RS-2022-IP122012

돼지급성설사증후군 코로나바이러스 기초기전 연구 및 진단기술 개발

최종보고서

2024

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

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

가축질병대응기술고도화지원사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호
11-1543000-004664-01

돼지급성설사증후군 코로나바이러스 기초기전연구 및 진단기술 개발

2024년 6월 18일

주관연구기관 / 충남대학교
공동연구기관 / ㈜진스랩

농 림 축 산 식 품 부

(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “돼지급성설사증후군 코로나바이러스 기초기전연구 및 진단기술 개발” (개발기간 : 2022. 04. ~ 2023. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

납본일자 2024.06.18.

주관연구기관명 : 충남대학교 산학협력단 (대표자) 임 남 형 (인)
공동연구기관명 : ㈜진스랩 (대표자) 장 욱 진 (인)

주관연구책임자 : 박 정 은
공동연구책임자 : 조 주 혁

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

최종보고서

보안등급
일반[√], 보안[ ]

중앙행정기관명	농림축산식품부	사업명	사업명	가축질병대응기술 고도화지원사업
전문기관명 (해당 시 작성)	농림수산식품기술기획평가원		내역사업명 (해당 시 작성)	
공고번호	제2022-17	총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
		연구개발과제번호	RS-2022-IP122012	

기술분류						
국가과학기술 표준분류	LB0701	50%	LB0702	30%	LB0710	20%
농림식품과학기술분류	RB0201	50%	RB0202	30%	RB0203	20%

총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문	
	영문	
연구개발과제명	국문	돼지급성설사증후군 코로나바이러스 기초기전연구 및 진단기술 개발
	영문	Investigation of infection mechanism and diagnostics for swine acute diarrhea syndrome coronavirus

주관연구개발기관	기관명	충남대학교 산학협력단	사업자등록번호	314-82-09264
	주소	(34134)대전시 유성구 대학로99	법인등록번호	160171-0004040
연구책임자	성명	박정은	직위	부교수
	연락처 직장전화	042-821-6784	휴대전화	010-8782-5112
	연락처 전자우편	jepark@cnu.ac.kr	국가연구자번호	10226910

연구개발기간	전체		2022. 04. 01 - 2023. 12. 31(21개월)
	단계 (해당 시 작성)	1단계	2022. 04. 01 - 2023. 12. 31(21개월)
		n단계	

연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계			연구개발비 외 지원금
					지방자치단체		기타( )					
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계	
총계		950,000	12,660	94,618					962,660	94,618	962,660	
1단계	1년차	407,000	4,290	38,610					411,290	38,610	411,290	
	2년차	543,000	8,370	56,008					551,370	56,008	551,370	
n단계	1년차											
	n년차											

공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고 역할	비고 기관유형
공동연구개발기관	㈜진스랩	조주혁	팀장	010-2031-3784	jhcho84@gccorp.com	수요	중견기업
위탁연구개발기관							
연구개발기관 외 기관							

연구개발담당자 실무담당자	성명	박정은	직위	부교수
	연락처 직장전화	042-821-6784	휴대전화	010-8782-5112
	연락처 전자우편	jepark@cnu.ac.kr	국가연구자번호	10226910

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

2024년 05월 30일

연구책임자: 박 정 은 (인)

주관연구개발기관의 장: 임 남 형 (직인)

공동연구개발기관의 장: 장 욱 진 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요 약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

<table>
<tr><td colspan="2">사업명</td><td colspan="2">가축질병대응기술고도화지원사업</td><td colspan="2">총괄연구개발 식별번호
(해당 시 작성)</td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td colspan="2">내역사업명
(해당 시 작성)</td><td colspan="2"></td><td colspan="2">연구개발과제번호</td><td colspan="2">RS-2022-IP122012</td></tr>
<tr><td rowspan="2">기술분류</td><td>국가과학기술 표준분류</td><td>LB0701</td><td>50%</td><td>LB0702</td><td>30%</td><td>LB0710</td><td>20%</td></tr>
<tr><td>농림식품 과학기술분류</td><td>RB0201</td><td>50%</td><td>RB0202</td><td>30%</td><td>RB0203</td><td>20%</td></tr>
<tr><td colspan="2">총괄연구개발명
(해당 시 작성)</td><td colspan="6"></td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제명</td><td colspan="6">돼지급성설사증후군 코로나바이러스 기초기전연구 및 진단기술 개발</td></tr>
<tr><td colspan="2">전체 연구개발기간</td><td colspan="6">2022.04.01 ~ 2023.12.31</td></tr>
<tr><td colspan="2">총 연구개발비</td><td colspan="6">총 1,057,275 천원
(정부지원연구개발비: 950,000 천원, 기관부담연구개발비 : 107,278 천원,
지방자치단체지원연구개발비: 천원, 그 외 지원연구개발비: 천원)</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발단계</td><td colspan="2">기초[√] 응용[ ] 개발[ ]
기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]</td><td colspan="2">기술성숙도
(해당 시 작성)</td><td colspan="2">착수시점 기준(1)
종료시점 목표(5)</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제 유형
(해당 시 작성)</td><td colspan="6"></td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제 특성
(해당 시 작성)</td><td colspan="6"></td></tr>
<tr><td colspan="2" rowspan="2">연구개발
목표 및 내용</td><td colspan="2">최종 목표</td><td colspan="4">□ 국내 유입 및 인수공통감염의 우려를 갖는 돼지급성설사증후군 코로나바이러스(SADS-CoV)의 감염 특성을 분석하여 대응기반 구축을 위한 과학적 자료를 마련함.
□ 유전자진단법 개발을 통해 초기 유입·발생시 조기 대응을 위한 선제적 대응기반을 마련하고 국내 질병 발생 양상에 대한 예찰 자료 및 유전정보를 확보함.</td></tr>
<tr><td colspan="2">전체 내용</td><td colspan="4">□ SADS-CoV 기초기전 연구
○ 바이러스 감염 매개 인자 규명
- Genome-wide CRISPR/Cas9 screening
- Surfaceome CRISPR/Cas9 screening
- S1-Fc를 이용한 세포수용체 규명
- 슈도바이러스를 이용한 감염 매개 핵심인자 규명
- 슈도바이러스를 이용한 감염 매개 보조인자 규명
- 슈도바이러스를 이용한 entry pathway 규명
- Authentic SADS-CoV를 이용한 감염기전 검증
○ 바이러스 인수공통감염성 규명
- 사람 및 동물 수용체와의 바이러스 친화도 평가
- 사람 및 동물 수용체의 감염매개능 평가
- 인간 폐 오가노이드에서의 감염 매개 인자 발현율 분석
- 인간 폐 오가노이드에서의 SADS-CoV 감염성 평가
□ SADS-CoV 유전자진단법 개발
○ Real-time PCR 기반 단일 및 다중 진단법 확립
- SADS-CoV, PEDV ,PDCoV 타겟유전자 선정
- 타겟유전자 합성 및 표준시료 확보
- 프라이머/프로브 제작 및 최적화
- Real-time PCR 반응조건 확립 및 최적화
○ 진단법 유효성 평가 및 국내 발생 양상 분석
- 표준시료를 이용한 민감도·특이도 평가
- 바이러스 배양액을 이용한 민감도·특이도 평가
- 임상시료를 이용한 진단법과의 민감도·특이도 평가</td></tr>
</table>

			- 돼지 분변 시료 확보 및 바이러스 유병율 분석 - 양성시료 내 바이러스 스파이크 유전자 상동성 분석
	1단계 (해당 시 작성)	목표	
		내용	
	n단계 (해당 시 작성)	목표	
		내용	

연구개발성과	☐ SADS-CoV 감염기전 규명 ☐ SADS-CoV 단일 및 SADS-CoV/PEDV/PDCoV 다중 진단기술 개발
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	☐ SADS-CoV 감염기전 및 인수간 전파 가능성 규명을 통한 사전 대응 역량 강화 ☐ SADS-CoV 유입 및 발생시 조기 대응을 위한 진단법 확보 및 바이러스 예찰 ☐ 국내 돼지 코로나바이러스 발생 양상에 대한 모니터링 자료 및 유전정보 제공 ☐ 신규 바이러스 자원 확보를 통한 기초/기전 연구 활성화 및 유용 선도물질의 원천성 확보 (나고야의정서 대응) ☐ 전염성 질병 연구를 위한 한중 국제협력 네트워크 구축
연구개발성과의 비공개여부 및 사유	

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	4	1	1					10				

연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설 ·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호

국문핵심어 (5개 이내)	돼지급성설사증후군	코로나바이러스	감염기전	인수간 전파	진단
영문핵심어 (5개 이내)	Swine acute diarrhea syndrome	Coronavirus	Infection mechanism	Inter-species transmission	Diagnosis

〈 목　　차 〉

1. 연구개발과제의 개요

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)

5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

별첨 자료 (참고 문헌 등)

※ 각 항목에서 요구하는 정보를 포함하여 연구개발과제의 특성에 따라 항목을 추가하거나 항목의 순서와 구성을 변경하는 등 서식을 수정하여 사용하거나 별도의 첨부자료 활용이 가능합니다.

1. 연구개발과제의 개요

1) 연구개발과제의 필요성

○ 돼지급성설사증후군(swine acute diarrhea syndrome, SADS, SeACoV)은 2017년 중국 광동지역에서 처음 보고된 **돼지의 신종 코로나바이러스 감염증**임. 주로 포유자돈에서 급성 구토와 수양성 설사를 일으키며 전염성과 폐사율(~90%)이 매우 높은 전염병으로 양돈 농가에 상당한 경제적 손실을 초래함. 국내에서의 아직 발생 보고가 없는 외래 신종 감염병임.

○ 2012년~2018년 중국 남부 돼지의 설사 유발 바이러스 원인체를 분석한 연구결과(그림 1)에 따르면, 돼지유행성설사병바이러스(PEDV, 50.21~62.10%), 돼지델타 코로나바이러스 (PDCoV, 19.62~29.19%), SADS-CoV(10.29%), 전염성 위장염 바이러스(TGEV, 3% 미만) 및 돼지 로타바이러스(PoRV, 3% 미만)의 순으로 높은 유병율을 나타냄. 이들 바이러스의 단일감염뿐 아니라 2종 이상의 코로나바이러스가 복합감염되는 경우도 빈번하게 나타남.

○ 이러한 연구결과는 **PEDV (특히, 변종 PEDV), PDCoV 및 SADS-CoV가 돼지에 단일 또는 동시 감염하여 설사를 일으키는 주요 병인**이며, 돼지 바이러스성 설사를 효과적으로 예방하고 통제하기 위해서는 **이들 바이러스의 감별진단, 특성에 관한 연구가 필요함**을 시사함.

그림 1. 2012년부터 2018년까지 중국 남부 샘플에서의 돼지 설사바이러스 단일 및 동시 감염 현황

○ 원인체인 SADS-CoV는 alphacoronavirus의 일종으로 박쥐 코로나바이러스인 HKU2와 높은 유전자

적 상동성(98.5%)을 보였으며, 이는 SADS-CoV가 박쥐로부터 유래했을 가능성을 시사함. 따라서, SADS-CoV는 최초의 박쥐 유래 돼지 감염성 코로나바이러스임.

○ HKU2는 2004년 최초로 보고되었으며, 다양한 종류의 박쥐 중 말굽박쥐에서 가장 높은 유병율을 나타냄. 말굽박쥐는 2002~2003년 유행한 인간 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스(SARS-CoV)의 ancestor인 HKU3를 가지고 reservoir로 알려짐.

○ SADS-CoV는 1) **돼지발병이 SARS-CoV 감염이 일어났던 지역과 지리적으로 근접**하며 2) **SARS-CoV와 마찬가지로 말굽박쥐에서 유래**하였다 것으로 미루어 보아, **박쥐-돼지-사람에 이르는 인수공통감염성에 대한 우려를 갖고 있음**.

그림 2. SADS-CoV와 SARS-CoV의 발생지역 및 Reservoir

○ 이를 뒷받침하듯 최근 연구결과에 따르면 SADS-CoV는 사람의 폐와 간에서 유래된 primary 세포와 다양한 동물에서 유래한 세포주에서 효율적으로 감염을 일으킨다고 보고됨 (Edwards et al., 2020, Yang et al., 2019). 이러한 결과는 **SADS-CoV가 광범위한 숙주 범위를 갖고 있으며 돼지를 중간숙주로 사용하여 인간에 감염할 수 있는 고유한 잠재력을 가지고 있음**을 나타냄.

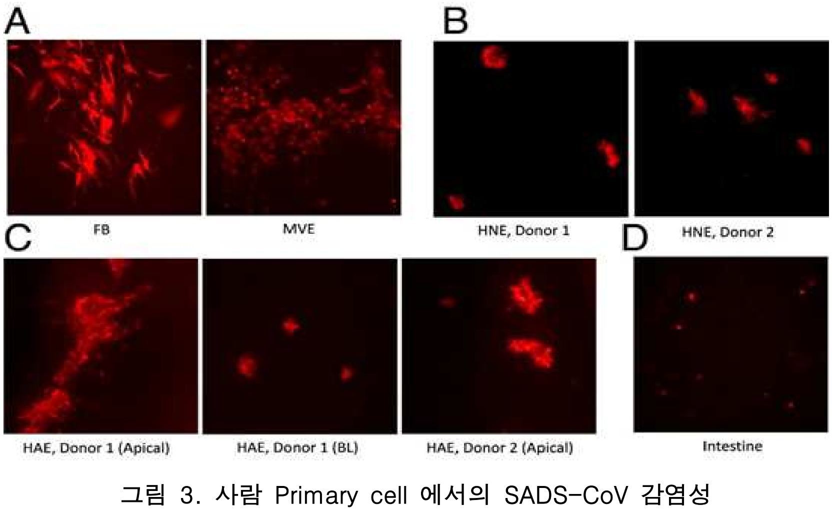


그림 3. 사람 Primary cell 에서의 SADS-CoV 감염성

○ 또한, 사람, 원숭이, 돼지, 햄스터 유래 세포에서도 바이러스 감염이 이루어지나, 마우스 유래 세포 및 면역능력이 있는 마우스나 면역결핍 마우스에는 감염을 일으키지 않았으며, 이는 SADS-CoV 세포수용체의 규명과 이를 통한 동물모델 구축의 필요성을 시사함.

○ 현재 국내에서 발생하고 있는 전염성 질병은 아니지만, **중국은 우리나라와 활발한 인적·물적 교류를 하고 있으며, 지리적으로 인접하여 전염병의 유입이 빠르게 일어날 수 있어 선제대응이 필요**함.
*** 변종 PED, COVID-19, 아프리카돼지열병, 조류독감, 중증열성혈소판감소증후군 등은 중국으로부터 유입되어 국내에서 유행하고 있는 대표적인 감염성 질환들임.

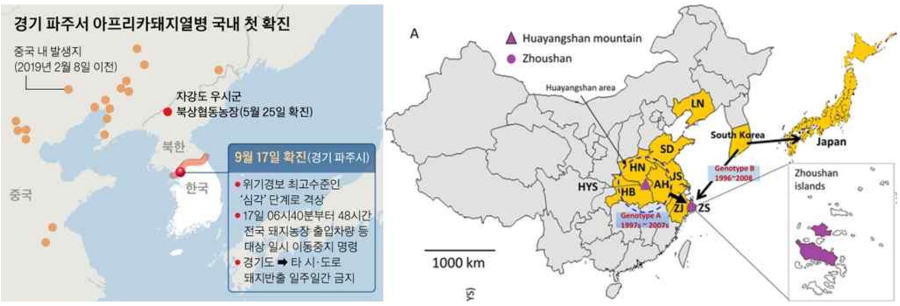


그림 4. 중국-한국간 전염병 발생 및 전파 예 (ASFV 및 SFTSV)

○ 향후 국내유입 및 인수공통감염의 잠재적인 위험요인을 가지고 있는 SADS-CoV에 대한 선제적인 대응체계 마련을 위해서는 기초기전 연구, 연구 활성화를 위한 연구인프라 구축 및 선제대응을 위한 진단기술의 확보가 요구되며, 질병 발생국인 중국과의 국제협력연구가 필요할 것으로 생각됨.

2) 연구개발과제의 목표

□ 최종목표

○ 본 연구의 목표는 돼지급성설사증후군 코로나바이러스(SADS-CoV) 기초기전 연구를 통해 질병 대응기반 구축을 위한 과학적 기초자료 및 연구인프라를 구축하는 것임.

○ 또한, 유전자진단법 개발을 통해 초기 유입·발생시 조기 대응을 위한 선제적 대응기반을 마련하고 국내 질병 발생 양상에 대한 예찰 자료 및 유전정보를 확보하기 위함.

그림 5. 연구목표

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1) 1차년도

□ 바이러스 감염 매개 인자 규명

○ Genome-wide 및 Surfaceome CRISPR/Cas9 screening

- 중국연구팀이 기 구축하고 있는 CRISPR/Cas9 Lentivirus library를 Vero 세포에 도입하고 authentic SADS-CoV를 감염시킴. 생존한 세포들의 NGS 분석을 통해 SADS-CoV 감염에 영향을 미치는 인자를 발굴함.

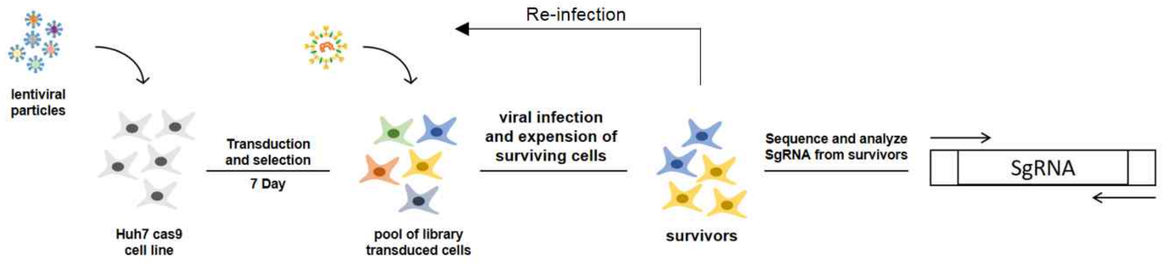


그림 6. CRISPR/Cas9 screening 방법

○ S1-Fc를 이용한 세포수용체 규명

- SADS-CoV 감염을 매개하는 세포수용체 규명을 위해 SADS S1-Fc를 제작하고 분리 정제된 S1-Fc을 Vero세포 및 숙주 유래 세포로부터 제조한 cell lysate를 이용하여 co-immunoprecipitation을 수행함. S1-Fc와 부착하는 세포내 단백질은 N-terminal 아미노산 분석법을 이용하여 규명함.
- 규명된 단백질의 발현과 바이러스 (슈도바이러스 및 authentic virus) 감염능과의 상관관계 분석, 단백질에 대한 항체의 존재 하에 바이러스 감염능 분석 등 추가적인 실험을 통해 세포수용체로서의 기능을 검증함.

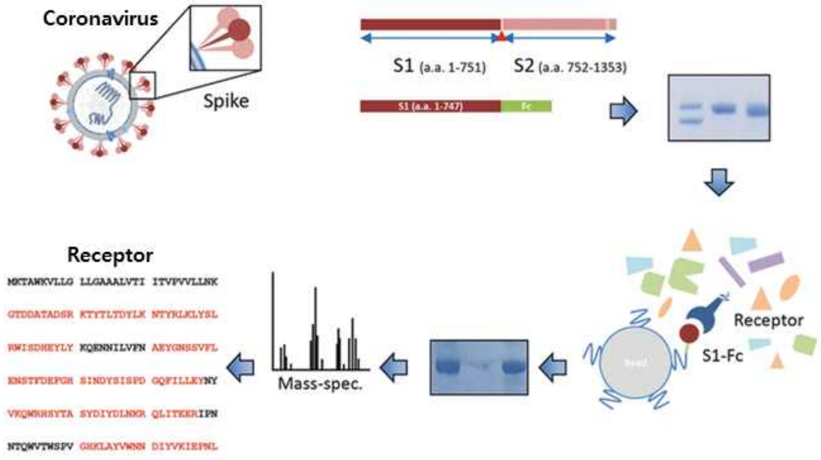


그림 7. S1-Fc를 활용한 SADS-CoV 세포수용체 규명

○ 바이러스 감염 매개 보조인자 (단백분해효소, tetraspanin 등) 규명

- 바이러스의 감염을 매개하는 단백분해효소를 규명하기 위해, 단백분해효소 억제제 (camostat, dec-RVKR-cmk, E64d 등)를 슈도바이러스가 세포에 감염하는 동안 처리하고 바이러스 감염력에 미치는 영향을 분석함.
- Tetraspanin의 역할을 규명하기 위해, CD9, CD81, CD63을 억제하는 siRNA를 처리하고 슈도바이러스의 감염력에 미치는 영향을 분석함.
- 또한, CRISPR/Cas9 screening으로 발굴된 다양한 감염인자의 역할 및 기전을 규명하기 위해 발굴된 숙주인자를 억제 또는 과발한하는 세포주를 제작하고 슈도바이러스의 감염력에 미치는 영향을 분석함.

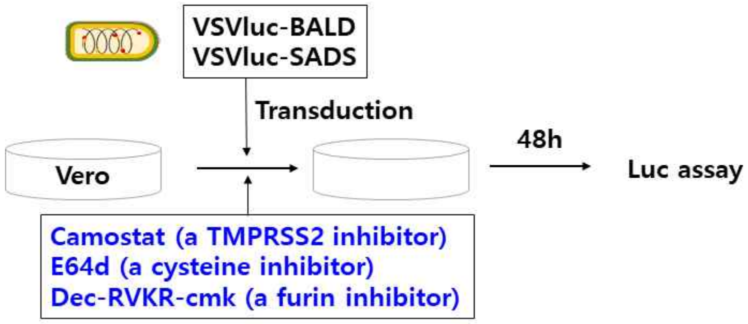


그림 8. 슈도바이러스를 이용한 단백분해효소 규명 연구

○ 바이러스 entry pathway 규명

- SADS-CoV의 감염경로를 규명하기 위해 SADS pseudovirus를 Vero 세포에 감염시키고, 단백분해효소 억제제 (camostat, dec-RVKR-cmk, E64d 등), endocytosis 억제제 (Bafilomycin A1, NH4Cl, Chloroquine 등), clathrin-mediated endocytosis 억제제 (chlorpromazine), caveolin-mediated endocytosis 억제제 (nystatin), dynamine inhibitor (dynasore) 등의 다양한 억제제를 처리하고 감염력에 미치는 영향을 분석함.

○ Authentic SADS-CoV를 이용한 감염기전 검증

- 중국연구팀이 확보한 authentic SADS-CoV를 이용하여 슈도바이러스 실험을 통해 규명된 연구결과에 대한 검증실험을 수행함.
- SADS-CoV를 다양한 억제인자와 함께 Vero세포에 감염시키고 24시간 또는 48시간 후 바이러스에 의해 유도된 세포변성효과를 관찰하고 바이러스 역가를 plaque assay를 이용하여 측정함.

□ Real-time PCR 기반 단일 및 다중 진단법 확립

○ SADS-CoV, PEDV, PDCoV 타겟 유전자 선정

- NCBI로부터 확보한 원인 바이러스의 염기서열을 바탕으로 유전자적 상동성을 분석하고 기존 문헌 및 유전자 상동성 분석을 바탕으로 타겟 유전자를 선정함.

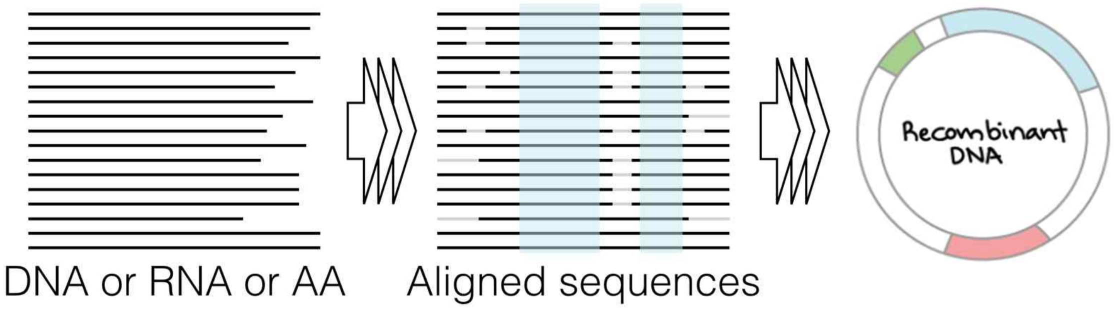


그림 9. 타겟 유전자 선정 및 표준시료 제작

○ 타겟 유전자 합성 및 표준시료(플라스미드) 제작

- Genscript로부터 선정된 유전자를 합성하고 pUC57 vector에 클로닝 함.
- 유전자 합성을 통해 만들어진 표준시료는 검출기술 평가를 위한 표준 주형 (template)으로 사용할 예정이며, 추후 개발될 진단키트의 양성대조군으로 활용함.

○ 프라이머 및 프로브 제작

- PrimerExplorer V5 (https://primerexplorer.jp/e/)을 사용하여 약 100bp 정도의 PCR 산출물을 증폭할 수 있는 프라이머 및 프로브를 디자인함. 최적의 프라이머 및 프로브 확보를 위해 각 유전자에 대한 3종의 후보 프라이머 및 프로브를 디자인함.
- 프로브로 사용할 프라이머의 5 ‘말단에는 FAM을 3’ 말단에 BHQ1을 Modification하여 Dual

labeled probe 제작할 예정임.
- 3종의 후보 프라이머 및 프로브를 이용하여 Real-time PCR을 수행하고 Ct (Threshold cycle)값, 산출물의 melting curve 등을 고려하여 최적화된 프라이머 및 프로브를 선별함.

