RS-2022-IP122001

대사체 바이오마커 진단기술 개발

브루셀라 오진률 최소화를 위한

최종보고서

2023

농림식품기술기획평가원

농림축산식품부

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

가축질병대응기술고도화지원사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호
11-1543000-004655-01

브루셀라 오진률 최소화를 위한 대사체 바이오마커진단 기술 개발

2024. 06. 19.

주관연구기관 / 경상국립대학교 산학협력단
공동연구기관 / ㈜이지메스

농 림 축 산 식 품 부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “브루셀라 오진률 최소화를 위한 대사체 바이오마커진단 기술 개발”(개발기간 : 2022. 04. 01~ 2023. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

납본일자 2024.06.19.

주관연구기관명 : 경상국립대학교 산학협력단 (대표자) 정 재우 (인)
공동연구기관명 : ㈜이지메스 (대표자) 김 현진 (인)

주관연구책임자 : 김 석
공동연구책임자 : 김 현진
참여기관책임자 :

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

최종보고서

보안등급
일반[√], 보안[ ]

중앙행정기관명	농림축산식품부	사업명	사업명	가축질병대응기술개발사업
전문기관명 (해당 시 작성)			내역사업명 (해당 시 작성)	
공고번호	농축 2022-17호	총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
		연구개발과제번호		RS-2022-IP122001

기술분류							
국가과학기술 표준분류	LB0702	50 %	LB0701	30 %	LB0710	20 %
농림식품과학기술분류	RB0202	40 %	RB0203	30 %	RB0101	30 %

총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문	브루셀라 오진률 최소화를 위한 대사체 바이오마커진단 기술 개발
	영문	Development of high sensitive and specific diagnosis based on metabolomic biomarkers to deplete misdiagnosis for bovine Brucellosis
연구개발과제명	국문	브루셀라 오진률 최소화를 위한 대사체 바이오마커진단 기술 개발
	영문	Development of high sensitive and specific diagnosis based on metabolomic biomarkers to deplete misdiagnosis for bovine Brucellosis

주관연구개발기관	기관명	경상국립대학교 산학협력단	사업자등록번호	613-82-11653
	주소	(52828) 진주시 진주대로 501	법인등록번호	191171-0001552

연구책임자	성명		김석	직위	교수
	연락처	직장전화		휴대전화	
		전자우편		국가연구자번호	

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		560,000	14,000	126,000					574,000	126,000	700,000	
1단계	1년차	240,000	6,000	54,000					246,000	54,000	300,000	
	2년차	320,000	8,000	72,000					328,000	72,000	400,000	

공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고	
						역할	기관유형
공동연구개발기관	경상국립대학교 산학협력단	김석	교수			공동	대학
	㈜이지메스	김현진	대표이사			공동	중소기업
위탁연구개발기관							
연구개발기관 외 기관							

연구개발담당자 실무담당자	성명		최수진	직위	사무원
	연락처	직장전화		휴대전화	
		전자우편		국가연구자번호	

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

2024 년 06 월 19 일

주관연구책임자: 김 석 (인)
주관연구개발기관의 장: 경상국립대학교 산학협력단장 정재우 (직인)
공동연구개발기관의 장: ㈜이지메스 대표이사 김현진 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요 약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

<table>
<tr><td colspan="2">사업명</td><td colspan="3">2022년도 가축질병대응기술고도화 지원사업</td><td colspan="2">총괄연구개발 식별번호
(해당 시 작성)</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">내역사업명
(해당 시 작성)</td><td colspan="3"></td><td colspan="2">연구개발과제번호</td><td>RS-2022-IP122001</td></tr>
<tr><td rowspan="2">기술분류</td><td>국가과학기술 표준분류</td><td>LB0702</td><td>50%</td><td>LB0701</td><td>30%</td><td>LB0710</td><td>20%</td></tr>
<tr><td>농림식품 과학기술분류</td><td>RB0202</td><td>40%</td><td>RB0203</td><td>30%</td><td>RB0101</td><td>30%</td></tr>
<tr><td colspan="2">총괄연구개발명
(해당 시 작성)</td><td colspan="6">브루셀라 오진률 최소화를 위한 대사체 바이오마커진단 기술 개발</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제명</td><td colspan="6">브루셀라 오진률 최소화를 위한 대사체 바이오마커진단 기술 개발</td></tr>
<tr><td colspan="2">전체 연구개발기간</td><td colspan="6">2022. 04. 01 - 2023. 12. 31(1년 9개월)</td></tr>
<tr><td colspan="2">총 연구개발비</td><td colspan="6">총 700,000천원
(정부지원연구개발비: 560,000천원, 기관부담연구개발비 : 140,000 천원,
지방자치단체지원연구개발비: 천원, 그 외 지원연구개발비: 천원)</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발단계</td><td colspan="3">기초[ ] 응용[ ] 개발[√]
기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]</td><td colspan="2">기술성숙도
(해당 시 작성)</td><td>착수시점 기준(5)
종료시점 목표(8)</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제 유형
(해당 시 작성)</td><td colspan="6">고민감도 진단기술 개발</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제 특성
(해당 시 작성)</td><td colspan="6">혈청학적 진단기술 고도화</td></tr>
<tr><td rowspan="4">연구개발
목표 및 내용</td><td colspan="2">최종 목표</td><td colspan="5">○ 소 브루셀라 진단의 오진으로 인해 발생농가의 동거축 이동 제한, 재검사, 비감염축 살처분과 같은 피해는 물론 국가 방역 신뢰 저하로 끊임없는 방역 분쟁이 발생하고 있음
○ 본 연구의 최종 목표는 브루셀라 감염 소의 혈청에 대하여 대사체 분석을 통해 특징적으로 발현된 바이오마커를 이용 브루셀라 감염증 오진률을 최소화 하는 고민감도 진단기법을 개발하는데 있음</td></tr>
<tr><td colspan="2">전체 내용</td><td colspan="5">○ 소 브루셀라증에서 특이적으로 발현하는 대사체와 질병과의 상관관계 규명(10종 이상)
○ 브루셀라 감염 대응 특이 대사체 성분 규명
○ 발굴 대사체 유용 분석기법 확립 및 진단 적용
○ 대사체 대응 단클론 항체 제작 및 혈청학적 진단 기술 확립
○ 대사체 기반 고민감도 진단기법 산업화</td></tr>
<tr><td rowspan="2">1단계
(해당 시 작성)</td><td>목표</td><td colspan="5">○ 브루셀라 감염 소의 혈청에 대하여 대사체 분석을 통해 특징적으로 발현된 바이오마커를 이용 브루셀라 감염증 고민감도 진단기법을 개발</td></tr>
<tr><td>내용</td><td colspan="5">○ 소 브루셀라증에서 특이적으로 발현하는 대사체와 질병과의 상관관계 규명(10종 이상)
○ 브루셀라 감염 대응 특이 대사체 성분 규명
○ 발굴 대사체 유용 분석기법 확립 및 진단 적용
○ 대사체 대응 단클론 항체 제작 및 혈청학적 진단 기술 확립
○ 대사체 기반 고민감도 진단기법 경제성 평가 및 산업화</td></tr>
</table>

연구개발성과	○ 소 브루셀라증에서 특이적으로 발현하는 대사체와 질병과의 상관관계 규명하였으며, 이들 대사체를 이용한 발병기전 해석과 진단적 가치를 평가함 ○ 소 브루셀라증에서 발현하는 대사체/유전체를 이용한 진단법 구축함 ○ 대사체를 이용한 소 브루셀라증 유용 분석기법을 확립 및 진단법을 제시함 ○ 특이적 대사체에 대응하는 단클론 항체를 제작하여 진단적 가치 규명함 ○ 소 브루셀라증에 특이적인 대사체 관련 유전자를 이용한 고민감도 진단법 확립 ○ 브루셀라증 감염기전 및 진단법 관련 국내외 전문 학술지 5편 이상, 기술이전 2건 이상, 시제품 1건 및 산업화를 위한 기반 구축 함
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	○ 브루셀라 의양성 반응에 의한 경제적/사회적 피해 최소화 ○ 면역반응에 의해 초래되는 낮은 민감도, 오진, 교차반응 등 진단적 단점 극복 ○ 세포내 기생성 난치성 질병 극복을 위한 토대구축 ○ 브루셀라 감염병 발병기전 및 신개념 진단법 제시 ○ 개발된 진단의 해외 수출을 통한 국가 경쟁력 제고

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
	5											

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)	소 브루셀라병	대사체 분석	바이오마커	오진	혈청 진단법
영문핵심어 (5개 이내)	Bovine brucellosis	metabolomics	biomarker	misdiagnosis	serological diagnosis

210mm×297mm[(백상지(80g/m^2) 또는 중질지(80g/m^2)

(23쪽 중 4쪽)

210mm×297mm[(백상지(80g/m^2) 또는 중질지(80g/m^2)

(23쪽 중 5쪽)

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 ····· 7

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 ····· 9

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 ····· 14

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성) ····· 81

5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여정도 ····· 82

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 ····· 82

별첨 자료 (참고 문헌 등)

1. 연구개발과제의 개요

1) 국내 발병 및 피해 현황

○ 세포내 기생성 세균의 종류는 매우 다양하며, 브루셀라, 살모넬라, 대장균, 리스테리아, 결핵, 레지오넬라 등은 국내에서도 법정 전염병에 속하는 공중보건학적으로 매우 중요한 세균이 대부분임. 특히, 브루셀라균은 대표적인 인수공통 전염병의 하나이며 국내는 물론 전 세계적으로 공중보건학적, 경제학적 심각한 문제를 야기함(인체;4군법정전염병, 가축;2종법정전염병).

2) 세포내 기생성 세균의 특성

○ 세포내 기생성 세균은 **세포내에서 증식**하며 발병을 일으키기 때문에 동물과 인체감염의 경우 짧게는 수주에서 길게는 수년간의 항생제 치료가 필요하며, 다량의 항생제 복용으로 인한 후유증 등으로 인하여 치료방법에 대한 개선이 시급한 실정이며, 완치로 판단되었어도 수년 이내에 재발되는 경우가 많아 지속적 관찰이 요구되는 심각한 질병임.

○ 세포내 기생성 세균 중 *Brucella* 균은 대표적인 인수공통 전염병으로, 감염증의 증상은 브루셀라에 감염될 경우 **10% 미만의 치사율**을 보이고, 지속적 발열, 두통, 식욕부진, 원기쇠약을 보이다가 **심내막염**, **뇌척수염**, **관절염** 등 중증 질병으로 진행되며, 심한경우 사망에 이르기도 함 (그림. 1).

○ 특히, 이들 세균은 감염환자 및 감염축에 감염하여 특별한 외부 증상 없이 균을 장기간 보균하며, **지속적으로 균 배출**하여 인체와 건강한 동물에 감염증을 유발함으로서 감염율의 폭발적 증가를 유발함(그림 2).

그림. 1. 브루셀라 감염증의 주요 임상 증상

그림 2. 2021년도 브루셀라 감염증 폭발적 증가

3) 현행 브루셀라 진단방법의 문제점

○ 현재 동물 브루셀라의 진단 방법으로서는 혈액 배양을 통한 균의 분리 동정, PCR, STA, 보체결합반응, Milk ring test, Rose Bengal test, Coomb's test, Counterimmuno- electrophoresis, indirect hemolysis, AGID, Brucellin skin test 등 다양한 방법이 제시되고 있으며, 사람에 있어서의 진단법은, 동물과 마찬가지로 혈액 배양을 통한 균의 분리 동정, PCR, STA, ELISA, Rose Bengal test등 다양한 방법이 제시되고 있음(그림 3).

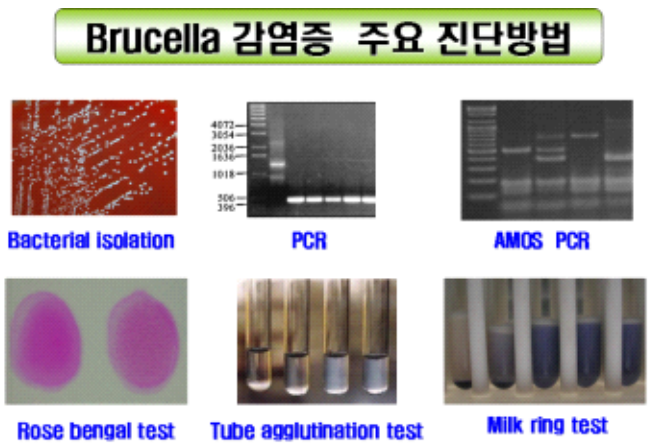


그림 3. 브루셀라 진단을 위한 주요 진단방법 (농림축산검역본부)

○ 그러나, 현재 사용되고 있는 진단 방법은 균 분리의 어려움, PCR에서의 낮은 검출률, 혈청학적 진단에서의 낮은 민감도와 다른 질병과의 교차 반응(*Y. entericolitica* O:9, *Salmonella*, *E. coli* 등) 으로 인하여 브루셀라 감염증을 진단하고 근절하는데 상당히 어려운 상황임.

○ 현재 국내의 브루셀라 감염증의 증가로 인체 및 동물유래의 야외주가 다수 분리되고 있으나, 진단상

의 어려움을 겪고 있으며, 야외주에 대한 병원성 및 항원성에 대한 연구 연구가 미흡하여, 병원성 요인의 분석, 감염경로 및 발병기전에 대한 기초적 자료가 거의 없는 실정이고, 이에 따라 브루셀라 감염증에 대한 대책 마련에 상당한 어려움을 겪고 있음 (그림 4).

그림 4. 현행 브루셀라 진단방법의 문제점

○ 균의 오염에 따른 숙주내 단백질들의 변화에 대한 연구는 지속적으로 연구되고 있지만, 생체 표현형과 가장 밀접한 대사물질들의 변화 연구는 거의 진행되고 있지 않음 (Pubmed 2022.02 기준, 논문 6편).

○ 대사체기반 관련 국내연구는 전혀 없으며 해외의 연구도 도입 초기단계에 머물러 있는 실정임.

4) 대사체 분석의 감염병 진단 적용 의의

○ 최근의 진단기술은 단순한 항원-항체 반응에 기초한 방법에 더하여 숙주 대사체 분석을 통한 biomarker의 발굴 및 이를 이용한 진단기법 개발이 다각도로 진행되고 있으며, 특히 감염병의 진단에 있어서 대사체의 이용은 고민감도 진단법 개발에 핵심사안으로 평가되고 있음(그림 5).

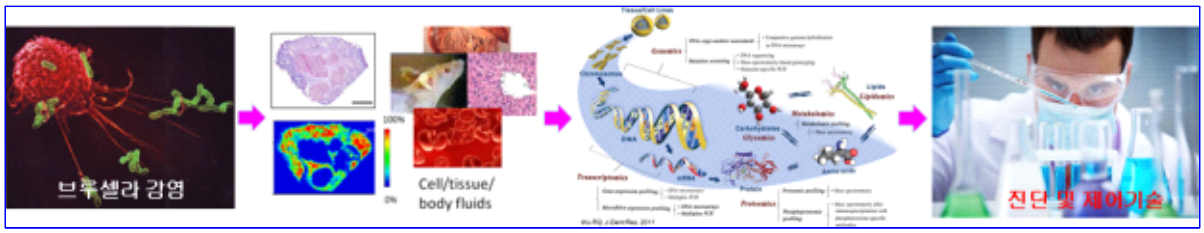


그림 5. 대사체 분석을 통한 브루셀라 감염증 진단 및 제어기술 흐름도

○ 최근 진단상 어려움을 겪고 있는 결핵이나 세포기생 세균성 감염병에 대한 대사체 분석과 이를 활용한 및 진단법 개발이 활발하게 진행되고 있으나, 브루셀라증에 대한 적용은 미흡함 (그림 6).

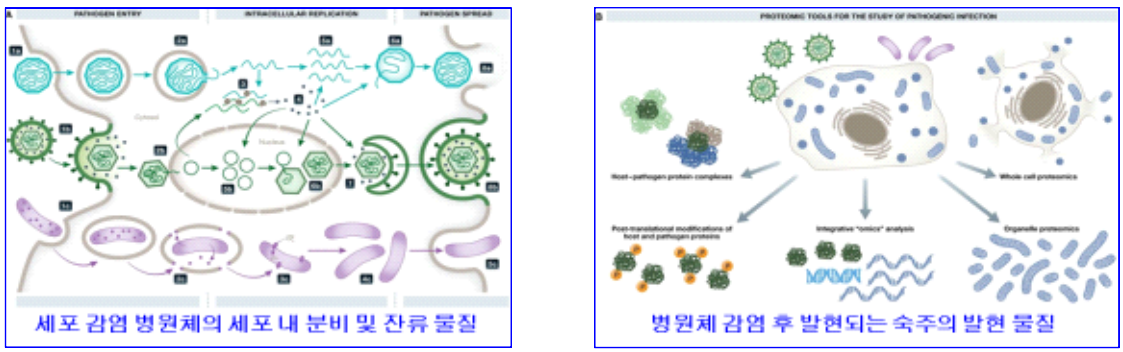


그림 6. 세포 감염 후 세포내외에 존재하는 병원체와 감염세포의 Biomarker 물질 (Nature, 2016)

5) 연구의 중요성 및 국가 연구개발비 지원의 필요성

○ 국내 세포내 기생성 세균 감염증은 최근 인체감염증 뿐만 아니라 가축에 폭발적으로 증가하여

국민보건을 심각하게 위협하고 있음.

○ 특히, 국내의 경우 브루셀라병, 우결핵병 등을 박멸하기 위한 정책으로 양성우에 대한 살처분(도태) 보상비용을 년간 수 백억원 이상을 지출하고 있음.

○ 브루셀라병의 경우 혈청학적 진단이 부정확하여 의양성, 의음성 개체가 다수 발생되고 있고, 이러한 결과는 가축의 이동제한, 재검사 등으로 농가와 방역당국의 고충이 심각한 상황임.

○ 따라서, 현재의 브루셀라 진단에 따른 재검사와 의양성 개체 진단으로 인한 이동제한, 동거축의 재검사와같은 복잡한 진단방법을 단순화하고 감염축의 신속한 처리를 통해 질병의 확산 방지가 본 질병의 근절에 있어 핵심 사안이라 할 수 있음.

그림 7. 현행 소 브루셀라 진단 체계의 문제점과 개선안

6) 사업화 가능성

○ 시료 확보: 본 연구팀은 다년간 브루셀라증 관련 대사체 분석 연구를 수행하였으며, 농림축산 검역검사본부, 각 시도 가축위생 시험소와 공동으로 진양성 / 진음성 / 의양성 개체 500건 이상 확보 되어 있음

○ 대사체 분석방법 확립: LC/MS와 GC/MS 분석방법을 통해 세포, 혈청 및 감염 조직에 대한 생체 대사체 분석, 지표물질, 상관관계분석을 위한 프로토콜이 확립되어 있음

○ 브루셀라 대응 대사체 물질 발굴: 다년간의 연구수행을 통해 브루셀라증에서 특이적으로 발현되는 대사체 10종 이상 확보함

○ 대사체 분석기반 진단방법 확립: 확보된 대사체 바이오마커를 이용한 진단방법의 표준화를 수행하였으며, 이를 기반으로 한 소 브루셀라 진단기법을 획기적으로 개선 할 노하우를 축적하였음.

