec)	74.8	3.93	1.13 (2급)	1.15 (2급)
V _{th} (V) @ I _d = 10 ⁻⁶ A	0.80	0.031	1.16 (2급)	1.19 (2급)

[표 1] 바이오 FET 소자의 양산 공정능력 지수

- 개발된 공정 기술의 양산성을 평가하기 위하여 제작된 바이오 FET 소자 양산 공정에 대해서 문턱전압이하스윙(SS) 및 문턱 전압(Vth)을 기준으로 공정능력 지수(Cp, Cpk)를 산출하였음. SS는 평균값 74.8 mV/dec, 표준편차 3.93 mV/dec를 가졌음.
- Vth는 전류 레벨 10⁻⁶ A 수준에서 도출하였으며, 평균값 0.80 V, 표준편차 0.031 V를 가짐.
- SS의 경우 상한 85 mV/dec, 하한 65 mV/dec, 상하한 규격차이 20 mV/dec로 설정하고, Vth의 경우 상한 0.9 V, 하한 0.7 V, 상하한 규격차이 0.2 V로 설정하여 평가를 진행함.
- 개발된 제조공정의 양산성 정도를 평가하기 위해 공정능력지수를 산출함. Cp는 공정의 중심값을 규격의 중심값으로 가정하고 산포정도를 비교한 값이고, Cpk는 치우침 정도를 고려한 값으로 1등급은 충분, 2등급은 만족, 3등급은 불만족 등으로 구별됨.
- SS 기준으로 공정능력 지수 산출 결과 Cp=1.13, Cpk=1.15을 얻었고, Vth 기준으로 공정능력 지수 산출 결과 Cp=1.16, Cpk=1.19을 얻었으며, 두 가지 기준에서 Cp와 Cpk 모두 1.00 초과 1.33 이하의 값으로 2급 공정능력 수준을 달성하였음.

○ 전해질-게이트 소자(Electrolyte-Gate Transistor) 동작원리

- 기존 바이오 FET 소자는 나노그물(nanonet) 채널에 receptor를 고정시키고 Ag/AgCl reference electrode를 통해 채널에 bias를 인가시켜 채널에 붙은 target의 charge를 감지하는 방식이었음.
- 본 연구에서는 채널면적에 비해 500 ~ 1000배 더 큰 면적을 갖는 게이트 전극에 특이적 감지물질(receptor)을 고정하고 전해질을 통해 bias를 가해주는 전해질-게이트(Electrolyte-Gated) 방식을 개발하였음. 게이트 전극상에 감지물질과 결합하는 표적물질(target 또는 analyte)은 dipole을 형성하고, 이는 채널 문턱 전압의 차이를 발생시킴.



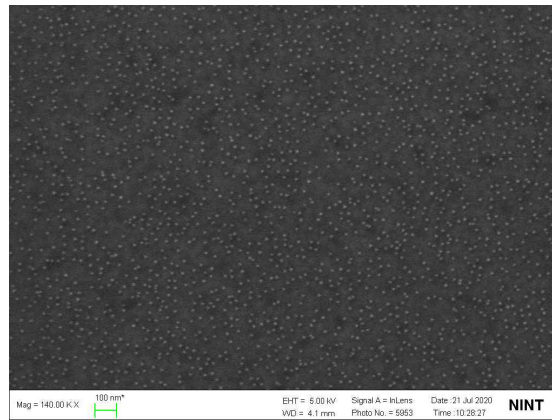
[그림 24] EGT 검출 원리

- 이후에 소개할 바이오 진단 실험들 결과에서 확인할 수 있는데, 기존 방식처럼 나노 그물 채널에만 인플루엔자 바이러스(H1N1)의 항체를 고정시키고 인플루엔자 바이러스(H1N1)를 검출한 실험의 경우엔 전압 민감도가 최고 15 mV 로 나타났음. 반면, 게이트전극에 감지물질을 부착한 EGT 이용하여 땅콩 알레르겐, SARS-CoV-2, Urea 검출실험 등의 경우엔 100 mV 이상의 높은 출력전압을 나타냈음.

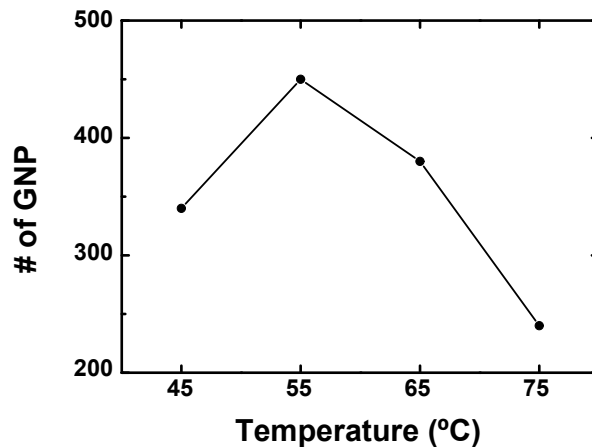
○ 항체 표면개질화 공정 개발

- 게이트 전극과 나노그물 채널 표면에 receptor를 부착하기 위한 표면처리 기술.
 - O2 plasma 전처리를 이용해 표면처리 효율을 증가시킴.
 - 아민기(NH2)를 형성하는 APTES 처리 단계에서, 기존의 일반적인 liquid 방식이 아닌 vapor 방식을 적용하여 APTES의 균일도 향상 및 처리 밀도 증가.
 - 금 나노입자가 결합된 항원을 이용한 표면처리 공정 검증.
- UV expose 전처리: UV expose 처리 시간에 따른 표면처리 효율을 분석함. 일련의 표면처리 과정을 통해 금 나노입자가 결합된 항원을 부착하고, 주사전자현미경(SEM)을 통해 관찰하였음. 30초, 60초, 90초, 120초 4개 조건에서 처리를 진행한 결과 처리 시간이 길수록 효율이 증가하나, 120초 이상에서는 FET 소자 특성(SS)에 열화가 발생해 최종적으로 90초 조건을 선택함.
- APTES Vapour 처리: 아민기(-NH2)를 형성하는 APTES 처리 단계에서, 기존의 일반적인 liquid 방식이 아닌 vapor 방식을 적용하여 APTES의 균일도 향상 및 처리 밀도 증가를 확인함.
- Vapor APTES 처리 온도에 따른 표면처리 효율을 관찰하고, 최적의 조건을 선택함. 일련의 표면처리 과정을 통해 금 나노입자가 결합된 항원을 부착하고, 주사전자현미경(SEM)을 통해 관찰함. $1\mu m \times 1\mu m$ 단위 면적 안의 금 나노입자의 개수를 비교하였음. 45, 55, 65, 75 °C 4 개 조건에서 처리를 진행한 결과, 55 °C 에서 가장 높은

효율을 보임. (≈ 450 개/ $1\mu\text{m}^2$)



[그림 25] 금 나노입자가 결합된 항원을 부착한 SEM 사진



[그림 26] Vapor 처리 온도에 따른 금 나노입자 갯수

- 최종적으로 항체와 반응할 알데하이드기(-CHO) 형성을 위해 아민기(-NH₂)에 glutaraldehyde(GA)를 반응시킴. 1XPBS를 base로 2.5%의 GA 용액을 상온에서 1시간 30분 동안 반응시켰으며, 균일도 향상을 위해 소자를 soak 하는 방식을 택함.

