**서론**

고소비형 사회로의 전환, 산업화에 따라 전 지구적 환경오염, 특히 토양 및 지하수 오염은 심각한 환경 문제를 유발할 수 있는 원인 중 하나로 인류의 건강을 위협하는 난제의 하나로 인식되고 있음. 또한 산업 시설의 노후화로 인한 오염물질 누출 위험이 항상 뒤따르고 있는 상황에서 높은 민감도를 갖는 효율적인 유해물질 모니터링 기술의 확보가 요구됨. 일반적으로 위와 같은 오염물질을 탐지하기 위해서 기기 화학적 방법이 사용되고 있으나 고비용 장비와 복잡한 처리에 의한 단점으로 인해 미생물을 활용한 환경 바이오센서가 대안으로서 주목받고 있음. 특히 슈도모나스를 비롯한 많은 미생물이 환경에 존재하는 난분해성 방향족 화합물과 같은 독성물질에 적응하며 이들을 생분해하는 효소 유전자들을 보유하고 있음이 알려지면서 이러한 유전자와 GFP와 같은 형광 단백질을 조합하여 손쉽게 오염물질의 존재 유무를 확인하는 whole cell 바이오센서가 개발됨. 대장균을 이용하여 TNT를 감지하는 감지 바이오센서가 가장 대표적인 예임. 일반적으로 미생물 바이오센서는 세포가 감지하는 미세한 환경 변화를 효율적으로 관찰자에게 전달해 주기 위해 발광이나 형광 리포터를 사용하고 있으나 약한 신호로 인한 가시화 효율에 한계가 있으며 특히 형광의 경우 고출력의 레이저와 필터를 갖춘 고가 장비가 필요한 단점이 있음. 또한 미생물 바이오센서는 세포의 배양과 반응 처리 등의 전처리 과정에 시간이 필요하다는 점도 실용화의 걸림돌로 지적되고 있음.

본 연구에서는 유해물 중 방향성 유해물을 감지하여 신호를 증폭하는 유전자회로를 미생물에 탑재하고 이를 형광 감지 디바이스로 원거리에서 감지하는 시스템을 구축함. 특히 시스템을 감지 미생물 (sender) 과 증폭 신호 수신 미생물 (receiver)로 나누어 이종간 균주를 조합함으로써 감지와 증폭 각각에 대한 반응 최적화를 수행할 수 있으며 freeze 기반 bead 센서를 개발하여 빠른 반응과 사용의 편의성을 최대화함. 또한 형광을 효율적으로 관찰하기 위한 3D 프린팅 및 아두이노를 활용한 저가형 디바이스를 제작하여 실용적 유해물 감지 및 활용을 위한 가능성을 보여주고 있음.

.