○ Real-time PCR 반응조건 확립
- Real-time PCR의 반응조성은 ㈜진스랩이 확보하고 있는 기술력과 노하우를 바탕으로 확립할 예정임.
- 최적조건을 확립하기 위해 표준시료를 이용하여 프라이머 농도와 반응온도를 달리하여 Real-time PCR을 수행함.

2) 2차년도

□ 바이러스 숙주특이성 및 인수공통감염성 규명
○ 동물 및 사람 세포수용체와의 바이러스 친화도 및 감염성 평가
- 유전자적 상동성 검사 : 발굴된 세포수용체의 종간 유전자적 상동성을 바탕으로 종간전파 가능성이 있는 동물을 선별함.
- 유전자 합성 및 클로닝 : SADS-CoV 스파이크 단백질과 다양한 동물의 세포수용체 사이의 친화도를 확인하기 위해, 선정된 동물의 세포수용체를 발현하는 유전자를 합성하고 pcDNA3.1 vector에 클로닝함.
- 바이러스와 세포수용체 binding affinity 평가 : S1-Fc와 세포수용체 사이의 binding affinity를 측정하기 위해 선정된 동물의 세포수용체를 발현하는 세포를 S1-Fc와 반응시킨 뒤, S1-Fc의 binding을 Surface plasmon resonance (SPR)를 이용하여 분석함.
- 바이러스 감염성 평가 : 친화도에 따른 바이러스 감염력을 확인하기 위해 선정된 동물의 세포수용체를 발현하는 세포에 슈도바이러스 및 authentic SADS-CoV를 감염시킨 후 바이러스의 감염력을 luciferase assay와 plaque assay를 이용하여 측정함.

○ 세포주 및 인간 폐 오가노이드에서의 바이러스 감염 매개 인자 발현율 분석
- 현재 중국공동연구팀에서는 인간 폐 오가노이드 모델을 구축하고 있으며, 인간 폐 오가노이드를 구성하는 세포를 분리하고 세포 내 SADS-CoV 세포수용체 및 감염매개인자들의 발현율을 real-time PCR을 이용하여 분석하고자 함.

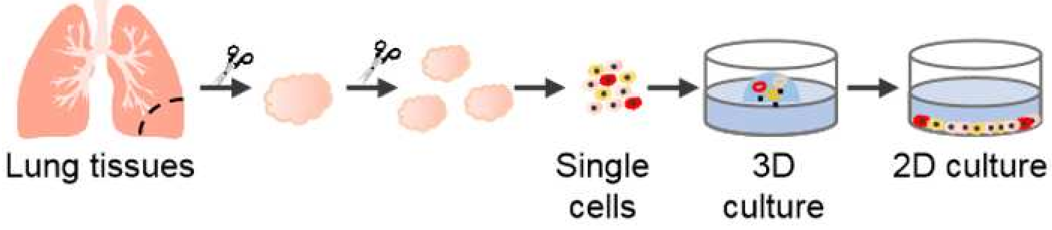


그림 10 Human lung 오가노이드 제작

○ 인간 폐 오가노이드에서의 SADS-CoV 감염성 평가
- 인간 폐 오가노이드에 SADS-CoV를 감염시키고 시간에 따른 바이러스양을 plaque assay를 이용하여 측정하고 면역염색을 통해 감염된 세포에서의 바이러스 항원을 표지함.
- 병원성 메커니즘 연구를 위해 SADS-CoV의 마우스 적응 균주를 생성하기 위해 SADS-CoV WT 균주를 4~6주령 BALB/c 및 STAT1 KO 마우스에 비강 내 접종 및 복강 내 주사를 통해 연속적으로 계대배양함. 비강내 접종 그룹의 주둥이 및 폐 조직과 복강내 주사 그룹의 장 조직을 접종 3일 후 바이러스 RNA 로드 분석을 위해 수집함.

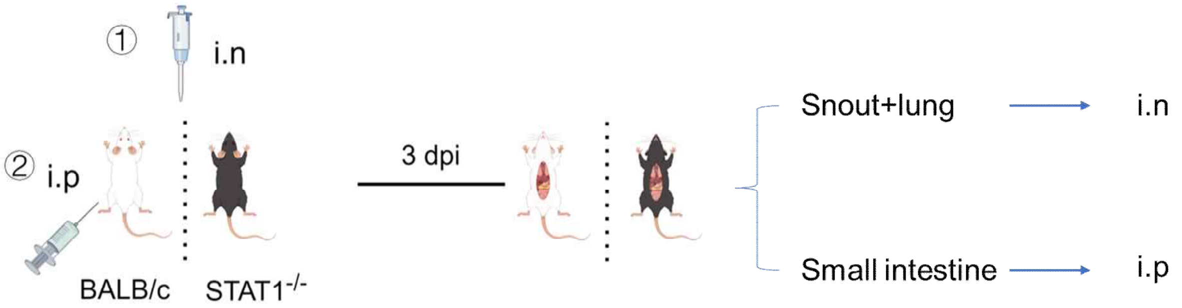


그림 11 Mouse-adapted SADS-CoV 제작 과정

□ 진단기술 유효성 평가 및 국내 발생 양상 모니터링

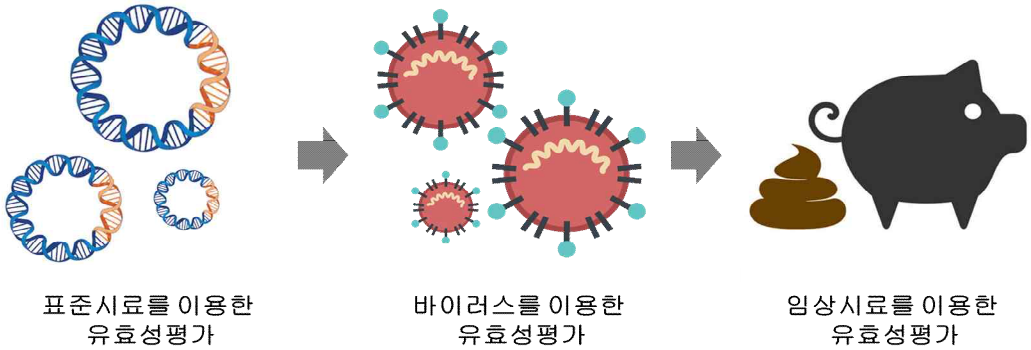


그림 12. 진단법 유효성 평가

○ 표준시료를 이용한 민감도·특이도 평가

- 단일 진단기술의 유효성을 평가하기 위해 SADS-CoV 표준시료를 10 배수 단계희석하고 기존의 RT-PCR 및 개발 real-time PCR을 실시하여 진단법간 민감도와 특이도를 비교함.
- 다중 진단기술의 유효성을 평가하기 위해 3종 표준시료 혼합물을 10 배수 단계희석하고 conventional PCR 및 개발 real-time PCR을 실시하여 진단법간 민감도와 특이도를 비교함.

○ 바이러스 배양액을 이용한 민감도·특이도 평가

- 3종의 바이러스 배양액으로부터 바이러스 핵산을 추출한 뒤 10 배수 단계희석하고 기존의 RT-PCR 및 개발 real-time PCR을 실시하여 진단법간 민감도와 특이도를 비교함.
- 연구에 사용되는 PEDV, PDCoV의 핵산은 국내연구팀이 농림축산검염본부 및 ATCC로부터 분양받은 바이러스에서 추출하여 사용할 것이며, SADS-CoV 핵산은 중국연구팀에서 추출하여 사용할 예정임.

○ 야외시료를 이용한 민감도·특이도 평가

- 야외시료에 대한 유효성을 평가하기 위해 수집한 돼지 분변시료로부터 핵산을 추출하고 기존의 RT-PCR 및 개발 real-time PCR을 실시하여 진단법간 민감도와 특이도를 비교함.
- 국내 양돈농가로부터 수집한 야외시료를 중심으로 하되, SADS-CoV 임상시료의 경우 해외에서 수집한 야외시료를 핵산의 형태로 공급받을 예정임.

○ 돼지 분변 시료 확보 및 바이러스 유병율 분석

- SADS-CoV는 아직 국내 발생 보고가 없으며, 역학적 조사가 이루어지고 있지 않음. 국내 유입 및 발생 여부를 확인하고 진단법 유효성 평가를 위한 임상시료를 수집하기 위해 양돈 농가로부터 100개 이상의 분변 샘플을 확보함.
- SADS-CoV, PEDV, PDCoV 유전물질을 기존의 RT-PCR을 이용하여 검출하여 국내 양돈 농가 내 설사 유발 바이러스 원인체의 유병율을 분석함.

○ 양성시료 내 바이러스 스파이크 유전자 분석
- SADS-CoV 양성반응을 보이는 시료로부터 스파이크 단백질에 대한 유전자적 분석을 수행하고 국내외 바이러스와의 유전자적 상동성을 분석함.
- 유전자정보는 NCBI GenBank에 공개함.

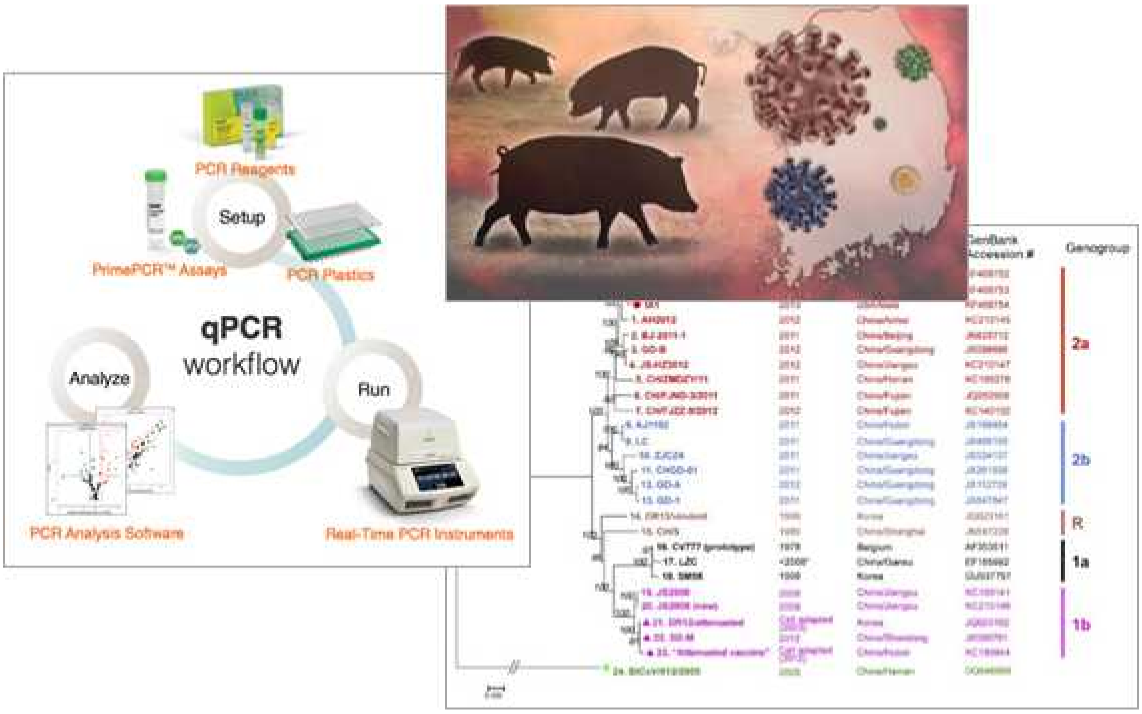


그림 13. 유병율 분석 및 유전정보 확보

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구 수행 결과

□ 바이러스 감염 매개 인자 규명

○ Genome-wide 및 Surfaceome CRISPR/Cas9 screening

- 국제협력공동연구를 통해 중국연구팀에서 수행함.
- Hela 세포에서의 SADS-CoV infection 및 titration에 대한 시험법을 확립하고 CRISPR/Cas9 library 및 lentivirus 확보함.

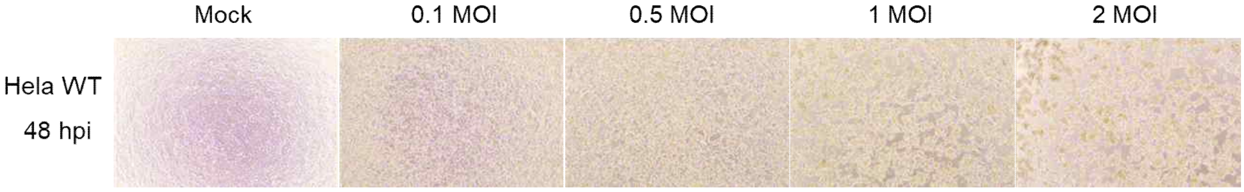


그림 14. Hela 세포에서의 SADS-CoV 감염

- 인간 세포에서 SADS-CoV 진입 및 감염을 매개하는 기능적 수용체를 확인하기 위해 CRISPR/Cas9 시스템을 사용하여 표면 막 단백질(5773개 유전자를 표적으로 함)이 녹아웃된 Hela 세포를 확립함. CRISPR/Cas9 스크리닝에는 SADS-CoV WT 균주를 사용함. 야생형 Hela 세포를 SADS-CoV WT 균주로 MOI 1로 48시간 동안 감염시켰고, 바이러스 매개 세포변성 효과(90%에 근접)를 광학 현미경으로 검사함.
- 그 후, CRISPR/Cas9 기술을 사용하여 편견 없는 표면체 스크리닝을 수행함. 단일 가이드 RNA(sgRNA)의 표면체 풀을 Cas9 발현 Hela 세포에 도입한 다음 MOI 1로 SADS-CoV에 감염시킴. 그런 다음 생존 세포의 sgRNA 서열을 서열 분석함.
- NGS 결과를 MAGeCK(Model-based Analysis of Genome-wide GRISPR/Cas9 Knockout)을 이용하여 분석한 결과, MOI=1 조건에서는 343개의 유전자가, MOI=3 조건에서는 678개의 유전자가 enrichment 된 것을 확인할 수 있었음. 두 조건에서 모두 유의하게 enrichment 된 유전자는 총 11개(NOX1, MCPH1, CASR, AKAP3, HPXA9, PSMC6, MAG, ORM1, GLS, AKPI, ABCD2)로 분석되었음.

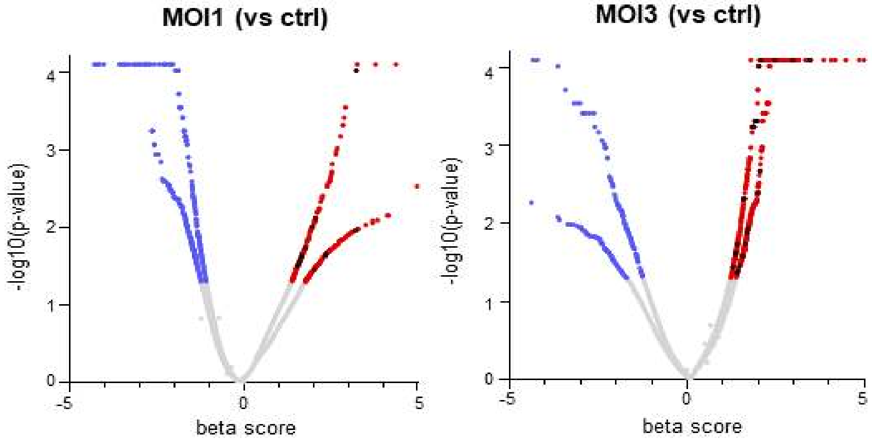


그림 15. CRISPR/Cas9 screening 분석 결과

- KEGG 분석 결과, cytokine-cytokine receptor interaction, toll-like receptor signaling pathway, NF-kappa B signaling pathway, inflammatory mediator regulation 등과 같은 세포 내 신호전달 및 면역반응 관련 인자들에 높은 연관성을 나타냈으며, coronavirus disease를 포함하여 hepatitis B, human cytomegalovirus, influenza A 등과 같은 바이러스 감염증과의 높은 연관성을 나타냄.

○ S1-Fc를 이용한 세포수용체 규명

- SADS-CoV 감염을 매개하는 세포수용체 규명을 위한 S1-Fc를 제작함. SADS-CoV S1-Fc를 발현하는 유전자를 GenScript로부터 합성하고 pCAGGS vector에 클로닝함. HEK293T세포에 SADS S1-Fc를 형질전환시키고 세포 및 상층액을 회수하여 western blot을 이용하여 단백질의 발현을 확인함. 또한, 상층액 내의 S1-Fc를 protein A coated agarose를 이용하여 분리정제함.

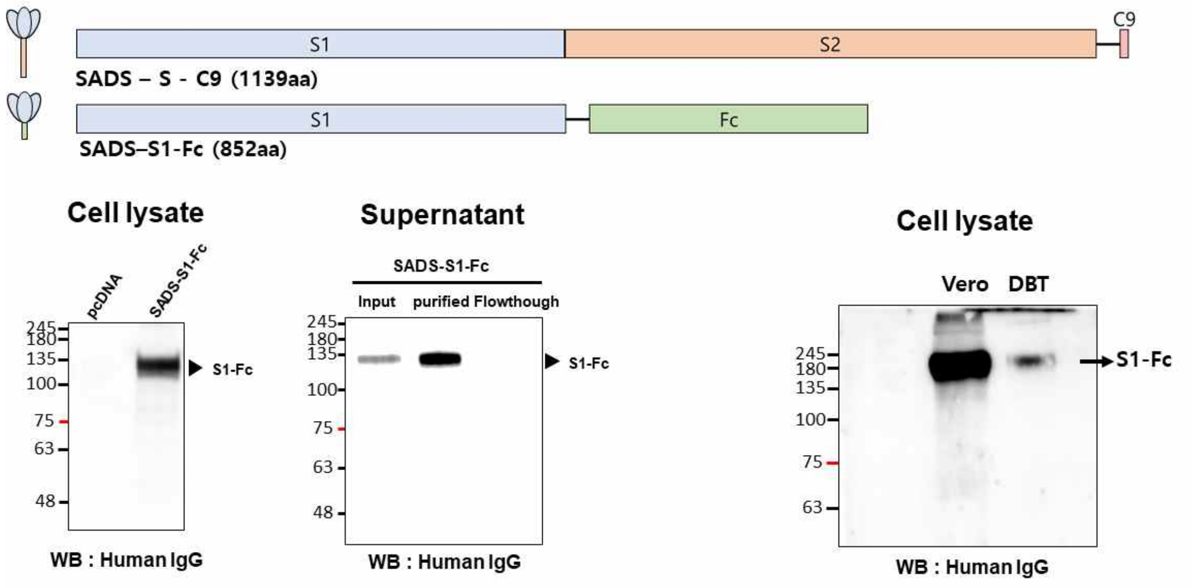


그림 16. SADS-CoV S1-Fc 발현 및 정제

- 분리 정제된 S1-Fc을 HEK293T, Vero 및 DBT 세포로부터 제조한 cell lysate와 혼합한 뒤 co-immunoprecipitation을 수행함. 그 결과 Vero, DBT 세포로부터 약 48 KDa의 단백질의 함께 precipitation되는 것을 확인함.

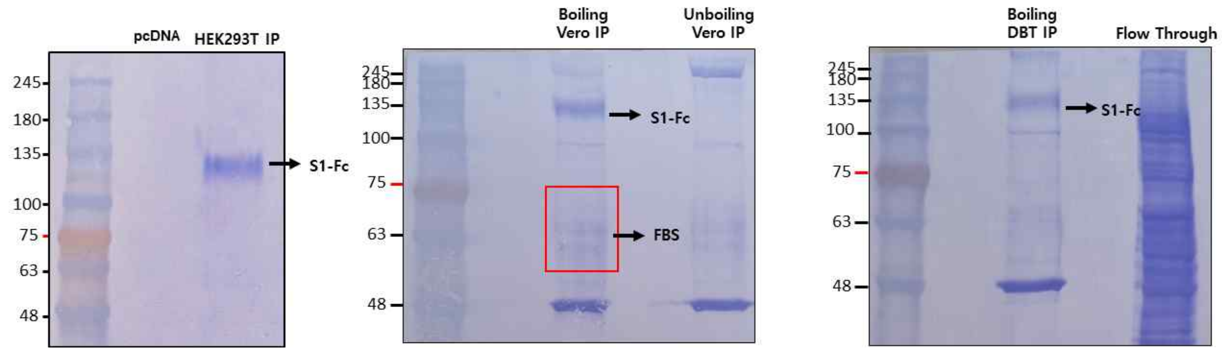


그림 17. SADS-CoV S1-Fc를 이용한 Co-IP 결과

- S1-Fc와 부착하는 세포내 단백질의 규명을 위해 N-terminal 아미노산 분석법을 이용하여 염기서열 분석을 수행함. 염기서열 분석 결과 N 말단의 염기서열은 X(S,G)-T(Y,P,L)-R(G)-K(E)-S(I)로 확인되었음. 시료 단백질이 양과 순도가 낮아 정확한 서열의 확보가 불가능했으며 추가 실험을 통해 높은 농도와 순도의 단백질을 확보하고 재분석을 실시할 예정임.

- 보다 정확한 단백질 분석을 위해 재실험을 실시 후 N 말단 염기서열 분석이 아닌 LC-MS/MS 기반의 in-gel digestion 및 protein identification을 실시함. 이를 위해 gel 샘플을 in-gel digestion 방식으로 처리하고 추출한 펩타이드를 LC-MS/MS 분석함. 단백질 검사는 Vero 샘플은 *Chlorocebus* (Uniprot392815), tb1Lu 샘플은 *Chiroptera* (uniprot9397) protein database (DB)로 Proteome Discoverer (Ver. 2.5) 프로그램에서 진행함. 그 결과, Vero 샘플은 26개 (PSMs > 5기준),Tb1Lu 샘플은 28개 (PSMs > 5기준) 단백질이 확인됨.

Accession	Description	Organism	Gene ID	Score	# PSMs	# Unique Peptides	MW [kDa]
A0A0D9R9X4	Fibronectin	Chlorocebus sabaeus	FN1	301.50	81	38	249.4
A0A0D9QYW4	Collagen type I alpha 1 chain	Chlorocebus sabaeus	COL1A1	275.20	85	14	138.9
A0A0D9RK13	Collagen type I alpha 2 chain	Chlorocebus sabaeus	COL1A2	235.95	68	13	120.0
A0A0D9R013	Keratin, type II cytoskeletal 1	Chlorocebus sabaeus	KRT1	171.38	68	18	67.4
A0A0D9S2X0	Keratin 10	Chlorocebus sabaeus	KRT10	155.93	63	14	62.6
A0A0D9R016	Keratin 2	Chlorocebus sabaeus	KRT2	117.27	47	11	65.5
A0A0D9RMD6	TIMP metallopeptidase inhibitor 1	Chlorocebus sabaeus	TIMP1	102.57	37	7	23.2
A0A0D9S2F0	Keratin 14	Chlorocebus sabaeus	KRT14	88.19	37	3	50.3
A0A0D9R1F2	Collagen type VI alpha 3 chain	Chlorocebus sabaeus	COL6A3	79.03	22	14	343.4
A0A0D9RZA6	Procollagen C-endopeptidase enhancer	Chlorocebus sabaeus	PCOLCE	78.77	20	10	55.1
A0A0D9R055	Keratin 5	Chlorocebus sabaeus	KRT5	78.45	34	11	62.6
A0A0D9S2E8	Keratin 16	Chlorocebus sabaeus	KRT16	77.60	34	2	51.5
A0A0D9S2F4	Keratin 9	Chlorocebus sabaeus	KRT9	77.23	22	10	63.4
A0A0D9R4H5	VWFA domain-containing protein	Chlorocebus sabaeus		76.73	21	8	105.5
A0A0D9R058	IF rod domain-containing protein	Chlorocebus sabaeus		68.03	29	4	60.0
A0A0D9RZ42	Periostin	Chlorocebus sabaeus	POSTN	48.04	14	9	90.0
A0A0D9QZ11	Matrix metallopeptidase 2	Chlorocebus sabaeus	MMP2	46.68	14	12	74.0
A0A0D9QZ51	Fibulin-1	Chlorocebus sabaeus	FBLN1	46.44	11	4	77.3
Q8MJJ9	Fibulin-1 (Fragment)	Chlorocebus aethiops	FBLN1	29.58	7	2	65.5
A0A0D9S8Q7	phosphopyruvate hydratase	Chlorocebus sabaeus	ENO1	26.85	7	6	47.2
A0A0D9RBM5	Nidogen 1	Chlorocebus sabaeus	NID1	21.02	7	6	136.4
A0A0D9R022	Keratin 73	Chlorocebus sabaeus	KRT73	19.41	9	2	57.0
A0A0D9RS65	IF rod domain-containing protein	Chlorocebus sabaeus		18.87	8	1	52.3
A0A0D9QZW8	Keratin 3	Chlorocebus sabaeus	KRT3	18.77	8	1	65.6
A0A0D9QUS3	Lumican	Chlorocebus sabaeus	LUM	15.70	7	3	38.4
A0A0D9R8S5	Apolipoprotein D	Chlorocebus sabaeus	APOD	14.24	6	2	21.5

그림 18. LC-MS/MS 분석결과 (Vero CCL81)