○ 발굴 대사체에 대한 대량 생산 및 항체에 기반한 진단기술 확립으로 비용절감과 경제성을 확보하여 사업화의 토대를 구축함

○ 발굴된 특이 생체지표 대사물질들 기반 대사경로를 이해할 수 있음으로 인해 균-숙주 상호작용 및 세포내 기생하는 브루셀라 감염증 제어기전 규명 연구의 기초자료로 활용될 수 있으며, 기존에 문제가 되고 있는 브루셀라 진단상의 문제점 (오진, 의양성, 의음성, 타 균과의 교차반응 등)을 획기적으로 해결 할 수 있기 때문에 현재 국내외에서 요구되는 수요는 폭발적으로 늘어날 것이며, 이에 대한 해결이 본 과제를 통하여 구현 될 것임.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1) 연구개발과제의 최종 목표

○ 브루셀라 감염증은 대표적인 인수공통전염병이지만, 현재까지 본 질병을 확진 할 수 있는 혈청학적 진단방법이 미흡한 실정임

○ 소 브루셀라 진단의 오진으로 인해 발생농가의 동거축 이동제한, 재검사, 비감염축 살처분과 같은 농가 피해는 물론 국가 방역 신뢰 저하로 끊임없는 방역 분쟁이 발생하고 있음
○ 본 연구의 최종 목표는 브루셀라 감염 소의 혈청에 대하여 대사체 분석을 통해 특징적으로 발현된 바이오마커를 이용 브루셀라 감염증 고민감도 진단기법을 개발하는데 있음

2) 연구개발과제의 단계별 목표

○ 본 연구의 최종 목표는 브루셀라 감염 소의 혈청에 대하여 대사체 분석을 통해 특징적으로 발현된 바이오마커를 이용 브루셀라 감염증 고민감도 진단기법을 개발하는데 있음

3) 연구개발과제의 내용

가. 주요 연구내용

(1) 대사체 분석 기반 브루셀라증 진단용 유용 바이오 마커 발굴 및 산업화

○ 소 브루셀라증에서 특이적으로 발현하는 대사체 발굴 (10종 이상)
  ◦ 확보된 브루셀라 소 혈청에 대한 대사체 분석(진양성, 진음성, 의양성, 위음성)
  ◦ 확보된 브루셀라 감염시기별 소 혈청에 대한 대사체 분석 (초기, 중기, 말기)
  ◦ 진단을 위한 최적 대사체 조합 설정
○ 발굴 대사체의 브루셀라 외 감염혈청과의 감별 분석(결핵, *Y. entericolitica* O9, 바이러스 등)
  ◦ 소 감염혈청과의 감별 분석 (우결핵, 바이러스 등)
  ◦ 교차반응 유발균 (*Y. enterocolitica* O9) 감염 혈청 대상 대사체 분석(소)
  ◦ 브루셀라 감염 후 발현되는 특정 대사체 선발
○ 발굴 대사체 분석방법 첨단화 및 대량 생산체계 구축
  ◦ 대사체 직접 분석 프로토콜 확립
  ◦ 특정 대사체, 대사체 유래 펩타이드 서열 등 분석
  ◦ 대사체 대량생산체계 구축
○ 개발 진단기술의 경제성 평가 및 산업화

(2) 브루셀라 감염과 숙주 대사체 상관관계 및 진단적 가치 평가

○ 브루셀라 감염병에 대응하는 숙주 대사체의 항균 효과 증명 (실험동물 및 세포 실험)
  ◦ 발굴 대사체의 숙주 세포 독성 및 항균효과
  ◦ 발굴 대사체의 숙주 세포내 균 저해능력 평가
  ◦ 발굴 대사체의 균감염 대응기전 규명 (실험동물)
○ 발굴 대사체가 브루셀라 감염 숙주의 면역반응 유도 규명
  ◦ 발굴 대사체의 숙주 면역세포 활성 규명 (세포 및 실험동물)
  ◦ 발굴 대사체의 숙주 세포 내 균 저해 기전 해석 (NO, ROS, lysosome activation 등)
  ◦ 발굴 대사체의 실질 장기내 균 증식 저해기전 규명(실험동물)
○ 동물실험을 통한 브루셀라 특이적 대사체 발현 규명 (실험동물)
  ◦ 교차반응 유발균 (*Yersinia enterocolitica* O9, *E. coli* O157 등) 감염 혈청 대상 대사체 분석(기확보된 목적 동물 및 실험동물)

(3) 대사체 분석기법 및 진단기술 확립

○ 발굴 대사체 이용 분석기법 확립 및 진단 적용
  ◦ 특정 대사체 발현량 평가방법 수립
  ◦ Biomarker 기반 진단기술의 표준화
  ◦ Biomarker 기반 진단기술의 산업화
○ 대사체에 대한 단클론 항체 기반 혈청학적 진단 기술 확립 및 산업화
  ◦ 특정 대사체에 항원 확보
  ◦ 특정 대사체에 특이한 항체를 생산하는 하이브리도마 개발
  ◦ 특정 대사체에 특이한 단클론 항체 대량 생산
  ◦ 단클론 항체를 이용한 혈청학적 진단기술 확립(ELISA, Dip-stick, lateral flow assay 등)
  ◦ 기존 혈청 검사 결과와의 비교를 통해 민감도, 특이도 등 평가
  ◦ 브루셀라 오진률 최소화를 위한 진단법 확립
  ◦ 개발 진단기술의 경제성 평가 및 산업화

나. 연차별 연구내용 및 추진일정

(1) 브루셀라 감염과 숙주 대사체 상관관계 및 진단적 가치 평가 (주관연구기관)

구분	년도	연구목표	세부 연구목표	세부 연구개발 내용	추진일정			
					1분기 (1/4)	2분기 (2/4)	3분기 (3/4)	4분기 (4/4)
1차년도	2022	브루셀라 감염과 숙주 대사체 상관관계 및 진단적 가치 평가	◦ 브루셀라 감염병에 대응하는 숙주 대사체의 항균 효과 증명 (실험동물 및 세포 실험)	▸발굴 대사체의 숙주 세포 독성 및 항균효과				
				▸발굴 대사체의 숙주 세포내 균 저해능력 평가				
				▸발굴 대사체의 균감염 대응기전 규명 (실험동물)				
		대사체 분석 기법 및 진단기술 확립	◦ 발굴 대사체 이용 분석기법 확립 및 진단 적용	▸특정 대사체 발현량 평가방법 수립				
				▸Biomarker 기반 진단기술의 표준화				
				▸Biomarker 기반 진단기술의 산업화				
2차년도	2023	브루셀라 감염과 숙주 대사체 상관관계 및 진단적 가치 평가	◦ 발굴 대사체가 브루셀라 감염 숙주의 면역반응 유도 규명	▸발굴 대사체의 숙주 면역세포 활성 규명 (세포 및 실험동물)				
				▸발굴 대사체의 숙주 세포 내 균 저해 기전 해석 (NO, ROS, lysosome activation 등)				
				▸발굴 대사체의 실질 장기내 균 증식 저해기전 규명(실험동물)				
			◦ 동물실험을 통한 브루셀라 특이적 대사체 발현 규명 (목적 및 실험동물)	▸교차반응 유발균 (*Yersinia enterocolitica* O9, *E. coli* O157 등) 감염 혈청 대상 대사체 분석(기 확보된 목적 동물 및 실험동물)				
		대사체 분석 기법 및 진단기술 확립	◦ 대사체에 대한 단클론 항체 기반 혈청학적 진단 기술 확립 및 산업화	▸특정 대사체에 항원 확보 ▸특정 대사체에 특이한 항체를 생산하는 하이브리도마 개발				
				▸특정 대사체에 특이한 단클론 항체 대량 생산 ▸단클론 항체를 이용한 혈청학적 진단기술 확립(ELISA, Dip-stick, lateral flow assay 등)				
				▸기존 혈청 검사 결과와의 비교를 통해 민감도, 특이도 등 평가 ▸브루셀라 오진률 최소화를 위한 진단법 확립 ▸개발 진단기술의 경제성 평가 및 산업화				

(2) 대사체 분석 기반 브루셀라증 진단용 유용 바이오 마커 발굴 및 산업화 (제 1 공동연구기관)

구분	년도	세부 연구목표	세부 연구개발 내용	추진일정			
				1분기 (1/4)	2분기 (2/4)	3분기 (3/4)	4분기 (4/4)
1차년도	2022	◦ 소 브루셀라증에서 특이적으로 발현하는 대사체 발굴 (10종 이상)	▸ 확보된 브루셀라 소 혈청에 대한 대사체 분석(진양성, 진음성, 의양성, 위음성) ▸ 확보된 브루셀라 감염시기별 소 혈청에 대한 대사체 분석 (초기, 중기, 말기)				
			▸ 진단을 위한 최적 대사체 조합 설정				
		◦ 발굴 대사체의 브루셀라 외 감염혈청과의 감별 분석(결핵, *Y. entericolitica* O9, 바이러스 등)	▸ 소 감염혈청과의 감별 분석 (우결핵, 바이러스 등) ▸ 교차반응 유발균 (*Y. enterocolitica* O9) 감염 혈청 대상 대사체 분석 (소)				
			▸ 브루셀라 감염 후 발현되는 특정 대사체 선발				
2차년도	2023	◦ 발굴 대사체 분석방법 첨단화 및 대량 생산체계 구축	▸ 대사체 직접 분석 프로토콜 확립 ▸ 특정 대사체, 대사체 유래 펩타이드 서열 등 분석 ▸ 대사체 대량생산체계 구축				
		◦ 개발 진단기술의 경제성 평가 및 산업화	▸ 개발 진단기술의 경제성 평가 및 산업화				

다. 연구방법

○ 브루셀라 감염 모델

◦ 실험동물: 마우스 감염실험을 통해 혈청 및 조직 확보 됨

◦ 목적동물:

-몽골 국립 수의연구소와 공동으로 소 브루셀라 감염실험을 통해 혈청 및 조직 확보 됨

-교차반응 유발균 (*Yersinia enterocolitica* O9, *E. coli* O157 등) 확보 됨

-브루셀라 외 감염혈청: 우결핵 및 바이러스 혈청 200건 이상 확보 됨

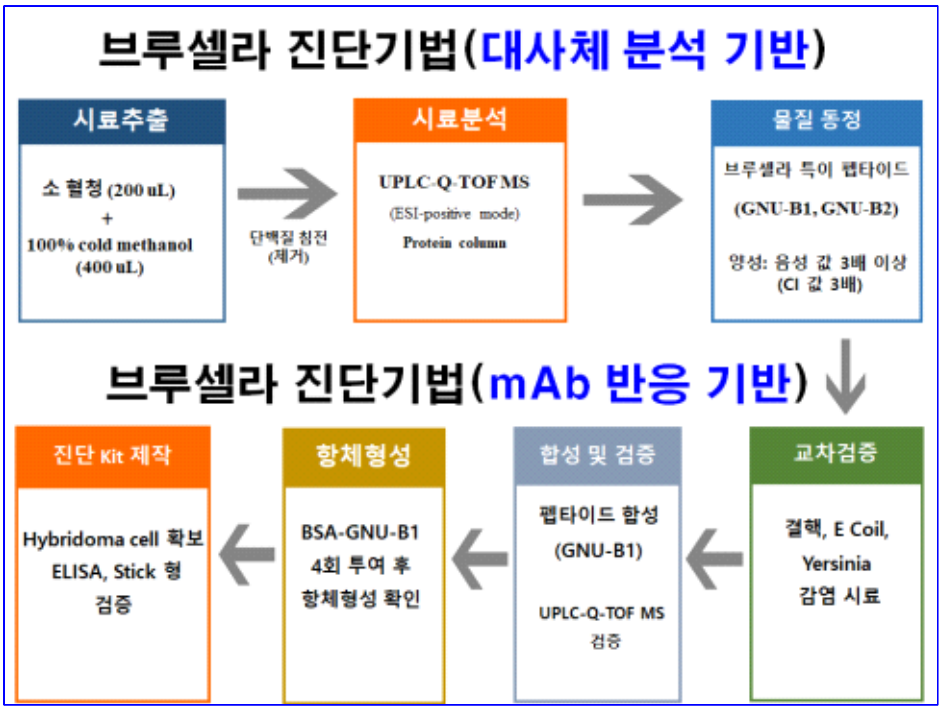


그림 8. 브루셀라 오진률 최소화 진단기법 연구개발 흐름도

○ 브루셀라병 관련 혈청시료 확보

◦ 혈청검사(STAT, ELISA, FPA)별: 진양성 / 진음성 / 의양성 개체 총 500건 이상 확보 (농림축산검역본부 및 시도 가축위생시험소를 통해 기 확보 됨)

○ 대사체 분석방법

◦ LC/MS와 GC/MS를 이용하여 브루셀라 균의 대사체 분석

▸ 세포 감염시 세포내외 존재하는 균의 대사체 분석

▸다변량통계분석 및 관련 지표물질 발굴

◦ LC/MS와 GC/MS를 이용하여 브루셀라 균을 감염시킨 숙주의 대사체 분석

▸숙주 대식구의 브루셀라 균 감염 후 숙주동물의 혈액, 소변 및 조직 대사체 분석

▸발굴한 혈액, 소변 및 조직 대사체 특성분석

▸다변량통계분석에 의한 숙주세포 대사체 발굴

▸발굴된 대사체와 감염과의 상관관계 규명

◦ LC/MS와 GC/MS를 이용하여 세포 및 목적 동물별 감염/치료제 처리에 따른 세포 및 생체 대사체 분석, 지표물질 발굴, 상관관계분석을 통한 진단적 가치평가

▸실험/목적동물 감염 후 혈액, 소변 및 조직 대사체 분석

▸감염숙주 지표 대사체 발굴

▸발현 대사체의 진단적 효능 평가

▸대사체 분석을 이용한 진단적 가치 평가 (제 1 공동)

▸타 병원균 감염과 공통 발현 대사체 규명 (*Y. entericolitica* O9, *E. coli* O157 등)

▸브루셀라 고유의 발현 대사체 선발

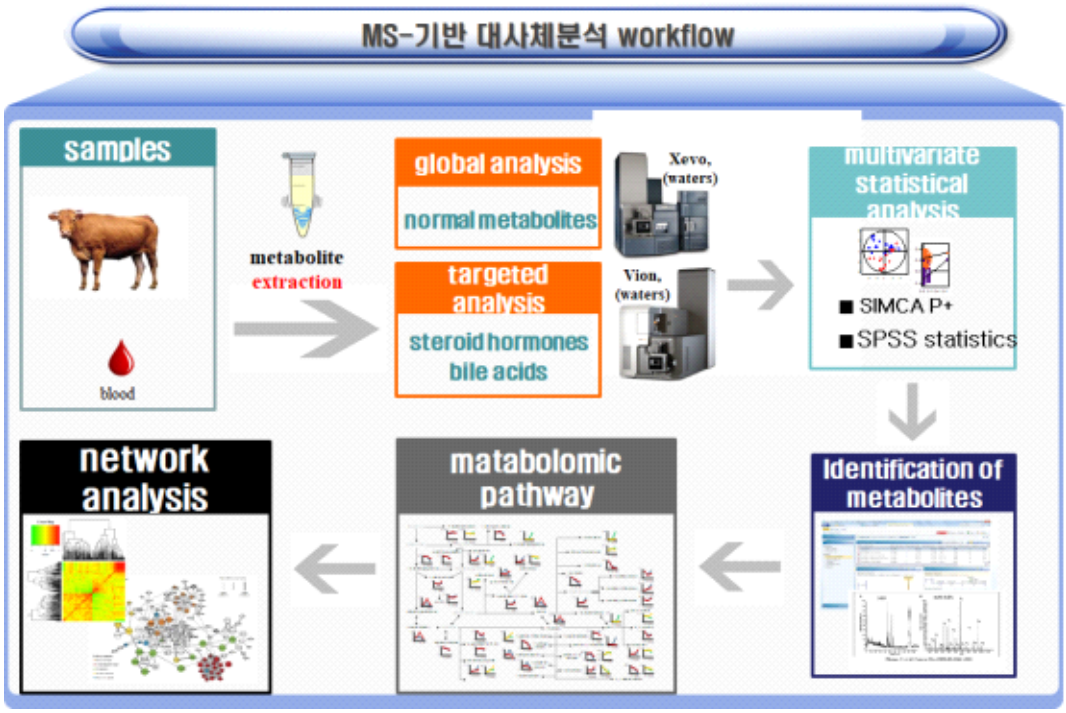


그림 9. 대사체 분석 기반 연구개발 흐름도

○ 숙주 대사체의 항균 효과 증명 (실험동물 및 세포 실험)

◦ 발굴 대사체의 농도별 숙주 세포(소유래 MBDK, 마우스 유래 RAW 263.7 등) 독성 평가

◦ 발굴 대사체의 농도별 브루셀라 균 직접 항균효과

◦ 발굴 대사체의 농도별 브루셀라 균 숙주세포 침입능력 평가

◦ 발굴 대사체의 농도별 브루셀라 균 숙주세포 증식능력 평가

◦ 발굴 대사체의 농도별 브루셀라 균 숙주세포 탐식경로 해석

○ 발굴 대사체가 브루셀라 감염 숙주의 면역반응 유도 규명

◦ 발굴 대사체의 숙주 면역세포 활성 규명: 혈중 싸이토카인 생산량 및 세포 내 유전발현량평가 등

◦ 발굴 대사체의 숙주 세포 내 균 저해 기전 해석 (NO, ROS, lysosome activation, protein 발현 등)

◦ 발굴 대사체의 실질 장기내 균 증식 저해기전 규명: 실질 장기내 균 분포, 실질 장기의 병변 변화, 실질장기 내 균 사멸 정도 등)

○ 동물실험을 통한 브루셀라 특이적 대사체 발현 규명 (목적동물 및 실험동물)

◦ 교차반응 유발균 (*Yersinia enterocolitica* O9, *E. coli* O157 등) 감염 혈청 대상 대사체 분석(목적동물 및 실험동물)

○ 대사체 분석기반 진단방법확립

◦ Biomarker 기반 진단기술의 표준화

▸확보 biomarker 진단을 위한 프로토콜 제시 (샘플량, 전처리기술, 적용량, 유용 분석방법)

▸ 확보 biomarker의 브루셀라 감염에 따른 cut-off value 설정 및 진단기준 확립
▸ 기존 혈청 검사 결과와의 비교를 통해 민감도, 특이도 등 평가
▸ 핵심 biomarker를 이용한 진단방법 표준화

○ 특정 대사체에 대한 단클론 항체 개발
▸ 특정 대사체에 항원 준비 및 면역(1-4차 면역)
▸ 세포융합 및 클로닝을 통한 하이브리도마 개발
▸ 하이브리도마가 생산하는 항체 특성 확인(ELISA, Western blot)
▸ 특정 대사체에 특이한 단클론 항체를 생산하는 단일클론 하이브리도마 확보
▸ 특정 대사체에 특이 단클론 항체 대량 생산

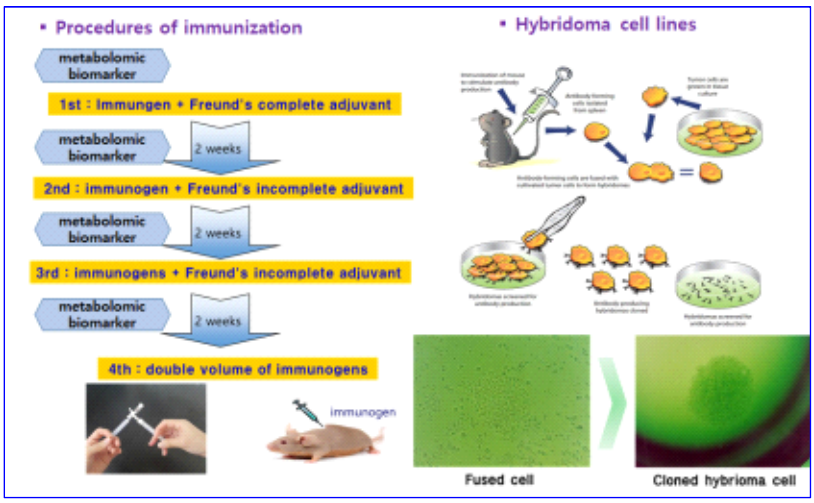


그림 10. 특정 대사체 특이 단클론 항체 확보을 위한 하이브리도마 개발 과정

○ 브루셀라 오진률 최소화를 위한 혈청학적 진단법 확립
▸ 대상 대사체에 따른 ELISA 포맷 개발(sandwich ELISA, indirect ELISA)
▸ 금나노입자(gold nanoparticl; GNP) 기반 dip-stick assay또는 lateral flow assay 개발
▸ 개발 진단 기술의 안정성 평가 및 산업화

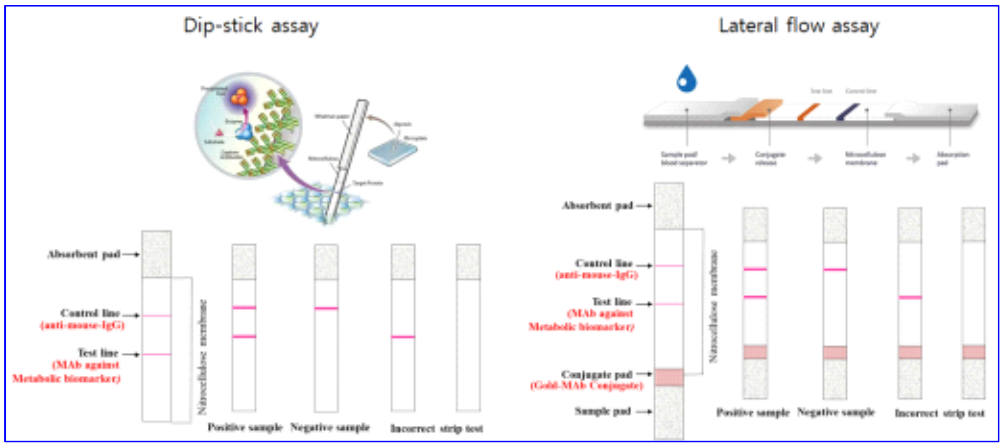


그림 11. Dip-stick assay와 lateral flow assay의 구조 및 진단원리

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

(1) 브루셀라 감염과 숙주 대사체 상관관계 및 진단적 가치 평가

가. 브루셀라 감염병에 대응하는 숙주 대사체의 항균 효과 증명 (실험동물 및 세포 실험)

① 숙주 대사체 simvastatin의 브루셀라 감염 저해능력 규명: 브루셀라 감염시 발현되는 숙주 대사체 중 simvastatin이 브루셀라 감염된 마우스에서 병원성 발현 저해 및 세포내 브루셀라증 치료에 중요한 역할을 담당하는 것으로 확인되어 브루셀라 감염증에있어서 유용한 바이오마커로서 작용이 가능할 것으로 판단되어 이에 대한 규명을 수행하고 있음 (그림11-17).

