

미세유체소자를 이용한 가축질병진단 바이오센싱 기술



김기성
서울대학교 / 연구부교수
keesung@snu.ac.kr

1. 가축질병의 신속 진단

농림수산식품부가 2011년 3월 발표한 구제역과 조류 독감 피해를 보면, 소·돼지 347만 두, 닭·오리 623만 수의 피해보상을 위한 소요 예산으로만 2조 1,454억원의 예산이 필요한 것으로 발표 하였다. 전염성이 높은 가축 질병의 방역에서 가장 중요한 것은 조기에 질병을 진단하고 전파를 막는 것이다. 그러나, 현재의 시스템은 발견 → 수의사 확인 → 방역기관 샘플 채취 및 이동 제한 → 방역기관 판정에 소모되는 시간이 약4-6일이 소요 된다.

다양한 가축 전염병의 원인이 되는 병원체를 신속하게 검출하기 위한 검사 키트의 개발이 절실히 요구되고 있으나, 현재 사용하고 있는 rapid kit와 같은 항원, 항체 반응을 이용한 검출방법은 항체의 고정화 방향의 제어 및 활성화 유지에 큰 어려움이 있다. 이로 인해 검출효능의 저하를 일으키고 또한 진단액의 특이성 및 보존성이 감소하는 문제점이 발생하고 있다. 이에 본 저자는 높은 quantum 방출 수율을 가진 hydroxyphenyl-benzoxazole (HBO) 유도체 기능성 polydiacetylene (PDA) polymer를 제작하여

다양한 리간드를 가지는 multiplex lipid vesicle를 설계 제작하고 이를 이용하여 다양한 병원체 검출을 위한 바이오센싱기술을 소개 하고자 한다.

2. 가축질병 진단용 고감도 PDA 리포좀 합성 및 진단칩 제작

2.1. PCDA-Epoxy Monomer 합성

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

2.2. PCDA-NHS 합성

(1) 상온에서 250ml 1-neck 플라스크에 magnetic stir를 넣고, EDC(1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride)를 0.76 g(8.02 mmol)와 NHS(N-hydroxysuccinimide)를 1.52 g(6.94 mmol) 넣는다.

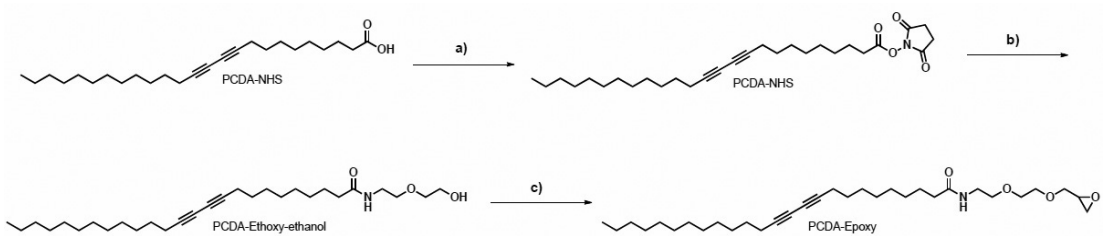


그림 1. PDA liposome 합성 과정

- (2) 50ml 비커에 약간 polymerization 되어 푸른 하늘색을 띠는 PCDA(pentacosadiynoic acid) powder 2.0 g(5.34 mmol)를 solvent methylene chloride 에(10ml) 녹인다. 녹으면 polymerization 분자들이 붉은색을 낸다. powder부터 먼저 넣어야 한다.
- (3) 20 ml syringe에 솜을 넣고 (1) 플라스크에 입구를 댄 뒤, (2)의 용액을 부어 polymerization 된 분자들을 filter 시킨다. 흘러나오는 용액은 붉은 색이 제거 되어 맑아야 한다.
- (4) 1-neck 플라스크를 septa로 밀봉한다. 이때 septa 에 주사기 바늘을 하나 꽂아서 공기가 빠져 나갈 수 있게 한다. stir를 돌려서 상온에서 반응 시킨다. TLC test를 수시로 하여, 반응물의 TLC peak가 완

전히 사라질 때 까지 반응 시킨다. 보통 2시간 정도 걸린다. 또한 stir가 일정한 속도로 안정되게 돌고 있는지 수시로 체크 한다.