Accession	Description	Organims	Gene ID	Score	# PSMs	# Unique Peptides	MW [kD
L5L1C4	Fibronectin	Pteropus alecto	PAL_GLEAN10014460	124.57	33	5	272.2
A0A6J2LKZ4	Fibronectin	Phyllostomus discolor	FN1	99.25	25	1	249.1
A0A7J7WGJ5	Fibronectin	Myotis myotis	mMyoMyo1_005237	85.64	24	3	270.8
L5L6F6	Keratin, type II cytoskeletal 1	Pteropus alecto	PAL_GLEAN10005088	67.81	25	1	138.1
A0A8B7R1S9	Keratin, type I cytoskeletal 10	Hipposideros armiger	KRT10	64.57	26	1	61.3
A0A7J7XUI1	Fibronectin	Pipistrellus kuhlii	mPipKuh1_005150	53.08	16	1	247.6
A0A7J7YHX6	Collagen type III alpha 1 chain	Rhinolophus ferrumequinum	mRhiFer1_003162	52.06	16	6	114.0
S7N9H2	Collagen alpha-2(I) chain	Myotis brandtii	D623_10033782	44.69	15	2	126.4
A0A7J7SUV3	Keratin 10	Pipistrellus kuhlii	mPipKuh1_007343	43.70	17	1	53.9
A0A7J8FYF9	Keratin 2	Molossus molossus	HJG59_007465	40.30	14	1	66.1
A0A7J8G6Z3	Collagen type I alpha 1 chain	Rousettus aegyptiacus	HJG63_003142	38.36	14	3	138.3
A0A6J2MA44	Keratin, type I cytoskeletal 16	Phyllostomus discolor	LOC114502438	32.59	15	2	51.1
A0A8B7SPF9	Keratin, type II cytoskeletal 1	Hipposideros armiger	KRT1	29.37	11	1	67.0
A0A7J7WQG8	Keratin 2	Rhinolophus ferrumequinum	mRhiFer1_007517	28.56	11	1	68.5
A0A6P6CN86	Collagen alpha-2(I) chain	Pteropus vampyrus	COL1A2	26.49	8	3	129.3
A0A7J7U7M5	Collagen type I alpha 1 chain	Pipistrellus kuhlii	mPipKuh1_003093	25.60	10	1	138.1
A0A7J8FB03	procollagen-lysine 5-dioxygenase	Molossus molossus	HJG59_014414	25.04	6	5	83.7
A0A7J7WG57	Collagen type VI alpha 3 chain	Myotis myotis	mMyoMyo1_003158	23.23	8	3	351.5
A0A7J7ZLH2	Periostin	Pipistrellus kuhlii	mPipKuh1_013876	22.46	6	6	93.0
A0A8B7QEJ9	LOW QUALITY PROTEIN: keratin, type I cytoskeletal 19	Hipposideros armiger	KRT19	21.97	10	1	44.0
A0A7J7ZIF7	Keratin 5	Pipistrellus kuhlii	mPipKuh1_007371	20.01	8	5	64.0
A0A671DVU3	Collagen type VI alpha 1 chain	Rhinolophus ferrumequinum	COL6A1	19.01	6	1	108.3
L5L6W7	Keratin, type II cytoskeletal 6C (Fragment)	Pteropus alecto	PAL_GLEAN10005095	18.32	8	1	60.7
A0A8B7TBT8	Keratin, type I cytoskeletal 14	Hipposideros armiger	LOC109395737	17.40	8	2	52.5
A0A8B7QBY6	Collagen alpha-3(VI) chain isoform X1	Hipposideros armiger	COL6A3	17.39	6	1	343.2
A0A834AF11	Collagen type VI alpha 3 chain	Phyllostomus discolor	HJG60_003130	17.30	6	1	349.3
A0A7J7ZTZ5	Collagen type VI alpha 1 chain	Myotis myotis	mMyoMyo1_003156	16.09	6	1	108.6
A0A7J8FYC7	Keratin 6B	Molossus molossus	HJG59_007480	15.87	7	3	60.3

그림 19. LC-MS/MS 분석결과 (Tb1lu)

- 이들 단백질 중 Periostin 단백질을 대상으로 추가연구를 수행함. Periostin (POSTN, PN) osteoblast-specific factor OSF-2)라고도 알려져 있는 단백직로 알파-V/베타-3 및 알파-V/베타-5 인테그린에 대한 ligand로 기능하며 상피세포의 부착과 이동을 지원함. Gla 도메인은 비타민 K 의존인자로 알려짐. 현재까지 바이러스 감염과 관련되어 보고된 것은 전무함.
- Periostin 및 extracellular 단백질이 SADS-CoV 감염에 미치는 영향을 연구하기 위한 후속 연구를 수행할 예정임.

○ 바이러스 감염 매개 보조인자 (단백분해효소, tetraspanin 등) 규명

- SADS-CoV 바이러스 감염을 매개하는 보조인자 중 단백분해효소 규명을 위한 연구를 중점적으로 수행하였음. 1차년도에는 SADS-CoV 스파이크(S) 매개 세포-세포 융합 및 진입에서 푸린의 역할을 조사했음.
- 그 결과, SADS-CoV S 단백질이 다양한 세포의 융합을 유도한다는 것을 발견했음.

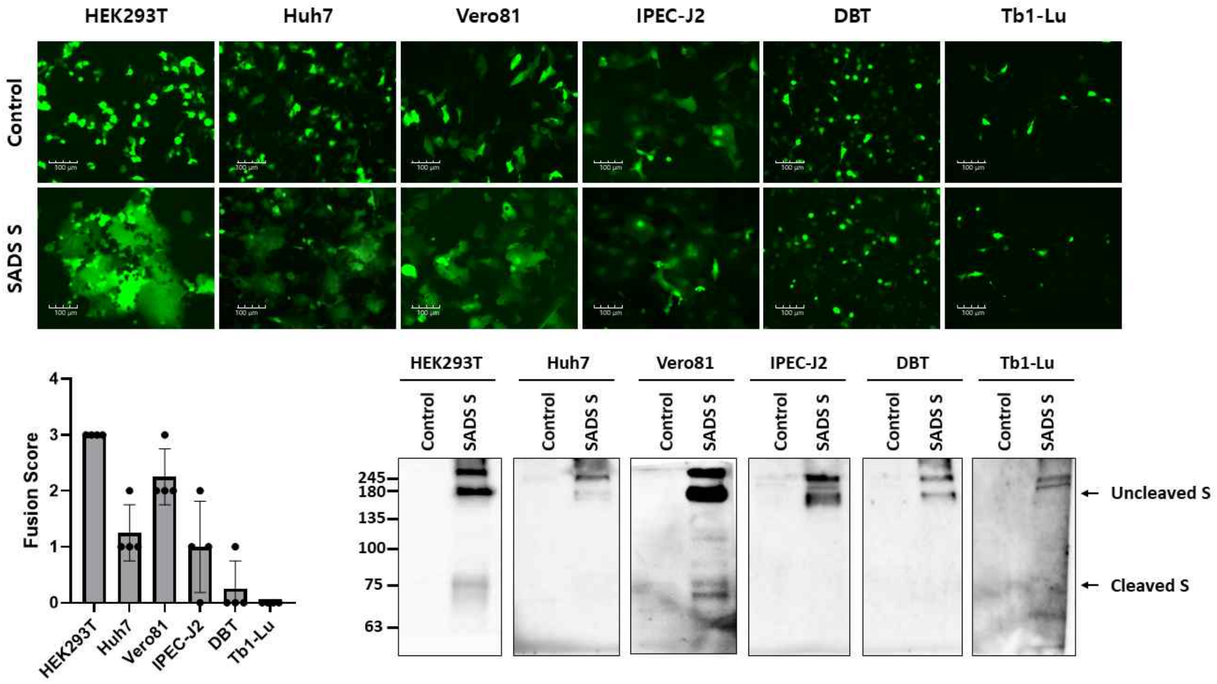


그림 20. SADS-CoV S 단백질에 의한 세포융합

- 세포-세포 융합은 proprotein convertase 억제제 dec-RVKR-cmk에 의해 억제되었고, 퓨린 절단에 내성이 있는 돌연변이 S 단백질로 형질감염된 세포 사이에서 억제되었음. 이러한 결과는 SADS-CoV S 단백질의 퓨린 유도 절단이 세포-세포 융합에 필요하다는 것을 나타냄.

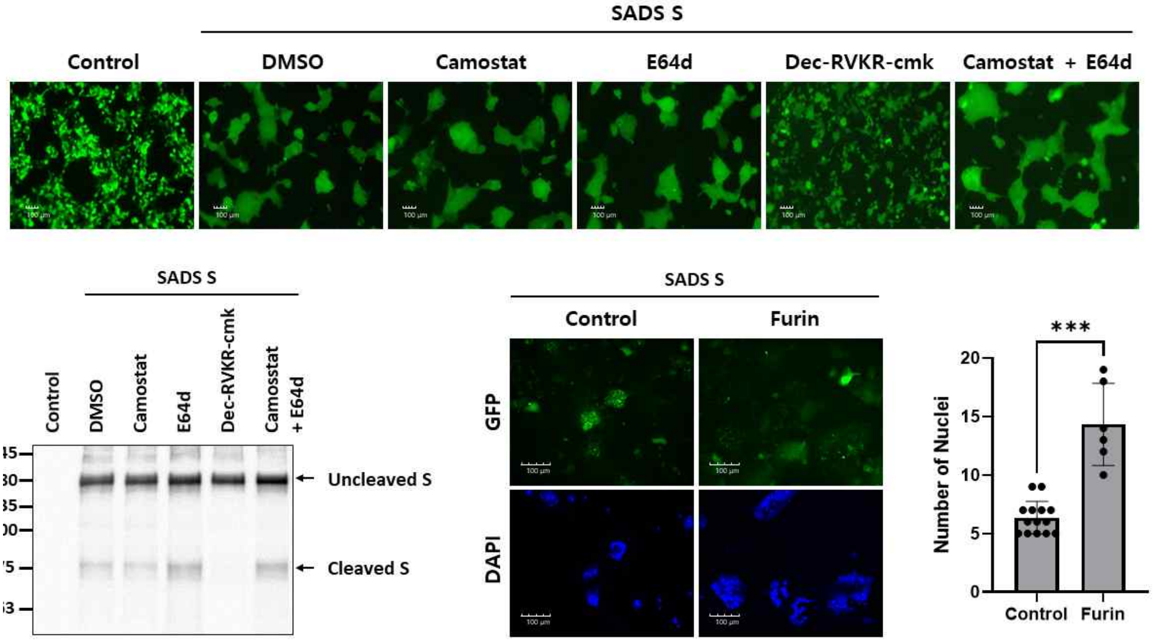


그림 21. SADS-CoV S 매개 세포융합에서의 furin의 역할

- 돌연변이 유발 분석을 사용하여 푸린이 S1/S2 절단 부위 근처의 SADS-CoV S 단백질인 446RYVR449 및 543AVRR546을 절단한다는 것을 입증했음.

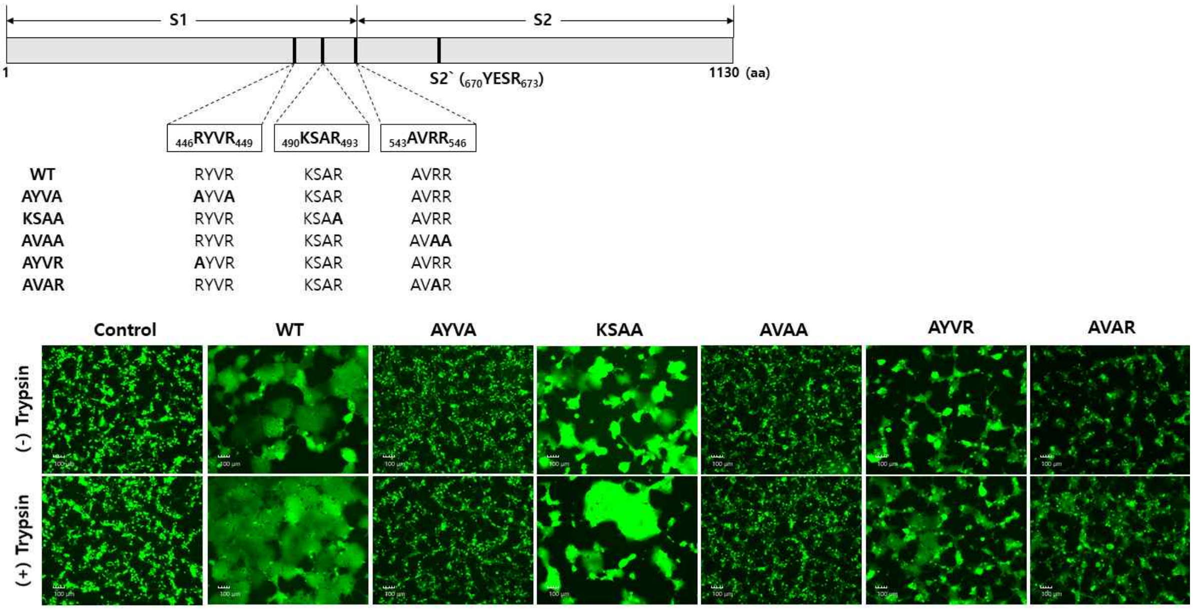


그림 22. Furin에 의한 SADS-CoV S cleavage

○ 바이러스 entry pathway 규명

- 바이러스 entry pathway를 규명하기 위해서는 SADS 슈도바이러스를 사용하였음. 슈도바이러스는 HIV 또는 VSV의 표면에 S 단백질을 발현시킨 것으로 authentic coronavirus와 동일한 바이러스 진입 메커니즘을 갖으며 바이러스 진입기전 연구, 중화항체가 측정, 백신 연구, 항바이러스제 스크리닝 등에 오랫동안 활용되어 왔음.
- SADS 슈도바이러스 제작을 위해 SADS-CoV S를 발현하는 유전자를 pCAGGS vector에 삽입하고 HEK293T 세포에서 발현을 확인함. HEK293T세포에 SADS-CoV-S를 발현하는 유전자와 HIVluc core 단백질을 발현하는 유전자를 형질전환시키고 상층액으로 방출되는 SADS 슈도바이러스의 유무를 western blot과 transduction을 통해 확인함.
- 푸린 유도 S 절단이 바이러스 진입에도 필요한지 여부를 결정하기 위해 pseudotyped 바이러스를 사용했음. 변형된 푸린 절단 부위를 가진 S 단백질을 발현하는 유사형 바이러스는 표적 세포로 형질도입될 수 있으며, 이는 푸린 유도 절단이 유사형 바이러스 진입에 필요하지 않음을 나타냄.

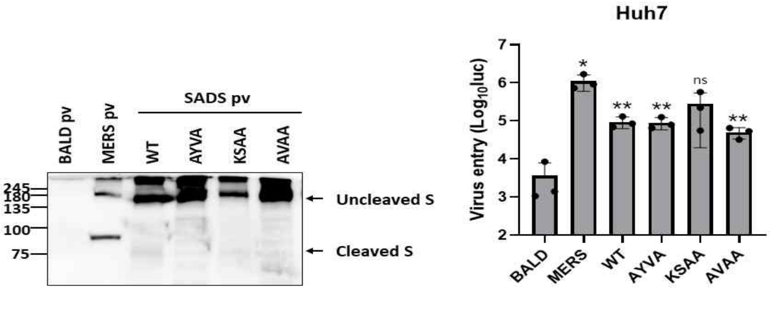


그림 23. SADS-CoV cell entry에서의 furin의 역할

- SADS-CoV의 감염경로를 규명하기 위해 SADS pseudovirus를 Vero 세포에 감염시키고, 단백분해효소 억제제 (camostat, dec-RVKR-cmk, E64d 등), endocytosis 억제제 (Bafilomycin A1, NH4Cl, Chloroquine 등), clathrin-mediated endocytosis 억제제 (chlorpromazine), caveolin-mediated endocytosis 억제제 (nystatin), dynamine inhibitor (dynasore) 등의 다양한 억제제를 처리하고 감염력에 미치는 영향을 분석함.
- 대조군인 VSV와 비교해 볼 때 E64d(또는 EST), bafilomycinA1, NH4Cl 처리하에서 유의하게 바이러스의 감염이 감소하는 것으로 보아 endosome에서 entry가 일어나는 것으로 생각됨.

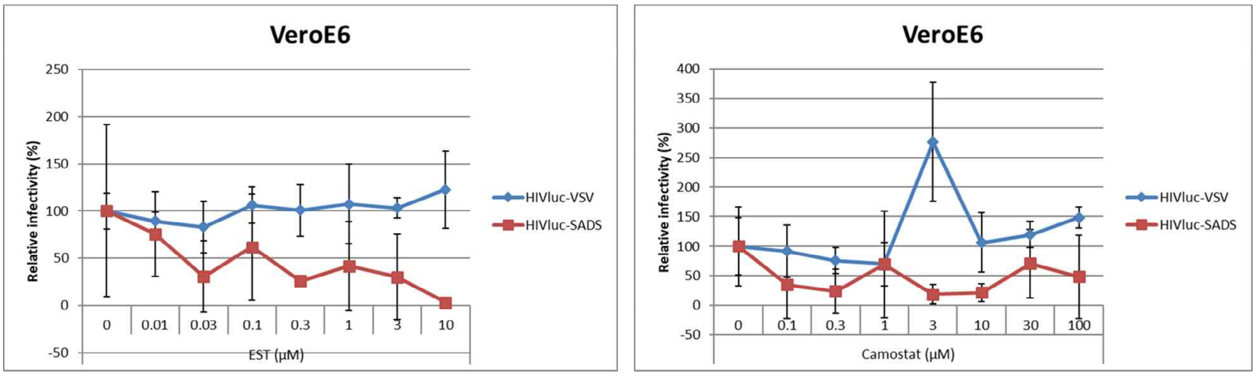


그림 24. SADS pseudovirus PI test

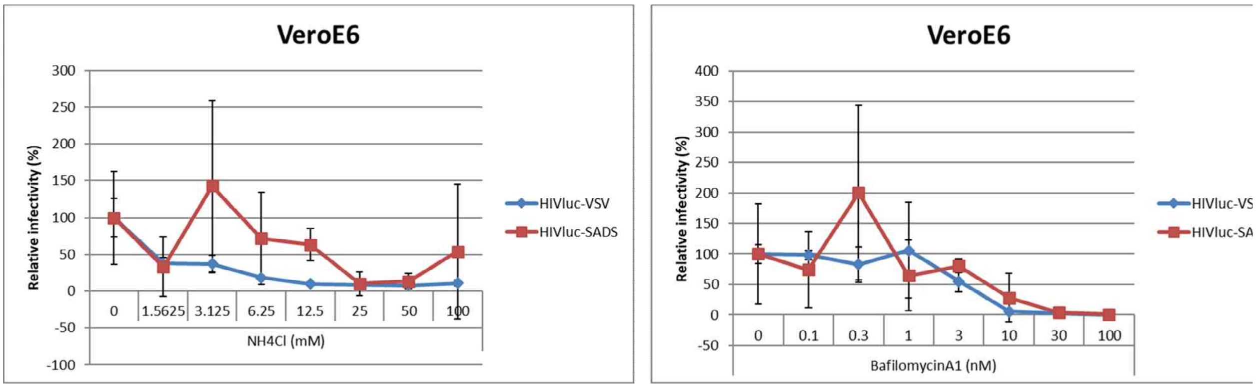


그림 25. SADS pseudovirus endocytosis 억제제 test

○ SADS-CoV를 이용한 감염기전 검증

- 감염 매개 핵심인자와 보조인자가 실제 SADS-CoV의 감염력에 미치는 영향을 평가하기 위해 SADS-CoV를 Vero 세포에 감염시키고, 단백분해효소 억제제 (camostat, dec-RVKR-cmk, E64d 등), endocytosis 억제제 (Bafilomycin A1, NH4Cl, Chloroquine 등), clathrin-mediated endocytosis 억제제 (chlorpromazine), caveolin-mediated endocytosis 억제제 (nystatin), dynamine inhibitor (dynasore) 등의 다양한 억제제를 처리하고 감염력에 미치는 영향을 분석함.

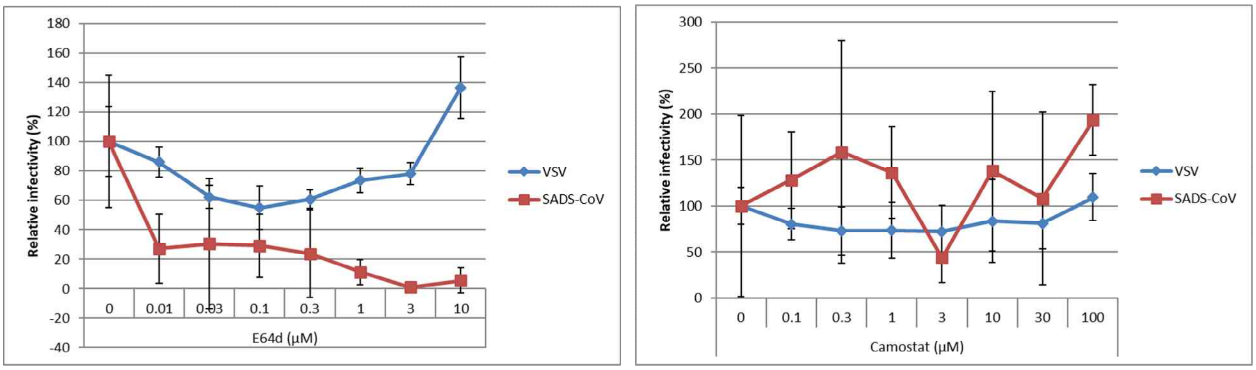


그림 26. SADS PI test

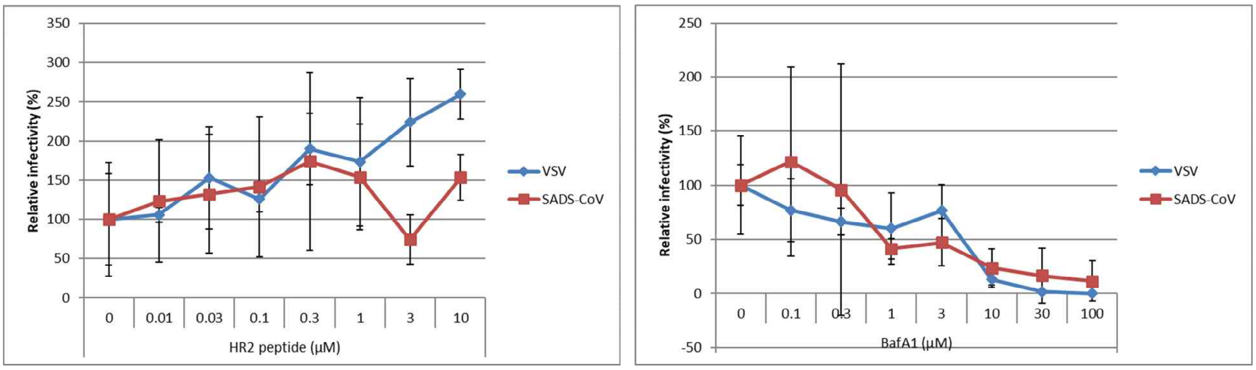


그림 27. SADS endocytosis 억제제 test

□ 바이러스 감염 매개 인자 규명

○ 사람 및 동물 수용체와의 바이러스 친화도 및 감염성 평가

- Periostin의 종간 유전자적 상동성을 분석한 결과, 돼지의 periostin은 사람, 원숭이, 쥐의 periostin과 84~92%의 높은 상동성을 나타냄.

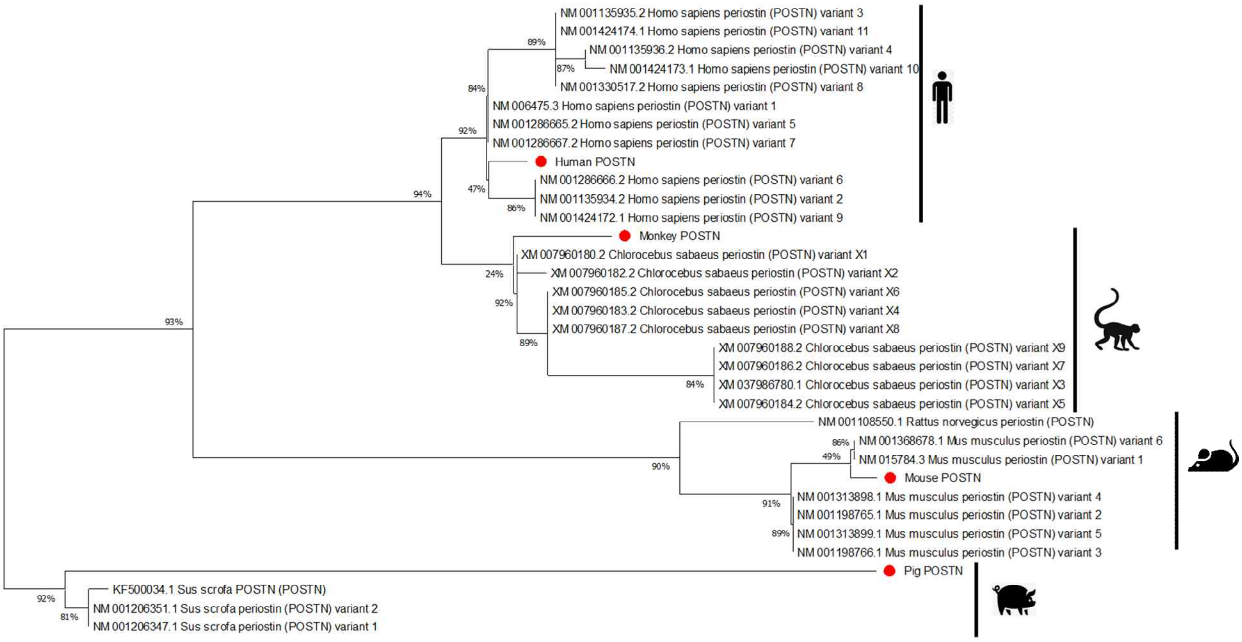


그림 28 Phylogenetic analysis of periostin from different hosts

Table: The percentage of axit amin & nucleotide based on Periostin protein (POSTN) in Homology								
#	Sequence	Accession	Length (bp)	The percentage of axit amin				
				1	2	3	4	5
1	Green monkey	XM_007960180.2	2511		98%	86%	95%	92%
2	Homo sapiens	NM_006475.3	2511	97%		87%	95%	93%
3	House mouse	NM_015784.3	2436	82%	82%		88%	86%
4	Wild boar domesticus	NM_001206347.1	2511	92%	92%	84%		94%
5	Molossus molossus	XM_036249896.1	2811	84%	85%	79%	86%	
				The percentage of nucleotide				

그림 29 Periostin 염기서열 및 아미노산 서열 homology

- 다양한 동물의 periostin 단백질을 pCAGGS에 클로닝하고 SADS-CoV S와의 Co-IP를 실시함. 그 결과, 돼지 Periostin과 가장 높은 결합력을 보였으며 다음으로 human periostin이 높은 결합력을 나타냄. 마우스와 박쥐의 periostin은 비교적 낮은 결합력을 나타냈음. 이러한 결과는 염기서열 유사도 분석과 일치하며 SADS-CoV의 사람으로의 가능성을 시사함.