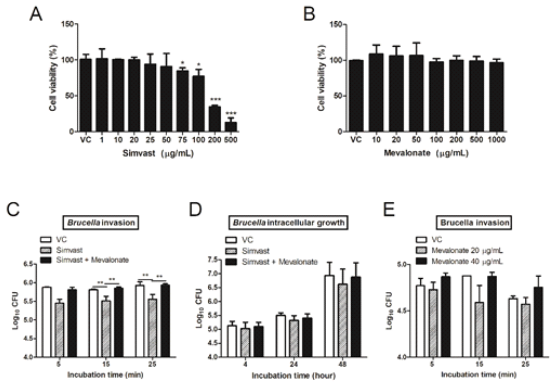


그림 12. 숙주 대사체인 Simvastatin과 mevalonic acid처리한 대식구 세포독성과 브루셀라 균 감염에 미치는 영향 분석

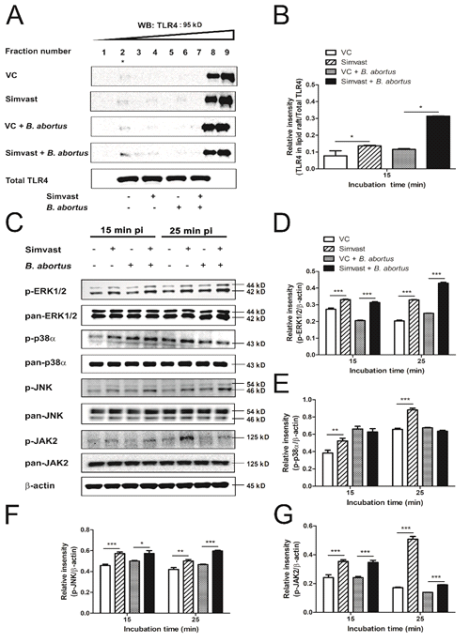


그림 13. 숙주 대사체인 simvastatin의 브루셀라 감염 초기에 나타나는 세포 신호전달 체계에 미치는 영향 분석

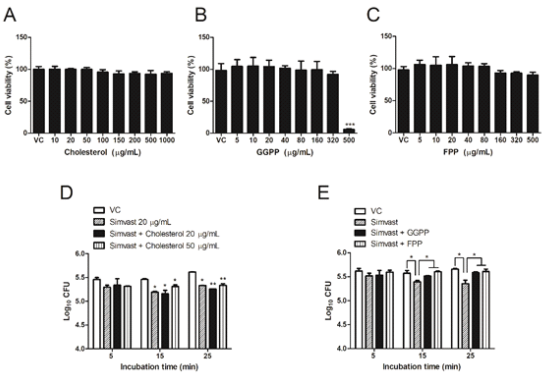


그림 14. 숙주 대사체인 simvastatin의 대사산물 GGPP과 FPP이 브루셀라균의 대식구내 침입에 미치는 영향 분석

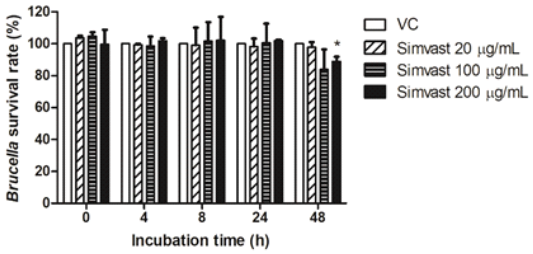


그림 15. 숙주 대사체인 simvastatin이 브루셀라 균에 대한 항균효과 규명 (0, 4, 8, 24, and 48 h 처리)

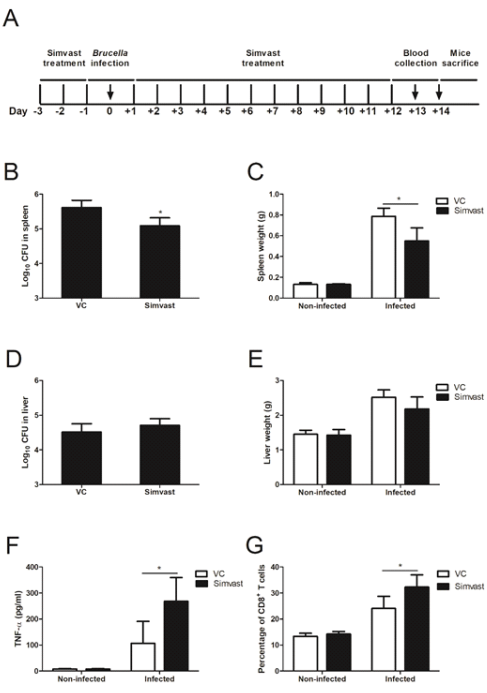


그림 16. 숙주 대사체인 simvastatin이 브루셀라 마우스 감염 치료 효과 규명

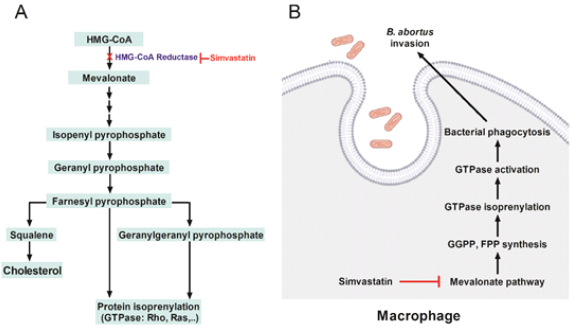


그림 17. 숙주 대사체인 simvastatin의 브루셀라 균 감염에 미치는 영향 모식도

② **숙주 대사체 lipoxygenase(LOX) pathway 저해제인 Nordihydroguaiaretic acid (NDGA)의 브루셀라 감염 저해능력 규명:** 브루셀라 감염시 발현되는 숙주 대사체 lipoxygenase pathway의 저해제인 Nordihydroguaiaretic acid (NDGA)이 브루셀라에 대한 항균효능 및 세포내 침입을 억제하는 기전이 밝혀 졌으며, 감염 후 다양한 면역반응 물질의 활성을 유도하여 브루셀라 감염증 치료 및 예방에 유용한 물질임이 밝혀짐 (그림18-22).

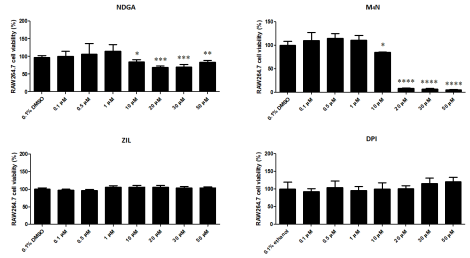


그림 18. 숙주 대사체 lipoxygenase(LOX) pathway 저해제인 NDGA, M_4N, ZIL, DPI의 대식구 세포독성 (48h)

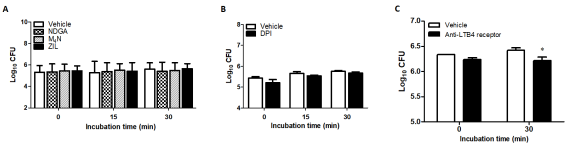


그림 19. 숙주 대사체 lipoxygenase(LOX) pathway 저해제인 NDGA, M_4N, ZIL, DPI의 대식구내 브루셀라균 탐식에 미치는 영향 분석

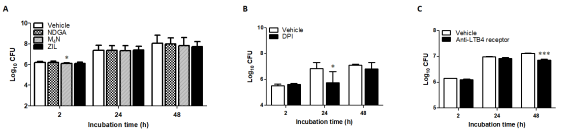


그림 20. 숙주 대사체 lipoxygenase(LOX) pathway 저해제인 NDGA, M_4N, ZIL, DPI의 대식구내 브루셀라균 증식에 미치는 영향 분석

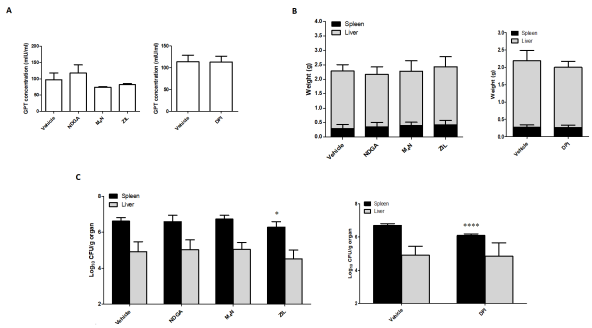


그림 21. 숙주 대사체 lipoxygenase(LOX) pathway 저해제인 NDGA, M_4N, ZIL, DPI의 마우스 처리에 따른 감염 예방능력 평가

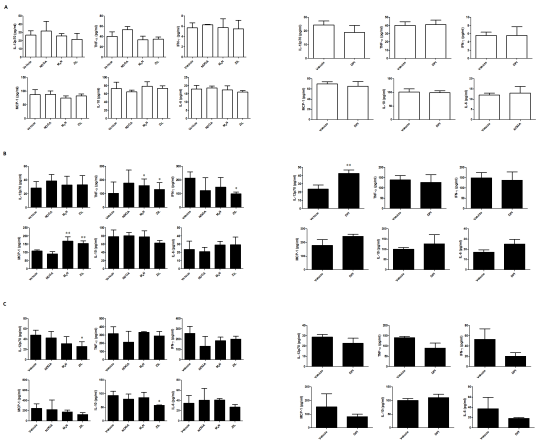


그림 22. 숙주 대사체 lipoxygenase(LOX) pathway 저해제인 NDGA, M_4N, ZIL, DPI의 처리가 브루셀라 감염 마우스의 면역물질 분비에 미치는 영향 분석

③ **숙주 대사체 조절인자인 SIRT1 activators 의 브루셀라 감염 저해능력 규명**: 브루셀라 감염시 발현되는 숙주 대사체 조절물질 중 Sirtuin 1 family의 하나인 SIRT1의 활성이 마우스와 마우스 유래 대식구 모델에서 브루셀라에 대한 항균효능 및 세포내 침입을 억제하는 기전이 밝혀 졌으며, 감염 후 다양한 면역반응 물질의 활성을 유도하여 브루셀라 감염증 치료 및 예방에 유용한 물질임이 밝혀짐 (그림23-26).

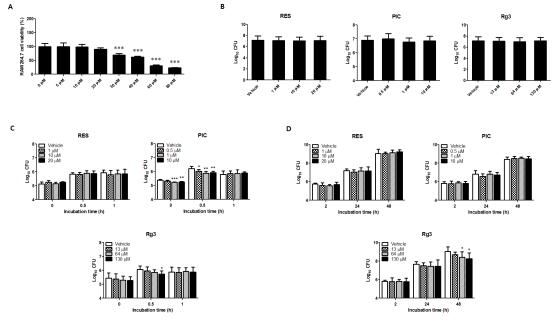


그림 23. Sirtuin 1 family의 하나인 SIRT1의 활성물질 (RES , PIC, Rg3)의 브루셀라 균 탐식 및 부착에 미치는 영향 규명

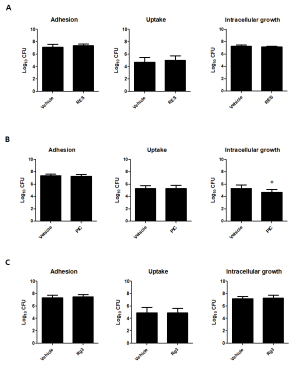


그림 24. Sirtuin 1 family의 하나인 SIRT1의 활성물질 (RES , PIC, Rg3)의 브루셀라 균 탐식 경로에 에 미치는 영향 규명

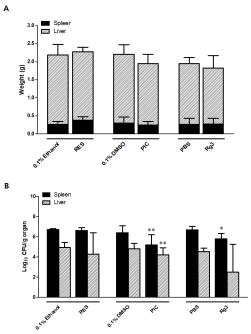


그림 25. Sirtuin 1 family의 하나인 SIRT1의 활성물질 (RES , PIC, Rg3) 투여를 통해 브루셀라 균 감염 마우스내 실질장기에서의 균 증식 억제 효과 규명

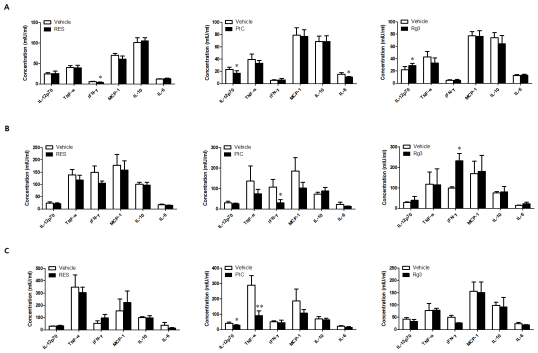


그림 26. Sirtuin 1 family의 하나인 SIRT1의 활성물질 (RES , PIC, Rg3) 투여를 통해 브루셀라 균 감염 마우스의 혈중 면역활성 물질 발현에 미치는 효과 규명

④ 대사체인 단사슬 지방산 중 하나인 sodium propionate의 브루셀라 감염 저해능력 규명:
브루셀라 감염시 발현되는 단사슬 지방산 중 하나인 sodium propionate의 투여가 마우스와 마우스 유래 대식구 모델에서 브루셀라에 세포내 침입을 억제하는 기전이 밝혀 졌으며, 감염 후 다양한 면역반응 물질의 활성을 유도하여 브루셀라 감염증 치료 및 예방에 유용한 물질임이 밝혀짐 (그림27-32).

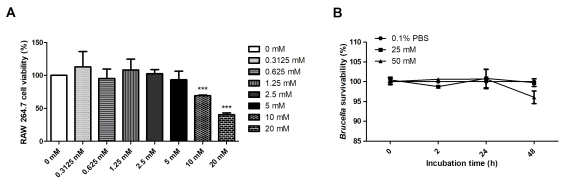


그림 27. 단사슬 지방산 sodium propionate의 세포독성 및 항균효과 규명

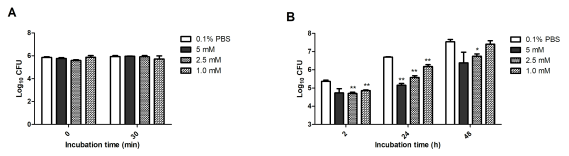


그림 28. 단사슬 지방산 sodium propionate의 대식구내 브루셀라 균 침입 및 증식 억제에 미치는 영향 규명

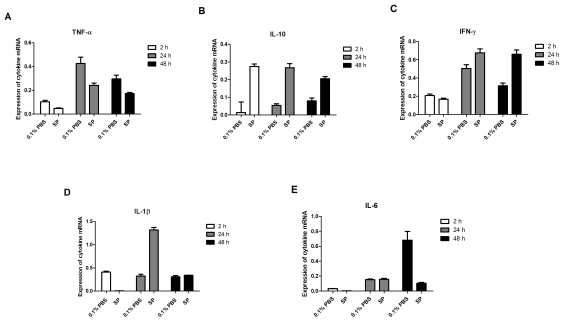


그림 29. 단사슬 지방산 sodium propionate의 대식구내 브루셀라 감염 후 나타나는 면역활성물질에 생산에 미치는 영향 규명 (TNF-α , IL-10, IFN-ɣ , IL-1β and IL-6)

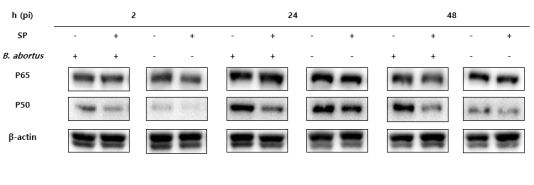


그림 30. 단사슬 지방산 sodium propionate의 브루셀라균 감염 된 대식구내 NF-κB 인산화에 미치는 영향 규명

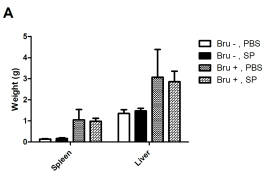


그림 31. 단사슬 지방산 sodium propionate의 투여가 브루셀라 감염 마우스에서의 치료에 미치는 영향 규명

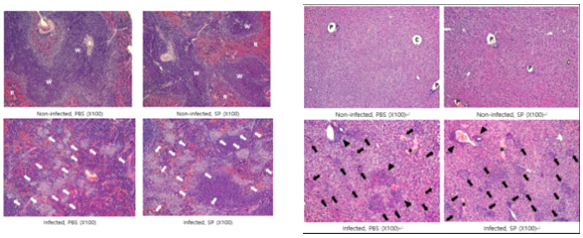


그림 32.SP 처리를 한 마우스에 브루셀라 균 감염후 나타나는 병리적 변화 규명

⑤ 숙주의 대사활성에 관여하는 대표적인 조절효소 (Regulatory enzyme)인 Catalase가 브루셀라 감염 조절 능력 규명: 브루셀라 감염시 발현되는 숙주의 대사 활성에 관여하는 대표적인 조절효소인 catalase의 억제를 유도하고(3-Amino-1,2,4-triazole; 3-AT) 이들 물질을 통해 catalase의 생성과 활성이 마우스와 마우스 유래 대식구 모델에서 브루셀라에 대한 항균효능 및 세포내 침입을 억제하는 기전이 밝혀 졌으며, 감염 후 다양한 면역반응 물질의 활성을 유도하여 브루셀라 감염증 치료 및 예방에 유용한 물질임이 밝혀짐 (그림33-38).