- (5) 250ml evaporate flask로 용액을 옮긴다. 옮기기 전에 methylene chloride를 파스퇴르 피펫으로 플라스크 안쪽 벽면에 뿌려 벽면에 붙은 것들을 씻어 녹인다. 옮긴 후에도 같은 방법으로 1-neck flask에 methylene chloride를 가한 뒤, evaporate flask로 용액을 옮기는 것을 반복하여 2-neck flask 안의 모든 내용물이 찌꺼기 없이 옮겨지도록 한다.

또한 250ml evaporate flask의 벽에도 methylene chloride를 가하여 벽면에 붙은 내용물들이 없도록 한다.

- (6) rotary evaporator에 5도의 물이 흘러가게 한 뒤, flask를 장착하고, 상온에서 감압하고 적당한 속도로 (1~10에서 6정도) 돌려서 solvent를 날린다.
- (7) (6)의 산물에 ethylene acetate를 부어 충분히 흔들어 녹인다. 대부분의 내용물이 ethylene acetate에 녹는다. 안 녹는 것들도 있는데 이것은 반응하지 않고 남은 불순물로 원하는 물질이 아니기 때문에 ethylene acetate에 충분히 흔들어 녹였다면, 이것들이 안 녹았다고 해서 염려할 필요 없다.

- (8) (7)을 250ml separating funnel에 넣고 그 위에 brine

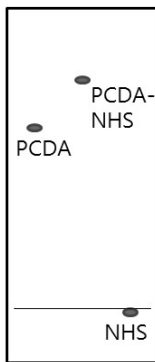


그림 2. PCDA-NHS 반응 TLC Peak (Eluent EA:Hex = 1:2)

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

(9) (8)의 용액에 용액의 우유색이 되도록 $MgSO_4$ 를 충분히 가한 뒤, 10분간 stir를 돌리고, filter하여, 용액에 섞여있는 water를 제거한다. Filter 시에는, 500ml filtering flask위에 filter adapter와 porcelain funnel(지름 8cm 정도)를 장착하고, aspirator와 호스로 연결한다. 플라스크를 red ring으로 걸어 넘어지지 않도록 한다. funnel위에 filter paper(Whatman, NO.5)를 놓는다. filter paper는 미리 methylene chloride로 적셔서 바닥과 밀착하게 한다. aspirator를 작동 시켜 진공을 잡은 뒤, 4.의 용액을 천천히 붓는다. aspirator를 끌 때는 호스부터 빼고 진공을 꺼야 한다.

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

(11) NMR 피크는 500 MHz, Solvent $CDCl_3$ 에서 0.86(t, 3H), 1.21-1.52(m, 36H), 2.21(t, 4H), 2.60(t, 2H), 2.87(s, 4H) 이다.



그림 3. PCDA-NHS의 구조식

3. PCDA-Ethoxy-ethanol 합성

- (1) 1.60g(15.26mmol)의 2-(2-aminoethoxy)ethanol를 methylene chloride에 녹여 100ml의 용액을 만든다.
- (2) 1단계의 산물 PCDA-NHS를 2.40g(5.08mmol) methylene chloride에 녹여 50ml의 용액을 만든다.
- (3) 250ml 1-neck 플라스크에 magnetic stir와 (1)를 넣고 (2)를 dropping funnel로 한 방울씩 30분 간 모두 떨어뜨린다. (2)를 dropping funnel에 넣을 때, 1.에서처럼 filter 하여 넣는다.
- (4) 1-neck 플라스크를 septa로 밀봉한다. 이때 septa에 주사기 바늘을 하나 꽂아서 공기가 빠져 나갈 수 있게 한다. TLC test를 수시로 하여, 반응물의 TLC peak가 완전히 사라질 때 까지 반응 시킨다. 보통 3 시간 정도 걸린다. 또한 stir가 일정한 속도로 안정되게 돌고 있는지 수시로 체크 한다.