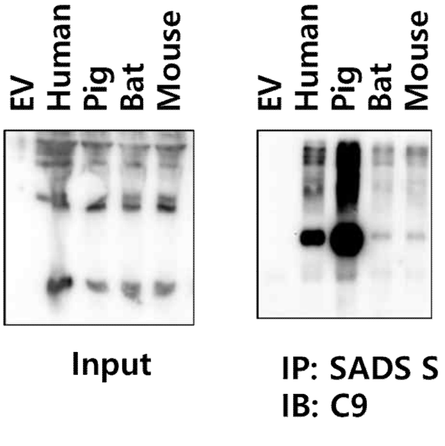


그림 30 Periostin Co-IP 결과

- Periostin을 세포에 과발현한 뒤 슈도바이러스를 감염시킨 후 바이러스의 감염력을 측정함.

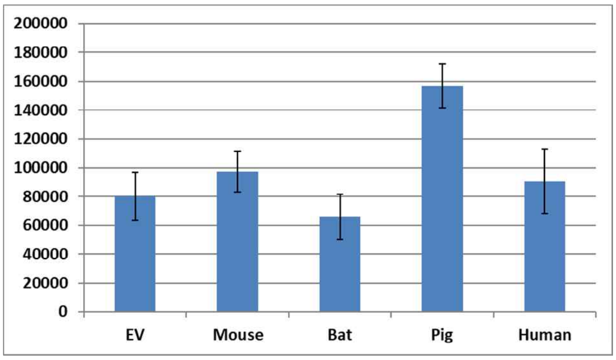


그림 31 Periostin 발현 세포에서의 바이러스 감염력

○ 감염매개인자 발현율 분석

- 주요 세포에서의 감염 매개 핵심인자와 보조인자의 발현율을 real-time PCR을 이용하여 분석함.

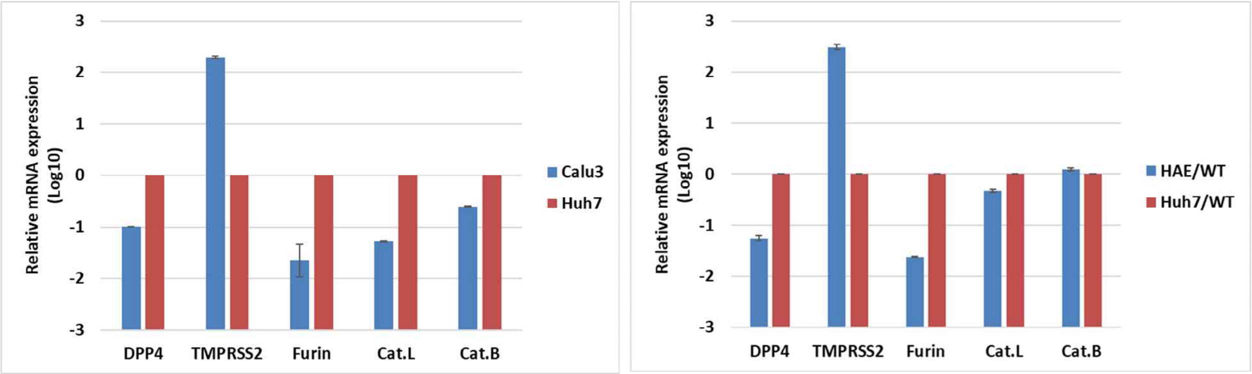


그림 32 인간 폐 유래 세포에서의 감염매개인자 발현율 분석

○ 인간 폐 오가노이드에서의 바이러스 감염성 분석

- SADS-CoV와 관련된 동물 감염 위험을 평가하기 위해 NP69 (Human Nasopharyngeal Epithelial Cell Line) 및 BEAS-2B (Human Bronchial Epithelial Cell Line) 세포를 표시된 MOI에서 SADS-CoV에 감염시켰음. 놀랍게도 우리는 NP69 및 BEAS-2B 세포에 대한 SADS-CoV의 감수성이 상당히 높은 것을 관찰함. 또한, SADS-CoV 감염은 강력한 세포변성 효과(CPE)를 시작하고 바이러스 복제뿐만 아니라 Hela 세포의 선천적 신호 및 염증 요인을 검출하게 되었음. 이러한 발견은 SADS-CoV가 잠재적으로 종의 장벽을 넘어 인간을 감염시킬 수 있는 동물감염 위험을 가질 수 있음을 시사함.

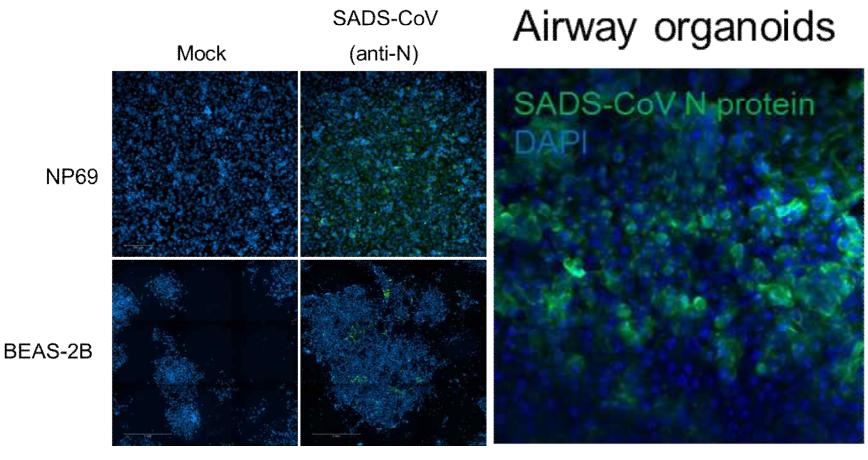


그림 33 인간 폐 유래 세포에서의 SADS-CoV 감염력 평가

- SADS-CoV의 인수공통감염성을 추가로 검증하기 위해 세 명의 서로 다른 건강한 기증자의 조직 샘플을 사용하여 인간 폐 오가노이드를 제작함.

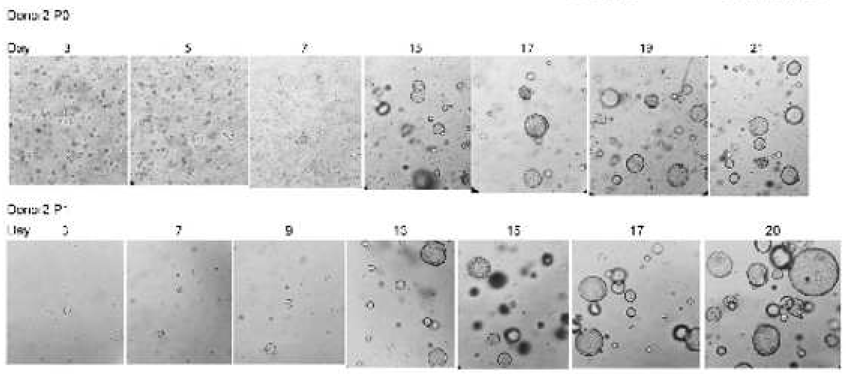


그림 34 Human lung 오가노이드 제작

- 인간 폐 오가노이드를 SADS-CoV 균주와 0.5 MOI, 37℃에서 1시간 동안 배양한 후 DPBS로 2회 세척한 후 신선한 배지에서 배양함. 감염 3일 후, 오가노이드를 4% 파라포름알데히드로 30분간 고정함. 특정 항체(항-SADS-CoV-N 단백질)를 사용한 공초점 현미경 분석에서 양성 N 단백질 신호(녹색)를 관찰함.
- 종합적으로, 우리의 평가는 SADS-CoV가 인간 세포와 폐 오가노이드를 감염시킬 수 있다는 것을 입증했으며, 이는 SADS-CoV와 관련된 잠재적인 동물감염 위험을 나타냄.

○ Mouse-adapted SADS-CoV 제작

- 병원성 메커니즘 연구를 위해 SADS-CoV의 마우스 적응 균주를 생성하기 위해 SADS-CoV WT 균주를 4~6주령 BALB/c 및 STAT1 KO 마우스에 비강 내 접종 및 복강 내 주사를 통해 연속적으로 계대배양함. 비강내 접종 그룹의 주둥이 및 폐 조직과 복강내 주사 그룹의 장 조직을 접종 3일 후 바이러스 RNA 로드 분석을 위해 수집함.

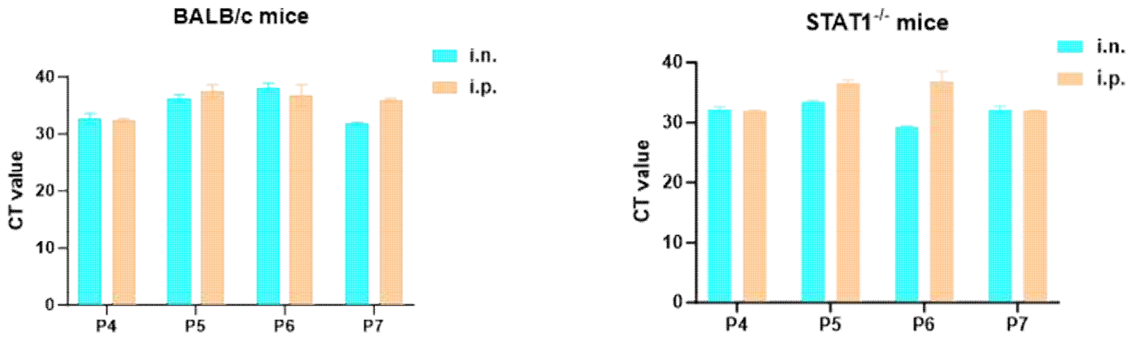


그림 35 Mouse-adapted SADS-CoV 감염능 (real-time PCR)

□ Real-time PCR 기반 단일 및 다중 진단법 확립

○ SADS-CoV, PEDV, PDCoV 타겟 유전자 선정

- SADS-CoV, PEDV, PDCoV 유전자 정보는 미국 국립생물공학정보센터 (NCBI, National Center for Biotechnology Information, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)에서 다운 받았음. Multiple Sequence Alignment 프로그램을 사용하여 유전자적 상동성을 분석함. 기존 문헌 및 유전자 상동성 분석을 바탕으로 타겟 유전자를 선정함.
- PEDV, PDCoV, SADS-CoV는 각각 ORF1, membrane, nucleocapsid 단백질을 코딩하는 유전자를 타겟 유전자로 선정함.

○ 타겟 유전자 합성 및 표준시료(플라스미드) 제작

- SADS-CoV, PEDV, PDCoV의 선정된 유전자를 pUC57 vector에 클로닝하여 유전자를 합성함.
- SADS-CoV, PEDV, PDCoV의 선정된 유전자를 *in vitro* transcription mRNA를 합성하여 검사법 평가를 위한 template로 사용함.
- PEDV, PDCoV는 주관기관에서 viral RNA 형태로 제공받음.

○ 프라이머 및 프로브 제작

- 선별된 유전자로부터 프라이머, 프로브 디자인을 수행하였고, 길이는 19~30 bp, Tm 값은 60~68℃, GC content는 40~60%가 되도록 고려하여 SADS-CoV, PEDV 및 PDCoV의 각 타겟에 대한 2종의 후보 프라이머 및 프로브를 디자인함.
- 후보 프라이머 및 프로브를 이용하여 Real-time PCR을 수행하고 Ct (Threshold cycle)값 등을 고려하여 최적의 프라이머 및 프로브를 선별함.
- Inclusivity 검증
  - 단일 및 다중 검출을 위해 사용하는 각 Target gene에 대한 primer와 probe 서열의 포괄도(Inclusivity)를 확인하기 위해 NCBI GenBank database를 활용하여 SADS-CoV, PDCoV 및 PEDV의 complete genome에 대한 *In-silico* analysis를 진행함. 각 Target genome의 reference sequence를 포함한 보고된 여러 whole genome sequence에 대해 BLASTn 분석한 결과 100% 일치함을 확인.

그림 36. SADS-CoV의 PCR amplicon에 대한 BLASTn 결과 (Primer and probe sequences are highlighted in yellow)

Porcine epidemic diarrhea virus isolate CV777 genome assembly, complete genome: monopartite

Sequence ID: LT906620.1 Length: 28017 Number of Matches: 1

Range 1: 3014 to 3145 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
239 bits(264)	8e-59	132/132(100%)	0/132(0%)	Plus/Plus

```
Query  1     CCAGTTTATAAGGTCTCCCTTGAATTTGAGTTCGAGTCTGAGACTATTATGGCTGTGCTT  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3014  CCAGTTTATAAGGTCTCCCTTGAATTTGAGTTCGAGTCTGAGACTATTATGGCTGTGCTT  3073

Query  61    AATAAGGCTGTTGGTAATCGTATCAAGGTTACAGGTGGTTGGGATGATGTCGTTGAGTAT  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3074  AATAAGGCTGTTGGTAATCGTATCAAGGTTACAGGTGGTTGGGATGATGTCGTTGAGTAT  3133

Query  121   ATTAACGTTGCC  132
             ||||||||||||
Sbjct  3134  ATTAACGTTGCC  3145
```

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☑	Porcine epidemic diarrhea virus isolate CV777 genome assembly, complete genome: monopartite	Porcine epidemi...	239	239	100%	8e-59	100.00%	28017	LT906620.1
☑	Porcine epidemic diarrhea virus isolate Br1_87 genome assembly, complete genome: monopartite	Porcine epidemi...	239	239	100%	8e-59	100.00%	28061	LT906582.1
☑	Porcine epidemic diarrhea virus isolate CV777 genome assembly, complete genome: monopartite	Porcine epidemi...	239	239	100%	8e-59	100.00%	27969	LT906581.1
☑	Porcine epidemic diarrhea virus isolate CV777 genome assembly, complete genome: monopartite	Porcine epidemi...	239	239	100%	8e-59	100.00%	27945	LT905451.1
☑	Porcine epidemic diarrhea virus isolate CV777 genome assembly, complete genome: monopartite	Porcine epidemi...	239	239	100%	8e-59	100.00%	28026	LT905450.1
☑	Porcine epidemic diarrhea virus isolate PEDV_GER_L00901-V215_1978 genome assembly, complete genome...	Porcine epidemi...	239	239	100%	8e-59	100.00%	27998	LT897799.1
☑	Porcine epidemic diarrhea virus strain 85-7-mutant1, complete genome	Porcine epidemi...	239	239	100%	8e-59	100.00%	27988	KX839247.1
☑	Porcine epidemic diarrhea virus strain 85-7-mutant5, complete genome	Porcine epidemi...	239	239	100%	8e-59	100.00%	27990	KX839251.1
☑	Porcine epidemic diarrhea virus strain 85-7-mutant4, complete genome	Porcine epidemi...	239	239	100%	8e-59	100.00%	27860	KX839250.1
☑	Porcine epidemic diarrhea virus strain 85-7-mutant3, complete genome	Porcine epidemi...	239	239	100%	8e-59	100.00%	28000	KX839249.1
☑	Porcine epidemic diarrhea virus strain 85-7-mutant2, complete genome	Porcine epidemi...	239	239	100%	8e-59	100.00%	27533	KX839248.1
☑	Porcine epidemic diarrhea virus strain 85-7, complete genome	Porcine epidemi...	239	239	100%	8e-59	100.00%	28015	KX839246.1
☑	Porcine epidemic diarrhea virus strain 85-7-C40, complete genome	Porcine epidemi...	239	239	100%	8e-59	100.00%	28000	KY486714.1
☑	Porcine epidemic diarrhea virus strain 85-7-A40, complete genome	Porcine epidemi...	239	239	100%	8e-59	100.00%	27988	KY486713.1
☑	Porcine epidemic diarrhea virus isolate ZJU/G1/2013, complete genome	Porcine epidemi...	239	239	100%	8e-59	100.00%	27994	KU664503.1
☑	Porcine epidemic diarrhea virus clone EAS1, complete genome	Porcine epidemi...	239	239	100%	8e-59	100.00%	28033	KR610991.1
☑	Porcine epidemic diarrhea virus genomic RNA, complete genome, isolate: AVCT12	Porcine epidemi...	239	239	100%	8e-59	100.00%	27991	LC053455.1
☑	Porcine epidemic diarrhea virus isolate CHM2013, complete genome	Porcine epidemi...	239	239	100%	8e-59	100.00%	27994	KM887144.1
☑	Porcine epidemic diarrhea virus isolate SM98, complete genome	Porcine epidemi...	239	239	100%	8e-59	100.00%	27994	GU937797.1
☑	Porcine epidemic diarrhea virus strain CV777, complete genome	Porcine epidemi...	239	239	100%	8e-59	100.00%	28033	AF353511.1

그림 37. PEDV의 PCR amplicon에 대한 BLASTn 결과 (Primer and probe sequences are highlighted in yellow)

Porcine deltacoronavirus strain CH/JXJGS01/P50, complete genome

Sequence ID: MH025764.1 Length: 25438 Number of Matches: 1

Range 1: 23200 to 23362 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
295 bits(326)	2e-75	163/163(100%)	0/163(0%)	Plus/Plus

```
Query  1      ATTTGGACCGCAGTTGACAGATCATCTAAGAAGGACGCAGTTTTCATTGTGTCCATAATT  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  23200  ATTTGGACCGCAGTTGACAGATCATCTAAGAAGGACGCAGTTTTCATTGTGTCCATAATT  23259

Query  61     TTTGCCGTACTGACCTTCATATCCTGGGCCAAGTACTGGTATGACTCAATTCGTTTATTA  120
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  23260  TTTGCCGTACTGACCTTCATATCCTGGGCCAAGTACTGGTATGACTCAATTCGTTTATTA  23319

Query  121    ATGAAAACCAGATCTGCATGGGCACTCTCACCTGAGAGTAGAC  163
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  23320  ATGAAAACCAGATCTGCATGGGCACTCTCACCTGAGAGTAGAC  23362
```

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☑	Porcine deltacoronavirus strain CH/JXJGS01/P50, complete genome	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	25438	MH025764.1
☑	Porcine deltacoronavirus strain CH/JXJGS01/P20, complete genome	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	25438	MH025763.1
☑	Porcine deltacoronavirus strain CH/JXJGS01/P7, complete genome	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	25438	MH025762.1
☑	Porcine deltacoronavirus isolate CHN/Sichuan/2019, complete genome	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	25380	MK993519.1
☑	Porcine deltacoronavirus strain CHN/Sichuan/2018, complete genome	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	25413	MK330605.1
☑	Porcine deltacoronavirus strain Swine/CHN/SC/2018/1, complete genome	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	25414	MK005882.1
☑	Porcine deltacoronavirus strain CH-01, complete genome	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	25404	KX443143.2
☑	Porcine deltacoronavirus isolate CH/JXJGS02/2016, complete genome	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	25438	KY293678.1
☑	Porcine deltacoronavirus strain CH/Jiangsu/2014, complete genome	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	25422	KY513725.1
☑	Porcine deltacoronavirus isolate CHN-GD16-05, complete genome	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	25403	KY363868.1
☑	Porcine deltacoronavirus strain HB-BD, complete sequence	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	25423	MF948005.1
☑	Porcine deltacoronavirus strain GD, complete genome	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	25420	MF431742.1
☑	Porcine deltacoronavirus isolate CH/JXJGS01/2016, complete genome	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	25438	KY293677.1
☑	Porcine deltacoronavirus isolate HB-BD membrane protein (M) gene, complete cds	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	654	KY129985.1
☑	Porcine deltacoronavirus strain NH isolate passage 10, complete genome	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	25420	KU981062.1
☑	Porcine deltacoronavirus strain NH isolate passage 5, complete genome	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	25420	KU981061.1
☑	Porcine deltacoronavirus strain NH, complete genome	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	25420	KU981059.1
☑	Porcine deltacoronavirus strain NH envelope protein (E) and membrane protein (M) genes, complete cds	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	1062	KU517165.1
☑	Porcine deltacoronavirus isolate HLJ-FY-2015 membrane protein gene, complete cds	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	654	KT313675.1
☑	Porcine deltacoronavirus isolate CHN-HN-2014, complete genome	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	25420	KT336560.1
☑	Porcine deltacoronavirus isolate CHN-AH-2004, complete genome	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	25420	KP757890.1
☑	Porcine deltacoronavirus isolate CHN-SF-2018, complete genome	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	25389	ON494594.1
☑	Porcine deltacoronavirus strain CHN-TS1-2019, complete genome	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	25420	MT663769.1
☑	Porcine deltacoronavirus isolate CH-HLJ-20, complete genome	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	25403	MZ802955.1
☑	Porcine deltacoronavirus isolate CH/JXJGS01/2016, complete genome	Porcine deltacor...	295	295	100%	2e-75	100.00%	25447	MK625640.1

그림 38. PDCoV의 PCR amplicon에 대한 BLASTn 결과 (Primer and probe sequences are highlighted in yellow)

- Exclusivity 확인
  - 본 연구의 개발에 사용하는 SADS-CoV와 PDCoV 및 PEDV의 primer와 probe 서열이 각각의 target 외의 설사 감염을 유발하는 유사한 다른 병원균에 대한 배척도(Exclusivity)를 확인하였음. BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/)를 이용하였으며 방법 및 입력한 parameter는 하단에 기입함.

① Enter Query Sequence: 분석할 Primer 또는 Probe를 입력한다.
② Choose Search Set: Organism에 분석할 Pathogen의 Taxonomy ID를 입력한다.
③ Program Selection: Somewhat similar sequences (blastn)을 선택한다.
④ General Parameters
A. Max target sequences를 5000으로 선택한다.
B. Expect threshold를 1000으로 설정한다.
C. Word size를 7로 설정한다.
D. Max matches in a query range를 1로 설정한다.
⑤ Scoring Parameters
A. Match/Mismatch Scores를 1, -3으로 설정한다.
B. Gap Costs를 Existence: 5 Extension 2로 설정한다.
⑥ Filters and Masking: Low complexity regions, Mask for lookup table only를 선택한다.

  - BlastN을 이용하여 Exclusivity를 확인을 위해 query coverage 값과 identity 값을 곱하여 % homology 값을 구하였고 그 결과는 아래와 같음. 40% 미만의 identity는 homology가 없는 것으로 판정하여 ‘/ = no alignment found’로 표기하였다.

표 1. SADS-CoV In-silico analysis 결과

Target	Taxonomy ID	Primer_F	Probe	Primer_R
Porcine epidemic diarrhea virus(PEDV)	**28295**	**100%**	**100%**	**100%**
Swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV)	2032731	45%	/	41%
Deltacoronavirus (PDCoV)	1477414	45%	43%	41%
Swine enteric coronavirus (SECoV)	1766554	41%	/	45%
Porcine transmissible gastroenteritis virus(TGEV)	11149	50%	/	50%

표 2. PDCoV In-silico analysis 결과

Target	Taxonomy ID	Primer_F	Probe	Primer_R
Deltacoronavirus (PDCoV)	**1477414**	**100%**	**100%**	**100%**
Swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV)	2032731	41%	/	43%
Porcine epidemic diarrhea virus(PEDV)	28295	50%	57%	42%
Swine enteric coronavirus (SECoV)	1766554	41%	/	52%
Porcine transmissible gastroenteritis virus(TGEV)	11149	55%	/	52%

표 3. PEDV In-silico analysis 결과

Target	Taxonomy ID	Primer_F	Probe	Primer_R
Swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV)	**2032731**	**100%**	**100%**	**100%**
Deltacoronavirus (PDCoV)	1477414	47%	/	45%
Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)	28295	52%	41%	50%
Swine enteric coronavirus (SECoV)	1766554	57%	/	50%
Porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV)	11149	57%	/	50%

○ Real-time PCR 반응조건 확립

- 단일 진단법 Real-time PCR

1) Real-time PCR을 위한 PCR 반응액 조성 및 반응 조건

• Real-time PCR의 반응액에는 SADS-CoV 특이 프라이머쌍, 프로브, 2X Master mix buffer, template를 혼합하여 총 volume이 20 μL가 되도록 한 후, real-time PCR의 96 well plate에 반응액을 넣어 PCR을 수행함. real-time PCR 조건은 아래와 같으며, 진단 키트 개발을 위해 모든 시험은 동일한 조성 및 조건으로 수행함. 장비는 CFX96™ Real-Time PCR Detection System을 사용함.

표 4. Real-time PCR 반응액 조성

성분	1회 분량
2X Master mix buffer	10 μL
Primer, Probe mix	5 μL
Template	5 μL
Total	20 μL

표 5. Real-time PCR 반응 조건

PCR step	Temp.(℃)	Time	Cycles
Reverse Transcription	50	20 min	1
Pre-Heating	95	5 min	1
Amplification	95	15 sec	40
	58 *	1 min	
	* Fluorescence detection		

2) Real-time PCR을 이용한 standard curve 확인

• Standard curve는 SADS-CoV IVT mRNA 1000 copies/μL를 10배 단위로 단계적 희석하여 Real-time PCR 반응액과 혼합한 다음 3반복 수행하였고, standard curve의 slope 값이 -3.1~-3.7, R^2 값은 0.98~1, efficiency 80~120%로 모두 범위 안에 들어오는지 확인함.