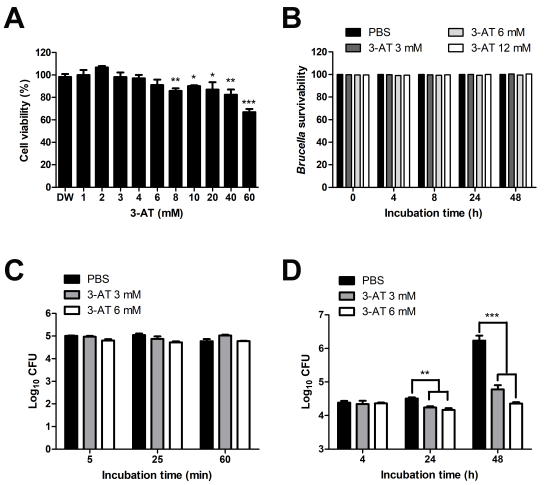


그림 33. 숙주 catalase의 생성과 활성을 조절하는 물질인 3-AT를 이용하여 세포독성, 세포내 침입 및 세포내 브루셀라 균 침입에 미치는 영향 규명

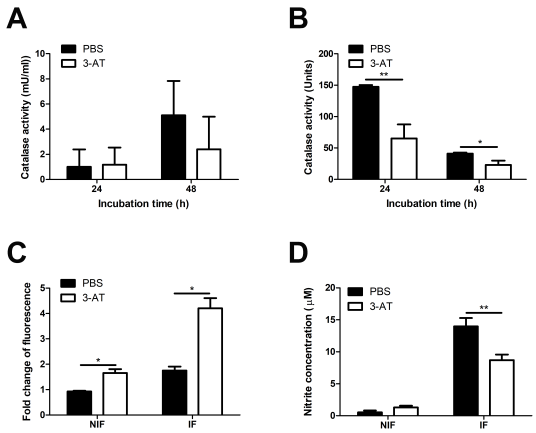


그림 34. 숙주 catalase의 생성과 활성을 조절하는 물질인 3-AT 처리 시 세포내 숙주 catalase의 생성에 미치는 영향 규명

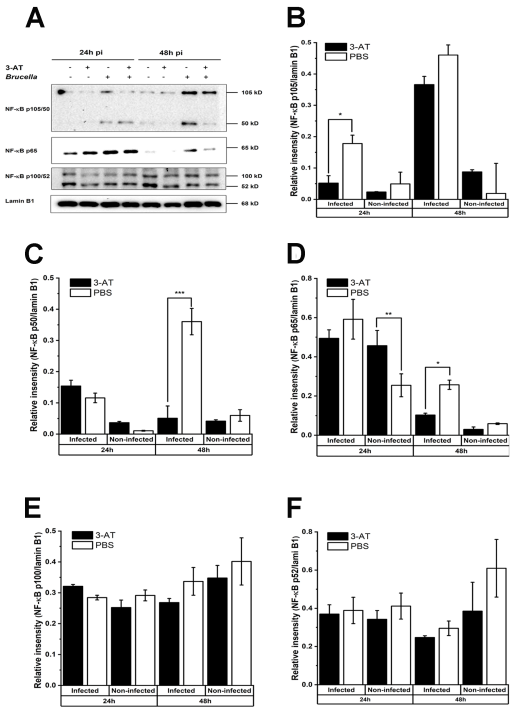


그림 35. 숙주 catalase의 생성과 활성을 조절하는 물질인 3-AT 처리 시 브루셀라 감염 세포의 면역반응 조절물질 발현 규명

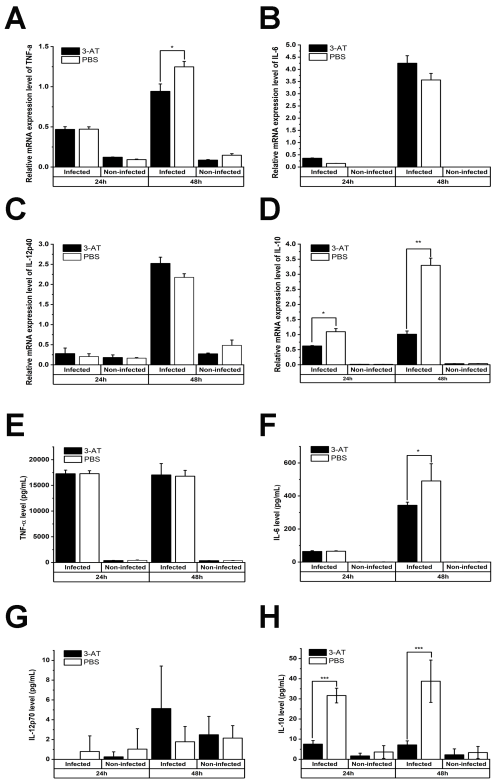


그림 36. 숙주 catalase의 생성과 활성을 조절하는 물질인 3-AT 처리 시 브루셀라 감염 세포의 싸이토카인 생성에 미치는 영향

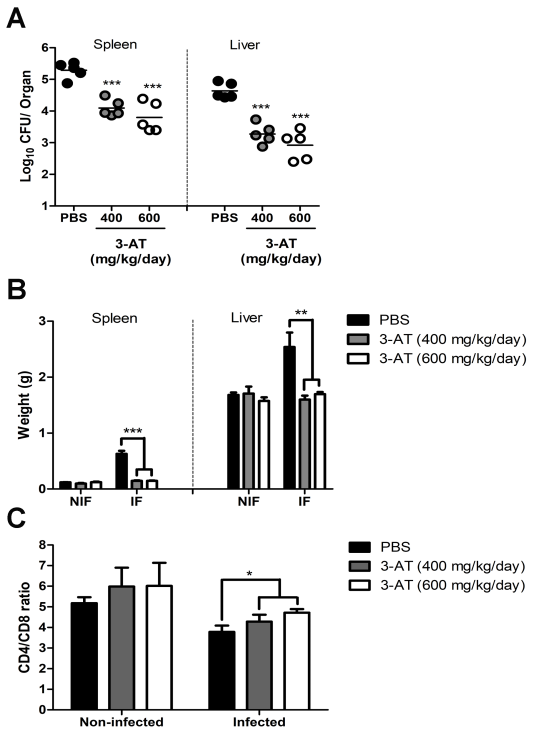


그림 37. 숙주 catalase의 생성과 활성을 조절하는 물질인 3-AT 처리 시 브루셀라 감염 감염 마우스내 실질장기에서의 균 증식 억제 및 면역세포 분화에 미치는 효과 규명

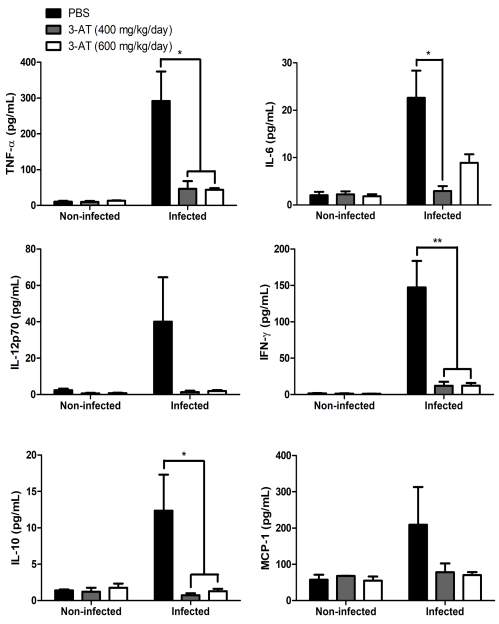


그림 38. 숙주 catalase의 생성과 활성을 조절하는 물질인 3-AT 처리 시 브루셀라 감염 감염 마우스 혈액 내 면역조절에 대한 효과 규명

⑥ 브루셀라균의 병원성 및 대사 조절 단백인 DapB/gpm을 이용한 브루셀라 균의 감염예방 능력 평가 : 브루셀라 균의 대표적인 대사 조절 물질이며, 균의 lysine과 tabtoxin 생합성을 조절하는 DapB단백질과 phosphoglyceromutase (gpm)을 이용하여 이들 단백의 병원성평가와 재조합 단백을 이용한 면역조절 능력을 평가 함 (그림39-42).

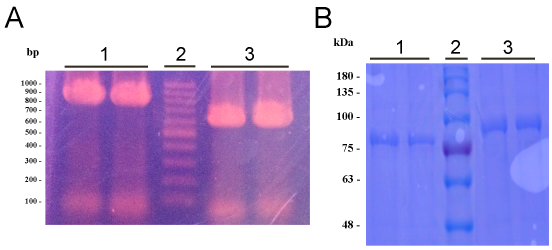


그림 39. 브루셀라 균의 대표적인 대사 조절 물질 DapB/gpm 유전자를 이용한 재조합 단백 제작 및 항원성 규명

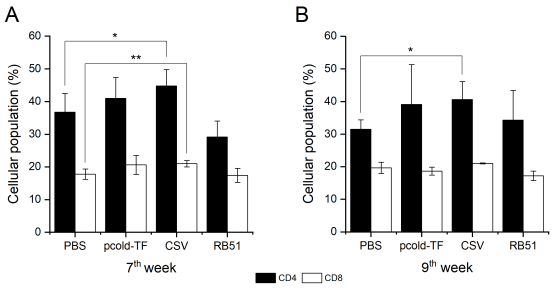


그림 40. 재조합 DapB/gpm 단백을 마우스에 접종 후 면역반응에 미치는 영향 규명

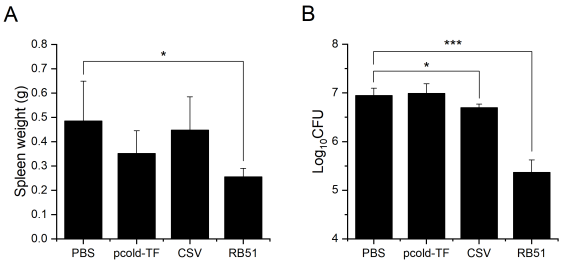


그림 41. 재조합 DapB/gpm단백을 마우스에 면역 후 도전감염을 통해 실질 장기에서의 균 분포 분석 및 기존의 백신과의 비교 평가

Table 2. Protection against *B. abortus* in BALB/c mice after immunization

Vaccine	Log_{10} CFU of bacteria in spleens (Mean ± SD)	Log protection	*P*-value[a]
PBS	6.95 ± 0.15		
pCold-TF vector	6.99 ± 0.20		
CSV	6.70 ± 0.07	0.25	$P < 0.05$
RB51	5.37 ± 0.25	1.58	$P < 0.001$

[a]Significantly different from PBS-immunized mice were estimated by Student's *t*-test. The data are represented as the mean ± SD of the mean of each group of five mice.

그림 42. 재조합 DapB/gpm단백을 마우스에 면역 후 도전감염을 통해 비장내 균 증식 억제 효과 규명

(2) 대사체 분석기법 및 진단기술 확립

① 브루셀라균 대사체 peptide에 특이적인 단크론성 항체와 면역분석법 개발

ⓐ BSA-EZ-B와 EZ-B-BSA 항원을 이용한 단크론성 항체 개발

○ **항원준비:** 1공동기관에서 제공받은 아래 2종의 면역원과 코팅항원을 이용하여 단크론성 항체를 개발하였음

- 면역원(2종): BSA-EZ-B와 EZ-B-BSA 컨주게이트 확보
- 코팅항원(2종): OVA-EZ-B와 EZ-B-OVA 컨주게이트 확보

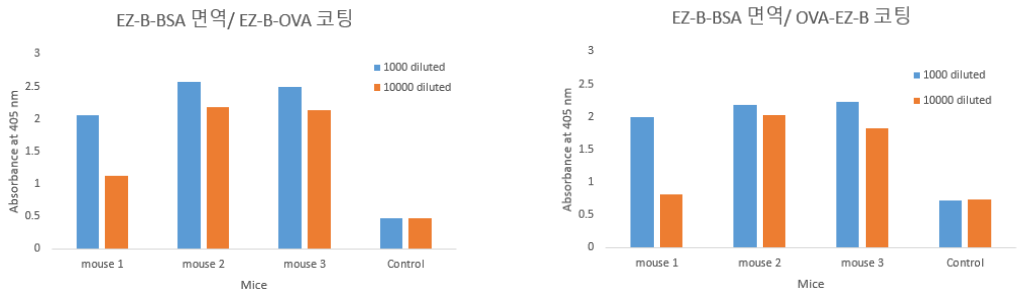
○ **면역:** 단크론성 항체 생산을 위한 hybridoma cell line 개발을 위해 생후 7-8주된 BALB/c mouse(암컷)에 앞서 준비된 항원(BSA-EZ-B와 EZ-B-BSA)을 이용하여 면역을 4차례 실시

- 1차 면역: 준비된 각각의 면역원 (100 μg/100 μl)을 complete Freund's adjuvant와 1 : 1(v/v)로 유화시켜 마리당 200 μl 씩 복강으로 1차 면역을 실시
- 2, 3차 면역: 1차 면역 후 2주 간격으로 각각의 면역원 (100 μg/100 μl)을 incomplete Freund's adjuvant의 동량 혼합한 후 각각 200 μl 씩 2회 추가 접종 실시
- 4차 면역: 3차 면역이후 세포융합 3일 전에 2배 량의 면역원만을 복강 내 주사하여 최종면역 실시

○ **항혈청 역가 측정:**

- 3차 면역 후 마우스 생체 내에 면역한 peptide에 대한 항체 생성여부를 확인하였음
- 마우스의 꼬리 정맥에서 3 μl 채혈한 후 PBS로 1,000와 10,000배 희석하여 indirect ELISA법으로 역가를 측정하였음
- 그 결과 아래 그림 1과 같이 EZ-B-BSA를 면역한 마우스 2번과 3번은 10,000배 희석한 혈액에서도 2종의 코팅항원(OVA-EZ-B와 EZ-B-OVA)에 높은 반응성을 보여, 항혈청 역가가 높은 것으로 확인되었음 (그림 43(a))
- 또한 BSA-EZ-B을 면역한 마우스는 세 마리 모두 10,000배 희석한 혈액에서도 2종의 코팅항원에 높은 반응성을 보여, 항혈청 역가가 높은 것으로 판단하였음 (그림 43(b))
- 항혈청 역가를 토대로 면역한 마우스 내에서 생성된 항체는 단백질에 결합된 peptide의 C-와 N-terminal의 방향성과 관계없이 모두 반응하는 것으로 확인되었음
- 따라서 최종면역을 실시한 후 항혈청 역가가 높은 EZ-B-BSA 면역 마우스 2번과 3번, BSA-EZ-B을 면역원으로 면역한 마우스 1, 2, 3번을 이후 세포융합에 사용하였음

(a)



(b)

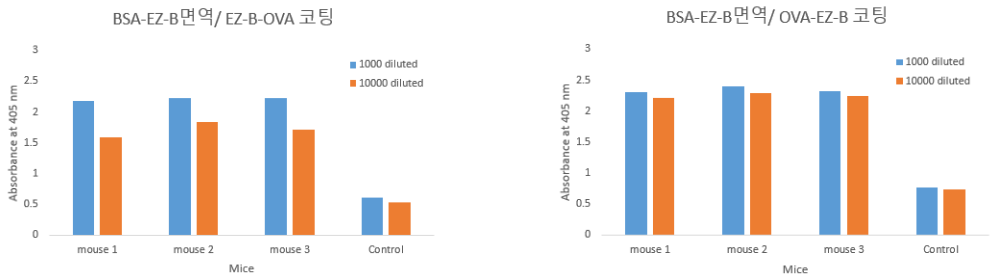


그림 43. 면역 마우스의 항혈청 역가 측정 결과 (a) 면역원: EZ-B-BSA, (b) 면역원: BSA-EZ-B

○ **Hybridoma cell line 개발을 위한 세포융합 결과:**

- 세포융합 이후 세포의 성장이 확인되면 상등액을 채취하여 항체를 분비하는지를 앞서 항혈청 역가 측정 시 사용한 indirect ELISA법을 이용하여 아래와 같이 검색하였음
- 그 결과 8개의 well에서 반응성이 강한 세포가 확인되었으며, 해당 세포를 24 well plate에 옮겨 배양한 후 항체 역가가 계속 유지되는지를 간접효소면역분석법을 통해 추가적으로 확인하였음 (그림 44)

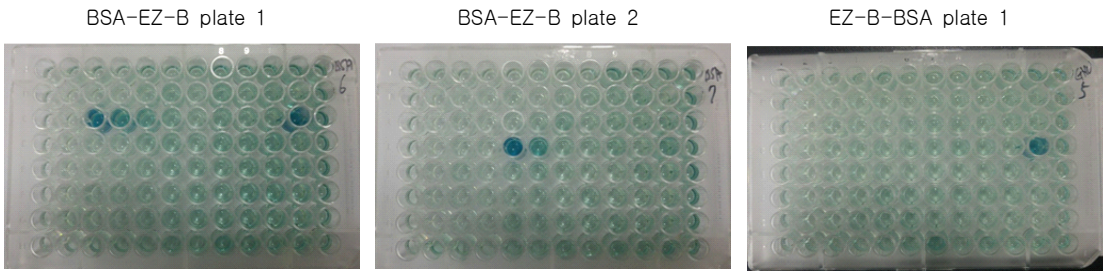


그림 44. 융합된 세포의 항체 역가 확인

- 이후 24 well에서 배양 중인 세포주의 항체 역가를 확인하였으며, indirect ELISA법을 통해 2.0 이상의 역가를 유지하는 융합세포 4종을 클로닝에 사용하였음 (표 1)

표 1. 융합 세포주에 대한 2차 ELISA 스크리닝 결과

(O.D. values)

		Fused cells							
		1	2	3	4	5	6	7	8
코팅항원	EZ-B-BSA	0.1945	0.687	0.1568	0.1932	2.3232	0.2051	0.2098	0.2794
	BSA-EZ-B	0.1869	0.1969	1.0199	0.3448	2.4277	2.4198	2.4949	0.2994

○ **확보된 4종의 Hybridoma cell line을 이용한 클로닝 및 역가 측정 결과:**

- 확보된 4종의 융합세포주를 임의로 G-1, B-1, B-2 및 B-3로 분류 및 명명하였고, 클로닝을 통해 16종의 단크론성 세포를 분리하였으며, 16종의 단크론성 세포의 역가 측정을 위해 해당 세포의 배양상등액을 채취하여 indirect ELISA법을 실시하였음
- 16종의 단크론성 세포 역가 측정을 통해 가장 높은 항체 역가를 보이는 총 8가지 단크론성 세포주를 확보하였음
- 선택된 8종(G-1-1, G-1-2, B-1-1, B-1-2, B-2-1, B-2-2, B-3-1, B-3-2)의 단크론성 세포주를 배양하면서 indirect ELISA법을 통해 역가를 측정하였으며, 그 결과 2종의 코팅항원에

대해 모두 반응성을 나타내는 G-1-1 및 B-2-1 세포주와, OVA-EZ-B 항원에 반응성이 높은 B-1-2 및 B-3-1과 같은 세포주 4종을 최종 선별하였음 (표 2)

표 2. 클로닝된 세포주의 indirect ELISA법을 이용한 스크리닝 결과

(O.D. values)

		세포주	코팅 항원		최종라벨
			EZ-B-OVA	OVA-EZ-B	
면역원	EZ-B-BSA	G-1-1	2.4697	2.4041	G-G-1
		G-1-2	2.386	2.3514	
	BSA-EZ-B	B-1-1	0.1943	2.4688	
		B-1-2	0.2456	2.5409	G-B-1
		B-2-1	2.4945	2.5432	G-B-2
		B-2-2	2.3445	2.2925	
		B-3-1	0.906	2.1416	G-B-3
		B-3-2	0.4777	1.6987	

○ **단크론성 항체의 확인:**

- Indirect ELISA법에서 생산된 항체는 well에 코팅된 항원에 결합된 peptide와 반응액 중의 free peptide와 경쟁적으로 반응하게 됨. 만약 항체가 free peptide 존재 시 코팅항원 상의 peptide 보다는 free peptide와 반응하게 되어 세척단계에서 반응 well로부터 제거되고 이후 2차 항체와의 반응하지 못해 기질에 의한 발색이 일어나지 않음. 반대로 free peptide가 존재하지 않을 시 코팅항원(EZ-B-protein, protein-EZ-B)과 반응하게 되어 반응 well상에 반응하여 이후 2차 항체와도 반응하여 기질에 의한 발색이 일어나게 됨
- G-B-2 하이브리도마 세포주의 경우 10 ppm의 free peptide와 경쟁 반응 시킨 결과 EZ-B-BSA 코팅항원을 1/2000에서 0.6, 1/4000에서 1.0 이상의 흡광도 차를 나타내었음 (표 3)
- G-B-3 하이브리도마 세포주의 배양액을 10 ppm의 free peptide와 경쟁반응 시킨 결과 EZ-B-BSA 코팅항원을 1/2000와 1/4000로 코팅하였을 때는 양성과 음성에서 모두 0.8 정도의 흡광도 차를 나타내었음
- G-G-1 하이브리도마 세포주의 경우 10 ppm의 free peptide와 경쟁반응 시킨 결과 EZ-B-BSA 코팅항원을 1/2000에서 0.6, 1/4000에서 0.8 이상의 흡광도 차를 나타내었음
- 이상의 결과로 볼 때 개발된 G-B-2와 G-G-1 하이브리도마 세포주가 생산하는 항체는 free peptide와 특이적으로 반응하는 것으로 확인되어 이후의 실험에 사용하였음

표 3. Indirect ELISA법에 의한 단크론성 항체 4종과 free peptide의 반응성 확인

(O.D. values)

		G-B-1		G-B-2		G-B-3		G-G-1	
		N	P	N	P	N	P	N	P
코팅 항원	EZ-B-BSA (1/2,000)	0.1411	0.0937	1.9805	1.4662	1.6518	0.9261	2.5031	1.9198
		0.0954	0.1158	2.0757	1.3449	1.8685	1.7715	2.3081	1.7532
	EZ-B-BSA (1/4,000)	0.1071	0.112	1.7772	0.7242	1.2673	0.3879	1.7087	0.8298
		0.1057	0.0902	1.9621	0.8997	1.0245	0.3993	1.6304	0.9005
	BSA-EZ-B (1/2,000)	2.595	2.4048	2.4314	1.9843	2.0634	1.76	2.4004	2.3306
		2.5691	2.5452	2.4134	2.1985	2.2883	1.703	2.3528	2.4323
	BSA-EZ-B (1/4,000)	2.0394	1.9445	1.9044	1.1947	1.5382	1.0019	1.7898	1.6794
		2.2018	2.1103	2.0652	1.372	1.5285	1.019	1.9428	1.6521

N: negative, P: positive, 10 ppm free peptide in PBS

- 2종의 하이브리도마에서 생산하는 항체가 실제 시료와 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)에 free peptide를 임의로 첨가한 양성과 음성 시료에 대해 양성과 음성으로 판정하는지 여부를 확인한 결과, 표 4에서 보는 바와 같이 혈청 추출액의 경우 항원-항체 반응에 방해하는 요인인 matrix effect가 큰 것으로 확인되었고, FBS의 경우 대체적으로 흡광도가 낮은 경향을 보였으나 양성과 음성의 구분이 가능하였음
- 따라서 실제시료를 분석하기 위해서는 간접효소면역분석법에 적절한 시료 전처리법의 개발이 선행되어야 할 것으로 판단됨

표 4. 생산된 항체를 이용한 시료 매트릭스별 항체 반응성 확인

(O.D. values)