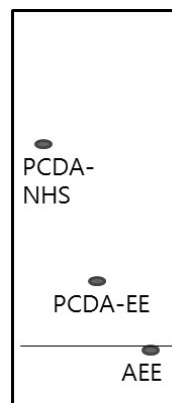


그림 4. PCDA-EE 반응 TLC Peak
(Eluent EA:Hex = 4:1)

- (5) (4)의 내용물을 250ml evaporate flask에 옮겨 담은 뒤, rotary evaporator에 5도의 물이 흘러가게 한 뒤, flask를 장착하고, 상온에서 감압하고 적당한

- 속도로 (1~10에서 6정도) 돌려서 solvent를 날린다.
- (6) (5)의 산물에 ethylene acetate를 부어 충분히 흔들어 녹인다. 대부분의 내용물이 ethylene acetate에 녹는다. 안 녹는 것들도 있는데 이것은 반응하지 않고 남은 불순물로 원하는 물질이 아니기 때문에 ethylene acetate에 충분히 흔들어 녹였다면, 이것들이 안 녹았다고 해서 염려할 필요 없다.
- (7) (8)을 250ml separating funnel에 넣고 그 위에 brine 용액(NaCl 포화 용액)을 붓는다. 그리고 separating funnel을 흔든다. 그리고 brine층과 ethylene acetate층으로 분리 될 때 까지 기다린 뒤, ethylene acetate층의 용액만을 받아 낸다. 이것을 총 세 번 반복한다. 반복할 때 마다, 녹아나오는 불순물의 양이 줄어들어 brine 용액 층이 점점 투명해진다.
- (8) 1. (9)의 과정대로 MgSO₄로 dry 한다. (9)의 내용물에서 solvent를 evaporating 한다.
- (9) (10)의 내용물을 methanol에 recrystallization 한다. methanol를 (8)의 250ml 플라스크의 1/3정도 붓고, 열을 가하여, powder를 완전히 녹인 뒤, 냉장고의 냉동실에 넣어 overnight 한다.
- (10) (9)의 내용물을 filtering 한다. 500ml filtering flask위에 filter adapter와 porcelain funnel(지름 8cm 정도)를 장착하고, aspirator와 호스로 연결한다. 플라스크를 red ring으로 걸어 넘어지지 않도록 한다. funnel위에 filter paper(Whatman, NO.5)를 놓는다. filter paper는 미리 methylene chloride로 적셔서 바닥과 밀착하게 한다. aspirator를 작동 시켜 진공을 잡은 뒤, (10)의 용액을 천천히 붓는다. aspirator를 끌 때는 호스부터 빼고 진공을 꺼야 한다.
- (11) filtering 되어 filter paper 위에 놓인 PCDA-

Ethoxy-ethanol 결정들을 20ml 바이알에 은반지로 싸서 따로 보관한다.

- (12) NMR 피크는 500 MHz, Solvent CDCl₃에서 0.86(t, 3H), 1.21-1.52(m, 36H), 2.22(m, 6H), 3.44(q, 2H), 3.55(q, 4H), 3.72(q, 2H), 5.81(s, 1H)이다.

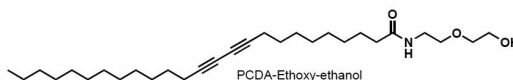


그림 5. PCDA-Ethoxy-ethanol 구조식

4. PCDA-Epoxy 합성

- (1) 250ml 1-neck 플라스크에 magnetic stir를 넣어 둔다. 영상 5도에서 0.10g(4.24,26mmol)의 sodiumhydride를 플라스크에 넣고 10ml의 tetrahydrofuran를 가한다. tetrahydrofuran은 anhydrous 해야 한다.(수분이 들어가서는 안 된다.) 따라서 tetrahydrofuran를 꺼낼 때는 시린지에 시린지 바늘을 꽂은 후, 바늘을 병의 마개에 꽂아 solvent를 꺼낸다.
- (2) 2단계의 산물 PCDA-Ethoxy-Ethanol를 1.00g(2.16mmol) tetrahydrofuran에 녹여 20ml의 용액을 만든다. 이때도 (1)과 마찬가지로 방법으로 tetrahydrofuran를 다룬다.
- (3) (2)의 용액을 dropping funnel에 넣는 뒤, dropping funnel로 (1)의 플라스크에 15분정도 drop을 떨어뜨린다.
- (4) 내용물을 4시간 동안 상온에서 stir를 돌려 반응시킨다.
- (5) (4)의 내용물에 0.5g(3.69mmol)의 epibromohyidin을

가한 뒤, 상온에서 밤새도록 stir를 돌린다. TLC Test로 생성물을 확인한다.

