

1
1
6
0
9
7
1
3

국
내
구
제
역
진
단
시
스
템
개
선
을
위
한
시
료
수
송
배
지
및
구
제
역
바
이
러
스
진
단
용
페
이
퍼
센
서
개
발
최
종
보
고
서

(건고덕
14p)

2018

(건고덕13p)

농
림
축
산
식
품
부

농
림
식
품
기
술
기
획
평
가
원

(건고덕
17p)

보안 과제(), 일반 과제(○) / 공개(), 비공개(), 발간등록번호(○)

발간등록번호

11-1543000-002914-01

(건고덕31p)

국내 구제역 진단 시스템 개선을 위한 시료
수송배지 및 구제역 바이러스
진단용 페이퍼센서 개발

최종보고서

2019.11.28.

(건고덕15p)

주관연구기관 / (주)메디안디노스틱
협동연구기관 / 전북대학교 산학협력단
협동연구기관 / 안전성평가연구소
위탁연구기관 / 충북대학교 산학협력단
위탁연구기관 / 농림축산검역본부

(건고덕 15.5p)

농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

(건고덕 20p)

<제출문>

제 출 문

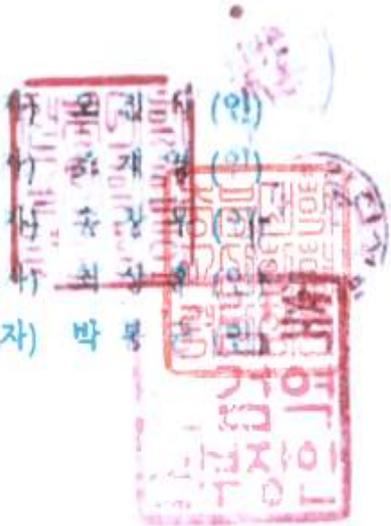
농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국내 구제역 진단 시스템 개선을 위한 시료 수송배지 및 구제역 바이러스 진단용 페이퍼센서 개발” (개발기간 : 2016. 09. 05 ~ 2019. 09. 04)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 10. 17.

주관연구기관명 : ㈜메디안디노스틱
 협동연구기관명 : 전북대학교 산학협력단
 : 안전성평가연구소
 위탁연구기관명 : 충북대학교 산학협력단
 : 농림축산검역본부

(대표자) 한재익 (인)
 (대표자) 강명균 (인)
 (대표자) 김양훈 (인)
 (대표자) 박복경 (인)



주관연구책임자 : 정 광 면
 협동연구책임자 : 한 재 익 / 강 명 균
 위탁기관책임자 : 김 양 훈 / 구 복 경

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116097-3	해 당 단 계 연구 기 간	2016. 09. 05~ 2019. 09. 04	단 계 구 분	(3)/(3)
연구 사업 명	단 위 사 업	가축질병대응기술개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구 과제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	국내 구제역 진단 시스템 개선을 위한 시료 수송배지 및 구제역 바이러스 진단용 페이퍼센서 개발			
연구 책임자	정 광 면	해당단계 참여연구원 수	총: 26명 내부: 9명 외부: 17명	해당단계 연구개발비	정부: 350,000천원 민간: 116,667천원 계: 466,667천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 26명 내부: 9명 외부: 17명	총 연구개발비	정부: 900,000천원 민간: 300,000천원 계: 1,200,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)메디안디노스틱 (기술연구소)			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: 충북대학교산학협력단/농림축산검역본부			연구책임자: 김양훈/구복경	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다) 보고서 면수

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>○ 구제역 백신 접종된 가축(우제류)이 구제역바이러스에 노출되어 감염될 경우 체내 백신항체에 의해 바이러스 증식이 대부분 억제되지만 구제역 바이러스가 미량으로 증식 될 수 있음. 이러한 백신 접종 상황 하에서 의심징후(구제역 바이러스 비구조 단백질(NSP, Non-Structural Protein)에 대한 항체 양성)가 있는 가축을 대상으로 구제역 바이러스 항원 진단률을 향상시키기 위한 방안으로써 다양한 오염물질과 함께 미량의 구제역바이러스가 포함되어있는 시료를 구제역바이러스의 손상 없이 구제역 정밀진단기관으로 안전하게 운송하기 위한 수송배지와 민감도가 향상된 구제역 바이러스 항원 진단키트를 개발하는 것이 본 과제의 목적임.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 다양한 환경오염물질이 포함되어있는 구제역 검사 시료 내 존재하는 구제역 바이러스를 감지할 수 있는 앵타머 개발 및 앵타머 & 자성입자를 이용한 바이러스 농축 가능 수송 배지의 개발 - Toehold switch RNA sensor 및 cell free translation kit를 이용한 구제역 항원진단용 페이퍼센서 개발 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 구제역바이러스 구조단백질과 반응하는 앵타머 3종 발굴 <ul style="list-style-type: none"> - 불활화 바이러스와의 반응성 확인 완료 ○ 구제역바이러스 구조단백질 특이 앵타머-자성입자 기반 바이러스 농축 및 수송 배지 프로토타입 완성 <ul style="list-style-type: none"> - 농축효능 및 수송배지로서의 적합성 시험 진행 중 ○ 구제역바이러스 3D gene을 target하는 Toehold switch sensor 1종 발굴 <ul style="list-style-type: none"> - Toehold switch sensor design 및 반응성 검증 완료 ○ trigger RNA(target gene) 의존적 toehold switch sensor 활성화 유무 및 이로 인한 reporter protein 발현량 분석을 위한 universal toehold switch sensor transcription & reporter protein 발현용 vector system 구축 ○ target gene과의 hybridization에 의해 toehold switch sensor의 translation 기작이 개시되어 발현되는 reporter protein detection system 개발 <ul style="list-style-type: none"> - lateral flow immunochromatographic assay platform - 반응시간 10min, 결과 육안판독, 비전문가 사용가능, 별도의 판독장비 불필요 ○ 구제역바이러스 RNA 유전자 검출용 GFP(Green Fluorescence Protein) 기반 페이퍼센서 개발 및 반응성 검증완료 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 구제역바이러스 의심시료 수송배지 제품화 및 구제역바이러스 항원진단용 페이퍼센서 제품화 ○ 불활화 구제역바이러스와의 반응성 있는 앵타머를 이용한 구제역바이러스 항원/항체 진단시스템 구축 가능 및 구제역바이러스에 대한 중화능 평가 가능 <ul style="list-style-type: none"> - 중화능이 확인 될 경우 구제역 치료제 및 바이러스 감염후 바이러스 증식 억제제로 개발 가능 ○ universal vector system을 통해 구제역바이러스 외 다양한 감염성 병원체 진단용 toehold switch 및 reporter protein을 매우 효율적으로 스크리닝하여 발굴할 수 있으며 선정된 toehold switch sensor와 reporter protein 이용한 진단키트 개발 가능 ○ 한가지 시료에 존재할 수 있는 다양한 감염성질환 원인체들을 동시에 스크리닝 가능 <ul style="list-style-type: none"> - 감염성 질환 원인체 유전자 별 특이 toehold switch design 및 특이 toehold switch sensor에 의해 translation 기작이 개시되어 발현되는 각각의 특이적인 reporter protein 감지 시스템 적용 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>가축질병</p>	<p>구제역</p>	<p>수송배지</p>	<p>페이퍼센서</p>	<p>진단법</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Livestock disease</p>	<p>FMDV</p>	<p>transport media</p>	<p>paper sensor</p>	<p>diagnostic method</p>

* 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	6
2. 연구수행 내용 및 결과	17
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	83
4. 연구결과의 활용 계획 등	88
붙임. 참고 문헌	89

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

가. 연구개발 목적

- (1) 구제역(foot and mouth disease, FMD)이란 소, 돼지, 양, 염소 등 발굽이 둘로 갈라진 우제류에 감염되는 급성 바이러스성 전염병으로, 발병 후 24시간 내에 발굽 사이, 입술, 혀, 잇몸, 코, 제관부 등에 수포가 생기는 것이 대표적인 증상임. 구제역 바이러스에 감염된 소는 번식장애 유발 및 급격한 산유량 감소 등의 생산성 저하를 동반하며 수포가 터진 부위에 세균에 의한 2차 감염에 노출되기 쉬움.
- (2) 구제역의 원인체는 *Picornaviridae Aphthovirus* 속에 속하는 foot and mouth disease virus(FMDV)로 RNA 바이러스이며 숙주역이 넓고 침습력이 강하며 감수성 개체에 질병을 일으킬 수 있는 감염 바이러스 량(infective dose)이 비교적 적고 잠복기간이 매우 짧은 것이 특징임. 또한 임상증상을 나타내기 전에 이미 바이러스가 숙주의 체외로 배설되기 시작하므로 인접한 다른 개체로의 직·간접적 전파가 매우 빠르게 일어날 수 있으며, 감염 동물 유래의 축산물에 의한 전파도 가능함. 일반 환경 내 바이러스의 생존기간은 통상 물에서는 최대 50일, 토양이나 건초 등에서는 26~200일, 혈액 등으로 오염된 나무나 금속에서는 최대 35일까지 생존한 기록이 있을 정도로 숙주 외에서도 장기간 생존이 가능한 것으로 알려져 있음.



그림 1. 구제역의 대표적 증상인 우제류 발굽 사이의 수포 (농림축산검역본부).



그림 2. 구제역 발병 개체의 유방에 생긴 수포 파열로 인한 상피탈락 (농림축산검역본부).

- (3) 이처럼 구제역은 전염성과 이환율이 높고 발병 개체의 대량 살처분을 요하므로, 축산 농가의 경제적 피해와 사회적 혼란 뿐만 아니라 매몰로 인한 주변 토양 및 지하수 오염 등의 환경적 문제까지 동반할 수 있음. 세계동물보건기구(World Organization for Animal Health, OIE)는 구제역을 A급 전염병으로 분류하고 있으며, 우리나라도 제 1종 가축 전염병으로 지정하고 있음.

- (4) 국내에서는 2000년 이후 구제역이 2~5년 주기로 지속적으로 발생, 현재까지 8건의 구제역이 발생하여 우리나라 축산업에 막대한 피해를 주고 있음.
- (5) 2010~2011년 구제역 발생 이후 모든 우제류에 대해 백신접종을 실시하는 것으로 구제역 방역 정책 전환과 함께 부분적 살처분 정책을 적용함에 따라 고밀도 양돈장 등에서 구제역 발생 시 쉽게 차단되지 않고 지속적으로 확산의 위험성이 있으며 또한, 백신접종 시 밀집사육 형태의 양돈장에서 임상증상이 미약하게 나타나는 경우 구제역을 조기에 발견하기가 쉽지 않음
- (6) 백신접종 시 임상증상이 미약하게 나타나 농장에서 쉽게 구제역 양성축 색출이 어려워짐에 따라 구제역 발생지역을 중심으로 NSP 항체 양성농가가 지속적으로 발생되고 있으나 이러한 농가에서 구제역 항원 검출은 쉽지 않고 실제적으로 보고된 건은 아주 적음
- (7) 국내에서 사용되는 백신은 백신생산 공정 중 비구조단백질 (non-structural protein, NSP)을 제거한 정제 구제역 불활화 백신으로 소 및 돼지 등 대상동물에 접종하였을 때 NSP에 대한 항체 형성 가능성이 낮음. 반면, 국내 혈청예찰 과정 중 NSP 항체양성 동물이 확인되고 있으며, 최근 발생한 구제역으로 인한 불현성 구제역 감염동물의 존재로 NSP 양성축의 검출이 지속될 수 있는 실정임
- (8) 백신을 여러 번 접종한 개체에서 백신에 잔존할 수 있는 NSP에 의하여 혈중에 NSP 항체가 검출될 가능성은 이미 국내 연구에서도 확인된 예가 있으나 효과적인 혈청학적 예찰 수행을 위한 백신접종 및 감염에 의해 생성된 NSP 항체의 지속기간 분석연구가 거의 없는 실정임.
- (9) 현재의 구제역 백신 정책이 향후 지속적으로 유지될 것으로 전망되므로 국내 구제역 방역 정책에서 수포가 아닌 소량의 바이러스가 포함된 시료에서 구제역 검사를 할 수 있기 위서는 바이러스를 농축할 수 있는 수송매지의 개발이 필요함.
- (10) 또한 소량의 바이러스를 검출하기 위해 본 연구개발 과제에서 제시한 페이퍼센서는 기존의 유전자 증폭 검사법의 틀을 변화시킬 수 있는 획기적인 방법이며 이를 활용한 다양한 진단 연구가 추진 될 수 있음.

나. 연구개발의 필요성

- (1) NSP 항체 양성농가에서의 구제역 항원진단은 진단시점에 따라 항원의 양이 급격히 감소되거나, 외부 환경에 노출된 후 구제역 항원검출 민감도가 떨어질 수 있으므로 이를 극복할 수 있는 민감도가 높은 진단법과 외부환경에 노출된 구제역 항원(RNA)이 안전하게 실험실까지 도달하여 구제역 유전자 검출이 용이하게 할 수 있는 시스템개발이 필요한 실정임

(2) 국내에서는 최근 돼지에서 구제역 모니터링 방법으로 양돈장 내 로프를 매달아 그 타액을 이용하여 바이러스 항원을 검출하는 진단법을 이용하고자 추진하고 있음. 그러나 이 방법은 시료에 많은 유기물이 혼재해 있고 오염물질이 많아 viral RNA 검출이 쉽지 않은 문제가 있으며 또한 우리나라 상황처럼 백신 후 배출되는 바이러스가 적은 경우 실험실에 도착한 시료에서 유전자 및 항원 검출률이 매우 떨어지는 문제점을 안고 있으며 이와 같은 결과는 2016년 7월까지 NSP 양성 농장이 303 농가를 대상으로 항원검사를 수행한 결과 양성은 단 4건 밖에 없는 것으로 설명이 가능함.

현실적으로 현장 시료가 정밀 검사 실험실에 도착하여 검사하는 경우 많은 시료가 real-time RT-PCR에서 Ct 값이 35(cut off 값)를 조금 넘는 음성인 경우가 많은데 이 문제는 안정적인 시료의 수송으로 해결할 수 있음.

(3) 구제역 바이러스의 검사를 위한 시료의 수송에 있어 세계 동물 보건기구(OIE)에서는 채취한 시료를 동량의 수송배지액 [글리세린과 0.04M phosphate buffer, pH 7.2 - 7.6 with added antibiotics (penicillin [1000 International Units (IU)], neomycin sulphate [100 IU], polymyxin B sulphate [50 IU], mycostatin [100 IU])에 넣어 냉장이나 냉동상태로 보내야 한다고 권고하고 있음. 구제역 바이러스는 특히 pH에 민감하기 때문에 이에 대한 조건을 강조하고 있음.

또한 시중에서 구제역 바이러스를 포함한 모든 바이러스를 수송할 수 있는 배지를 판매하고 있으나 이는 국내에서의 구제역 진단을 위해 의뢰되는 시료의 상태가 다양한 유기물과 오염물질에 노출되어 있으며 바이러스 농도 또한 극소량인 경우가 많으며 최소한 1ml이상에서 5ml 정도의 배지에 넣어야 하는 문제로 시료가 희석되는 문제점을 갖고 있음(그림 3).

(4) Suh 등은 (2014) 식품내 *Campylobacter jejuni*의 real-time PCR 검출 민감도를 높이기 위한 방법으로 aptamer magnetic capture system을 이용한 결과 기존의 항체를 붙여 세균을 모으는 방법에 비해서 10-13%이상 민감도가 높아지는 결과를 확인함(그림 4). 따라서 구제역 바이러스를 특이적으로 결합하여 안정한 상태로 유지할 수 있는 앵타머를 발굴하고 이와 함께 마그네틱 비드를 이용한 농축기능이 있는 수송배지를 개발하여 국내 구제역 진단의 문제점(구제역 백신접종 후 야외 감염 시 동물에서 유도 될 수 있는 소량의 구제역 바이러스의 정밀진단 시 나타날 수 있는 위음성)을 해결 하고자 함



그림 3. 상용화된 가축의 바이러스 배양용 수송용 배지.

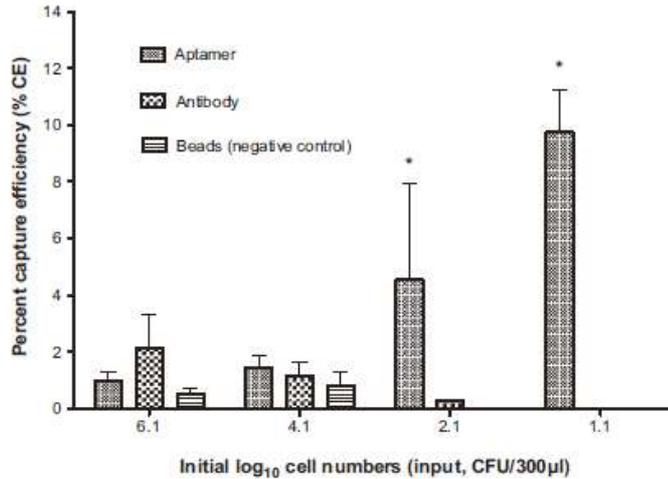


그림 4. 식품내 *Campylobacter jejuni*의 검출을 위한 항체와 앱타머 처리의 비교.

- (5) 또한 이 수송배지 시스템과 더불어 본 연구에서는 합성생물학의 플랫폼 기술들을 적용한 유전자 회로 조작을 통한 바이오 센싱 플랫폼(Riboswitch의 일종인 Toe-hold switch sensor 및 cell free translation system을 이용한 바이러스 유전자 진단시스템)으로 이를 활용하여 간단하거나 필요하지 않는 전처리 과정 후 페이퍼에 시료를 적시는 것만으로 병원체 유전자를 검출하여 발색을 통해 결과를 확인 할 수 있는 매우 효과적인 방법을 제시하고자 함. 또한 cell free translation system에 의해 발현된 단백질을 감지하기 위하여 항원항체 반응을 이용한 detection system (immunochromatographic assay)을 개발하여 현장에서의 활용성을 높일 수 있는 system으로써의 가능성을 평가하고자 하였음.

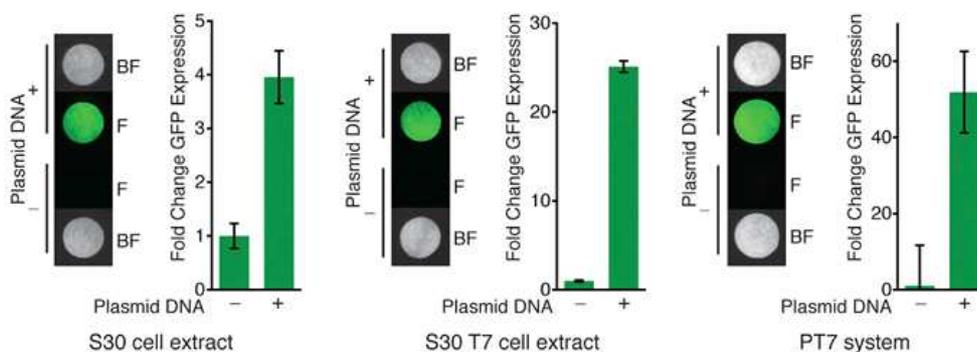


그림 5. 병원체 검출이 가능한 PT7 cell-free system과 S30 cell extraction 시스템 비교실험 결과 (출처: Pardee *et al.* Cell, 2014)

- (6) 본 연구에서 제시한 앱타머 기반 구제역 시료 수송배지의 개발 및 페이퍼센서의 개발은 구제역 방역정책을 추진하는데 매우 중요한 부분임과 동시에 이 기술이 국내외적으로 발생이 증가하고 있는 다양한 인수공통감염병에 활용될 수 있기 때문에 국가 방역 체계 구

축과 국민의 건강증진 목적에서 정부의 지원이 매우 필수적인 연구임.

다. 연구개발 범위

구분	내용
최종목표	<p>국내 구제역 백신 상황에서 구제역 바이러스 검사를 위한 다양한 오염된 시료를 운송하기 위한 새로운 수송 시스템의 개선과 소량의 구제역 바이러스 항원 진단용 진단 키트 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 기존 구제역 시료 수송 과정 대비 100배이상의 민감도 유지 수송배지 시스템 개발 - 기존 항원진단 키트 대비 10배 이상의 민감도 높은 진단 키트 개발
세부목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 다양한 구제역 검사 시료를 대상으로 한 구제역 바이러스 앵타머를 포함한 수송 배지의 개발 ○ 구제역 수송 배지 시스템의 실험실 내 및 현장 적용 실험 ○ 구제역 백신 상황에서 저농도의 구제역 항원 검출을 위한 민감한 페이퍼센서의 개발 ○ 구제역 바이러스 검출용 페이퍼센서의 효능 및 안정성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 국내 구제역 바이러스 진단용 Toehold switch 센서 디자인 - Toehold switch 센서 스크리닝 - Cell-free 페이퍼센서 제작 ○ 국내 구제역 발생 상황에 적합한 구제역 진단 시스템 개선

(1) 1차년도

㉠ 개발 목표

- 주관연구기관 (메디안디노스틱)
 - : 구제역 진단을 위한 수송배지 조성 분석 및 페이퍼센서 제작 기반 시설 구축
- 제 1 협동연구기관 (전북대학교)
 - : 구제역 NSP 항체 양성 양돈장 분석 및 시료를 이용한 상용화 수송배지의 비교 분석
- 제 1 위탁기관 (충북대학교)
 - : 구제역 진단 시스템 개선에 활용될 구제역 바이러스 진단용 앵타머 개발을 위한 표적 물질 확보
- 제 2 협동연구기관 (안전성평가연구소)
 - : 페이퍼센서용 구제역 바이러스 유전자 분석 및 probe 제작
 - : 국내 구제역 바이러스 진단용 toehold 센서 디자인
 - : 구제역 바이러스의 RNA를 인식하기 위해 riboswitch 형태의 toehold 형 switch 센서를 디자인함
 - : toehold switch는 T7 promoter를 가지고 있도록 디자인하여, 해당 구제역 바이러스의 RNA가 있을 경우 switch가 풀리면서 switch 말단에 존재하는 eGFP, LacZ 또는 기타 발색반응을 확인할 수 있도록 함. 이를 위해 T7 promoter정보와 최적의 toehold형 switch 형태를 생물정보학 기법을 이용하여 디자인하도록 함.
- 제 2 위탁기관 (농림축산검역본부) : 양돈장 시료의 수송배지별 항원 검출 시험 분석 및 민감도 평가

㉡ 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관 (메디안디노스틱)
 - : 구제역 진단을 위한 수송배지 조성 분석 및 구제역 시료 조성 분석을 통한 오염물질 분석
 - : 기존의 진단 키트 형태에 포함될 수 있는 형태의 페이퍼 센서 제작 시설 구축

- 제 1 협동연구기관 (전북대학교)

- : 구제역 NSP 항체 양성 양돈장 분석 및 오염 시료별 항원 양성률 평가
- : 오염된 시료를 이용한 기존 배지와 연구 개발 된 수송배지의 효능 평가 및 개선

- 제 1 위탁기관 (충북대학교)

- : 가축 환경 내 구제역 바이러스의 진단 및 검출용 앵타머 개발을 위한 표적 물질 확보
- : 각종 문헌 및 서열 조사를 통한 가축 환경 내에서 구제역을 유발하는 바이러스 또는 바이러스 표면 특이 발현 단백질의 선별
- : 문헌 조사를 통하여 선정된 구제역 바이러스 또는 바이러스 표면 특이 발현 단백질의 확보



그림6. 표적 물질에 특이적으로 결합하는 앵타머 선별을 위한 SELEX 모식도

: 다양한 선행연구 결과를 통하여 확보한 DNA/RNA 앵타머 선별 및 확보를 위해 SELEX (Systematic Evolution of Ligands of Exponential enrichment) 기술을 기반으로 표적 단백질 또는 균주와 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 선별하고자 함. 표적 단백질 또는 균주와 결합하는 DNA 앵타머를 선별하기 위하여 먼저 무작위 서열을 가진 방대한 핵산의 라이브러리에서 제작하고, PCR 및 asymmetric PCR 등의 기법을 이용하여 dsDNA 라이브러리 증폭, ssDNA 라이브러리로의 분리, 선별함. 이렇게 확보된 ssDNA 라이브러리는 상기 연구에서 확보한 효소 또는 균주와 반응 시킨 후, 표적 물질과 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머만을 선별, 회수하여 PCR을 이용하여 이를 다시 증폭시키는 SELEX process를 총 8~15회에 걸쳐 반복 수행함으로써 표적 물질과 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 선별 확보하고자 함.

: 또한 선별된 앵타머의 다양한 적용 실험을 위해서는 표적물질과 특이적으로 결합하는 최적 앵타머를 선별해야함. 이를 위하여 SPR (Surface Plasmon Resonance) 기술, EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) 법, western blotting 등 다양한 분석 기법을 이용하여 표적 단백질 또는 균주에 특이적으로 결합하는 앵타머의 결합력을 정량

적으로 측정하고, 최적 앵타머를 선별하고자 함.

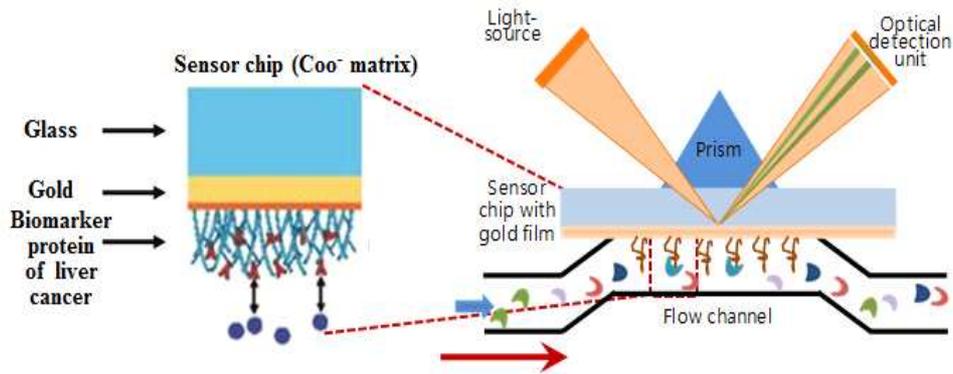
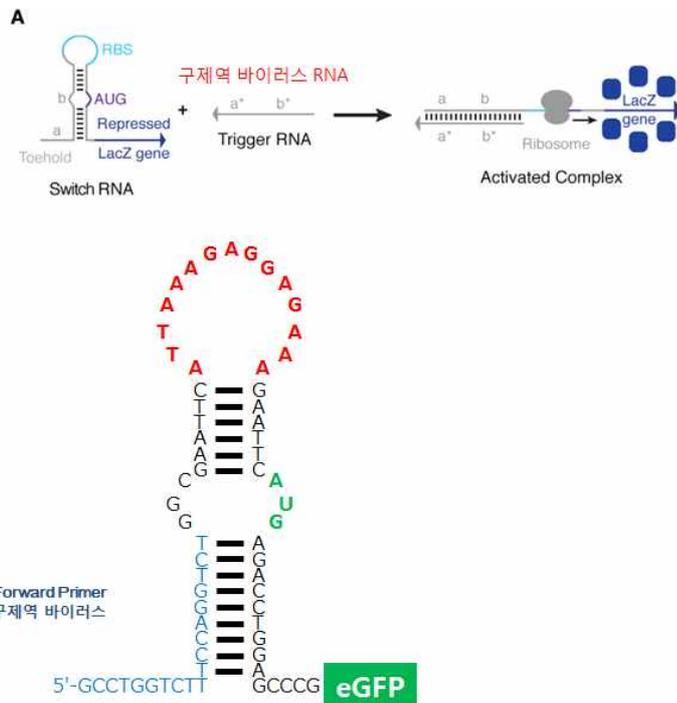


그림7. 앵타머의 결합능을 평가하기 위한 SPR 실험

- 제 2 협동연구기관 (안전성평가연구소)

* 국내 구제역 바이러스 진단용 Toehold 센서 디자인



<그림8. 구제역 바이러스를 검출하기 위한 Toehold 형 Switch RNA의 예시>

- 제 2 위탁기관 (농림축산검역본부)

: 양돈장 시료의 수송배지별 항원 검출 시험 분석

: 일선 양돈장에서 구제역 검사를 의뢰하는 시료를 기준으로 바이러스 검출 극대화를 위한 수송 시스템 및 바이러스 농축 프로토콜을 확립함

: 최근의 구강액 검사 시스템에 적합한 바이러스 농축 시스템의 개발을 위한 바이러스 농도별 민감

도 검사 수행

- : 구제역 바이러스를 함유한 시료에서의 유전자 검사 분석
- : 다양한 수송 환경에서 운반된 시료에서의 구제역 바이러스 유전자 증폭 검사의 민감도 및 효율성 평가
- : 구제역 바이러스 특성상 생물안전3등급 시설인 검역본부 구제역진단과 차폐 실험실에서 모든 과정 수행함

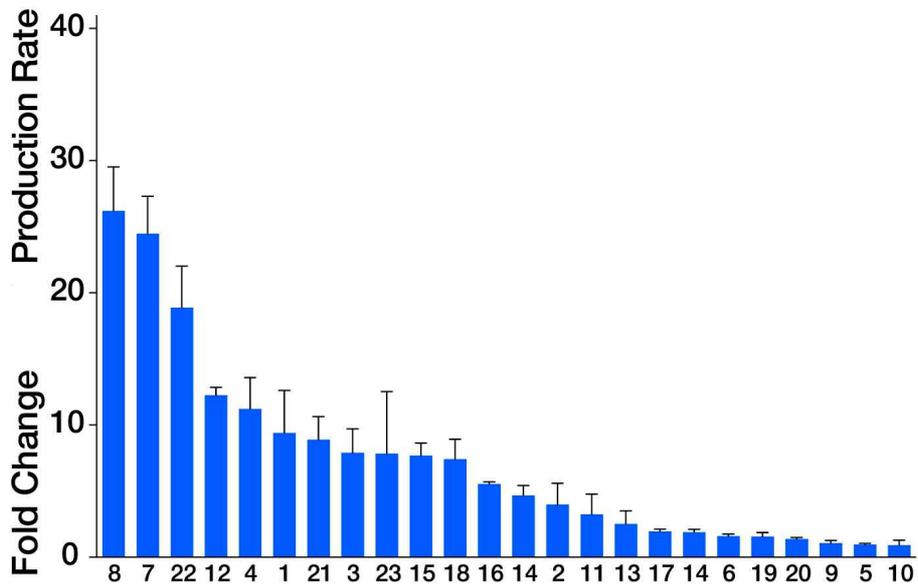
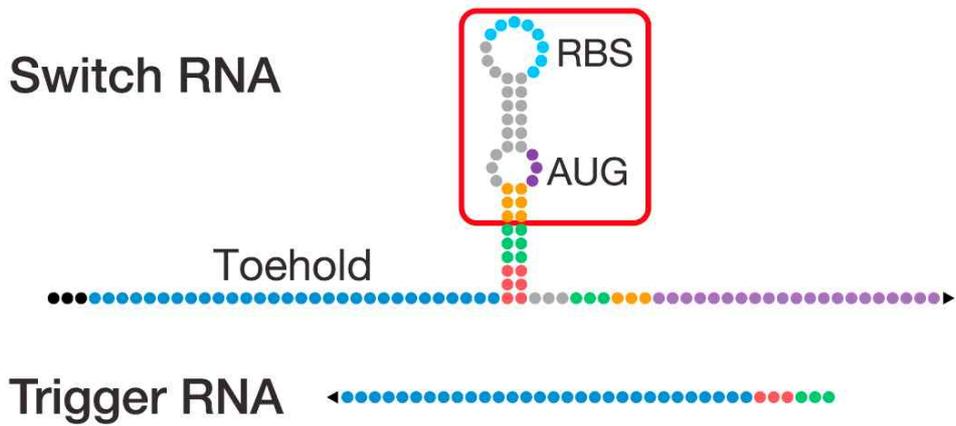
(2) 2차년도

㉓ 개발 목표

- 주관연구기관(메디안디노스틱)
 - : 구제역 의심 시료의 수송 배지 제작 및 페이퍼센서 시작품 제작
- 제 1 협동연구기관(전북대학교)
 - : 시료를 이용한 구제역 수송배지 안정성 실험
- 제 1 위탁기관 (충북대학교)
 - : 구제역 진단 시스템 개선을 위한 구제역 바이러스 특이 결합 앵타머 제작, 선별 및 확보
- 제 2 협동연구기관(안전성평가연구소)
 - : 구제역 검출 페이퍼센서 민감도 증진 실험 및 Toehold 센서 스크리닝
 - : Toehold 센서 스크리닝의 경우 디자인된 15~25base 크기의 toehold switch 들의 효과를 확인하기 위하여 reference RNA를 통하여 스크리닝을 수행함. 스크리닝 결과에 따라 민감도를 높이기 위한 재 디자인을 통해 민감도가 높은 Toehold switch를 선별함.
- 제 2 위탁기관 (농림축산검역본부)
 - : 양돈장 시료의 수송배지별 항원 검출 및 페이퍼센서의 민감도, 특이도 분석

㉔ 개발 내용 및 범위 (시스템 구성도, 구조 등을 그림으로 구체적 표현)

- 주관연구기관(메디안디노스틱)
 - : 구제역 진단을 위한 시료 수송배지 시작품 제작
 - : 구제역 페이퍼센서 시작품 제작
- 제 1 협동연구기관(전북대학교)
 - : 구제역 NSP 항체 양성 양돈장 시료에서의 수송 배지 안정성 평가
 - : 오염된 시료를 이용한 연구개발된 수송배지의 효능 평가 및 개선 실험
- 제 1 위탁기관 (충북대학교)
 - : 가축 환경 내 구제역 바이러스 검출/진단용 특이 결합 앵타머 선별 및 확보
 - : 앵타머 스트리닝 기법인 SELEX 법을 이용한 구제역 바이러스 검출용 DNA 앵타머 선별, 동정 선별된 구제역 바이러스 특이 결합 앵타머 후보군의 표적 물질에 대한 특이성 및 민감도 측정
- 제 2 협동연구기관(안전성평가연구소)
 - : Toehold 센서 스크리닝 (다양한 Toehold Switch를 제작하여, Control대비 eGFP또는 LacZ의 Fold Change가 높은 센서를 선별하는 작업을 수행함)



<그림 9. 후보 Toehold Switch 스크리닝 예시>

- 제 2 위탁기관 (농림축산검역본부)
 - : 양돈장 시료의 수송배지별 항원 검출 시험 분석
 - : 국내 분리 구제역 바이러스를 함유한 시료에서의 유전자 검사 민감도 분석

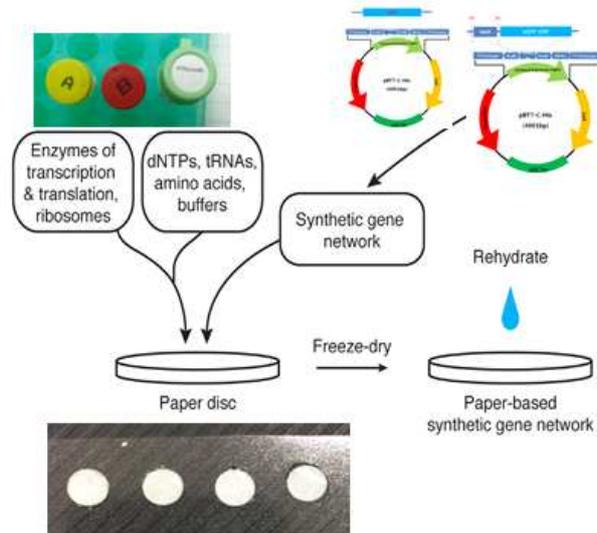
(3) 3 차년도

① 개발 목표

- 주관연구기관 (메디안디노스틱)
 - : 구제역 진단을 위한 수송배지 조성 분석 및 페이퍼센서 제작 기반 시설 구축
 - : 구제역 페이퍼센서의 경우 국내 인허가를 위한 성능시험 (민감도/특이도/안정성/재현성) 수행 및 인허가 자료 작성
- 제 1 협동연구기관 (전북대학교)
 - : 구제역 NSP 항체 양성 양돈장 분석 및 시료를 이용한 상용화 수송배지의 비교 분석
- 제 1 위탁기관 (충북대학교)

- : 가축 환경 내 구제역 바이러스 진단용 페이퍼 제작을 위한 앵타머의 화학적 변형 및 안정성 평가
 - 제 2 협동연구기관 (안전성평가연구소)
 - : Cell-free 페이퍼센서 제작
 - : 바이러스 시료 및 NSP 항체 양성 시료에서의 검증 실험 및 이를 통한 민감도, 특이도 평가
 - 제 2 위탁기관 (농림축산검역본부)
 - : 양돈장 시료의 수송배지별 항원 검출 시험 분석
 - : 개발된 페이퍼센서와 수송배지의 민감도 특이도 비교 검사 수행
 - : 기존의 진단법인 RT-PCR과 ELISA와의 비교 시험 수행
- ② 개발 내용 및 범위 (시스템 구성도, 구조 등을 그림으로 구체적 표현)
- 주관연구기관 (메디안디노스틱)
 - : 구제역 진단을 위한 수송배지 제작
 - : 기존 진단 키트 형태에 포함될 수 있는 형태의 페이퍼 센서 제작
 - : 제작된 페이퍼센서의 성능평가 자료를 바탕으로 국내 인허가 서류 작성
 - 제 1 협동연구기관 (전북대학교)
 - : 제작된 수송 배지를 이용한 구제역 NSP 항체 양성 양돈장 분석 평가
 - : 구제역 페이퍼센서의 현장 적용 실험 및 개선
 - 제 1 위탁기관 (충북대학교)
 - : 가축 환경 내 구제역 바이러스 진단용 페이퍼 제작을 위한 앵타머의 변형 및 안정성 평가
 - : 가축 환경 내 소량으로 존재하는 구제역 바이러스를 진단하기 위한 앵타머의 화학적 변형 및 구조적 안정성 평가
 - : 화학적 변형을 통한 앵타머의 구제역 바이러스 진단 여부 확인 및 센서 내 구제역 바이러스 포집 여부 확인
 - 제 2 협동연구기관 (안전성평가연구소)
 - : 구제역 바이러스 진단용 페이퍼센서 개발
 - : Cell-free 페이퍼센서 제작 (2차년도까지의 연구성과물을 바탕으로 Reference RNA 뿐만 아니라 채집된 구제역 바이러스에서 민감도가 높은 Toehold Switch 센서를 바탕으로 현장에서 사용할 수 있는 POCT 개념의 페이퍼 센서를 제작하고 테스트를 수행함)

<페이퍼 센서 제작과정>



<그림 10. POCT개념의 Cell free 페이퍼센서 제작 모식도>

- 제 2 위탁기관 (농림축산검역본부)
 - : 구제역 바이러스 의심 시료를 위한 수송 배지의 개선 시험
 - : 구제역 바이러스 검출용 페이퍼 센서 유전자 검사 분석 개선 시험

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 구제역 진단시스템 개선을 위한 시료 수송배지 개발

(1) 구제역 바이러스 관련 문헌조사 및 바이러스와 관련 된 핵심 유전자 발굴

- 가축 환경 내에서 구제역을 유발하는 바이러스와 관련된 핵심 유전자 등에 대해 종래 보고된 논문 및 서열 정보를 미국 국립생물정보센터 (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov)에서 nucleotide 정보를 통해 확보함.
- 확보한 유전자 서열 정보를 토대로 핵심 인자의 대량확보를 위해 관련 핵심 유전자는 PCR을 통해 서열의 대량 확보 후 pET21a 등의 재조합 발현 벡터를 활용하여 핵심 유전자의 클로닝을 진행함.
- 본 연구에서는 세계동물보건기구 (World Organization for Animal Health, OIE)에서 A급 전염병으로 분류하고, 우리나라에서도 제 1종 가축 전염병으로 지정하고 있는 구제역의 원인인 구제역 바이러스의 특정 단백질을 타겟으로 선정하고 클로닝을 수행하고자 하였음. 먼저 구제역을 유발하는 구제역 바이러스 관련 핵심 유전자의 서열정보는 미국 국립 생물 정보센터를 통해 확보하였으며, 핵심 유전자로서 capsid protein을 암호화하는 P1을 선정하였음. PCR을 통해 얻은 P1 유전자를 제한 효소 처리를 통해 pET21a 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제작하였음. 재조합 벡터는 동일한 제한 효소 처리 후 전기영동을 통해 P1 유전자가 삽입된 것을 확인하였으며, 재조합 벡터를 E. coli BL21(DE3) 숙주세포에 전기천공법 (electroporation)을 이용하여 형질 전환을 수행하였음. 이를 통해 형질 전환 된 단일 클론을 확보할 수 있었음.