	용액별 free peptide 양성과 음성									
	PBS		혈청1 추출액		혈청2 추출액 1/2		FBS 1x		FBS 1/2x	
	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P
G-B-2 항체	1.313	0.5177	1.9304	1.9077	1.8503	1.7386	0.4134	0.2159	0.5261	0.2334
	1.4498	0.4768	2.2192	1.9419	1.864	1.7715	0.4533	0.2032	0.4929	0.2096
G-G-1 항체	1.8621	0.9612	2.2195	2.4049	2.1218	2.3104	0.5856	0.3924	1.0639	0.5586
	1.7784	0.9554	2.1414	2.3345	2.0088	2.1887	0.7035	0.3795	1.1114	0.375

N: negative, P: positive, 10 ppm free peptide in PBS

ⓑ 다양한 Peptide(GNU)-단백질 컨쥬게이트 항원을 이용한 단크론성 항체 개발

○ **항원준비:** 1공동기관에서 제공받은 아래 6종의 Peptide(GNU)-단백질 컨쥬게이트 면역원과 코팅항원을 이용하여 단크론성 항체를 개발하였음

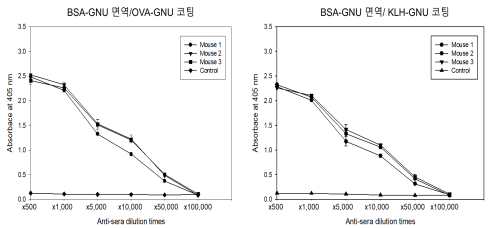
- 면역원 및 코팅항원(6종): OVA-GNU, KLH-GNU, BSA-GNU, GNU-OVA, GNU-KLH, GNU-BSA 컨주게이트 확보

○ **면역:** 단크론성 항체 생산을 위한 hybridoma cell line 개발을 위해 준비된 항원(OVA-GNU, KLH-GNU, BSA-GNU, GNU-OVA, GNU-KLH, GNU-BSA)을 이용하여 면역을 4차례 실시

○ **항혈청 역가 측정:**

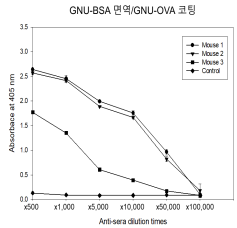
- 3차 면역 후 마우스 생체 내에 면역한 peptide에 대한 항체 생성 여부를 확인하였음
- 마우스의 꼬리 정맥에서 3 μl 채혈한 후 PBS로 500-100,000배 희석하여 indirect ELISA 법으로 역가를 측정하였음
- 그 결과 아래 그림에서 보는 바와 같이 면역한 마우스 모두 각각의 항원을 교차로 코팅하였을 때 반응성이 있는 것으로 확인되었음
- 대부분 마우스 1과 2번의 역가가 높게 나타났으며 50,000배 희석한 혈청에서도 반응성이 확인되었음
- 또한 control 마우스와 비교하였을 때 면역한 마우스에서만 반응성이 나타나 항원이 면역되어 항체가 생성된 것으로 판단하였음
- 따라서 최종 면역을 실시한 후 항혈청 역가가 높은 면역 마우스 1과 2번을 이후 세포융합에 사용하였음

(a)

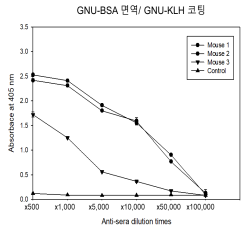


(b)

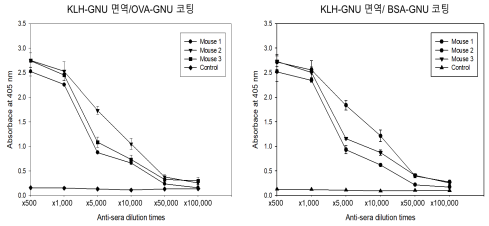
(c)



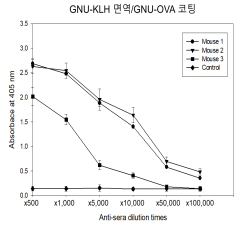
(d)

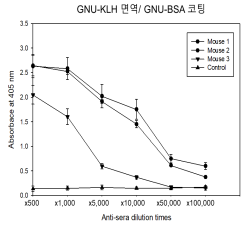


(e)



(f)





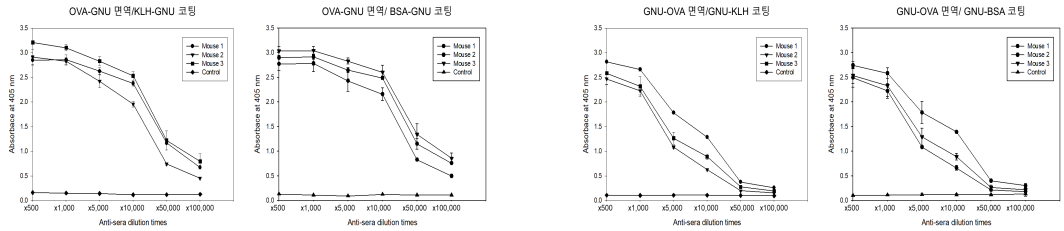


그림 45. 면역 마우스의 항혈청 역가 측정 결과
BSA-GNU(a), GNU-BSA(b), KLH-GNU(c), GNU-KLH(d), OVA-GNU(e), GNU-OVA(f)

○ **Hybridoma cell line 개발을 위한 세포융합 결과:**

- 세포융합 이후 세포의 성장이 확인되면 상등액을 채취하여 항체를 분비하는지를 앞서 항혈청 역가 측정 시 사용한 indirect ELISA법을 이용하여 아래와 같이 검색하였음
- 그 결과 아래와 같이 BSA-GNU, GNU-BSA로 면역한 마우스를 이용하여 세포융합한 경우반응성이 강한 세포가 확인되었으며, 해당 세포를 24 well plate에 옮겨 배양한 후 항체 역가가 계속 유지되는지를 indirect ELISA법을 통해 추가적으로 확인하였음
- 그러나 OVA-GNU, KLH-GNU, GNU-OVA, GNU-KLH로 면역한 마우스를 이용하여 세포융합한 경우는 반응성이 약한 세포가 확보되어 이후 24 well plate에 옮기지 않고 모두 폐기하였음

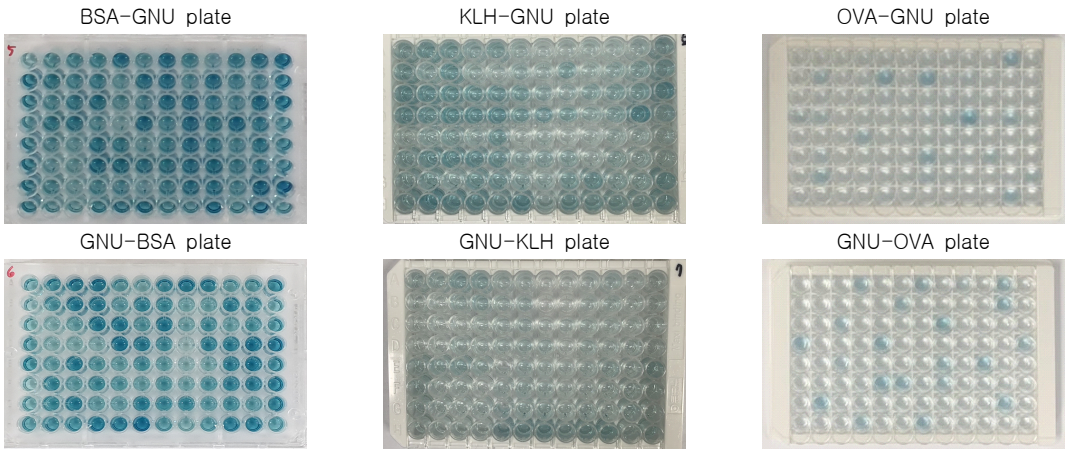


그림 46. 융합된 세포의 항체 역가 확인

- 이후 24 well에서 배양 중인 BSA-GNU와 GNU-BSA 세포주의 항체 역가를 확인한 결과, 반응성이 높게 나타나 클로닝을 실시하였고, 역가가 1.2 이상의 역가를 유지하는 BSA-GNU 5종(1A5, 2A1, 3G5, 3A7, 4E8)과 GNU-BSA 3종(1D11, 2G3, 4B8) hybridoma cell 을 이용하여 free Peptide와 버퍼 그리고 Peptide-GMBS (Peptide와 단백질 연결기)에 대한 경쟁 반응성을 확인하였음

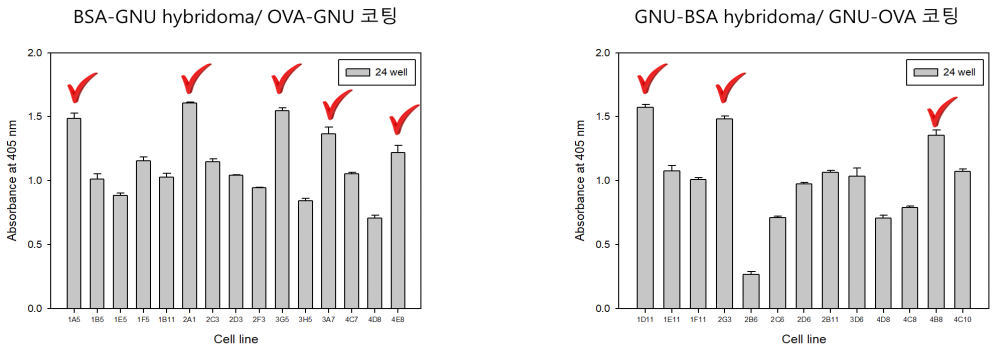


그림 47. BSA-GNU와 GNU-BSA hybridoma cell에 대한 2차 ELISA 스크리닝 결과

○ **확보된 8종의 Hybridoma cell line을 이용한 경쟁 반응성 역가 측정 결과**

- 단크론성 항체를 생산하기 위한 클로닝에 앞서 확보된 BSA-GNU 5종(1A5, 2A1, 3G5, 3A7, 4E8)과 GNU-BSA 3종(1D11, 2G3, 4B8) hybridoma cell이 생산하는 항체에 대해 대사체와 경쟁 반응성을 indirect ELISA법으로 측정하였음
- 경쟁기반 indirect ELISA법은 1차 항체를 제외한 모든 단계에서 기존 indirect ELISA법과 동일

하게 진행하였으며, 1차 항체로 배양상등액 50 μl와 50 μl의 free Peptide (0, 10 ppm) 또는 Peptide-GMBS (10 ppm)를 혼합하여 분주하고 37℃에서 1시간 반응하였음
- 실험 결과 확인은 양성 control과 음성 control 사이의 흡광도 값 차이를 비교하였음
- Free Peptide(양성)이 포함된 Peptide(10 ppm)와 Peptide-GMBS(10 ppm)의 흡광도 값이 낮게 나타나면서 음성 control의 흡광도 값이 비교적 높게 나타나는 것을 경쟁 반응성이 나타난 것으로 판단하였으나, 항원합성 시 사용되는 GMBS의 일부와 더 특이적으로 반응하는 것으로 확인되어 항원합성의 방법을 달리하여 항체를 생산할 필요를 확인하였음

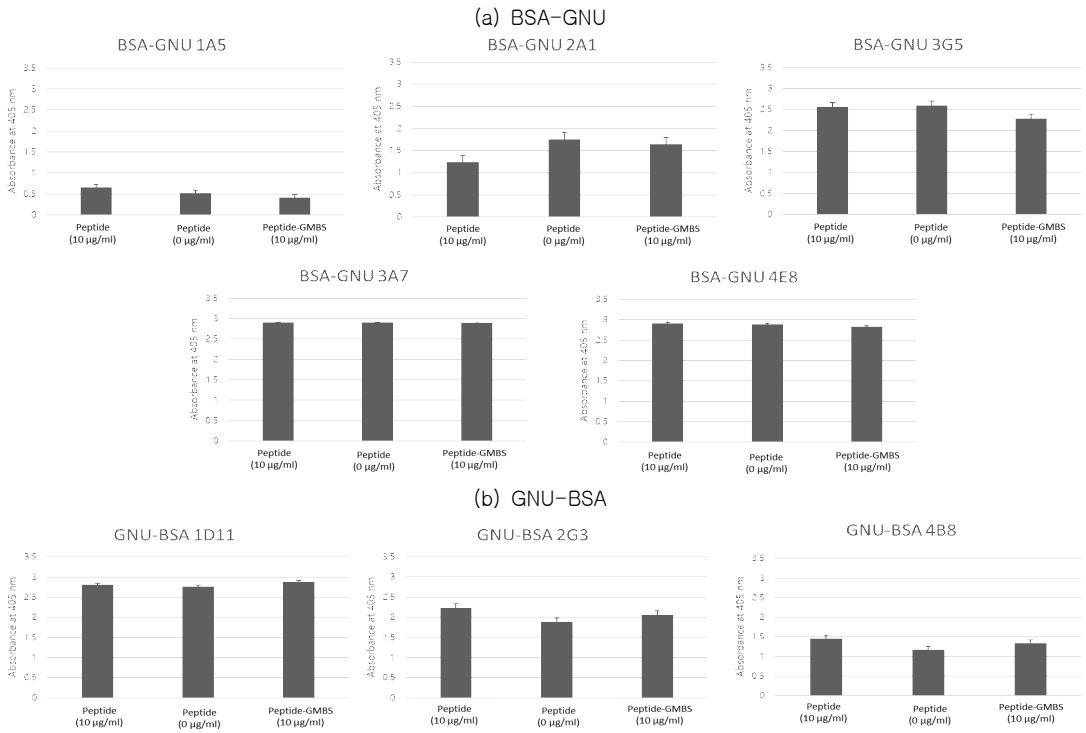


그림 48. BSA-GNU와 GNU-BSA 융합 세포주에 대한 간접 경쟁 ELISA 스크리닝 결과

ⓒ sfGFP-GNU 항원을 이용한 단크론성 항체 개발

○ **항원준비:** 1공동기관에서 제공받은 1종의 면역원과 1종의 코팅항원을 이용하여 단크론성 항체를 개발하고, 간접효소면역분석법을 개발하였음
- 면역원 (1종): sfGFP-Peptide 확보
- 코팅항원(1종): NanoLuc-Peptide 확보

○ **면역:** 단크론성 항체 생산을 위한 hybridoma cell line 개발을 위해 sfGFP-Peptide를 이용하여 면역을 4차례 실시

○ **항혈청 역가 측정:**
- 3차 면역 후 마우스 생체 내에 면역한 마우스에 peptide에 대한 항체 생성 여부를 확인하였음
- 마우스의 꼬리 정맥에서 3 μl 채혈한 후 PBS로 1,000-500,000배 희석하여 indirect ELISA 법으로 역가를 측정하였음
- 그 결과 아래 그림 49에서 보는 바와 같이 면역한 마우스 모두 각각의 항원을 교차로 코팅하였을 때 반응성이 있는 것으로 확인되었음
- 마우스 1과 2번의 역가가 높게 나타났으며 100,000배 희석한 혈청에서도 반응성이 확인되었음
- 또한 control 마우스와 비교하였을 때 면역한 마우스에서만 반응성이 나타나 항원이 면역되어 항체가 생성된 것으로 판단하였음
- 따라서 최종 면역을 실시한 후 항혈청 역가가 높은 면역 마우스 1과 2번을 이후 세포융합에 사용하였음

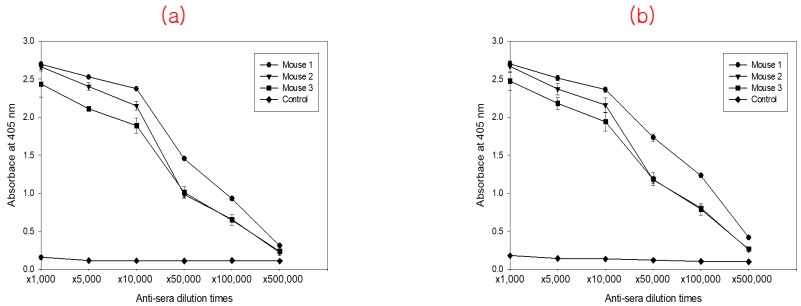


그림 49. 면역 마우스의 항혈청 역가 측정 결과. sfGFP-peptide 면역원에 대한 반응성(a), NanoLuce-peptide 코팅항원에 대한 반응성(b)

○ **Hybridoma cell line 개발을 위한 세포융합 결과:**

- 세포융합 이후 세포의 성장이 확인되면 상등액을 채취하여 항체를 분비하는지를 앞서 항혈청 역가 측정 시 사용한 간접효소면역분석법을 이용하여 검색하였음
- well에서 반응성이 강한 세포가 확인되었으며, 해당 세포 38종을 24 well plate에 옮겨 배양한 후 항체 역가가 계속 유지되는지를 간접효소면역분석법을 통해 추가적으로 확인하였음
- 24 well에서 배양 중인 38개의 세포주의 항체 역가를 확인하였으며, NanoLuce-peptide 항원을 코팅하여 실험하였음 (그림 50)
- 2차 ELISA 결과, NanoLuce-peptide를 면역한 항원에서 반응성이 나타난 3종의 세포주 (sfGFP-Peptide 1A10, 3B8, 4C5)를 선별하였으며 free Peptide와 버퍼 그리고 Peptide-GMBS (Peptide와 단백질 연결기)에 대한 경쟁 반응성을 확인하였음

Table. List of cell line

Number	Cell line	Number	Cell line
1	1A11	20	3F5
2	3G2	21	3F8
3	3G3	22	3G5
4	3G4	23	3D3
5	3G5	24	3A6
6	3G6	25	3B8
7	3F11	26	3B11
8	4D2	27	3C3
9	5B10	28	3C5
10	5B11	29	3C6
11	5B12	30	4A1
12	1B7	31	4B8
13	1A10	32	4C5
14	1F11	33	4C10
15	3C7	34	4D8
16	3C8	35	4D9
17	3C10	36	4D11
18	3C11	37	5B7
19	3E10	38	5F11

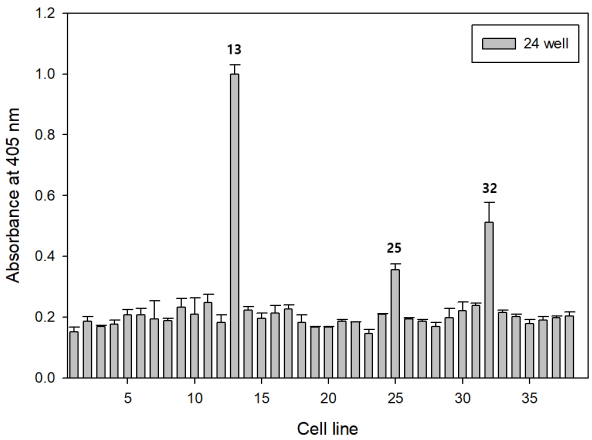


그림 50. sfGFP-Peptide 융합세포주에 대한 2차 ELISA 스크리닝 결과

○ **확보된 3종의 Hybridoma cell line을 이용한 경쟁 반응성 역가 측정 결과**

- 단크론성 항체를 생산하기 위한 클로닝에 앞서 확보된 sfGFP-Peptide 3종(1A10, 3B8, 4C5) 융합세포주를 이용하여 sfGFP-Peptide와 NanoLucPeptide 항원을 코팅하고 경쟁 반응성을 확인하였음
- 실험결과, free Peptide에 대한 모든 항체에서 양성과 음성 간의 차이를 확인할 수 없었으나 그 중 sfGFP-Peptide 4C5만 sfGFP-Peptide와 NanoLuc-Peptide에도 반응성이 있는 것으로 확인되었음(그림 51)
- 세포가 충분히 자란 후에도 반응성을 확인하였으나 양성과 음성 간의 차이를 확인할 수 없었음
- 따라서, 브루셀라균 대사체 peptide에 대한 항체가 생성되지 않은 것으로 판단하였음

(a)