2-2-2. 소자 검출 성능 검증 및 개선을 위한 바이오진단 테스트

○ 다양한 바이오물질에 대한 진단 결과 요약

- 본 연구단이 개발한 바이오 FET 소자의 검출 능력을 검증하기 위한 기초 실험으로 인플루엔자 바이러스 (H1N1), 땅콩 알레르겐, SARS-CoV-2, urea 검출을 진행함.
- 게이트 면적을 활용한 EGT에서 상대적으로 높은 출력을 기록하였으며, 최고 100 mV 가량의 높은 민감도를 나타냈음.
- Receptor의 경우 10 nm 이하의 크기를 가질수록 효과적이어서, 항체의 Fab를 사용해 검출한 땅콩 알레르겐과 aptamer를 이용해 검출한 SARS-CoV-2 는 수 십 pg/mL 이하의 낮은 검출 한계를 가졌음.

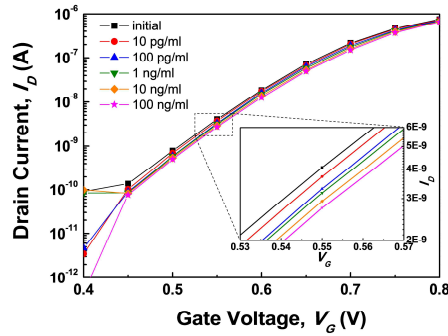
○ 인플루엔자 바이러스 (H1N1) 검출

- 채널 위에만 감지물질을 부착한 기존 AgCl/Ag 소자구조를 이용함. 출력전압의 변화가 40 mV 이하로 작게 나타남. 출력전류를 이용한 민감도를 산출함.
- 바이오 FET의 나노그물 채널에 APTES, Glutaraldehyde(GA) 등의 일련의 표면처

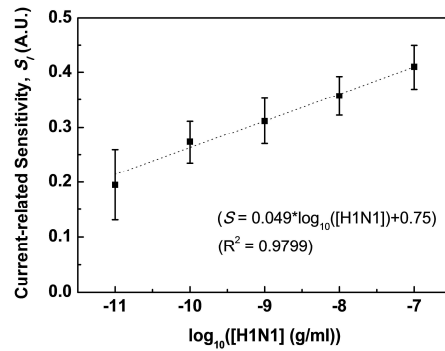
리 과정을 통하여 인플루엔자 항체를 고정하여 인플루엔자 바이러스를 검출함.

- 인플루엔자 바이러스의 pI = 5.4 이므로 0.01X PBS buffer 용액 내에서는 negative 전하를 가짐. 이에 따라 소자의 특성 곡선은 전류가 줄어드는 방향인 오른쪽으로 이동함.

- 아래는 바이러스의 농도에 따른 BioFET 특성 곡선의 변화를 나타냄. 10 pg/ml - 100 ng/ml 의 인플루엔자 A를 20분간 반응시킨 후 변화를 관찰하였음.



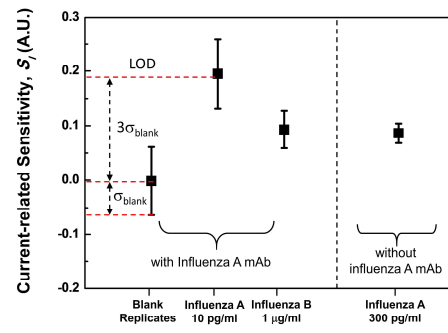
[그림 27] 인플루엔자 바이러스 농도에 따른 소자의 특성 곡선 변화



[그림 28] 인플루엔자 바이러스 농도에 따른 전류민감도

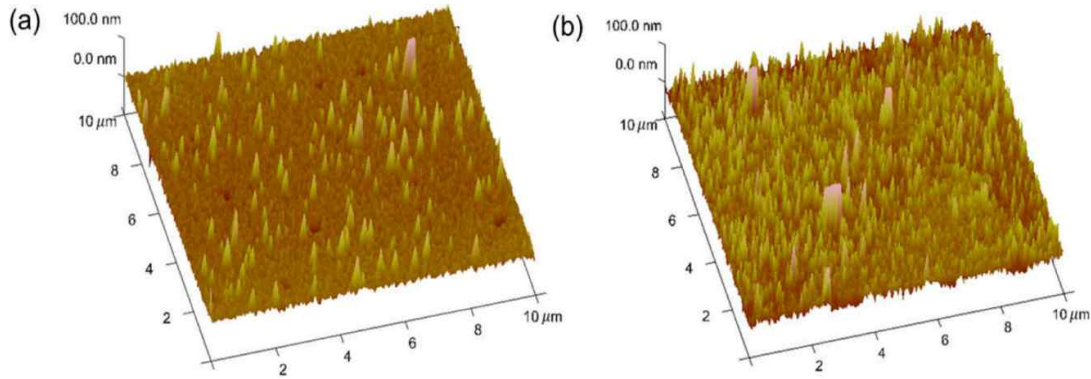
- 선택도 비교검증을 위해 인플루엔자 항체를 고정하지 않은 바이오 FET의 인플루엔자 A에 대한 특성 곡선의 반응과 인플루엔자 B에 대한 반응을 비교해봄. 또한, 3-sigma 방법을 이용하여 검출한계를 설정하기 위하여 인플루엔자 A가 포함되지 않은 blank replicate 샘플에 대한 특성 곡선 변화도 확보함.

- ◆ 항체를 고정하지 않은 소자에서는 높은 농도의 인플루엔자 A에 대해서도 낮은 전류 민감도를 나타냄.
- ◆ 선택도 특성 확인을 위하여 인플루엔자 B에 대한 검출을 수행한 결과, 높은 농도임에도 불구하고 낮은 전류 민감도를 나타냄.
- ◆ 검출한계는 blank replicate를 이용한 민감도의 표준편차의 3배에 해당하는 민감도를 가지는 농도임. 이번 실험에서는 10 pg/ml의 우수한 검출한계를 확보.



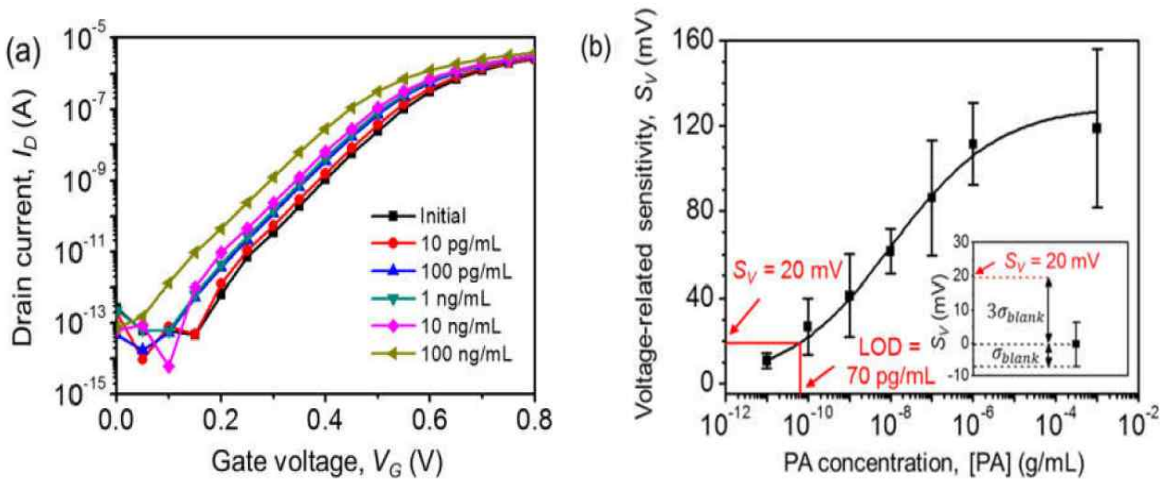
[그림 29] 인플루엔자 바이러스의 선택도, 검출한계 실험 결과

○ 땅콩 알레르겐 검출



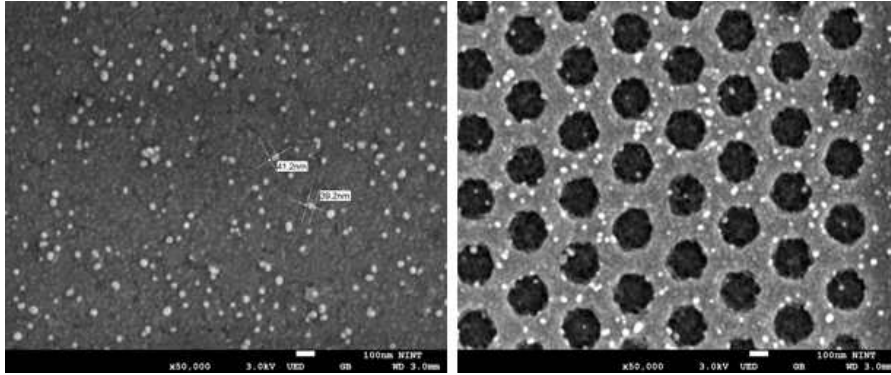
[그림 30] Ag 전극에 Fab를 결합하기 전(a), 후(b) AFM 사진