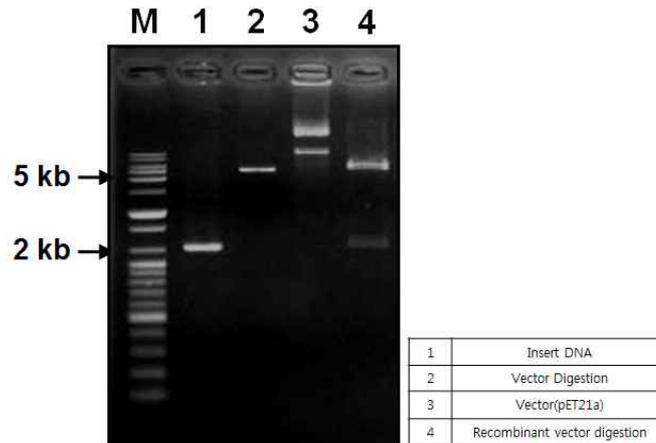


그림 2-가-1. 구제역 바이러스 관련 핵심인자의 서열 정보 및 클로닝 실험 결과

(2) 가축 환경 내에서 구제역을 유발하는 구제역바이러스 단백질의 확보

- 기 확보한 구제역 바이러스 핵심 유전자를 확보해둔 발현벡터를 포함하고 있는 세포를 여러 농도의 IPTG 와 함께 배양하여 단백질 발현 최적 조건을 확인하고, 확인한 최적조건으로 발현 벡터를 포함한 세포를 키움으로서 단백질의 과발현을 유도하여 해당 단백질을 확보하려함.
- 상기의 연구 과정을 통해 확보한 P1이 재조합된 pET21a를 포함하고 있는 E. coli BL21 (DE3) 재조합 클론을 획득하여, LB broth에 seed culture를 위하여 12시간 이상 배양한 후 본 배양배지에 접종하여 세포의 성장과 함께 capsid protein의 과 발현을 유도함으로서 대량 확보하려 함.

- *E. coli* BL21(DE3) 재조합 클론을 통한 단백질의 발현 결과를 보면 정제하여 사용이 가능한 soluble protein의 발현이 제대로 이루어지지 않은 것을 확인할 수 있음.
- (주)메디안디노스틱에서 재조합 클론을 통해 발현한 뒤 정제한 FMDV capsid protein을 제공받아 앵타머 선별과정인 SELEX를 진행하기로 함.

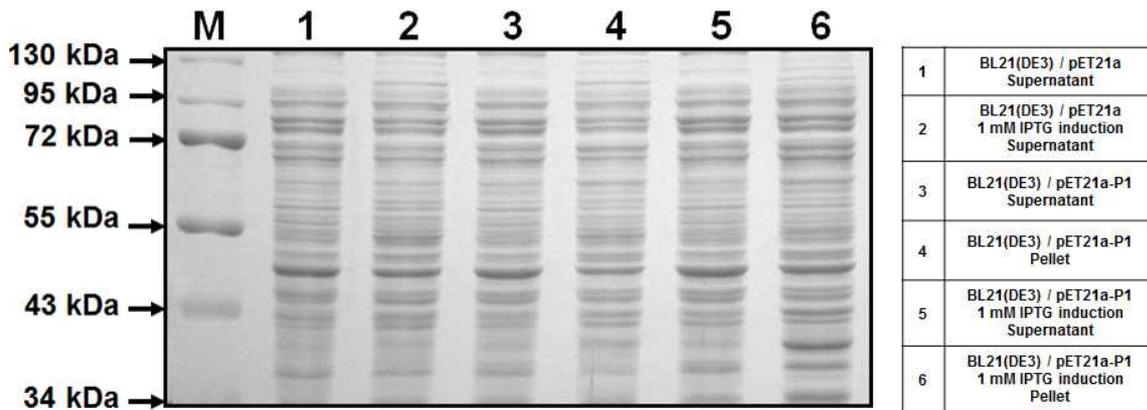


그림 2-가-2. IPTG induction을 통한 단백질 과발현

(3) FMDV(Foot-and-Mouth Disease Virus) capsid protein에 특이적으로 결합하는 앵타머 개발

- (주)메디안디노스틱으로부터 제공받은 FMDV (Foot-and-Mouth Disease Virus) capsid protein을 타겟으로하여 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) process를 진행함. 이 과정을 통해 FMDV capsid protein에 높은 친화력과 특이성을 가진 DNA 앵타머 후보군을 선별하는 중임.
- FMDV(Foot-and-Mouth Disease Virus)의 P1 유전자에서 발현되어지는 capsid protein과 특이적으로 결합하는 앵타머를 선별하기 위하여 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) process를 수행함. 타겟에 특이적인 DNA 앵타머를 제작하기 위하여 76bp의 주형 DNA와 이를 증폭할 수 있는 두 개의 프라이머를 제작 및 확보하였음. 주형 DNA로 사용되는 랜덤 DNA 라이브러리는 PCR 기법을 이용하여 증폭하였으며, PCR 기법을 통해 확보된 DNA 라이브러리는 PCR purification kit (Qiagen, USA)를 이용하여 정제하여 DNA 라이브러리 만을 회수함.

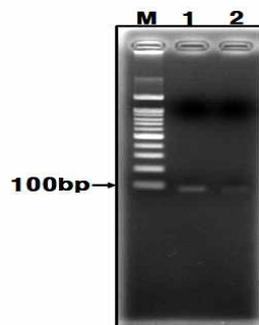


그림 2-가-3. PCR을 통해 얻은 DNA 라이브러리 정제

- DNA 라이브러리로부터 ssDNA만을 확보하기 위해, 정제된 dsDNA를 가열-냉각 기법과 스트랩 타아비딘 (Pierce, USA)을 이용하여 회수함. 회수한 ssDNA는 85°C에서 5분간 끓여 변성시킨 후, 상온에서 천천히 식혀 ssDNA 앵타머의 안정한 3차원 구조를 형성하였음. 안정한 3차원 구조를 형성한 ssDNA를 일정 농도의 타겟 단백질과 결합 시킨 후, 4°C에서 12시간 이상 반응시킴. 타겟 단백질은 His tag를 붙여두었으며, 이 단백질에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 선별하기 위하여 Ni-NTA bead를 사용하였음. 우선 비드를 1X His binding buffer로 활성화 시켜준 뒤, 12시간 이상 반응시켜두었던 단백질-앵타머를 넣어주었음. 이후, 원심분리를 통해 상층을 회수하였으며 1X washing buffer를 통해 세 차례 비드를 씻어내며 타겟 단백질과 결합하지 않는 앵타머들을 제거함. 비드를 씻어내며 결합하지 않은 앵타머를 모두 제거한 후에는 elution buffer를 넣고 85°C에서 끓이는 과정을 두 번 거치며 단백질과 결합한 앵타머를 회수함. 일련의 과정을 통하여 FMDV capsid protein과 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 회수 할 수 있으며, 회수된 DNA 앵타머는 여러 라운드를 통해 좀 더 특이적으로 결합하는 앵타머를 선별이 가능해짐.
- Ni-NTA bead를 이용하여 His tagging이 달린 타겟 단백질에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 선별하는 라운드 도중에, Ni-NTA에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 제거하기 위하여 네가티브 선별 (negative selection)을 진행함. 네가티브 선별은 다른 라운드와는 달리 타겟 단백질 없이 Ni-NTA bead와 앵타머만을 반응시킴. 이때, 원심분리를 통하여 Ni-NTA bead와 결합하지 않은 앵타머를 회수하여 다음 라운드를 진행함.

(4) SELEX를 이용한 구제역 바이러스 표적물질에 결합하는 앵타머 개발

- (주)메디안 디노스틱으로부터 제공받은 FMDV (Foot-and-Mouth Disease Virus) capsid protein을 타겟으로하여 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) process를 진행하여 완료하였음. SELEX 과정은 11 라운드까지 진행되었으며, 이 중 최적 앵타머 라운드를 선별하기 위하여 Nano-drop spectrophotometer를 이용하여 가장 효율이 좋은 라운드를 선별하였음. 각 round에서 elution된 앵타머의 농도를 확인함으로써 표적 단백질인 FMDV P1 단백질의 결합력이 가장 높은 round를 선별할 수 있었으며, 실제 10 round가 FMDV P1 단백질과 가장 특이적으로 결합하는 최적 앵타머 풀임을 확인 할 수 있었음. Nano drop을 이용하여 이용하여 확인된 FMDV P1 단백질과의 결합 효율이 가장 높은 11 aptamer round를 활용하여 FMDV P1 단백질과 특이적으로 결합하는 앵타머 후보군을 획득하기 위한 T-vector cloning을 실시함. 이를 통하여 획득된 clone들의 DNA sequencing 분석을 진행하였음. 이와 같은 실험을 통하여 FMDV P1 단백질과 특이적으로 결합하는 앵타머 총 11개를 획득할 수 있었음. 선별된 각 앵타머 후보군들의 구조는 Rensselaer polytechnic institute에서 제공하는 DNA mfold 프로그램을 활용하여 이미지화 함.

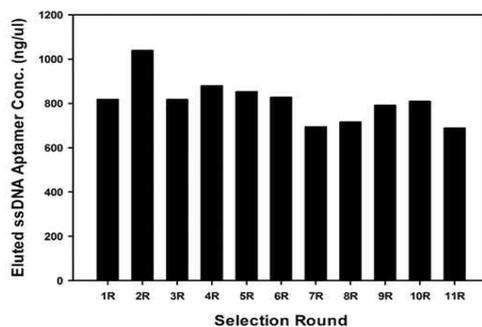


그림 2-가-4. Nano-drop을 활용한 각 round의 affinity 확인 결과

(5) 구제역 바이러스 특이 결합 앵타머 후보군의 결합력 평가

- 확보된 11개의 FMDV P1 단백질 결합 DNA 앵타머 후보들은 post-SELEX를 수행하여 각각의 DNA 앵타머들이 FMDV P1 단백질로부터 높은 농도로 회수되는지 여부를 확인하였으며 가장 결합력이 높아 고농도로 회수되는 FMDV P1 단백질 결합 DNA 앵타머를 선별하고자 하였음. 실험결과, FMDV P1 단백질 결합 DNA 앵타머 1번과 4번, 9번 앵타머에서 높은 결합력으로 고농도의 DNA가 회수되었음을 판단하여 FMDV P1 단백질 결합 DNA 앵타머로서 1번과 4번, 9번을 선정함.

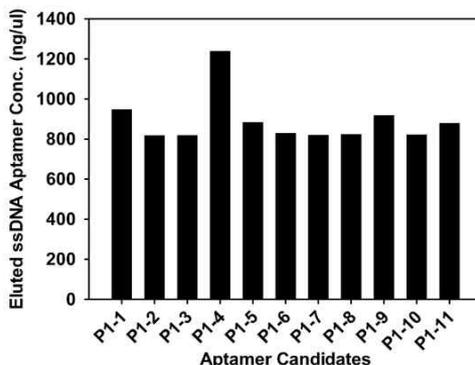


그림 2-가-5. Post-SELEX를 통한 최적 FMDV P1 단백질 DNA 선별

- FMDV P1 단백질과 특이적으로 결합하는 최적 앵타머 3종의 친화도를 정량하기 위하여 SPR 실험을 진행함. SPR은 표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance, SPR) 원리를 차용하고 있는 실험으로 표적 물질과 결합물질간의 친화도를 정량적으로 계산하여 보여주는 특징을 가지고 있음. FMDV P1 단백질과 각 앵타머 후보군과의 친화도를 정량하기 위하여 표면이 카르복실기로 코팅된 센서 칩 CM5(GE Healthcare)을 활용하였으며, 센서 칩 CM5는 0.1M Nhydroxysuccinimide (NHS)와 0.4 M N-ethyl-N'-(dimethyl aminopropyl) carbodiimide(EDC) 혼합액을 5μl/min의 속도로 10분 동안 칩에 흘려 칩 표면을 활성화시켜 카르복실기를 반응성이 더 좋은 N-hydroxysuccinimide ester로 바꾸었음. NHS-ester로 활성화된 센서 칩 CM5의 표면에 FMDV P1 단백질을 고정하기 위하여 10 mM sodium acetate 완충액에 100μg/ml의 농도로 녹아 있는 FMDV P1 단백질 용액을 5μl/min의 속도로 10분 동안 처리하였으며, FMDV P1 단백질이 고정된 센서 칩은 1M 에탄올아민 하이드로클로라이드(pH 8.5)를 5μl/min의 속도로 10분 동안 칩에 흘려줌으로써 남아 있는 반응기를 불활성화하였으며, 이와 같은 실험 과정을 통하여 다른 시약 및 앵타머가 센서 칩 표면에 직접 결합하는 것을 방지함. FMDV P1 단백질과 FMDV P1 단백질 결합 앵타머의 결합에 의하여 발생하는 속도 변수는 BIA 평가프로그램(BIACORE)으로 수득, 정량하였음.
- FMDV 표면에 발현되는 capsid protein P1 단백질과 가장 높은 친화력을 가지는 앵타머를 선별하기 위하여 기 확보된 FMDV P1 단백질 결합 앵타머 후보군 3종은 HBSEP buffer에 각 앵타머를 1μM, 2μM, 3μM의 농도로 희석하여 준비함. 다양한 농도로 준비된 FMDV P1 단백질 결합 앵타머 후보군들은 아무것도 결합시키지 않은 센서 칩 (채널 1), FMDV P1 단백질이 고정된 센서칩 (채널 2)에 흘려줌으로써 FMDV P1 단백질과 앵타머 후보군간의 친화도를 정량할 수 있었음. 각 FMDV P1 단백질 결합 앵타머 후보군의 해리상수 (K_D , dissociation)를 수득하여 확인한 결과 앵타머의 해리상수가 1번 앵타머는 3.436×10^{-10} M, 4번 앵타머는 6.675×10^{-14} M, 9번 앵타머는 9.284×10^{-11} M로 높은 친화도 값을 가지고 있음을 확인 할 수 있었음.

- 또한 본 연구에서 개발한 FMDV P1 단백질의 serotype은 O 형으로, 보다 특이적으로 결합하는 앵타머를 확보하기 위하여 다른 serotype에 대한 P1 단백질과의 친화도 측정을 진행하였음. 실험 방법은 상기에 제시된 SPR을 이용하여 동일하게 진행되었음. 실험결과 선별된 최종 앵타머 후보군은 serotype에 따라 결합력이 달라지는 것을 확인하였음. Serotype A형과 asia1 P1 단백질에 대해 결합력을 측정한 결과, 앵타머를 선별한 O형과는 다르게 serotype A와 asia1에서는 결합력이 매우 낮은 것을 확인하였음.

[Affinity of P1 serotype O and aptamer]		[Affinity of P1 serotype A and aptamer]		[Affinity of P1 serotype Asia1 and aptamer]	
Aptamer	K_D (M)	Aptamer	K_D (M)	Aptamer	K_D (M)
P1-1	3.436×10^{-10}	P1-1	1.131×10^{-6}	P1-1	2.392×10^{-5}
P1-4	6.675×10^{-14}	P1-4	9.425×10^{-6}	P1-4	2.821×10^{-5}
P1-9	9.284×10^{-11}	P1-9	6.445×10^{-6}	P1-9	8.165×10^{-6}

그림 2-가-6. FMDV P1 결합 최적 앵타머 3종과 serotype에 따른 P1 단백질 결합력 차이
(왼쪽) serotype O P1 단백질과의 결합력, (가운데) serotype A P1 단백질과의 결합력, (오른쪽) serotype asia1 P1 단백질과의 결합력

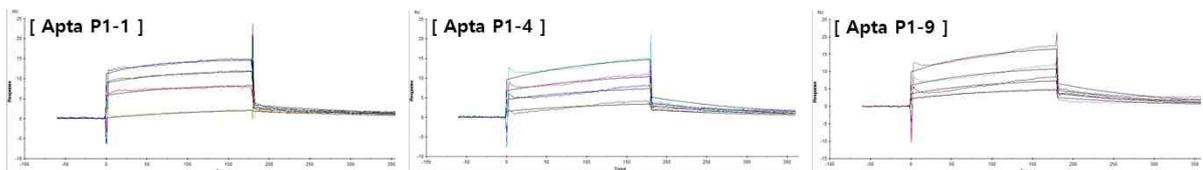


그림 X. FMDV serotype A P1 단백질과의 결합력

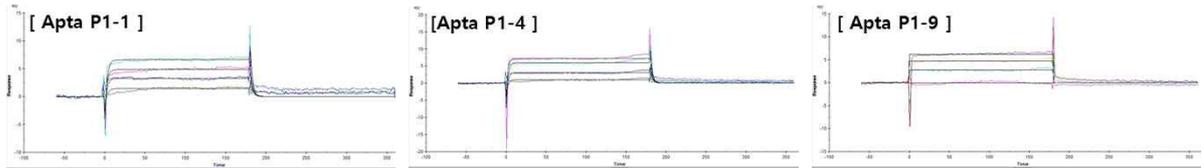


그림 2-가-7. FMDV serotype asia1 P1 단백질과의 결합력

(6) 구제역 바이러스 표적 결합 최종 앵타머 확보 및 안정성 평가

- FMDV P1 단백질에 결합하는 최적 앵타머 3종의 DNA 앵타머가 실제 구제역 바이러스 샘플에 결합이 가능한지 확인하였음. 실제 FMDV를 실험을 할 수 없으므로, 불활화된 O형 바이러스가 결합되어 항체 생성 여부를 판단하는데 이용되는 PrioCHECK FMDV Type O Antibody ELISA Kit (ThermiFisher SCIENTIFIC, USA)를 사용하여 앵타머와 FMDV가 결합 유무에 대해 확인하는 실험을 진행하였음. PrioCHECK FMDV Type O Antibody ELISA Kit는 농림축산검역본부로부터 제공받아 사용되었으며, 실험 방법은 검역본부에서 제시하는 방법으로 항체 대신 앵타머를 이용하여 실험을 진행하였음. 항체 대신 Cy5가 달린 앵타머를 처리한 뒤 형광 값을 측정하기 위해 SpectraMax M2 (Molecular Devices, USA)를 이용하여 형광값을 측정하였음. 형광값을 측정하기 전, 바이러스와 결합하지 않은 앵타머를 제거하기 위해 1X PBS를 이용해 수차례 세척하였다. SpectraMax M2를 이용하여 측정 한 결과, 앵타머를 처리하지 않은 경우에는 형광을 띄지 않았으며, 앵타머를 처리한 경우에 높은 형광강도를 나타내었음. 9번 앵타머의 형광 강도가 2874.77로 가장 높았으며, 1번과 4번은 각각 2012.03와 2586.21의 값을 나타내었음.

그리하여 재조합 단백질이 아닌 불활화된 실제 바이러스에도 앵타머가 결합을 한다는 것을 확인할 수 있었음.

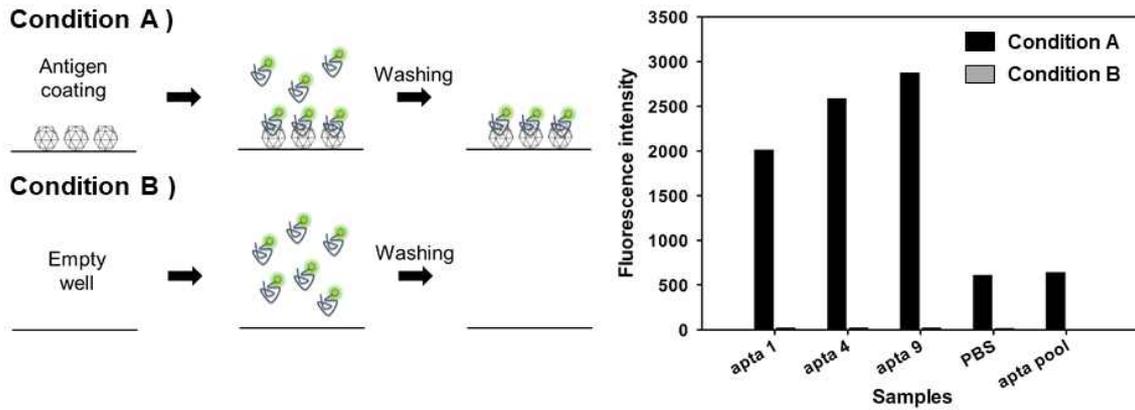


그림 2-가-8. 불활화 된 FMDV를 이용한 최적 앵타머 후보군 3종의 결합 유무 확인

(7) 구제역 바이러스 앵타머의 화학적 변형을 통한 표적 물질 검출력 확인

- FMDV P1 단백질에 결합하는 최적 앵타머 3종의 DNA 앵타머가 구제역 바이러스 serotype 별로 검출이 가능한지 확인하고자 하였음. 앵타머 3종의 화학적 변형 - 형광물질 (fluorescein; FAM)을 앵타머 5번 말단에 변형 시킨 후, 앵타머 기반의 assay를 통하여 구제역 바이러스 serotype 검출을 진행하였음. 먼저 NOS group이 coating 되어있는 96-well plate를 이용하여 각 항원 단백질 (P1 protein serotype O, A, asia1)을 결합, 고정시켰음. 그리고 FMDV P1 단백질에 결합하는 형광물질 화학적 변형을 한 최적 앵타머 3종을 각 well에 처리하였으며, 반응이 끝난 후 1X PBS buffer로 5회 이상 washing을 진행하여 non-specific binding을 제거하였음. 실험결과, 앵타머 1번에서 serotype asia1에 일부 결합하는 것을 제외하고 나머지 앵타머 4번과 9번에서 다른 serotype 단백질에 결합하지 않는 것을 확인하였음. 또한, P1 단백질에 결합력이 없는 aptamer pool을 동일하게 실험을 진행한 결과, 아무런 반응이 보이지 않는 것으로 보아 본 연구에서 선별한 FMDV P1 단백질에 결합하는 앵타머 3종은 FMDV P1 단백질 serotype O에만 결합하는 것으로 확인되었음.

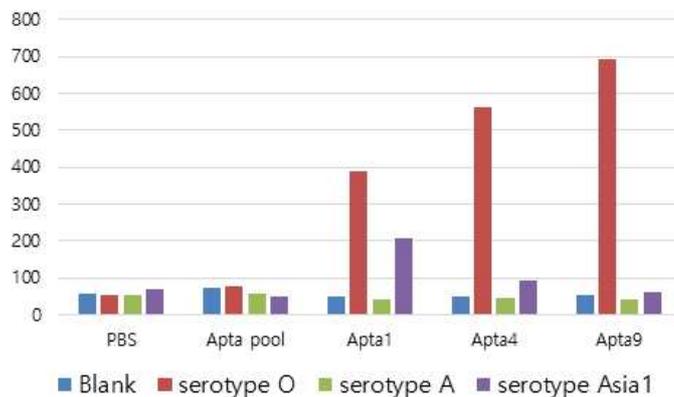


그림 2-가-9. FMDV P1 단백질 serotype에 따른 화학적 변형된 앵타머의 결합력 확인

(8) 센서 내 앵타머 적용시 앵타머 안정성 평가 및 결합력 여부 확인

- FMDV P1 단백질에 결합하는 최적 앵타머 3종의 DNA 앵타머가 실제 구제역 바이러스 샘플에 결합이 가능한지 앵타머의 결합능을 확인하기 위하여 FMDV P1 단백질에 결합하는 최적 앵타머 3종의 농도에 따른 불활화 바이러스 검출유무를 확인하였음. 실험 방법은 이전 차년도의 구제역 바이러스 표적 결합 최종 앵타머 확보 및 안정성 평가 실험과 동일하게 진행이 되었으며, 처리한 앵타머는 화학적 변형을 진행하여 사용하였음. 상기 실험에서 앵타머의 5번 말단에 화학적 변형을 진행하여도 표적 단백질에 높은 결합력 및 특이성을 가지고 있는 것을 확인하였으므로, 이의 농도를 각각 다르게 하여 앵타머의 민감도를 평가 하는 실험을 진행하였음. 앵타머의 농도는 0, 0.001, 0.01, 0.1, 0.5 그리고 1 nM 로 진행하였음. 실험 결과, 4번 앵타머가 불활화된 바이러스에 가장 민감하게 반응하는 것으로 나타났으며, 농도가 증가할수록 더 많은 불활화된 바이러스에 더 많이 결합하는 것을 확인할 수 있었음. 이러한 결과를 통하여 앵타머를 센서에 적용하여 활용 시, 처리할 앵타머의 적정농도를 확인할 수 있었음.

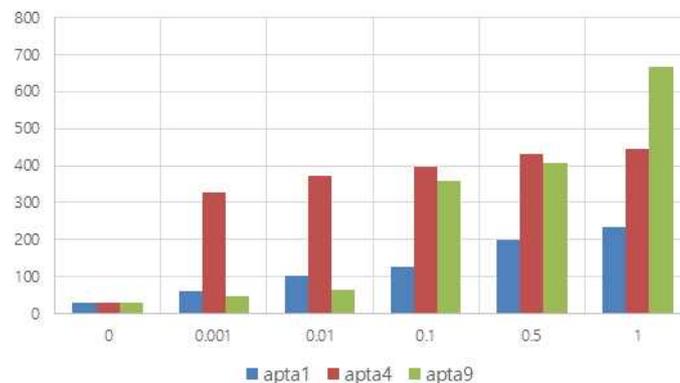


그림 2-가-10. 화학적 변형된 앵타머의 실제 센서로의 적용 시 앵타머의 결합력 평가 확인

- 실제 실험을 통하여 확인된 앵타머-표적 단백질의 결합 형태를 다양한 조건에서도 동일하게 결합 할수 있는지 확인하기 위하여 *in silico* 분석을 통한 FMDV 결합 앵타머와 FMDV P1 단백질의 결합구조 형태를 확인하였음. 단백질과 앵타머의 구조 예측은 MOE 2016.08 프로그램을 이용하였으며, 3차원 구조 시각화 프로그램은 PyMol 프로그램을 이용하였음. FMDV P1 단백질 구조는 Phyre II를 이용하여 단백질 3차원 구조 모델을 예측하였고, 본 연구에서 개발한 DNA 앵타머는 2차원 구조를 Mfold 프로그램을 이용하여 예측하였고, 이를 기반으로 하여 RNA의 3차원 구조를 RNAcomposer 사이트를 이용하여 PDB 파일로 만들었으며 3차원 구조 형태로 시각화하였음. 확보된 RNA 구조 모델을 이용하여 Pymol 프로그램을 이용하여 DNA 앵타머 구조 모델을 확보하였음. 확보한 구조를 이용하여 FMDV P1 단백질 구조와 DNA 앵타머 3종을 각각 docking 시켜 결합 부위를 예측하였음. 구조를 예측하기 전, 단백질과 앵타머는 구조의 에너지를 최소화하는 minimization 과정을 진행하였음. Docking 진행 후 결과는 Pymol 프로그램을 이용하여 결합 부위를 예측하였음. 해당 분석시 다양한 buffer 조건을 넣어 분석을 진행하였으며, 극한 환경(매우 낮거나 높은 pH, high salt 조건)의 변화가 아닐 시, FMDV P1 단백질과 앵타머의 결합 형태는 변하지 않는 것으로 확인되었음. 본 연구팀의 연구결과를 바탕으로 국내 특허 출원 준비 중에 있음. (10월 말 국내 특허 출원 예정)

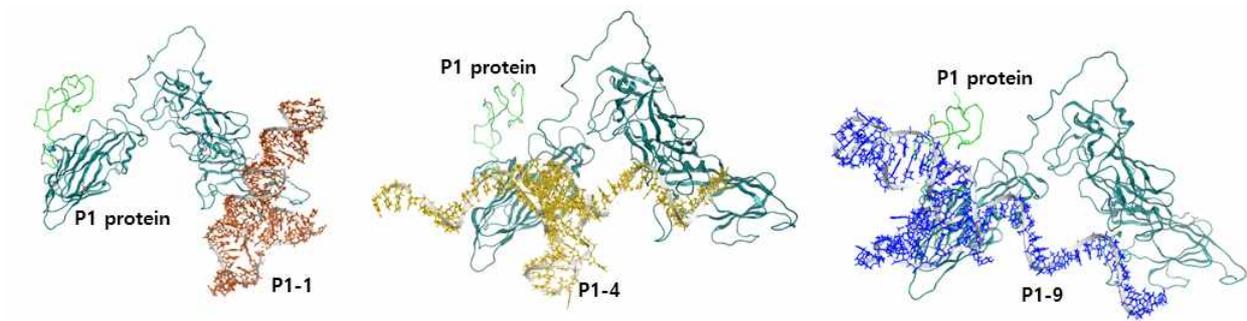
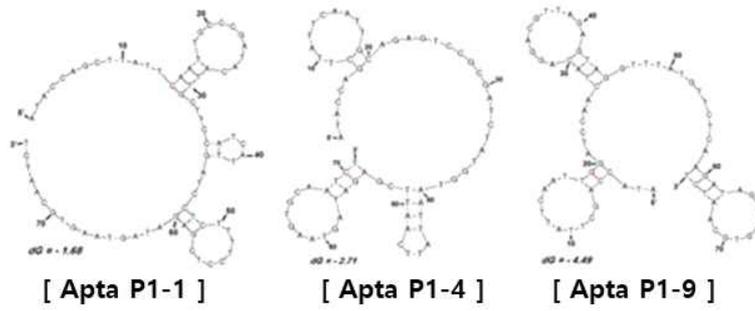


그림 2-가-11. FMDV P1 결합 최적 앵타머 3종의 2차원, 3차원 구조 형태

(위쪽) FMDV P1 결합 최적 앵타머 3종의 2차원 구조 형태, (아랫쪽) FMDV P1 단백질과 앵타머의 3차원 결합

(9) 구제역 바이러스 특이 앵타머-자성입자 복합체 제작 및 효능평가

- 실험 진행 중

나. 구제역 바이러스 진단용 페이퍼센서 개발

(1) Cell-free system

(가) Cell-free system 정의

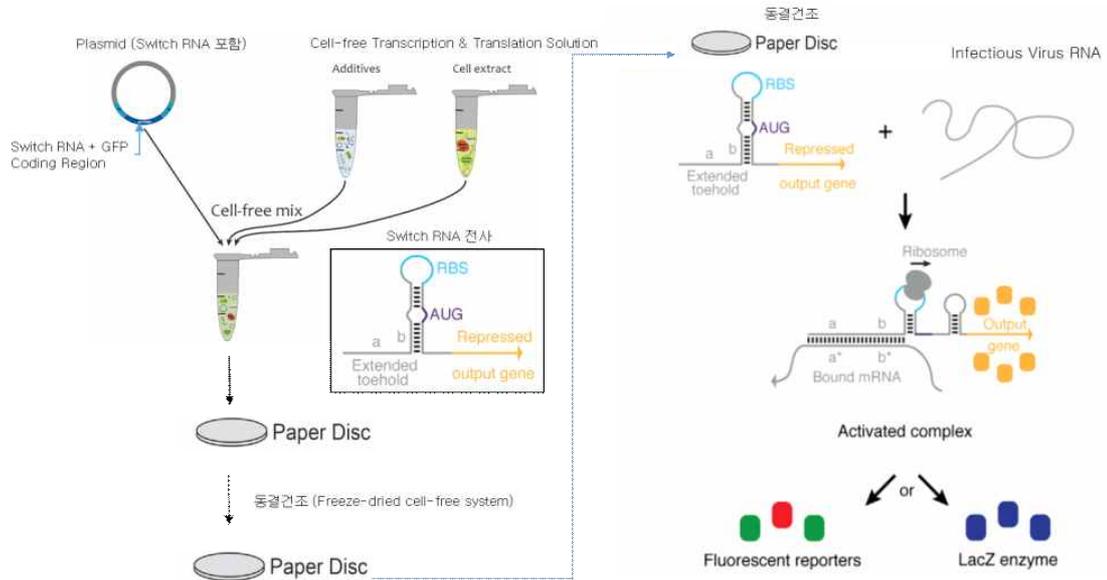
- Cell free system이란 Cell에서 일어나는 생물학적 반응을 cell을 사용하지 않고 in vitro 환경에서 구축한 것을 말하며, 많은 다른 세포 소기관 없이 반응 가능하도록 세포 내 molecular machinery를 초원심분리 (ultra-centrifugation)를 통해 얻어낸 용액을 의미함
- 다양한 정제된 효소와 조효소의 mixture를 이용한 Cell-free system은 미생물 발효시스템과 비교해 비용을 절감할 수 있는 생물학적 제조방법으로 여겨지고 있으며, 단백질 합성을 E.coli를 키우지 않고 빠르게 수행할 수 있는 새로운 대체 수단으로 평가되고 있음
- 본 연구에서는 Cell-free system을 FDMV 검출하는데 적용하고 있음

(나) Cell-free system의 장점

- 세포막 없이 쉽게 조작·접근이 가능함
- 이전에 할 수 없었던 살아있는 병원체나 화학 촉매를 사용한 생물학적 반응을 시행할 수 있음
- 부산물을 생성하거나 cell mass를 합성할 필요 없이 매우 많은 양의 생성물을 얻을 수 있음
- 종이 위에서 반응시킬 수 있어 휴대가 간편하며, 저비용의 virus 진단 플랫폼으로 제작 가능함
- 종이 위에 동결 건조시켜 상업적으로 이용 가능하므로 값싸고 살균된 상태로 의료, 건강, 산업, 연구, 교육 등의 다양한 분야에 배포 가능
- 눈으로 검출할 수 있도록 색깔로 측정가능한 생산물을 만들어 현미경 없이 현장에서 사용가능

(다) 전체 흐름도

- 1단계 : virus를 검출하기 위한 Switch RNA를 넣은 플라스미드를 제작
- 2단계 : 바이러스 유무 및 정량적 확인을 위해 Reporter gene으로 녹색 형광을 나타내는 eGFP 또는 눈으로 직접 확인이 가능한 lacZ을 사용함
- 3단계 : Cell이 아닌 microtube에 cell-free transcription&translation solution(NEB)과 제작한 플라스미드를 섞어줌
- 4단계 : 만들어진 mixture를 종이 위에 떨어트려 동결건조 시킨 후 감염된 virus 등 target RNA를 넣어주면 Switch RNA와 반응해 reporter gene이 발현. 최종적으로 바이러스 유무를 확인할 수 있음



<Cell free system 개념도>

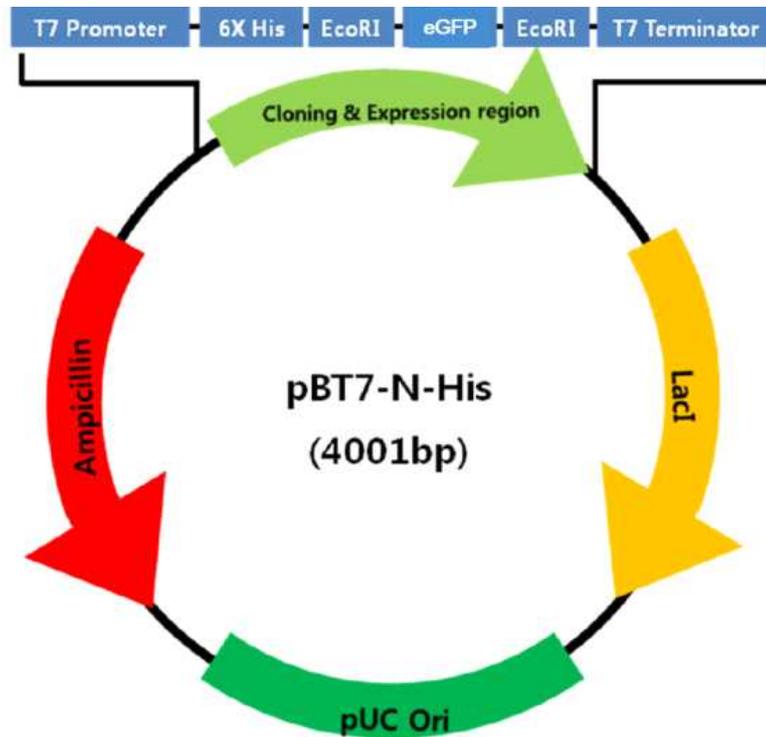
(라) 관련 연구

- MIT의 Collins 그룹에서는 PT7 cell-free system과 S30 cell extraction 시스템 비교. PT7 system은 상용으로 판매되는 cell-free 유전자 발현 시스템으로서 50배 정도의 민감성의 보이는 것을 확인함. 또한 센서 제작의 비용을 줄이기 위해 S30 cell의 extraction을 이용하여 제작된 센서의 경우는 약 4배정도의 민감도를 보이는 것을 밝힘 (출처 : Keith Pardee et al, Cell, 2014)
- Collins 그룹에서는 cell-free system과 switch RNA를 이용하여 Zika virus를 검출하는데 성공하였음 (출처 : Keith Pardee et al, Cell, 2016)

(2) Cell-free system 세팅

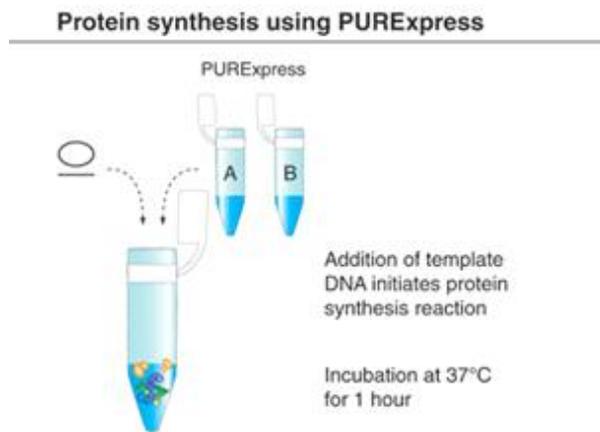
(가) Cell-free 세팅용 벡터

- pBT7-N-His-eGFP : cell-free system에서 reporter 유전자가 발현을 잘 하는지 확인하기 위하여, protein expression vector(pBT7-N-His, 바이오니아 구매)에 eGFP(720bp, NC_025025.1)에 cloning하였음. pBT7-N-His 벡터는 단백질 합성을 위한 translation vector로 EcoRI 사이에 Cloning site가 위치하며, His-tag은 N-terminal과 C-terminal 2군데에 모두 가능한 벡터임. N과 C-terminal 모두 eGFP를 cell-free system을 테스트해 보았으며, 결론적으로 N-terminal His-tag 있는 벡터에서 cell-free system이 효과적으로 작용하는 것을 확인하였음



<cell-free system 테스트용 eGFP 발현 vector, pBT7-His-tag>

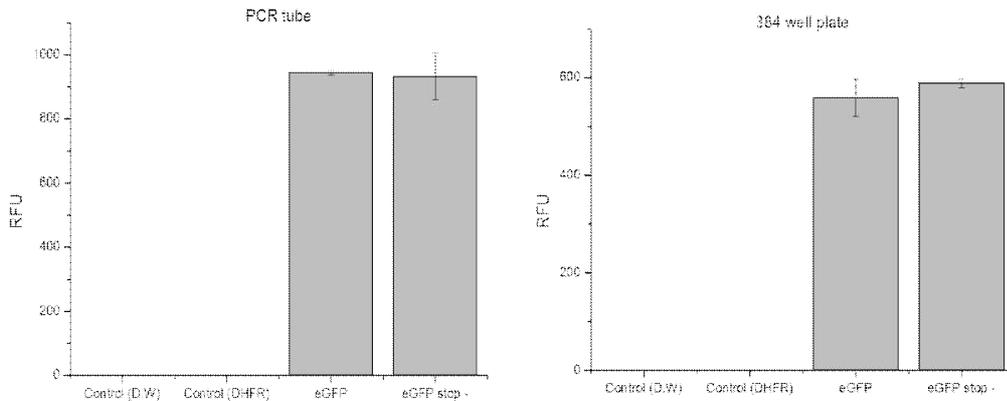
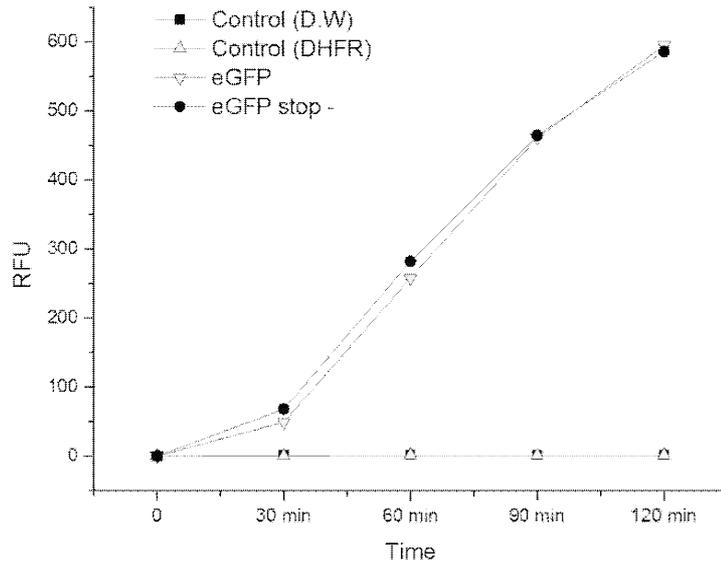
(나) Cell-free solution (Pure system, NEB)



- 본 연구에 사용된 cell-free solution은 PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Kit(NEB) 로 빠르게 유전자 발현 분석이 가능하며 E.coli translation에 필수적인 정제된 구성성분을 대체할 cell-free transcription/translation system임. PURExpress platform은 nuclease, protease가 없어 완전한 형태의 DNA, RNA templates 상태로 유지하고 결과적으로 단백질의 변형과 분해가 자연스럽게 일어남. Transcription과 translation은 단지 2개의 tube만을 이용해 원스텝으로 반응이 수행되며 1 시간 후에 결과를 얻을 수 있음.