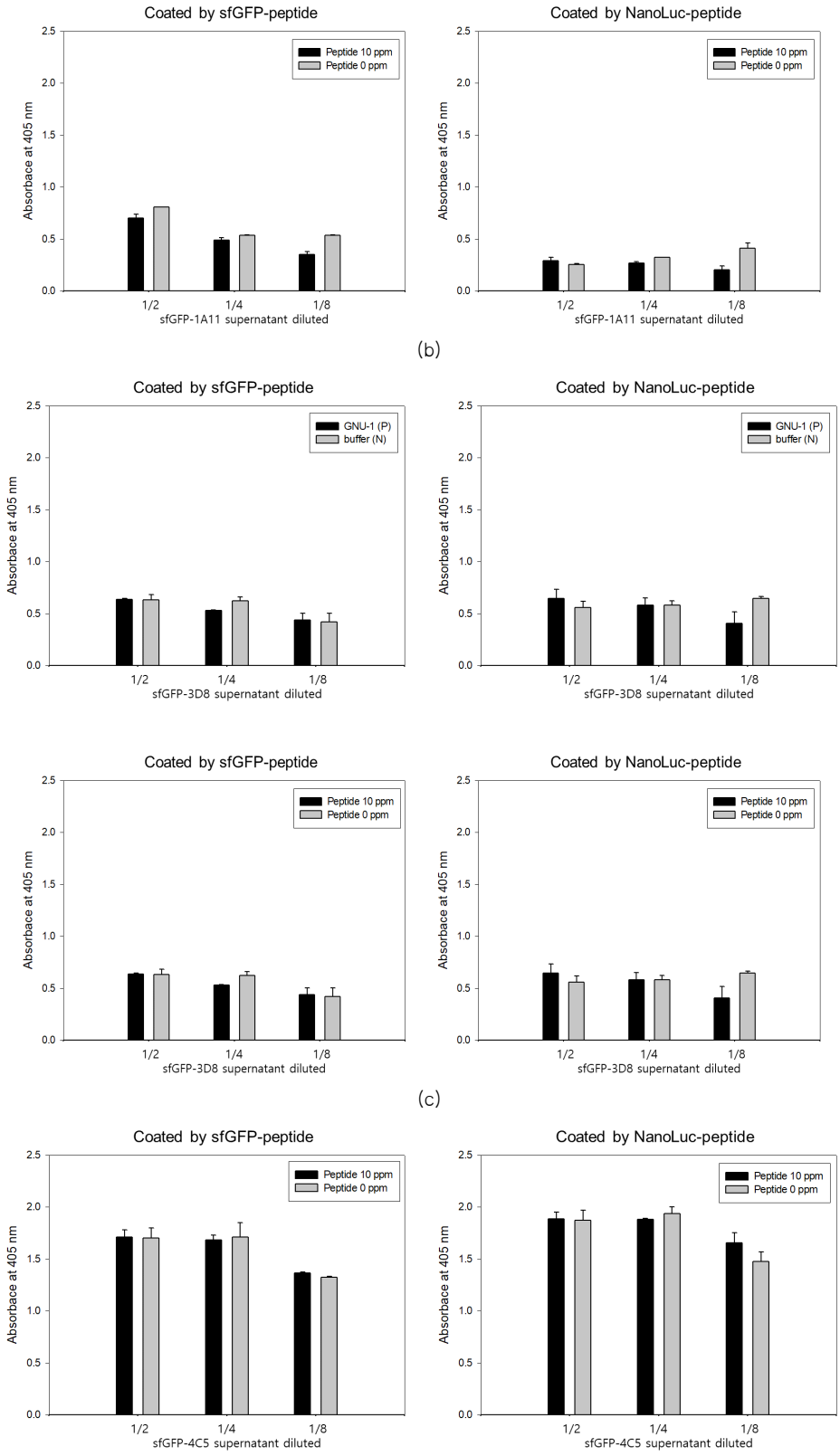


그림 51. sfGFP-Peptide 융합 세포주에 대한 간접 경쟁 ELISA 스크리닝 결과.
sfGFP-1A11(a), sfGFP-3D8(b), sfGFP-4C5(c)

ⓓ 브루셀라균 대사체 펩타이드 신속 검출을 위한 간접효소면역분석법 개발

○ 항원/항체

- 사용항체(4종): 브루셀라균 대사체 peptide에 반응성이 높은 G-B-2와 G-G-1 단크론성 항체
- 코팅항원(2종): 1공동기관에서 추가로 제공한 sfGFP-Peptide와 GNU-OVA를 코팅항원으로 사용하여 간접효소면역분석법을 개발하였음

○ 간접효소면역분석법 최적화

✓ **1차 항체 및 항체 희석배수 선정: 간접효소면역분석법 개발을 위해 1차 항체와 항체의 희석배수를 선정하였음**

- G-B-2와 G-G-1 단크론성 항체를 이용하여 경쟁 반응성을 확인하였음
- 양성 control로 peptide 10 ppm, 음성 control로 Peptide 0 ppm를 사용하였으며, 항체 희석배수는 1/2000, 2차 항체 1/1000 코팅항원은 sfGFP-Peptide를 사용하였음
- G-B-2와 G-G-1 단크론성 항체를 10 ppm의 free peptide와 경쟁 반응시킨 결과 항체의 반응성이 0.3 이상의 흡광도 차이를 나타내어 G-B-2와 G-G-1 단크론성 항체 2종의 항체를 사용하였음
- 이후 항체 희석배수에 따른 경쟁반응 결과 2배 이상의 흡광도 차이를 나타내는 G-B-2는 1/250, G-G-1 항체는 1/125로 희석배수를 선정하였음

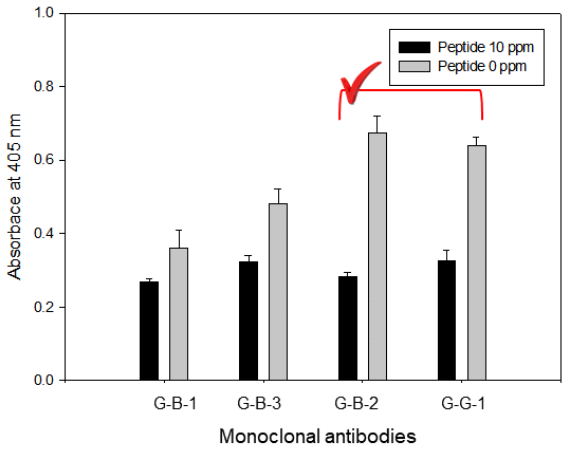
✓ **2차 항체 희석배수 선정: 간접효소면역분석법 개발을 위해 선정된 1차 항체를 기반으로 2차 항체의 희석배수를 선정하였음**

- 2차 항체 희석배수는 Goat anti-mouse IgG(HRP)를 1/1000-15000의 조건으로 희석하여 실험을 진행하였음
- 아래 그림에서 보는 바와 같이 양성과 음성의 흡광도 차이와 경제성을 고려하여 1/2500으로 선정하고 이후의 실험에 사용하였음

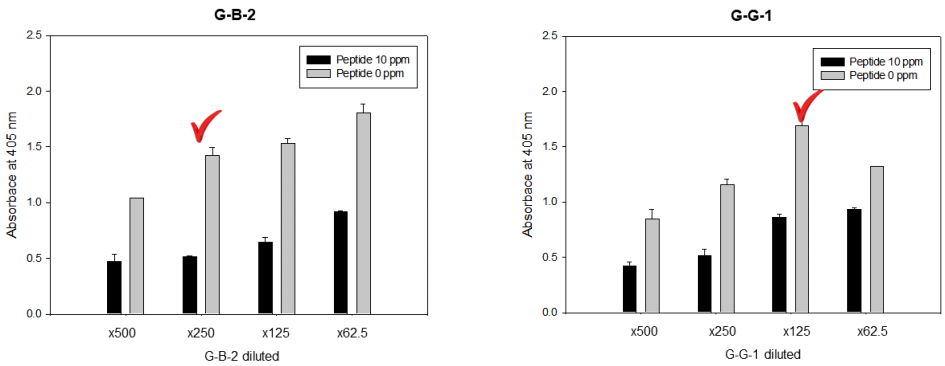
✓ **코팅항원 희석배수 선정: 간접효소면역분석법 개발을 위해 항원의 농도를 최적화하였음**

- 코팅 항원은 sfGFP-Peptide를 사용하였으며 아래 그림에서 보는 바와 같이 0-50 μg/ml 농도로 희석하여 사용하였음
- 실험결과 코팅항원 sfGFP-Peptide 5, 10, 50 μg/ml에서 양성(peptide 10 ppm)과 음성(water)의 흡광도 차이를 확인하였으며, 코팅항원 10 μg/m에서 양성과 음성 간의 흡광도가 2배 차이나 항원의 코팅농도로 선정하였음

(a)



(b)



(c)

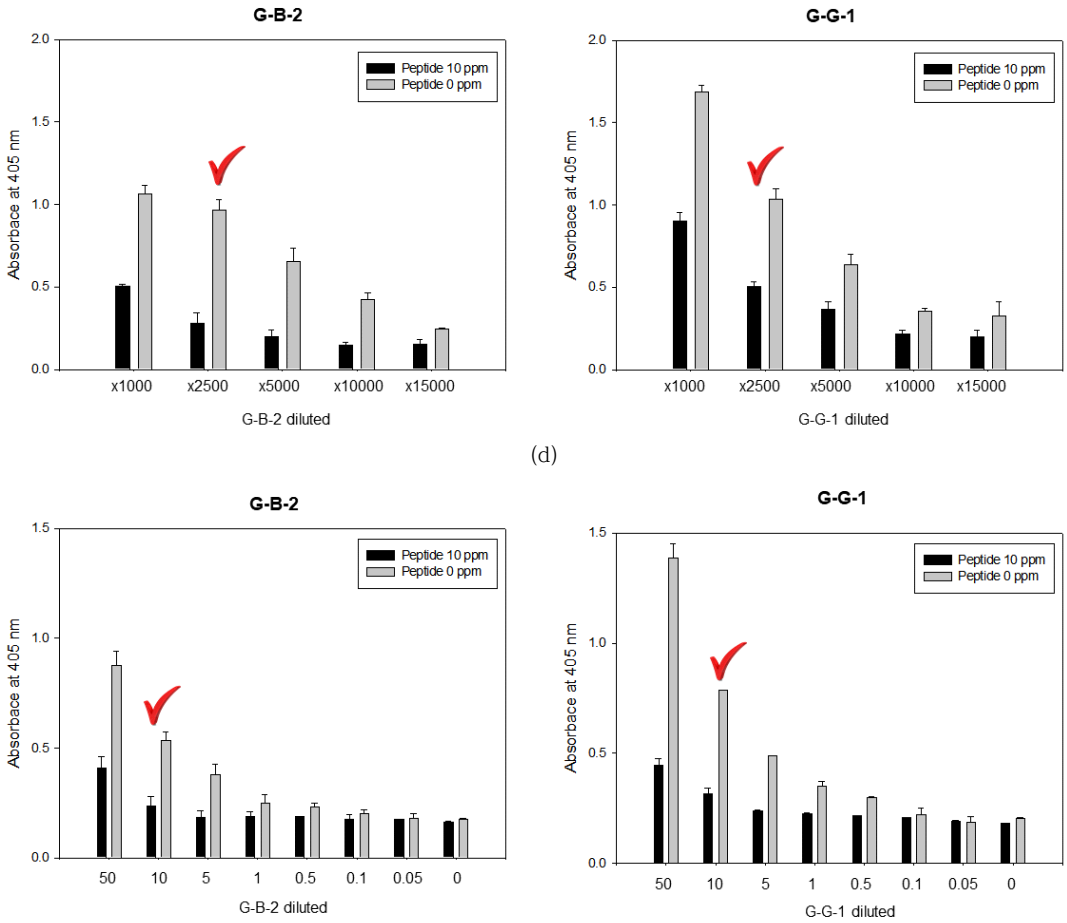


그림 52. 브루셀라균 대사체 peptide 신속검출을 위한 간접효소면역분석법 최적화 결과
1차 항체 선정(a), 1차 항체 희석배수 선정(b), 2차 항체 희석배수 선정(c), coating 항원 농도 선정(d)

✓ **Peptide 재현성 및 검출한계 확인**

- 앞서 최적화된 항원, 1차 항체, 2차 항체 조건을 바탕으로 표준용액의 농도별 반응성을 비교하고 검출한계를 확인하였음
- 1차 항체 첨가 단계에서 브루셀라균 대사체 Peptide(0-100 ppm), Peptide-GMBS(0-100 ppm), 3차 증류수(D.W) 사용하여 흡광도를 측정하였음
- 아래 그림과 같이 모든 항체에서 음성 control로 사용된 D.W의 흡광도가 유지되는 것으로 나타났으며, Peptide가 포함된 peptide와 Peptide-GMBS는 100 ppm에 가까울수록 흡광도가 감소하는 것으로 나타났음
- 또한 G-G-1 단크론성 항체는 5 ppm까지 충분히 검출할 수 있으며, 특히 G-B-2 항체는 1 ppm까지 충분히 검출 가능한 것으로 나타났음

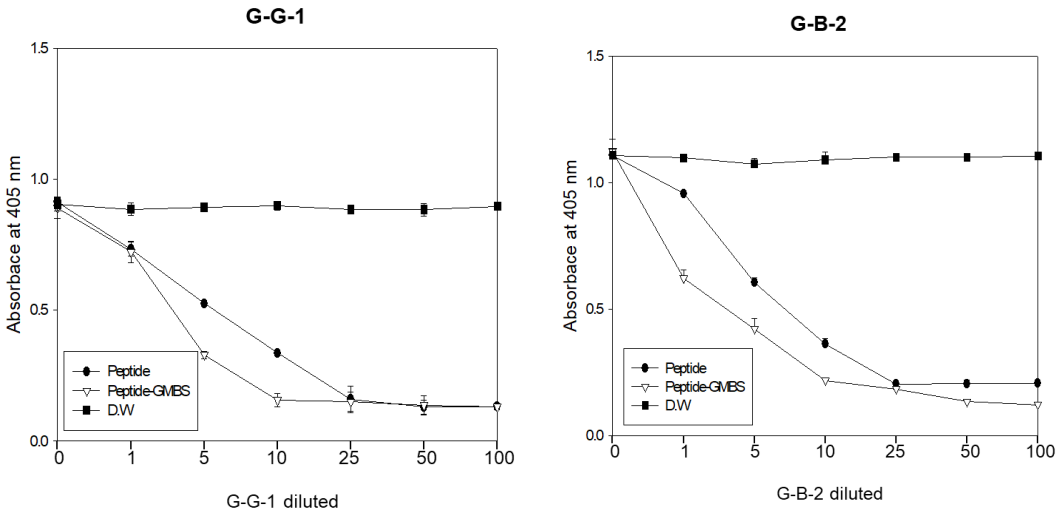


그림 53. 브루셀라균 대사체 peptide 검출을 위한 간접효소면역분석법 검출한계

✓ **Fetal Bovine Serum(FBS) 속 브루셀라균 대사체 peptide 검출**

- 2종의 단크론성 항체가 실제 시료와 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)에 free peptide를 임의로 첨가한 양성과 음성 시료에 대해 양성과 음성으로 판정하는지 여부를 확인한 결과, 그림에서 보는 바와 같이 FBS 함유량이 적을수록 흡광도가 낮은 경향을 보였으나 양성과 음성의 구분이 가능하였음
- 따라서 실제시료를 분석하기 위해서는 indirect ELISA법에 적절한 시료 전처리법의 개발이 선행되어야 할 것으로 판단됨

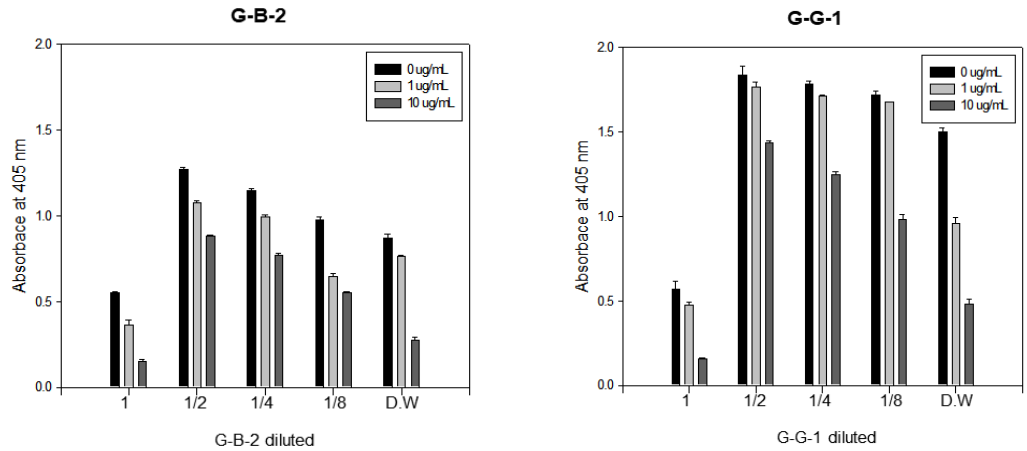


그림 54. 간접효소면역분석법을 이용한 FBS 속 브루셀라균 대사체 검출 가능 여부 확인

ⓓ 브루셀라균 대사체 peptide 검출을 위한 lateral flow assay(LFA) 법 개발

○ **항체 기반 LFA 법의 설계:** 본 연구에서는 소의 브루셀라균 대사체 peptide에 대한 고감도 신속 진단기술 개발을 위해 항체 기반의 측방유동스트립을 아래 그림과 같이 디자인하였음

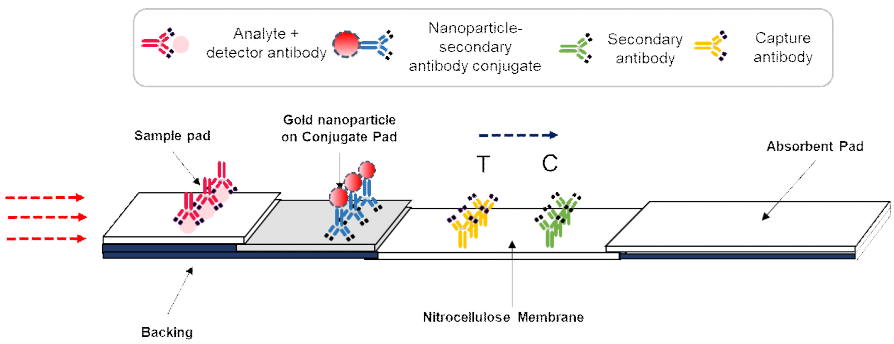


그림 55. 브루셀라균 대사체 peptide 신속 진단을 위한 LFA 법의 설계 원리. T: test line, C: control line

○ 유효성 검증

- 본 연구에서는 gold nanoparticl(GNP)을 제조하여 2차 항체와 합성량을 최적화하였음
- LFA의 최적화 조건으로 test line에 코팅항원 처리조건과 전개용매 조건 등을 확인하여 최적화 하였음

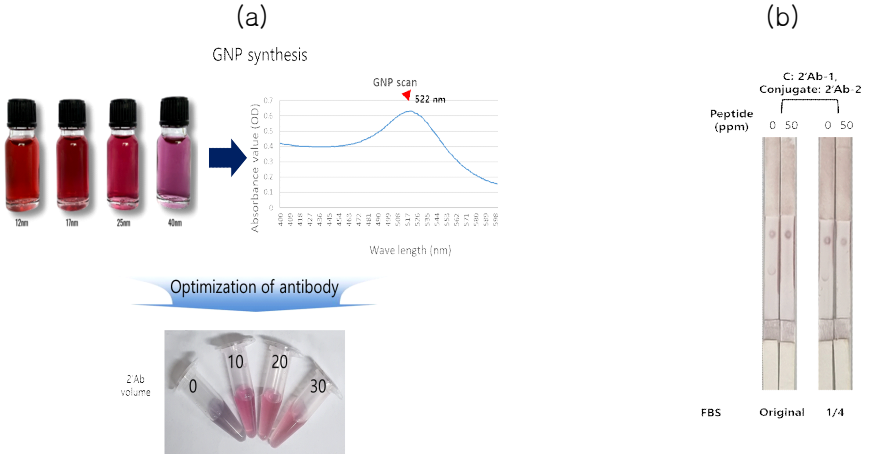


그림 56. GNP 제조 및 항체 합성량 선정(a)과 LFA 전개 결과(b)

- LFA 반응성을 확인하기 위해 새로운 2'Ab를 사용하여 GNP 농도 및 점적량, 항체 합성량 및 전개 용매량 등의 조건을 다시 최적화하였음
- 2차 항체 2종(Goat anti-mouse IgG, Rabbit Goat anti-mouse IgG)를 사용하여 항원 3종(sfGFP-peptide, KLH-GNU, OVA-GNU)의 반응성을 확인하였으며, control과 Test line에 spot이 나타나는 **GNU-BSA-1 KLH 항원조건**을 선정하여 FBS 기반 버퍼에서 양성과 음성의 경쟁 반응성을 LFA로 확인하고자 함