- EGT로 땅콩 알레르겐의 원인이 되는 항원인 땅콩 알레르겐을 검출함. EGT의 Ag 전극에 땅콩 알레르겐과 특이적으로 결합하는 단클론 항체의 항원결합부위(Fab)를 고정함.
- Fab는 항체에 비해 크기가 작아 항체에 결합하는 타겟 물질이 검출 가능 거리 (debye length)안에 들어올 확률이 높아 검출에 유리함.
- APTES와 glutaraldehyde로 이어지는 일련의 표면처리 과정을 통해 Ag 전극에 Fab를 결합하고 AFM을 통해 성공적으로 고정되었음을 확인하였음.
- 10 pg/mL - 100 ng/mL의 땅콩 알레르겐을 20분간 반응시키고 변화를 관찰함. 땅콩 알레르겐의 농도가 높아질수록 특성 곡선이 왼쪽으로 이동하였음. 최고 농도에서는 약 100 mV 이상의 커다란 변화가 발생하였으며, 이는 채널의 수백 배 이상의 면적을 가지는 전극을 통해 검출하는 EGT로 인한 효과임.
- 검출 한계(limit of detection, LOD)는 3-sigma 방법을 이용해 계산함. 즉 땅콩 알레르겐 농도에 따른 민감도 그래프와 blank replicate 샘플에 대한 신호를 바탕으로 검출 한계를 구하였음.
- 계산된 검출 한계는 70 pg/mL로 기존 연구들에 비해 10배 이상 낮은 값을 나타냄.



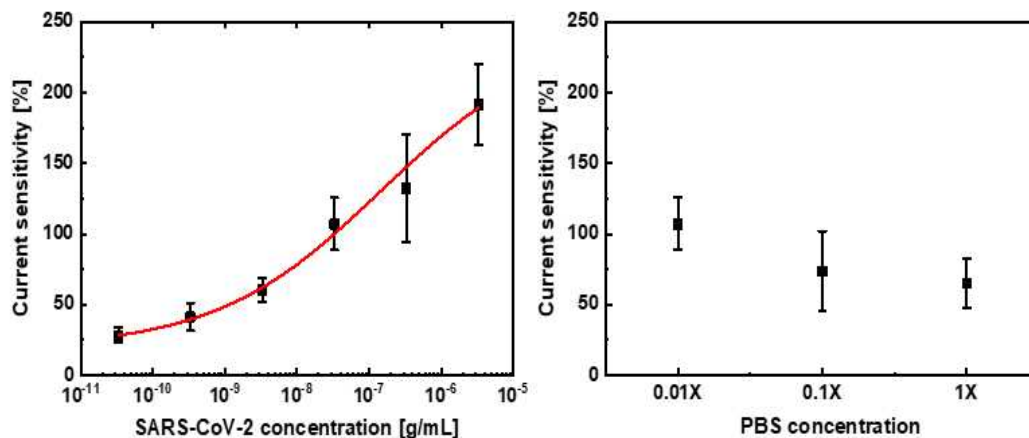
[그림 31] 땅콩 알레르겐 농도에 따른 소자의 특성 곡선 변화(a) 및 민감도(b)

○ SARS-CoV-2 검출



[그림 32] 금 나노입자가 전극과 채널에 부착된 SEM 사진

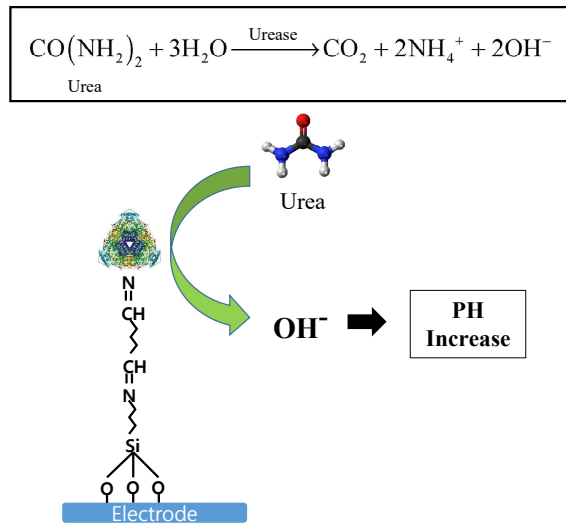
- EGT로 인간 몸의 수용체에 달라 붙는 SARS-CoV-2의 spike protein을 검출함. 일반적으로 사용되는 항체에 비해 5~6배 정도 크기가 작고 화학적으로 결합이 가능한 aptamer를 receptor로 활용하였으며, receptor의 사이즈가 작아 높은 민감도를 기대할 수 있음.
- EGT의 전극에 APTES, GA의 일련의 표면처리를 통해 aptamer를 부착함. aptamer에 40nm 사이즈의 금 나노입자를 부착하고 전자현미경을 통해 성공적으로 고정되었음을 확인함.
- 300pg/mL - 3μg/mL의 SARS-CoV-2 검출을 진행함. SARS-CoV-2 농도가 높아질수록 전류가 증가 하였음. 3-sigma 방법을 이용하여 검출 한계를 추출 해본 결과, 900fg/mL의 낮은 검출 한계를 가졌음.
- 버퍼의 농도에 따른 전류 민감도의 변화를 비교해본 결과, 버퍼 농도가 커져도 비슷한 수준의 신호를 감지하였음. 이는 aptamer의 사이즈가 작기 때문에 디바이 스크리닝 현상(debye screening effect)이 완화되었기 때문임.



[그림 33] SARS-CoV-2 spike protein 농도에 따른 전류 민감도, PBS buffer 용액의 농도에 따른 전류 민감도

○ Urea 검출

- 포유류의 단백질 대사 최종 산물인 urea를 검출함. EGT 전극 표면에 APTES, Glutaraldehyde 처리를 통해 urease를 고정함. Urease는 촉매 작용을 통해 urea를 분해시켜 OH⁻ 이온을 발생시키기 때문에, 그로 인한 pH 변화를 EGT로 감지할 수 있음.