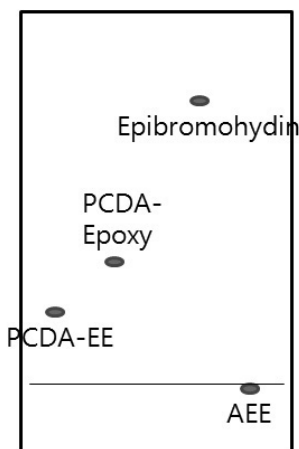


그림 6. PCDA-EE 반응 TLC Peak (Eluent Chloroform:Methanol=95:5)

- (6) (5)의 내용물을 filtering 한다. 500ml filtering flask 위에 filter adapter와 porcelain funnel(지름 8cm 정도)를 장착하고, aspirator와 호스로 연결한다. 플라스크를 red ring으로 걸어 넘어지지 않도록 한다. funnel위에 filter paper(Whatman, NO.5)를 놓는다. filter paper는 미리 methylene chloride로 적셔서 바닥과 밀착하게 한다. aspirator를 작동 시켜 진공을 잡은 뒤, 4.의 용액을 천천히 붓는다. aspirator를 끌 때는 호스부터 빼고 진공을 꺼야 한다.
- (7) filter된 내용물을 250ml evaporate flask에 옮겨 담은 뒤, rotary evaporator에 5도의 물이 흘러가게 한 뒤, flask를 장착하고, 상온에서 감압하고 적당한 속도로 (1~10에서 6정도) 돌려서 solvent를 날린다.
- (8) column chromatography로 내용물을 정제한다. 이 때, chloroform과 methanol을 95:5로 섞은 것을 사용한다.
- (9) NMR 피크는 500 MHz, Solvent $CDCl_3$ 에서

0.86(t, 3H), 1.21-1.58(m, 37H), 2.16(t, 6H), 2.57(q, 1H), 2.77(t, 1H), 3.14(m, 1H), 3.43(m, 3H), 3.52(t, 2H) 3.59~3.65(m, 4H), 3.79(q, 1H), 5.89(s, 1H) 이다.

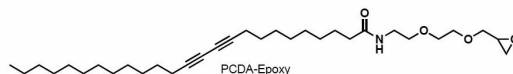


그림 7. PCDA-Epoxy 구조식

5. PDA liposome 조립

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

6. PDA liposome 유리 기판 제작

- 1) PCDA-epoxy liposome 고정화를 위한 유리 기판 처리 방법
 - (1) 슬라이드 glass를 chloroform에 담가 초음파 세척기에 5분간 bath sonication 한다.
 - (2) acetone에 5분간 bath sonication 한다
 - (3) 2-propanol 5분간 bath sonication 한다
 - (4) 적당량의 nochromix를 넣은 sulfuric acid용액에 위의 슬라이드 glass를 넣은 후, 60분간 bath sonication한다.