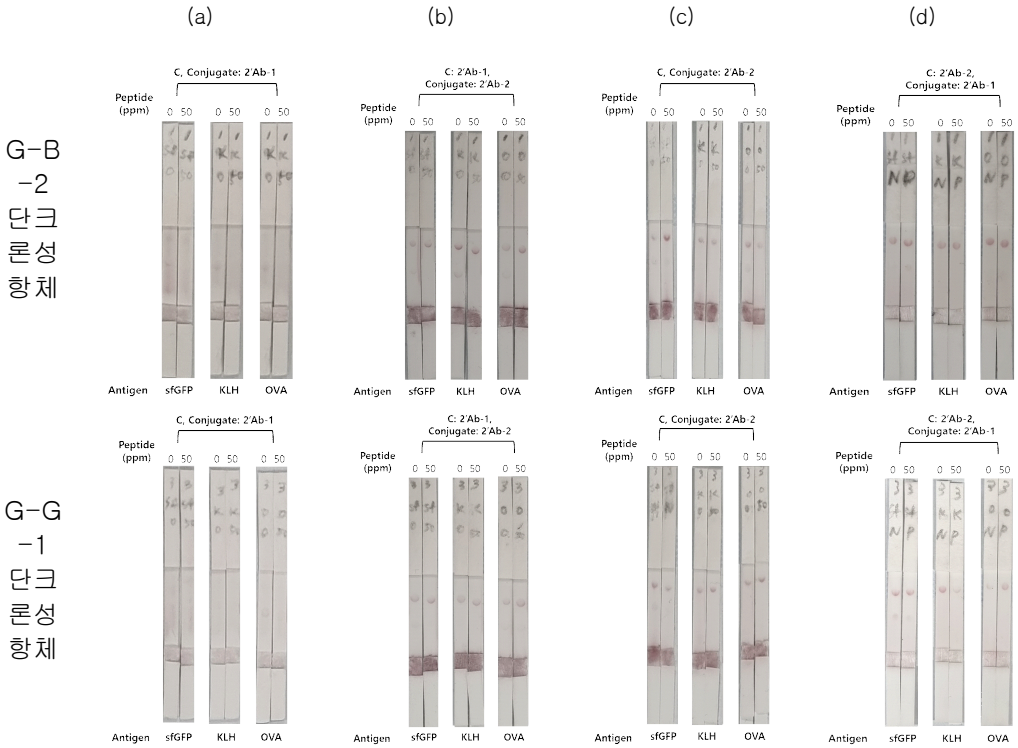


그림 57. 브루셀라균 대사체 peptide 신속 검출을 위한 항원별 LFA 법의 최적화 결과
C: control, Conjugate: conjugate pad, 2'Ab-1: Goat anti-mouse IgG, 2'Ab-2: Rabbit anti-mouse IgG

- 개발한 LFA가 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)에 free peptide를 임의로 첨가한 양성과 음성 시료에 대해 양성과 음성으로 판정하는지 여부를 확인한 결과, 아래 그림에서 보는 바와 같이 증류수를 전개 용매로 사용하였을 때 양성과 음성의 경쟁 반응이 나타났음
- 반면, FBS가 포함된 전개 용매에서 반응성이 희미하게 나타났으나 양성과 음성의 구분이 가능

한 것으로 나타났음

- 전개용매에 따라 결과에 차이가 있는 것으로 보아 실제 시료를 분석하기 위해서는 LFA에 적절한 시료 전처리법의 개발이 선행되어야 할 것으로 판단됨
- 따라서 혈액 중에 브루셀라균의 DNA를 검출할 수 있는 등온증폭진단기술과 측방유동스트립이 병합된 LAMP-LFA 법을 브루셀라균 신속 고감도 진단 키트로 개발하고자 함

그림 58. 브루셀라균 대사체 peptide 신속 검출을 위한 항원별 LFA 법 시료 적용 결과. 전개용매: 증류수(a), FBS(b), C: control, Conjugate: conjugate pad, 2'Ab-1: Goat anti-mouse IgG, 2'Ab-2: Rabbit anti-mouse IgG

② 브루셀라균 신속 진단을 위한 고리매개등온증폭법 기반의 측방유동스트립(Loop-mediated isothermal amplification-lateral flow assay; LAMP-LFA 법)의 개발

○ **LAMP-LFA법의 설계:** 소 브루셀라균에 대한 고감도 신속 진단기술 개발을 위해 고리매개등온증폭법 기반의 측방유동스트립을 아래 그림과 같이 디자인하였음 (그림 59)

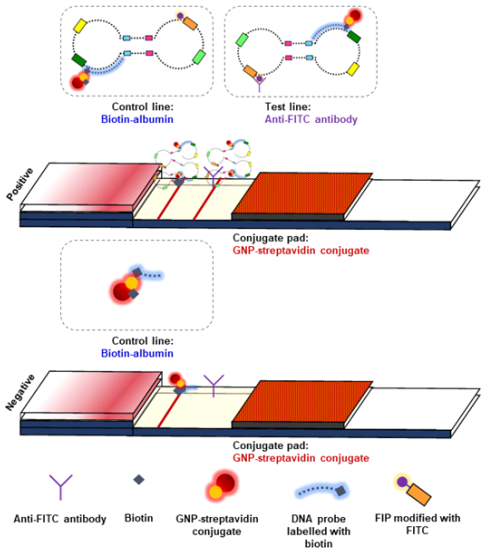


그림 59 소 브루셀라균 신속 진단을 위한 LAMP-LFA법의 설계 원리

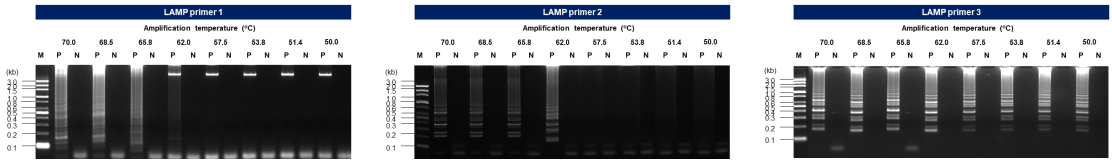
○ **LAMP-LFA법의 최적화**

ⓐ **대상유전자의 선정:** 문헌조사를 통해 소 부르셀라균 검출 LAMP법 개발에 가장 많이 활용된 *BruAb2_0168* gene을 대상유전자로 최종 선정하였음

ⓑ **LAMP primer의 선정:** 대상유전자 *BruAb2_0168* gene을 대상으로 개발 및 보고된 3종의 LAMP primer 중 3번 LAMP primer를 최종 선정하였으며(그림 60), oligonulceotide 합성 시 FIP primer의 5' 말단에 FITC를 tagging 함으로써 추후 LFA로의 적용 가능성을 고려하였음 (표 5)

표 5. 소 브루셀라균 특이적 LAMP primer의 염기서열

		염기서열 (5'-3')	nt
LAMP primer 1	F3	GGG TGG AAC GAC CTT TGC	18
	B3	ATT GCC ACC AAT CTC TCC G	19
	FIP	FITC-CAA AAC CTT GGC TGT CAC CGC TTG GCA GTC TGG TGC AGA A	40
	BIP	CGG TAC GAC CAC GGT GTC GAC ACC GCT ATT CAC CGT CAC	39
LAMP primer 2	F3	GCG GAA GCA AGA ATG ACC	18
	B3	TCT TAC CTT GTG ACG CCT G	19
	FIP	FITC-GGA CTG CGT TGA GTA CGC ATC CGC AAG CAC AGA CCA CAG C	40
	BIP	CGC TCT TAC AAG TCT TGC GCC CTT CTG AGA TGT GCC CAC TG	41
LAMP primer 3	F3	GGG CTT ACG CTT GGA TCG	18
	B3	CGT AGC TGG GGC TAT TCG T	19
	LF	TCG TTG ACC TGC TGG TTG AT	20
	LB	GGC AAT GGC ACC TGG ACA	18
	FIP	FITC-AGT GGC GCC AGT AGT ATT GAC GTT TTT GAG CGT GGA CAA GGT GT	44
	BIP	CGC AGG GCG ATG GTC TGT TGC TTC AGT TGA AGT TGC CCG TAG	42



P: positive; *B. abortus* DNA, N: negative; *E. coli* DNA

그림 60. 3종의 LAMP primer를 이용한 반응성 확인 결과

ⓒ 프로브의 디자인

✓ 1차 디자인(개선 전, 구조: biotin-spacer-target gene-protector)

- 실험에 사용한 *BruAb2_0168* gene 특이적 DNA probe는 분자비콘의 loop 구조에 결합할 수 있도록 BIP region을 target으로 디자인하였으며, 추후 LFA로의 적용 가능성과 비특이적인 반응 발생 가능성을 고려하여 3' 말단에 biotin을 tagging 하였음 (그림 61)

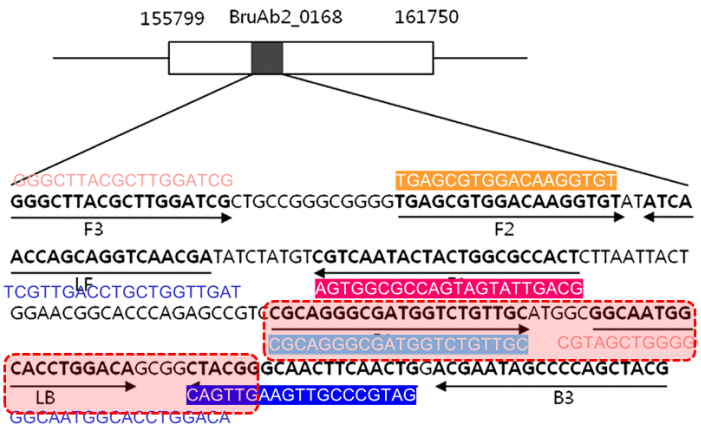
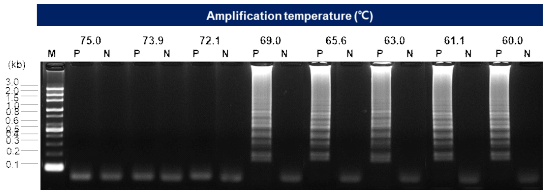


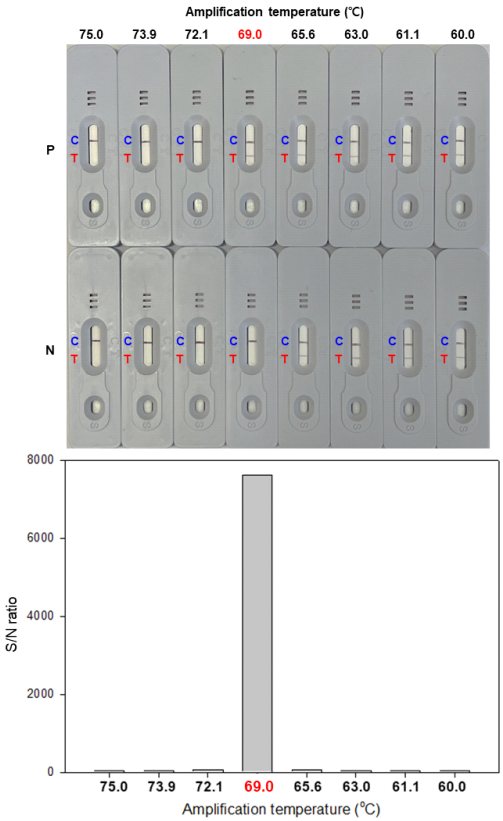
그림 61. 3번 LAMP primer 특이적 DNA probe의 디자인

- 그 결과 프로브가 self folding 또는 dimer를 형성함에 따라 스트립에서 비특이적인 반응이 나타나는 것으로 판단하여 구조를 개선하였음



P: positive; *B. abortus* DNA, N: negative; *E. coli* DNA

그림 62. 'biotin-spacer-target gene-protector' 구조의 프로브를 이용한 LAMP 반응 및 해당 LAMP 증폭산물에 대한 전기영동 결과

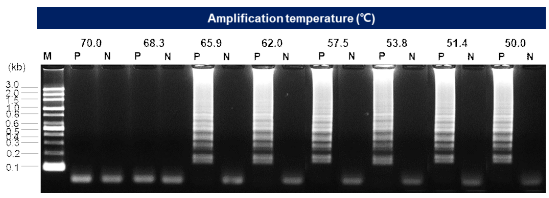


P: positive; *B. abortus* DNA, N: negative; *E. coli* DNA

그림 63. 'biotin-spacer-target gene-protector' 구조의 프로브를 이용한 LAMP 반응 및 해당 LAMP 증폭산물에 대한 스트립 결과

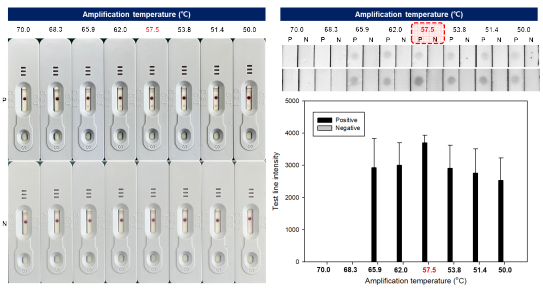
✓ 2차 디자인(개선 후, 구조: biotin-spacer-target gene-biotin)

- 프로브의 3' 말단에 poly-A 대신 biotin을 tagging 하였으며, spacer의 경우 아데닌(adenin) 염기 5개를 배치하였음
- 그 결과 비특이적인 반응은 나타나지 않았고, 핵산의 증폭 효율과 프로브의 혼성화 효율이 가장 높은 57.5℃를 최적의 반응 온도로 선정하였음



P: positive; *B. abortus* DNA, N: negative; *E. coli* DNA

그림 64. 'biotin-spacer-target gene-biotin' 구조의 개선된 프로브를 이용한 LAMP 반응 및 해당 LAMP 증폭산물에 대한 전기영동 결과



P: positive; *B. abortus* DNA, N: negative; *E. coli* DNA

그림 65. 'biotin-spacer-target gene-biotin' 구조의 개선된 프로브를 이용한 LAMP 반응 및 해당 LAMP 증폭산물에 대한 스트립 결과

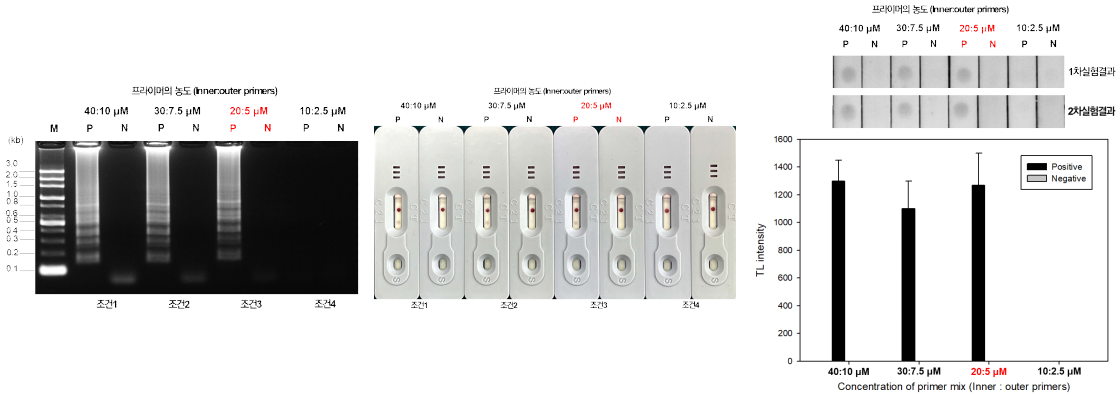
ⓓ 시약의 농도

✓ **프라이머 농도:** 10:2.5-40:10 μM (Inner : outer primers)의 primer mix를 사용하여 최적화 실험을 진행함

표 6. 프라이머의 최적 농도 확인을 위한 실험 조건

프라이머의 농도 (Inner : outer primers, μM)			
조건1	조건2	조건3	조건4
40 : 10	30 : 7.5	20 : 5	10 : 2.5

- 전기영동 및 스트립 결과에서 가장 이상적인 반응을 도출한 조건3을 최적화 조건으로 선정



P: positive; *B. abortus* DNA, N: negative; *E. coli* DNA

그림 66. 최적의 프라이머 농도 확립을 위한 LAMP-LFA 실험 결과
(좌) 전기영동, (중) 스트립, (우) 스트립 중 test line (TL)에 대한 정량화 결과

- 변경된 조건을 기반으로 분석법의 검출한계를 확인하였으며, 위 확립한 조건3의 프라이머 농도가 분석법의 검출한계(검출한계: 8.85x10^0 CFU/mL)에 영향을 미치지 않음을 확인하였음

P: positive; *B. abortus* DNA, N: negative; *E. coli* DNA

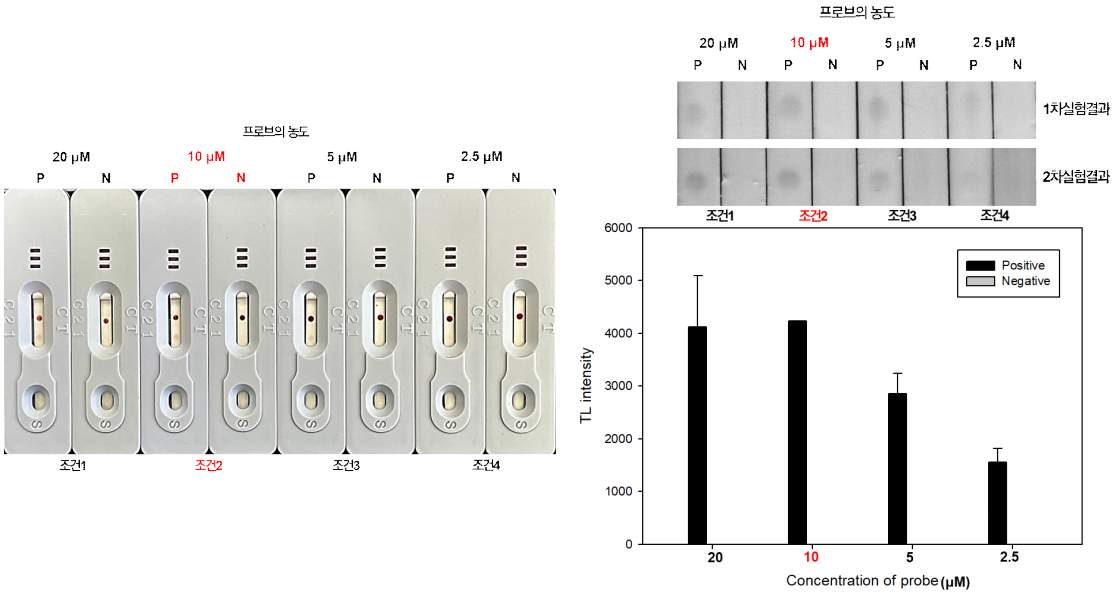
그림 67. 확립한 프라이머 농도를 기반으로 실시한 LAMP-LFA법의 검출한계 확인 결과
(좌) 전기영동, (중) 스트립, (우) 스트립 중 test line (TL)에 대한 정량화 결과

✓ **프로브의 농도:** 2.5-20 μM의 프로브를 사용하여 최적화를 진행함

표 7. 프로브의 최적 농도 확인을 위한 실험 조건

프로브의 농도 (μM)			
조건1	조건2	조건3	조건4
20	10	5	2.5

- Test line에서 가장 높은 intensity를 나타낸 조건2를 최적화 조건으로 선정하였음



P: positive; *B. abortus* DNA, N: negative; *E. coli* DNA

그림 68. 최적의 프로브 농도 확립을 위한 LAMP-LFA 실험 결과
(좌) 스트립, (우) 스트립 중 test line (TL)에 대한 정량화 결과

■ **측방유동스트립(결과 확인 단계)의 최적 조건 확립**

ⓐ **금 나노입자(Gold nanoparticle; GNP)-streptavidin(SA) conjugate의 합성 조건 확립**

✓ **GNP의 합성 및 대량 확보**

- 본 연구에서는 Frens (1973)등이 보고한 문헌 자료에 따라 금 나노입자를 합성하였으며, 합성한 네 가지의 colloidal gold 용액에 대해 파장을 스캔하고(400-800 nm), 각 용액의 peak SPR wavelength (PSW; nm)를 관찰함으로써 금 나노입자의 대략적인 크기를 확인하였음
- 30 nm의 금 나노입자를 실험에 사용하는 것으로 결정하였음

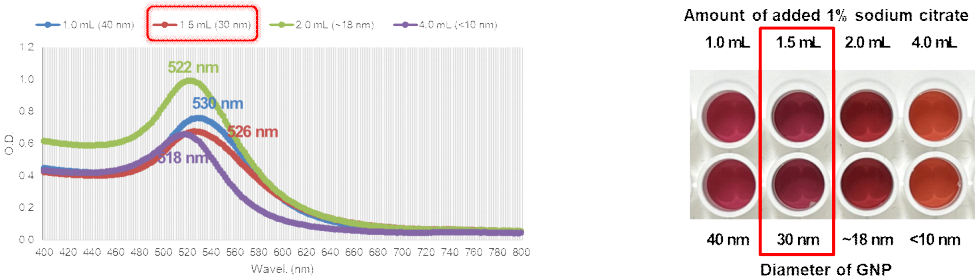


그림 69. 합성한 colloidal gold 용액의 파장 스캔(400-800 nm) 결과(좌) 및 GNP에 대한 이미지 촬영 결과(우)