- 본 연구에서는 Reporter 유전자인 eGFP가 cell-free에서 최대 발현 농도 지점을 확인하기 위해 (saturation point) 3시간(240분)이 이상 반응하였으며, 결과적으로 eGFP는 2시간일때까지 발현이 계속 이루어지다가 saturation 되는 것을 확인함
- Cell-free system에서 eGFP의 형광 발현 세기(RFU)는 control 대비 약 600배까지 차이나는 것으로 확인함

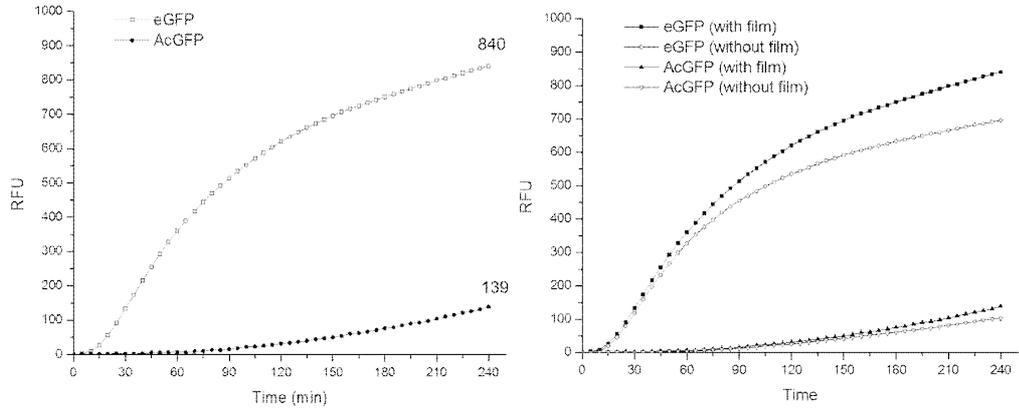
① NEB에서 eGFP expression 테스트



- 첫 번째 그래프는 Cell free system에서 NEB solution을 사용했을 때 eGFP expression 테스트를 진행한 그래프로 Control로 D.W 사용하고, NEB solution만 넣었을 때(DHFR) RFU 값이 측정되지 않지만 eGFP vector가 정상적으로 expression 되는 것을 확인함. His tag이 expression에 영향을 주는지 확인하기 위해 eGFP의 stop codon을 제거해 비교실험한 결과 차이가 없음을 확인함

- 두 번째, 세 번째 그래프는 eGFP translation vector를 NEB solution에서 2시간 반응시킨 후 end point 값을 각각 PCR tube, 384 well plate에서 수행한 것으로 첫 번째 그래프와 마찬가지로 eGFP가 expression 된 것을 확인 가능함

② eGFP, AcGFP 비교 테스트

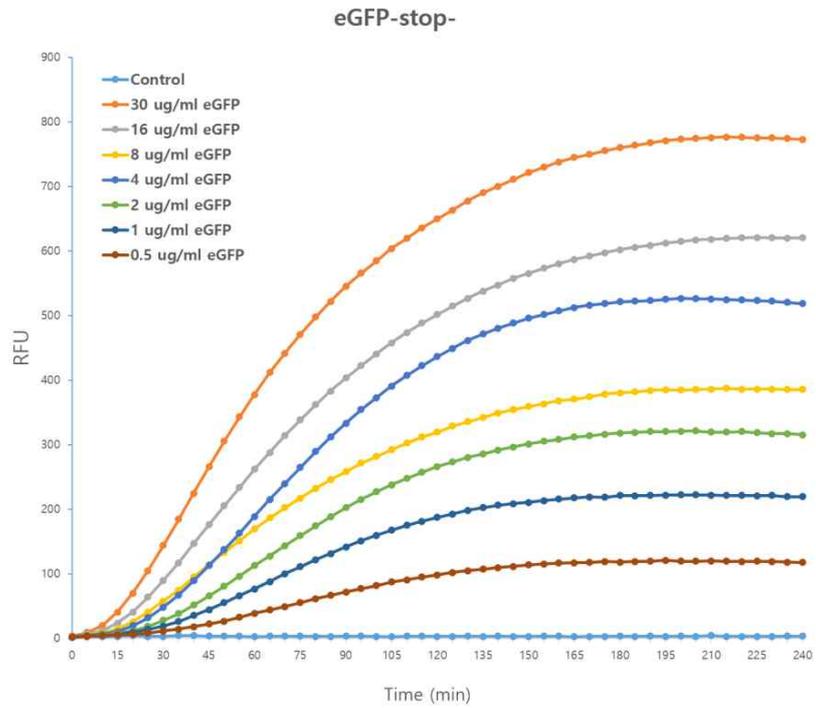


- Reporter gene으로 eGFP가 아닌 AcGFP(*Aequorea coerulescens* GFP)를 포함하는 translation vector를 이용해 비교 분석함. eGFP는 dimeric 으로 protein fold이 이루어질 때 flurosense이 나오지만, AcGFP는 monomeric expression으로도 flurosence를 발현하여 eGFP 보다 발현 시간 및 flurosence brightness가 높은 것으로 알려져 있음 이에 따라 AcGFP와 eGFP를 cell-free system에서의 발현 비교를 수행하였음. 결과적으로 eGFP가 expression이 잘 되는 것으로 확인됨. 부가적으로 film을 부착해 시료 증발을 방지해 비교 실험을 했으나 오히려 film이 없는 것이 expression이 잘 되는 것을 볼 수 있음

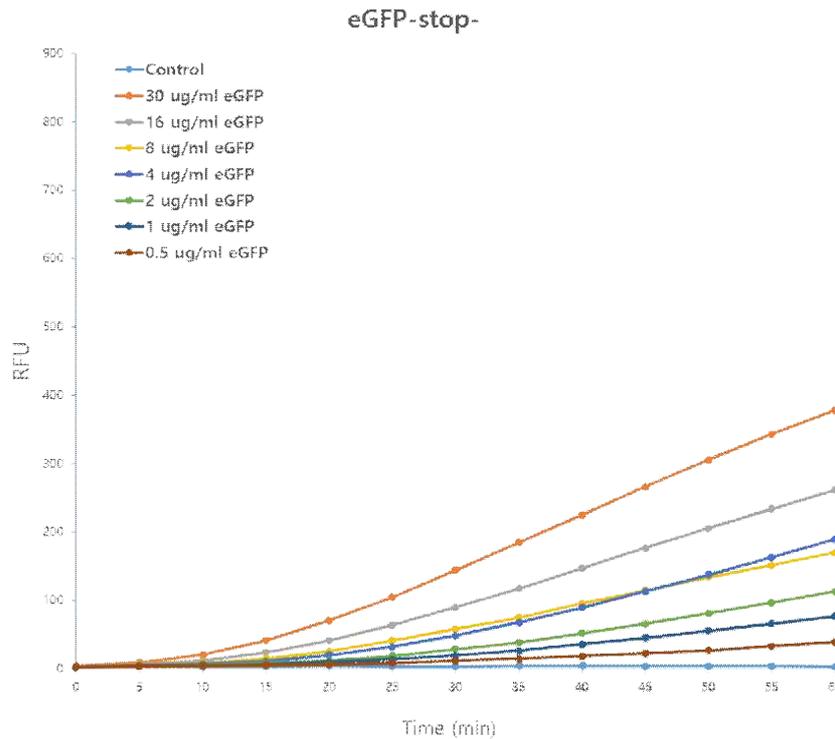
(다) eGFP expression 반응 시간 테스트

- NEB solution을 사용해 cell free system에서 eGFP가 expression 되는 시간을 테스트하기 위해 eGFP가 들어있는 translation vector(pBT7)와 NEB solution을 섞어 384 well에 넣고 37°C에서 5분 간격으로 4시간(240분)동안 관찰(결과 1), 37°C에서 5분 간격으로 30분 동안 관찰(결과 2).
- 전체적인 실험 결과 RFU(relative fluorescence unit) 값이 농도 의존적으로 증가해 실험이 제대로 진행되었다는 것을 알 수 있음. Stop-는 eGFP의 stop codon을 제거해 His tag까지 translation되는 벡터를 말하며, His tag이 cell free system에서 eGFP expression에 시간에 따라 영향을 주는지 확인하기 위해 비교 실험을 했으나 거의 차이가 없음

① 37°C에서 5분 간격으로 4시간(240분)동안 관찰(결과 1) : 약 150분이 지나면서 Saturation이 일어남.

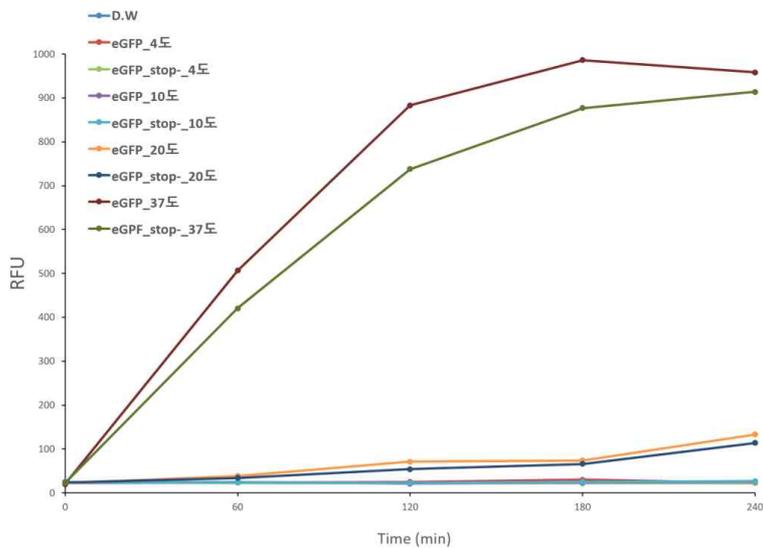


② 37°C에서 5분 간격으로 30분동안 관찰(결과 2) : 20분 정도 경과 하면 RFU가 100에 도달



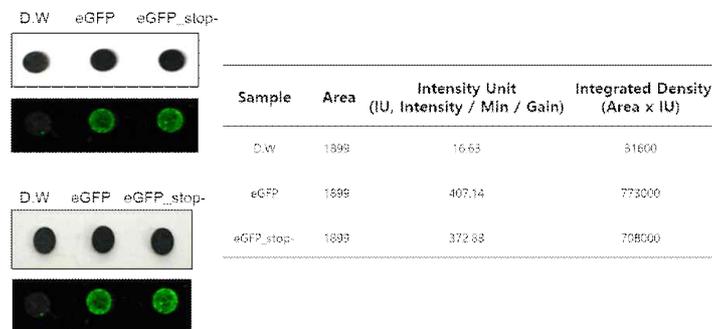
(라) eGFP expression 온도 테스트

- 시간 테스트와 마찬가지로 NEB solution을 사용해 cell free system에서 eGFP가 expression 되는 적정온도를 찾기 위해 eGFP가 들어있는 translation vector(pBT7)와 NEB solution을 섞어 384 well에 넣고 온도별로 1시간 간격으로 4시간(240분)동안 관찰하였음
- 전체적인 실험 결과 RFU(relative fluorescence unit) 값이 온도 의존적으로 증가해 실험이 제대로 진행되었다는 것을 알 수 있음. Stop-는 eGFP의 stop codon을 제거해 His tag까지 translation되는 벡터를 말하며, His tag이 cell free system에서 eGFP expression에 온도에 따른 영향을 주는지 확인하기 위해 비교 실험을 했으나 거의 차이가 없음
- 4도, 10도에서는 반응이 일어나지 않았으며 20도에서는 3시간 경과 후 100가까이 RFU값이 나왔고, 37도에서 가장 expression 효율이 높은 것을 확인하였음



(마) eGFP expression 종이 테스트

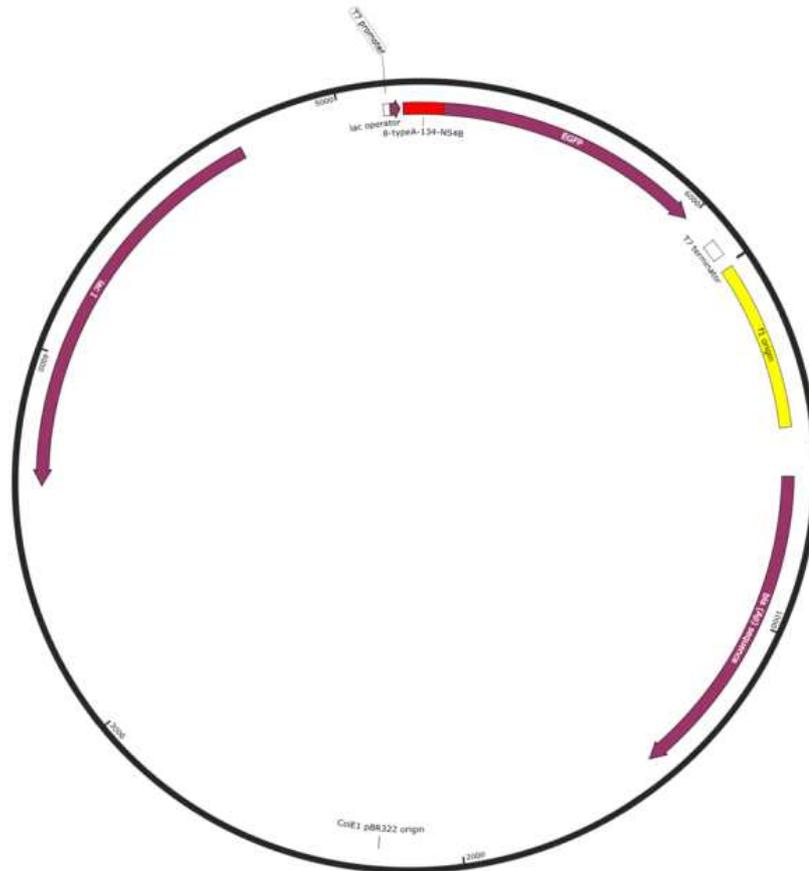
- Cell free system의 가장 큰 장점 중에 하나로 paper 위에서 반응이 일어나 현장진단이 가능한 것인데, 이를 확인하기 위해 종이 위에 벡터와 NEB solution을 섞어 떨어트린 후 37°C에서 2시간동안 반응 시킨 후 형광을 측정함. 측정 결과 eGFP와 stop codon을 제거한 경우 형광이 잘 나타나는 것을 확인. 앞서 했던 실험을 종이 위에서 실현가능한 것으로 확인되었으며, 앞으로 바이러스를 진단함에 있어 충분히 적용 가능할 것으로 예상됨



(3) Switch RNA 검증

(가) Zika vRNA Switch 디자인(sensor)

① pET21a vector: eGFP를 Reporter gene로 사용하여, T7 promoter 다음에 zika virus를 검출할 수 있는 switch RNA가 삽입된 벡터를 제작하였음. Sensor sequence는 하버드대에서 개발된 Zika virus를 이용한 switch RNA sequence를 이용 하였으며, Zika virus의 NS4B 부위와 E(envelope) 부위에 대한 상보적인 sequence를 지님.



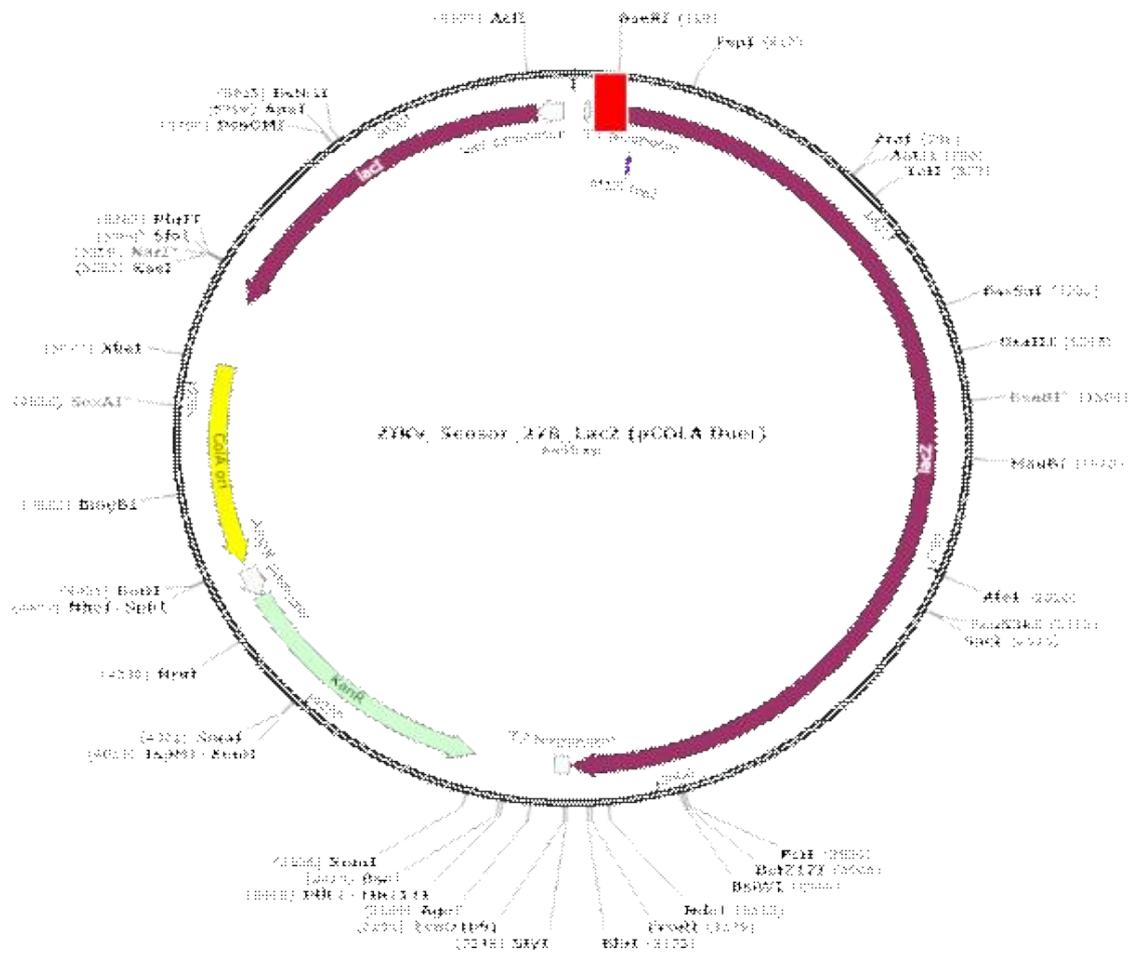
㉓ eGFP: Enhanced green florescence protein의 줄임말로 720bp의 크기를 가지며, sensor vector에 사용되어 시각적으로 확인하기 위한 reporter gene의 역할을 함. switch RNA 바로 다음에 연결되어 transcription을 거쳐 expression되면 형광현미경으로 녹색의 형광을 관찰할 수 있어 정량적으로 expression의 여부를 확인 가능

㉔ NS4B, E(8, 27): eGFP를 reporter gene으로 하는 transcription vector에 T7 promoter 다음 switch RNA를 넣어 제작한 Sensor vector. Switch RNA 종류에 따라 pET21a_8A, pET21a_27B 두 종류를 실험하였으며 앞서 설명했듯이 pET21a_8A는 refolding domain이 있어 transcription이 끝난 후 translation될 때 스스로 다시 refolding 되는 것을 막아주는 역할을 하도록 제작됨. 이와 달리 pET21a_27B는 refolding domain이 없음. 실험결과 refolding domain의 여부는 크게 차이가 없는 듯 보이며 오히려 없는 것이 더 발현이 잘 되는 것으로 확인됨. Sensor RNA를 테스트 하기 위해 Switch RNA와 상보적인 zika virus 서열을 지닌 trigger vector도 함께 제작하여 사용함

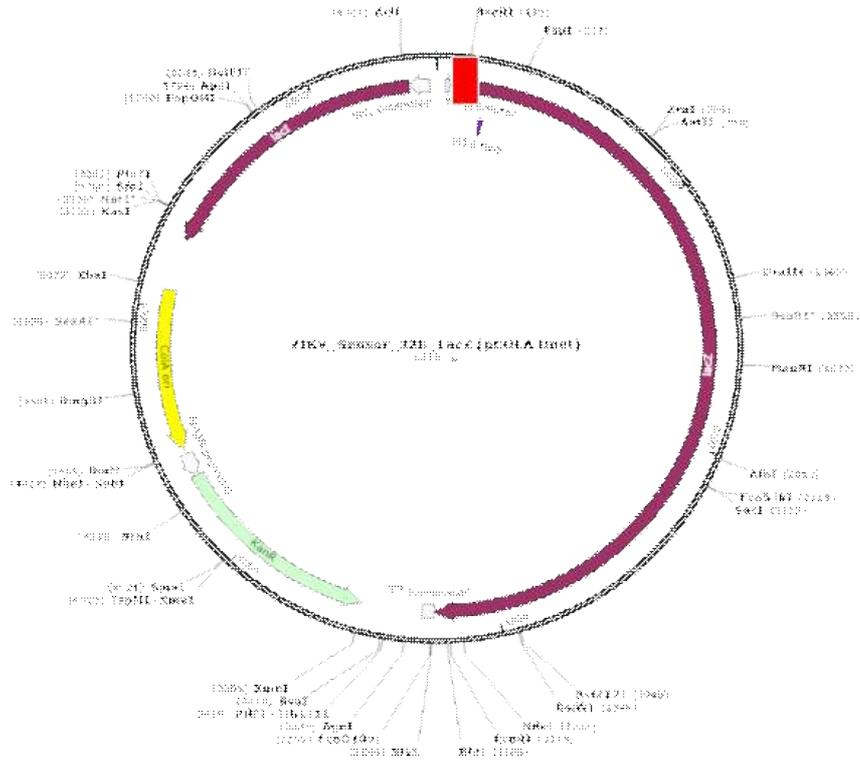
② pCOLA duet vector(Addgene)

㉗ LacZ gene: reporter gene으로 사용한 eGFP를 대신하여 사용할 수 있는 또 다른 reporter gene 중 하나로 LacZ gene은 expression 됐을 경우 eGFP와 다르게 눈으로 직접 관찰이 가능함. 하지만 사이즈가 eGFP보다 크며 CPRG(Chlorophenol red -β-D-galactopyranoside)를 사용해 노란색이었던 CPRG가 lacZ gene이 expression 산물과 반응하여 점점 주황색이 되고, 최종적으로 보라색으로 변하는 것을 볼 수 있음

㉘ Sensor 27B : LacZ gene을 reporter gene으로 지닌 pCOLA Duet vector에서 T7 promoter 바로 뒤에 하버드대 논문에서 사용한 zika virus를 target으로 하는 여러 서열 중 27B를 사용. Sensor vector를 제작하고 이를 trigger하는 zika virus 서열을 지닌 Trigger vector도 제작함



- Sensor 32B : Sensor 27과 마찬가지로 LacZ gene을 reporter gene으로 지닌 pCOLA Duet vector를 사용. T7 promoter 바로 뒤에 하버드대 논문에서 사용한 서열 중 32B를 넣어 Sensor vector를 제작하고 이를 trigger할 수 있는 zika virus의 서열(Sensor의 switch RNA 서열과 상보적)을 지닌 Trigger vector도 제작해 테스트 진행

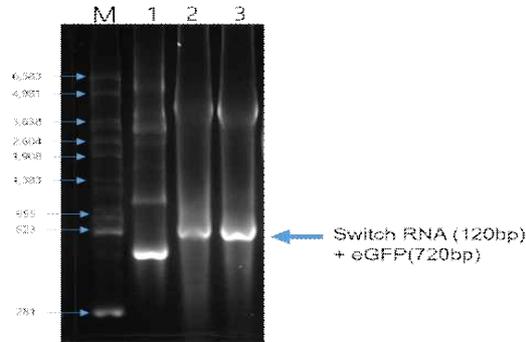


(나) Zika vRNA sensor 테스트

① pET vector

㉞ 벡터 Transcription 테스트

- 벡터가 Cell free system에서 적용되는지 확인하기 위해 Transcription 확인 테스트를 시행함. 벡터는 바이오닉스의 pET21a를 이용했으며, 원형의(circular) 벡터는 NEB의 제한효소 중 EcoRV를 사용해 절단함. 선형(linear)으로 만들어진 벡터를 Ambion의 transcription kit인 MEGAscript(Cat: AM1334)를 사용하여 Cell free system으로 transcription 된 RNA를 얻은 후 RNA가 생성되었는지는 RNA formaldehyde gel electrophoresis와 nanodrop 두 가지 방법으로 각각 확인
- RNA formaldehyde gel electrophoresis를 통한 vector transcription 확인(결과 1) : 1번 lane은 NEB에 들어있는 circular vector control로 EcoRV가 제대로 기능을 하는지 확인하기 위한 control로 사용하였으며, 2~3번 lane은 각각 Bionics에서 제작한 pET21a 벡터에 zika virus를 target으로 하는 switch RNA 8A, 27B가 들어있는 벡터임 (벡터에 대한 설명은 뒤에서 다시 자세히 설명함). 화살표로 표시된 부분에서 switch RNA과 reporter gene으로 연결된 eGFP가 transcription 된 것을 확인된 것으로 보아 cell free system에서 transcription이 잘 되는 것으로 사료됨



<gel electrophoresis로 transcription 확인>

- Nanodrop 측정을 통한 vector transcription 확인(결과 2) : Nanodrop은 생성된 RNA solution을 떨어뜨려 농도를 측정하는 방법으로 pTXI-Xef는 Transcription kit에 들어있는 linear template DNA로 cell free system으로 transcription이 되는지에 대한 control로 사용하였음. DHFR은 NEB에 들어있는 circular vector control로 EcoRV가 제대로 기능을 하는지 확인하기 위한 control로 사용. 나머지는 각각 pET21a 8A, 27B 벡터 결과임. 결과적으로 전체적인 농도가 2902~2939ng/ul로 cell free system에서 벡터가 RNA로 transcription 된 것을 확인가능. 특히 RNA의 농도만을 측정하기 위해 DNase 처리 전 후를 비교 실험했지만, 차이가 미미한 것으로 확인됨

DNase 처리 전

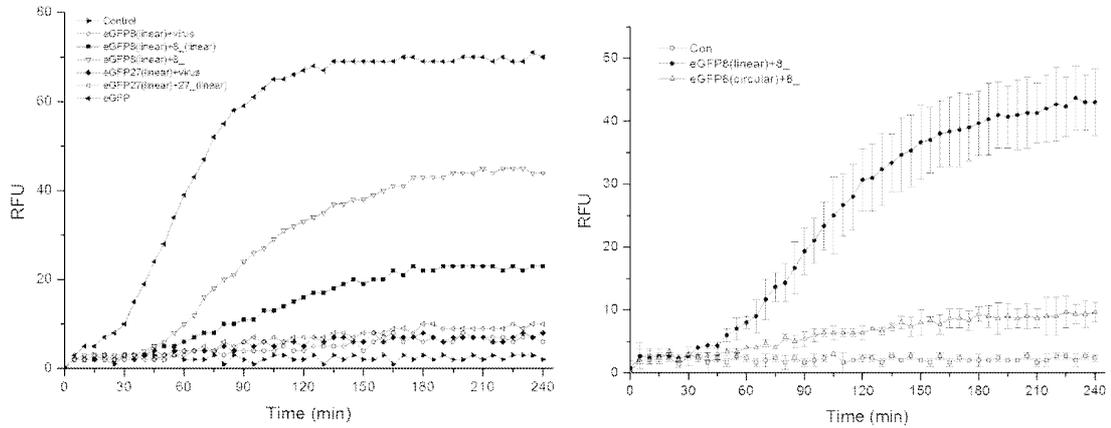
Name	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/μL
pTXR	3.78	3.401	0.111	3.639	3.264	1.115	2911.283
DHFR	3.739	3.357	0.086	3.629	3.25	1.116	2903.183
biohis 8	3.779	3.365	0.11	3.66	3.249	1.126	2927.832
biohis	3.764	3.391	0.109	3.648	3.277	1.113	2918.529

DNase 처리 후

Name	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/μL
pTXR	3.764	3.377	0.11	3.662	3.277	1.118	2929.795
DHFR	3.747	3.36	0.082	3.666	3.282	1.117	2933.012
biohis 8	3.799	3.385	0.119	3.674	3.264	1.126	2939.503
biohis	3.782	3.368	0.115	3.65	3.241	1.126	2920.208

④ Micro PlateReader기 결과

- Sensor 8, 27 vector와 trigger vector를 NEB solution에 넣고 37°C에서 형광값을 측정하였음. Sensor vector는 이전에 transcription kit를 사용해 RNA가 잘 생성되는 것을 확인하였고, 이번 실험에서도 농도 의존적으로 RFU 값이 증가하는 것을 볼 수 있었음.



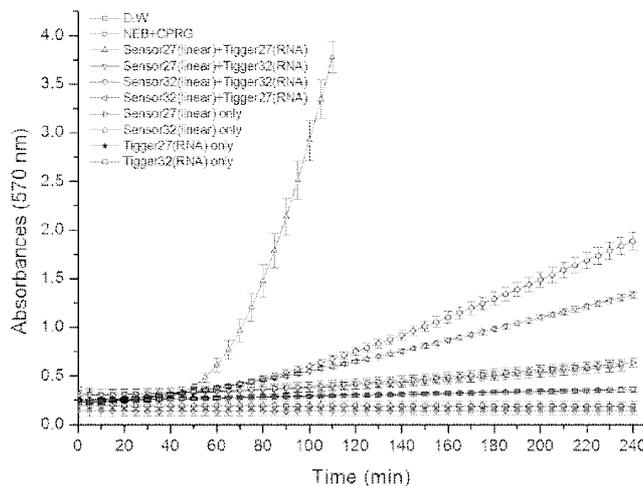
- Control은 음성대조군으로 NEB solution에 D.W만 첨가한 것으로 0에 가까운 가장 낮은 값이 나온 반면 translation vector를 사용한 eGFP는 양성대조군으로 값이 제일 크게 나옴. 전체적으로 제한효소 (EcoRV)를 사용해 circular vector를 linear vector로 만들었을 때 RFU 값이 더 크게 나왔으며, 마찬가지로 Trigger RNA는 전체 virus 서열을 넣어주는 것보다 linear 형태로 조각내 넣어주는 것이 더 RFU 값이 크게 나오는 것으로 확인함. 결과적으로 sensor 8과 27을 비교했을 때 sensor 27 보다는 sensor 8이 virus를 detection하는데 용이할 것으로 사료됨

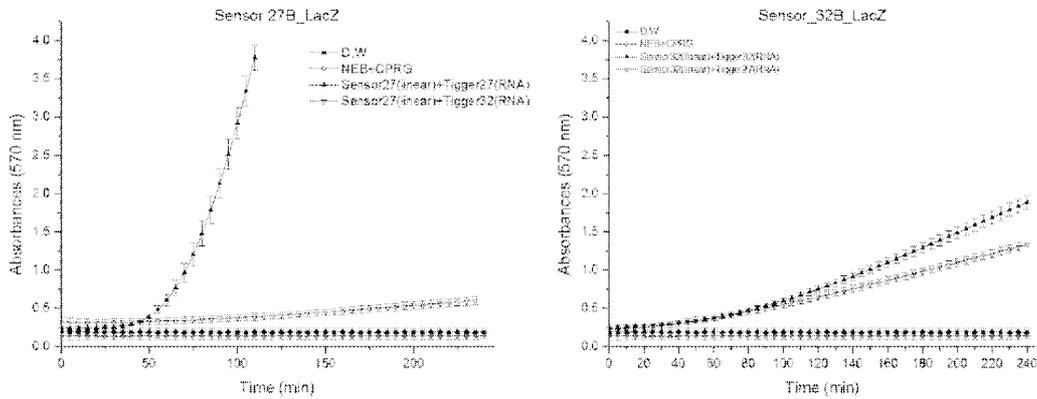
② LacZ vector

⑦ MicroPlateReader 결과

- 디자인한 Sensor 27, 32 vector와 trigger vector를 NEB solution에 넣고 37°C에서 4시간 동안 570nm 파장으로 흡광도를 측정하였음. 흡광도는 최대 4까지 측정 가능하며, 1 이상이 되면 노란색의 CPRG가 보라색으로 변하는 것이 관찰되기 시작함. Trigger vector는 RNA transcription kit를 사용하여 transcription 된 RNA(nanodrop으로 농도 확인함)를 사용하였으며, sensor vector는 NEB의 제한효소(Nru I)를 처리해 선형으로 만들어 37°C에서 4시간동안 반응시킴

Addgene Lac Z (pCOLA Duet vector)





- 실험 결과 sensor 27이 detection을 잘하는 것으로 확인되며, 80분이 지나면 육안으로 검출이 가능할 것으로 보임. Sensor와 trigger vector를 교차실험 했을 때, sensor 27은 trigger 27만을 detection 해 sensor 32보다 specificity가 좋은 것으로 확인되며 sensor 32는 흡광도도 낮게 나올 뿐만 아니라 trigger 27과도 반응하고, 추가적인 실험에서는 trigger가 없이도 translation까지 진행되어 LacZ가 expression되는 것을 확인함.