**결과**

**Cell-cell communication based coupled biosensors**

본 연구팀은 유해물 중 특히 방향성 페놀류 화학물에 반응하는 바이오센서를 개발하여 고속 탐색이나 유해물 감지 whole cell 센서로서 사용되어 왔음. 이러한 센서들은 DmpR 단백질을 기반으로 phenol이 존재할 경우 DmpR이 활성화 되고 하위 gfp 유전자를 발현시켜 형광을 보이는 세포를 관찰함으로써 페놀의 유무를 정량적으로 확하는데 사용되고 있음. 본 연구에서는 이러한 whole cell 센서의 감지 효율 개선 및 신호 증폭을 위해서 기존 dmpR과 gfp로 이루어진 유전자 회로에 luxI-luxR 기반의 세포간 통신 모듈을 추가한 유해물 감지 시스템을 구축하였음 (그림 1 A). 이 시스템은 유해물을 감지하고 증폭 신호를 전달하는 sender cell과 증폭된 신호를 받아 형광을 내는 receiver cell로 나누어져 있으며 sender cell에서는 dmpR과 rfp 그리고 luxR 로 구성되어 phenol이 존재할 경우 하위 rfp를 발현하여 red 형광을 내고 동시에 luxI를 발현하여 세포간 통신용 매개물인 AHL을 생성함. Receiver cell에서는 sender cell에서 생성한 AHL를 받아 green 형광을 내기 위한 luxR과 그 하위 gfp 유전자로 구성되어 있음. 먼저 이 두 가지 종류의 세포를 각각 다른 seed 비율로 공배양하며 phenol 감지에 따른 형광 신호의 증폭 효과를 확인하였음 (그림 1 B). Sender와 Receiver의 공배양을 위해 각각에 대한 접종 비율을 0, 5, 10, 15, 20μL으로 나누어 1ml 배지에 최종 40mL 가 되도록 하여 총 9개 경우에 대한 형광 세기를 비교 측정하였음. Phenol 사용량은 최종 100μM 농도로 seed와 함께 처리해 주었음. 30도에서 15시간 배양한 후 형광을 측정한 결과 Sender 15μL, Receiver 25μL 비율에서 가장 높은 green 형광 발현을 보였음. 다음으로 sender-receiver 시스템과 dmpR과 gfp만으로 이루어진 whole cell 시스템의 신호 강도를 비교하였음. 최종 선정된 sender-receiver 시스템의 최적 조건과 동일한 조건의 단일 whole cell 센서를 phenol과 반응 시킨 결과 sender-receiver 시스템이 단일 whole cell 시스템에 비해 약 2배의 높은 신호 강도를 갖는 것을 알 수 있었음 (그림 1 C). 이러한 결과는 DmpR의 phenol 감지 민감도와 LuxR에 의한 AHL 감지 민감도의 차이에 따른 것으로 (그림 1 D) 일정 phenol 농도에 의한 DmpR의 발현이 LuxI의 AHL 생성을 매개로 증폭되고 보다 높은 수준의 gfp 발현을 유도하여 최종적으로 향상된 유해물 가시화 성능을 보여주고 있음.

추가적으로 sender와 receiver로 모듈화된 시스템은 각 모듈의 기능을 최대화 할 수 있다는 장점이 있음. 즉, sender의 DmpR 단백질이 유래한 Pseudomonas putida KT2440 균주는 30도가 적정 growth 온도이고 LuxI의 경우도 30도에서 AHL 생산이 최적화 되어 있는 것으로 알려져 있으나 이들이 구현된 숙주인 *E. coli*의 경우 37도가 생장 최적 온도로서 생장과 단백질 활성 조건의 차이로 인한 유해물 감지 센서의 가시화 효과가 저해될 수 있음. 본 연구에서 제안하는 방식은 sender와 receiver의 세포들을 각각 최적 배양 조건에서 기르고 생장과 관계 없이 30도에서 유해물 반응을 수행 할 수 있으므로 각 조건에 따른 기능 저하를 최소화 할 수 있음. 특히 Pseudomonas 균주를 sender 호스트로 사용 할 경우 DmpR 단백질의 발현 및 활성을 최대화 할 수 있을 것으로 기대하여 dmpR-gfp-luxI 회로를 pSEVA vector에 삽입한 *P. putida* sender를 구축한 후 *E. coli* receiver 와 함께 성능을 측정하였음. 그 결과 대장균을 sender로 이용할 때 보다 약 5배 이상의 향상된 GFP 신호를 관측할 수 있었음 (그림 1E).