3) 분석적민감도(최소검출한계)

• 단일 진단법의 분석적 민감도를 평가하기 위해 IC plasmid DNA에 SADS-CoV IVT mRNA를 10 copies/μL, 5 copies/μL, 2.5 copies/μL, 1 copies/μL, 0.5 copies/μL 농도로 혼합하여 각각 7반복 시험하고, SADS-CoV가 95% 이상 검출 가능한 농도를 선정함. Confirmatory LoD test는 Pre-liminary LoD test에서 선정된 농도가 95% 검출 가능한 농도임을 25회 반복 시험을 통해 재확인하고 최소 검출한계를 결정함.

- 다중 진단법 Real-time PCR

1) Real-time PCR을 위한 PCR 반응액 조성 및 반응 조건

• Real-time PCR의 반응액에는 SADS-CoV 특이 프라이머쌍 및 프로브, PEDV 특이 프라이머쌍 및 프로브, PDCoV 특이 프라이머 쌍 및 프로브와 2X Master mix buffer, template를 혼합하여 총 volume이 20 μL가 되도록 한 후 real-time PCR의 96 well plate에 반응액을 넣어 PCR을 수행함. real-time PCR 조건은 단일 진단법 조건과 동일하며, 진단키트 개발을 위해 모든 시험은 동일한 조성 및 조건으로 수행함. 장비는 CFX96™ Real-Time PCR Detection System을 사용함.

2) Real-time PCR을 이용한 standard curve 확인

• Standard curve는 PDCoV, PEDV IVT mRNA 1000 copies/μL를 10배 단위로 단계적 희석하여 Real-time PCR 반응액과 혼합한 다음 3반복 수행하였고, standard curve의 slope 값이 -3.1~-3.7, R^2 값은 0.98~1, efficiency 80~120%로 모두 범위 안에 들어오는지 확인함.

3) 검체 증폭 확인 테스트

• 주관기관에서 viral RNA 형태로 제공받은 PEDV, PDCoV 검체를 앞서 최적화된 Real-time PCR을 이용하여 개발된 Primer, Probe set의 성능을 테스트 확인함. Ct값이 40 이내로 검출 될 경우 양성으로 판단하였음.

4) 분석적민감도(최소검출한계)

- 다중 진단법의 분석적 민감도를 평가하기 위해 IC plasmid DNA에 SADS-CoV IVT mRNA, PEDV IVT mRNA, PDCoV IVT mRNA를 10 copies/μL, 5 copies/μL, 2.5 copies/μL, 1 copies/μL, 0.5 copies/μL 농도로 혼합하여 각각 7반복 시험하고, SADS-CoV, PEDV 및 PDCoV 모두 95% 이상 검출 가능한 농도를 선정함. Confirmatory LoD test는 Pre-liminary LoD test에서 선정된 농도가 95% 검출 가능한 농도임을 20회 반복 시험을 통해 재확인하고 최소검출한계(Limit of Detection, LoD)를 결정함.

- 프라이머/프로브 제작 및 최적화 결과

- BLAST로 확인된 최종 유전자로부터 프라이머, 프로브는 길이, Tm, GC content 등을 고려하여 최적의 프라이머, 프로브를 개발함. 증폭산물의 200 bp 이내가 되도록 디자인하여 증폭 효율을 높임.
- PEDV, PDCoV 및 SADS-CoV의 동시 감별을 위하여 리포터는 각각 FAM, VIC 및 SFC610 순으로 프로브에 결합시킴. 개발된 특이 프라이머 및 프로브는 다음과 같음.

표 6. 단일 진단법 프라이머 및 프로브 정보

Target	Name	Sequence(5'→3')	Size(bp)
SADS-CoV	SADS-CoV-F	CAG TCT CGT TCT CGC AAT C	131
	SADS-CoV-R	CTC AGA CAC CTC GTG CTC AAC AGC	
	SADS-CoV-P	CTA GAA GCT ATG CCC AAG TC	

표 7. 다중 진단법 프라이머 및 프로브 정보

Target	Name	Sequence(5'→3')	Size(bp)
PEDV	PEDV-F	CCA GTT TAT AAG GTC TCC CTT G	132
	PEDV-R	AGG CTG TTG GTA ATC GTA TCA AGG TTA CAG	
	PEDV-P	GGC AAC GTT AAT ATA CTC AAC G	
PDCoV	PDCoV-F	ATT TGG ACC GCA GTT GAC	163
	PDCoV-R	CGT ACT GAC CTT CAT ATC CTG GGC CAA G	
	PDCoV-P	GTC TAC TCT CAG GTG AGA GTG	
SADS-CoV	SADS-CoV-F	CAG TCT CGT TCT CGC AAT C	131
	SADS-CoV-R	CTC AGA CAC CTC GTG CTC AAC AGC	
	SADS-CoV-P	CTA GAA GCT ATG CCC AAG TC	

- 단일 진단법 Real-time PCR 결과

1) Standard curve 확인 결과 : SADS-CoV IVT mRNA 1000 copies/μL를 10배 단위로 단계적 희석하여 Real-time PCR을 실험한 결과 standard curve R^2 값, slope, efficiency는 각각 0.995, -3.289, 101.4%로 나타남.

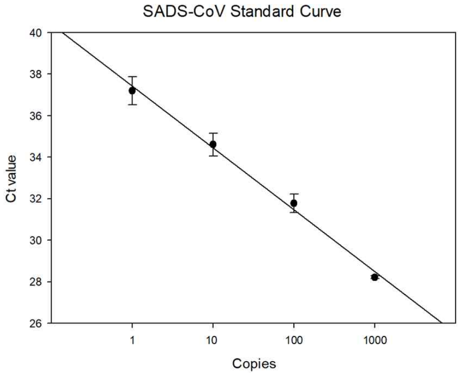


그림 39. SADS-CoV Standard Curve

2) 분석적 민감도(최소검출한계) : 분석적 민감도를 평가한 결과 SADS-CoV가 95% 이상 검출된 최소 농도는 5 copies/μL로 선정됨.

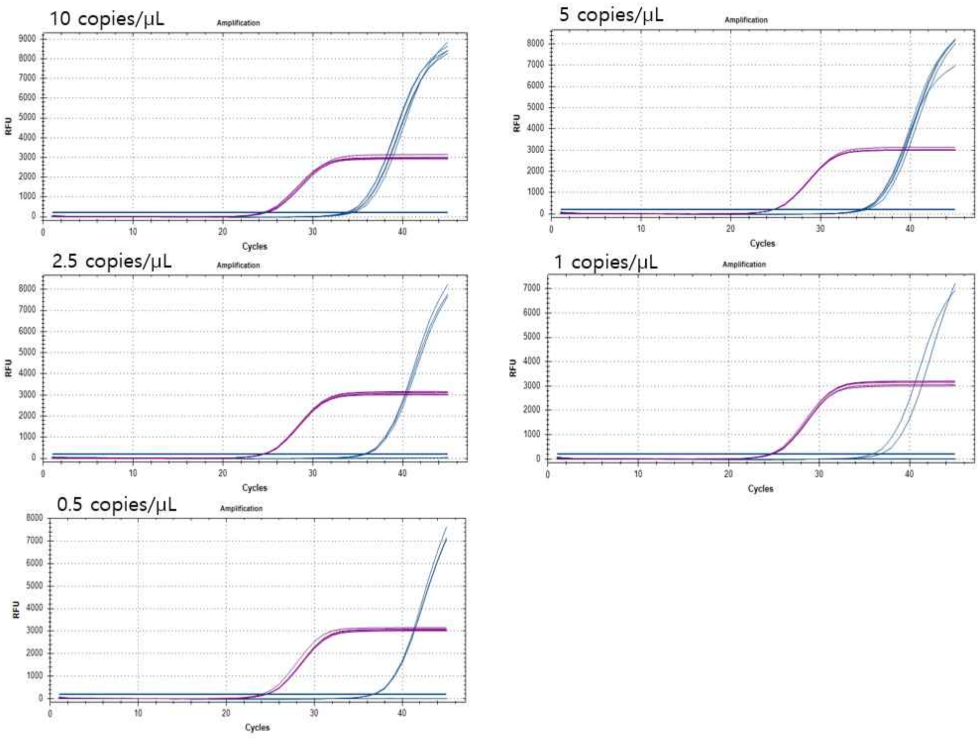


그림 40. SADS-CoV Pre-liminary LoD test 결과

표 8. SADS-CoV Pre-liminary LoD test 결과

Copies/μL		10	5	2.5	1	0.5
SADS-CoV	1	33.93	35.18	35.66	35.79	N/A
	2	34.89	34.51	N/A	N/A	36.75
	3	34.01	34.69	35.91	36.63	N/A
	4	33.5	34.4	35.59	N/A	36.72
	5	34.64	34.45	N/A	N/A	36.63
평균		34.19	34.65	35.72	36.21	36.70
표준편차		0.56	0.32	0.17	0.59	0.06
CV%		1.65	0.92	0.47	1.64	0.17
검출률%		100	100	60	40	60

- Confirmatory LoD test를 진행한 결과 5 copies/μL, 20 반복해서 SADS-CoV가 100% 검출됨을 확인함. 따라서 단일 진단법의 분석적 민감도(최소검출한계)는 5 copies/μL임을 확인함.

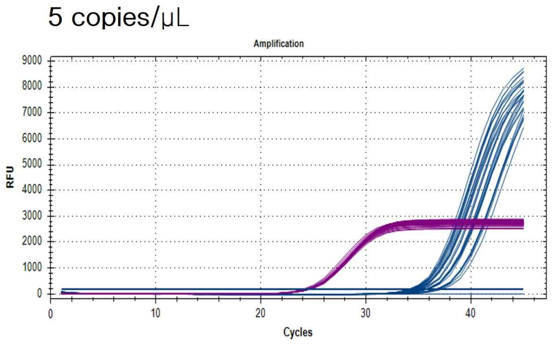


그림 41. SADS-CoV Confirmatory LoD test 결과

3) 결과 판독 기준 : SADS-CoV signal의 Ct 값과 Internal Control signal의 Ct 값이 40 이하일 때 양성으로 판정하고 IC signal의 Ct값만 확인될 경우 음성으로 판정함. IC signal의 Ct 값은 negative control (NC)를 포함한 모든 sample에서 확인되어야 함.

- 다중 진단법 Real-time PCR 결과
  1) Standard curve 확인 결과
     - PEDV IVT mRNA 1000 copies/μL를 10배 단위로 단계적 희석하여 Multiplex qRT-PCR을 실험한 결과 standard curve R^2 값, slope, efficiency는 각각 0.996, -3.448, 95%로 나타남.

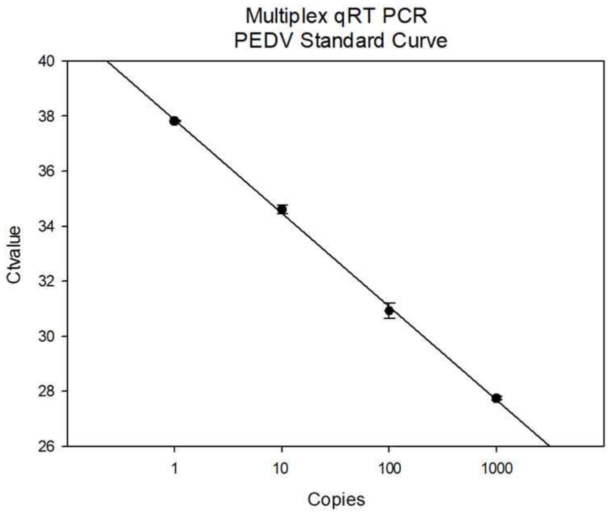


그림 42. Multiplex qRT-PCR PEDV Standard Curve

     - PDCoV IVT mRNA 1000 copies/μL를 10배 단위로 단계적 희석하여 Multiplex qRT-PCR을 실험한 결과 standard curve R^2 값, slope, efficiency는 각각 0.984, -3.581, 90.2%로 나타남.

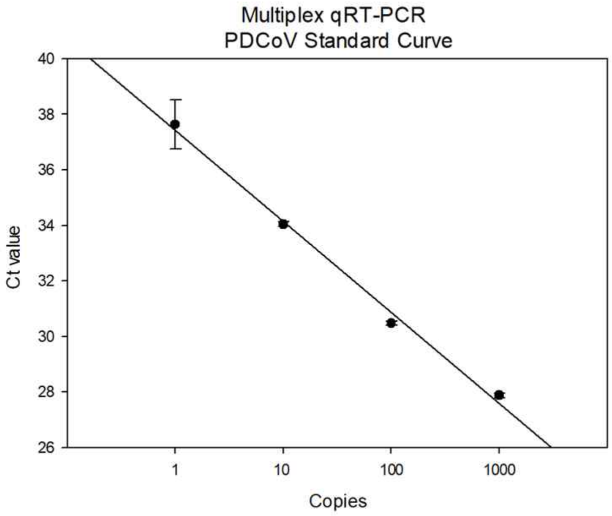


그림 43. Multiplex qRT-PCR PDCoV Standard Curve

     - SADS-CoV IVT mRNA 1000 copies/μL를 10배 단위로 단계적 희석하여 Multiplex qRT-PCR을 실험한 결과 standard curve R^2 값, slope, efficiency는 각각 0.984, -3.581, 90.2%로 나타남.

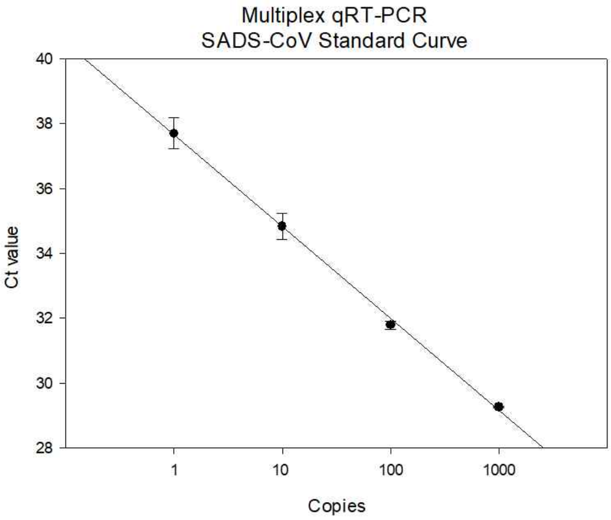


그림 44. Multiplex qRT-PCR PDCoV Standard Curve

2) 검체 증폭 확인 테스트

- 주관기관에서 viral RNA 형태로 제공받은 PEDV, PDCoV 검체를 앞서 최적화 된 Real-time PCR을 이용하여 개발된 Primer, Probe set의 성능을 테스트 확인함. Ct값이 40 이내로 검출 될 경우 양성으로 판단하였음. PEDV 양성검체 샘플에서는 PDCoV와 SADS-COV의 시그널이 증폭 되지 않고, PEDV만 검출된 것을 확인 할 수 있음. 또한, PDCoV 양성검체 샘플에서는 PEDV와 SADS-COV의 시그널이 증폭 되지 않고, PDCoV만 검출된 것을 확인 할 수 있음. 이러한 결과는 개발된 Primer, Probe가 실제 양성샘플에서도 높은 특이도 및 민감도를 보이며, 신종 동물 감염병 유행에 대한 선제적 대응 체계가 구축됨에 따라 검출 및 진단방법으로 활용이 가능 한 것으로 사료됨.

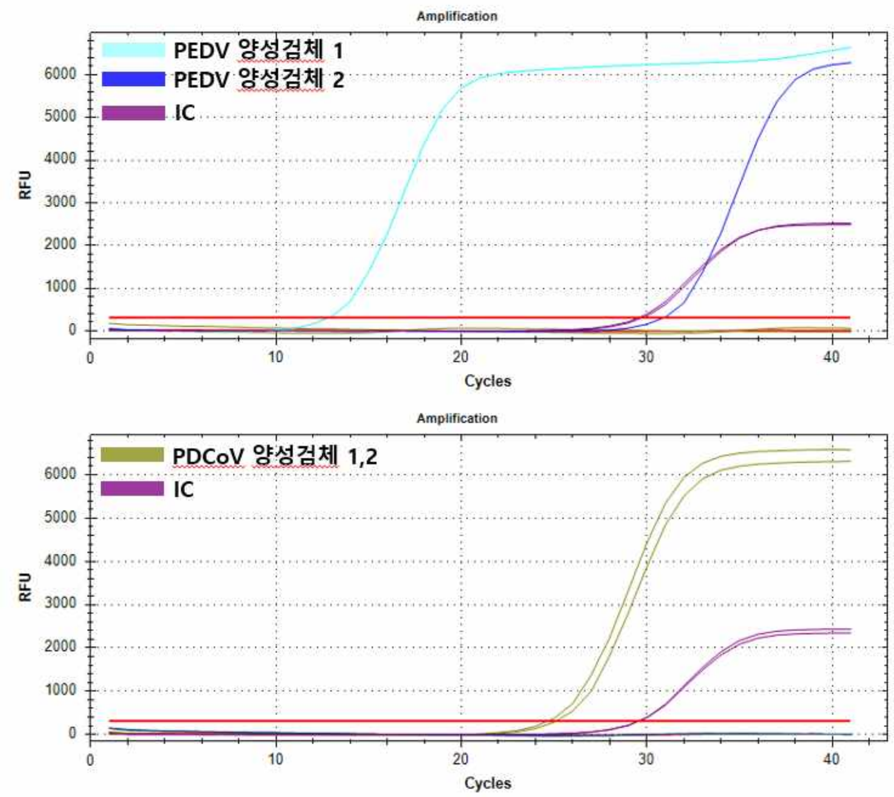


그림 45. Multiplex qRT-PCR PEDV, PDCoV 검체 테스트 결과

3) 분석적 민감도(최소검출한계) : 분석적 민감도를 평가한 결과 SADS-CoV, PEDV 및 PDCoV 모두 95% 이상 검출된 최소 농도는 5 copies/μL로 선정됨.

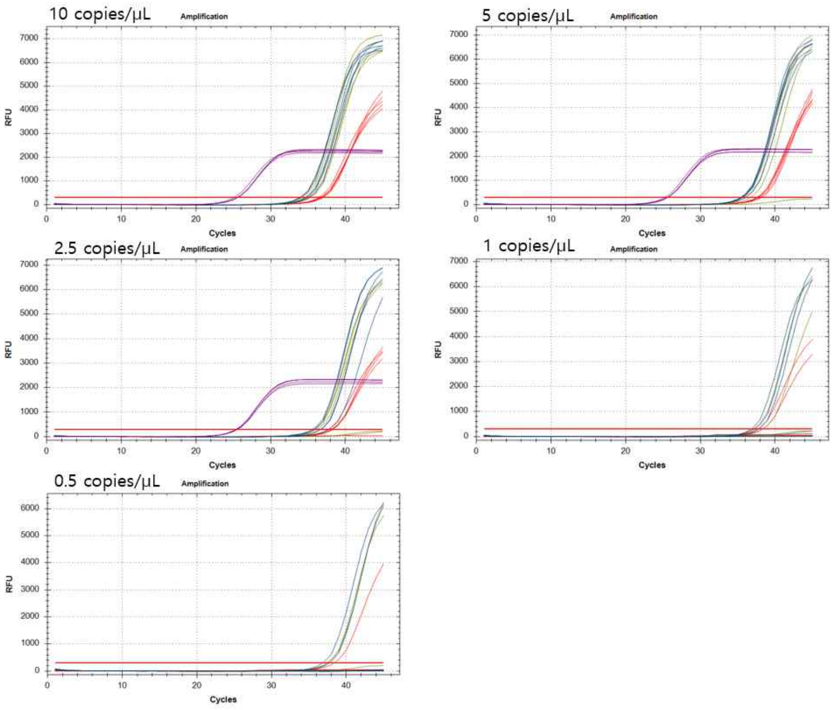


그림 46. SADS-CoV, PDCoV, PEDV Multiplex qRT-PCR Pre-liminary LoD test 결과

표 10. SADS-CoV, PDCoV, PEDV Multiplex Pre-liminary LoD test 결과

copies/μL		10	5	2.5	1	0.5
SADS-CoV	1	36.39	38.16	N/A	37.66	38.36
	2	36.94	37.69	38.3	N/A	N/A
	3	36.82	38.03	37.69	N/A	N/A
	4	36.61	37.68	38.23	38.23	N/A
	5	37.02	37.01	38.18	N/A	N/A
평균		36.76	**37.71**	38.10	**37.95**	38.36
표준편차		0.26	0.45	0.28	0.40	-
CV%		0.70	1.18	0.73	1.06	-
검출률%		100	100	80	40	20

copies/μL		10	5	2.5	1	0.5
PDCoV	1	34.06	36.07	N/A	38.3	N/A
	2	33.92	35.49	36.24	N/A	37.5
	3	34.64	N/A	35.97	N/A	37.41
	4	34.75	35.5	N/A	N/A	N/A
	5	34.19	34.88	35.93	37.08	N/A
평균		34.31	**35.48**	36.05	**37.69**	37.46
표준편차		0.36	0.42	0.17	0.86	0.06
CV%		1.06	1.19	0.47	2.29	0.17
검출률%		100	100	60	40	40

copies/μL		10	5	2.5	1	0.5
PEDV	1	34.68	36.04	36.65	N/A	N/A
	2	34.85	35.52	36.73	37.81	N/A
	3	35.1	35.45	35.82	N/A	37.77
	4	33.97	35.36	36.77	37.24	36.87
	5	34.76	35.6	35.54	36.78	N/A
평균		34.67	35.59	36.30	37.28	37.32
표준편차		0.42	0.26	0.58	0.52	0.64
CV%		1.22	0.74	1.59	1.38	1.71
검출률%		100	100	100	60	40

- Multiplex qRT-PCR confirmatory LoD test를 진행한 결과 5 copies/μL, 20 반복해서 SADS-CoV, PEDV 및 PDCoV 모두 100% 검출됨을 확인함. 따라서 다중 진단법의 분석적 민감도(최소검출한계)는 5 copies/μL임을 확인.

Target	PEDV				PDCoV				SADS-CoV			
	Ct	평균	표준편차	CV%	Ct	평균	표준편차	CV%	Ct	평균	표준편차	CV%
5 copies	36.52	35.44	0.58	1.63	35.44	35.81	0.77	2.15	36.61	37.26	0.90	2.42
	35.23				35.39				38.09			
	34.66				35.12				36.62			
	35.3				35.37				38.45			
	34.93				36.06				36.66			
	35.17				35.01				38.15			
	34.43				34.47				38.14			
	35.28				35.35				38.08			
	35.67				36.09				38.18			
	35.02				35.51				37.22			
	36.23				36.13				38.14			
	35.31				36.3				38.23			
	34.83				37.69				35.45			
	36.11				35.56				35.88			
	35.54				37.03				37.37			
	36.03				35.08				37.02			
	35.56				35.8				36.94			
	35.78				35.71				36.85			
	36.26				37				37.32			
	34.95				36.05				35.89			
검출률	100%				100%				100%			

표 11. Multiplex qRT-PCR Confirmatory LoD test 결과

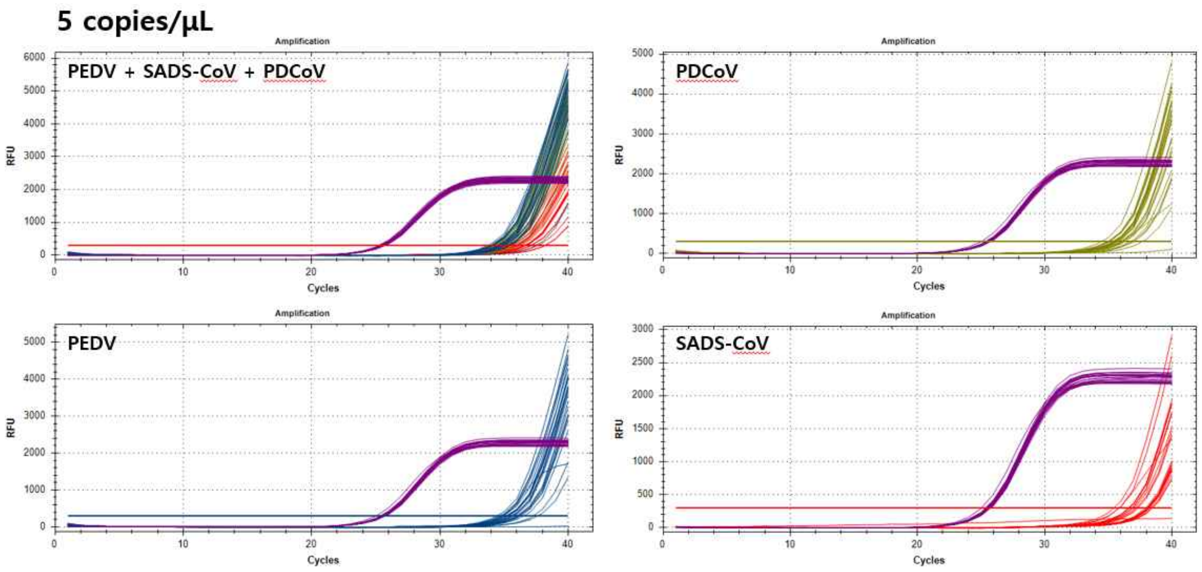


그림 47. Multiplex qRT-PCR Confirmatory LoD test 결과

4) 결과 판독 기준 : SADS-CoV signal의 Ct값, PEDV signal의 Ct값, PDCoV signal의 Ct값과 Internal control signal의 Ct 값이 40 이하일 때 양성으로 판정하고 IC signal의 Ct값만 확인될 경우 음성으로 판정함. IC signal의 Ct 값은 negative control (NC)를 포함한 모든 sample에서 확인되어야 함.