㉠ 종이 테스트 결과

- 앞서 진행한 실험을 paper 위에 적용시킨 결과로 하얀색 종이를 사용했을 때, D.W는 투명하기 때문에 색깔 변화 없이 하얗게 보이며 NEB+CPRG는 NEB solution과 CPRG(Chlorophenol red -β-D-galactopyranoside)의 Mixture로 CPRG의 색인 노란색으로 보임. Sensor 27과 32에 각각 Trigger vector 27과 32를 circular 형태로 처리하였으며, 추가적으로 Zika virus RNA를 sensor vector에 각각 넣어 92°C에서 2분간 처리해 색깔 변화를 관찰함. 결과적으로 sensor vector의 reporter gene인 LacZ가 expression되어 CPRG와 반응해 보라색으로 변한 것이 관찰됨

(4) FMDV switch RNA 디자인

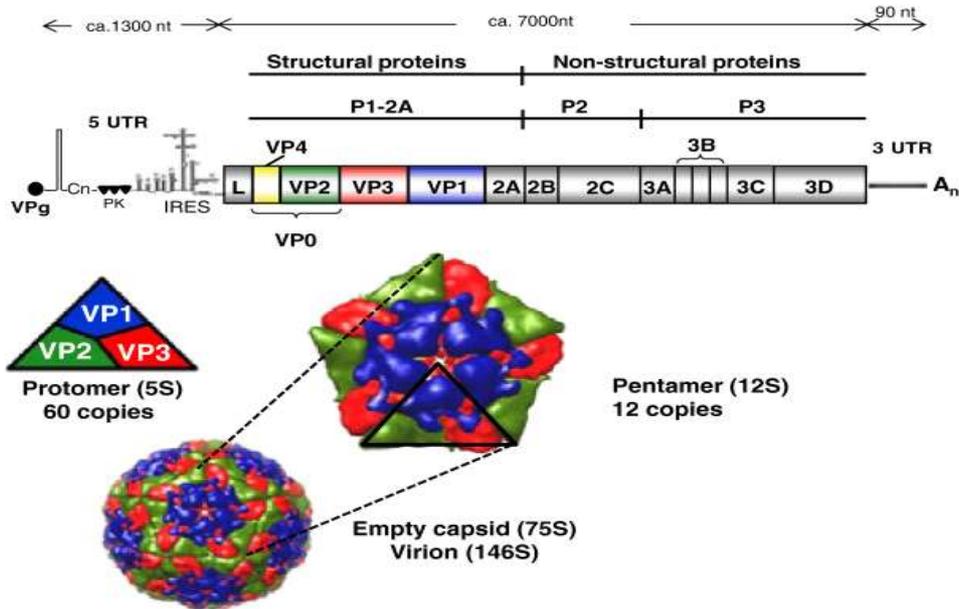
가) FMDV vRNA 설명

- FMDV(Foot-and-mouth disease virus, 구제역 바이러스)는 지름 30nm의 작고 단순한 바이러스로 캡시드 단백질 VP1 ~ VP4 네 가지가 각각 60개씩 240개가 단일가닥으로 이루어진 약 8,500 여 개의 염기로 구성된 (+)RNA를 감싸고 있으며(VP4는 표면에 노출되지 않음) 감기바이러스로 알려진 리노바이러스와 매우 유사한 구조를 가짐

- FMDV genome 구조를 보면 4개의 구조단백질(VP1, VP2, VP3, VP4)과 8개의 비구조단백질(L, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D)로 구성되며, 하나의 긴 ORF로 단일의 폴리단백질로 번역되고 3개의 프로테아제(Leader, 2A, 3C)에 의해 절단되어 성숙한 구조·비구조 단백질이 됨

- FMDV genome 구조 중 중요한 5'UTR 부위를 보면, 360nt의 Large hairpin구조인 S fragment와 90%의 C(cytosine)가 존재하는 150~250nt의 Poly C track(Cn), 아직까지 기능은 알려지지 않은 Pseudoknots(pk), RNA 복제에 관여하는 55nt의 안정한 stem-loop element로 "AAACA"를 conserved motif로 지닌 Cre/Bus, 마지막으로 바이러스의 캡-비이온적 단백질 합성 개시에 작용하는 150nt의 IRES가 존재함(정확한 그림은 아래그림 참조)

- 5'UTR 끝에 위치한 VPg는 단백질을 3개의 형태로 만들어 각각 RNA 합성 과정에서 primer로 작용해 복제시 각각의 RNA genome은 VPg에 공유결합으로 연결됨



<Genome organization of FMDV and the structure of virus>
 Foot-and-mouth disease: past, present and future
 Jamal and Belsham Veterinary Research 2013, 44:116

(5) FMDV switch RNA 센서 스크리닝

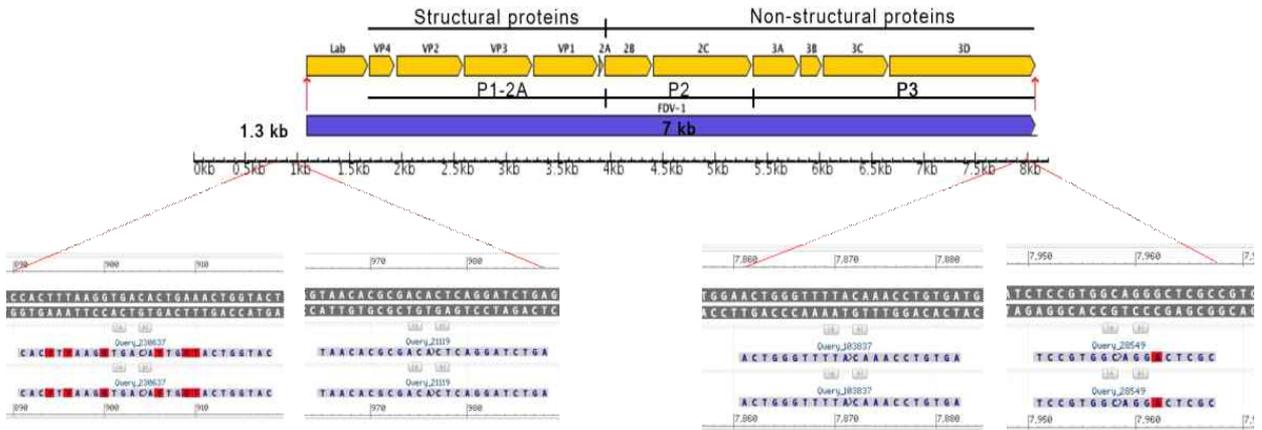
(가) 5'UTR, 3D 부위 디자인

- OIE에서 구제역 바이러스(FMDV, foot-and-mouth disease virus) detection을 위한 real time PCR probe 로 5'UTR과 3D의 primer를 각각 지정. 앞으로의 실험에서는 switch RNA에 5'UTR sequence와 3D sequence 를 넣어 사용할 것으로 OIE에서 지정한 primer를 이용해 NCBI GenBank에서 KF112887.1을 이용 2010년 5월 발병한 O형 FMDV genome sequence의 5'UTR과 3D sequence를 각각 얻었으며, 서열은 아래에 제시함

- 5'UTR sequence: **CACTTTAAGGTGACACTGAACTGGTACTCAACCACTGGTGACAGGCTAAGGATGCCC TTCAGGTACCCCGAGGTAACACGCGACTCAGG** (서열은 총 92 bp로 빨간색 서열이 probe sequence)

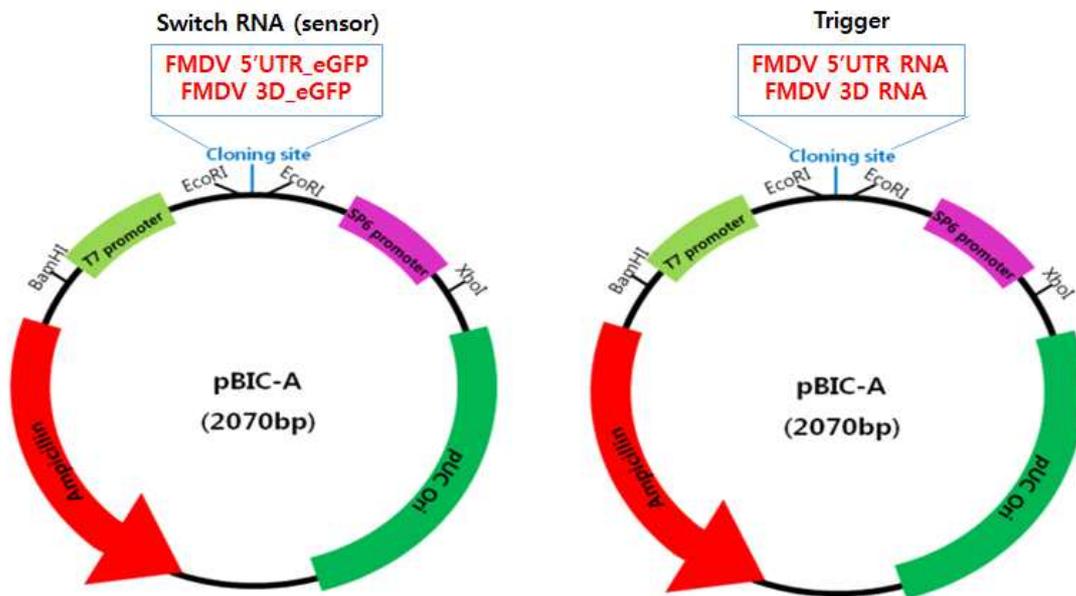
- 3D sequence: **ACTGGGTTTTACAAACCTGTGATGGCTTCGAAGACCCTCGAGGCTATCCTCTCCTTTGCACGCCGTGGGACCATA C AGGAGAAGTTGATCTCCGTGGCAGGGCTCGC** (서열은 총 107 bp로 빨간색 서열이 probe sequence)

- 아래 그림은 OIE지정 primer를 사용했을 때 5'UTR, 3D sequence의 위치를 표시한 것임



(나) FMDV 벡터 디자인

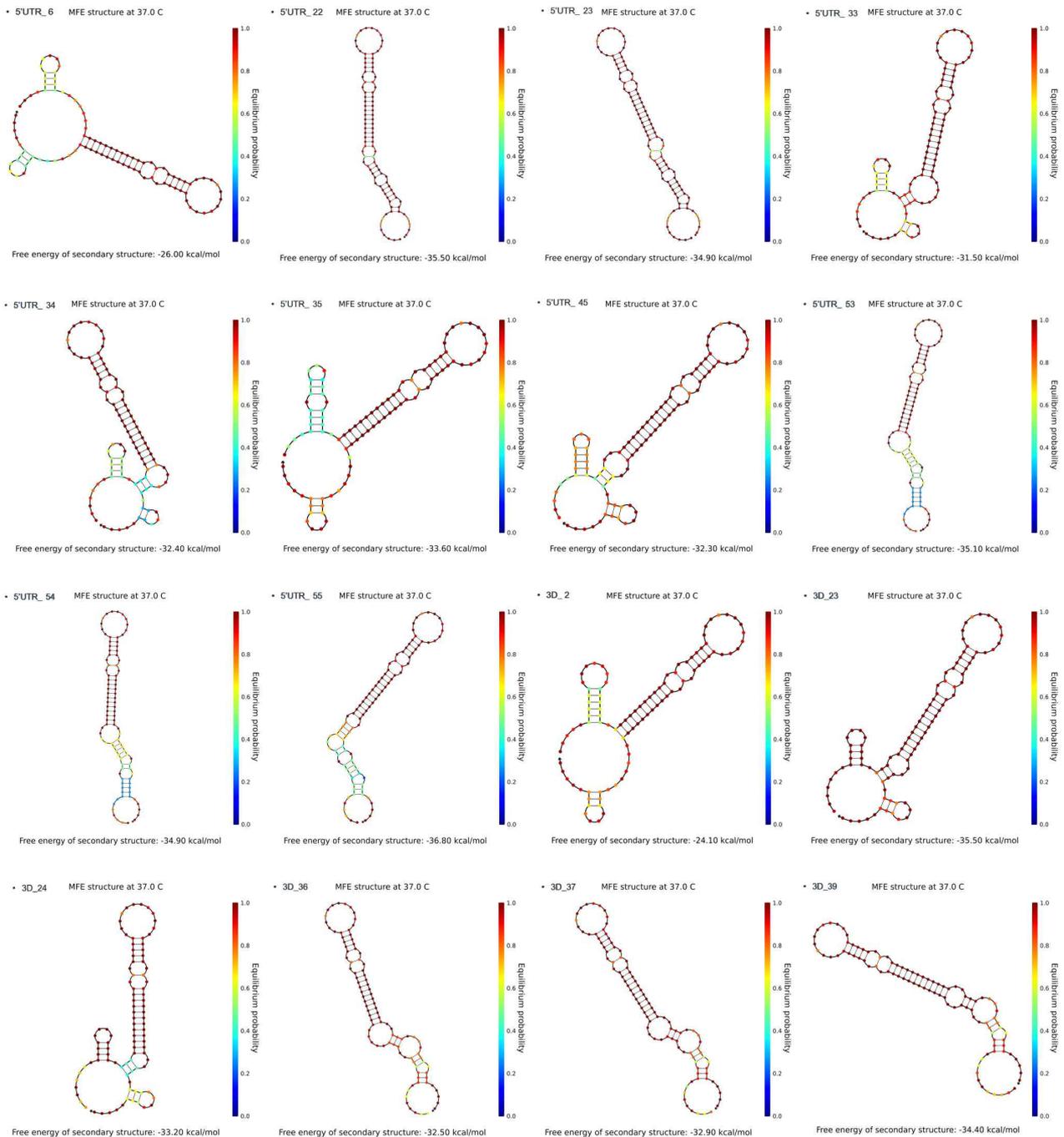
- FMDV switch RNA를 제작하기 위해 in vitro transcription이 가능한 바이오피아 제공하는 pBIC-A 벡터를 이용하여 벡터를 제작함. T7 promoter 다음에 EcoRI 사이에 cloning site가 위치하며 cell-free system에서 reporter 유전자가 발현을 잘 하는지 확인하기 위하여 FMDV 5'UTR 과 3D 서열 뒤에 eGFP(720bp, NC_025025.1)을 cloning하였음.
- FMDV RNA trigger도 위와 같이 in vitro transcription 이 가능한 바이오피아 제공하는 pBIC-A 벡터를 이용하여 벡터를 제작함. T7 promoter 다음에 EcoRI 사이에 cloning site에 FMDV 5'UTR 과 3D trigger 서열을 cloning하였음

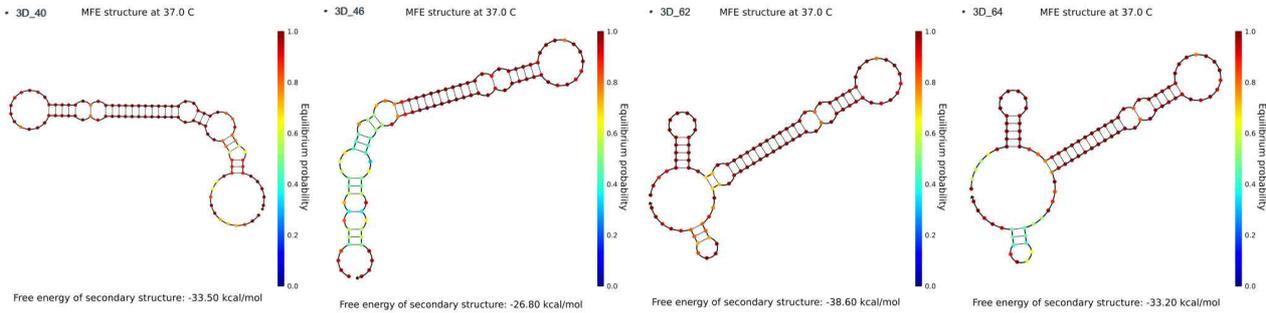


(다) FMDV switch RNA 제작

- OIE에서 구제역 바이러스 진단용으로 제시한 5'UTR과 3D sequence를 기준으로 59개의 5'UTR switch RNA 와 72개의 3D switch RNA 서열을 이용. vector가 transcription되어 refolding 될 때 안정성을 알아보기 위해 에너지를 계산하고, 이차구조를 예측함

- NUPACK (The nucleic acid package)은 소프트웨어를 이용하여 핵산의 minimum free energy (MFE) 2차 구조를 계산함. 총 131개의 5'UTR, 3D sequence를 분석하였고, 다음과 같은 결과를 얻음





- 아래 그림은 제작한 switch RNA sequence (sensor) 예를 나타냄. []로 묶인 부위가 FMDV에 상보적으로 결합하여 sensor의 이차구조가 풀리게 되고 빨간색 서열의 ribosome binding site (RBS)가 노출되어 reporter gene의 translation이 진행됨. 그림에 나타나 있는 파란색과 초록색의 서열은 각각 상보적인 쌍으로 존재하며, refolding되어 sensor 자체적으로 안정성을 부여하고 추후 FMDV의 여부에 따라 trigger 될 때 잘 풀리도록 에너지를 계산하여 제작하였음

```

Candidate 1 sensor :
[UGACCCAAAUGUUUGACACUACCGA UCCUGUGUC] GGA CUUUAG AAC AGAGGAG AUAAAG AUG GACACAGGA CACAACCUGGCGGCAGCGCAAAAG
Candidate 2 sensor :
[AGCUUCUGGGAGCACCGAUAGGAGAGG UGUUUUCCA] GGA CUUUAG AAC AGAGGAG AUAAAG AUG UGGAAAACA UCAAACCUGGCGGCAGCGCAAAAG
Candidate 3 sensor :
[AAACGUGCGGCACCCUGGUAUGUCCUC UUUUUCCCC] GGA CUUUAG AAC AGAGGAG AUAAAG AUG GGGGAAAAA AGAAACCUGGCGGCAGCGCAAAAG
Candidate 4 sensor :
[CUUCAACUAGAGGCUCCGTCCCGAGCG GCGGUUAUC] GGA CUUUAG AAC AGAGGAG AUAAAG AUG GAUAACGCC CAUAACCUGGCGGCAGCGCAAAAG
  
```

(6) 3D부위 진단 센서 선정

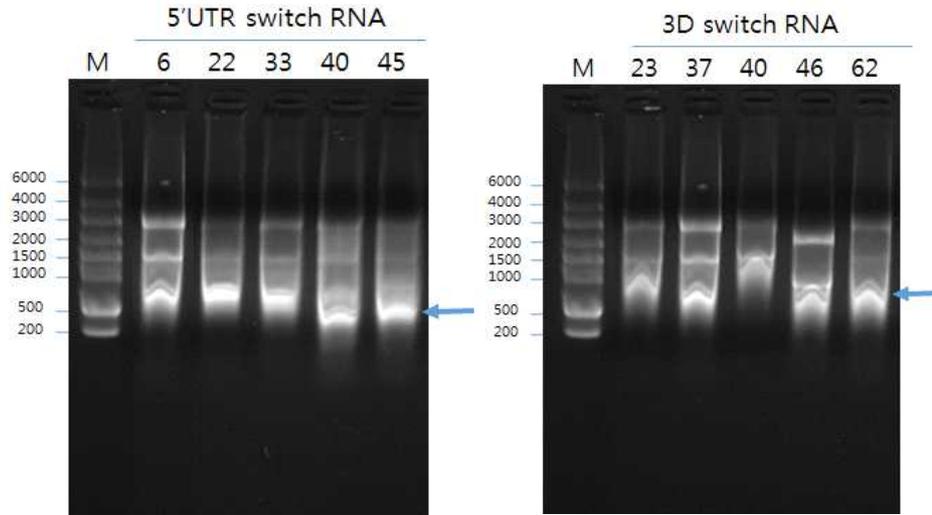
(가) FMDV switch RNA 후보 screening

① FMDV 5'UTR 과 3D switch RNA 발현 테스트

② FMDV 5'UTR 과 3D switch RNA transcription

- FMDV 5'UTR 과 3D switch RNA를 만들기 위해 in vitro transcription 하여 RNA 생성능을 확인함. 바이오니아 in vitro transcription 벡터인 pBIC-A의 원형(circular)을 제한효소 EcoRV를 사용해 절단하여 선형(linear)을 만들고 Ambion의 transcript kit인 MEGAscript(Cat: AM1334)를 사용하여 FMDV 5'UTR 과 3D switch RNA 만듦. Transcription 된 RNA가 생성되었는지는 RNA formaldehyde gel electrophoresis와 nanodrop 두 가지 방법으로 각각 확인함

- RNA formaldehyde gel electrophoresis를 통한 vector transcription 확인(결과): FMDV 5'UTR switch RNA 5종(6, 22, 33, 40, 45)과 FMDV 3D switch RNA 5종(23, 37, 40, 46, 62) 을 in vitro transcription 후 생성된 switchRNA를 RNA formaldehyde gel 상에서 확인 하였으며, 화살표로 표시된 부분에서 FMDV switch RNA와 reporter gene으로 연결된 eGFP가 transcription 된 밴드가 나타남으로 switch RNA가 in vitro transcription이 잘 된 것으로 확인됨



<gel electrophoresis로 transcription 확인>

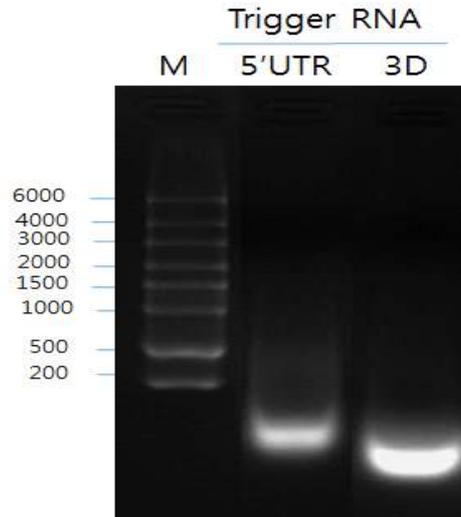
- Nanodrop 측정을 통한 vector transcription 확인(결과) : Nanodrop은 생성된 RNA를 260nm에서 측정하여 나온 흡광도를 이용하여 농도 환산함. RNA 정량시 260/280비가 1.6~2.2 정도에서 순수도를 확인함만들어진 각 FMDV switch RNA는 모두 평균 2.2로 순수한 RNA로 확인되며, 결과적으로 FMDV 5'UTR switch RNA 농도는 16233 ~ 22706 ng/ul으로 FMDV 3D switch RNA는 13199 ~ 20098 ng/ul로 확인됨.

Name	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/μL
FMDV_eGFP_5UTR_6	2.909	1.382	0.047	2.838	1.323	2.145	22706
FMDV_eGFP_5UTR_22	2.415	1.121	0.051	2.347	1.063	2.209	18779
FMDV_eGFP_5UTR_33	1.822	0.855	0.042	1.773	0.81	2.19	14184
FMDV_eGFP_5UTR_40	2.075	0.959	0.04	2.029	0.916	2.215	16233
FMDV_eGFP_5UTR_45	2.555	1.179	0.054	2.508	1.127	2.224	20063
FMDV_eGFP_3D_23	1.697	0.8	0.051	1.65	0.751	2.198	13199
FMDV_eGFP_3D_37	2.373	1.112	0.054	2.323	1.059	2.193	18583
FMDV_eGFP_3D_40	2.567	1.192	0.055	2.512	1.137	2.21	20098
FMDV_eGFP_3D_46	2.296	1.058	0.049	2.239	1.005	2.228	17911
FMDV_eGFP_3D_62	2.524	1.156	0.053	2.445	1.091	2.241	19561

② FMDV 5'UTR 과 3D trigger RNA 발현 테스트

① FMDV 5'UTR 과 3D trigger RNA transcription

- FMDV 5'UTR 과 3D trigger RNA를 만들기 위해 switch RNA와 동일하게 in vitro transcription 하여 RNA 생성능을 확인함. pBIC-A 벡터의 원형(circular)을 제한효소 EcoRV를 사용해 절단하여 선형(linear)을 만들고 Ambion의 transcript kit인 MEGAscript(Cat: AM1334)를 사용하여 FMDV 5'UTR 과 3D trigger RNA 만듦. Transcription 된 RNA가 생성되었는지는 RNA formaldehyde gel electrophoresis와 nanodrop 두 가지 방법으로 각각 확인함



- RNA formaldehyde gel electrophoresis를 통한 vector transcription 확인(결과): FMDV 5'UTR과 3D trigger RNA를 RNA formaldehyde gel 상에서 확인 하였으며, 화살표로 표시된 부분에서 FMDV trigger RNA 밴드가 나타남으로 trigger RNA가 in vitro transcription이 잘 된 것으로 확인됨

- Nanodrop 측정을 통한 vector transcription 확인(결과) : Nanodrop은 생성된 RNA를 260nm에서 측정하여 나온 흡광도를 이용하여 농도 환산함. RNA 정량시 260/280비로 switch RNA와 같이 1.6~2.2 정도에서 순수도를 확인하며 만들어진 각 FMDV trigger RNA는 모두 평균 2.1로 순수한 RNA로 확인되며, 결과적으로 FMDV 5'UTR trigger RNA 농도는 20901 ng/ul로 FMDV 3D trigger RNA는 18128 ng/ul로 확인됨

Name	Location	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/μL
FMDV 5'UTR trigger RNA	D3	2.657	1.241	0.044	2.613	1.196	2.185	20901
FMDV 3D trigger RNA	G3	1.286	0.616	0.042	1.226	0.565	2.17	18128

- FMDV trigger RNA copy 수 계산 : Nanodrop으로 측정된 각 trigger RNA 농도를 이용하여 아래 수식에 대입하여 FMDV 5' UTR과 3D trigger RNA의 copy 수를 계산함. FMDV RNAsms 499.5 dalton/bp 이며 아보가드르수(6.022×10^{23})를 이용하여 계산함

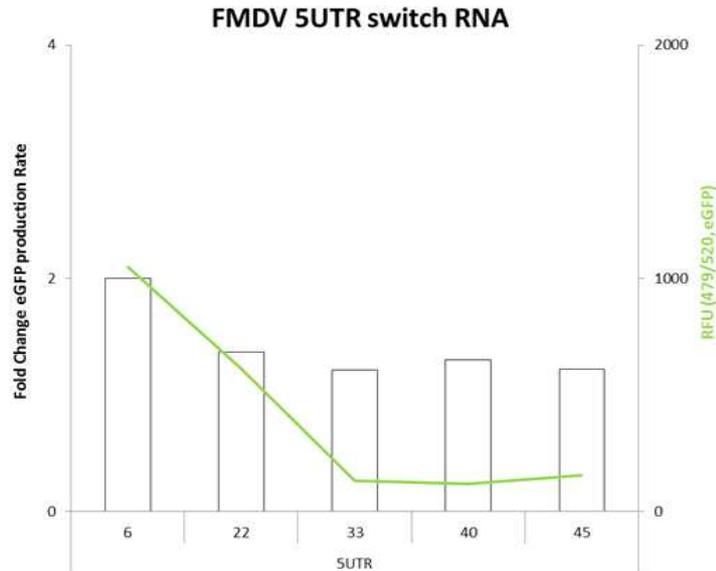
$$\text{Number of copies (copies/ml)} = (\text{ng} \times 6.022 \times 10^{23}) / (\text{length} \times 1 \times 10^9 \times 499.5)$$

③ FMDV 5'UTR 과 3D switch RNA 스크리닝

㉞ FMDV 5'UTR switch RNA

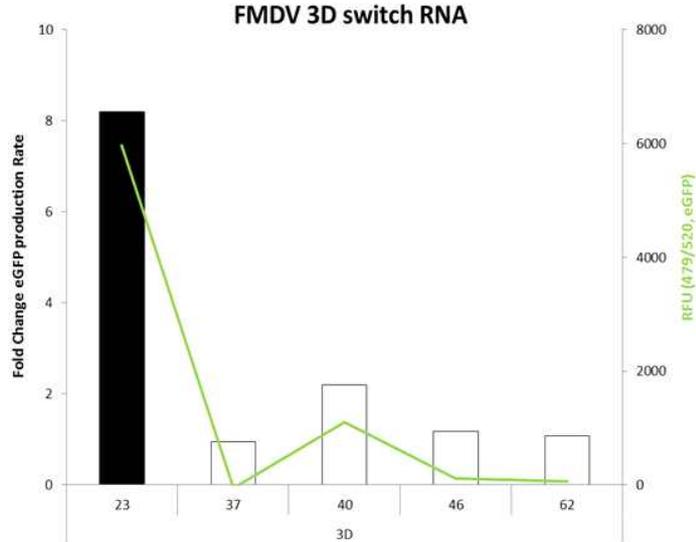
- 만들어진 FMDV 5'UTR switch RNA 5종(6, 55, 33, 40, 45)을 cell free protein synthesis solution 에 FMDV 5'UTR RNA와 함께 넣고 반응 후 생성된 형광의 양을 측정하여 FMDV RNA에 반응하는 5'UTR switch RNA를 확인함. 만들어진 FMDV 5'UTR switch RNA(최종 농도 300 ng/ul)와 cell free solution을 384 well에 넣고 37°C에서 20분 동안 pre-incubation하여 cell free solution에서 switch

RNA를 안정화 시킨 후, FMDV RNA(1×10^{12} copies/ml)를 넣고 microplate reader에서 37°C온도에서 2시간 동안 형성되는 eGFP 형광값인 RFU 값을 확인함. 아래 그래프와 같이 FMDV 5'UTR switch RNA_6번에서 대조군 대비 2배 증가분이 확인 되었으며, 1050 RFU 값이 측정됨. 나머지 4종의 5'UTR switch RNA는 1000 RFU 이하 값이 관찰되었으며 대조군 대비 증가분도 나타나지 않았음



㉔ FMDV 3D switch RNA

- FMDV 3D switch RNA 5종(23, 37, 40, 46, 62)을 위의 5'UTR switch RNA와 같은 조건으로 cell free protein synthesis solution을 이용하여 FMDV 3D RNA에 반응하는 3D switch RNA를 확인함. 만들어진 FMDV 3D switch RNA(최종 농도 300 ng/ul)와 cell free solution을 384 well에 넣고 37°C에서 20분 동안 pre-incubation하여 cell free solution에서 switch RNA를 안정화 시킨 후, FMDV RNA (1×10^{12} copies/ml)를 넣고 microplate reader에서 37°C온도에서 2시간 동안 형성되는 eGFP 형광값인 RFU 값을 확인함. 아래 그래프와 같이 FMDV 3D switch RNA_23번에서 대조군 대비 8.2배 증가분이 확인 되었으며, 5965 RFU 값이 측정됨. 또한 FMDV 3D switch RNA_40번에서 대조군 대비 2.2배 증가분이 확인 되었으며, 1107 RFU 값이 측정됨. 나머지 3종의 3D switch RNA는 1000 RFU 이하 값이 관찰 되었으며 대조군 대비 증가분도 나타나지 않았음



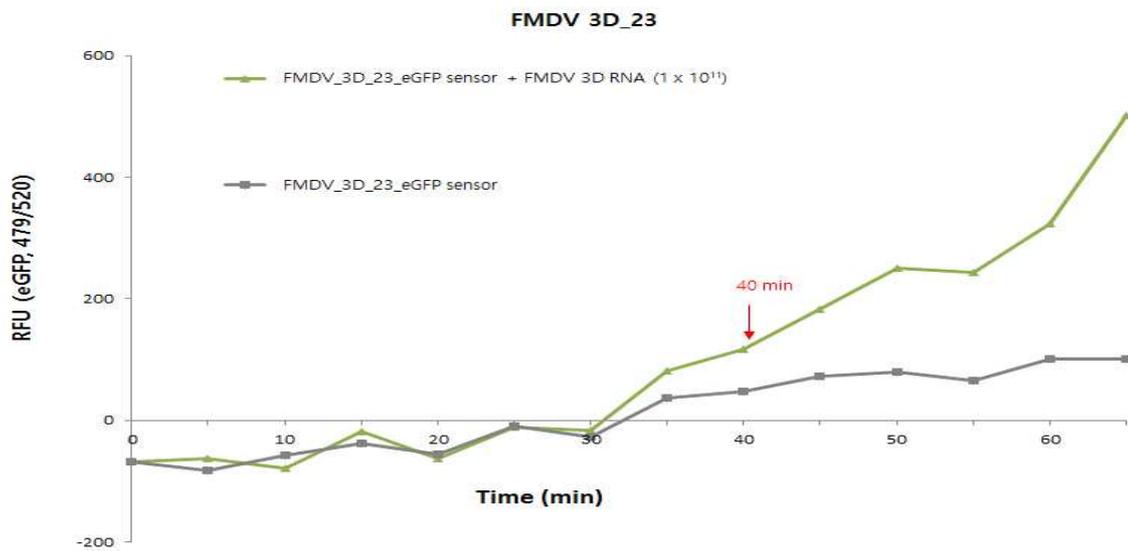
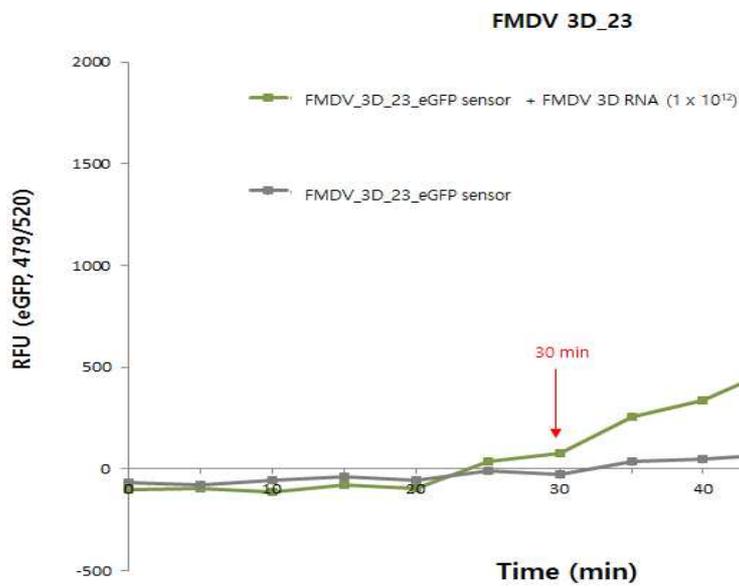
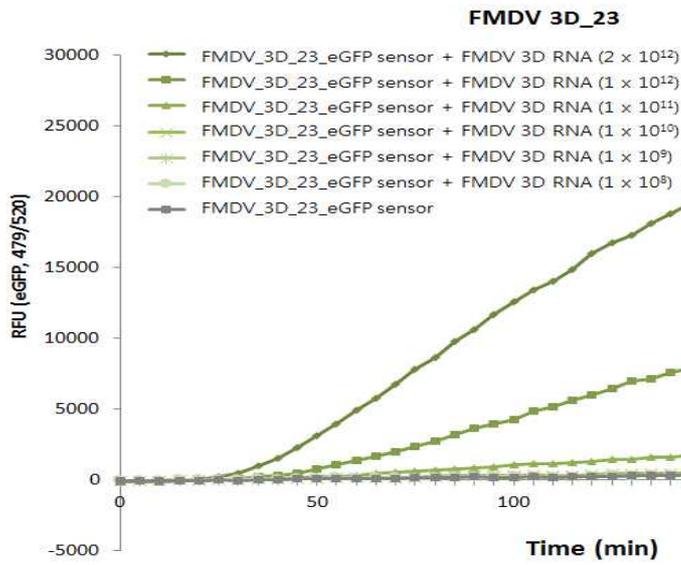
③ FMDV 5'UTR과 3D switch RNA 스크리닝 결과 대조군 대비 8.2배 증가율을 보인 **FMDV 3D switch RNA_23번을 선정**하였음

(나) FMDV 3D switch RNA_23 민감도 테스트

- FMDV switch RNA 스크리닝으로 확인된 FMDV switch RNA_23을 이용하여 FMDV 3D RNA에 대한 민감도 확인을 위해 FMDV 3D RNA를 농도별로 처리하여 반응하는 형광값(RFU)을 확인함.

- FMDV 3D switch RNA(최종 농도 300 ng/ul) 와 cell free solution을 384 well에 넣고 37°C에서 20분 동안 pre-incubation하여 cell free solution에서 switch RNA를 안정화 시킨 후, FMDV 3D RNA를 농도별 (2×10^{12} / 1×10^{12} / 1×10^{11} / 1×10^{10} / 1×10^9 / 1×10^8 copies/ml)로 처리한 후 microplate reader에서 37°C온도에서 5분에 한번씩 4시간 동안 형성되는 eGFP 형광값인 RFU 값을 확인함.

- 아래 그래프와 같이 FMDV 3D RNA 2×10^{12} copies/ml에서 4시간 후 RFU 값이 28369으로 확인 되었으며, 대조군 대비 38배의 증가율을 나타냈으며 3배 증가 시간은 35분으로 나타남. FMDV 3D RNA 1×10^{12} copies/ml에서 4시간 후 RFU 값이 17869으로 확인 되었으며, 대조군 대비 21배의 증가율을 나타냈으며 3배 증가 시간은 2×10^{12} copies/ml 농도와 마찬가지로 35분으로 나타남. 그러나 3배 증가 시간은 두 농도에서 동일하게 나타났지만 35분에 2×10^{12} copies/ml에서는 26배 증가분, 1×10^{12} copies/ml에서는 7배 증가분으로 증가 비율은 차이가 나는 것으로 확인됨. 또한, FMDV 3D RNA 1×10^{11} copies/ml에서 4시간 후 RFU 값이 3742으로 확인 되었으며, 대조군 대비 4배의 증가하는 것으로 나타났으며 3배 증가 시간은 50분으로 나타남. FMDV 3D RNA 1×10^{10} copies/ml 농도에서는 4시간 후에 1219 RFU 값을 나타냈지만, 증가분은 2배 이하를 나타남. 따라서 **민감도는 FMDV RNA 1×10^{11} copies/ml** 확인됨.

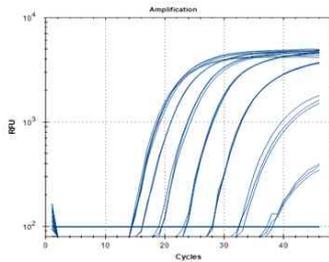
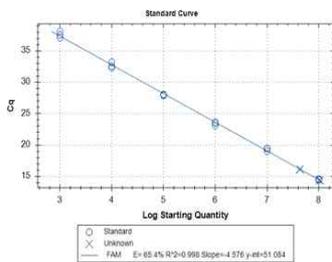


(7) 구제역 바이러스 시료 확보

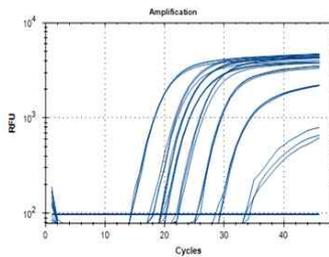
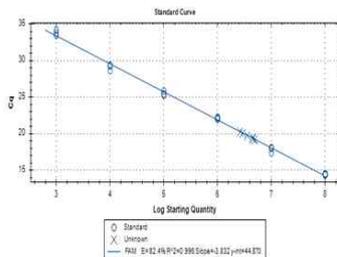
(가) 페이퍼센서 반응 평가를 위한 구제역바이러스 유전자 시료 확보

- 개발 진행 중인 페이퍼센서의 반응성을 평가하여 선별하기 위한 구제역바이러스 유전자 시료를 확보하고자 함. 아시아지역에서 가장 발생 빈도가 높은 O형 및 A형과 최근 미얀마에서 10년만에 보고된 Asia1형도 포함하였음. O형의 경우 유전형이 다른 최근 국내분리 바이러스 2종 (2014년 진천바이러스 및 2017년 보은바이러스)를 사용하고, A형의 경우 최근 국내 분리 바이러스 1종(2017년 연천바이러스) 및 국내에서 백신으로 사용 중인 A22 Iraq 바이러스를 사용함. Asia1형의 경우 국내에서 백신으로 사용한 적 있는 Shamir주를 사용함.

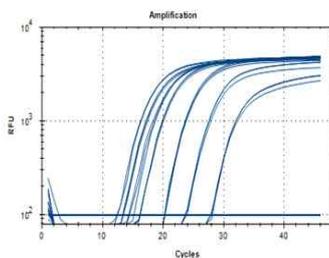
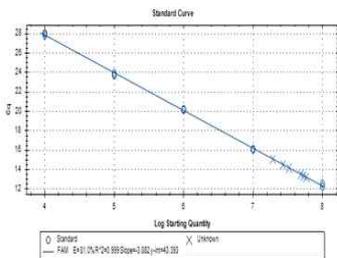
- 각 바이러스의 배양 원액(바이러스 역가 $10^5 \sim 10^6$ TCID₅₀/ml) 0.2ml 및 2ml(보다 높은 유전자 함유 시료를 작성하기 위해 10배 더 많은 2ml 사용함)에서 RNA를 추출하였으며, 추출한 RNA는 곧바로 유전자 정량할 수 있도록 표준유전자와 같이 realtime RT-PCR을 실시하여 정량값을 확인하였음. 2ml 배양액에서 추출한 RNA 정량값은 0.2ml 배양액에서 추출한 RNA값보다 0.7~4.2배 더 높은 유전자 함량이 확인되었음.



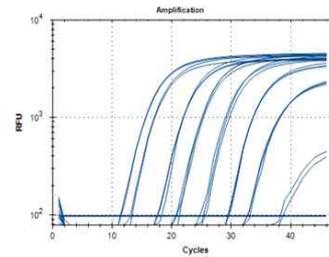
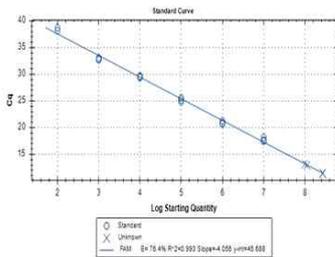
2014 O진천주	Cq 평균값	환산 copy수
0.2ml	16.2	4.3E+07
2ml	14.4	1E+08



2017 O보은주	Cq 평균값	환산 copy수
0.2ml	19.3	4.7E+06
2ml	20.0	3.1E+06

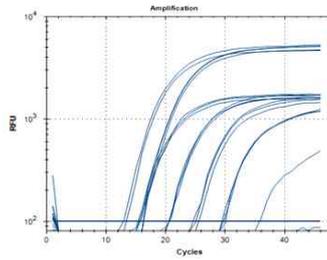
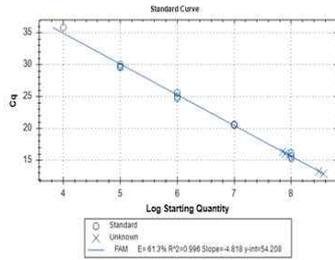


2017 A연천주	Cq 평균값	환산 copy수
0.2ml	14.6	2.6E+07
2ml	13.4	5.3E+07



A22 Iraq	Cq 평균값	환산 copy수
0.2ml	13.1	1.1E+08
2ml	11.5	2.7E+08

Asia1	Cq	환산
-------	----	----



Shamir	평균값	copy수
0.2ml	16.2	8.5E+07
2ml	12.9	3.7E+08

(나) 페이퍼센서 민감도 및 특이도 분석을 위한 구제역바이러스 항원 패널 확보

- 개발 진행 중인 페이퍼센서의 민감도 및 특이도 분석을 위해 다음과 같이 총 40종의 구제역바이러스 항원 패널을 확보하였음. 전세계에서 가장 발생보고가 많은 O형의 경우 다양한 지역형(4개) 및 유전형(5종) 총 22개 바이러스를 구축하였으며, A형의 경우 아시아 발생 지역·유전형 총 10개 바이러스를 구축하였음. Asia1형의 경우 3종의 바이러스를 확보하였으며, 나머지 C, SAT1, SAT2 및 SAT3은 각 1개 바이러스를 구축하였음.

- 또한, 국내에서 발생했던 구제역바이러스를 대상으로 평가하기 위해 O형은 12개 바이러스가 포함되었고 및 A형의 바이러스도 2종 포함되었음. 특히 O형의 경우 지난 2000년부터 최근까지 대부분의 발생 건이 항원 패널에 포함되어 페이퍼센서 평가에 매우 유용한 결과를 도출할 수 있을 것으로 예측됨. A형의 경우도 가장 최근 2018년 바이러스의 특성평가가 완료 되는대로 항원패널에 추가할 예정임.