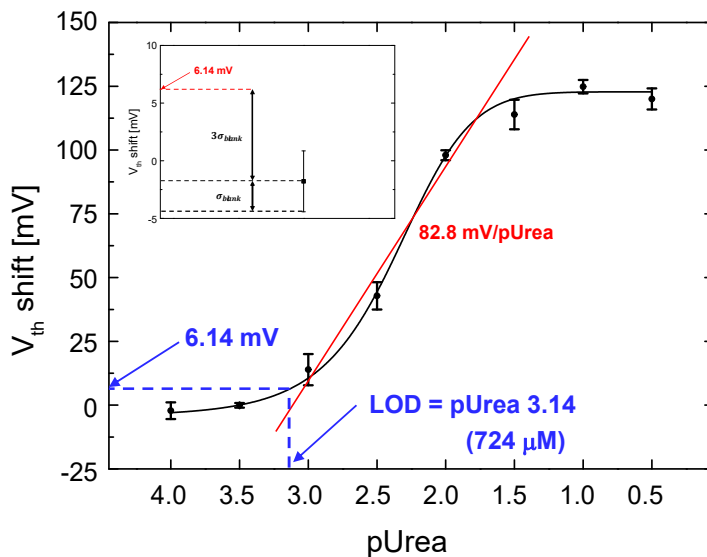


[그림 34] Urea 검출 원리

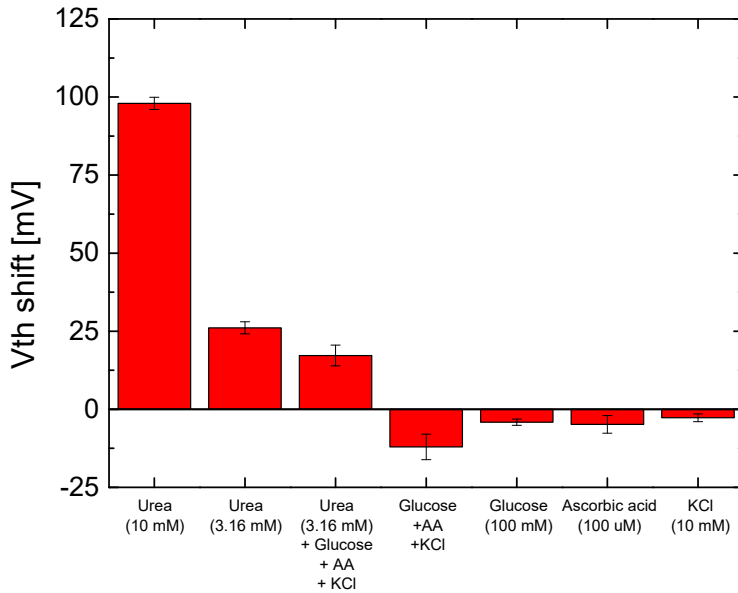
- 이는 앞선 인플루엔자, 땅콩 알레르겐, SARS-CoV-2 검출에서 target의 charge를 직접 검출하는 것과는 달리 바이오 반응으로 인한 주변 환경의 변화를 감지하는 방법임.

- pUrea 4 ~ 0.5 (0.1 mM ~ 333 mM) 의 urea에 대한 검출을 진행함. Urease를 고정화 EGT에 15분간 urea를 반응시키고 변화를 관찰하였음. 결과는 pUrea 1.72 ~ 2.95 범위에서 linear range를 가졌으며, 이 구간에서 82.8 mV/pUrea의 높은 민감도를 보임.

- 이 linear range는 인체 내의 urea 농도 범위인 pUrea 2.1 ~ 2.6 를 충분히 아우르기 때문에, EGT를 사람 몸의 urea 검출에 사용 가능함을 알 수 있음. 또한 3-sigma 방법을 이용해 얻은 검출 한계는 pUrea 3.14 (724 μM)로 인체 내의 urea 농도 범위 보다 10배 가량 낮았음.



[그림 35] Urea 농도에 따른 전압 민감도



[그림 36] 혈액 내에 존재하는 다른 물질들과 urea 간의 신호 비교

- 인체의 혈액 내에 있는 urea를 검출 가능하다는 것을 확인하기 위해, 혈액에 존재하는 방해물질에 대한 신호와, 그 물질들 사이에서 urea를 검출해낼 수 있다는 것을 보였음.

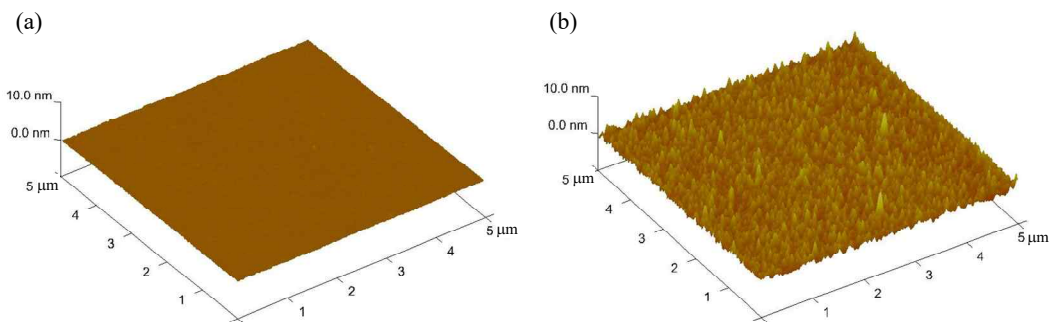
- Glucose, ascorbic acid, Cl⁻ 이온과 같이 일반적으로 혈액에 들어있는 물질들에 대한 신호를 관찰한 결과, urea의 신호와 반대 방향으로 10 mV 이하의 미약한 신호만 보였음.

- Glucose, ascorbic acid, Cl⁻ 을 모두 섞은 용액에 대해서도 마찬가지로 urea 반대 방향의 10mV 정도의 신호만 보임. 또한 Glucose, ascorbic acid, Cl⁻ 혼합 용액에 들어있는 urea와, urea만 들어있는 용액 간의 신호를 비교해본 결과 거의 유사한 신호를 가졌기 때문에, 혈액 내의 urea에 대한 검출 가능성을 보임.

2-2-3. ASF 바이러스 검출

- 표면개질화 처리: EGT 표면에 증남대에서 제공받은 진단용 단클론 ASFV 항체를 화학적으로 고정하고 AFM을 통해 항체고정을 검증함.

- UV expose : UV expose를 통해 표면을 활성화함. 90초간 처리.
- APTES vapour: APTES 증기방식으로 아민기(-NH₂)를 형성함. 55 °C 에서 5분간 예열 후 1분간 반응.
- Glutaraldehyde(GA) : 항체와 반응할 알데하이드기(-CHO)를 형성함. 상온에서 2.5% GA에 1시간 30분 동안 반응.
- AFM 검증: EGT 표면에 진단용 ASFV 항체를 소자 당 10 ul 씩 drop 하여 overnight 으로 처리. 처리하는 동안 항체가 손상되는 것을 막기 위해 4 °C에서 반응시킴. 또한 밤새 용액이 마르는 걸 방지하기 위해 petri dish에 DIW로 적신 와이퍼와 소자를 같이 넣어 수분을 유지함.



[그림 37] SiO₂ 기판에 ASFV 항체를 고정하기 전(a), 후(b) AFM 사진

Parameter	ASFV 항체 고정 전	ASFV 항체 고정 후
Max roughness (R_{max})	1.25 nm	8.23 nm
Average roughness (R_a)	0.0872 nm	1.25 nm

[표 2] ASFV 항체 고정 전·후 AFM을 통한 roughness 비교

- EGT를 이용해 ASF 바이러스 검출을 진행함. 그 조건 및 과정은 다음과 같음.

- EGT 전류전압 곡선 측정 bias 조건
 - 드레인 전압(V_D) = 0.1 V
 - 소스 전압(V_S) = 0 V
 - 바디 전압(V_B) = 0 V
 - 게이트 전압(V_G) = 0 ~ 1 V
- ASFV 단클론 항체를 고정한 EGT 위에 0.01 X PBS 용액을 drop하고 초기 전류전압 곡선을 얻음.
- DIW, N₂ blowing을 통해 씻어냄.
- EGT에 100 ng/mL ~ 1 mg/mL 농도의 진단용 ASFV 항원 drop 하여 상온에서 20분간 반응.
- 1 X PBS, DIW, N₂ blowing을 통해 씻어냄.
- 다시 0.01 X PBS 용액을 drop하고 전류전압 곡선을 얻음.
- 반응 전·후 전류전압 곡선의 문턱 전압(V_{th})을 추출하여 차이를 비교함.