□ 진단기술 유효성 평가

○ 표준시료 및 바이러스 배양액을 이용한 특이도 평가

- 정량된 Target pDNA와 충남대학교에서 제공한 viral RNA를 동시에 Real-time PCR을 수행하였고, 정량된 Target pDNA를 바탕으로 viral RNA 결과 값과 Standard-Curve를 그려 정량함.

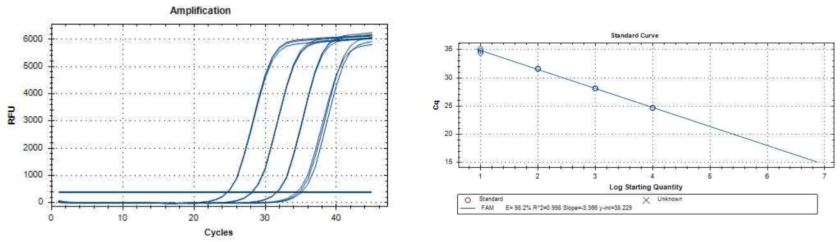


그림 48. PEDV 정량 결과

- PEDV의 standard curve R2 값, slope, efficiency는 각각 0.998, -3.366, 98.2%로 나타남. standard curve의 slope 값이 -3.1~-3.7, R2 값은 0.98~1, efficiency 80~120%로 모두 범위 안에 들어오는지 확인하였음.

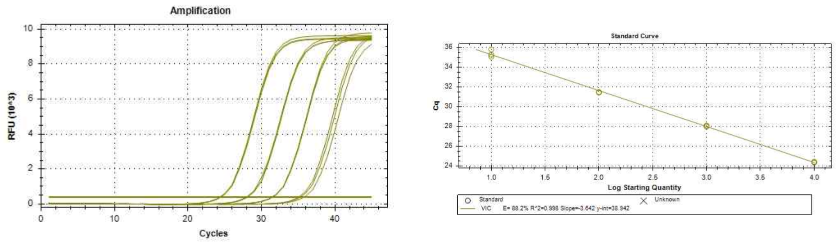


그림 49. PDCoV 정량 결과

- PDCoV의 standard curve R2 값, slope, efficiency는 각각 0.998, -3.642, 88.2%로 나타남. standard curve의 slope 값이 -3.1~-3.7, R2 값은 0.98~1, efficiency 80~120%로 모두 범위 안에 들어오는지 확인하였음.

- 개발한 다중 진단법을 이용하여 정량된 Viral RNA로 Real-time PCR을 수행함.

표 11. 정량된 PEDV viral RNA 의 민감도 평가 결과

Target		CT			Mean	SD
PEDV	10^3	28.26	28.32	28.33	28.30	0.04
	10^2	31.58	31.48	31.40	31.49	0.09
	10^1	35.27	35.03	34.95	35.08	0.17
	5	36.35	35.47	37.04	36.29	0.79
	1	38.05	38.03	N/A	38.04	0.01
NTC		N/A	N/A	N/A		

표 12. 정량된 PDCoV viral RNA 의 민감도 평가 결과

Target		CT			Mean	SD
PDCoV	10^3	27.01	27	27.04	27.02	0.02
	10^2	29.1	29.57	29.2	29.29	0.25
	10^1	32.48	32.27	32.06	32.27	0.21
	5	33.64	32.65	33.35	33.21	0.51
	1	35.41	36.41	35.3	35.71	0.61
NTC		N/A	N/A	N/A		

- 충남대학교에서 제공한 PEDV, PDCoV의 Viral RNA 사용하여 LOD 테스트를 진행한 결과 PEDV는 5 copies/μL까지 detect 되었으며, PDCoV는 1 copies/μL까지 detect되었음. 충남대학교에서 Viral RNA 제공하기 전, 전년도에 사용했던 IVT mRNA같은 경우에는 Plasmid를 이용하여 합성하다 보니 DNA 컨탐 가능성이 농후하여 품질이 저하되는 경우가 다수 발생함. 따라서, 위의 결과를 기반으로, 당해연도에 충남대학교에서 제공해준 Viral RNA를 사용하여 실험하였을 때 RNA의 품질이 높아 PDCoV의 민감도가 향상된 것으로 사료됨.
- 결론적으로 IVT mRNA (PDCoV: 5 copies/μL, PEDV: 5 copies/μL, SADS-CoV: 5 copies/μL)와 Viral RNA (PDCoV: 1 copies/μL, PEDV: 5 copies/μL, SADS-CoV: 데이터 없음) 모두 5 copies/μL 이하로 검출되는 비슷한 결과양상을 가지고 있음을 확인하였음.

○ 표준시료 및 바이러스 배양액을 이용한 특이도 평가

- 개발한 단일 진단법 및 다중 진단법 Real-time PCR 검사 방법이 검출하고자 하는 SADS-CoV, PEDV, PDCoV 외의 설사 유발 병원체 및 돼지 genomic RNA에 대해 교차반응이 있는지 확인함.
- SADS-CoV 단일 진단법 Real-time PCR : 22종의 교차균주 및 돼지 genomic RNA에서 모두 교차반응이 관찰되지 않음.
- PEDV, PDCoV, SADS-CoV 다중 진단법 Real-time PCR : 22종의 교차균주 및 돼지 genomic RNA에서 모두 교차반응이 관찰되지 않음.

표 14. PEDV, PDCoV, SADS-CoV 다중 진단법 특이도 결과

No	Sample	Rep	Ct				Result
			PEDV	PD CoV	SADS-CoV	IC	
1	Porcine epidemic diarreha virus (PEDV)	1	23.51	N/A	N/A	29.08	PEDV
2	Porcine rotavirus (PoRV-1)	1	N/A	N/A	N/A	28.73	Negative
3	Transmissible gastroenteritis virus (TEGV)	1	N/A	N/A	N/A	28.25	Negative
4	Classical Swine Fever virus (CSFV)	1	N/A	N/A	N/A	28.73	Negative
5	Porcine reproductive and respiratoty syndrome virus (PRRSV)	1	N/A	N/A	N/A	28.80	Negative
6	Giardia lamblia	1	N/A	N/A	N/A	29.09	Negative
7	Salmonella typhi	1	N/A	N/A	N/A	28.46	Negative
8	Salmonella enteritidis	1	N/A	N/A	N/A	29.9	Negative
9	Campylobacter coli	1	N/A	N/A	N/A	28.82	Negative

10	Toxoplasma gondii	1	N/A	N/A	N/A	29.04	Negative
11	Shigella flexneri	1	N/A	N/A	N/A	29.08	Negative
12	Entamoeba histolytica	1	N/A	N/A	N/A	29.08	Negative
13	Clostridium perfringens	1	N/A	N/A	N/A	29.07	Negative
14	Cryptosporidium parvum	1	N/A	N/A	N/A	29.16	Negative
15	Klebsiella aerogenes	1	N/A	N/A	N/A	29.04	Negative
16	Yersinia enterocolitica subsp	1	N/A	N/A	N/A	29.17	Negative
17	Cyclospora cayetanensis	1	N/A	N/A	N/A	29.04	Negative
18	Sapovirus	1	N/A	N/A	N/A	29.02	Negative
19	Astrovirus	1	N/A	N/A	N/A	28.7	Negative
20	Bacillus spizizenii	1	N/A	N/A	N/A	28.85	Negative
21	Borrelia burgdorferi	1	N/A	N/A	N/A	29.02	Negative
22	Leptospira interrogans	1	N/A	N/A	N/A	29.07	Negative
23	돼지 genomic RNA	1	N/A	N/A	N/A	29.02	Negative

○ PEDV, PDCoV, SADS-CoV Real-time PCR 재현성 평가

- PEDV, PDCoV, SADS-CoV 다중 진단법 Real-time PCR : 모든 target signal의 Ct 값은 표 6. PCR 양성 판정 기준치 (Cut-off value)를 적용하여 양성으로 판정하고, N/A (not applicable)로 표시되어 확인되지 않을 경우 음성으로 판정함. CFX96 Real-Time PCR Detection System (체외 수인 10-205호, Bio-Rad)를 사용하여 표준물질의 농도 NTC, 1000, 100, 10 copies/ul에서 3일간 1일 3반복 시험을 진행 결과, 모두 100% 양성 비율로 검출되었다. 또한, CV(%)가 적합기준 CV 5% 이내임을 확인하여 검사결과에 차이가 없음을 확인하였음.

표17. Swine Enteric Coronaviruses (PEDV, PDCoV, and SADS-CoV)재현성 결과

Target	Concentration (Copies/μL)	Intra-Assay			Inter-Assay		
		$\bar{x}$	SD	CV (%)	$\bar{x}$	SD	CV (%)
SADS-CoV	1.00×10^3	29.55	0.06	0.00	29.63	0.54	0.02
	1.00×10^2	33.16	0.21	0.01	32.87	0.43	0.01
	1.00×10^1	36.69	0.59	0.02	36.22	0.41	0.01
PEDV	1.00×10^3	28.40	0.01	0.00	27.86	0.15	0.01
	1.00×10^2	31.20	0.18	0.01	31.10	0.27	0.01
	1.00×10^1	35.25	0.63	0.02	34.75	0.46	0.01
PDCoV	1.00×10^3	28.44	0.03	0.00	28.76	0.99	0.03
	1.00×10^2	32.06	0.03	0.00	32.40	1.01	0.03
	1.00×10^1	36.49	0.95	0.03	36.30	1.10	0.03

- SADS-CoV 단일 진단법 Real-time PCR : 마찬가지로, 모든 target signal의 Ct 값은 표 6. PCR 양성 판정 기준치 (Cut-off value)를 적용하여 양성으로 판정하고, N/A (not applicable)로 표시되어 확인되지 않을 경우 음성으로 판정함. CFX96 Real-Time PCR Detection System (체외 수인 10-205호, Bio-Rad)를 사용하여 표준물질의 농도 NTC, 1000, 100, 10 copies/ul에서 3일간 1일 3반복 시험을 진행한 결과, 모두 100% 양성 비율로 검출되었다. 또한, CV(%)가 적합기준 CV 5% 이내임을 확인하여 검사결과에 차이가 없음을 확인하였음.

표18. SADS-CoV 재현성 결과

Target	Concentration (Copies/μL)	Intra-Assay			Inter-Assay		
		$\bar{x}$	SD	CV (%)	$\bar{x}$	SD	CV (%)
SADS-CoV	1.00×10^3	29.23	0.05	0.00	28.58	0.59	0.02
	1.00×10^2	32.39	0.20	0.01	31.85	0.47	0.01
	1.00×10^1	35.72	0.53	0.01	35.06	0.58	0.02

○ 야외시료를 이용한 민감도·특이도 평가

- 국내 양돈 농가로부터 수집한 70개의 돼지 분변시료를 이용하여 기존의 RT-PCR 및 개발 real-time PCR을 실시하여 진단법간 민감도와 특이도를 비교함.

표 19. SADS-CoV 단일 진단법 임상 검체 확인 결과

Sample	Result	Sample	Result	Sample	Result
1	Negative	26	Negative	51	Negative
2	Negative	27	Negative	52	Negative
3	Negative	28	Negative	53	Negative
4	Negative	29	Negative	54	Negative
5	Negative	30	Negative	55	Negative
6	Negative	31	Negative	56	Negative
7	Negative	32	Negative	57	Negative
8	Negative	33	Negative	58	Negative
9	Negative	34	Negative	59	Negative
10	Negative	35	Negative	60	Negative
11	Negative	36	Negative	61	Negative
12	Negative	37	Negative	62	Negative
13	Negative	38	Negative	63	Negative
14	Negative	39	Negative	64	Negative
15	Negative	40	Negative	65	Negative
16	Negative	41	Negative	66	Negative
17	Negative	42	Negative	67	Negative
18	Negative	43	Negative	68	Negative
19	Negative	44	Negative	69	Negative
20	Negative	45	Negative	70	Negative
21	Negative	46	Negative		
22	Negative	47	Negative		
23	Negative	48	Negative		
24	Negative	49	Negative		
25	Negative	50	Negative		

표 20. PDCoV, PEDV, SADS-CoV 다중 진단법 임상 검체 확인 결과

Sample	Result	Sample	Result	Sample	Result
1	Negative	26	Negative	51	Negative
2	Negative	27	Negative	52	Negative
3	Negative	28	Negative	53	Negative
4	Negative	29	Negative	54	Negative
5	Negative	30	Negative	55	Negative
6	Negative	31	Negative	56	Negative
7	Negative	32	Negative	57	Negative
8	Negative	33	Negative	58	Negative
9	Negative	34	Negative	59	Negative
10	Negative*	35	Negative	60	Negative***
11	PEDV	36	PEDV**	61	Negative
12	Negative	37	Negative	62	Negative
13	PEDV	38	Negative	63	Negative
14	Negative*	39	Negative	64	Negative
15	Negative	40	Negative	65	Negative
16	PEDV	41	Negative	66	Negative
17	PEDV	42	Negative	67	Negative
18	PEDV	43	Negative	68	Negative
19	Negative	44	Negative	69	Negative
20	Negative	45	Negative	70	Negative
21	Negative	46	Negative		
22	Negative	47	Negative		
23	Negative	48	Negative		
24	Negative	49	Negative		
25	Negative	50	Negative		

* Sample 10, 14: PEDV 결과 불일치

** Sample 36 : PEDV 추가 양성

*** Sample 60: PDCoV 결과 불일치

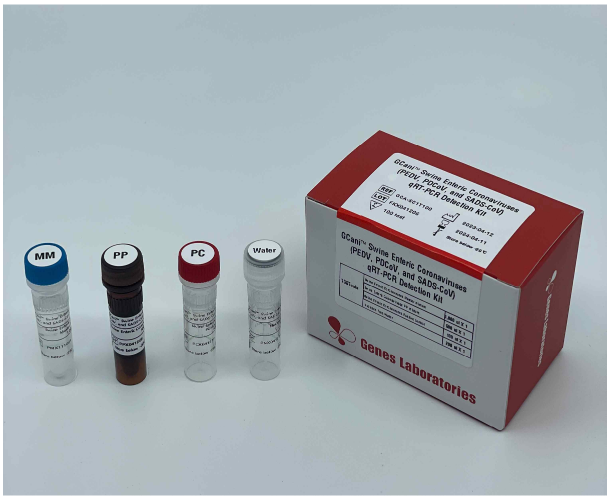
- 기존의 RT-PCR과 개발된 검사법의 비교 결과, 4개의 sample(10, 14, 36, 60)을 제외한 나머지

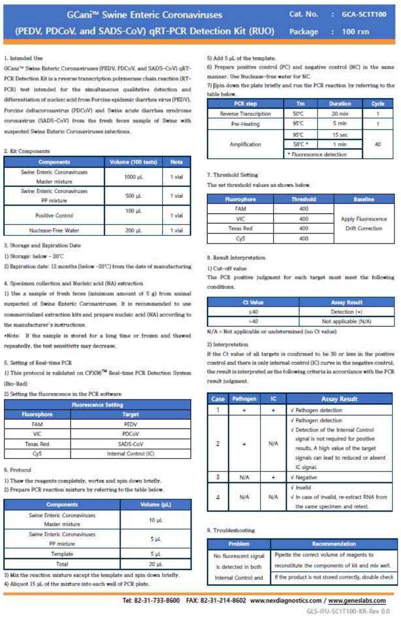
66개의 sample은 실험 결과가 동일함. PEDV 추가 양성으로 확인된 Sample 36의 경우, sequencing을 통해 추가 양성 검증을 완료함. Sample 10, 14, 60의 경우, 장거리 운송 및 보관 중 냉·해동 반복 등에 의한 검체의 안정성 저하로 결과가 상이한 것으로 판단됨.

- 이러한 결과는 개발된 primer, probe가 실제 양성 검체에서도 높은 특이도 및 민감도를 보임을 확인할 수 있으며 신종 동물 감염병 유행에 대한 선제적 대응 체계가 구축됨에 따라 검출 및 진단 방법으로 활용이 가능한 것으로 사료됨.

○ 시제품 생산

- 유효성 검증 완료 후 본 과제에서 개발한 진단법을 시제품으로 생산하였음.





GCani™ Swine Enteric Coronaviruses (PEDV, PDCoV, and SADS-CoV) qRT-PCR Detection Kit (RUO) | Cat. No. : GCA-SC1T100 | Package : 100 rxn

1. Intended Use

GCani™ Swine Enteric Coronaviruses (PEDV, PDCoV, and SADS-CoV) qRT-PCR Detection Kit is a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) test intended for the simultaneous qualitative detection and differentiation of nucleic acid from Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), Porcine deltacoronavirus (PDCoV) and Swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV) from the fresh feces sample of Swine with suspected Swine Enteric Coronaviruses infections.

2. Kit Components

Components	Volume (100 tests)	Note
Swine Enteric Coronaviruses Master mixture	1000 μL	1 vial
Swine Enteric Coronaviruses PP mixture	500 μL	1 vial
Positive Control	100 μL	1 vial
Nuclease-Free Water	200 μL	1 vial

3. Storage and Expiration Date

1) Storage: below - 20℃

2) Expiration date: 12 months (below -20℃) from the date of manufacturing

4. Specimen collection and Nucleic acid (NA) extraction

1) Use a sample of fresh feces (minimum amount of 5 g) from animal suspected of Swine Enteric Coronaviruses. It is recommended to use commercialized extraction kits and prepare nucleic acid (NA) according to the manufacturer's instructions.

•Note: If the sample is stored for a long time or frozen and thawed repeatedly, the test sensitivity may decrease.

5. Setting of Real-time PCR

1) This protocol is validated on CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad)

2) Setting the fluorescence in the PCR software

Fluorescence Setting	
Fluorophore	Target
FAM	PEDV
VIC	PDCoV
Texas Red	SADS-CoV
Cy5	Internal Control (IC)

6. Protocol

1) Thaw the reagents completely, vortex and spin down briefly.

2) Prepare PCR reaction mixture by referring to the table below.

Components	Volume (μL)
Swine Enteric Coronaviruses Master mixture	10 μL
Swine Enteric Coronaviruses PP mixture	5 μL
Template	5 μL
Total	20 μL

3) Mix the reaction mixture except the template and spin down briefly.

4) Aliquot 15 μL of the mixture into each well of PCR plate.

5) Add 5 μL of the template.

6) Prepare positive control (PC) and negative control (NC) in the same manner. Use Nuclease-free water for NC.

7) Spin down the plate briefly and run the PCR reaction by referring to the table below.

PCR step	Tm	Duration	Cycle
Reverse Transcription	50℃	20 min	1
Pre-Heating	95℃	5 min	1
Amplification	95℃	15 sec	40
	58℃ *	1 min	
	* Fluorescence detection		

7. Threshold Setting

The set threshold values as shown below.

Fluorophore	Threshold	Baseline
FAM	400	Apply Fluorescence Drift Correction
VIC	400	
Texas Red	400	
Cy5	400	

8. Result Interpretation

1) Cut-off value

The PCR positive judgment for each target must meet the following conditions.

Ct Value	Assay Result
≤40	Detection (+)
>40	Not applicable (N/A)

N/A = Not applicable or undetermined (no Ct value)

2) Interpretation

If the Ct value of all targets is confirmed to be 30 or less in the positive control and there is only internal control (IC) curve in the negative control, the result is interpreted as the following criteria in accordance with the PCR result judgment.

Case	Pathogen	IC	Assay Result
1	+	+	√ Pathogen detection
2	+	N/A	√ Pathogen detection √ Detection of the Internal Control signal is not required for positive results. A high value of the target signals can lead to reduced or absent IC signal.
3	N/A	+	√ Negative
4	N/A	N/A	√ Invalid √ In case of invalid, re-extract RNA from the same specimen and retest.

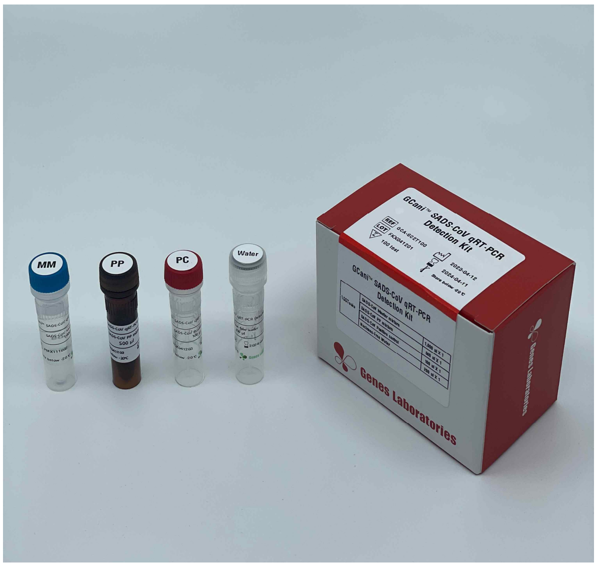
9. Troubleshooting

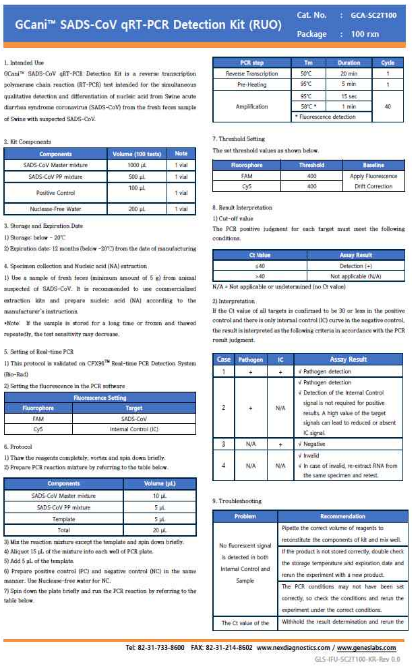
Problem	Recommendation
No fluorescent signal is detected in both Internal Control and	Pipette the correct volume of reagents to reconstitute the components of kit and mix well.
	If the product is not stored correctly, double check

Tel: 82-31-733-8600 FAX: 82-31-214-8602 www.nexdiagnostics.com / www.geneslabs.com

GLS-IFU-SC1T100-KR-Rev 0.0

그림 50. PDCoV, PEDV, SADS-CoV 다중 진단법 제품사진 및 사용설명서





GCani™ SADS-CoV qRT-PCR Detection Kit (RUO) | Cat. No. : GCA-SC2T100 | Package : 100 rxn

1. Intended Use

GCani™ SADS-CoV qRT-PCR Detection Kit is a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) test intended for the simultaneous qualitative detection and differentiation of nucleic acid from Swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV) from the fresh feces sample of Swine with suspected SADS-CoV.

2. Kit Components

Components	Volume (100 tests)	Note
SADS-CoV Master mixture	1000 μL	1 vial
SADS-CoV PP mixture	500 μL	1 vial
Positive Control	100 μL	1 vial
Nuclease-Free Water	200 μL	1 vial

3. Storage and Expiration Date

1) Storage: below - 20℃

2) Expiration date: 12 months (below -20℃) from the date of manufacturing

4. Specimen collection and Nucleic acid (NA) extraction

1) Use a sample of fresh feces (minimum amount of 5 g) from animal suspected of SADS-CoV. It is recommended to use commercialized extraction kits and prepare nucleic acid (NA) according to the manufacturer's instructions.

•Note: If the sample is stored for a long time or frozen and thawed repeatedly, the test sensitivity may decrease.

5. Setting of Real-time PCR

1) This protocol is validated on CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad)

2) Setting the fluorescence in the PCR software

Fluorescence Setting	
Fluorophore	Target
FAM	SADS-CoV
Cy5	Internal Control (IC)

6. Protocol

1) Thaw the reagents completely, vortex and spin down briefly.

2) Prepare PCR reaction mixture by referring to the table below.

Components	Volume (μL)
SADS-CoV Master mixture	10 μL
SADS-CoV PP mixture	5 μL
Template	5 μL
Total	20 μL

3) Mix the reaction mixture except the template and spin down briefly.

4) Aliquot 15 μL of the mixture into each well of PCR plate.

5) Add 5 μL of the template.

6) Prepare positive control (PC) and negative control (NC) in the same manner. Use Nuclease-free water for NC.

7) Spin down the plate briefly and run the PCR reaction by referring to the table below.

PCR step	Tm	Duration	Cycle
Reverse Transcription	50℃	20 min	1
Pre-Heating	95℃	5 min	1
Amplification	95℃	15 sec	40
	58℃ *	1 min	
	* Fluorescence detection		

7. Threshold Setting

The set threshold values as shown below.

Fluorophore	Threshold	Baseline
FAM	400	Apply Fluorescence Drift Correction
Cy5	400	

8. Result Interpretation

1) Cut-off value

The PCR positive judgment for each target must meet the following conditions.

Ct Value	Assay Result
≤40	Detection (+)
>40	Not applicable (N/A)

N/A = Not applicable or undetermined (no Ct value)

2) Interpretation

If the Ct value of all targets is confirmed to be 30 or less in the positive control and there is only internal control (IC) curve in the negative control, the result is interpreted as the following criteria in accordance with the PCR result judgment.

Case	Pathogen	IC	Assay Result
1	+	+	√ Pathogen detection
2	+	N/A	√ Pathogen detection √ Detection of the Internal Control signal is not required for positive results. A high value of the target signals can lead to reduced or absent IC signal.
3	N/A	+	√ Negative
4	N/A	N/A	√ Invalid √ In case of invalid, re-extract RNA from the same specimen and retest.