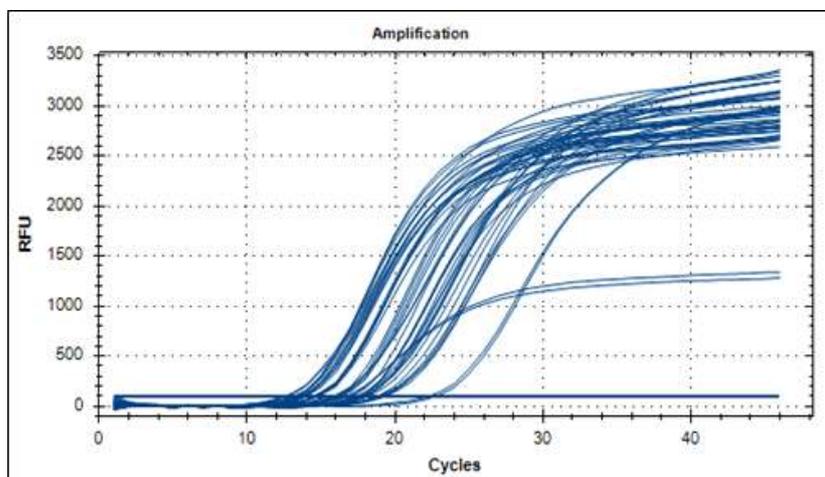
- 특이도 평가를 위해 돼지에서 구제역과 임상증상이 유사하며, 같은 Picornaviridae family에 속하는 Seneca valley virus를 포함하였음. 구제역과 감별이 필요한 여러 질병 중에서 현재 가장 넓은 지역, 특히 가까운 중국에서도 발생이 보고되고 있는 바이러스성 질병임.

번호	바이러스 명(strain)	혈청형	지역·유전형	분리년도
1	A_포천	A	Asia/Sea-97	2010
2	A_zabaykalsky	A	Asia/Sea-97	2013
3	A_Bac_Ninh_VN2013	A	Asia/Sea-97	2013
4	A_VN18	A	Asia/Sea-97	2014
5	A_VN25	A	Asia/Sea-97	2014
6	A_연천	A	Asia/Sea-97	2017
7	A_Malaysia97	A	Asia/Sea-97	해외도입
8	A_VN15	A	Asia/Sea-97	2014
9	A_Iran05	A	Asia/Iran-05	해외도입
10	A_A22Iraq	A	Asia/G-IV	해외도입
11	Asia1_MOG05	ASIA1	G-V	2005
12	Asia1_CAM_9-80	ASIA1	G-V	해외도입
13	Asia1_sharmir	ASIA1	G-V	해외도입
14	C3_Resende/BRA-55	C	Euro-SA	해외도입
15	O_Yang-Ju	O	SEA/Mya-98	2010
16	O_Paju	O	SEA/Mya-98	2010
17	O_Jincheon	O	SEA/Mya-98	2014
18	O_VN1	O	SEA/Mya-98	2014
19	O_VN6	O	SEA/Mya-98	2014
20	O_hapcheon_KOR2014	O	SEA/Mya-98	2014
21	O_Gimje	O	SEA/Mya-98	2016

번호	바이러스 명(strain)	혈청형	지역·유전형	분리년도
22	O_Gochang	O	SEA/Mya-98	2016
23	O_Nonsan	O	SEA/Mya-98	2016
24	O_안동2010	O	SEA/Mya-98	2010
25	O_primorsky	O	SEA/Mya-98	해외도입
26	O_chung-Ju	O	ME-SA/PanAsia	2000
27	O1_SKR_2002	O	ME-SA/PanAsia	2002
28	O_VN2013_Sonla	O	ME-SA/PanAsia	2013
29	O_Bac_Ninh_VN2013	O	ME-SA/PanAsia	2013
30	O_보은1차	O	ME-SA/IND2001d	2017
31	O_정읍	O	ME-SA/IND2001d	2017
32	O1_manisa	O	ME-SA	해외도입
33	O_Campos	O	Euro-SA	해외도입
34	O1_BFS_1860_UK_67	O	Euro-SA	해외도입
35	O_Yunlin_Tw_97	O	Cathay	해외도입
36	O_3039	O	Cathay	해외도입
37	SAT1_BOT-1-68	SAT1	WZ(III)	해외도입
38	SAT2_ZIM-5-81	SAT2	WZ(II)	해외도입
39	SAT3_ZIM_4-81	SAT3	-	해외도입
40	Seneca valley virus	-	SVV	해외도입

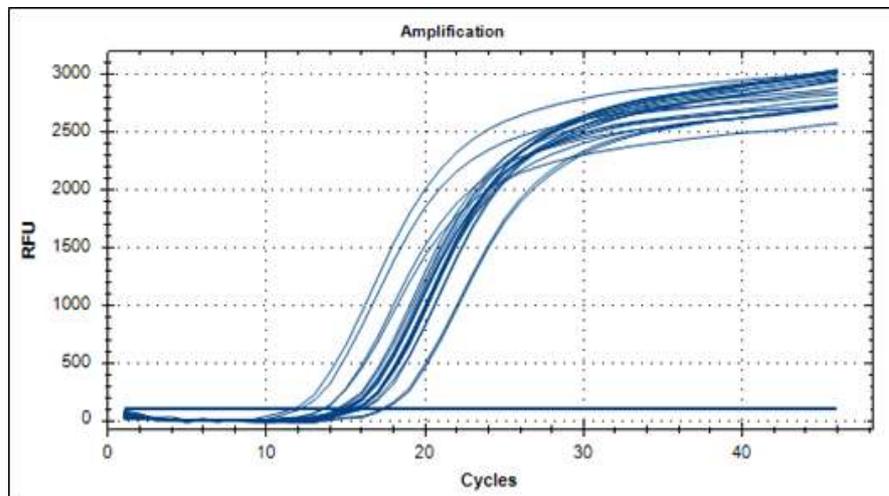
(다) 페이퍼센서 민감도 및 특이도 분석을 위한 구제역바이러스 항원 패널 평가 결과

- 상기의 확보된 구제역바이러스 항원 패널에 대해 혈청형 별로 구분하여 실시한 유전자 증폭방법(realtime RT-PCR, rRT-PCR)을 이용하여 각 항원 패널 내에 구제역바이러스 유전자 함량을 평가하였음. 사용된 rRT-PCR 방법은 구제역바이러스의 3D 유전자를 검출하는 방법으로 OIE (세계동물보건기구) 표준진단매뉴얼에 등재되어 있는 방법으로 구제역바이러스 항원 패널 중 혈청형 별로 평가하였음
- 구제역바이러스 O형의 경우 총 22개 구제역바이러스 항원패널이 적용되었으며, 살아있는 바이러스 역가 (TCID50/ml)는 $10^5 \sim 10^7$ 로 확인되었으며(Data not shown), rRT-PCR에서 모두 검출되었고 Cq값을 통해 유전자 함량은 차이가 있음을 확인할 수 있었음 (Cq 13~22)



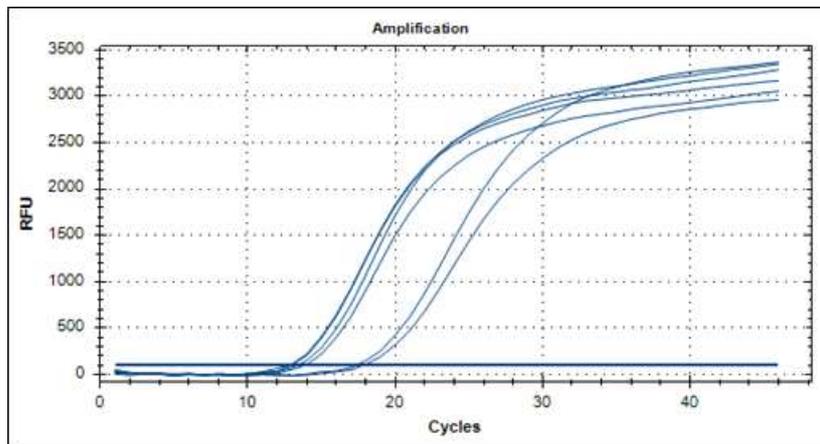
번호	혈청형	바이러스명(Strain)	유전형	Bioneer(3D)	
				Cq1	Cq2
1	O	O_Yang-Ju	SEA/Mya-98	13.4	13.6
2	O	O_Paju		14.03	13.88
3	O	O_Jincheon		17.94	17.81
4	O	O_VN1		22.67	22.2
5	O	O_VN6		17.6	17.08
6	O	O/Hapcheon/KOR/2014		18.68	18.11
7	O	O_Gimje		18.84	18.95
8	O	O_Gochang		15.7	15.52
9	O	O_Nonsan		17.41	17.53
10	O	O_primorsky		14.52	14.41
11	O	O_안동2010		16.58	16.71
12	O	O_chung-Ju	ME-SA/PanAsia	16.14	16.28
13	O	O1_SKR_2002		14.56	14.48
14	O	O_VN2013_Son		15.91	16.1
15	O	O_Bac_Ninh_VN2013		17.35	17.51
16	O	O_보은1차	ME-SA/ind-2001d	18.02	18.03
17	O	O_정읍		13.73	13.58
18	O	O1_manisa	ME-SA	12.46	12.57
19	O	O_3039	Cathay	13.14	13.16
20	O	O_Yunlin_Tw_97		18.94	19.27
21	O	O_Campos	Euro-SA	13.38	13.73
22	O	O1_BFS_1860_UK_67		14.62	14.75

- 구제역바이러스 A형의 경우 총 10개 구제역바이러스 항원패널이 적용되었으며, 살아있는 바이러스 역가 (TCID50/ml)는 $10^5 \sim 10^6$ 로 확인되었으며(Data not shown), rRT-PCR에서 모두 검출되었고 Cq값을 통해 유전자 함량은 차이가 있음을 확인할 수 있었음(Cq 13~17)



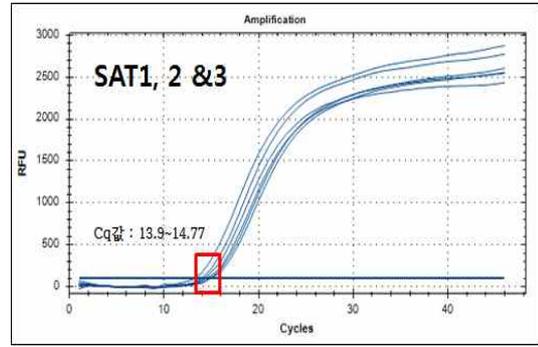
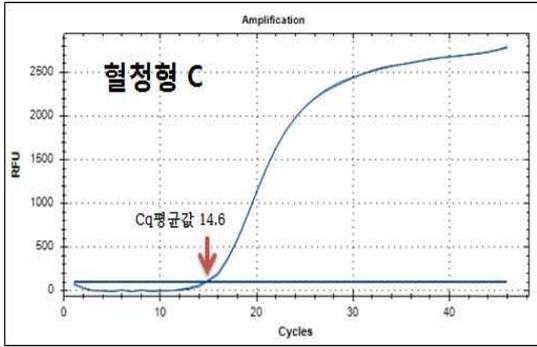
번호	혈청형	바이러스명(Strain)	유전형	Bioneer(3D)	
				Cq1	Cq2
1	A	A_포천	Asia/Sea-97	13.5	13.52
2	A	A_zabaykalsky		15.14	15.32
3	A	A_Bac_Ninh_VN2013		14.88	14.95
4	A	A_VN18		16.03	15.95
5	A	A_VN25		15.3	15.39
6	A	A_연천		15.65	15.43
7	A	A_Malaysia97		17.21	17.37
8	A	A_VN15		14.62	15.07
9	A	A_Iran05	Asia/Iran-05	12.06	11.53
10	A	A_A22Iraq	Asia/G-IV	14.46	14.36

- 구제역바이러스 ASIA1형의 경우 총 3개 구제역바이러스 항원패널이 적용되었으며, 살아있는 바이러스 역가 (TCID50/ml)는 약 10^6 로 확인되었으며(Data not shown), rRT-PCR에서 모두 검출되었고 Cq값을 통해 유전자 함량은 차이가 있음을 확인할 수 있었음(Cq 12~17)

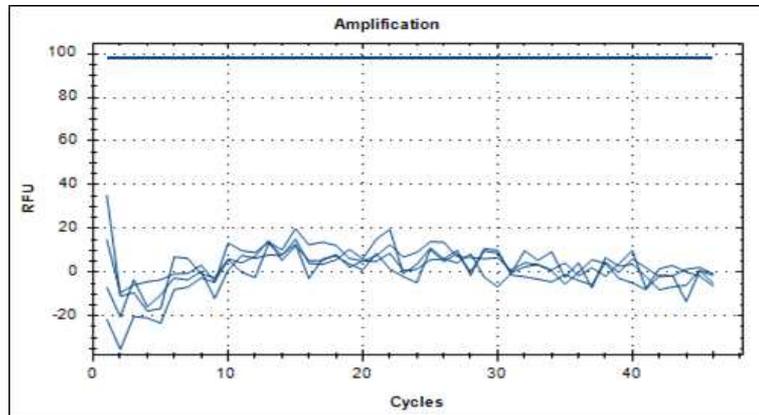


번호	혈청형	바이러스명(Strain)	유전형	Bioneer(3D)	
				Cq1	Cq2
1	Asia1	MOG/05	G-V	12.67	12.85
2	Asia1	CAM/9/80		13.79	13.26
3	Asia1	Sharmir		17.26	17.77

- 구제역바이러스 혈청형C, SAT1,SAT2 및 SAT3의 경우 살아있는 바이러스 역가(TCID50/ml)는 약 10^6 로 확인되었으며(Data not shown), rRT-PCR에서 모두 검출되었고 Cq값을 통해 유전자 함량은 약간의 차이가 있음을 확인할 수 있었음(약 Cq 14)



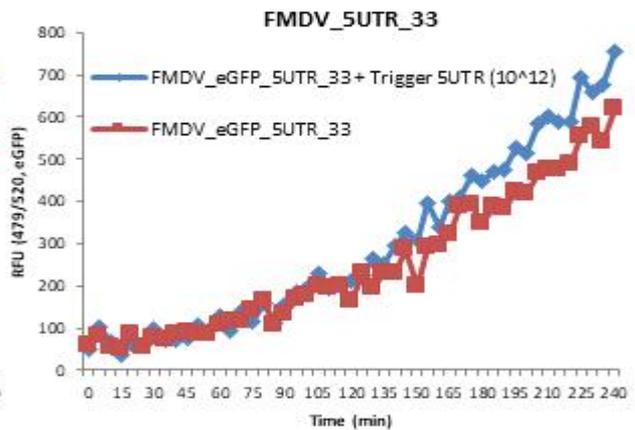
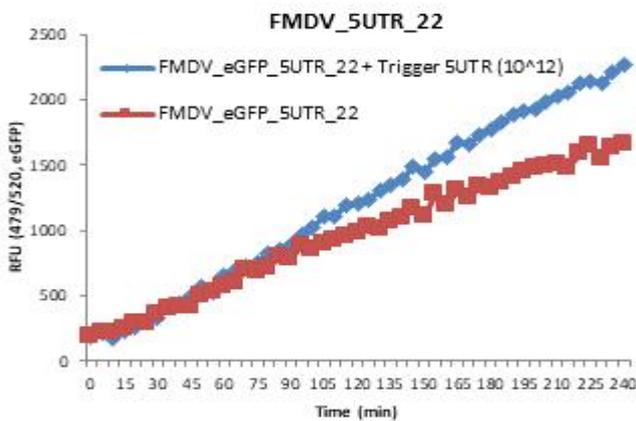
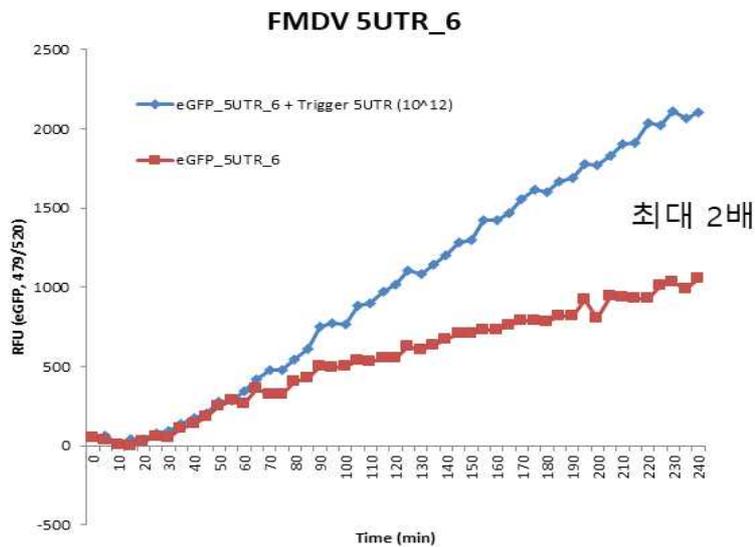
- 돼지에서 구제역바이러스와 임상증상이 유사하여 감별이 필요한 Seneca valley virus를 적용한 결과 약 5×10^5 TCID₅₀/ml의 살아있는 바이러스가 확인되었으며, rRT-PCR 적용 결과 구제역바이러스 유전자는 전혀 검출되지 않아 교차반응 없었음. 향후 페이퍼센서 평가 시 특이도 평가를 위해 유용하게 활용될 수 있을 것을 기대됨

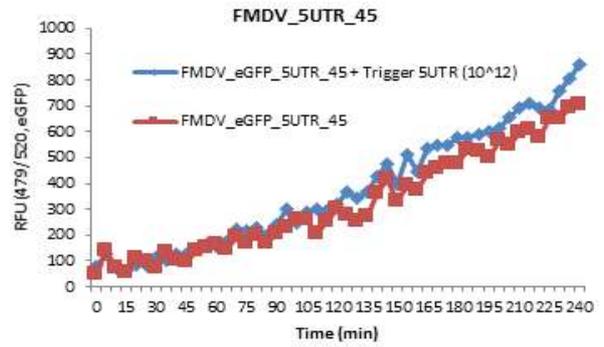
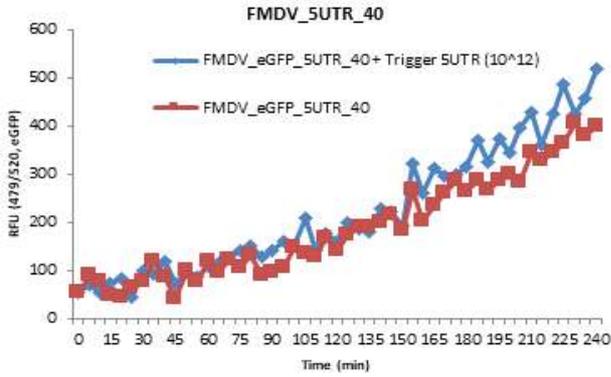


(8) 구제역 바이러스 진단용 페이퍼 센서 개발

(가) FMDV 5'UTR 영역 후보 switch RNA 발현 시간별 테스트

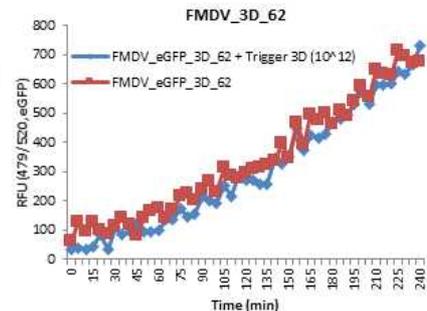
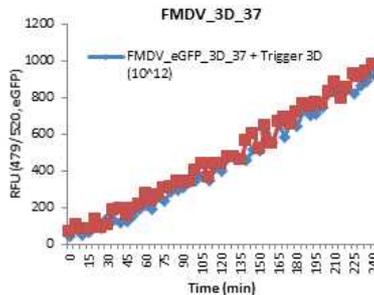
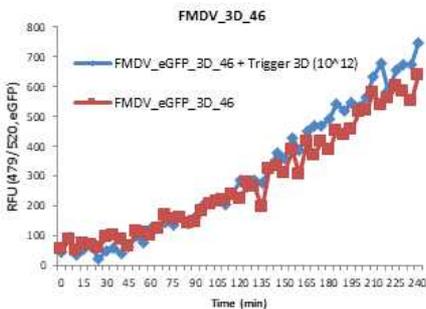
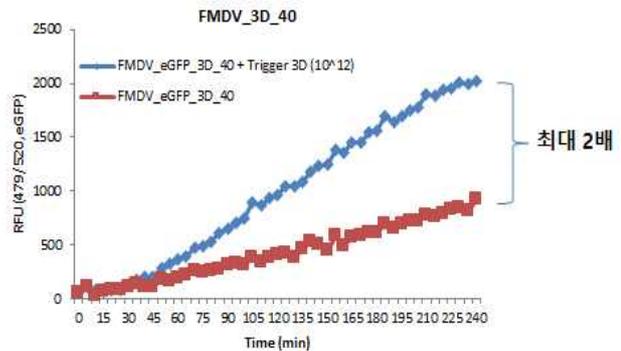
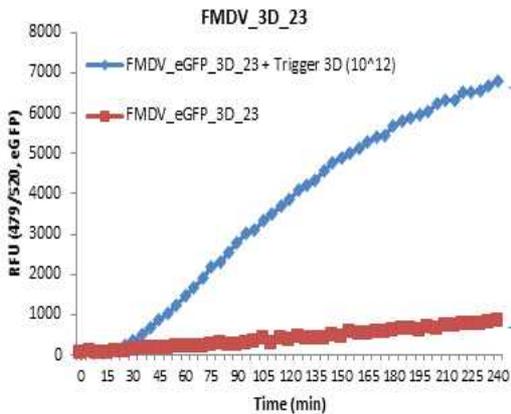
- FMDV 5'UTR switch RNA 5종(6, 22, 33, 40, 45)을 cell free protein synthesis solution을 이용하여 FMDV 5'UTR RNA에 반응하는 5'UTR switch RNA를 반응을 시간별로 확인함. 만들어진 FMDV 5'UTR switch RNA(최종 농도 300 ng/ul)와 cell free solution을 384 well에 넣고 37°C에서 20분 동안 pre-incubation하여 cell free solution에서 switch RNA를 안정화 시킨 후, FMDV RNA (1×10^{12} copies/ml)를 넣고 microplate reader에서 37°C온도에서 4시간 동안 형성되는 eGFP 형광값인 RFU 값을 확인함. 아래 그래프와 같이 4시간 후 FMDV 5'UTR switch RNA_6번에서 대조군 대비 2배 증가가 확인됨



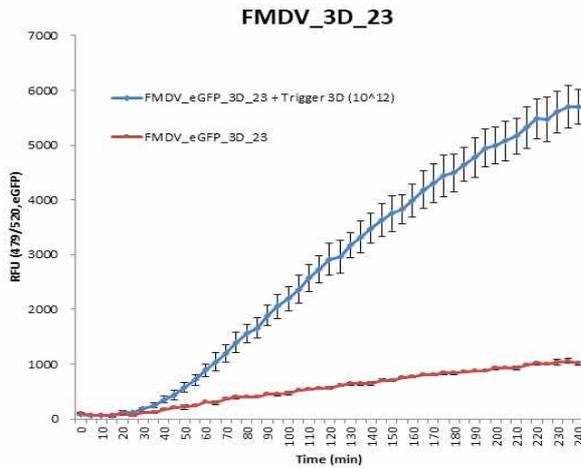


(나) FMDV 3D 영역 후보 switch RNA 5종 발현 시간별 테스트

- FMDV 3D switch RNA 5종(23, 37, 40, 46, 62)을 cell free protein synthesis solution을 이용하여 FMDV 3D RNA에 반응하는 3D switch RNA를 반응을 시간별로 확인함. 만들어진 FMDV 3D switch RNA(최종 농도 300 ng/ul)와 cell free solution을 384 well에 넣고 37°C에서 20분 동안 pre-incubation하여 cell free solution에서 switch RNA를 안정화 시킨 후, FMDV RNA (1×10^{12} copies/ml)를 넣고 microplate reader에서 37°C온도에서 4시간 동안 형성되는 eGFP 형광값인 RFU 값을 확인함. 아래 그래프와 같이 4시간 후 FMDV 3D switch RNA_23번에서 대조군 대비 8배, FMDV 3D switch RNA_40번에서 대조군 대비 2배 증가가 확인됨



- 그 중 가장 반응이 좋은 FMDV 3D switch RNA_23을 cell free protein synthesis solution을 이용하여 재현성 실험을 실시하였으며, 아래 그래프와 같이 3배 증가시간은 50분이며, 4시간 후 5.6배의 형광이 증가되는 것이 확인됨



Time	3D_23				ratio
	Trigger x		Trigger o		
	Av.	Sted.	Av.	Sted.	
0	101	7.9	84	18.5	0.8
5	67	12.5	70	5.1	1.0
10	66	5.0	70	6.7	1.1
15	56	15.0	82	26.2	1.1
20	96	24.2	111	36.7	1.2
25	61	6.0	113	26.7	1.8
30	120	17.8	190	7.9	1.6
35	115	15.4	247	42.6	2.2
40	170	9.8	353	84.8	2.1
45	200	14.2	436	88.1	2.2
50	215	38.6	573	83.2	2.7
55	247	8.6	713	99.3	2.9
60	309	7.4	898	122.0	2.9
65	232	27.5	1039	165.8	3.6
70	361	21.0	1194	156.3	3.3
75	394	29.7	1393	184.1	3.5
80	406	5.8	1557	171.3	3.8
85	405	4.5	1662	190.5	4.1
90	446	18.3	1898	183.7	4.2
95	449	25.1	2051	212.2	4.6
100	471	32.8	2198	220.0	4.7
105	519	8.5	2368	258.3	4.6
110	535	16.4	2577	249.3	4.8
115	562	8.5	2734	252.8	4.9
120	565	24.7	2915	288.0	5.2
125	603	8.9	2981	292.4	4.9
130	639	25.1	3176	231.6	5.0
135	640	30.0	3322	291.0	5.2
140	647	33.0	3479	276.3	5.4
145	708	28.5	3629	303.3	5.1
150	695	7.6	3750	330.4	5.4
155	757	18.0	3835	264.4	5.1
160	769	10.4	3992	297.7	5.2
165	805	25.1	4188	339.5	5.2
170	806	25.0	4305	353.3	5.3
175	832	33.0	4438	382.5	5.3
180	835	22.4	4491	338.7	5.4
185	851	13.3	4648	398.9	5.5
190	887	13.1	4774	358.2	5.5
195	881	7.5	4947	350.0	5.6
200	923	21.5	4995	338.5	5.4
205	927	22.9	5076	361.0	5.5
210	926	30.7	5169	325.7	5.6
215	987	6.8	5321	372.0	5.4
220	1011	25.9	5480	369.1	5.4
225	1008	6.0	5469	399.5	5.4
230	1032	48.2	5607	375.2	5.4
235	1057	45.6	5707	386.8	5.4
240	1010	30.8	5695	314.9	5.6

(9) FMDV 샘플을 이용한 3D switch RNA 테스트 (검역본부)

- 상기의 진행된 실험 결과에 따라 가장 효과가 좋은 3D영역의 23번 switch RNA 테스트를 진행하였으며, 테스트에 사용할 구제역바이러스의 3D 영역 유전자 서열은 아래와 같이 구제역바이러스 플라스미드를 이용함

FMDV3D Cloning Plasmids														
#	Serotype	Sample	Insert DNA Size (bp)	pTOP TA Vector size (bp)	Total size(bp)	Nudeic Acid Conc.	Unit	Copy number	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Volume (ul)
1	O	보은2017-3	1475	3807	5282	228.0	ng/ul	4.00x10 ¹⁰	4.56	2.40	1.90	2.15	DNA	49
2	O	진천2014-3	1477	3807	5284	204.7	ng/ul	3.59x10 ¹⁰	4.09	2.17	1.88	1.92	DNA	49
3	A	연천2017-3	1477	3807	5284	282.4	ng/ul	4.95x10 ¹⁰	5.65	2.97	1.90	2.03	DNA	49
4	A	포천2010-3	1462	3807	5269	271.4	ng/ul	4.77x10 ¹⁰	5.43	2.86	1.90	2.00	DNA	49
5	Asia	Asia1shamir-3	1477	3807	5284	294.8	ng/ul	5.17x10 ¹⁰	5.90	3.11	1.90	1.91	DNA	49
6	A	A22Iraq-3	1477	3807	5284	412.0	ng/ul	7.22x10 ¹⁰	8.24	4.32	1.91	2.11	DNA	49
7	O	AD2002-3	1465	3807	5272	191.1	ng/ul	3.36x10 ¹⁰	3.82	1.98	1.93	2.16	DNA	49
8	O	AD2010-2	1462	3807	5269	529.4	ng/ul	9.31x10 ¹⁰	10.59	5.54	1.91	2.16	DNA	30

(가) 전체 흐름도

- 플라스미드의 양이 적기 때문에 구제역바이러스 3D 영역 부위를 증폭시키는 과정이 필요하였으며, DNA agarose gel로 PCR product를 확인 후 충분한 3D 유전자를 확보하여 switch RNA가 검출 할 수 있는 RNA로 전사 시킨 후 테스트를 진행함

① 1단계 : T7 promoter를 포함한 primer와 검역본부에서 제공한 각 벡터를 넣고 conventional PCR 실시하여 T7 promoter가 함유된 각 FMDV 종류별 3D 영역 PCR product 생성함

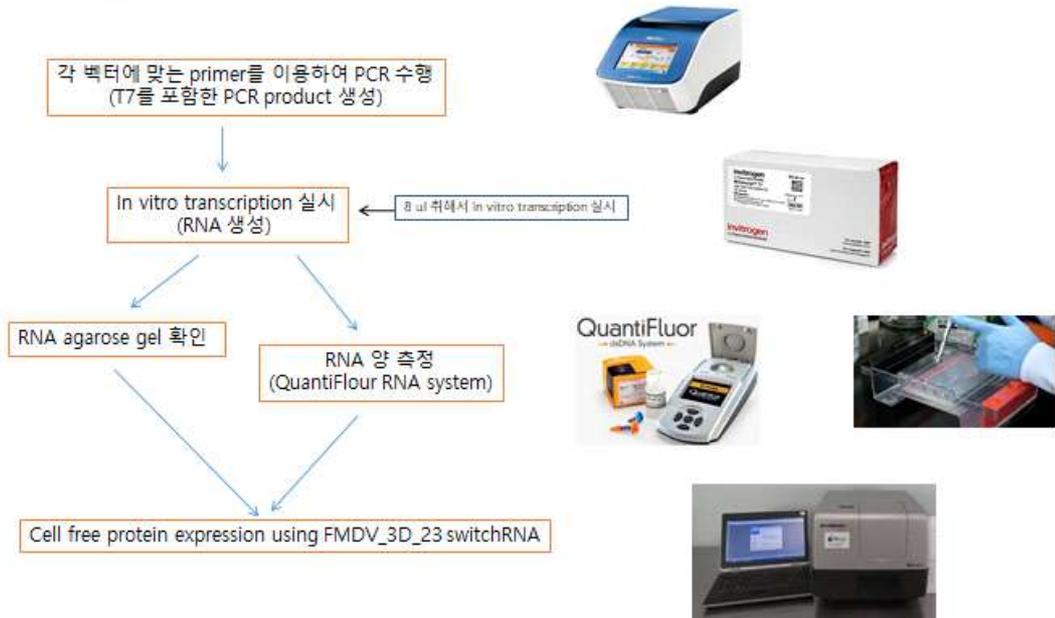
② 2단계 : 생성된 각 유전자별 FMDV 3D 영역의 DNA를 DNA agarose gel을 이용하여 확인함 (promoter까지는 DNA 확인)

③ 3단계 : 각 FMDV 종류별 T7 promoter를 포함한 PCR product를 이용한 in vitro transcription을 실시함

여 각 유전자별 FMDV 3D 영역의 RNA를 생성함

④ 4단계 : 생성된 각 유전자별 3D 영역의 RNA를 RNA formaldehyde agarose gel을 이용하여 확인함

⑤ 5단계 : 각 유전자별 3D 영역의 RNA를 리보조절 유전자와 함께 cell-free transcription & translation solution (NEB)과 반응하여 형성된 형광(eGFP)를 측정함



<실험 전체 흐름도>

(나) 벡터 및 primer 제작

- FMDV 샘플 pTOP TA plasmid의 정보를 아래와 같이 확인 후 RNA로 전사 (transcript) 시킬 수 있는 T7 promoter가 포함된 primer를 제작함



lacZα ATG																		
M13 Reverse Primer					M13 Forward (-20) Primer													
CAG	GAA	ACA	GCT	ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	CCA	AGC	TTG	GTA	CCG	AGC	TCG	GAT	CCA	CTA
GTC	CTT	TGT	CGA	TAC	TGG	TAC	TAA	TGC	GGT	TCG	AAC	CAT	GGC	TCG	AGC	CTA	GGT	GAT
					PCR Product													
GTA	ACG	GCC	GCC	AGT	GTG	CTG	GAA	TTC	GCC	CTT	TAG	GGC	GAA	TTC	TGC	AGA		
CAT	TGC	CGG	CGG	TCA	CAC	GAC	CIT	AAG	CGG	GAA	TTC	CCG	CTT	AAG	ACG	TCT		
					PCR Product													
TAT	CCA	TCA	CAC	TGG	CGG	CCG	CTC	GAG	CAT	GCA	TCT	AGA	GGG	CCC	AAT	TCG	CCC	TAT
ATA	GGT	AGT	GTG	ACC	GCC	GGC	GAG	CTC	GCA	CAT	AGA	TCT	CCC	GGG	TTA	AGC	GGG	ATA
					PCR Product													
AGT	GAA	TCG	TAT	TAC	AAT	TCA	CTG	GCC	GTC	GTT	TTA	GAA	CGT	CGT	GAC	TGG	GAA	AAC
TCA	CTT	AGC	ATA	ATG	TTA	AGT	GAC	CGG	CAG	CAA	AAT	GTT	GCA	GCA	CTG	ACC	CTT	TTG

Figure 5-4. A schematic map of pTOP TA-Blunt V2 (3807 bp). A molecule of topoisomerase (TOPO) is covalently coupled to each of the two 3' ends (nt positions 294 and 295) of pTOP TA-Blunt V2. Therefore, pTOP TA-Blunt V2 is ready to form a covalent bond when mixed with PCR products.