**Freeze stock based reaction ready biosensors**

기존 whole cell 기반 바이오센서의 경우 미생물의 배양과 유해물 반응을 위하여 seed 배양과 main 배양을 포함하여 최소 16 시간이 필요할 뿐만 아니라 배양액과 시료 등의 준비 과정이 필요함. 그러나 이러한 준비과정은 다양한 시료로부터 유해물질을 감지하기 위한 센서로 사용하는데 한계로 지적되고 있음. 본 연구에서는 반응이 준비된 미생물 센서를 장기간 안정적으로 보관하고 유해물의 빠른 반응 확인을 위하여 미리 미생물 센서를 배양하여 최적의 상태로 냉동 보관하고 유해물 반응을 4시간 이하에서 확인하는 새로운 프로토콜을 정립함. 본 연구에 사용되는 DmpR 기반 바이오 센서는 N 결핍에 의해 활성이 강해지는 sigma54 factor 기반의 transcription factor로서 센서의 신호가 exponential phase이후 서서히 증가하는 패턴을 보이며 따라서 exponential phase가 지난 세포를 수거 후 PBS로 교환하여 유해물과 반응할 경우 그 신호가 빠르게 증가하여 반응 시간을 크게 줄일 수 있음 (그림 2A). 이러한 결과는 활성화 직전의 센서 세포 배양액을 적절한 조건에 보관하고 필요할 때 꺼내어 PBS로 희석하여 유해물을 관찰 할 경우 기존 미생물 바이오센서를 활용한 유해물 검정 시간을 크게 줄일 수 있을 것으로 기대할 수 있음. 이를 위해 센서 세포들이 가장 healthy하면서도 sigma54가 발현되기 전 상태인 exponential phase에서 센서 세포를 수거하여 fresh LB와 glycerol을 첨가 후 -70도에서 보관하는 방법을 제안함. 이렇게 보관된 센서 세포를 PBS에 희석하여 유해물에 대한 반응을 측정 한 결과 fresh LB로 교환한 샘플의 GFP가 glycerol만 넣은 샘플보다 더 높은 GFP 형광 반응을 보였음 (그림 2B). 또한 stock된 세포를 PBS에 1/10 또는 1/5 희석한 경우에 대한 반응을 비교한 결과 1/10희석된 샘플의 경우 OD와 형광이 지속적으로 증가하지만 시료와의 반응 후 OD의 증가는 false positive를 유도할 수 있고 반응 시간이 길다는 단점이 있음 (그림 2C). 그에 비해 1/5 희석의 경우 약 4시간 이후에는 OD와 형광의 증가가 없으며 농도에 따른 명확한 정량적인 구분이 가능하여 기존 16시간 소모되던 반응 확인 시간을 약 1/4로 줄이는 효과를 얻을 수 있음. 추가로 더욱 높은 가시화 신호 효과를 구현하기 위하여 sender-receiver 시스템의 형광 비교를 위해 설계 되었던 sender의 rfp를 sfgfp 유전자로 교체하여 신호 강도와 실용성을 향상시켰음. 교체된 sender-receiver의 경우 기존 receiver 단독 gfp 형광에 비해 약 3배 이상의 신호 강도가 높아진 결과를 얻을 수 있었음 (그림 2D).

**Beads based cell mobilization**

앞서 구축된 sender-receiver 시스템은 GMO로서 실제 환경에 노출하여 사용할 수 없다는 한계가 있음. 이에 본 연구에서는 sender-receiver 세포를 비드 형태로 고정화 한 후 일정 양의 환경 시료와 함께 투명한 반응기에 넣고 시료내 유해물의 존재 유무를 판단하기 위한 detection agent로서 사용함. 유해물 존재 유무의 판단은 반응기 내부의 비드 센서들이 발현하는 GFP 형광을 감지함으로써 알 수 있으며 이를 위한 원거리 형광 감지 디바이스 및 구체적 감지 프로토콜은 다음 장에서 소개할 예정. 본 장에서는 고정화 비드를 제작하고 이를 이용하여 sender-receiver 시스템의 신호 변환 및 증폭 특성을 조사함. 먼저 고정화 비드 센서를 만들기 위해 앞서 제작된 freeze stock의 PBS 희석액과 sodium alginate 용액 (2% w/v)을 섞고 주사기 펌프를 이용하여 0.2mM CaCl2 용액에 떨어뜨려 약 2mm 직경의 비드를 제작함. 이렇게 만들어진 바이오센서 비드를 90mm 플레이트에 고르게 펴고 중앙에 2mM phenol을 10uL 처리한 결과 phenol 감지 sender의 경우 약 1cm 반경에서 rfp 신호를 관찰 할 수 있는 반면 receiver를 통한 gfp 형광은 sender의 두 배인 약 2cm 반경의 면적에서 관찰할 수 있었음 (그림 3A). 이러한 감지 범위 확장은 앞서 신호 증폭과 같은 원리로 감지 불가능한 phenol 감지 활성이 고민감도 AHL 신호로 전환되어 나타나는 효과라고 할 수 있음. 또한 앞서 freeze stock된 sender리포터를 rfp에서 gfp로 전환한 세포를 이용하여 bead를 제작하여 20 mL 플라스크에 최종 10uM phenol 농도의 시료와 함께 넣고 4시간 반응 후 비드를 꺼내어 형광을 관측한 결과 배양액 상태에서와 같이 phenol이 포함된 시료에서 높은 형광을 관측할 수 있었음 (그림 3B).