9. Troubleshooting

Problem	Recommendation
No fluorescent signal is detected in both Internal Control and Sample	Pipette the correct volume of reagents to reconstitute the components of kit and mix well.
	If the product is not stored correctly, double check the storage temperature and expiration date and rerun the experiment with a new product.
	The PCR conditions may not have been set correctly, so check the conditions and rerun the experiment under the correct conditions.
The Ct value of the	Withhold the result determination and rerun the

Tel: 82-31-733-8600 FAX: 82-31-214-8602 www.nexdiagnostics.com / www.geneslabs.com

GLS-IFU-SC2T100-KR-Rev 0.0

그림 51. SADS-CoV 단일 진단법 제품사진 및 사용설명서

- 돼지의 분변에서 추출한 검체로부터 분리한 RNA를 대상으로 신종 바이러스인 SADS-CoV 및 PEDV, PDCoV 에서 특정 유전자를 RT-PCR 방법으로 증폭하여 감염여부를 확인하는 제품임.

○ 돼지분변시료 확보 및 바이러스 유병율 분석

- 국내 및 베트남으로부터 돼지 분변시료를 확보하고 PDCoV, PEDV, SADS-CoV 다중 진단키트를 이용하여 바이러스 유병율을 분석함.
- 한국과 베트남으로부터 확보한 총 139개 샘플에 대해 분석을 실시하였으며 singleplex RT-PCR을 동시에 진행하여 신뢰도를 확보함. 그 결과 PEDV는 31개, PDCoV는 4개, SADS-CoV는 5개의 샘플에서 양성반응이 나타남.

	Multiplex RT-qPCR			Singleplex RT-PCR		
	PEDV	PDCoV	SADS-CoV	PEDV	PDCoV	SADS-CoV
Positive	31	4	5	31	4	5
Negative	108	135	134	108	135	134
Total	139	139	139	139	139	139

○ 양성시료 내 바이러스 스파이크 단백질 유전자 분석

- 양성시료 내 PEDV와 SADS-CoV spike 단백질을 PCR을 이용하여 증폭하고 phylogenetic analysis를 실시함.
- PEDV는 모두 G2b group으로 나타남.

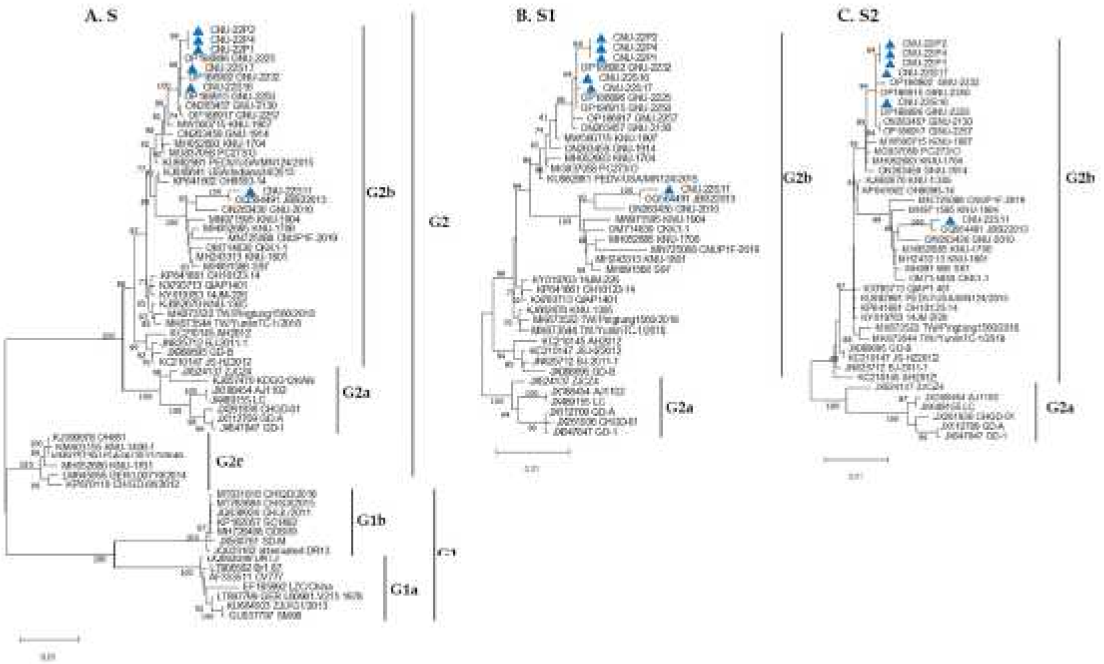


그림 52. PEDV isolates의 phylogenetic tree

- SADS-CoV는 모두 중국 strain으로 나타남.

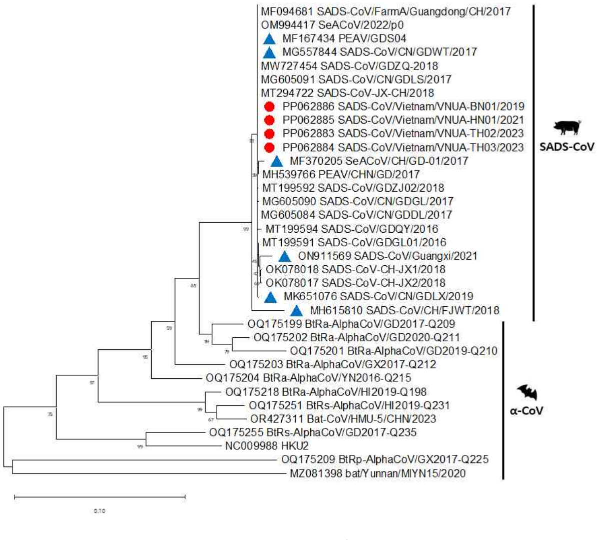


그림 53. SADS-CoV isolates의 phylogenetic tree

2) 연구개발 성과

(1) 정성적 연구개발성과

○ 연구목표별 정성적 연구개발성과

세부 연구목표	정성적 연구개발성과
SADS-CoV 감염기전 규명	• CRISPR/Cas 스크리닝을 통해 11개의 숙주인자(NOX1, MCPH1, CASR, AKAP3, HPXA9, PSMC6, MAG, ORM1, GLS, AKPI, ABCD2)를 식별하였음 • SADS-CoV S1-Fc를 이용하여 periostin 및 다양한 수용체 후보물질을 식별하였음 • 단백분해효소인 furin이 SADS-CoV S의 S1/S2 cleavage site에서 S를 절단하고, S 단백질에 의해 매개되는 cell-cell fusion에 일으킨다는 것을 규명함 • SADS-CoV가 endosomal pathway를 통해 감염한다는 것을 규명함 • 인간폐오가노이드에서 SADS-CoV의 증식이 활발하게 일어난다는 것을 규명함
SADS-CoV 진단법 확립	• SADS-CoV 단일진단 qRT-PCR 프라이머, 프로브, 반응조건 확립함 • SADS-CoV, PDCoV, PEDV multiplex qRT-PCR 프라이머, 프로브, 반응조건 확립함 • 표준물질, 바이러스, 및 임상시료를 이용하여 진단법의 민감도 및 특이도를 측정함

○ 세부기관별 정성적 연구개발성과

세부 연구목표	정성적 연구개발성과
충남대학교	• SADS-CoV S1-Fc를 이용하여 periostin 및 다양한 수용체 후보물질을 식별하였음 • 단백분해효소인 furin이 SADS-CoV S의 S1/S2 cleavage site에서 S를 절단하고, S 단백질에 의해 매개되는 cell-cell fusion에 일으킨다는 것을 규명함 • SADS-CoV가 endosomal pathway를 통해 감염한다는 것을 규명함 • 임상시료를 이용하여 진단법의 민감도 및 특이도를 측정함
㈜진스랩	• SADS-CoV 단일진단 qRT-PCR 프라이머, 프로브, 반응조건 확립함 • SADS-CoV, PDCoV, PEDV multiplex qRT-PCR 프라이머, 프로브, 반응조건 확립함 • 표준물질을 이용하여 진단법의 민감도 및 특이도를 측정함
중국	• CRISPR/Cas 스크리닝을 통해 11개의 숙주인자(NOX1, MCPH1, CASR, AKAP3, HPXA9, PSMC6, MAG, ORM1, GLS, AKPI, ABCD2)를 식별하였음 • SADS-CoV가 endosomal pathway를 통해 감염한다는 것을 authentic virus를 이용하여 규명함 • 인간폐오가노이드에서 SADS-CoV의 증식이 활발하게 일어난다는 것을 규명함
베트남	• 임상시료를 이용하여 진단법의 민감도 및 특이도를 측정함

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

(3) **세부 정량적 연구개발성과**(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Furin cleavage is required for swine acute diarrhea syndrome coronavirus spike protein-mediated cell-cell fusion	Emerging Microbe & Infections	김진만	11	영국	Taylor & Francis	SCIE	2022.09.21	2222-1751	100
2	Molecular characterization of porcine epidemic diarrhea virus from field samples in South Korea	Viruses	Bac Tran Le	15	스위스	MDPI	SCIE	2023.12.14	1999-4915	100
3	Porcine epidemic diarrhea: insights and progress on vaccines	Vaccines	박정은	12	스위스	MDPI	SCIE	2024.0218	2076-393X	100
4	A multiplex real time RT-qPCR for simultaneous detection of PEDV, PDCoV, and SADS-CoV	Archives of Virology	백지혜, 이유민, Ngoc Duong Vu, 김민희	-	오스트리아	Springer	SCIE	-	0304-8606	100
5	Two consecutive proline substitutions in the fusion peptide of swine acute diarrhea syndrome coronavirus spike protein reduce cell-cell fusion	Journal of Preventive Veterinary Medicine	Bac Tran Le	47	대한민국	한국예방수의학회	비SCIE	2023.12.15	2287-7994	100

1

Emerging Microbes & Infections
2022, VOL. 11
https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2114850

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

Furin cleavage is required for swine acute diarrhea syndrome coronavirus spike protein-mediated cell – cell fusion

Jinman Kim[a], Jaewon Yoon[a] and Jung-Eun Park[a,b]

[a]Laboratory of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea; [b]Research Institute of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea

ABSTRACT
Swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV) was reported in China in 2017 and is a causative agent of porcine enteric disease. Recent studies indicate that cells from various hosts are susceptible to SADS-CoV, suggesting the zoonotic potential of this virus. However, little is known about the mechanisms through which this virus enters cells. In this study, we investigated the role of furin in SADS-CoV spike (S)-mediated cell – cell fusion and entry. We found that the SADS-CoV S protein induced the fusion of various cells. Cell – cell fusion was inhibited by the proprotein convertase inhibitor dec-RVKR-cmk, and between cells transfected with mutant S proteins resistant to furin cleavage. These findings revealed that furin-induced cleavage of the SADS-CoV S protein is required for cell – cell fusion. Using mutagenesis analysis, we demonstrated that furin cleaves the SADS-CoV S protein near the S1/S2 cleavage site, [illegible]RYVR[illegible] and [illegible]AVRR[illegible]. We used pseudotyped viruses to determine whether furin-induced S cleavage is also required for viral entry. Pseudotyped viruses expressing S proteins with a mutated furin cleavage site could be transduced into target cells, indicating that furin-induced cleavage is not required for pseudotyped virus entry. Our data indicate that S cleavage is critical for SADS-CoV S-mediated cell – cell fusion and suggest that furin might be a host target for SADS-CoV antivirals.

ARTICLE HISTORY Received 13 April 2022; Revised 10 August 2022; Accepted 14 August 2022

KEYWORDS Swine acute diarrhea syndrome coronavirus; furin; spike; cleavage; cell – cell fusion

Introduction

Swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV) is a novel member of the genus Alphacoronavirus, which was first identified in southern China in 2017 [1–3]. Infection with SADS-CoV induces acute diarrhea and vomiting, similar to porcine epidemic diarrhea, resulting in a high mortality rate among young piglets [1–4]. Bats in a nearby epidemic area were found to harbour coronaviruses (HKU2) carrying 96–98% sequence homology to SADS-CoV, suggesting that bat-derived CoV spilled over to infect pigs [3,5]. Phylogenetic analysis revealed that the S genes of HKU2 and SADS-CoV formed a distinct lineage with all known alphacoronaviruses [3]. SADS-CoV-like CoVs have been identified in 9.8% of tested bats, mainly *Rhinolophus* spp., which are also CoV reservoirs associated with severe acute respiratory syndrome (SARS)-CoV [1,3]. Recent reports have indicated that SADS-CoV can infect cells from several species, including humans [6–8]. These findings highlight the importance of CoV spillover from bats to livestock, and indicate that SADS-CoV carries the potential for interspecies transmission. There are currently no vaccines or antiviral drugs for SADS-CoV [9].

The SADS-CoV genome is ~ 27 kb long, and contains nine open reading frames (ORFs) along with ORF1a, ORF1b, spike (S), envelope, membrane, nucleocapsid protein-encoding, and three accessory genes (NS3a, NS7a, and NS7b) [3]. S protein mediates viral entry into cells by recognizing cell receptors and catalyzing fusion between viral envelope and the cell membrane [10]. The S protein is divided into three parts: a large ectodomain, a single-pass transmembrane anchor, and a small cytoplasmic tail. The ectodomain of the S protein consists of two domains: the N-terminal receptor-binding domain S1, which is responsible for receptor binding, and the C-terminal membrane fusion domain S2, which is responsible for membrane fusion [11]. The S1 domain contains receptor-binding domains that recognize sugars and proteins on target cells. The S2 domain contains a hydrophobic fusion peptide and two heptad repeats, which are typical features of class I viral fusion proteins [12]. Some CoV S proteins are cleaved by furin/proprotein convertases at a cleavage site between the S1 and S2 domains (the S1/S2 cleavage site) during biosynthesis [13,14]. The S1/S2 cleavage site of CoV S is required for efficient infection and promotes the formation of syncytia [13,14]. Host receptor engagement

CONTACT Jung-Eun Park jepark@cnu.ac.kr

© 2022 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2

viruses

MDPI

Brief Report

Molecular Characterization of Porcine Epidemic Diarrhea Virus from Field Samples in South Korea

Bac Tran Le [†], Hansani Chathurika Gallage [†], Min-Hui Kim and Jung-Eun Park [*]

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea;
[illegible]@gmail.com (B.T.L.); [illegible]@gmail.com (H.C.G.); [illegible]@gmail.com (M.-H.K.)
[*] Correspondence: jepark@cnu.ac.kr
[†] These authors contributed equally to this work.

Abstract: Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) is a highly contagious enteric pathogen of swine. PEDV has been a major problem in the pig industry since its first identification in 1992. The aim of this study was to investigate the diversity, molecular characteristics, and phylogenetic relationships of PEDVs in field samples from Korea. Six PEDVs were identified from the field samples, and the full spike (S) glycoprotein gene sequences were analyzed. A phylogenetic analysis of the S gene sequences from the six isolates revealed that they were clustered into the G2b subgroup with genetic distance. The genetic identity of the nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of the S genes of those isolates was 97.9–100% and 97.4–100%, respectively. A BLAST search for new PEDVs revealed an identity greater than 99.5% compared to the highest similarity of two different Korean strains. The CO-26K equivalent (COE) epitope had a 521H→Y/Q amino acid substitution compared to the subgroup G2b reference strain (KNU-1305). The CNU-22S11 had 28 amino acid substitutions compared to the KNU-1305 strain, which included two newly identified amino acid substitutions: 562S→F and 763P→L in the COE and SS6 epitopes, respectively. Furthermore, the addition and loss of N-linked glycosylation were observed in the CNU-22S11. The results suggest that various strains of PEDV are prevalent and undergoing evolution at swine farms in South Korea and can affect receptor specificity, virus pathogenicity, and host immune system evasion. Overall, this study provides an increased understanding of the prevalence and control of PEDV in South Korea.

Keywords: porcine epidemic diarrhea virus; spike; molecular characterization; phylogenetic analysis

check for updates

Citation: Le, B.T.; Gallage, H.C.; Kim, M.-H.; Park, J.-E. Molecular Characterization of Porcine Epidemic Diarrhea Virus from Field Samples in South Korea. *Viruses* 2023, 15, 2428. https://doi.org/10.3390/v15122428

Academic Editor: Levon Abrahamyan

Received: 1 November 2023
Revised: 7 December 2023
Accepted: 13 December 2023
Published: 14 December 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Porcine epidemic diarrhea (PED) is an acute and highly contagious enteric disease in swine caused by PED virus (PEDV). PED first appeared in England in 1971, manifesting as watery diarrhea and dehydration, resulting in mortality of up to 50% [1,2]. The causative agent of PED was identified in Belgium and the United Kingdom in 1978 [3], and since then, PEDV has been reported in many countries, especially in Europe and Asia [4,5]. In 2010, high-virulence PEDV variant strains emerged in China, resulting in high mortality and morbidity of up to 90–95% among infected sucking piglets [6]. In spring of 2013, a PEDV variant was confirmed in the US that was genetically close to the highly pathogenic Chinese strains and led to the massive deaths of newborn piglets within a year of the outbreak [7]. The strain rapidly spread to American, European, and Asian countries, initiating a second PED epidemiologic wave worldwide [8,9]. Thus, PEDVs were classified into two groups: classical G1, the strains of which have circulated since the 1970s, and highly pathogenic G2 variants, which emerged after the 2010s. Furthermore, PEDVs were divided into five subgroups. Subgroup G1b was identified after the attenuated vaccine for subgroup G1a (classical strains) was approved. In 2010, a highly pathogenic G2 PEDV with a genetic signature, spike insertions–deletions (S INDEL), appeared in China, and subgroup G2a PEDV showed high morbidity and mortality in piglets [6]. Group G2

3

vaccines

MDPI

Review

Porcine Epidemic Diarrhea: Insights and Progress on Vaccines

Jung-Eun Park

Laboratory of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea; jepark@cnu.ac.kr

Abstract: Porcine epidemic diarrhea (PED) is a swine-wasting disease caused by coronavirus infection. It causes great economic damage to the swine industry worldwide. Despite the continued use of vaccines, PED outbreaks continue, highlighting the need to review the effectiveness of current vaccines and develop additional vaccines based on new platforms. Here, we review existing vaccine technologies for preventing PED and highlight promising technologies that may help control PED virus in the future.

Keywords: porcine epidemic diarrhea; coronavirus; vaccine

check for updates

Citation: Park, J.-E. Porcine Epidemic Diarrhea: Insights and Progress on Vaccines. *Vaccines* **2024**, *12*, 212. https://doi.org/10.3390/vaccines12020212

Academic Editor: [illegible]

Received: 16 January 2024
Revised: 16 February 2024
Accepted: 17 February 2024
Published: 18 February 2024

Copyright: © 2024 by the author. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Porcine epidemic diarrhea (PED) is a gastrointestinal illness in swine that is triggered by the porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). This virus can infect pigs of any age; however, it is particularly lethal and causes high rates of illness in newborn piglets. The primary method of PED transmission is through fecal-to-oral contact, although it can also spread via airborne particles from the feces to the nose [1]. PEDV predominantly targets the intestinal epithelial cells of pigs, leading to degeneration, necrosis, and loss of intestinal villi. Infection of these cells results in impaired nutrient absorption and triggers symptoms such as vomiting, diarrhea, weight loss, appetite loss, and potentially death [2,3].

PED was initially identified in the United Kingdom in 1971. Following identification, the disease quickly spread across various European nations, leading to substantial mortality among suckling piglets in Europe throughout the 1970s and 1980s [4]. In Asia, the first cases of PED emerged in the early 1980s, and the disease has been endemic in several Asian countries [5–7]. Until 2010, the spread of PED was primarily confined to Europe and Asia, and it was not regarded as a worldwide concern. However, the situation changed dramatically in early 2013 when the PED unexpectedly emerged in the United States [8–10] and rapidly spread to neighboring countries in North America [11–14]. This outbreak eventually reached East Asia [15–17] and Europe [18], culminating in a global PED epidemic during 2013–2014.

PEDV was first discovered in 1978 by scientists from Belgium [19,20]. A member of the *Alphacoronavirus* genus within the *Coronaviridae* family, PEDV is part of the *Nidovirales* order. The virus is encased in a nearly spherical shell measuring between 95 and 190 nanometers in diameter and features a club-like trimeric spike that is approximately 18 to 23 nanometers long [19]. Its genetic material is composed of a single-strand, positive-sense RNA approximately 28 kilobases in length with a 5′-cap and a 3′-polyadenylated tail at its ends. There are seven key coronavirus genes within the PEDV genome, including open reading frame (ORF) 3, which contains the following components: 5′ untranslated region (UTR)-ORF1a-ORF1b-S-ORF3-E-M-N-3′ UTR [21,22]. The ORF1a and ORF1b segments are precursors to polyproteins that are split into 16 nonstructural proteins (nsp1–nsp16) by the virus's protease, aiding in virus multiplication and evasion of the host's immune defenses. The S glycoprotein can form trimeric spikes on the viral surface, which mediate cell entry by attaching to host receptors and facilitating membrane fusion. The S gene, known for its high variability among PEDV strains, is used for phylogenetic analysis to determine viral genetic diversity [23–25]. PEDV is classified into two main genogroups:

4

Archives of Virology (2024) 169:82
https://doi.org/10.1007/s00705-024-06003-9

BRIEF REPORT

A multiplex real-time RT-qPCR assay for simultaneous detection of porcine epidemic diarrhea virus, porcine deltacoronavirus, and swine acute diarrhea syndrome coronavirus

Ji Hye Baek[1] · Yu-Min Lee[1] · Ngoc Duong Vu[2] · Min-Hui Kim[3] · Jincun Zhao[4] · Van Phan Le[2] · Joo Hyuk Cho[1] · Jung-Eun Park[3]

Received: 20 October 2023 / Accepted: 27 February 2024
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2024

Abstract

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), porcine deltacoronavirus (PDCoV), and swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV) cause intestinal diseases with similar manifestations in suckling piglets. In this study, we developed a multiplex real-time PCR for differential diagnosis of PEDV, PDCoV, and SADS-CoV. The assay demonstrated high specificity with a detection limit of 5 copies/μl for each virus. The assay specifically detected PEDV, PDCoV, and SADS-CoV and excluded all other swine pathogens circulating in pigs. Furthermore, the assay exhibited satisfactory performance in analyzing clinical samples. The data indicate that the newly developed multiplex real-time PCR method can be applied for differential diagnosis of porcine enteric coronaviruses.

Coronaviruses (family *Coronaviridae*, order *Nidovirales*) are enveloped viruses with a single-stranded positive-sense RNA genome. They infect various species of mammals and birds and cause respiratory and gastrointestinal diseases [1]. Currently, six coronaviruses have been reported to infect pigs: porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), transmissible gastroenteritis virus (TGEV), porcine respiratory coronavirus (PRCV), porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus (PHEV), porcine deltacoronavirus (PDCoV), and swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV) [12, 13, 20]. PEDV, TGEV, PDCoV, and SADS-CoV cause enteric diseases characterized by watery diarrhea and dehydration in pigs and can cause death in suckling piglets [8, 12, 13, 20]. PEDV is an alphacoronavirus that is present in many countries and has caused severe economic damage to the swine industry. It was first isolated in 1978 from pigs exhibiting acute diarrhea and dehydration [11]. PEDV strains can be divided into two genotypes – genotype I (GI) and genotype II (GII) – which show high genetic diversity and different degrees of virulence [2, 7, 14, 16]. PDCoV was first identified in 2009 and is associated with PEDV-like illness in pigs [6, 19]. In 2017, SADS-CoV was identified in Guangdong, China [4, 24], and the spread of SADS-CoV is currently limited to southern China [17].

Swine enteric coronaviruses, especially PEDV and PDCoV, have a tremendous economic impact on the pig industry worldwide [18]. SADS-CoV is also highly pathogenic to piglets and poses a threat to the swine industry [24]. To effectively control swine diarrhea, it is important to develop a rapid, accurate, and sensitive method that can be used to detect these viruses. PCR-based multiplex diagnosis is a powerful technique that can differentially detect various pathogens in a single assay. However, such assays are often challenging to design in a way that ensures high sensitivity for all of the pathogens included.

Handling Editor: Akhar Dastjerdi.

Ji Hye Baek, Yu-Min Lee, Ngoc Duong Vu, Min-Hui Kim contributed equally to this work.

Jung-Eun Park
jepark@cnu.ac.kr

[1] Molecular Diagnostics Team, Genes Laboratories, 388, Dunchon-daero, Jungwon-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 13403, Republic of Korea

[2] College of Veterinary Medicine, Vietnam National University of Agriculture, Hanoi, Vietnam

[3] College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea

[4] State Key Laboratory of Respiratory Disease, National Clinical Research Center for Respiratory Disease, Guangzhou Institute of Respiratory Health, The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, Guangdong, China

Published online: 23 March 2024

Springer

5

pISSN 2287-7991, eISSN 2287-8009
J. Prev. Vet. Med. Vol. 47, No. 4: 185-189, December 2023
https://doi.org/10.13041/jpvm.2023.47.4.185

Two consecutive proline substitutions in the fusion peptide of swine acute diarrhea syndrome coronavirus spike protein reduce cell-cell fusion

Bac Tran Le, Jung-Eun Park†

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

Abstract: Previous studies have shown that proline mutations in the heptad repeat region stabilize the coronavirus spike (S) protein in a pre-fusion state. To understand the impact of proline substitutions on the fusogenicity of the S protein, we engineered the swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV) S protein with two proline substitutions (S-PP) and examined its fusogenicity using dual-split-protein based cell-cell fusion assay. Unlike the wild-type S (S-WT), S-PP rarely formed syncytia. Additionally, protein expression of S-PP was impaired compared to S-WT, as previously reported. Our results indicate that pre-fusion stabilized S protein is unable to induce membrane fusion and provide a better understanding of SADS-CoV S and vaccine antigen design.