- EGT에 다클론 항체를 고정하고 ASFV 항원 검출 실험을 진행하였음. 양성 시료와

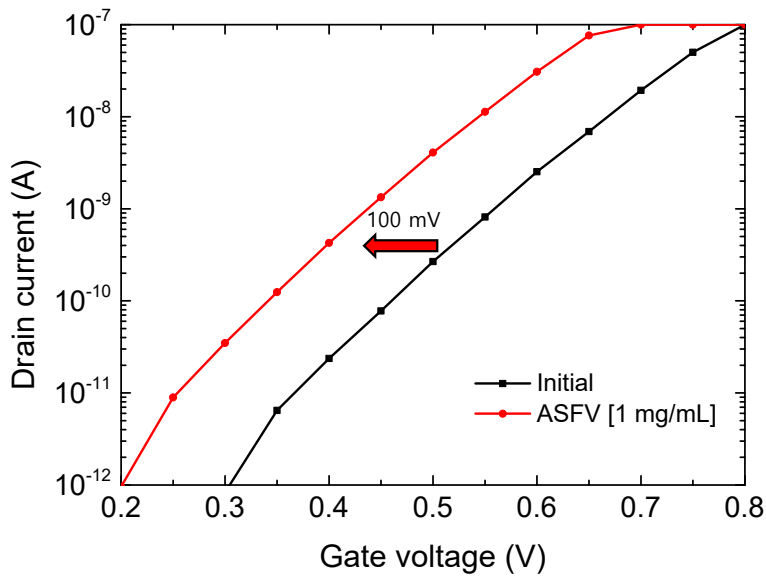
음성 시료간의 신호 차이는 평균 10 mV 이내로 매우 적게 나타남. 이는 ASFV 다클론 항체 용액에 포함된 다른 단백질들이 EGT 표면에 ASFV 항체 대신 달라 붙어 ASFV 항원과의 반응을 방해했기 때문으로 사료됨. 따라서 정제된 ASFV 단클론 항체를 EGT 표면에 고정하고 실험을 진행함.

- ASFV 단클론 항체를 EGT 표면에 고정하고 ASFV 항원을 반응 시킨 결과, 최고 농도에서 약 100 mV의 큰 신호가 발생하였고, 항원 농도가 10배 변할 때 마다 약 18 mV의 변화폭이 있었음 ($18 \text{ mV/pC}_{\text{ASFV}}$).

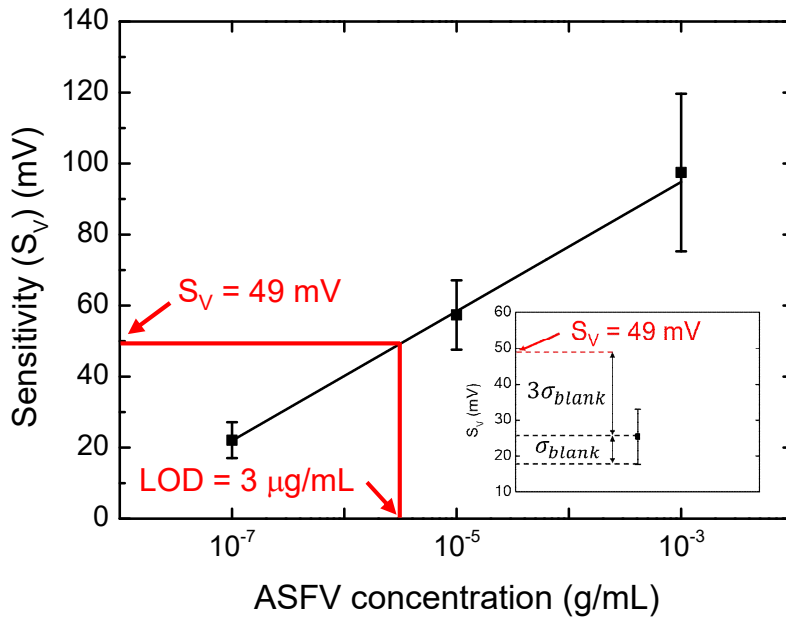
- ASFV 항원이 포함되지 않은 음성 시료의 경우 평균 25 mV의 변화폭에 8 mV의 표준편차를 가짐(그림 39, inset). 음성 시료 신호에 대한 표준편차의 3배 이상의 신호를 내는 ASFV 양성 시료의 농도를 우리 센서의 검출 한계로 정의하였으며(3-sigma method), 이를 ASFV 농도에 따른 민감도 그래프에서 추출한 결과 3 ug/mL의 검출 한계를 얻었음(그림 39).

- 본 실험은 PBS 버퍼 환경에서 진행되었으나, 추후 tris buffer, glycine buffer 등 다양한 버퍼 조건에서도 ASFV 검출이 가능한지 검증할 계획이며, 최종적으로는 혈액 내의 ASFV에 대한 검출 임상 실험을 진행할 예정임.

- 본 센서의 ASFV 검출 한계는 3 ug/mL로 기존 크로마토그래피 방식의 신속진단키트보다 우수하나, 현 단계에서 ASFV 야의 샘플에 대한 접근이 불가하여 실제 바이러스에 대한 민감도와 특이도 평가를 수행하지 못하였음. 추후 임상 실험을 통해 ASFV 샘플의 민감도 및 특이도 평가를 진행할 계획임.



[그림 38] 1 mg/mL ASFV에 노출된 경우 센서 전류전압 곡선 변화



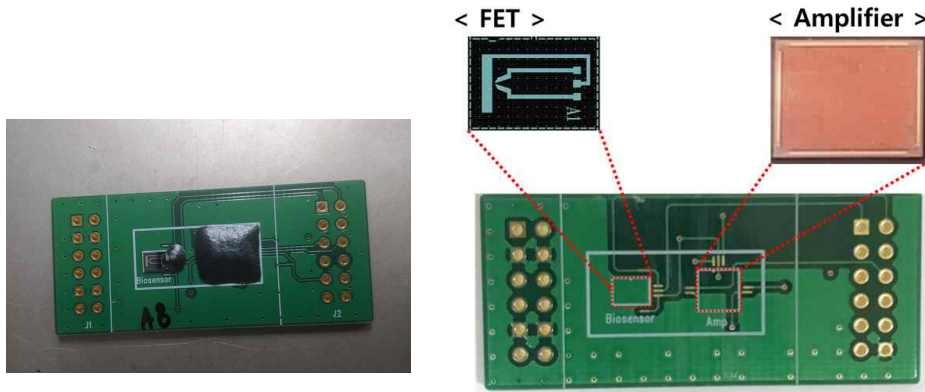
[그림 39] ASFV 농도에 따른 민감도 및 검출 한계

2-3. ASFV 진단용 스트립 및 진단기기 시작품 제작

2-3-1. ASFV 진단기기 시작품 개발

○ 일회용 스트립 공정 개발

- 소자와 스트립을 부착하여 스트립 구조체를 제작함. 스트립은 바이오 FET와 Amplifier로 구성되며, epoxy로 molding된 일회용 스트립 공정을 개발함.
- PCB 기판과 FET, Amplifier 각각은 wire bonding을 통하여 전기적으로 연결되며, epoxy molding을 통하여 고정됨. 리더기와의 연결을 통한 전기적 특성평가를 통하여 제작된 스트립의 안정성을 평가함.



[그림 40] 스트립 구조체 사진

○ Linear Array Sensor를 이용한 POCT 진단기기 개발]

- 선정된 Linear CCD Sensor는 Sony사의 ILX511과 554B로 Pixel크기는 14umX200um (54um) 이며, 2048의 Pixel을 가지고 있어 실시간 동시 측정이 가능함. Linear CCD Sensor의 신호 획득, Touch LCD를 이용한 구동, USB통신 및 LED 제어를 위한 전자보드의 회로 설계, PCB 제작 및 구동을 위한 FW 및 SW를 개발함.