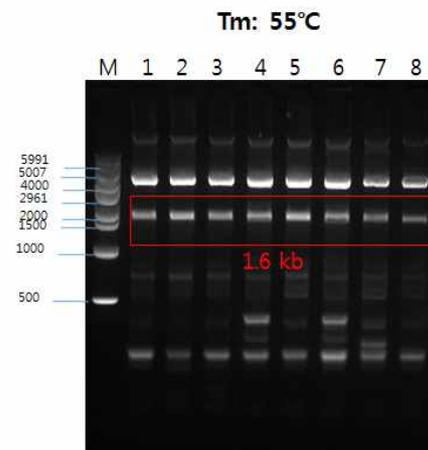
Lac promoter/operator : 95-216
 M13 Reverse Primer binding site : 205-221
 LacZα ORF : 217-534
 MCS, Multiple Cloning Sites : 234-357
 M13 (-20) Forward Primer binding site : 391-406
 ccdB ORF : 544-846
 Kanr gene : 1057-1989
 Ampr gene : 2007-2867

Name	primer 서열
M13R+T7	5'- TAATACGACTCACTATAGGG CAGGAAACAGCTATGAC-3'
M13F	5'- GTAAAACGACGGCCAG-3'

(다) FMDV 샘플 3D 영역 DNA 서열 증폭 및 RNA 확보

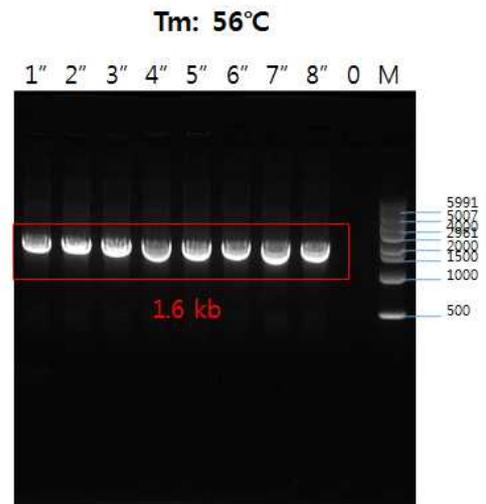
- FMDV 8종에 대한 3D 영역에 삽입된 pTOP TA vector를 T7 promotor가 포함된 primer를 이용하여 PCR을 실시함. 조건은 아래 표와 같이 전체 60 cycle을 실시하였고, annealing 온도를 55도 실시하였음. 아래와 같이 여러 분자량의 PCR product가 만들어 졌고, 그중 3D 영역이 포함된 1.6 kb의 밴드를 확인하였음. 그러나 비특이적 반응의 밴드가 확인되어 annealing 온도를 조절하여 PCR을 재실시함

Step	Temperature	Time	cycle	
Pre-denaturation	95°C	5 min	1 cycle	
Denaturation	95°C	20 sec	60 cycle	
Annealing	55°C	20 sec		
Extension	72°C	30 sec		
Final extension	72°C	7 min		1 cycle
Storage	4°C	∞		-



- 위와 같은 조건에서 annealing 온도를 56도 조정하여 실시하였고, 아래와 같이 3D 영역이 포함된 1.6 kb의 밴드 생성이 확인되어 비특이적 반응의 밴드 없이 FMDV 3D 영역에 포함된 PCR product만 순수하게 얻음

Step	Temperature	Time	cycle	
Pre-denaturation	95°C	5 min	1 cycle	
Denaturation	95°C	20 sec	60 cycle	
Annealing	56°C	20 sec		
Extension	72°C	30 sec		
Final extension	72°C	7 min		1 cycle
Storage	4°C	∞		-

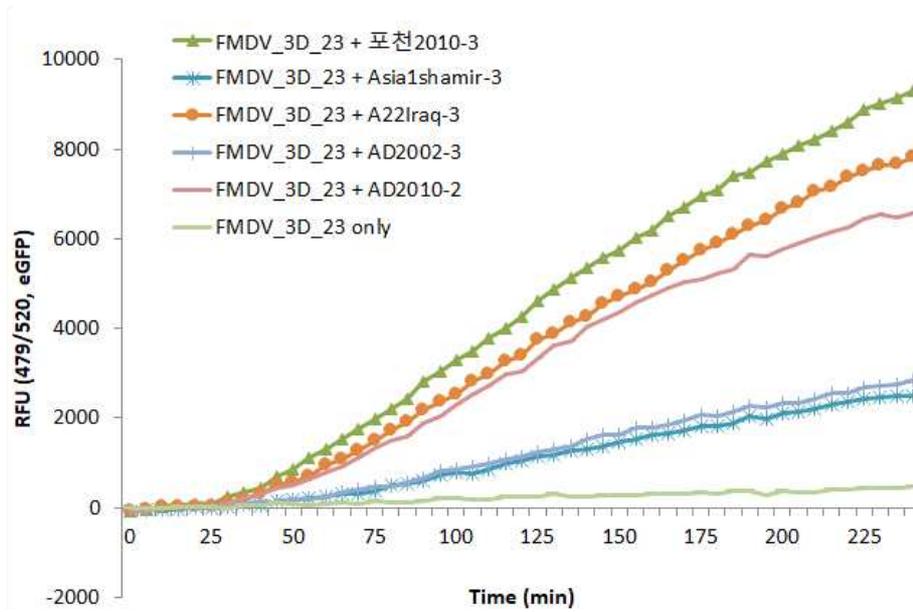


No.	vector 양 (ng)	→	PCR product 양 (ng)
1	100	보은2017-3	7600
2	100	진천2014-3	7600
3	100	연천2017-3	8400
4	100	포천2010-3	5600
5	100	Asia1shamir-3	10000
6	100	A22Iraq-3	7200
7	100	AD2002-3	9400
8	100	AD2010-2	4000

- 위의 PCR을 통해 생성된 FMDV 8종의 3D 영역에 삽입된 PCR product를 이용하여 in vitro transcription을 실시하여 아래 표와 같은 RNA 양을 확보함

No.	DNA 양 (ng)	→	RNA 양 (ng/ul)	copies/ml
1	3040	보은2017-3	6560	7.4×10^{13}
2	3040	진천2014-3	7560	8.5×10^{13}
3	3360	연천2017-3	8330	9.4×10^{13}
4	2240	포천2010-3	9380	1.1×10^{14}
5	4000	Asia1shamir-3	15000	1.7×10^{14}
6	2880	A22Iraq-3	26500	3.0×10^{14}
7	3760	AD2002-3	14400	1.6×10^{14}
8	1600	AD2010-2	14800	1.6×10^{14}

- FMDV 8종의 3D 영역이 포함된 RNA를 이용하여 FMDV 3D_23 switch RNA와 함께 cell-free transcription&translation solution(NEB)과 반응하여 형성된 형광(eGFP)를 측정함
- 실험 결과 포천2010-3의 반응이 가장 높게 일어났으며, 3배 증가 시간이 65분으로 8종중에 가장 높음. 그 다음으로 A22Iraq-3, AD2010-2, AD2002-3, 그리고 Asia1shamir-3 순으로 반응이 나타났으며, 보은 2017-3, 진천2014-3, 그리고 연천2017-3은 반응이 일어나 않았음



	copies/ml	mutation	3배 증가 시간
포천2010-3	1.8×10^{13}	2	65 m
A22Iraq-3	5.0×10^{13}	2	80 m
AD2010-2	2.8×10^{13}	0	85 m
AD2002-3	2.7×10^{13}	2	190 m
Asia1shamir-3	2.8×10^{13}	3	205 m

- 구제역 바이러스 검출을 위한 Switch RNA 제작에 사용한 3D서열의 길이는 총 107 bp로 중간 부위인 36 bp의 서열로 앞서 성공적으로 검출된 5가지 구제역 바이러스의 서열과 비교한 결과는 아래와 같음

```

FMDV 3D Trigger      A CTGGGTTTTACAAACCTGTGATGGCTTCGAAAGACCCCTCGAGGCTATCCTCTCCTTTGCA CGCCGTGGGACCAATACAG
Andong 2010-2        A CTGGGTTTTACAAACCTGTGATGGCTTCGAAAGACCCCTCGAGGCTATCCTCTCCTTTGCA CGCCGTGGGACCAATACAG
A22Iraq-3            A CTGGGTTTTACAAACCTGTGATGGCTTCGAAAGACCCCTCGAGGCTATCCTCTCCTTTGCA CGCCGTGGGACCGTACAG
Pocheon 2010-3      A CTGGGTTTTACAAACCTGTGATGGCTTCGAAAGACCCCTCGAGGCTATCCTCTCCTTTGCA CGCCGTGGGACCAATACAG
Andong 2002-3       A CTGGGTTTTACAAACCTGTGATGGCTTCGAAAGACCCCTCGAGGCTATCCTCTCCTTTGCA CGCCGTGGGACCAATACAG
Asia1 shamir-3      A CTGGGTTTTACAAACCTGTGATGGCTTCGAAAGACCCCTCGAGGCTATCCTCTCCTTTGCA CGCCGTGGGACCAATACAG
  
```

```

FMDV 3D Trigger      GAGAA GTTGATCTCCGTGGCA GGCTCGC
Andong 2010-2        GAGAA GTTGATCTCCGTGGCA GGGCTCGC 0
A22Iraq-3            GAGAA GTTGATCTCCGTGGCA GGGCTCGC 2
Pocheon 2010-3      GAGAA GTTGATCTCCGTGGCA GGCTCGC 2
Andong 2002-3       GAGAA GTTGATCTCCGTGGCA GGCTCGC 2
Asia1 shamir-3      GAGAA GTTGATCTCCGTGGCA GGCTCGC 3
  
```

<3D 전체 서열 비교>

현재 Switch RNA

```

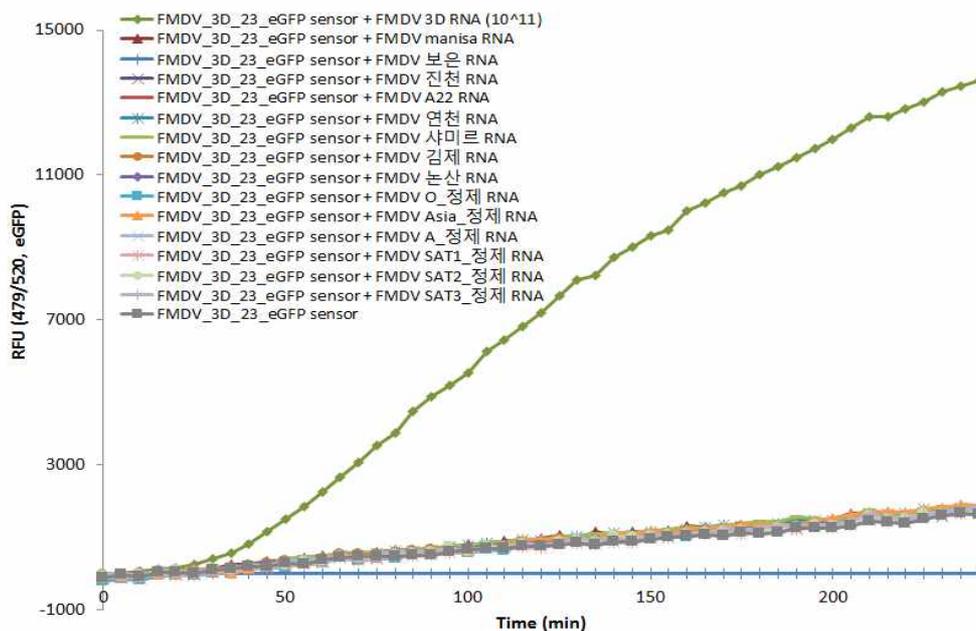
                                     ACCGAAGCTTCTGGGAGCTCCGATAGGAGGAAAC
FMDV 3D Trigger      ACTGGGTTTTACAAACCTGTGA GGGCTTCGAAAGACCCCTCGAGGCTATCCTCTCCTTTGCACGCGTGGGACCAATACAG
Andong 2010-2        ACTGGGTTTTACAAACCTGTGA TGGCTTCGAAAGACCCCTCGAGGCTATCCTCTCCTTTGCACGCGTGGGACCAATACAG 0
A22Iraq              ACTGGGTTTTACAAACCTGTGA TGGCTTCGAAAGACCCCTCGAGGCTATCCTCTCCTTTGCACGCGTGGGACCGTACAG 1
PC2010-3             ACTGGGTTTTACAAACCTGTGA TGGCTTCGAAAGACCCCTCGAGGCTATCCTCTCCTTTGCACGCGTGGGACCAATACAG 1
Andong 2002-3       ACTGGGTTTTACAAACCTGTGA TGGCTTCGAAAGACCCCTCGAGGCTATCCTCTCCTTTGCACGCGTGGGACCAATACAG 0
Asia1 shamir-3      ACTGGGTTTTACAAACCTGTGA TGGCTTCGAAAGACCCCTCGAGGCTATCCTCTCCTTTGCACGCGTGGGACCAATACAG 2
  
```

<Switch RNA 서열 비교>

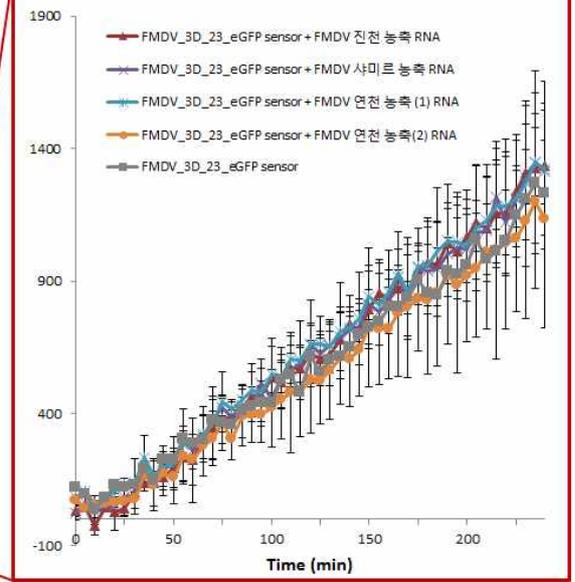
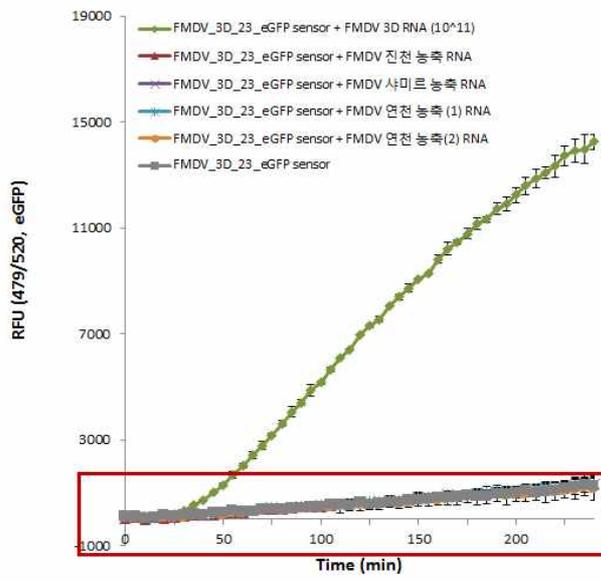
- 총 107 bp의 3D 서열을 trigger 서열과 비교한 결과, 안동2010-2는 100% 일치했지만 A22Iraq-3과 포천 2010-3, 안동2002-3는 각각 2개 차이로 98.1%의 상동성을 보이며 Asia1shamir-3은 3개 차이로 97.2%의 상동성을 보임
- Switch RNA 서열로 사용되는 3D 영역의 일부 서열 (36 bp)을 비교한 결과에서는 안동2010-2와 안동2002-3가 100% 일치하였으며, A22Iraq-3과 포천 2010-3은 1개 차이로 97.2%의 상동성을 보임. Asia1shamir-3은 2개 차이로 94.4%의 상동성을 보임.

(라) Non-amplification 구제역 바이러스 RNA를 검출 실험

- FMDV 3D_23 switch RNA를 이용하여 검역본부에서 배양하여 농축한 구제역 바이러스 RNA를 반응 형광값을 확인함
- 검역본부에서 농축한 정제한 RNA를 FMDV 3D_23 switch RNA와 함께 cell-free transcription & translation solution에서 반응하며 형광값을 시간별로 측정함
- FMDV 3D_23 switch RNA의 반응을 확인하기 위해 양성대조군으로 Trigger 3D RNA (10^{11} copies/ml)을 함께 실험하여 switch RNA의 정상적인 작동을 확인함
- 검역본부에서 14종의 배양 FMDV RNA를 제공 받아 in vitro transcription kit를 이용해 만들어 놓은 FMDV 3D_23 switch RNA와 4시간동안 반응하였지만, 샘플군에서는 형광값이 나타나지 않았음



- 농도에 따른 반응을 확인 하고자 검역본부에서 배양 FMDV RNA를 10배 농축하여 제공 받아 in vitro transcription kit를 이용해 만들어 놓은 FMDV 3D_23 switch RNA와 4시간동안 반응함. 샘플군에서는 형광값이 나타나지 않았음

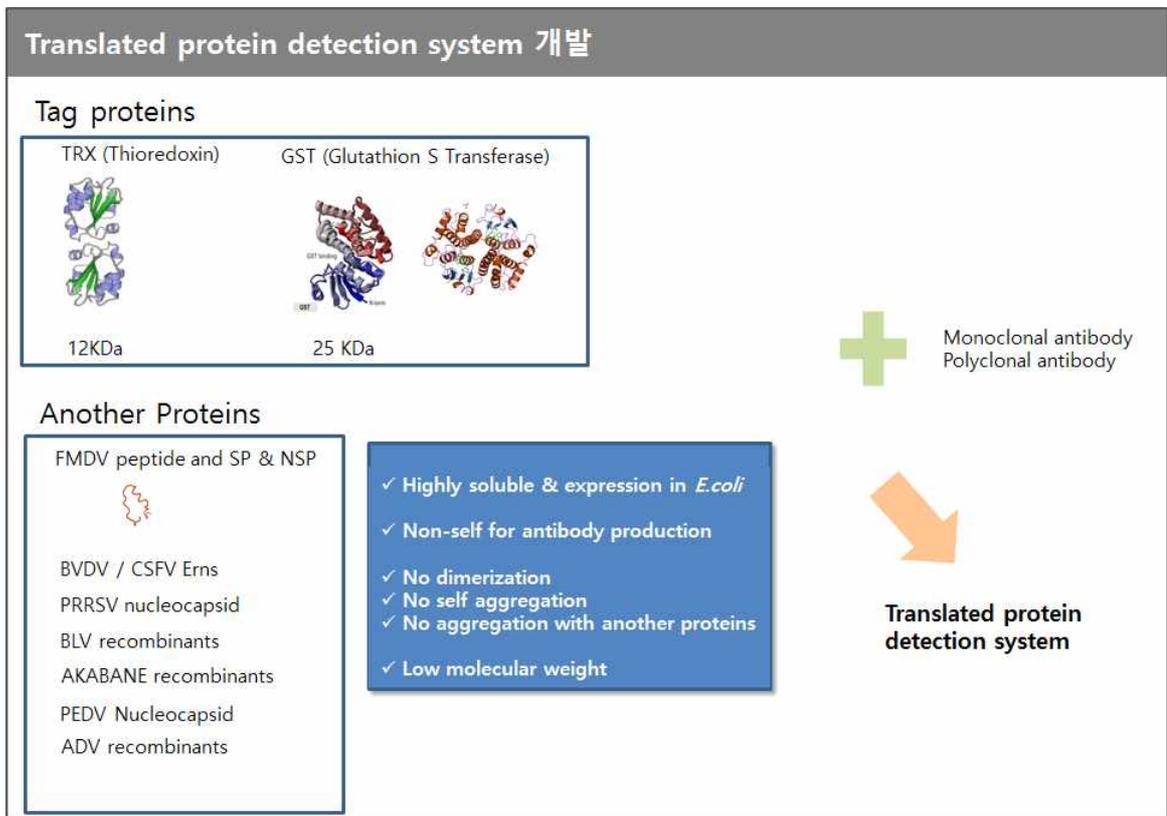


(10) POCT 개념의 switch RNA 센서 제작 및 테스트 - pET32a 벡터 이용

(가) Toehold switch RNA 센서로부터 발현되는 단백질 선정 및 재조합단백질 발현

① Translated protein detection system 개발 전략

- Toehold switch RNA 센서로부터 발현되는 단백질은 solubility가 높아서 self aggregation 발생률이 낮아야하며, cell free translation system에서 정해진 발현시간 동안 발현량을 극대화 하기 위해서는 분자량이 작을수록 좋으며, 이 단백질에 대한 고친화도를 나타내는 단클론항체 제작을 위해서는 mouse 기준 비자기성이 높은 아미노산으로 이루어진 단백질일수록 유리할 것으로 가정함.



② cell free translation system과 E.coli 발현시스템의 발현효율 비교

- recombinant BVDV Erns 유전자가 삽입되어있는 expression vector를 이용하여 cell free translation system(Bioneer社)과 E.coli expression 효율을 비교해본 결과 cell free translation system에서도 E.coli와 유사하게 발현되는 것을 확인함.

Cell free expression과 E.coli expression 비교

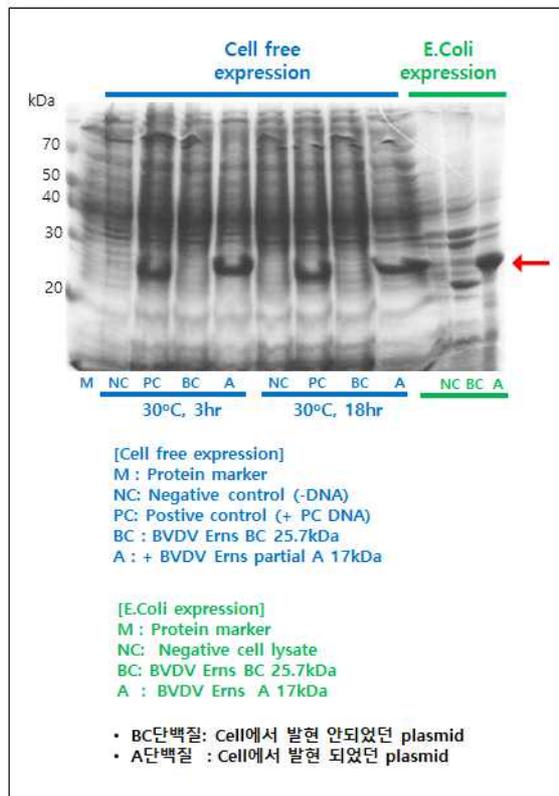


그림. cell free expression system과 E.coli expression 비교

(나) 재조합단백질에 대한 단클론항체 제작 및 LFA (Lateral Flow Assay) kit 제작

① PRRSV NA ORF7 gene fishing & recombinant nucleocapsid expression

PRRSV NA ORF7 gene fishing & rec. nucleocapsid expression (rORF7)

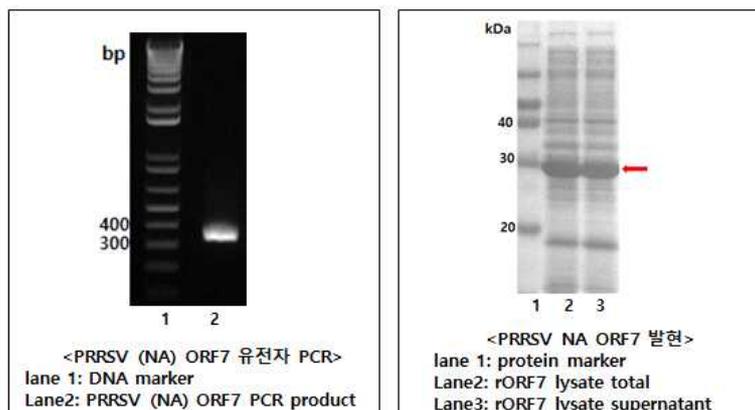


그림. PRRSV NA ORF7 gene fishing & recombinant nucleocapsid expression

- PRRSV (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, 돼지생식기호흡기증후군 바이러스) NA type (North American type, VR2332) 의 구조단백질인 nucleoprotein을 coding 하는 full gene(ORF7)을 cloning 하여 E.coli expression system (pET32a)에서 발현 후 정제하였음.

② monoclonal anti-PRRSV NA nucleoprotein antibody (14종)을 이용한 LFA(Lateral Flow Assay) capture & conjugate 선정 시험

- recombinant PRRSV NA nucleoprotein을 마우스 면역화하여 총 14종의 monoclonal antibody를 최종 선 발하였으며, 상기 14종의 단클론항체를 이용하여 capture & gold conjugate matching test를 실시하여 최적의 민감성 및 특이성을 나타내는 capture & gold conjugate 용 단클론항체 pair 선정함.

mAb(mouse anti-PRRSV NA NP monoclonal antibodies) 14종 pair test

- capture : 항체 2mg/ml dotting, 37°C, 20분 고정
- detector : pH 9, 항체 5µg/ml, OD 7 농도로 검체와 섞어서 loading
- 희석버퍼 : 0.4% Tween20, 0.1mg/ml NMI, 50mM borax
- 희석버퍼 : gold : 검체 = 20 : 5 : 25
- 검체 : 음성-공백터 발현 E.coli lysate, 양성-NA ORF7 5µg/ml

> 3, 7, 25번 항체 조합이 반응성이 가장 좋음.
 > 이 결과 상으로는 7번 gold가 반응성이 가장 좋아 보임. 25-??

그림. monoclonal anti-PRRSV NA nucleoprotein antibody (14종)을 이용한 LFA(Lateral Flow Assay) capture & conjugate 선정 시험

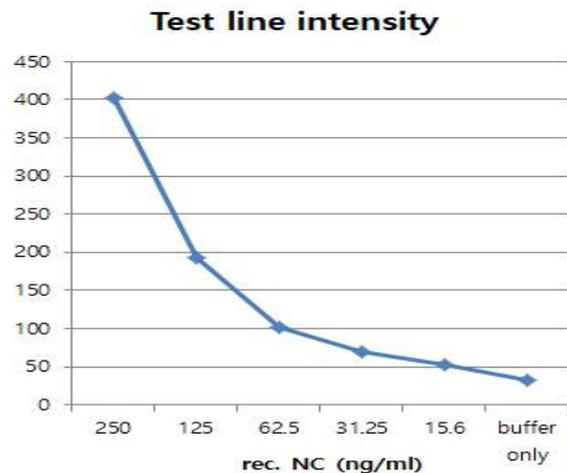
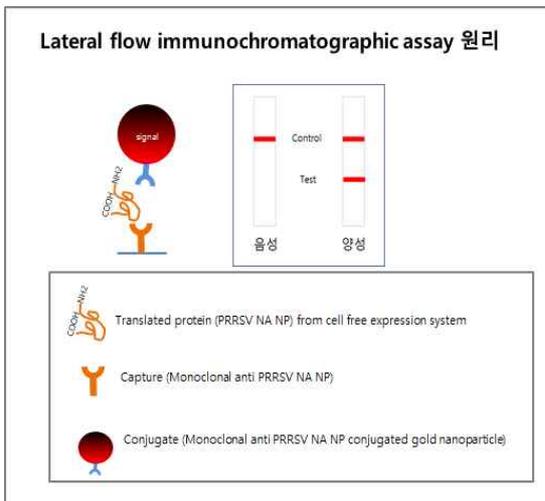
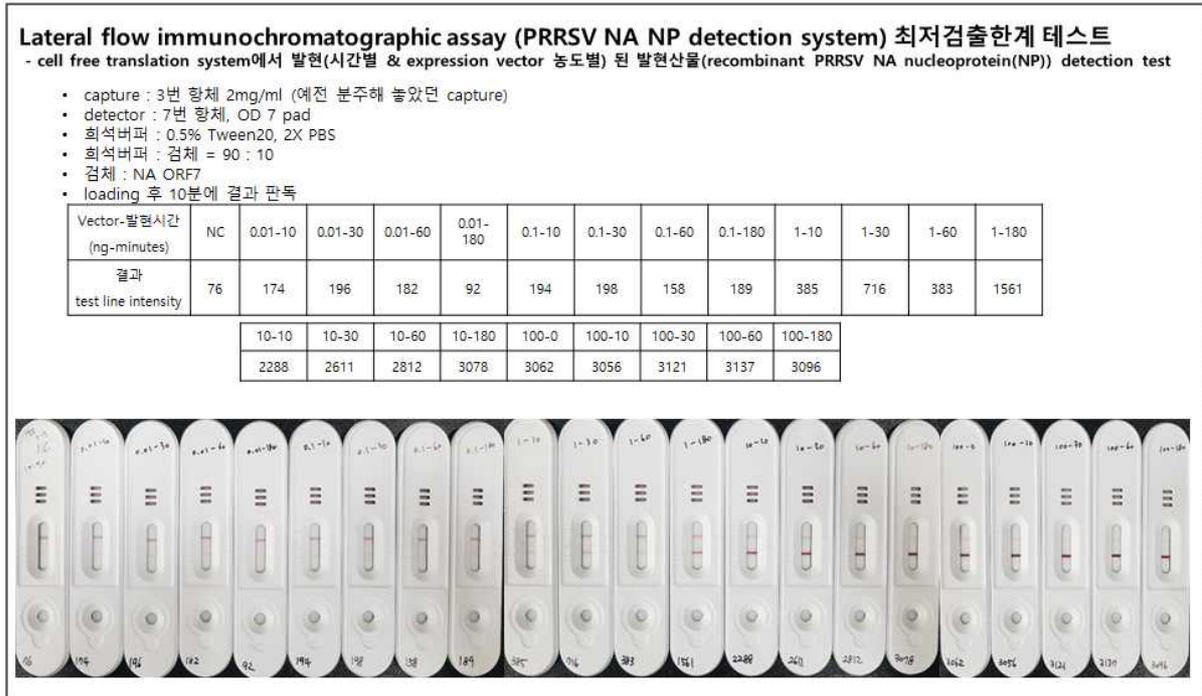


그림. LFA kit의 반응원리 및 재조합 nucleocapsid(NC)의 농도에 따른 LFA test line 반응성

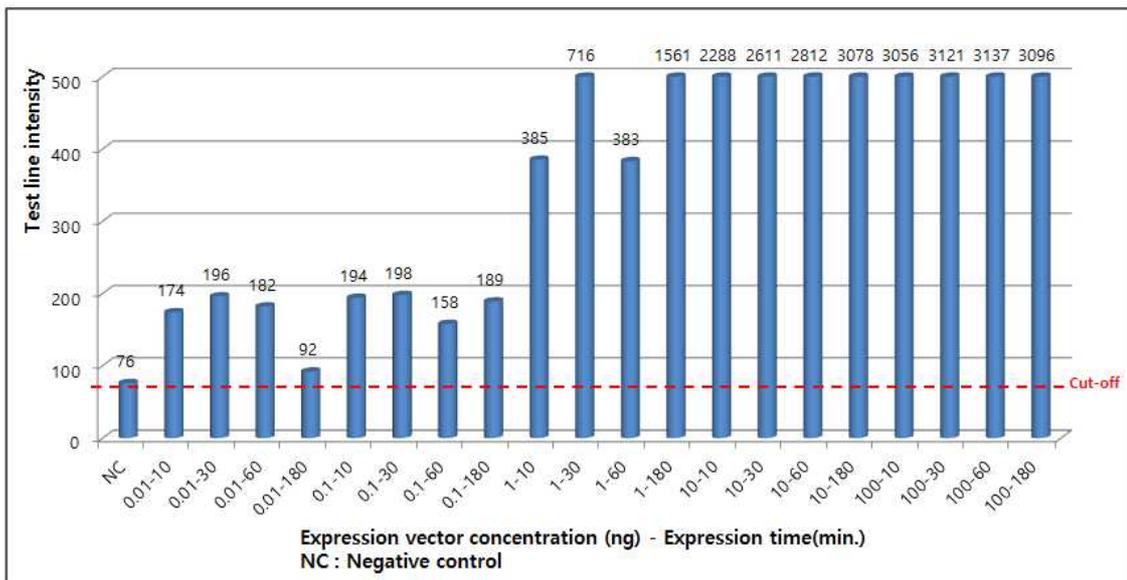
(다) PRRSV NA nucleoprotein detection 기반 LFA kit의 cell free translation system에서 발현된 단백질 검출능 평가

① cell free translation system (Bioneer社)을 이용한 PRRSV NA nucleoprotein 발현 및 LFA 최저검출한계 분석

- LFA의 최저검출한계는 0.01ng의 vector로부터 10분간 발현된 재조합단백질을 감지할 수 있는 것으로 확인.



Lateral flow immunochromatographic assay (PRRSV NA NP detection system) 최저검출한계 테스트
 - cell free translation system에서 발현(시간별 & expression vector 농도별) 된 발현산물(recombinant PRRSV NA nucleoprotein(NP)) detection test



② PRRSV NA nucleoprotein외에 BVDV Erns, TRX(Thioredoxin), GST(Glutathion S transferase), 등에 대한 재조합단백질 및 단클론항체를 제작 후 LFA kit화 하여 반응성 비교평가 해본 결과, PRRSV NA nucleoprotein detection system이 가장 민감성이 높았으며, cell free translation system에 적합하게 작동하는 것으로 확인 되었음. (data not shown)

(라) Toehold switch RNA 센서(FMDV 3D switch RNA_23)의 유전자가 삽입된 pET32a expression vector 시스템 구축 및 trigger (3D gene) 의존적 발현 검증

- Trigger(3D RNA gene)와 hybridization 되어 toehold가 풀림으로 인해 구조적으로 activation 됨으로써 PRRSV NA nucleoprotein이 translation 될 수 있는 Toehold switch RNA 센서(pET32a-FMDV 3D switch RNA_23-PRRSV NA NC) 제작

- ① 1단계 : PRRSV NA nucleoprotein이 translation 될 수 있는 pET32a expression vector 준비
- ② 2단계 : 상기 vector에 존재하고 있는 RBS (Ribosome Binding Site) 제거
- ③ 3단계 : RBS가 제거된 상기 vector에 Toehold 센서 ligation
- ④ 4단계 : cell-free transcription&translation solution (NEB)에 첨가하여 trigger와의 특이적인 hybridization에 의해 toehold switch RNA 센서가 구조적 activation되어 PRRSV NA nucleoprotein 발현유도 확인 (SDS-PAGE & western blotting)
- ⑤ 5단계 : 반응액을 LFA 검체희석액(0.1% tween20 - PBS)에 1/10(v/v) 으로 희석 후 LFA에서 전개시킴
- ⑥ 6단계 : 10min 후 LFA kit의 Test line 반응 확인 및 LFA reader를 이용하여 test line의 반응세기를 수치화 함.

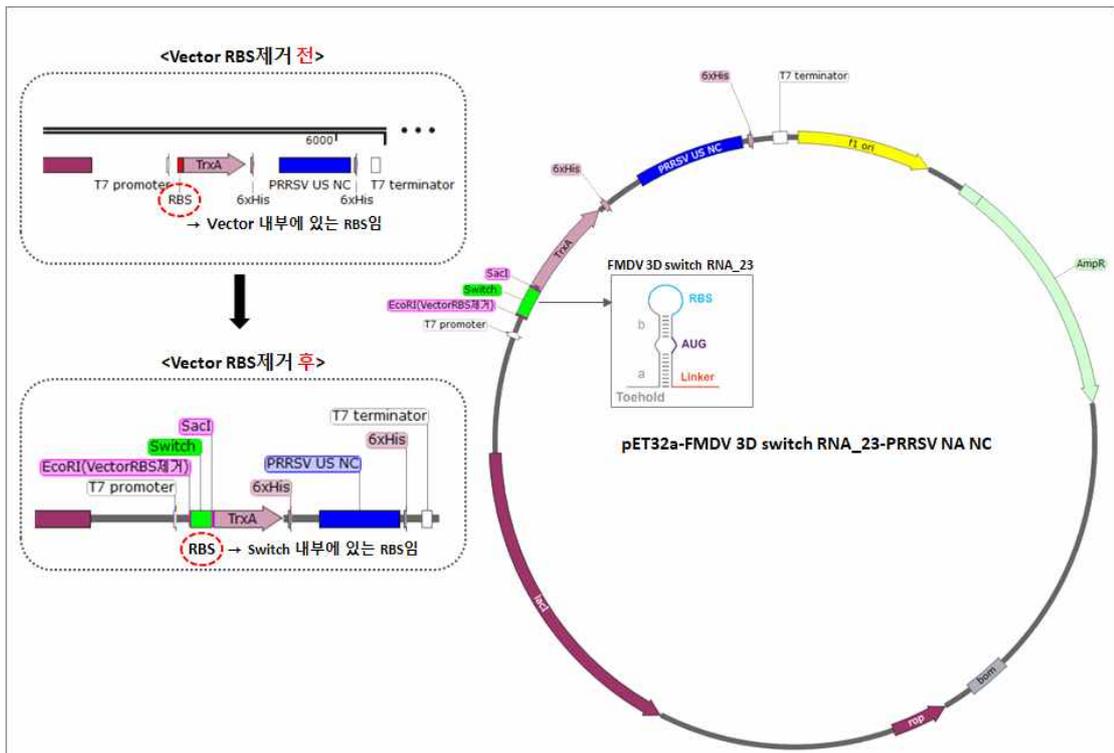


그림. Toehold switch RNA 센서 유전자가 삽입된 pET32a expression vector(pET32a-FMDV 3D switch RNA_23-PRRSV NA NC) 시스템 구축

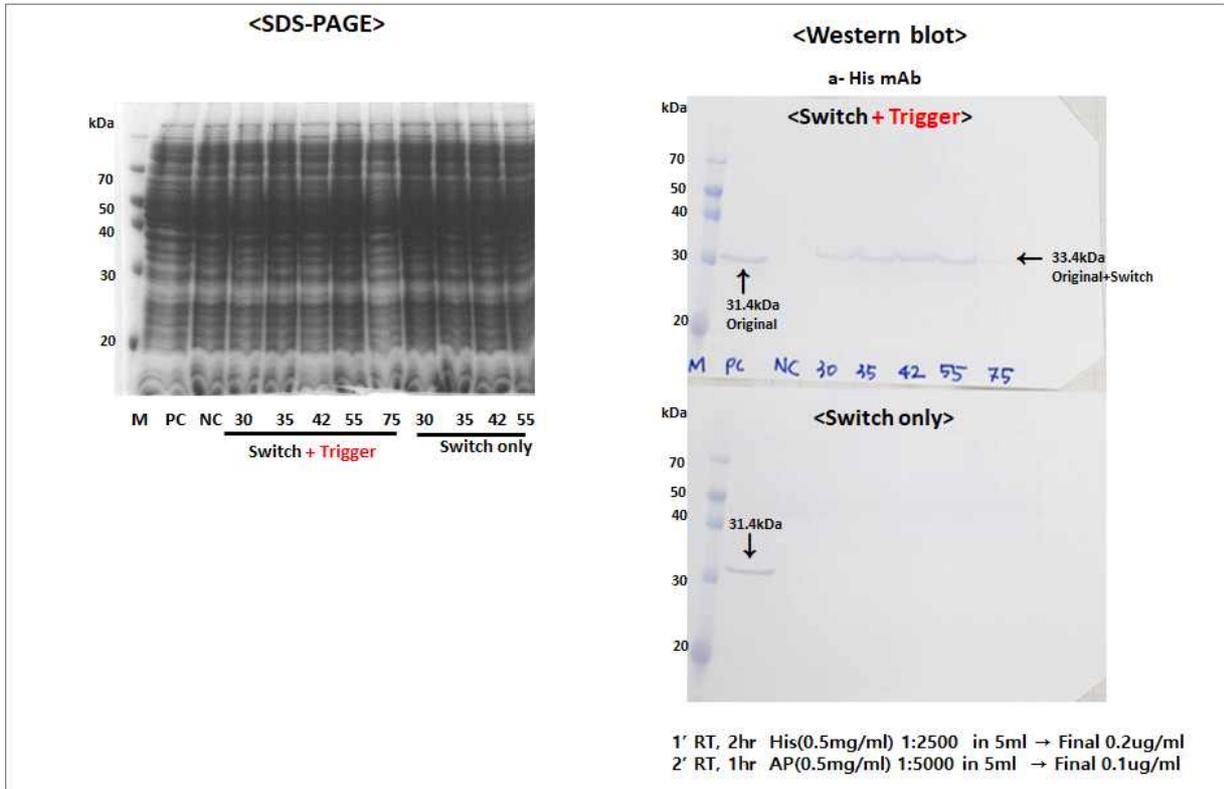


그림. Toehold switch RNA 센서의 유전자가 삽입된 pET32a expression vector의 trigger 의존적 발현 양상 확인

Toehold sensor RNA & Trigger RNA (3D gene partial) hybridization temperature	Hybridization status	Cell free translation kit reaction time	LFA test line intensity	LFA result
75°C	Toehold sensor & Trigger	2hrs, 37°C	287	
	Toehold sensor only		34	
55°C	Toehold sensor & Trigger		778	
	Toehold sensor only		45	
42°C	Toehold sensor & Trigger		832	
	Toehold sensor only		40	
35°C	Toehold sensor & Trigger		655	
	Toehold sensor only		45	
30°C	Toehold sensor & Trigger		32	
	Toehold sensor only		42	
	PC (pET32a)		1592	
	NC		32	

표. Toehold switch RNA 센서의 유전자가 삽입된 pET32a expression vector (pET32a-FMDV 3D switch RNA_23-PRRSV NA NC)의 trigger 의존적 반응성 확인

- * PC : Positive control (PRRSV NA nucleoprotein gene이 삽입되어있는 pET32a expression vector - no toehold switch sensor gene)
- * NC : cell free translation kit only

- Trigger(3D RNA gene)와 hybridization 되어 toehold가 풀림으로 인해 구조적으로 activation 됨으로써 PRRSV NA nucleoprotein이 translation 될 수 있는 Toehold switch RNA 센서(pET32a-FMDV 3D switch RNA_23-PRRSV NA NC) 제작 후 hybridization 온도별 반응성 확인 결과 trigger 의존적으로 PRRSV NA nucleoprotein이 translation 되는 것을 LFA를 통해 확인 하였음.

(마) PRRSV NA nucleoprotein detection 기반 LFA kit를 이용한 Toehold switch RNA 센서의 cell free translation 반응시간 별 Trigger RNA(3D gene)검출능 평가

- Toehold switch RNA 센서 (FMDV 3D switch RNA_23)와 Trigger RNA (3D gene partial)가 반응하여 toehold 센서가 활성화되어 PRRSV NA nucleoprotein이 translation 되는지를 LFA kit (PRRSV NA nucleoprotein detection 기반 / 반응소요시간 약 10~15min) 를 이용하여 아래와 같이 테스트 실시.

① 1단계 : PRRSV NA nucleoprotein이 translation 될 수 있는 Toehold switch RNA 센서(MDV 3D switch RNA_23) 의 유전자가 삽입된 pET32a expression vector(pET32a-FMDV 3D switch RNA_23-PRRSV NA NC) 제작 및 Toehold switch 센서 RNA (FMDV 3D switch RNA_23) 제작

② 2단계 : Trigger RNA (3D gene partial) 제작

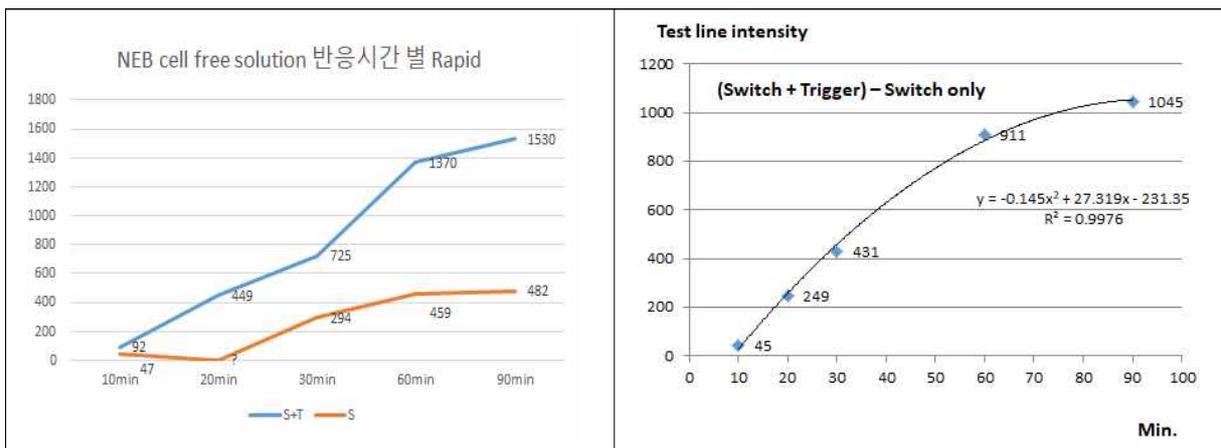
③ 3단계 : Toehold switch 센서 RNA (6.35×10^{11} copy/ml)와 Trigger RNA (6.5×10^{11} copy/ml)를 별도의 tube에서 42°C에서 30min 반응시킴 (toehold switch RNA 센서와 Trigger의 hybridization 유도)

④ 4단계 : cell-free transcription&translation solution (NEB)에 첨가하여 trigger와의 특이적인

hybridization에 의해 toehold switch RNA 센서가 구조적 activation되어 PRRSV NA nucleoprotein 발현 유도

⑤ 5단계 : 반응액을 LFA 검체희석액(0.1% tween20 - PBS)에 1/10(v/v) 으로 희석 후 LFA에서 전개시킴

⑥ 6단계 : 10min 후 LFA kit의 Test line 반응 확인 및 LFA reader를 이용하여 test line의 반응세기를 수치화 함.