**Remote fluorescence detection device**

앞서 제작된 비드의 형광 신호를 현장에서 직접 실시간으로 측정하기 위한 디바이스를 제작하였음. 특히 형광 관측용 고가의 fluorimeter를 대체하기 위하여 3D 프린팅과 아두이노 그리고 스마트폰을 활용한 저가형 휴대형 원거리 형광감지기를 설계하고 비드 센서의 형광을 모니터링하도록 디바이스를 제어하는 소프트웨어를 개발함. arduino는 AVR 마이크로 컨트롤러를 기반으로 한 오픈소스 원보드 컴퓨터로서 전기/전자와 관련된 전문적인 지식이 없이도 스위치나 센서로부터 값을 받아들여, LED나 모터와 같은 외부 전자 장치들을 제어할 수 있음. 본 연구에서 사용된 아두이노 보드는 인텔에서 제작된 에디슨 보드이며 다수의 detection agent를 모니터링 할 수 있도록 x축과 y축으로 움직임이 가능한 두 대의 step 모터를 사용하였음. 또한 멀리 있는 Green 형광 단백질을 excitation 하기 위해 532nm 파장의 레이저를 사용하였고 형광 관측을 위한 570nm의 bandpath 필터를 사용하였음 (그림 4A). 디바이스의 housing에 필요한 프레임 디자인은 Autodesk의 Fusion 360 software를 사용하여 각 부품을 디자인하고 범용 3D 프린터를 이용하여 프레임을 제작함 (그림 4B). 아두이노를 통한 디바이스 컨트롤은 wifi 네트워크를 통하였으며 스마트폰의 이미지를 다운로드 후 분석하여 유해물의 유무를 판명할 수 있음. 실제 디바이스의 성능을 검증하기 위해 freeze stock cell을 이용하여 비드를 제작하고 이를 투명한 반응기에 넣고 페놀 농도별로 디바이스에서 모니터링 된 이미지를 분석하였음 (그림 4C). 약 3시간 디바이스를 작동시키며 페놀 실험군과 대조군 (without phenol)의 비드에 대한 형광을 모니터링 한 결과 시료에 약 1uM 농도 이상의 페놀이 존재할 경우 감지가 가능 한 것을 보였음 (그림 4D).

**결론**

약 20여년 전부터 미생물을 이용한 센서 연구가 진행이 되어왔고 특히 최근 환경오염이나 건강에 대한 관심이 높아지고 합성생물학 연구가 발달하면서 미생물 센서를 이용한 오염물질이나 인간의 장내 환경에 대한 모니터링에 미생물 센서를 활용하려는 연구가 증가하고 있음. 일반적으로 미생물이 감지하는 미세한 환경 변화를 가장 효율적으로 관찰자에게 전달해 주는 가시화 매개체로 발광이나 형광을 사용하고 있으나 이러한 광학 기반 방법의 경우 태생적으로 약한 생물학적 신호로 인해 관찰에 한계가 있고 특히 형광의 경우 고출력의 레이저와 필터를 갖춘 고가 장비가 필요한 단점이 있음. 본 연구에서는 이러한 단점을 극복하고자 세포간 통신을 활용한 sender-receiver로 이루어진 이종 세포 센서를 통해 신호 증폭을 최대화 하고 freeze stock 방법을 활용하여 센서 세포의 빠른 활용이 가능하도록 하였음. 또한 3D 프린터와 아두이노 그리고 스마트폰을 연계하여 고가의 형광 관측장비를 대체할 수 있는 저가형 원거리 형광 감지기를 제작하여 시료에 포함된 최소 1uM 농도의 유해물을 감지할 수 있음을 검증함. 본 연구는 합성생물학 연구와 메이커 기술의 융합을 통해 토양이나 수질, 공기 등의 오염을 모니터링 하는 등 사회문제를 해결할 수 있는 가능성을 보여주고 있음. 추후 cell free 시스템을 활용하여 GMO 이슈를 극복하고 비드 센서를 환경에 직접 사용하게 될 경우, 실시간으로 환경 모니터링이 가능할 것으로 기대되며 아프리카의 폭발물 감지나 농작물 재배용 토지 등 광범위한 지역에 대한 오염물 모니터링이 가능할 것임. 특히 100 달러 이하로 제작이 가능한 유해물 감지 디바이스는 농민 등 일반인에 비용 부담없이 공급 가능하며 3D 프린팅을 통한 부품 자급으로 오지에서도 활용이 용이할 것으로 기대함.