 <p>테스트용 스트립 홀더 (1차/2차)</p>	 <p>테스트용 광학계</p>
 <p>Time Series 측정용 기구 설계 파일</p>	 <p>Time Series 측정 HW/SW</p>
 <p>센서 보드</p>	 <p>제어보드</p>
 <p>진단기기 상부 (LCD 및 LCD 제어보드)</p>	 <p>진단기기 하부 (광학계, 제어보드, 홀더)</p>
 <p>화학발광진단기기 프로그램 테스트</p>	 <p>화학발광진단기기 시제품 모습</p>

[그림 41] 진단기기 부품 및 시제품 사진

- 신호의 검출을 위해 카메라 렌즈, 밴드패스 필터, 센서 장착 및 스트립 로딩을 위한 광학부와 스트립 홀더 등을 제작 및 최적화하여 테스트를 진행함. 광학부, 스트립 홀더 등과 연계된 시제품의 케이스를 설계 및 제작하여 진단기기개발을 완료하여 테스트를 진행함.

- 진단기기의 상품성 및 편리성을 높이기 위해 신규 디자인을 적용한 시제품을 설계 및 제작하였고, 구동 및 운영 프로그램을 완성하였음. 선정된 Linear CCD Sensor를 이용할 시 신호의 동시 측정은 가능하였으나 민감도의 개선 필요성에 의해 2고감도 센서를 선정하여 민감도 개선을 완성함.



개발 진단기기 설정 창 모습

개발 진단기기 측정 모습

[그림 42] 시제품 측정 테스트

○ IoT 구현

- 데이터의 전송 방법을 USB 메모리, 블루투스 통신 방법으로 구현하였음. 아래의 그림은 무선 블루투스 통신 방법을 통해 데이터를 스마트폰으로 전송하여 확인할 수 있는 실험 결과를 보여주는 데이터로, 장비와 스마트폰 간의 IoT구현을 통해 데이터 확인이 가능한 기능을 구현함.



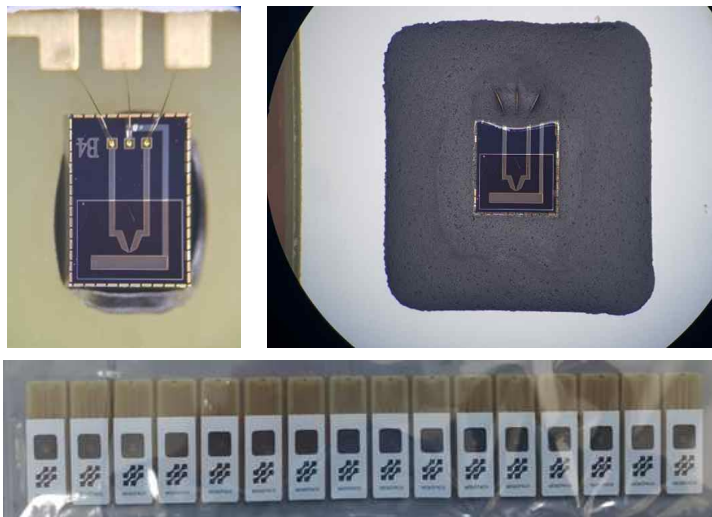
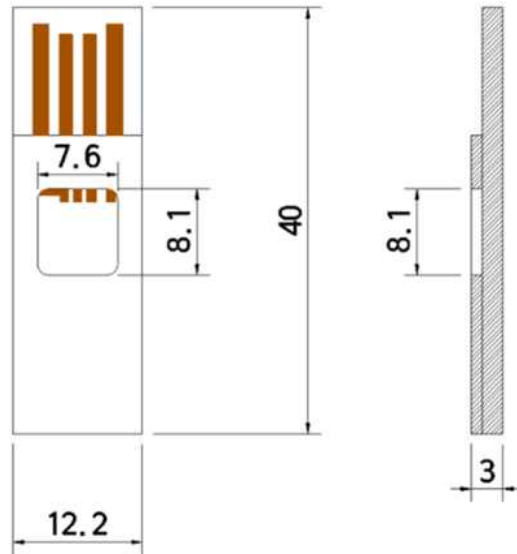
[그림 43] 블루투스 통신을 통한 데이터 전송 및 확인

2-3-2. ASFV 진단용 휴대용 진단시스템 개발

○ 일회용스트립 제작공정 개발

- EGT소자가 부착되고 리더기와 연결 가능한 USB 타입 일회용 스트립을 제작하였음. 스트립 제작 과정에서 발생할 수 있는 오염 및 전극의 산화를 방지하기 위해, EGT의 채널 및 전극을 ma-P 1240 photoresist(PR)로 보호 후 작업을 진행함. 공정 과정은 다음과 같음.

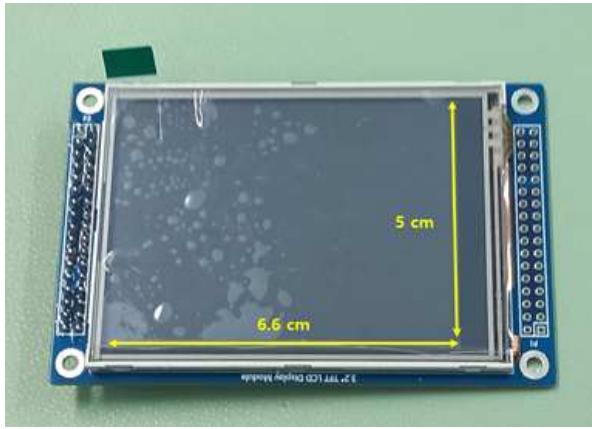
- ◆ Die attach : Epoxy를 이용해 준비된 strip구조체에 EGT를 부착함. EGT 보호용 PR의 burning을 방지하기 위해 저온(80 °C, 30 min)에서 공정 진행. 제작 후 보호용 PR을 제거하는데 사용할 아세톤에 녹지 않는 epoxy를 선정하였음.
- ◆ Wire bonding : EGT의 source, drain, gate pad와 스트립의 contact pad를 wire로 연결함.
- ◆ Molding : 검출에 사용될 용액이 소자의 pad와 닿아 short가 발생하는것을 방지하기 위해 pad 부분에 molding을 진행함. 마찬가지로 보호용 PR의 보존을 위해 저온(90 °C, 60 min)에서 공정 진행.