- Switch (190716) 6.35×10^{11}
- Trigger (190716) 6.5×10^{11}
- NC : Switch only + DW(Trigger volume만큼)
- PC : Expression vector: 6.34×10^{11}

그림. PRRSV NA nucleoprotein detection 기반 LFA kit를 이용한 Toehold switch RNA 센서 RNA (FMDV 3D switch RNA_23)의 Trigger RNA(3D gene partial) cell free translation kit 내 반응시간 별 검출능 평가

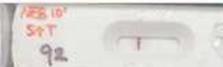
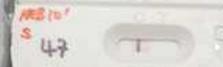
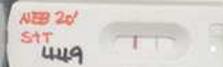
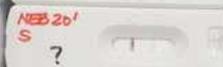
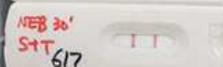
	Cell free translation kit 반응시간	LFA kit test line intensity	LFA kit 반응결과		Cell free translation kit 반응시간	LFA kit test line intensity	LFA kit 반응결과
Toehold 센서 & Trigger(3D partial)	10min	92		Toehold 센서 & Trigger(3D partial)	30min	834	
Toehold 센서 only		47		Toehold 센서 only		331	
Toehold 센서 & Trigger(3D partial)	20min	449		Toehold 센서 & Trigger(3D partial)	60min	1370	
Toehold 센서 only		Not calculated		Toehold 센서 only		459	
Toehold 센서 & Trigger(3D partial)	30min	617		Toehold 센서 & Trigger(3D partial)	90min	1503	
Toehold 센서 only		258		Toehold 센서 only		482	

그림. PRRSV NA nucleoprotein detection 기반 LFA kit를 이용한 Toehold switch 센서 RNA (FMDV 3D switch RNA_23)의 Trigger RNA(3D gene partial) cell free translation kit 내 반응시간 별 검출능 평가

- Toehold switch 센서 RNA (6.35×10^{11} copy/ml)와 Trigger RNA (6.5×10^{11} copy/ml)를 별도의 tube에서 42°C에서 30min 반응 (Toehold switch 센서 RNA 와 Trigger RNA 의 hybridization 유도) 시키고, cell free translation kit (NEB 社)에서 시간별로 반응시킨 후 LFA kit에서 반응산물을 전개시켜본 결과 시간에 따라 반응성이 증가하고 있으며 10min에서도 유의한 반응이 확인 되었음.

- Toehold switch 센서 RNA only 시험군에서 cell free translation kit에서의 반응시간이 증가함에 따라 trigger RNA (3D partial)가 존재하지 않아도 PRRSV NA nucleoprotein이 translation 되는 translation leaking 현상이 관찰되었으며, 향후 개선 필요.

(바) PRRSV NA nucleoprotein detection 기반 LFA kit를 이용한 Toehold switch RNA 센서의 Trigger RNA(3D full gene) 농도별 검출능 평가

- Toehold switch RNA 센서 (FMDV 3D switch RNA_23)에 Trigger RNA (3D gene full)를 농도별로 반응시켜 trigger 농도에 따른 toehold 센서의 활성화 정도를 확인하기 위하여 아래와 같이 테스트 실시.

① 1단계 : PRRSV NA nucleoprotein이 translation 될 수 있는 Toehold switch RNA 센서(FMDV 3D switch RNA_23) 의 유전자가 삽입된 pET32a expression vector(pET32a-FMDV 3D switch RNA_23-PRRSV NA NC)로부터 Toehold switch 센서 RNA (FMDV 3D switch RNA_23) 제작

② 2단계 : 농도별 Trigger RNA (3D gene full) 제작

③ 3단계 : Toehold switch 센서 RNA (1.5×10^{12} copies/ml)와 Trigger RNA ($5 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^4$ copies/ml)를 각각 별도의 tube에서 72°C에서 5min 반응시킴 (toehold switch RNA 센서와 Trigger의 hybridization 유도)

④ 4단계 : cell-free transcription & translation solution (NEB)에 첨가하여 37°C, 2hr동안 trigger와의 특이적인 hybridization에 의해 toehold switch RNA 센서가 구조적 activation되어 PRRSV NA nucleoprotein 발

현 유도

⑤ 5단계 : 반응액을 LFA 검체희석액 (0.1% tween20 - PBS)에 1/10(v/v) 으로 희석 후 LFA에서 전개시킴

⑥ 6단계 : 10min 후 LFA kit의 Test line 반응 확인 및 LFA reader를 이용하여 test line의 반응세기를 수치화 함.

Toehold switch sensor	Trigger RNA (3D gene partial)	Hybridization temp., time	Cell free translation kit reaction temp., time	LFA test line intensity	Signal - Noise	LFA result
1.5 x 10 ¹²	5 x 10 ¹²	72°C, 5min.	37°C, 2hrs	1703	1190	
	5 x 10 ¹¹			910	397	
	5 x 10 ¹⁰			698	185	
	5 x 10 ⁹			672	159	
	5 x 10 ⁸			612	97	
	5 x 10 ⁷			610	97	
	5 x 10 ⁶			666	153	
	5 x 10 ⁵			612	99	
	5 x 10 ⁴			527	14	
	Dw			513	0	
PC	1078					

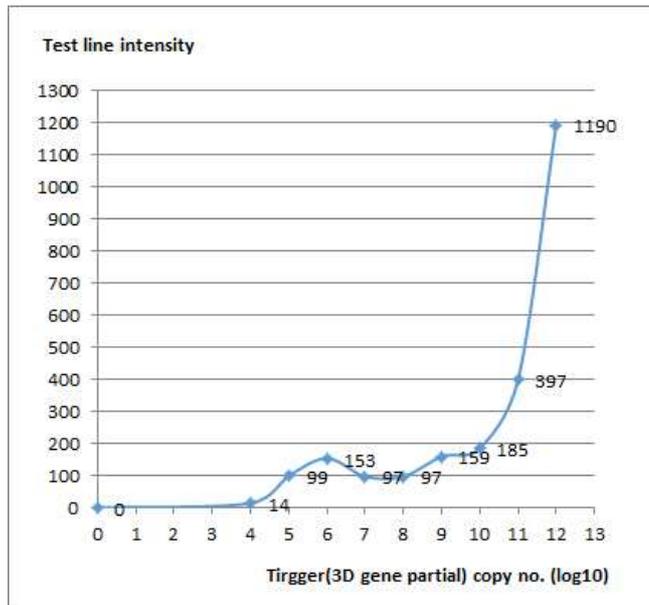


그림. PRRSV NA nucleoprotein detection 기반 LFA kit를 이용한 Toehold switch RNA 센서의 Trigger RNA (3D full gene) 농도별 검출능 평가

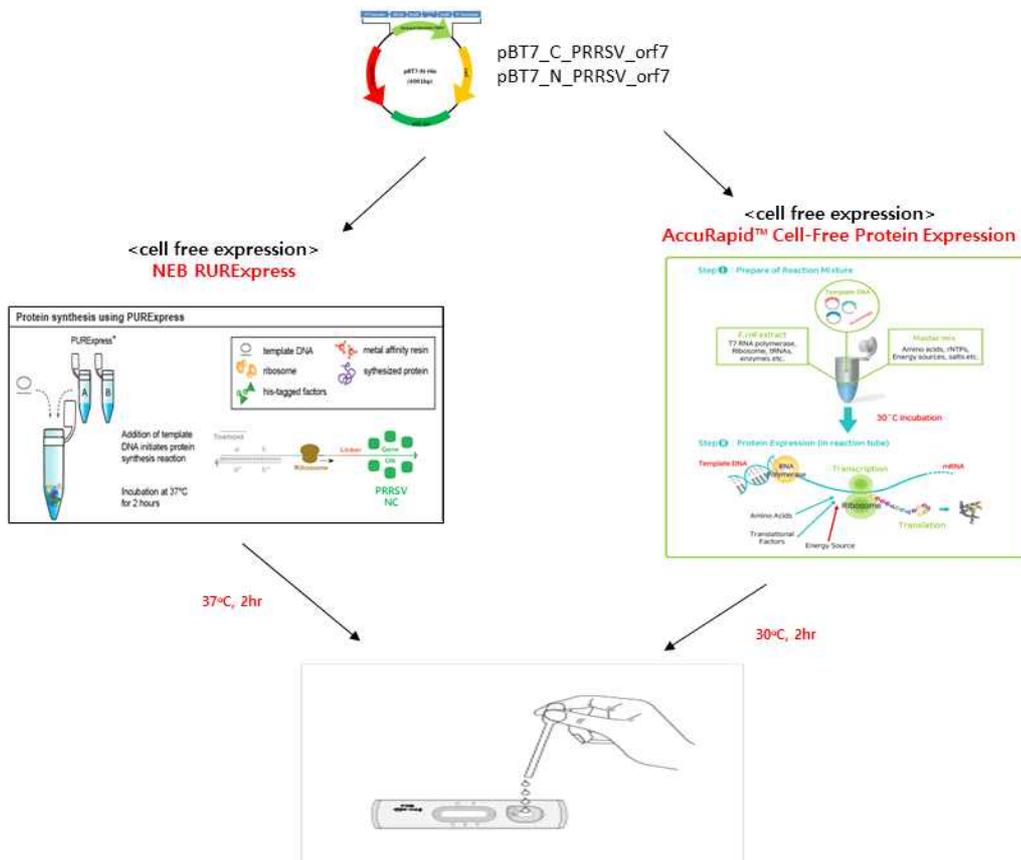
- 최저검출한계 테스트 결과 음성 대비 5 x 10⁴ ~ 5 x 10⁵ copies/ml 까지 감지하는 것으로 확인 되었으나 5 x 10⁹ ~ 5 x 10⁵ copies/ml range에서 dose-dependent 한 test line intensity 가 확인 되지 않아 원인 파악이 필요 함.

(11) POCT 개념의 switch RNA 센서 제작 및 테스트 - pBT7 벡터 이용

(가) pBT7를 이용한 POCT용 LFA(Lateral Flow Assay)의 cell-free solution 비교

- 현장 진단을 위해 Lateral Flow Assay 방법을 이용하여 구제역바이러스 RNA 검출 하기 위해 다음과 같은 테스트를 실시함

- ① 1단계 : TRX (thioredoxin)과 반응하는 PRRSV_orf7를 발현하는 pBT7 vector 제작
- ② 2단계 : RNA를 리보조절 유전자와 함께 cell-free transcription&translation solution (NEB, bioneer CFS) 과 반응함
- ③ 3단계 : 반응액을 strip에 drop후 전개시킴
- ④ 4단계 : 전개 후 반응 밴드 확인



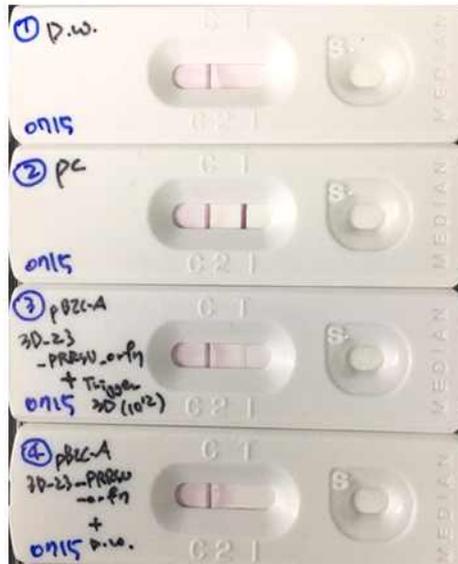
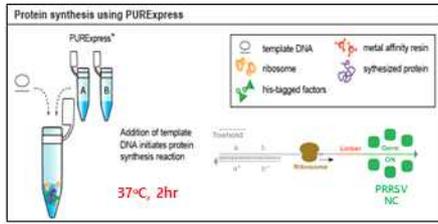
<Lateral flow assay 테스트 방법 모식도>

- pBT7 벡터에서의 정상적인 PRRSV_orf7의 발현을 확인하기 위해 N-말단과 C-말단에 각각 PRRSV_orf7을 삽입하여 벡터를 제작함. 각 벡터를 NEB와 Bioneer 회사에서 제공되는 각각의 cell-free transcription & translation solution에서 반응한 후, 반응액을 strip에 drop해서 10분간 반응시켜 line을 확인함. 양성대조군엔 PRRSV 항원(Ag)과 반응한 strip의 test line을 확인 하였고, N-말단과 C-말단 삽입 위치에 관계없이 농도별 PRRSV_orf7 발현이 test line을 통해 확인됨. 확인된 PRRSV_orf7 발현을 이용한 FMDV LFA 테스트를 실시함.

- Pure system은 물론이고, Cell extract 시스템인 Bioneer에서도 flesh solution상태일 때 반응을 잘 하는 것을 확인하였음



(나) 3D_23 센서를 삽입한 pBIC-A를 이용한 POCT용 LFA 실험



NEB + D.W.

NEB + PC
(pBT7_C_PRRSV_orf7)

NEB + pBIC-a_3D_23_PRRSV_orf7
+ Trigger 3D

NEB + pBIC-a_3D_23_PRRSV_orf7
+ D.W.

- PRRSV_orf7가 발현되는 pBIC-A_3D-23 switch RNA를 이용하여 FMDV RNA를 LFA로 진단함
- PRRSV_orf7를 발현하는 3D_23 switch RNA와 FMDV RNA를 in vitro transcription kit를 이용하여 만들고, 각각을 cell-free transcription&translation solution에 넣어 37도 2시간동안 반응함. 반응이 끝난 반응액은 strip에 drop 한 후 10분간 흘려보내고 test line을 관찰함
- 양성대조군인 PRRSV 항원(Ag)은 strip의 test line이 확인되었고, FMDV 3D 영역의 RNA 10¹² copies/ml 반응액에서 test line이 확인되어 3D_23 switchRNA가 FMDV RNA와 반응하여 PRRSV_orf7 단백질이 발현된 것을 확인됨

다. 구제역 바이러스 진단용 페이퍼센서 민감도 향상

(1) POCT를 위한 페이퍼 센서 제작 민감도 향상

(가) Palm PCR

- Palm PCR은 열대류 방식으로 초고속 유전자 증폭을 구현하는 동시에 전기 소모량을 줄여 대규모 전원 대신 리튬이온 배터리를 장착해 휴대성을 높였으며, 검출시간을 15분 이내로 단축하여 기존 PCR의 현장진단의 단점을 보완함



"It is now possible to do PCR anywhere, anytime."



< Palm PCR Selection Chart >

PCR Speed Level	PCR Time 30 cycles	Dynamic Range
T2	18 min	≤ 400 bp
T1	21 min	≤ 500 bp
F3	24 min	≤ 600 bp
F2	27 min	≤ 800 bp
F1	30 min	≤ 1 kbp
S2	34 min	≤ 1.5 kbp
S1	39 min	≤ 2 kbp

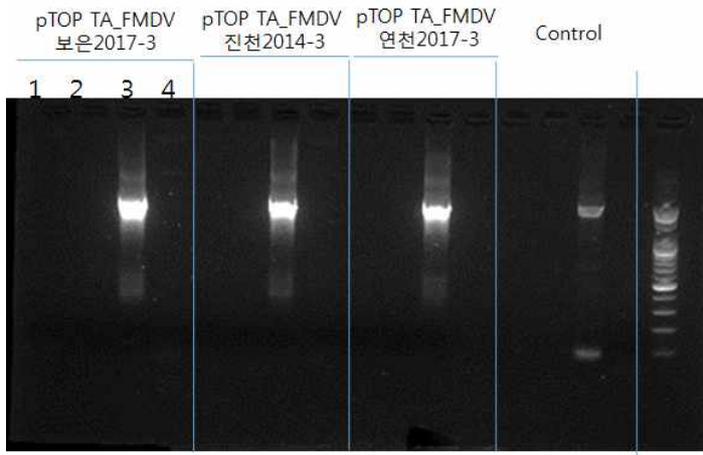


http://www.ahrambio.com/products_palmPCR_technology_more.html

(나) Conventional PCR과 비교

- Conventional PCR을 이용하여 FMDV RNA를 증량하여 반응하는 것을 확인 하였지만, conventional PCR 은 최소 반응 시간이 2시간이 필요함. 따라서 진단 시간이 길어지는 단점이 발생하며, 또한 기존 PCR 기기는 전원이 필요하며 휴대성이 떨어지기 때문에 현장진단에는 사용할 수 없게 됨. 이에 따라 PCR 시간을 단축시키며 현장에서 휴대가 가능한 PCR 기기를 확보하여 위와 같은 실험을 실시함
- Palm PCR을 이용하여 검역본부에서 제공받은 8종의 3D 영역에 삽입된 pTOP TA vector를 T7 promotor가 포함된 primer를 이용하여 PCR을 실시함. 조건은 Palm PCR에서 제공한 2 kbp 이하 조건 프로그램인 S1을 사용하여 39분을 실시하였고, 반응 후 만들어진 PCR product를 DNA gel을 이용하여 확인함. pBIC-A에 제작한 FMDV 3D RNA (366 kb)을 palm PCR을 이용하여 T2 프로그램을 이용하여 18분 동안 PCR을 실시함

(다) Palm PCR 결과

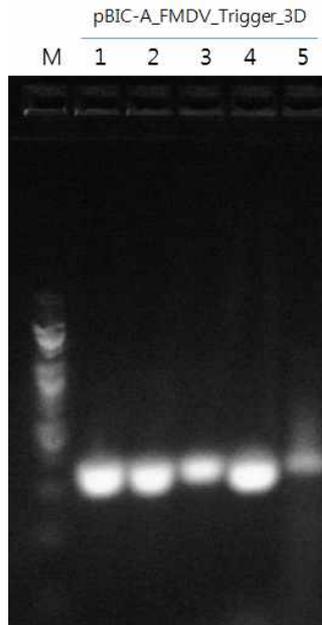


- 1: Palm PCR (1/5)
- 2: Palm PCR (1/5)
- 3: conventional PCR
- 4: Palm PCR (원액)

< Palm PCR Selection Chart >

PCR Speed Level	PCR Time 30 cycles	Dynamic Range
T2	18 min	≤ 400 bp
T1	21 min	≤ 500 bp
F3	24 min	≤ 600 bp
F2	27 min	≤ 800 bp
F1	30 min	≤ 1 kbp
S2	34 min	≤ 1.5 kbp
S1	39 min	≤ 2 kbp

- 검역본부에서 제공받은 8종의 3D 영역에 삽입된 pTOP TA vector를 이용한 palm PCR 결과는 아래와 같으며, 1.6 kbp의 PCR product는 만들어지지 않음. 비교 분석을 위해 실시한 366 bp의 FMDV 3D RNA는 PCR product가 만들어짐



- 1: pBIC-A_FMDV_Trigger_3D (366 kb) - 100 ng
- 2: pBIC-A_FMDV_Trigger_3D (366 kb) - 10 ng
- 3: pBIC-A_FMDV_Trigger_3D (366 kb) - 1 ng
- 4: pBIC-A_FMDV_Trigger_3D (366 kb) - 0.1 ng
- 5: 0 (only primer)

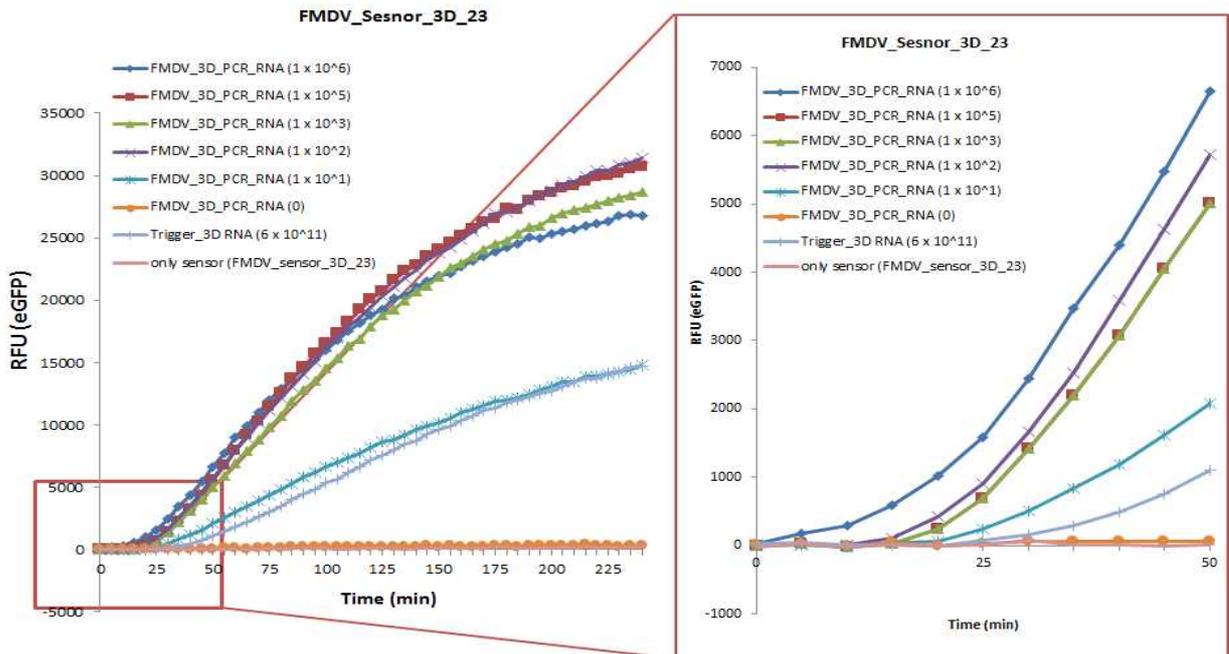
< Palm PCR Selection Chart >

PCR Speed Level	PCR Time 30 cycles	Dynamic Range
T2	18 min	≤ 400 bp
T1	21 min	≤ 500 bp
F3	24 min	≤ 600 bp
F2	27 min	≤ 800 bp
F1	30 min	≤ 1 kbp
S2	34 min	≤ 1.5 kbp
S1	39 min	≤ 2 kbp

(라) Conventional PCR과 Palm PCR 민감도 테스트 결과 비교

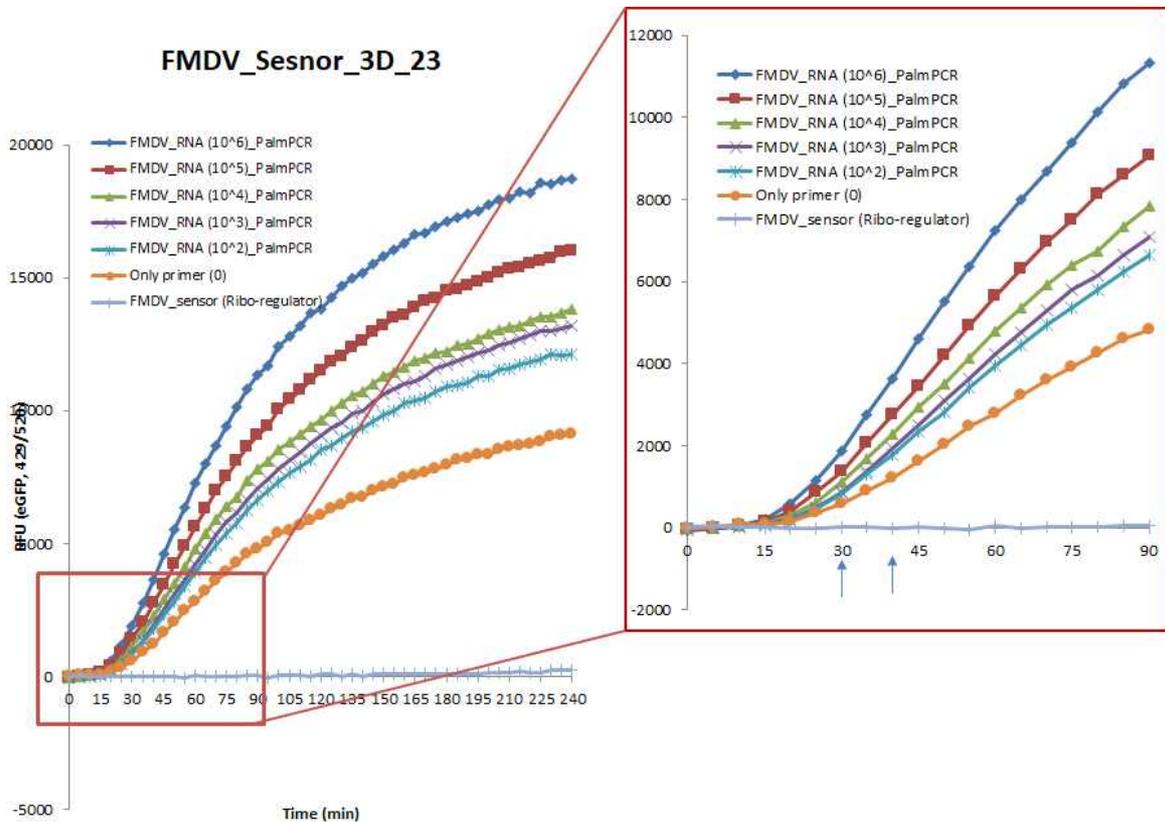
- Conventional PCR를 사용해 2시간동안 증폭시킨 FMDV 3D RNA를 농도별 ($10^1 \sim 10^6$ copies/ml)로 FMDV 3D_23 switch RNA와 반응하여 나타나는 형광(eGFP)을 측정함
- 10^6 copies/ml 농도의 FMDV 3D RNA를 증폭하여 FMDV 3D_23 switch RNA와 반응 결과, 3배 증가 시간은 25분으로 관찰됨. 4시간후 RFU값은 26765로 나타냈으며, 이는 21배의 형광증가 값을 나타냄
- $10^2 \sim 10^5$ copies/ml 농도의 FMDV 3D RNA의 3배 형광 증가 시간은 모두 30분으로 나타남

- 10^1 copies/ml 농도의 FMDV 3D RNA를 증폭하여 FMDV 3D_23 switch RNA와 반응 결과, 3배 증가 시간은 45분으로 관찰됨. 4시간후 RFU값은 14833로 나타냈으며, 이는 12배의 형광증가값을 나타냄
- 따라서 증폭 전 FMDV 3D_23 switch RNA에서 FMDV RNA는 10^{11} copies/ml 농도에서 반응이 일어나지만, PCR 증폭 후에는 10^1 copies/ml 이상의 농도에서 FMDV RNA가 검출되는 것을 확인함



<Conventional PCR (60 cycle, 2 hr)>

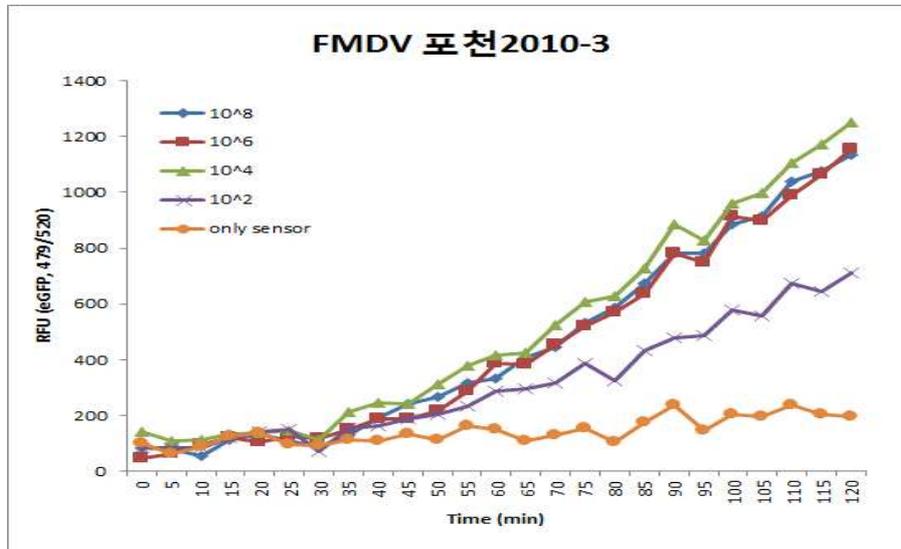
- Conventional PCR로 확인 된 FMDV RNA 증폭을 휴대가 용이한 palm PCR을 이용하여 구현함으로써 현장진 단용 테스트를 용이하게 함
- Palm PCR을 이용해 18분 동안 FMDV 3D RNA를 농도별 ($10^2 \sim 10^6$ copies/ml)로 증폭하였으며, 이를 FMDV 3D_23 switch RNA와 반응하여 나타나는 형광(eGFP)을 측정함
- $10^5 \sim 10^6$ copies/ml 농도의 FMDV 3D RNA를 증폭하여 FMDV 3D_23 switch RNA와 반응 결과, 3배 증가 시간은 30분으로 관찰됨. 4시간 후 RFU값은 18723으로 나타냈으며, 이 14배의 형광 증가 값을 나타냄
- $10^2 \sim 10^4$ copies/ml 농도의 FMDV 3D RNA의 3배 형광 증가 시간은 모두 30분으로 나타남. 4시간후에는 모두 약 12배의 형광 증가 값을 나타냄. 따라서 palm PCR을 통한 18분 증폭 후에도 FMDV 3D_23 switch RNA에서 FMDV RNA는 10^2 copies/ml 농도에서 검출되는 것을 확인함



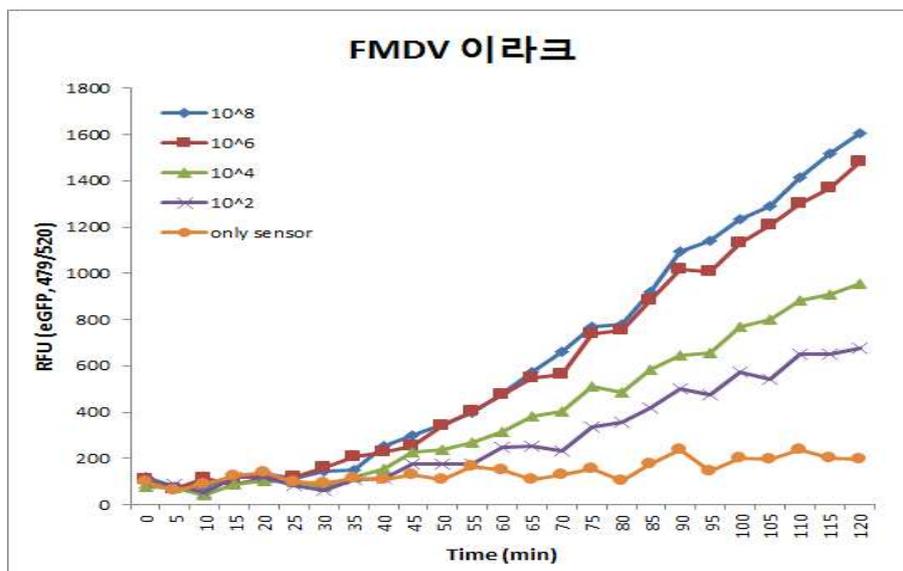
<Palm PCR (30 cycle, 18min)>

(마) 검역본부 8종의 3D 영역에 삽입된 pTOP TA vector를 이용한 PCR 증폭 민감도 테스트

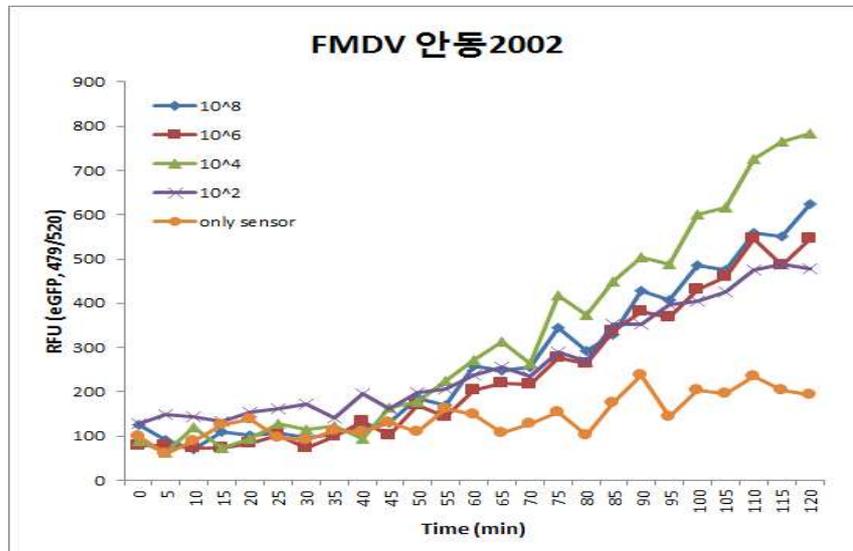
- 검역본부에서 제공받은 8종의 3D 영역에 삽입된 pTOP TA vector를 T7 promotor가 포함된 primer를 이용하여 conventional PCR을 실시함. 조건은 annealing 온도를 56도에서 60 cycle을 2시간동안 실시하여 T7 promotor가 포함된 PCR product를 만들어 in vitro transcription kit를 이용해 3D 영역이 포함된 RNA를 생성함. 만들어진 각 RNA를 FMDV 3D_23 switch RNA와 반응하여 나타나는 형광(eGFP)을 측정함
- 검역본부에서 제공받은 8종을 모두 실시하였으며, 그 중 4종 (이라크, 안동2010, 안동2002, 포천 2010-3)에서 형광증가 값이 관찰됨
- 포천 2010-3 FMDV RNA의 FMDV 3D_23 switch RNA와 반응하여 나오는 3배 형광 증가 시간은 10² copies/ml 농도에서는 65분, 10⁴ copies/ml 농도에서는 50분, 10⁶ copies/ml 농도에서는 60분, 그리고 10⁸ copies/ml 농도에서는 65분으로 확인됨



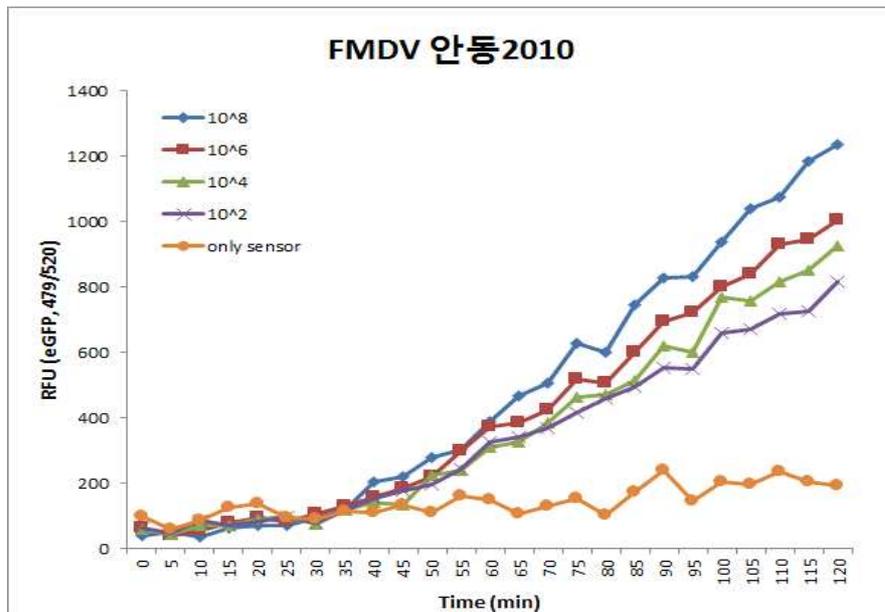
- 이라크 FMDV RNA의 FMDV 3D_23 switch RNA와 반응하여 나오는 3배 형광 증가 시간은 10² copies/ml 농도에서는 80분, 10⁴ copies/ml 농도에서는 65분, 10⁶ copies/ml 농도에서는 50분, 그리고 10⁸ copies/ml 농도에서는 50분으로 확인됨



- 안동 2002 FMDV RNA의 FMDV 3D_23 switch RNA와 반응하여 나오는 3배 형광 증가 시간은 10² copies/ml 농도에서는 80분, 10⁴ copies/ml 농도에서는 65분, 10⁶ copies/ml 농도에서는 80분, 그리고 10⁸ copies/ml 농도에서는 80분으로 확인됨

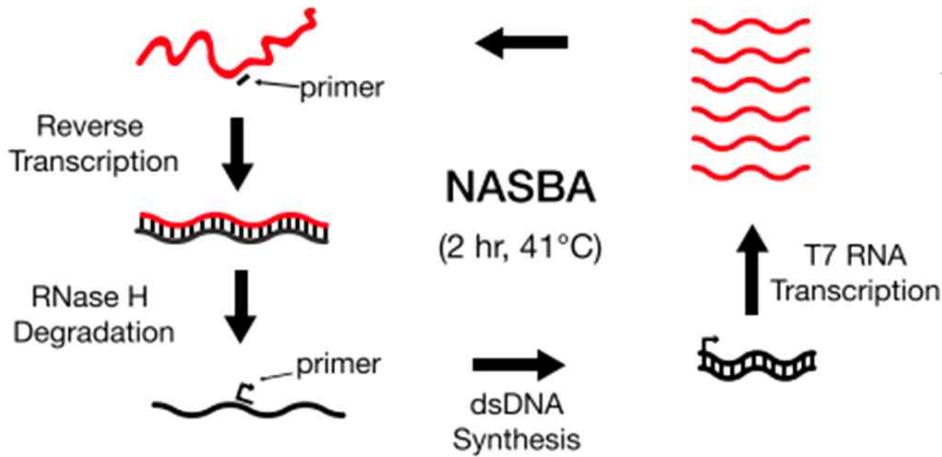


- 안동 2010 FMDV RNA의 FMDV 3D_23 switch RNA와 반응하여 나오는 3배 형광 증가 시간은 10² copies/ml 농도에서는 65분, 10⁴ copies/ml 농도에서는 65분, 10⁶ copies/ml 농도에서는 60분, 그리고 10⁸ copies/ml 농도에서는 60분으로 확인됨

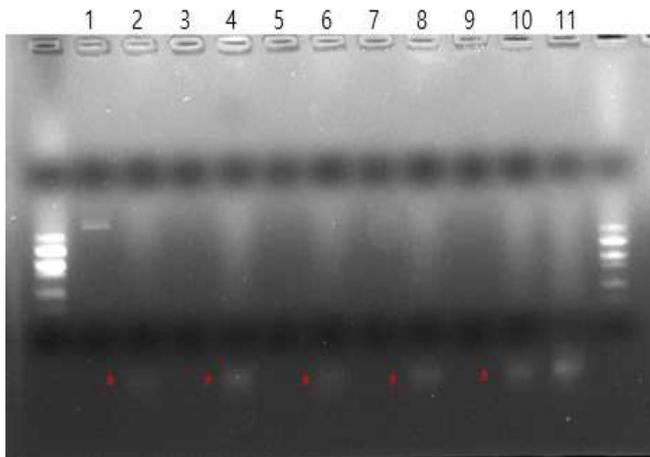


- 보은, 진천, 연천, 사미르 FMDV RNA는 증폭 이후에서 FMDV 3D_23 switch RNA와의 반응은 일어나지 않음
- 따라서 FMDV 3D_23 switch RNA에서 conventional PCR을 이용하여 FMDV RNA는 10² copies/ml 농도에서도 형광반응이 일어나는 4종의 샘플군이 나오는 것을 확인하였음. 이를 이용하여 반응시간 단축을 위해 palm PCR 조건을 최적화 하여 실시할 예정이며, 나오지 않은 4종의 서열을 비교 분석하여 조건 최적화를 통해 바이러스 검출 조건을 증진 시킬 예정임

(바) 등온증폭을 이용한 3D switch RNA 센서 실험

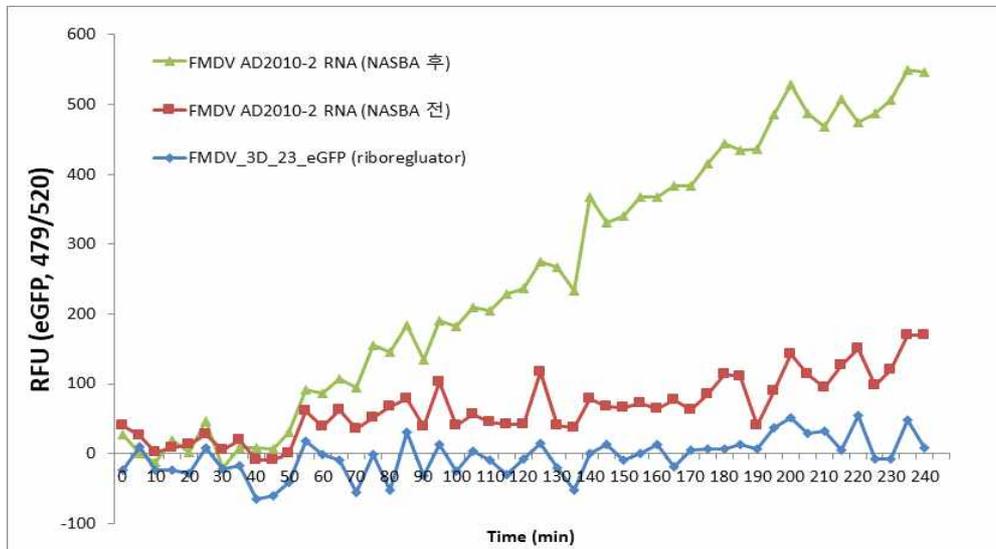


- 등온증폭을 통해 switch RNA의 민감도 개선을 위해 Nucleic acid sequence based amplification(NASBA)를 적용하였음. NASBA는 등온에서 Reverse Transcriptase를 이용해 RNA를 증폭하는 기술이며, NASBA가 LAMP에 비해 오염의 위험이 덜함. 특히 FMDV 진단에 적용된 사례가 존재함
- 13 ng/ul 농도의 FMDV RNA를 1번 (13 ng/ul, 10^{10} copies/ml) 으로 시작으로 3번 (130 pg/ul, 10^8 copies/ml)은 1번 RNA를 1/100 희석, 5번 (1.3 pg/ul, 10^6 copies/ml)은 3번 샘플을 1/100 희석, 7번 (13 fg/ul, 10^4 copies/ml)은 5번 샘플을 1/100 희석, 그리고 9번(0.13 fg/ul, 10^2 copies/ml) 샘플은 7번 샘플을 1/100 희석한 샘플임. 각 샘플을 NASBA kit를 이용해 등온 증폭하였고, 각각의 샘플을 아래와 같이 젤상에서 확인함. 1번 샘플을 등온 증폭한 샘플은 2번 line 130 bp(별표)에 밴드가 확인되었으면, 각 샘플이 등온 증폭 후 나온 밴드가 130 bp(별표)로 밴드가 확인됨



- 1: NASBA 전 (13 ng/ul)
- 2: 1번 샘플 NASBA 후
- 3: NASBA 전 (1번 샘플의 1/100 희석)
- 4: 3번 샘플 NASBA 후
- 5: NASBA 전 (3번 샘플의 1/100 희석)
- 6: 5번 샘플 NASBA 후
- 7: NASBA 전 (5번 샘플의 1/100 희석)
- 8: 7번 샘플 NASBA 후
- 9: NASBA 전 (7번 샘플의 1/100 희석)
- 10: 9번 샘플 NASBA 후
- 11: NASBA control
(RNA 없이 primer와 NASBA mix 넣고 반응)

- NASBA 등온증폭 전후 샘플을 FMDV 3D_23 switch RNA와 함께 cell-free transcription & translation solution에 넣고 반응하며 형광값을 측정함. 2배 증가 시간은 55분이며, 4시간 반응 후 등온증폭 전후 형광값이 3배 이상 증가하는 것을 관찰함. 따라서 등온증폭으로 RNA를 기기 없이 빠르게 증폭 할수 있어, 민감도 높은 FMDV RNA 진단이 가능함을 시사함.