**방법**

**Sender/Receiver cell construction**

Sender cell 구축을 위해 P. putida 유래 dmpR 유전자를 포함하고 있는 pGESSv4 플라스미드 (pGESSv4, ACS Synth. Biol., 3: 163~171, 2014)을 PCR amplification 을 진행 하고 Vibrio fischeri 유래 luxI 유전자 (GenBank: Acc.No. CP000021.2)를 합성하여 PCR 을 진행. 각각의 PCR products를 gel-purification, Gibson Assembly (Master Mix Assembly Master Mix, NEB, USA) 수행 후 ligation. Receiver cell의 luxR 유전자(GenBank: Acc.No. CP000021.2)를 바이오니아에서 합성 후 PCR amplification을 수행하였고 eGFP 유전자를 포함하고 있는 pGESSv4 (pGESSv4, ACS Synth. Biol., 3:163~171, 2014)를 주형 DNA로 PCR amplification을 진행하여 각각의 PCR products를 gel-purified 한 후 Gibson Assembly (Master Mix Assembly Master Mix, NEB, USA)와 ligation 수행을 통해 pGESSv4-LuxR을 구축함. V. fischeri 유래 LuxR 전사인자에 의해 발현이 조절되는 Lux operon 부위, 즉 lux box와 프로모터를 포함하는 유전자 서열 (GenBank Acc.No. CP001133.1)을 바이오니아에서 합성하였고 (pGENB1-E.LuxBOX) 이들을 포함하는 DNA 조각의 PCR amplification을 수행. 이후 luxR 유전자를 포함하는 pGESSv4-LuxR 을 PCR amplification 을 진행하고 각각의 PCR products를 gel-purification과 Gibson Assembly (Master Mix Assembly Master Mix, NEB, USA)를 수행 후 ligation하여 Sender/Receiver용 plasmid pS-dmpR-luxI-rfp, pR-luxR-egfp를 구축함. 각각의 plasmid를 E. coli Dh5a 균주에 각각 형질전환 후 sender/receiver 세포 구축 완료. Pseudomonas putida sender의 경우 위에서 구축한 pS-dmpR-luxI-rfp plasmid를 primer11f, primer11r로 PCR 증폭 후 얻어진 Insert DNA 와 pBBRBB-eGFP (Addgene Catalog# 32549)를 template로 primer12f, primer12r로 얻어진 backbone을 Gibson Assembly 후 pBBRBB-dmpR-luxI-rfp plasmid를 구축함. 이렇게 얻어진 plasmid를 P. putida KT2440 균주에 형질 전환 후 sender로 사용함.