[그림 44] Strip 제작 도면, Wire bonding 후, Molding 후, 제작 완료 후 사진

○ 정밀리더기 제작

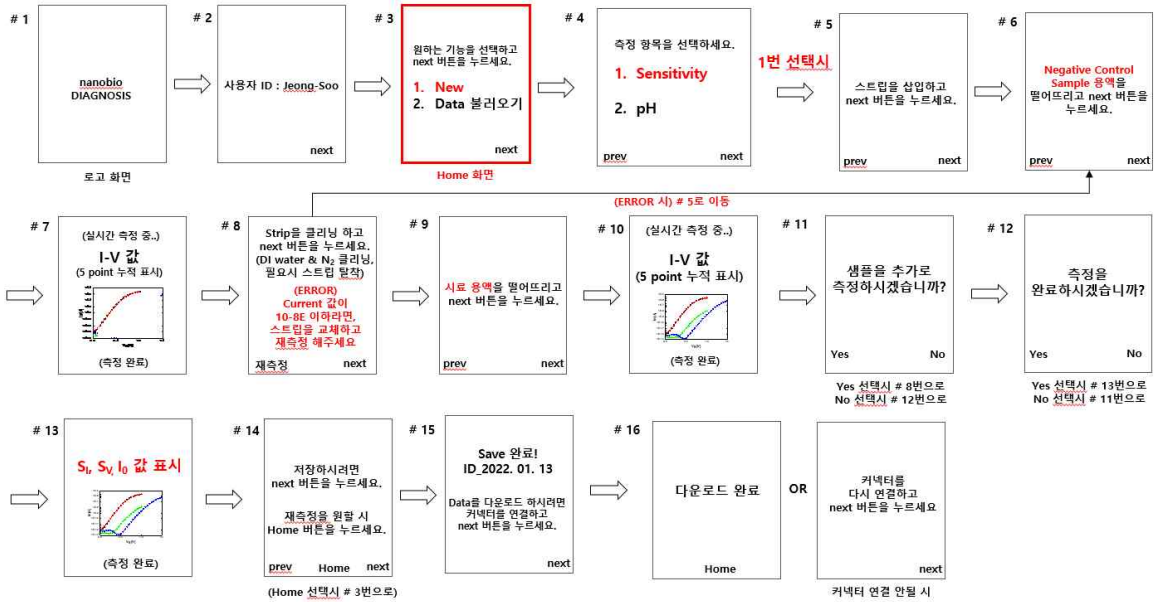
- 현장에서 사용할 수 있도록 사용자 친화적인 GUI를 설계하였음. ASF 바이러스 뿐만 아니라 다른 바이러스, 질병 표지자 등 다양한 종류의 바이오 물질의 검출에도 사용할 수 있도록 범용적으로 설계함.
- 사용자 ID를 등록하여 여러 명의 사용자가 각각 검출한 data를 저장 및 관리 할 수 있게 함. 검출 중간에 특성 검증 기능을 추가하여 소자 및 스트립에 문제가 생겼을 경우도 대비함.
- ASFV 진단기기 시작품에 들어갈 디스플레이는 교체하기 편한 AA 배터리를 사용하는 LCD 디스플레이를 선택했으며, 화면 출력 영역은 6.6 cm x 5 cm 로 큰 화면을 통해 검출 결과 및 그래프를 확인하기 용이하게 하였음.
- 고화질의 TFT 타입 LCD를 사용하였음. 디스플레이의 두께는 0.45 cm 로 얇음.



[그림 45] 디스플레이 사진

- GUI로 구현한 검출과정은 다음과 같음.

- 스트립에 negative control sample 용액을 떨어트림
- Initial 그래프 확인
- DI water로 씻어내고 및 N2 gas로 말려줌
- 스트립에 검출하고자 하는 타겟 물질이 들어간 시료 용액을 떨어트림
- 민감도 등 측정값 확인
- 측정 결과 그래프 확인



[그림 46] 리더기 측정방법에 따른 GUI sequence



[그림 47] GUI 구현 예

- 일회용 스트립을 삽입하여 측정할 수 있는 휴대용 정밀리더기의 하드웨어 설계를 진행하였음. 측정전류의 노이즈값은 0.1 nA 수준이며, 1회 측정 시간은 75초가 걸리는 것으로 나타남. 측정데이터의 저장 및 다운로드 기능도 추가함.



[그림 48] ASFV 진단용 정밀리더기 시제품

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

기관	세부목표		달성 내용
포항공과대학교	1-1	50 nm 급 나노그물 FET 소자 공정 개발	<ul style="list-style-type: none"> EGT 8인치 양산 공정을 최적화하고 저비용 공정을 확보함. 문턱전압이하스윙(SS) 및 문턱 전압(V_{th})을 기준으로 공정능력 지수(C_p, C_{pk})를 산출한 결과 C_p와 C_{pk} 모두 1.00 초과 1.33 이하의 값으로 2급 공정능력 수준을 달성하였음.
	1-2	항체 표면처리 공정 개발	<ul style="list-style-type: none"> 게이트 전극과 나노그물 채널 표면에 receptor를 부착하기 위한 표면처리 기술 개발함. Vapor APTES 처리 온도에 따른 표면처리 효율을 관찰하고, 최적의 조건을 선택함.
	1-3	항원-항체를 이용한 feasibility test	<ul style="list-style-type: none"> 바이오 진단 실험: EGT로 여러 종류의 바이오 물질(인플루엔자 바이러스(H1N1), 땅콩 알레르겐, SARS-CoV-2, Urea)의 검출을 통해, 고민감도 신속 검출 능력을 검증함. ASFV 검출: 충남대에서 제공받은 ASFV 진단용 항원·항체를 이용하여 검출실험을 진행함. 전압 민감도의 경우 최대 100 mV, 그리고 18 mV/dec의 변화폭을 보였으며 검출 한계는 3 µg/mL 였음.
	1-4	ASFV 진단용 일회용 스트립 제작	<ul style="list-style-type: none"> EGT의 검출 성능을 보존하면서 소자와 리더기를 연결해 주는 스트립 제작 공정을 개발함. 정전기파괴를 방지하는 스트립 공정 개발
	1-5	GUI 설계	<ul style="list-style-type: none"> ASFV 검출 과정을 바탕으로 사용자 친화적 GUI 설계. ASFV 뿐만 아니라 다른 바이러스, 질병 표지자 등 다양한 종류의 바이오 물질의 검출에도 사용할 수 있도록 범용적으로 설계함.
	1-6	ASFV 진단용 리더기 평가	<ul style="list-style-type: none"> ASF 바이러스 검출용 리더기를 설계함. 제작된 리더기의 성능 평가 및 GUI 피드백 실시함.
충남대학교	2-1	ASFV 진단용 항원 개발	<ul style="list-style-type: none"> ASFV 항원단백질 3종 (p22, p30, CD2v)을 동물세포에서 발현하였고 항원단백질로써 정제하였음.
	2-2	ASFV 진단용 단클론/다클론 항체 개발	<ul style="list-style-type: none"> ASFV 항원단백질 3종 (p22, p30, CD2v)에 대한 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 제작하였음. ASFV 항원단백질 3종 (p22, p30, CD2v)에 특이적으로 결합하는 펩타이드를 발굴하였고 이를 이용하여 peptibody (재조합 항체 유사체)를 제작하였음. ASFV 항원단백질 3종 (p22, p30, CD2v)을 면역화한 마우스의 혈청을 확보하였음.
	2-3	ASFV 진단용 항체 스크리닝 및	<ul style="list-style-type: none"> 1차년도에서 개발한 하이브리도마 유래 단클론 항체 및 재조합 항체 유사체 peptibody의 항원에 대한 특이 반

		반응성 평가	음성 확인하였음. • ASFV 항원단백질 3종 (p22, p30, CD2v)을 면역화한 마우스 혈청의 항원에 대한 특이 반응성 확인하였음.
(주)씨맥	3-1	일회용 스트립 양산 공정 개발	• 소자와 스트립을 부착하여 스트립 구조체를 제작. • 리더기와의 연결을 통한 전기적 특성평가를 통하여 제작된 스트립의 안정성을 평가함.
	3-2	정밀센서 리더기 시제품 제작	• 휴대용 ASFV 진단기기 시제품 제작. 한 손으로 조작 가능한 휴대용으로 소자스트립을 삽입하여 사용하는 구조임. • Linear Array Sensor를 이용 POCT 진단기기 개발. • 데이터의 전송 방법을 USB 메모리, 블루투스 통신 방법으로 구현.

(2) 정량적 연구개발성과

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명		연도	2020~2021	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	특허	목표	4	20
		실적	4	
	학술발표	목표	6	20
		실적	8	
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	제품화	목표	1	20
		실적	1	
	기술실시	목표	0	10
		실적	1	
	고용창출	목표	3	10
		실적	4	
	인력양성	목표	12	20
		실적	12	
계		목표	30	100
		실적	36	

* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[에스시아이 Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신제품 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.