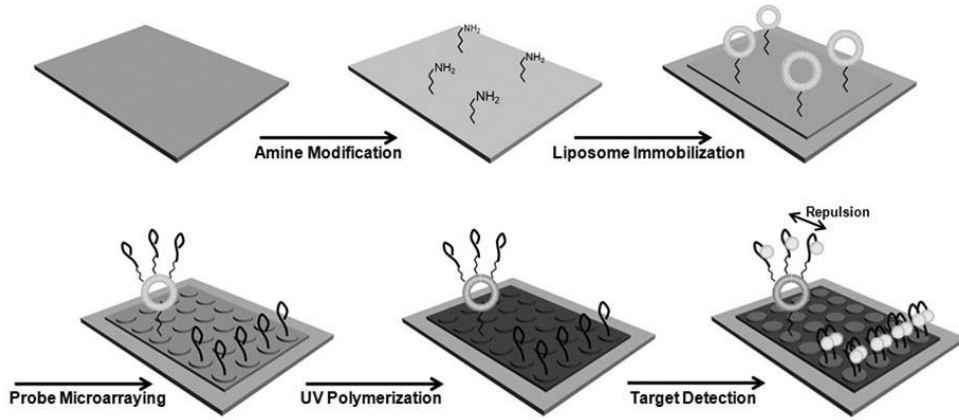


그림 8. PDA liposome 기판 제작 과정

- (5) 증류수를 이용하여 sulfuric acid를 충분히 세척한 후 건조한다.
- (6) glass 표면을 2 wt% 3-aminopropyltriethoxysilane/toluene 용액에 1시간 담근 뒤, 꺼내어 toluene으로 가볍게 세척하고 130 °C에서 30분간 baking 한다.
- (7) 그 후, 슬라이드 glass를 toluene, toluene: methanol (1:1), methanol 용액에 각각 3분간 초음파 세척기로 세척하여 결합되지 않은 silane모노머를 제거한다.

7. PCDA-epoxy liposome 고정화

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

liposome 코팅된 슬라이드 glass위에 spot한 다음 6 시간 incubation 시킨다.

8. UV-lamp를 이용한 photopolymerization

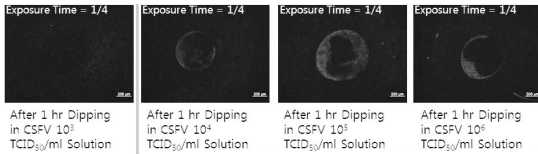
Incubation 시킨 슬라이드 glass는 10mM pH 8 HEPES Buffer를 이용하여 세척한 다음 질소를 이용 건조 시킨 다음 254 nm UV light을 이용하여 30 초간 photopolymerization시킨다.

3. PDA 리포솜 진단칩을 이용한 병원균 검출 결과

- 돼지열병바이러스 (Classical Swine Fever Virus, CSFV)

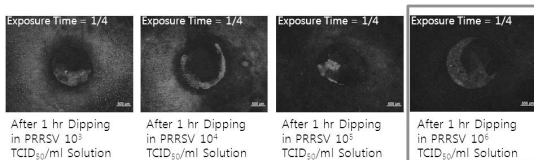
CSFV 농도별로 준비된 샘플용액에 PDA 칩을 완전히 담근 후 1시간 후에 형광 현미경으로 관찰 하였다. 검출 실험 결과는 아래 그림과 같다. 10^6 TCID₅₀/ml 에서

도 검출이 가능 하나 반복적인 실험을 더 해보아야 할 것으로 판단된다.



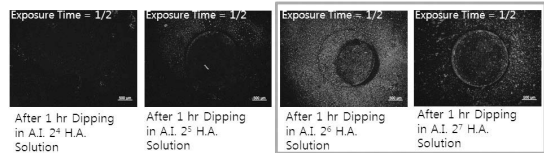
● 돼지생식기 및 호흡기 증후군 (Procine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PRRSV)

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



● 조류독감 (Avian Influenza, AI)

농도별로 준비된 Avian Influenza 샘플용액에 PDA 칩을 완전히 담근 후 1시간 후에 형광 현미경으로 관찰 하였다. 검출 실험 결과는 아래 그림과 같다. 26 과 27 H.A. solution 에서도 검출이 가능한 것으로 판단 되며 검출한 계와 검출시간에 대한 추가 연구가 진행 되어야 한다.



PDA microarray를 이용한 바이오센싱 기술은 바이러스, 박테리아와 같은 병원균 뿐만 아니라 농업 전반에 문제가 제기 되고 있는 중금속, 항생제, 잔류농약과 같은 이온성분을 검출 하는 기술로도 활용 될 수 있어 그 분야의 연구가 활발히 진행 되고 있다. 그러나, 바이오센서의 경우 연속측정을 하는데 문제가 있어 연속측정을 위한 연구가 좀 더 이루어 져야 하며 BT IT NT 기술이 농공학 분야에 좀 더 깊숙이 접목되어 새로운 기술의 발전으로 이루어지 지길 기대 한다.

참고문헌

1. Jiseok Lee, Hayeon Jun, Jinsang Kim, "Polydiacetylene Liposome Microarrays for Selective and Sensitive Mercury (II) Detection," Adv. Mater., Vol. 21, pp. 3674 (2009).
2. Lee, J.; Kim, H.-J.; Kim, J., "Polydiacetylene Liposome Arrays for Selective Potassium Detection," JACS, Vol. 130, pp. 5010 (2008).

이달원 dwlee@cnu.ac.kr