**Sender/Receiver cell 기반 유해물 감지 assay**

14mL round bottom tube에 LB broth 배지를 1mL 넣고 Ampicillin 100mg/mL 첨가. Sender 또는 Receiver를 키워둔 plate에서 single colony를 loop를 이용해 접종. E. coli의 경우 37도 P. putida의 경우 30도 200rpm shaking incubator에서 overnight배양하여 seed로 사용. Main culture를 위해서 14mL round bottom tube 각각에 LB broth 배지를 1mL 씩 넣고 Ampicillin 100g/mL를 첨가. 이후 sender 또는 receiver seed에서 각각 적당량을 취하여 최종 4% 접종. 37도 200rpm shaking incubator에서 Optical Density 600nm (OD600) 약 0.5까지 배양. 이후, substrate (phenol)을 처리하고 30도, 200rpm shaking incubator에서 15시간 배양. 배양이 끝난 후 각 샘플을 충분히 섞고 96 well plate에 200ul씩 로딩. Multi-plate reader (VICTOR)를 이용하여 OD600, GFP (ex: 485nm em: 535nm), RFP (ex: 531nm em: 595nm) 측정.

**Freeze stock protocol**

LB broth 배지 1mL 과 Ampicillin 100g/mL 첨가된 14mL round bottom tube에 sender 또는 receiver 단일 콜로니를 접종 후 37도 200rpm shaking incubator에서 overnight 배양하고, ampicillin 100g/ml이 첨가된 20ml LB를 포함하는 125 ml baffled flask에 1% 접종하여 37도 200rpm 조건으로 OD600이 약 0.5 가 될 때 까지 배양함. 이 후 배양액을 온도 조절이 되는 원심분리기에 4도, 3000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후, 상층액을 버리고 남은 펠릿에 본 배양액의 1/10 부피의 fresh LB를 넣어준 뒤 텝핑으로 cell suspension. 이 용액을 50% 글리세롤 용액과 7:3의 비율로 섞은 뒤 액체 질소로 급속 냉각한 후 -80도에 보관하여 freeze stock을 제작함.

-- 보고서 내용 --

● 특히 본 연구에서 사용한 페놀 감지 유전자회로는 Pseudomonas putida 유래의 전사조절단백질(dmpR), 프로모터, 리포터(형광단백질)로 구성되어 있으며 1μM ~ 100μM의 페놀 농도 감지 범위를 갖고 있음 (SL. Choi et al., ACS Synthetic Biology 2013). 위 유전자회로를 탑제한 대장균을 감지 센서로 활용하기 위하여 유전자회로의 신호를 극대화 할 수 있는 조건에서 장시간 보관 및 필요시 신속하게 꺼내어 바로 사용가능한 조건을 탐색함. 이를 위해 유전자회로 탑제 pUCB19 플라스미드를 대장균 DH5alpha에 형질전환 후 ampicillin이 50 ㎍/ml 첨가된 LB 고체 배지에 도말한 후 37℃에서 12시간 배양함. 배양 후 단일 콜로니를 골라 다시 ampicillin이 50 ㎍/ml 첨가된 LB 고체 배지에 루프(loop)를 이용하여 도말한 뒤 37℃에서 12시간 배양함. 이 후 단일 콜로니를 선별하여 ampicillin이 50 ㎍/ml 첨가된 1mL LB 액체 배지가 든 14ml 튜브에 접종 한 뒤 37℃도 200rpm에서 12시간 진탕배양 하여 전배양액으로 사용함. ampicillin이 50 ㎍/ml 첨가된 LB 액체배지 20ml에 1%(v/v)로 접종한 후 OD600nm 값이 0.5가 될 때까지 37도 200rpm에서 배양함. 그 후 위 배양액을 50ml 튜브에 옮기고 4℃ 1977g에서 10분간 원심분리를 수행한 후 상층액을 분리한 뒤 ampicillin이 50 ㎍/ml 첨가된 LB 액체 배지를 2ml 넣고 세포를 풀어줌. 대장균이 균일하게 풀어진 것을 확인 한 후, 멸균된 50% Glycerol을 1.5ml EP 튜브에 0.3ml 세포배양액을 0.7ml 넣고 액체 질소에 급속 냉각 시킨 뒤 -70 ℃에 넣어 보관함. 위와 같은 방법으로 stock된 세포를 꺼내어 37℃에서 해동한 뒤 ampicillin이 50 ㎍/ml 첨가된 Minimal media (0.1% Acetate) 9ml에 넣어 10배 희석하여 바이오센서 혼합용액으로 사용함. 그 결과 기존 전배양 본배양에 걸친 방법에 비해 높은 신호를 얻을 수 있었으며 이는 sigma 54기반의 DmpR 단백질 활성으로 인한 영향으로 보임 (그림 71). 이러한 방법으로 센서혼합액의 저장성을 개선하여 가용성을 높이고 준비 기간 및 신호 편차를 크게 줄이는 효과를 얻을 수 있음. 유전자 회로 프린팅을 위한 바이오잉크 개발: 유전자 회로의 프린팅을 위해서는 기존 cell free 시스템에서 사용되는 solution들을 scale up하여 프린팅 장비와 연계할 필요가 있음. 본 연구에서는 cell free 시스템을 위한 S12 lysate와 in vitro translation, transcription에 필요한 아미노산과 에너지 source 등이 함유된 Master mix를 제조하여 프린팅을 위한 바이오잉크의 재료로 사용함.