* 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다

(연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

< 연구개발성과 성능지표 >

평가 항목 (주요성능 ¹⁾)	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치	연구개발 결과	목표설정 근거	
			보유국/보유기관	성능수준	성능수준				
1	Cp	등급	20	-	-	3	2	2	-
2	Cpk	등급	20	-	-	3	2	2	-
3	SS	mv/dec	20	미국	<80	150	<100	< 80	-
4	ASFV 검출시간	min	20	미국	<20	-	< 20	< 20	-
5	ASFV 검출한계	ug/mL	20	-	-	-	< 10	< 3	-

* 1) 정밀도, 인장강도, 내충격성, 작동전압, 응답시간 등 기술적 성능판단기준이 되는 것을 의미합니다.

* 2) 비중은 각 구성성능 사양의 최종목표에 대한 상대적 중요도를 말하며 합계는 100%이어야 합니다.

(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	An Ultrasensitive Silicon-Based Electrolyte-Gated Transistor the Detection of Peanut Allergens	biosensors	Donghoon Kim	1	해외	MDPI	SCIE	2022.1.4	2079-6374	50%
2	Extraction of Nitride Trap Profile in 3-D NAND Flash Memory Using Intercell Program Pattern	IEEE Access	Jounghun Park	9	해외	IEEE	SCIE	2021.8.24	2169-3536	50%
3	Fabrication and Characterization of Nanonet-Channel LTPS TFTs Using a Nanosphere-Assisted Patterning Technique	micromachines	Gilsang Yoon	7	해외	MDPI	SCIE	2021.6.24	2072-666X	50%
4	Heat shock protein 70 could enhance porcine epidemic diarrhoea virus replication by interacting with membrane proteins	Veterinary Reseach	Jae-Yeon Park	52	해외	BMC	SCIE	2021.10.30	1297-9716	50%
5	Lumped-Capacitive Modeling and Sensing Characteristics of an Electrolyte-Gated FET Biosensor for the Detection of the Peanut Allergen	IEEE Access	Donghoon Kim	9	해외	IEEE	SCIE	2021.12.20	2169-3536	50%
6	Three-dimensional imaging of carbon clusters in thermally stable nickel silicides by carbon pre-implantation	Applied Surface Science	Iksoo Park	539	해외	ELSEVIER	SCIE	2021.2.15	0169-4332	50%

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	한국분자·세포생물학회	Yea Jin Lee	2021.11.4	제주	대한민국
2	한국분자·세포생물학회	Nipuna Tennakoon	2021.11.4	제주	대한민국
3	한국분자·세포생물학회	Jihoon Ryu	2021.11.4	제주	대한민국
4	한국분자·세포생물학회	Jae-Yeon Park	2021.11.4	제주	대한민국
5	한국분자·세포생물학회	Saori Kosaka	2021.11.4	제주	대한민국
6	한국반도체 학술대회	Gilsang Yoon	2021.1.27	온라인	대한민국
7	한국반도체 학술대회	Seonghwan Shin	2021.1.28	온라인	대한민국
8	한국반도체 학술대회	Jounghun Park	2021.1.27	온라인	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	특허	대한민국	포항공과대학교 산학협력단	2021.4.29	10-2021-0056032					50%	
2	특허	대한민국	포항공과대학교 산학협력단	2021.11.23	10-2021-0162374					50%	
3	특허	대한민국	포항공과대학교 산학협력단	2020.9.1	10-2020-0111123					50%	
4	특허	PCT	포항공과대학교 산학협력단	2021.8.17	PCT/KR2021/010898					50%	

○ 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 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	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 ¹⁾	표준명	표준기구명 ²⁾	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³⁾	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	POCT 진단 시스템	2021.04.30	지에스엠	(주)씨맥	돼지 열병 진단	6개월		

□ 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	직접 실시	휴대용 POCT 시스템	(주)씨맥	2021.12.09	0	0

- * 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*
1			276,310,060원	276,310,060원	신규 공장 부지 확보

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	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
			2020년	2021년	
1	휴대용 돼지 질병(ASFV) 진단 기기	(주)씨맥	0	4	
합계			0	4	

□ 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	휴대용 돼지 질병(ASFV) 진단 기기	35,000		23,720		4	
기대 목표		1,190,000		800,000		7	

□ 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)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 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	학위 취득	2021	8	4			10	2		4	8		

□ 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

□ 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)

* 「과학기술기본법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과]

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함)
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록·기탁 대상과 범위

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상 (부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백질체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
기탁	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

2) 목표 달성 수준

추진목표	달성내용	달성도(%)
○ ASFV 진단용 항원 개발	○ ASFV 항원단백질 3종 (p22, p30, CD2v)을 동물	○ 100

	세포에서 발현하고, 항원 단백질로써 정제함	
○ ASFV 진단용 항체 개발	○ ASFV 항원단백질 3종 (p22, p30, CD2v)에 대한 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포 제작	○ 100
○ ASFV 진단용 항체 스크리닝 및 반응성 평가	○ 하이브리도마 유래 단클론 항체 및 재조합 항체 유사체 peptibody의 항원에 대한 특이 반응성 확인	○ 100
○ EGT 소자 양산 공정 개발	○ Cp 2등급, Cpk 2등급 달성	○ 100
○ 바이오 진단 기초 실험	○ 인플루엔자 바이러스, 땅콩 알레르겐, SARS-CoV-2, urea 검출을 통한 EGT 검증	○ 100
○ ASF 바이러스 검출실험	○ 충남대에서 제공받은 ASFV 진단용 항원·항체를 이용하여 검출실험 진행	○ 100
○ 일회용 스트립 공정 개발	○ 소자와 스트립을 부착하여 스트립 구조체를 제작하고, 리더기와의 연결을 통한 전기적 특성평가를 진행함	○ 100
○ ASFV 진단기기 시작품 제작	○ 진단기기 시작품 GUI 및 디자인 설계	○ 100
	○ Linear Array Sensor를 이용해 POCT 진단기기 개발	○ 100

4. 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

2) 자체 보완활동

3) 연구개발 과정의 성실성

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

FET 타입에서 세계 최초로 ASFV 검출을 이뤄 냈음. 이를 성취하는 과정에서 EGT 기반 진단 기기 시제품 제작공정을 확립함. 즉 반도체 웨이퍼부터 소자제작, 표면처리, 스트립 제작, 정밀리더기 시제품 까지 일괄제조공정을 구축하였고, 이를 바탕으로 관련 시장 진출을 적극 추진할 계획임.

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 본 과제를 통해 얻은 공정 기술, 항원/항체 개발 기술 등을 바탕으로 진단기기 시장 진출.
- 기술이전을 통해 진단기기, 반도체 바이오소자 제조공정 등의 기술과 노하우를 관련 중소기업에 전파.
- 바이오진단분야 고급 석·박사 연구 인력을 배출하여 해당 분야 기술 성장 및 시장창출에 기여함.
- 동물용의료기기 품목허가 신청을 위해 농림축산검역본부 동물약품관리과에 기술문서 및 안전성유효성 심사대상 여부를 문의하고 필요한 절차를 진행할 계획임.

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE	5	
	비SCIE	0	
	계	5	
국내논문	SCIE	0	
	비SCIE	0	
	계	0	
특허출원	국내	3	
	국외	2	
	계	5	
특허등록	국내	2	
	국외	1	
	계	3	
인력양성	학사	0	
	석사	3	
	박사	3	
	계	6	
사업화	상품출시	2	
	기술이전	1	
	공정개발	2	
제품개발	시제품개발	2	
비임상시험 실시		1	
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	0
		2상	0
		3상	0
	의료기기	1	
진료지침개발		0	
신의료기술개발		1	
성과홍보		3	
포상 및 수상실적		1	
정성적 성과 주요 내용		1	

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서 2) 연구성과 활용계획서
2.	1) 2)

주 의

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