Key words: Fusogenicity, Proline, SADS-CoV, Spike

INTRODUCTION

Swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV), also known as swine enteric alphacoronavirus, was first identified in diarrheic piglets in 2017 in southern China [5]. SADS-CoV, a memer of the *Alphacoronavirus* genus, *Coronaviridae* family, is a single-stranded positive-sense RNA enveloped virus with an approximately 27 kb long virus genome that encodes 16 nonstructural proteins, 4 structural proteins, and 3 accessory proteins [11]. Bats are the reservoir host of SADS-CoV [5]. Additionally, SADS-CoV has broad cell tropism and an inherent potential to cross host species barriers for dissemination [4, 21]. Currently, there are no effective vaccines or antiviral drugs to treat SADS-CoV infection.

The spike (S) protein of the coronavirus is crucial component that plays a key role in the virus's ability to enter and infect host cells. The primary function of S protein is to recognize and bind to specific receptors on the surface of host cells [10]. The S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), binds to the angiotensin-converting enzyme 2 receptors on human cells [2]. The host receptor for SADS-CoV is not yet known. After binding to the host cell receptor, the S protein undergoes conformational changes that allow the virus to fuse with the host cell membrane [13]. This fusion process facilitates the entry of the viral genetic material into the host cell.

The S protein is typically a trimer which means that it exists as three identical subunits [10]. Each subunit is composed of two functional domains: the S1 domain responsible for receptor binding and the S2 domain responsible for membrane fusion (Fig. 1A). The S1 domain contains the receptor-binding domain (RBD), which is the region of the S protein that directly interacts with the host cell receptor [9]. The S2 domain contains the fusion peptide, heptad repeat regions, and transmembrane domain. The fusion peptide is critical for the fusion of the viral and host cell membranes and allows the virus to enter the host cell. Understanding the structure and function of the coronavirus S protein is crucial for the development of antiviral drugs and vaccines.

The heptad repeat regions, also known as HR1 and HR2, are important for the fusion of the viral and cellular membranes. Proline is known for its unique structural characteristics, including the presence of a cyclic side chain, which can introduce kinks or bends in protein structures. Substituting proline in the heptad repeat regions may influence the overall conformation of the S protein and affect its ability to mediate membrane fusion.

*Received 09 December 2023, Revised 15 December 2023, Accepted 15 December 2023
† Corresponding Author: Jung-Eun Park, Tel: +82-42-821-6784, E-mail: jepark@cnu.ac.kr
Copyright © 2023 The Korean Society of Preventive Veterinary Medicine
The full text is freely available on the web at http://www.jpvm.kr

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	대한수의학회 2022년 추계학술대회	김진만, 박정은	2022.11.16. ~ 2022.11.18	제주국제컨벤션센터	대한민국
2	대한수의학회 2022년 추계학술대회	김진만, 윤재원, 박정은	2022.11.16. ~ 2022.11.18	제주국제컨벤션센터	대한민국
3	38th World Veterinary Association Congress	박정은	2023.04.26. ~ 2023.04.29.	Taipei Nangang Exhibition Center	대만
4	International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians 2023	김민희, 박정은	2023.06.29. ~ 2023.07.01	Lyon Convention Centre	프랑스
5	한국예방수의학회 정기학술대회	김민희, 박정은	2023.07.06. ~ 2023.07.07	충남대학교 국제문화회관	대한민국
6	한국예방수의학회 정기학술대회	Bac Tran Le, 박정은	2023.07.06. ~ 2023.07.07	충남대학교 국제문화회관	대한민국
7	한국미생물학회 국제학술대회 (MSK) 2023	Bac Tran Le, 김민희, 박정은	2023.10.25. ~ 2023.10.27	여수 엑스포컨벤션센터	대한민국
8	한국미생물학회 국제학술대회 (MSK) 2023	박정은, 백지혜, 이유민, 김민희, 조주혁	2023.10.25. ~ 2023.10.27	여수 엑스포컨벤션센터	대한민국
9	대한수의학회 2023년 추계국제학술대회	박정은, Bac Tran Le	2023.11.29. ~ 2023.12.02	제주국제컨벤션센터	대한민국

1	P-315 **The cytoplasmic tail of the *swine acute diarrhea syndrome coronavirus* spike protein facilitates expression at the cell surface** JinMan Kim, Jung-Eun Park* *Laboratory of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Chungnam National University*
2	P-001 **Furin cleavage is required for swine acute diarrhea syndrome coronavirus spike protein-mediated cell-cell fusion** JinMan Kim, Jaewon Yoon, Jung-Eun Park* *College of Veterinary Medicine, Chungnam National University*
3	WVAC 2023 Posters Wednesday, April 26 — Saturday, April 29 Poster Area Economic Animal: EA_014 **THE ROLE OF CYTOPLASMIC TAIL OF SWINE ACUTE DIARRHEA SYNDROME CORONAVIRUS SPIKE PROTEIN IN SUBCELLULAR LOCALIZATION**

<table>
<tr>
<td>4</td>
<td>
ISWAVLD 2023
International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians
29 JUNE-1 JULY 2023 Congress Centre Lyon
Towards the veterinary diagnostics of the future

1 July 2023, Montbonnot Saint Martin

ATTENDANCE CERTIFICATE

On behalf of the organizers of ISWAVLD 2023, we confirm the participation of :

Jung-Eun PARK

In the above-mentionned conference in Lyon, France from 29 June to 1 July 2023.

Family name : PARK
Firstname : Jung-Eun
Organisation : CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY

Should you need additional information, please do not hesitate to contact us by email at registration@iswavld2023.org

For the registration secretariat
Insight Outside
</td>
</tr>
<tr>
<td>5</td>
<td>
P-29

Development of multiplex reverse transcript real-time PCR for simultaneous detection of PEDV, PDCoV, and SADS-CoV

Ji Hye Baek[1], Yu-Min Lee[1], Min-Hui Kim[2], Joo Hyuk Cho[1], Jung-Eun Park[2*]

[1]Molecular Diagnostics Team, Genes Laboratories, Seongnam-si 13403, Republic of Korea
[2]College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea
</td>
</tr>
</table>

6	P-45 **Cytoplasmic Tail Truncation Affects Subcellular Localization of S and Cell-to-Cell Fusion and Enhances S Protein Incorporation into SADS-CoV Pseudovirions** Bac Tran Le[1], Jung-Eun Park[1,2*] *[1]Research Institute of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea* *[2]Laboratory of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea*
7	D055 **Molecular Characterization of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strains from Field Samples in South Korea** Bac Tran Le[1], Min-Hui Kim[2], and Jung-Eun Park[1,2*] *[1]Research Institute of Veterinary Medicine, Chungnam National University, [2]Laboratory of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Chungnam National University*
8	C055 **Development of Multiplex Reverse Transcript Real-Time PCR for Simultaneous Detection of PEDV, PDCoV and SADS-CoV** Jung Eun Park[1], Ji Hye Baek[2], Yu-Min Lee[2], Minhui Kim[1], and Joo Hyuk Cho[2*] *[1]Chungnam National University, [2]Genes Laboratories*
9	P-020 **Cytoplasmic Tail Truncation of SADS-CoV Spike Protein Facilitate Cell Surface Expression, Enhances Cell-to-Cell Fusion and S Protein Incorporation into Pseudovirions** **Jung-Eun Park*, Bac Tran Le** *College of Veterinary Medicine, Chungnam National University*

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	Porcine epidemic diarrhea virus strain South Korea/CNU-22S11/2022 spike protein gene, complete cds.	OR529200	GenBank	2023
2	Porcine epidemic diarrhea virus strain South Korea/CNU-22S16/2022 spike protein gene, complete cds.	OR529201	GenBank	2023
3	Porcine epidemic diarrhea virus strain South Korea/CNU-22S17/2022 spike protein gene, complete cds.	OR529202	GenBank	2023
4	Porcine epidemic diarrhea virus strain South Korea/CNU-22P1/2022 spike protein gene, complete cds.	OR529203	GenBank	2023
5	Porcine epidemic diarrhea virus strain South Korea/CNU-22P2/2022 spike protein gene, complete cds.	OR529204	GenBank	2023
6	Porcine epidemic diarrhea virus strain South Korea/CNU-22P4/2022 spike protein gene, complete cds.	OR529205	GenBank	2023
7	Swine acute diarrhea syndrome coronavirus isolate SADS-CoV/Vietnam/VNUA-TH02/2023 spike glycoprotein (S) gene partial cds.	PP062883	GenBank	2023
8	Swine acute diarrhea syndrome coronavirus isolate SADS-CoV/Vietnam/VNUA-TH03/2023 spike glycoprotein (S) gene partial cds.	PP062884	GenBank	2023
9	Swine acute diarrhea syndrome coronavirus isolate SADS-CoV/Vietnam/VNUA-HN01/2021 spike glycoprotein (S) gene partial cds.	PP062885	GenBank	2023
10	Swine acute diarrhea syndrome coronavirus isolate SADS-CoV/Vietnam/VNUA-BN01/2019 spike glycoprotein (S) gene partial cds.	PP062886	GenBank	2023

1~6	**GenBank OR529200-OR529205** 23-09-08 (금) 21:56 보낸사람 : gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov 수신차단하기 IP : 130.14.21.246 받는사람 : bac.le.dvm@gmail.com, jepark@cnu.ac.kr Dear GenBank Submitter: Thank you for your submission of sequence data to GenBank, a contribution which will benefit the scientific community. We have provided GenBank accession numbers for your nucleotide sequences: BankIt2741685 CNU-22S11 OR529200 BankIt2741685 CNU-22S16 OR529201 BankIt2741685 CNU-22S17 OR529202 BankIt2741685 CNU-22P1 OR529203 BankIt2741685 CNU-22P2 OR529204 BankIt2741685 CNU-22P4 OR529205
7~10	**GenBank PP062883-PP062886** 23-12-30 (토) 04:33 보낸사람 : gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov 수신차단하기 IP : 130.14.8.212 받는사람 : jepark@cnu.ac.kr, lephgnam98@gmail.com Dear GenBank Submitter: Thank you for your submission of sequence data to GenBank, a contribution which will benefit the scientific community. We have provided GenBank accession numbers for your nucleotide sequences: BankIt2780992 SADS-CoV/Vietnam/VNUA-TH02/2023 PP062883 BankIt2780992 SADS-CoV/Vietnam/VNUA-TH03/2023 PP062884 BankIt2780992 SADS-CoV/Vietnam/VNUA-HN01/2021 PP062885 BankIt2780992 SADS-CoV/Vietnam/VNUA-BN01/2019 PP062886

[기술적 성과]

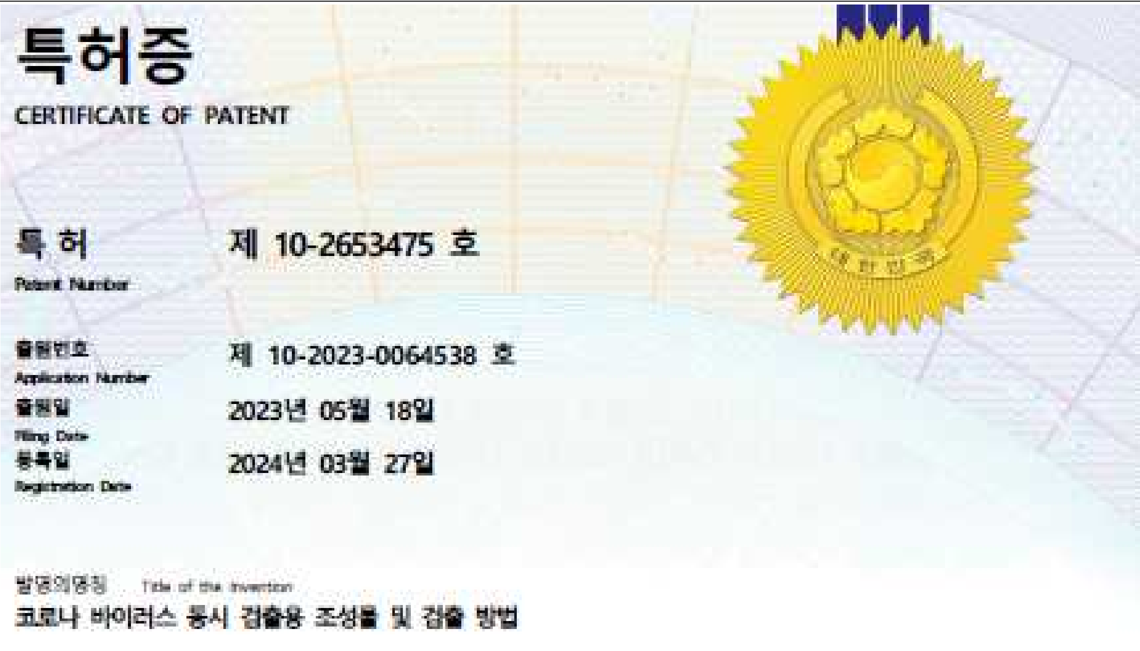
□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	돼지 급성설사 증후군 코로나바이러스 검출용 프라이머 세트	대한민국	㈜진스랩	2022.12.22	10-2022-0182276	10-2599751	㈜진스랩	2023.11.03	10-2599751	100	활용
2	코로나 바이러스 동시 검출용 조성물 및 검출방법	대한민국	충남대학교 산학협력단	2023.05.18	10-2023-0064538	10-2653475	충남대학교 산학협력단	2024.03.27	10-2653475	100	활용

1

특허증
CERTIFICATE OF PATENT
특 허 제 10-2599751 호
Patent Number
출원번호 제 10-2022-0182276 호
Application Number
출원일 2022년 12월 22일
Filing Date
등록일 2023년 11월 03일
Registration Date
발명의명칭 Title of the Invention
돼지 급성설사 증후군 코로나바이러스 검출용 프라이머 세트

2


특허증
CERTIFICATE OF PATENT
특 허 제 10-2653475 호
Patent Number
출원번호 제 10-2023-0064538 호
Application Number
출원일 2023년 05월 18일
Filing Date
등록일 2024년 03월 27일
Registration Date
발명의명칭 Title of the Invention
코로나 바이러스 동시 검출용 조성물 및 검출 방법

ㅇ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	√									
2	√									

□ 저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

□ 신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

□ 기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

□ 표준화

ㅇ 국내표준

번호	인증구분1」	인증여부2」	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류3」	제안/인증일자

* 1」 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
* 2」 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
* 3」 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

ㅇ 국제표준

번호	표준화단계구분1」	표준명	표준기구명2」	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식3」	제안자	표준화 번호	제안일자

* 1」 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
* 2」 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
* 3」 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	GCani SADS-CoV qRT-PCR Detection kit	2023.03	㈜진스랩	-	SADS-CoV 분자진단	-	-	-
2	GCani Swine Enteric Coronaviruses (PEDV, PDCoV and SADS-CoV) qRT-PCR Detection Kit	2023.03	㈜진스랩	-	PEDV, PDCoV, SADS-CoV 감별 분자진단	-	-	-

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식1」	사업화 형태2」	지역3」	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

* 1」 기술이전 또는 자기실시
* 2」 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
* 3」 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)		현재까지	3년 후	5년 후
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내			
		국외			
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)		현재	3년 후	5년 후
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			yyyy년	yyyy년	
합계					

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	
		생산인력	
	개발 후	연구인력	
		생산인력	

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

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

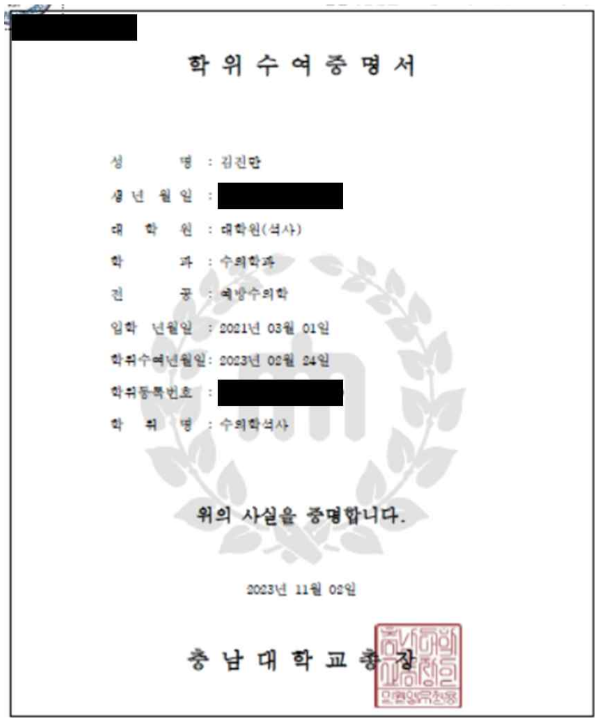
□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구 분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
1	석사	2023	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
2	석사	2023		2			1	1		2			

1	2


[redacted]

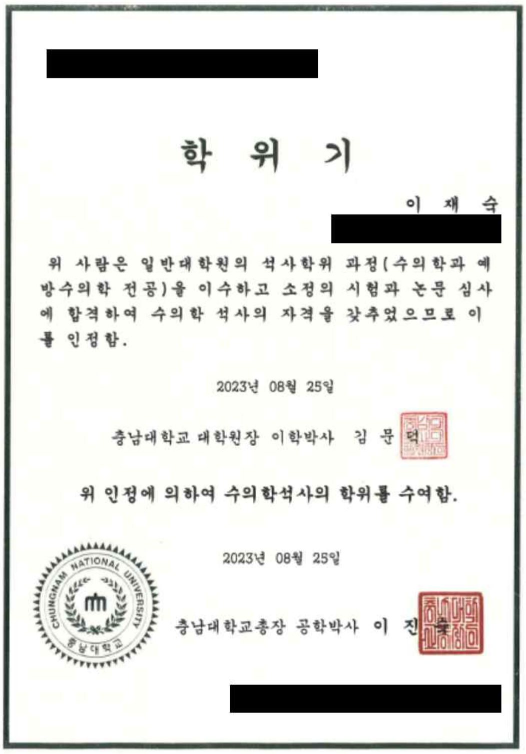
학 위 수 여 증 명 서

성 명 : 김건란
생 년 월 일 : [redacted]
대 학 원 : 대학원(석사)
학 과 : 수의학과
전 공 : 예방수의학
입학 년월일 : 2021년 03월 01일
학위수여년월일: 2023년 02월 24일
학위등록번호 : [redacted]
학 위 명 : 수의학석사

위의 사실을 증명합니다.

2023년 11월 02일

충 남 대 학 교 총 장


[redacted]

학 위 기

이 재 숙
[redacted]

위 사람은 일반대학원의 석사학위 과정(수의학과 예방수의학 전공)을 이수하고 소정의 시험과 논문 심사에 합격하여 수의학 석사의 자격을 갖추었으므로 이를 인정함.

2023년 08월 25일

충남대학교 대학원장 이학박사 김 문 덕

위 인정에 의하여 수의학석사의 학위를 수여함.

2023년 08월 25일

충남대학교총장 공학박사 이 진숙

[redacted]

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

□ 연구시설・장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설・장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설・장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

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

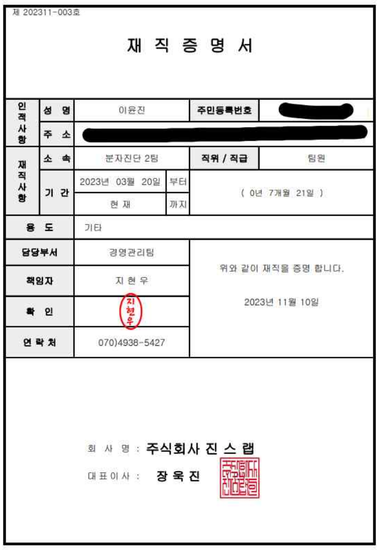
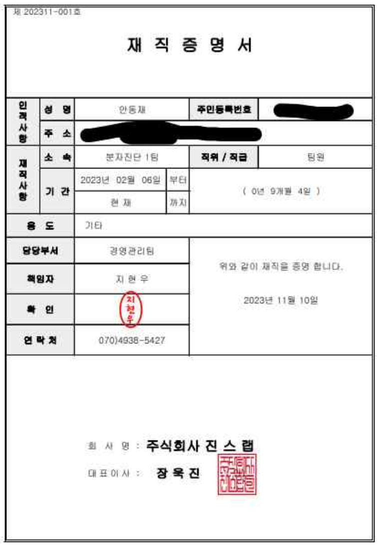
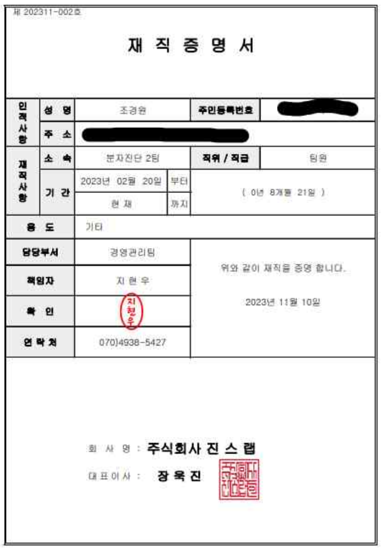
[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

현재 게재중인 논문성과

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	GALNT2 broadly restricts respiratory virus infections through modulating O-linked glycosylation	Science	Wei Ran	-	미국	AMER ASSOC ADVANCEMENT SCIENCE	SCIE	-	0036-8075	100
2	Detection of swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV) in pigs in Vietnam, 2019~2023	Veterinary Quarterly	Bac Tran Le	-	영국	Taylor & Francis	SCIE	-	0165-2176	100

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

고용창출 3건 (이윤진, 안동재, 조경원)

이윤진	안동재	조경원
		

제 202311-003호

재 직 증 명 서

인적사항	성 명	이윤진	주민등록번호 [redacted]
	주 소	[redacted]	
재직사항	소 속	분자진단 2팀	직위 / 직급: 팀원
	기 간	2023년 03월 20일 부터 현 재 까지	(0년 7개월 21일)
용 도	기타		
담당부서	경영관리팀	위와 같이 재직을 증명 합니다. 2023년 11월 10일	
책임자	지 현 우		
확 인	지현우		
연 락 처	070)4938-5427		

회 사 명 : 주식회사 진 스 랩

대표이사 : 장 욱 진

제 202311-001호

재 직 증 명 서

인적사항	성 명	안동재	주민등록번호 [redacted]
	주 소	[redacted]	
재직사항	소 속	분자진단 1팀	직위 / 직급: 팀원
	기 간	2023년 02월 06일 부터 현 재 까지	(0년 9개월 4일)
용 도	기타		
담당부서	경영관리팀	위와 같이 재직을 증명 합니다. 2023년 11월 10일	
책임자	지 현 우		
확 인	지현우		
연 락 처	070)4938-5427		

회 사 명 : 주식회사 진 스 랩

대표이사 : 장 욱 진

제 202311-002호

재 직 증 명 서

인적사항	성 명	조경원	주민등록번호 [redacted]
	주 소	[redacted]	
재직사항	소 속	분자진단 2팀	직위 / 직급: 팀원
	기 간	2023년 02월 20일 부터 현 재 까지	(0년 8개월 21일)
용 도	기타		
담당부서	경영관리팀	위와 같이 재직을 증명 합니다. 2023년 11월 10일	
책임자	지 현 우		
확 인	지현우		
연 락 처	070)4938-5427		

회 사 명 : 주식회사 진 스 랩

대표이사 : 장 욱 진

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

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

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

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

2) 목표 달성 수준

추 진 목 표	달 성 내 용	달성도(%)
○ SADS-CoV 기초기전 규명	○ CRISPR/Cas 스크리닝을 통한 숙주인자 발굴 ○ SADS-CoV 수용체 후보물질 발굴 ○ SADS-CoV 감염 매개 인자 규명 ○ SADS-CoV 감염기전 규명 ○ SADS-CoV 숙주특이성 평가 ○ SADS-CoV 인수공통감염성 평가	100
○ SADS-CoV 유전자 진단법 개발	○ SADS-CoV 단일진단법 확립 ○ SADS-CoV/PEDV/PDCoV 다중진단법 확립 ○ 진단법 유효성 평가 ○ 국내외 발생 양상 모니터링 ○ 시제품 제작 및 특허 등록	100

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

해당없음.

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

○ SADS-CoV 감염기전 및 제어인자 규명을 통한 사전대응 역량 강화 및 학문적 정보 제공
○ SADS-CoV 유입 및 발생시 조기대응을 위한 진단법 확보 및 바이러스 예찰
○ 국내외 돼지 코로나바이러스 발생 양상에 대한 모니터링 자료 및 유전정보 확보
○ 신규 바이러스 자원 확보를 통한 기초/기전 연구 활성화 및 유용 선도물질의 원천성 확보
○ 전염성 질병 연구를 위한 국제협력네트워크 구축

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

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

○ SADS-CoV 기초기전 연구
- Screening을 통해 식별된 숙주인자와 periostin이 SADS-CoV 감염에 미치는 영향을 규명하기 위한 추가 연구를 수행하고 논문을 통해 발표할 예정임.

○ SADS-CoV 단일 및 다중 진단법 개발
- SADS-CoV 단일 및 다중 진단에 대한 기존 특허를 기반으로 제품의 실용화를 위한 후속연구과제를 수주할 예정임.
- 현장진단기술을 접목하여 SADS-CoV 및 다른 돼지 장감염 바이러스의 현장진단법으로 고도화할 것임.
- SADS-CoV, PEDV, PDCoV 외의 TGEV, Rotavirus, ASFV, CSFV 같은 설사를 일으키는 바이러스를 추가하여 다중진단 플랫폼을 확립할 것임.

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1. 공통 요구자료	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
	3) 연구부정행위 예방 확인서
2.	1)
	2)

[뒷면지]

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술고도화지원사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술고도화지원사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.