**Alginate bead based bacterial sensor**

6g sodium alginate를 200ml DW 에 녹인 혼합액과 2g calcium chloride 를 100ml DW에 녹인 용액을 준비. Freeze stock된 sender와 receiver 세포를 꺼내어 적당한 비율로 혼합하고 최종 OD600이 약 2 가 되도록 sodium alginate 혼합액 200ml과 섞음. 펌프에 지름 약 2mm 튜브를 연결하여 세포가 섞인 alginate 용액을 calcium chloride 100ml 용액에 떨어뜨리며 약 지금 약 2mm 인 alginate bead를 만듦. 비드를 CaCl2 용액에 약 30분간 정치시켜 안정화하고 PBS로 washing 을 수행하여 CaCl2를 제거.

**Remote fluorescence detection device**

디바이스의 housing에 필요한 프레임 디자인은 Autodesk의 Fusion 360 software를 사용함. 총 64개의 부품으로 구성되어 있으며 각 부품의 프린팅은 Fused Filament Fabrication 기술을 적용한 3D 프린터 (Ultimaker2+TM)를 이용하였고 Polylactic acid (PLA) 기반 재료를 사용함. 디바이스의 구동을 위해 두 개의 2상 4선식 42각 스텝모터를 (1.6kg/cm torque, 1.8degree/step, 3.2v, 0.8A, 17PM-J049-01WS, MenebeaJapan) 사용했으며 모터 드라이버의 분해능을 16으로 설정하여 (SBC-10, Moterbank) 사용함. 형광을 excitation 시키기 위해서 532 nm wavelength를 갖는 green laser module 을 이용하고 위 두 개의 스텝모터와 함께 제어하기 위한 컨트롤러는 아두이노를 사용함 (Intel® Edison kit for Arduino). Open-source Arduino Software (IDE) 를 사용하여 디바이스 제어 코드를 구현하였고 자세한 코드는 supplementary information을 참고. 이미지 캡쳐를 위한 스마트폰은 Samsung Note5를 사용하였고 캡쳐용 소프트웨어는 SelfiShop Camera 엡을 사용여 TRRS audio jack을 통해 아두이노의 신호를 전달하고 스마트폰을 제어하였음. 이를 위한 회로 구성 및 소프트웨어는 Supplementary information 참고. 스마트폰을 이용한 이미지 레코딩은 570nm의 bandpath 필터 통해 수행되었음. 디바이스가 여러 곳에 위치한 시료액의 비드를 모니터링 하기 위해서는 해당 위치들을 기억하고 일정 시간 간격으로 카메라를 회전하며 순환 하여야 함. 이를 위해서 스마트폰과 제어용 컴퓨터, 아두이노를 wifi로 연결하고 Sidesync 소프트웨어를 통해 카메라의 화면을 컴퓨터 화면으로 모니터링 하며 아두이노와 연결된 모터를 컴퓨터에서 제어하는 기능을 구현하였음.