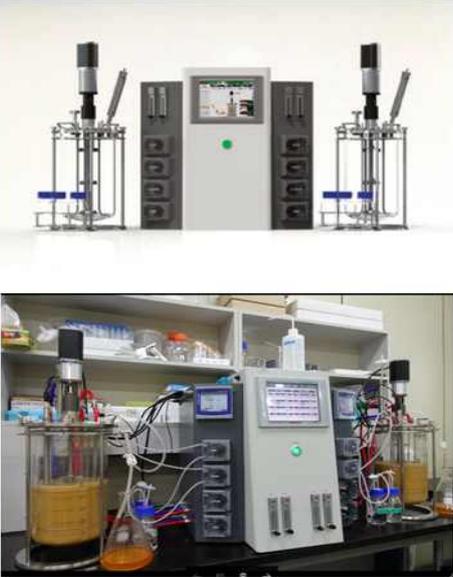
라. 구제역 바이러스 수송배지 및 진단용 페이퍼센서 생산시스템 구축

(1) 구제역 바이러스 앵타머 기반 수송배지 생산시설

- (주)메디안디노스틱 (춘천시 동내면 소재) 내 구제역바이러스 수송배지 분주기 및 Hepafilter 장착 생산설비 구축 완료

(2) 페이퍼센서 생산시스템 구축

- Toehold switch sensor gene 및 reporter gene이 insertion 되어있는 plasmid vector 대량 증폭을 위해 필요한 E.coli 대량배양 시스템 및 microfluidizer 구축
- (주)메디안디노스틱 (춘천시 동내면 소재) 내 생산설비 구축 완료



Autoclavable single shell borosilicate glass vessel
 3 ~ 14 L total volume
 Electro polished STS316L head plate & bottom plate

Nozzles
 -Inoculum port : 화염접종 (option:주사기 접종, 무균접종밸브)
 -Cartridge heater & cooler
 -Temperature, pH, DO, foam sensor (option : ORP, level, OD sensor)
 -Exhaust & condenser
 -Agitation
 -4 media feeds
 -Sampling & harvest (option: 무균이송밸브)

Agitation
 -Single mechanical seal
 -High torque 60 W BLDC motor (30 ~ 1,200 rpm)
 -3 baffles or more

Aeration
 -Ring sparger (option : 1 ~ 10 μ m micro sparger)
 -0.2 μ m disposable hydrophobic filter with check valve
 Removable addition bottles support
 -Peristaltic pump with tubings

Impeller
 -Rushton type/Pitched blade/Marine blade

Gas flow
 -2 gas control rotameters
 (option : 4 rotameters or 1 ~ 4 mass flow controller)
 -Flow rate
 0.3~3 L/min
 0.7~7 L/min
 1~10 L/min
 1.4~14 L/min

약 20배 농축배양 가능



[사양]

- 분주량 설정 범위 0.2~100ml
- 설정 분해능 0.1ml
- 분주속도:100ml/40sec 후 0.2ml/0.08sec
- 분주정도 $\pm 2\%$ 이내(물의 경우)
- 유압 흡입 노즐 외경:0.7mm
- 대상:본체(스틸, 콘용 튜브 카트리리지 H일리콘 고무)
- 전원:AC100~240V 50/60Hz
- 본체 사이즈:130*190*140mm
- 중량:약 2.5kg
- 오도블레이드가용(전용 튜브 카트리리지 H만)

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

가. 구제역 백신 접종된 가축(우제류)이 구제역바이러스에 노출되어 감염될 경우 체내 백신항체에 의해 바이러스 증식이 대부분 억제되지만 구제역 바이러스가 미량으로 증식될 수 있음. 이러한 백신 접종 상황 하에서 의심징후(구제역 바이러스 비구조 단백질(NSP, Non-Structural Protein)에 대한 항체 양성)이 있는 가축을 대상으로 구제역 바이러스 항원 진단률을 향상시키기 위한 방안으로써 다양한 오염물질과 함께 미량의 구제역바이러스

가 포함되어있는 시료를 구제역바이러스의 손상 없이 구제역 정밀진단기관으로 안전하게 운송하기 위한 수송배지와 민감도가 향상된 구제역 바이러스 항원 진단키트를 개발하는 것이 본 과제의 목적임.

- 다양한 환경오염물질이 포함되어있는 구제역 검사 시료 내 존재하는 구제역 바이러스를 감지할 수 있는 앵타머 개발 및 앵타머 & 자성입자를 이용한 바이러스 농축가능 수송 배지의 개발
- Toehold switch RNA sensor 및 cell free translation kit를 이용한 구제역 항원진단용 페이퍼센서 개발

나. 정량적 목표 및 성과

(1) 특허출원 목표 2건

- 실적 : 특허출원 1건 완료(안전성평가연구소), 1건 예정(충북대 10월 30일 예정), 프로그램등록 1건 예정 (10월 18일 예정)

(2) 기술실시 목표 1건

- 실적 : 없음.

(3) SCI 논문 목표 2건

- 실적 : SCI 논문 1편 (안전성평가연구소)

(4) 비SCI 논문 목표 2건

- 실적 : 비SCI 논문 1편 (안전성평가연구소), 1편 예정 (전북대)

(5) 학술발표 목표 5건

- 실적 : 학술발표 6건

(6) 인력양성 목표 1건

- 실적 : 인력양성 1건 예정 (전북대)

3-2. 목표 달성여부

목표	세부 목표	달성여부	가중치	진행률	달성률	관련분야 기술발전예의 기여도
구제역 바이러스 수송배지 개발	구제역바이러스 구조 단백질과 반응하는 앵타머 발굴 유무	3종 발굴 완료	10%	100%	10%	실제 구제역바이러스 구조단백질과의 반응성이 있는 앵타머이므로 추후 구제역바이러스 중화실험을 통해 중화능이 있을 경우 구제역 치료제 및 구제역바
	앵타머의 구제역바이러스와의 반응성 유무	3종 모두 구제역 불활화 바이러스와 반응하는 것으로 확인	10%	100%	10%	

						이러스 감염후 바이러스 증식 억제제로써 개발 가능함
	구제역바이러스 구조 단백질 특이 앵타머 - 자성입자 기반 바이러스 농축 및 수송배지 prototype 제작 유무	제작 완료	5%	100%	5%	
	구제역바이러스 수송 배지의 성능개선 및 효능 평가 유무	진행 중	10%	70%	7%	
	수송배지 생산시스템 구축 유무	구축 완료	5%	100%	5%	구제역바이러스 외에 다른 종류의 바이러스 및 세균 검사를 위한 수송배지 생산에 적용가능
구제역 바이러스 항원진단용 페이퍼 센서 개발	구제역바이러스 3D gene을 target 하는 toehold switch sensor design 및 발굴 유무	발굴 완료	5%	100%	5%	
	Toehold switch sensor의 trigger (3D gene) 의존적 반응성 검증 유무	검증완료	10%	100%	10%	
	toehold switch sensor 및 reporter gene 평가용 universal vector system 구축 유무	구축완료	10%	100%	10%	구제역 바이러스 외에 다양한 감염성 질병에 대한 원인체 진단을 위해 design 된 toehold switch sensor 후보들의 성능 screening을 매우 간편하고 효율적으로 수행할 수 있게 해주는 분석시스템으로써의 가치가 높음.
	target gene과의 hybridization에 의해 toehold switch sensor의 translation 기작이 개시되어 발현되는 reporter protein detection system 개발 유무	개발 및 구축 완료	10%	100%	10%	translation의 개시로 발현되는 reporter protein을 다양하게 변환가능하며, 단클론항체를 이용한 sandwich immunoassay를 통해 간편하게 reporter protein 정량가능
	구제역바이러스 RNA	검증 완료	5%	100%	5%	

유전자 검출을 위한 GFP (Green Fluorescence Protein) 기반 페이퍼 센서 개발 및 반응성 검증 유무						
구제역 바이러스 toehold switch sensor 대량생산 시스템 구축 유무	구축 완료	5%	100%	5%		
기존 항원측정용 래피드키트의 최저검출한계 대비 10배 높은 민감도 달성 유무	toehold switch sensor 와 palm PCR 접목시 달성완료 (NASBA 와 접목시 민감도 상승 유무 시험중	10%	90%	9%		palm PCR을 통한 18분 증폭 후 FMDV 3D_23 switch RNA에서 FMDV RNA는 10 ² copies/ml 농도 검출 가능
구제역바이러스 항원 진단용 페이퍼센서허가서 작성 유무	허가서 작성 예정	5%	20%	1%		
총 합계		100%		92%		

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

목표	목표 미달성의 원인(사유)	차후대책 (후속연구의 필요성 등)
구제역바이러스 수송배지 개발	○ 앵타머-자성입자 conjugation 최적화 및 구제역바이러스 농축효율 시험 진행중	- 앵타머-자성입자 기반 수송배지의 성능개선 및 효능평가 후 기존 상용화 배지보다 성능이 좋을 경우 산업화 예정임 - 상기 자성입자기반의 수송배지의 구제역바이러스 포집효능이 좋지않을

		<p>경우 구제역바이러스가 포함되어있는 시료를 구제역 항원진단용 현장진단 키트에 반응시킨 후 구제역 정밀진단 기관으로 수송</p> <ul style="list-style-type: none"> - 수송된 현장진단키트의 nitrocellulose membrane의 test line에 포집된 구제역바이러스를 채취하여 구제역바이러스 정밀진단에 사용하는 형태로 개발 예정
<p>구제역바이러스 항원진단용 페이퍼센서 개발</p>	<p>○ toehold switch sensor의 target gene(3D)에 대한 낮은 hybridization rate으로 인해 궁극적으로 구제역바이러스 검출에 대한 민감도 저조현상 유발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 한 개의 target RNA gene에 다수의 toehold switch RNA sensor가 반응(hybridization)하여 translation 이 증폭될 수 있는 시스템에 대한 개발 검증 필요 - NASBA(Nucleic Acids Sequence Based Amplification)등의 방법으로 구제역바이러스 RNA를 증폭시킨 후 toehold switch sensor 및 cell free translation 시스템 적용하여 낮은 민감성 극복 가능
	<p>○ 구제역바이러스 3D gene의 일부 영역(OIE primer 인지 구간)을 한정하여 toehold switch design</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 광범위한 영역에서 다양한 toehold switch sensor를 design 하여 높은 성능을 보이는 sensor 후보를 발굴해야함.
	<p>○ toehold switch sensor design 및 성능시험 방법상의 난이도</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 본 과제를 통해 개발 구축된 universal vector system(pET32a vector system & 정량분석가능한 면역크로마토그래피) 을 통해 많은 수의 toehold switch sensor 후보들과 reporter protein들을 효율적으로 스크리닝 하여 고성능의 후보물질 선별 가능
	<p>○ toehold switch sensor의 trigger가 없어도 translation 이 개시되는 leaking 현상</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Bioinformatics 기술을 기반으로한 sequence 변화를 통한 leaking 최소화 유도
	<p>○ 기 상용화 되어있는 cell free translation kit의 성분조절 불가능</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bioneer社 - New England Biolab 社 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro</i> transcription & translation kit의 자체개발을 통해 구성분의 농도를 조절할 수 있는 시스템을 구축하여 최적의 toehold switch sensor 효능 구현 가능

		- <i>in vitro</i> transcription 과 <i>in vitro</i> translation을 구분하여 자체 개발/생산 필요
	○ 상용화되어있는 cell free translation kit의 높은 가격으로 인한 원활한 반응 최적화 실험 진행의 어려움 - 약 30,000원/test (pure system 인 New England Biolab 의 경우)	- <i>in vitro</i> transcription & translation kit를 자체 개발할 경우 가격을 낮출 수 있을 것으로 사료
	○ reporter protein (translated protein) detection system(gold nanoparticle 기반의 면역크로마토그래피법)의 민감성 개선 필요	- toehold switch sensor의 leaking 현상이 없을 경우 gold nanoparticle 외에 fluorescence nanoparticle 및 Enzyme 등을 이용한 signal 증강을 통해 reporter protein의 감지능을 개선할 수 있음.

4. 연구결과의 활용 계획 등

가. 예상되는 연구성과의 활용분야 및 활용 방안

- 현재 구제역 예방을 위해 실시하는 백신의 영향으로 극미량의 바이러스만이 존재하는 가축 가검 시료 내에서의 바이러스 검사 시 진단률을 향상시키기 위한 수송배지 시스템 및 구제역바이러스 항원진단을 위해 toehold RNA sensor 기반의 진단시스템 적용

나. 추가 연구의 필요성

(1) 수송배지

- 앵타머와 자성입자의 conjugation 최적화 및 앵타머-자성입자 축합체 기반 수송배지의 구제역바이러스 농축 효능 시험 진행 중
- 구제역 항원진단용 현장진단키트에 구제역바이러스가 존재할 수 있는 의심 시료를 loading 하여 test line에 포집된 형태로 구제역 정밀진단기관으로 수송
- 구제역 정밀진단기관으로 수송된 구제역항원진단용 현장진단키트의 nitrocellulose membrane의 test line (의심시료에 구제역바이러스가 존재할 경우 test line에 구제역 바이러스가 포집되어 있음)을 채취하여 구제역 정밀진단용 시료로 이용 하는 형태의 연구 진행 필요

(2) Toehold switch RNA sensor

- 더욱 민감성 높은 toehold switch RNA sensor design 및 성능평가를 통한 민감성 개선 필요
- 1개의 target gene에 다수의 toehold switch RNA sensor 가 hybridization 되어 다수의 toehold switch RNA sensor로부터 translation이 개시되어 최종적으로 signal을 증폭시킬 수 있도록 민감도 개선 필요
- 등온증폭을 통한 switch RNA의 민감도 개선의 가능성이 있음. 특히 등온증폭의 일종인 Nucleic acid sequence based amplification(NASBA)를 통해 FMDV 증폭이 성공적으로 이루어진 보고들이 있음. NASBA는 등온에서 Reverse Transcriptase를 이용해 RNA를 증폭하는 기술이며, NASBA가 LAMP에 비해 오염의 위험이 덜함. switch 센서 앞단계에 등온증폭을 통해 FMDV를 증폭한후 현장에서 사용가능한 Toehold switch RNA sensor rapid detection system 개발 필요
- 기 상용화 되어있는 cell free translation kit의 경우 고가(30,000원/test)이므로 toehold switch sensor와의 조합을 통한 진단키트로의 제품화에 문제가 있으므로 자체 생산 시스템 구축 필요 및 이를 통한 toehold switch sensor로 부터의 최적의 translation 조건 재 확립 관련 연구 필요

다. 타 연구에의 응용

- (1) target 유전자와의 hybridization에 의해 유도되는 translated protein을 detection 하여 target 유전자의 유무를 감별할 수 있는 새로운 진단 platform 으로서 바이러스 및 세균 등과 같은 감염성 미생물 진단 등 그 응용범위는 매우 넓음.
- (2) toehold switch sensor를 design하여 expression vector의 원하는 위치에 간편하게 ligation 할 수 있으며, trigger RNA(target gene)와 hybridization 시 translation 기작이 개시되어 발현되는 단백질을 다양하게 손쉽게 변환할 수 있는 universal toehold switch

sensor transcription 용 vector를 구축하였으므로 다양한 질병진단키트 개발이 가능하며 특히 한 검체로부터 다양한 질병의 원인체에 대한 유전자를 동시에 진단 가능한 multiple toehold switch sensor 개발이 가능할 것으로 사료됨.

- (3) 구제역 바이러스와 반응하는 앵타머를 구제역 바이러스 항원진단키트에 적용가능하며 앵타머가 구제역바이러스 중화능이 있다면 구제역바이러스 증식 억제제 및 치료제로 개발 가능성이 있을 것으로 사료됨.

라. 기업화 추진방안 및 기술이전

- (1) 구제역 진단을 위해 민감성이 우수한 toehold switch sensor 및 hybridization 조건 발굴 시 기술이전 받을 예정임.
- (2) 앵타머 기반 바이러스 농축 수송시스템의 효능검증 후 기술이전 받을 예정임.

붙임. 참고문헌

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 국내 구제역 진단시스템 개선을 위한 시료 수송배지 및 구제역 바이러스 진단용 페이퍼센서 개발				
	(영문) Development of the paper sensor for detection and transport system of FMDV to improve the FMD diagnostic system				
주 관 연구 기관	(주)메디안디노스틱		주 관 연 구	(소속) 기술연구소	
참 여 기 업			책 임 자	(성명) 정 광 면	
총 연구개발비 (1,200,000천원)	계	1,200,000천원	총 연 구 기 간	2016. 09. ~ 2019. 09. (년 월)	
	정부출연 연구개발비	900,000천원	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	26명
	기업부담금	300,000천원		내부인원	7명
	연구기관부담금	0		외부인원	19명

○ 연구개발 목표 및 성과

- 구제역 백신 접종된 가축(우제류)이 구제역바이러스에 노출되어 감염될 경우 체내 백신항체에 의해 바이러스 증식이 대부분 억제되지만 구제역 바이러스가 미량으로 증식 될 수 있음.
- 이러한 백신 접종 상황 하에서 의심징후(구제역 바이러스 비구조 단백질(NSP, Non-Structural Protein)에 대한 항체 양성)가 있는 가축을 대상으로 구제역 바이러스 항원 진단률을 향상시키기 위한 방안으로써 다양한 오염물질과 함께 미량의 구제역바이러스가 포함되어있는 시료를 구제역바이러스의 손상 없이 구제역 정밀진단기관으로 안전하게 운송하기 위한 수송배지와 민감도가 향상된 구제역 바이러스 항원 진단키트를 개발하는 것이 본 과제의 목적임.
- 다양한 환경오염물질이 포함되어있는 구제역 검사 시료 내 존재하는 구제역 바이러스를 감지할 수 있는 앵타머 개발 및 앵타머 & 자성입자를 이용한 바이러스 농축가능 수송 배지의 개발
- Toehold switch RNA sensor 및 cell free translation kit를 이용한 구제역 항원진단용 페이퍼센서 개발

○ 연구내용 및 결과

- 구제역바이러스 구조단백질과 반응하는 앵타머 3종 발굴
: 불활화 바이러스와의 반응성 확인 완료
- 구제역바이러스 구조단백질 특이 앵타머-자성입자 기반 바이러스 농축 및 수송배지 프로토타입 완성
: 농축효능 및 수송배지로서의 적합성 시험 진행 중
- 구제역바이러스 3D gene을 target하는 Toehold switch sensor 1종 발굴
: Toehold switch sensor design 및 반응성 검증 완료

- trigger RNA(target gene) 의존적 toehold switch sensor 활성화 유무 및 이로 인한 reporter protein 발현량 분석을 위한 universal toehold switch sensor transcription & reporter protein 발현용 vector system 구축
- target gene과의 hybridization에 의해 toehold switch sensor의 translation 기작이 개시되어 발현되는 reporter protein detection system 개발
 - : lateral flow immunochromatographic assay platform
 - : 반응시간 10min, 결과 육안판독, 비전문가 사용가능, 별도의 판독장비 불필요
- 구제역바이러스 RNA 유전자 검출용 GFP(Green Fluorescence Protein) 기반 페이퍼센서 개발 및 반응성 검증완료, 민감성을 높이기 위한 Palm RT-PCR(10^2 copies/ml 까지 감지하는 것으로 확인) 및 NASBA(Nucleic Acids Sequence Based Amplification) 과 toehold switch sensor 의 접목 시험 진행 중

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 특허출원 1건 완료(추가 1건 출원 진행중), 프로그램등록 1건 완료, SCI 1편 완료, 비SCI 1편 완료 (추가 비SCI 1편 예정), 학술발표 6건 완료, 인력양성 1건 예정
- 구제역 수송배지 및 페이퍼센서 산업화 예정
- 불활화 구제역바이러스와의 반응성 있는 앵타머를 이용한 구제역 바이러스 항원/항체 진단시스템 구축 가능 및 구제역바이러스에 대한 중화능 평가 예정
 - : 중화능이 확인 될 경우 구제역 치료제 및 바이러스 감염후 바이러스 증식 억제제로 개발 가능
- universal vector system을 통해 구제역바이러스 외 다양한 감염성 병원체 진단용 toehold switch 및 reporter protein을 매우 효율적으로 스크리닝하여 발굴할 수 있으며 선정된 toehold switch sensor와 reporter protein 이용한 진단키트 개발 가능
- 한 가지 시료에 존재할 수 있는 다양한 감염성질환 원인체들을 동시에 스크리닝 가능
 - : 감염성 질환 원인체 유전자 별 특이 toehold switch design 및 특이 toehold switch sensor에 의해 translation 기작이 개시되어 발현되는 각각의 특이적인 reporter protein 감지 시스템 적용

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		116097-3	
사업구분	가축질병대응기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	가축질병대응기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	국내 구제역 진단 시스템 개선을 위한 시료 수송배지 및 구제역 바이러스 진단용 페이퍼센서 개발 (주)메디안디노스틱			과제유형	(기초,응용, 개발)
연구기관	전북대학교 산학협력단 안전성평가연구소 충북대학교 산학협력단 농림축산검역본부			연구책임자	정 광 면
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	'16. 09. 05 ~ '17. 09. 04	300,000	100,000	400,000
	2차연도	'17. 09. 05 ~ '18. 09. 04	250,000	83,333	333,333
	3차연도	'18. 09. 05 ~ '19. 09. 04	350,000	116,667	466,667
	계	3년	900,000	300,000	1,200,000
참여기업	(주)메디안디노스틱				
상대국				상대국연구기관	

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2019. 10. 16

3. 평가자(연구책임자) : 정 광 면

소속	직위	성명
(주)메디안디노스틱	이사 (연구소장)	정 광 면

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	---

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, **보통**, 미흡, 불량)

기존에 존재하는 항원항체반응을 이용한 진단법이 아닌 신개념의 진단법 연구로써 창의성은 우수하다고 평가되나, 당초 목표였던 수송배지 평가완료 및 페이퍼센서의 국내인허가를 위한 성능 개선 등의 실험이 진행 중이므로 최종적으로는 “보통”으로 평가하였음.

<실적 요약>

- 불활화 구제역바이러스와 반응하는 앵타머 3종 개발
- 앵타머-자성입자 축합체 기반 구제역바이러스 농축 및 수송배지 효능평가 진행 중
- 구제역바이러스 3D gene 의존적 반응을 나타내는 toehold switch RNA sensor 개발
- toehold switch & reporter protein 의 성능을 효율적으로 스크리닝 할 수 있는 universal toehold switch sensor transcription vector system 구축
- 항원항체반응 및 면역크로마토그래피를 이용한 reporter protein detection 시스템 구축
- toehold switch sensor 기반 구제역바이러스 항원진단키트의 민감성 개선 중
- palm RT-PCR & NASBA(Nucleic Acids Sequence Based Amplification) 적용 중

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

- 구제역바이러스 특이 앵타머 기반 수송배지의 최적화 및 효능검증이 완료될 경우 구제역 의심 환경시료 내 존재 할 수 있는 구제역바이러스의 안전한 수송 및 진단률 향상에 기여
- 종래의 진단법인 항원항체 반응 및 유전자 증폭방법이 아닌 신개념의 진단법으로써 target gene과의 RNA-RNA hybridization이 이루어지면 toe-hold가 풀리면서 translation 기작이 개시되어 reporter protein의 발현되는데 이러한 reporter protein을 감지하여 시료 내 target virus의 존재 유무를 진단하는 방법임.
- 본 진단법을 이용하여 현장에서 발생된 구제역 바이러스 유무 진단 뿐만 아니라 serotyping & topotyping 진단도 가능할 것으로 사료됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

- 구제역바이러스와 반응하는 앵타머가 구제역바이러스 중화능이 있는 것으로 확인 된다면 앵타머 기반 구제역 치료제 및 구제역바이러스가 감염된 동물의 체내에서 구제역바이러스의 증식을 억제할 수 있는 구제역바이러스 증식억제제로 개발 가능
- universal toehold switch sensor transcription & reporter protein 발현용 vector system 구축으로 bioinformatics 기술을 통해 후보로 design된 다양한 종류의 toehold switch sensor의 성능평가를 효율적으로 수행가능

- target gene과의 hybridization에 의해 toehold switch sensor의 translation 기작이 개시되어 발현되는 reporter protein detection system 구축 (immunochromatographic assay platform)으로 별도의 판독장비 없이 신속하게(반응시간 10min) 결과를 산출 할 수 있음.
- 본 진단방법과 원리는 감염성 질환의 원인체(바이러스, 세균 등) 진단에 모두 적용될 수 있으며, 특히 조류인플루엔자바이러스의 고병원성/저병원성을 감별하거나 백신주 바이러스와의 감별이 필요한 변종 바이러스를 진단하기 위한 serotyping 및 genotyping 진단키트의 개발이 가능해 질 것으로 사료됨.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 일반 실험실에서 다룰 수 없는 구제역바이러스 진단관련 연구분야로써 앵타머 발굴을 위한 실험적 환경이 용이하지 않았으며, 종래의 항원항체진단법 및 유전자 증폭 진단법이 아닌 유전자 hybridization과 단백질의 in vitro translation 기법이 융합된 신개념의 진단법으로써 시행착오가 많은 실험 분야였으나 각 기관의 연구자들이 주어진 여건과 상황 하에서 성실하게 최선을 다하였다고 사료됨.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 특허출원 목표 2건
 - 실적 : 특허출원 1건 완료, 1건 예정(10월 말 예정), 프로그램등록 1건 완료
- 기술실시 목표 1건
 - 실적 : 없음.
- SCI 논문 목표 2건
 - 실적 : SCI 논문 1편 완료
- 비SCI 논문 목표 2건
 - 실적 : 비SCI 논문 1편 완료, 1편 예정
- 학술발표 목표 5건
 - 실적 : 학술발표 6건 완료
- 인력양성 목표 1건
 - 실적 : 인력양성 1건 예정

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
구제역바이러스 구조단백질과 반응하는 앵타머 발굴 유무	10%	10%	- 완료 - 실제 구제역바이러스 구조단백질과의 반응성이 있는 앵타머이므로 추후 구제역바이러스 중화실험을 통해 중화능이 있을 경우 구제역 치료제 및 구제역바이러스 감염후 바이러스 증식 억제제로써 개발 가능함
앵타머의 구제역바이러스와의 반응성 유무	10%	10%	- 완료
구제역바이러스 구조단백질 특이 앵타머 - 자성입자 기반 바이러스 농축 및 수송배지 prototype 제작 유무	5%	5%	- 완료
구제역바이러스 수송배지의 성능 최적화 및 효능 평가 유무	10%	7%	- 완료 - 현재 앵타머-자성입자 기반 바이러스 수송배지의 최적화 및 효능평가 진행중임.
수송배지 생산시스템 구축 유무	5%	5%	- 완료 - 수송배지의 결과가 양호할 경우 구제역바이러스 외에 다른 종류의 바이러스 및 세균 검사를 위한 수송배지 생산에 적용가능
구제역바이러스 3D gene을 target 하는 toehold switch sensor design 및 발굴 유무	5%	5%	- 완료
Toehold switch sensor의 trigger (3D gene) 의존적 반응성 검증 유무	10%	10%	- 완료 - 구제역 바이러스 외에 다양한 감염성 질병에 대한 원인체 진단을 위해 design된 toehold switch sensor 후보들의 성능 screening을 매우 간편하고 효율적으로 수행할 수 있게 해주는 분석시스템으로써의 가치가 높음.
toehold switch sensor 및 reporter gene 평가용 universal vector system 구축 유무	10%	10%	- 완료 - translation의 개시로 발현되는 reporter protein을 다양하게 변환 가능하며, 단클론항체를 이용한 sandwich immunoassay를 통해 간편하게 reporter protein 정량가능
target gene과의 hybridization에 의해 toehold switch sensor의 translation 기작이 개시되어 발현되는 reporter protein detection system 개발 유무	10%	10%	- 완료

구제역바이러스 RNA 유전자 검출을 위한 GFP (Green Fluorescence Protein) 기반 페이퍼센서 개발 및 반응성 검증 유무	5%	5%	- 완료
구제역바이러스 toehold switch sensor 대량생산 시스템 구축 유무	5%	5%	- 완료
기존 항원측정용 래피드키트의 최저검출한계 대비 10배 높은 민감도 달성 유무	10%	9%	- palm PCR(약 18분동안 유전자 증폭)과 toehold switch sensor를 융합할 경우 구제역바이러스 3D RNA 10 ² copies/ml 까지 검출 가능함을 확인함. - NASBA(Nucleic Acids Sequence Based Amplification)를 통해 시료 RNA 증폭 후 toehold switch sensor 에 적용하는 시험 진행중
구제역바이러스 항원진단용 페이퍼센서허가서 작성 유무	5%	1%	- 허가서 작성 예정
합계	100%	92%	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

○ 구제역 백신 접종된 가축(우제류)이 구제역바이러스에 노출되어 감염될 경우 체내 백신 항체에 의해 바이러스 증식이 대부분 억제되지만 구제역 바이러스가 미량으로 증식될 수 있음. 이러한 백신 접종 상황 하에서 의심징후(구제역 바이러스 비구조 단백질(NSP, Non-Structural Protein)에 대한 항체 양성)이 있는 가축을 대상으로 구제역 바이러스 항원 진단률을 향상시키기 위한 방안으로써 다양한 오염 물질과 함께 미량의 구제역바이러스가 포함되어있는 시료를 구제역바이러스의 손상 없이 구제역 정밀진단기관으로 안전하게 운송하기 위한 수송배지와 민감도가 향상된 구제역 바이러스 항원 진단키트를 개발하는 것이 본 과제 의 목적임.

○ 본 연구팀은 최종 목표까지 실험적 진행이 이루어지지 않은 부분이 있으나 연구과정 중 아래와 같은 다양한 파급효과를 창출할 수 있는 연구적 성과를 얻었으며 이는 향후 본 진단시스템을 이용한 진단키트의 제품화 및 사업화의 중요한 기반이 될 것으로 사료됨.

<성과 요약>

- 불활화 구제역바이러스와 반응하는 앵타머 3종 개발
- 앵타머-자성입자 축합체 기반 구제역바이러스 농축 및 수송배지 효능평가 진행 중
- 구제역바이러스 3D gene 의존적 반응을 나타내는 toehold switch RNA sensor 개발
- toehold switch & reporter protein 의 성능을 효율적으로 스크리닝할 수 있는 universal toehold switch sensor transcription vector system 구축
- 항원항체반응 및 면역크로마토그래피를 이용한 reporter protein detection 시스템 구축
- toehold switch sensor 기반 구제역바이러스 항원진단키트의 민감성 개선 중
- palm RT-PCR & NASBA(Nucleic Acids Sequence Based Amplication) 적용 중

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

○ 본 연구과제는 종래의 항원항체진단법 및 유전자 증폭 진단법이 아닌 유전자 hybridization과 단백질의 *in vitro* translation 기법 및 현장진단용 면역크로마토그래피법이 융합된 신개념의 진단법으로써 시행착오가 많았던 실험 분야였음.

○ 향후 지속적 연구개발을 통해 산업화할 수 있는 파급효과 및 응용범위가 큰 유망한 분야로 사료됨.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

○ 본 진단법을 이용하여 현장에서 발생된 구제역 바이러스 유무 진단 뿐만 아니라 serotyping & topotyping 진단도 가능할 것으로 사료됨.

○ 본 진단방법과 원리는 감염성 질환의 원인체 (바이러스, 세균 등) 진단에 모두 적용될 수 있으며, 특히 조류인플루엔자바이러스의 고병원성/저병원성을 감별하거나 백신주 바이러스와의 감별이 필요한 변종 바이러스를 진단하기 위한 serotyping 및 genotyping 진단키트의 개발이 가능해 질 것으로 사료됨.

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

--

2. 연구기관 자체의 검토결과

--

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	가축질병대응기술개발사업	
연구과제명	국내 구제역 진단 시스템 개선을 위한 시료 수송배지 및 구제역 바이러스 진단용 페이퍼센서 개발			
주관연구기관	(주)메디안디노스틱		주관연구책임자	정 광 면
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	900,000 천원	300,000 천원	0	1,200,000 천원
연구개발기간	2016. 09. 05 ~ 2019. 09. 04			
주요활용유형	<input checked="" 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 구제역바이러스 구조단백질과 반응하는 앵타머 발굴	앵타머 발굴 완료
② 앵타머의 구제역바이러스와의 반응성 검증	구제역바이러스와의 반응성 검증 완료
③ 구제역바이러스 구조단백질 특이 앵타머 - 자성입자 기반 바이러스 농축 및 수송배지 prototype 제작	수송배지 prototype 제작 완료
④ 구제역바이러스 수송배지의 성능검증 및 효능 평가	성능 및 효능 평가 진행중
⑤ 수송배지 생산시스템 구축	수송배지 생산시스템 구축 완료
⑥ 구제역바이러스 3D gene을 target 하는 toehold switch sensor design 및 발굴	3D gene target toehold switch sensor 발굴 완료
⑦ Toehold switch sensor의 trigger (3D gene) 의존적 반응성 검증	반응성 검증 완료
⑧ toehold switch sensor 및 reporter gene 평가용 universal vector system 구축	universal vector system 구축 완료
⑨ target gene과의 hybridization에 의해 toehold switch sensor의 translation 기작이 개시되어 발현되는 reporter protein detection system 개발	reporter protein detection system 개발 완료
⑩ 구제역바이러스 RNA 유전자 검출을 위한 GFP (Green Fluorescence Protein) 기반 페이퍼센서 개발 및 반응성 검증	GFP 기반 페이퍼센서 개발 및 기본적인 반응성 검증 완료
⑪ 구제역바이러스 toehold switch sensor 대량생산 시스템 구축	toehold switch sensor gene plasmid 대량생산 시스템 구축 완료
⑫ 기존 항원측정용 래피드키트의 최저검출한계 대비 10배 높은 민감도 달성	민감도 향상을 위한 palm RT-PCR과 toehold switch sensor 와 조합시 구제역바이러스 3D RNA 10 ² copies/ml의 최저검출한계 확인
⑬ 구제역바이러스 항원진단용 페이퍼센서 허가서 작성	허가서 작성 예정

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권		기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용 홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)	
	특허 출원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논문		논 문 평 균 IF			학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
												SC I	비 SCI							
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	2			1	10						2	2		5	1					
연구기간내 달성실적	2 (1)			0							1	1 (1)		6	(1)					
달성율(%)	100 (150)			0							50	50 (100)		120	0 (100)					

() : 추가성과 달성 예정

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	구제역바이러스와 반응하는 앵타머 3종
②	구제역바이러스 3D RNA gene 의존적 반응을 나타내는 toehold switch sensor
③	toehold switch & reporter protein을 자유롭게 제작하고 평가하여 조합할 수 있는 universal toehold switch sensor transcription vector system
④	항원항체반응 및 면역크로마토그래피법을 이용한 reporter protein detection system

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 부 계	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개발	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장에로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술		V				V	V	V		
②의 기술	V	V				V	V	V		
③의 기술		V				V		V		
④의 기술		V				V		V		

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	엡타머-자성입자 축합체를 포함하는 구제역바이러스 수송배지 성능평가 완료 후 산업화 예정 구제역바이러스 특이 엡타머를 이용한 항원/항체 진단키트 개발 가능성 타진 예정 구제역바이러스에 대한 중화능있는지 확인 예정이며 중화능 있을 경우 구제역 치료제 및 구제역바이러스 증식 억제제로 개발가능성 타진 예정
②의 기술	NASBA(Nucleic Acids Sequence Based Amplification) 및 palm RT-PCR 과 toehold switch sensor와의 조합시 민감성이 매우 높은 진단시스템으로 구성가능하며 reporter protein detection system인 면역크로마토그래피법을 접목할 경우 현장 진단시 매우 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료
③ & ④의 기술	구제역바이러스 진단 외에 감염성 질환의 원인체 (바이러스, 세균 등) 진단시 toehold switch sensor 및 reporter protein design 및 제작, 성능평가가 매우 용이하므로 성능좋은 다양한 toehold switch sensor 기반 진단키트 개발 가능 예) 구제역바이러스 topotyping kit, 조류인플루엔자 고병원성/저병원성 감별 kit 등

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문 SC I	비 SC I	논문 평균 IF			학술발표	정책 활용	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표																			
연간기간내 달성실적																			
연구종료후 성과창출 계획		1		1		2			1										

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.