✓ **GNP-SA conjugate 합성을 위한 streptavidin의 안정화 농도 확립:** 40 μL 이상의 streptavidin을 첨가한 조건에서 안정화가 유지되는 것으로 확인됨

조건 별 SA 첨가량 (단위: μL in 500 μL의 colloidal gold solution)				
조건 1 (A1)	조건 2 (B1)	조건 3 (C1)	조건 4 (D1)	조건 5 (E1)
5	10	15	20	25
조건 6 (A2)	조건 7 (B2)	조건 8 (C2)	조건 9 (D2)	조건 10 (E2)
30	35	40	45	50

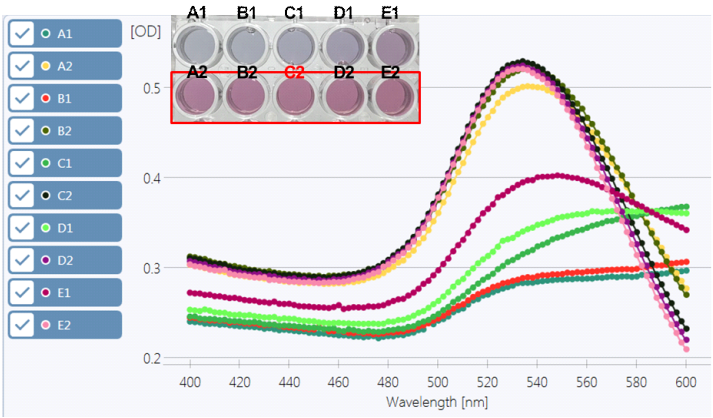


그림 70. GNP-SA conjugate 합성을 위한 streptavidin 안정화 농도 확인 결과

- 합성 이후 bare gold 용액을 대조군으로 파장의 변화(blue shift)를 확인하였고, GNP-SA conjugate가 합성됨을 확인함

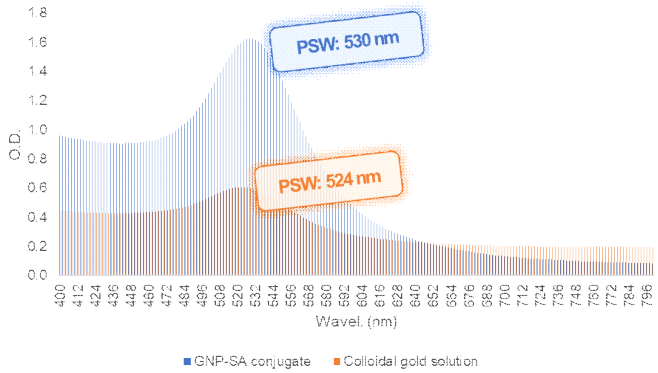


그림 71. 합성한 GNP-SA conjugate(푸른색)와 bare GNP(주황색)에 대한 파장 스캔 결과

ⓑ 측방유동스트립의 구성 요소 별 최적 조건 확립

✓ **Conjugate pad에 처리되는 GNP-SA conjugate의 최적 농도 확인:** 1-3배로 희석한 합성물을 대상으로 최적화를 진행함

표 8. Conjugate pad에 처리되는 GNP-SA conjugate의 최적 농도 확인을 위한 실험 조건

GNP-SA conjugate의 희석배수(PSW: 530 nm, O.D.: 2.3)		
조건1	조건2	조건3
1배	2배	3배

- Test line에서 가장 높은 intensity를 나타내는 조건1을 최적화 조건으로 선정하였음

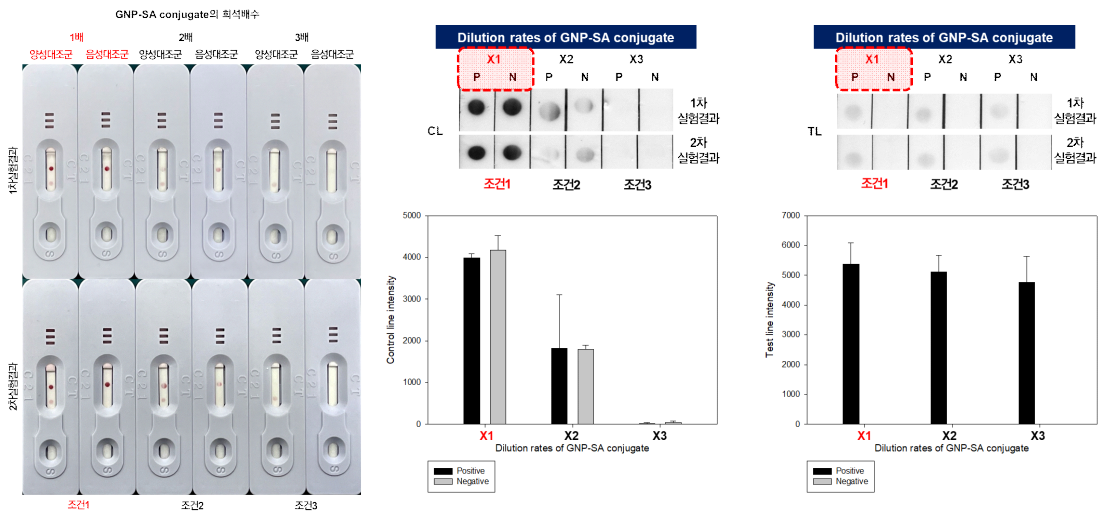


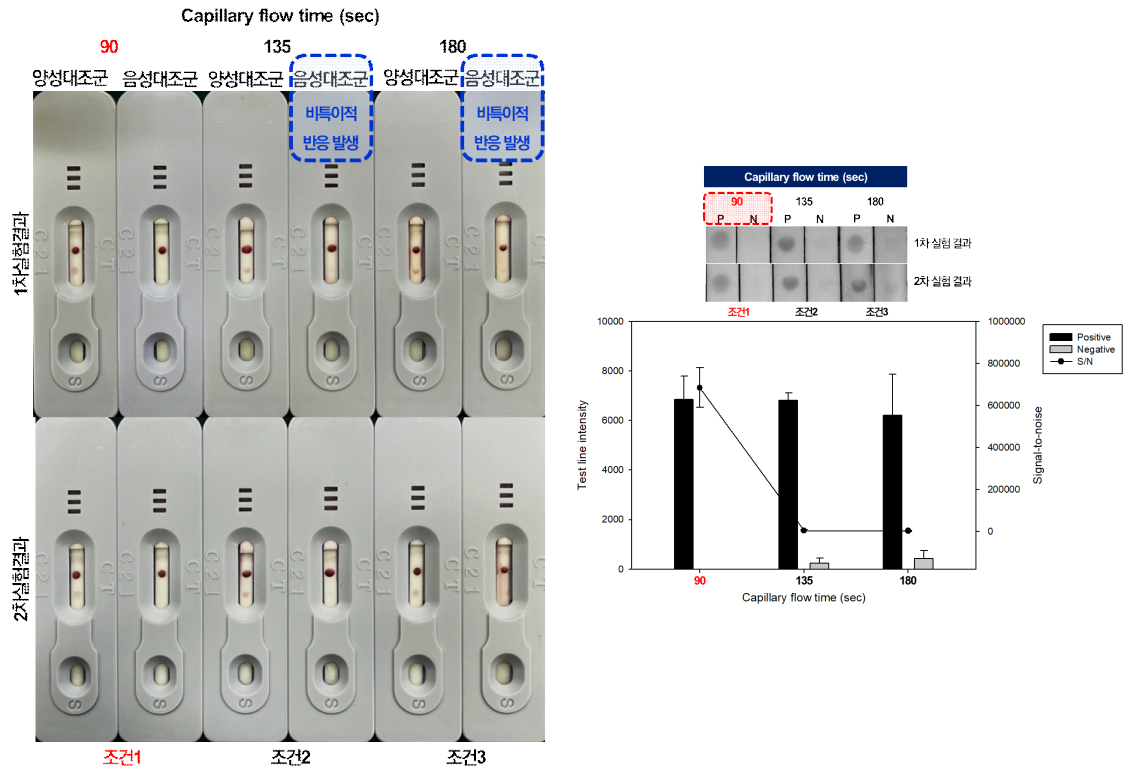
그림 72. conjugate pad에 처리되는 GNP-SA conjugate의 최적 농도 확인 결과 (좌) 스트립, (중) 스트립의 CL 정량화 결과, (우) 스트립의 TL 정량화 결과

✓ **Nitrocellulose (NC) membrane의 선정:** 90±23-180±45 sec/4cm의 capillary flow time을 가지는 membrane을 사용하여 최적화를 진행함

표 9. NC membrane 선정을 위해 사용한 NC membrane filter의 종류 및 실험 조건

NC membrane filter		
조건1	조건2	조건3
90±23 sec/4cm	135±34 sec/4cm	180±45 sec/4cm

- 조건1의 NC membrane을 스트립 제작에 사용하는 것으로 결정하였음



P: positive; *B. abortus* DNA, N: negative; *E. coli* DNA

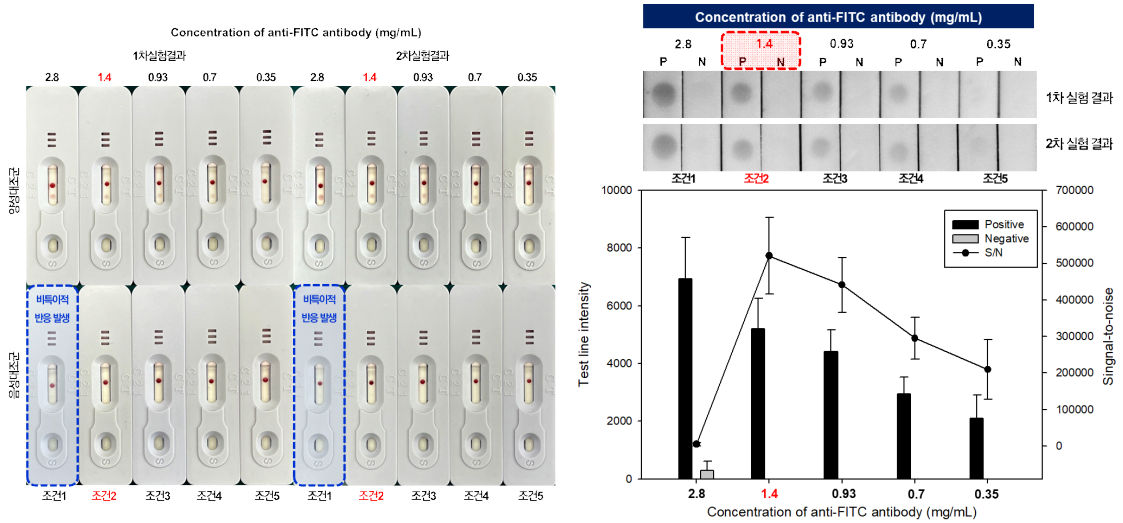
그림 73. 최적의 capillary flow time을 가진 NC membrane 선정을 위한 실험 결과 (좌) 스트립, (우) 스트립 중 test line (TL)에 대한 정량화 결과

✓ **NC membrane의 test line에 처리되는 anti-FITC 항체의 농도:** 0.35-2.8 mg/mL의 범위에서 최적화를 진행함

표 10. Test line에 처리되는 anti-FITC 항체의 최적 농도 확립을 위한 실험 조건

Anti-FITC antibody (mg/mL)				
조건1	조건2	조건3	조건4	조건5
2.8	1.4	0.93	0.7	0.35

- 비특이적 반응 없이 test line에서 가장 높은 intensity를 나타내는 조건2를 최적화 조건으로 선정하였음



P: positive; *B. abortus* DNA, N: negative; *E. coli* DNA

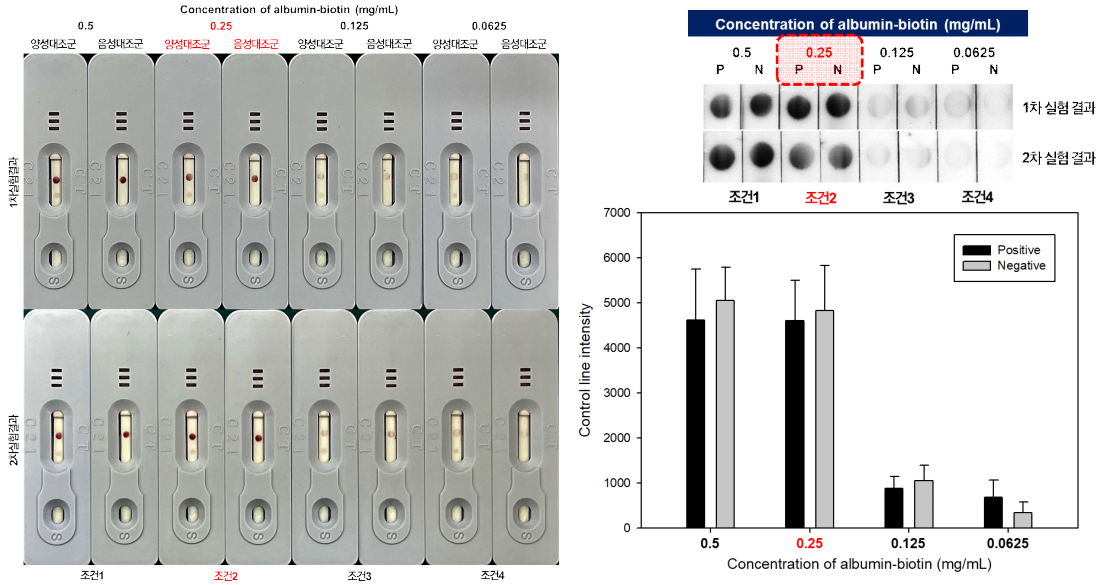
그림 74. Anti-FITC 항체의 최적 농도 확립을 위한 실험 결과
(좌) 스트립, (우) 스트립 중 test line (TL)에 대한 정량화 결과

✓ **NC membrane의 control line에 처리되는 albumin-biotin의 농도**: 0.0625-0.5 mg/mL의 범위에서 최적화를 진행함

표 11. Control line에 처리되는 albumin-biotin의 최적 농도 확립을 위한 실험 조건

Albumin-biotin (mg/mL)			
조건1	조건2	조건3	조건4
0.5	0.25	0.125	0.0625

- control line에서 최소량으로 가장 높은 intensity를 나타내는 조건2를 최적화 조건으로 선정하였음



P: positive; *B. abortus* DNA, N: negative; *E. coli* DNA

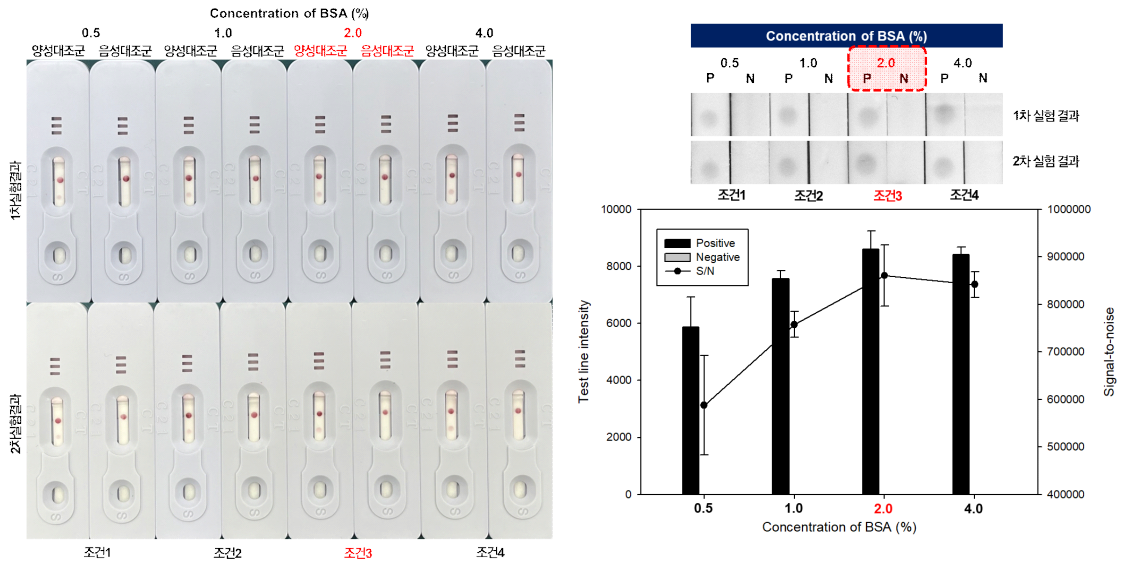
그림 75. Biotin-albumin의 최적 농도 확립을 위한 실험 결과
(좌) 스트립, (우) 스트립 중 control line (CL)에 대한 정량화 결과

✓ **NC membrane의 blocking을 위한 bovine serum albumin (BSA)의 농도:** 0.5-4%의 범위에서 최적화를 진행함

표 12. NC membrane의 blocking 용액(BSA)에 대한 최적 농도 확립을 위한 실험 조건

BSA (%)			
조건1	조건2	조건3	조건4
0.5	1.0	2.0	4.0

- 비특이적 반응 없이 test line에서 가장 높은 intensity를 나타내는 조건3을 최적화 조건으로 선정하였음



P: positive; *B. abortus* DNA, N: negative; *E. coli* DNA

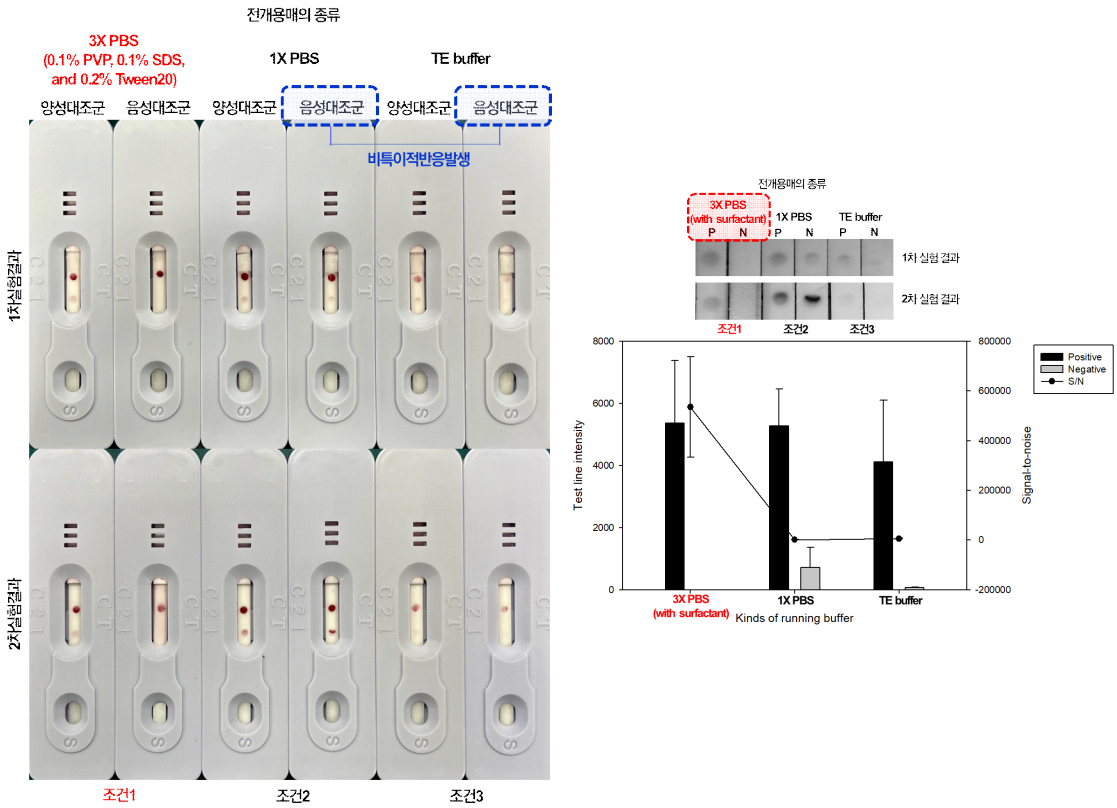
그림 76. NC membrane에 대한 blocking 용액(BSA)의 최적 농도 확립을 위한 실험 결과
(좌) 스트립, (우) 스트립 중 test line (TL)에 대한 정량화 결과

✓ **측방유동스트립 용 전개용매(Running buffer)의 선정:** 아래 세 가지 전개용매를 대상으로 실험을 진행

표 13. 측방유동스트립용 전개용매 선정을 위해 사용한 버퍼의 종류

Running buffer의 종류	
조건1	3X PBS (0.1% SDS, 0.1% PVP 및 0.2% Tween 20 첨가)
조건2	1X PBS (0.05M, pH 7.4)
조건3	TE buffer (pH 8.0)

- 계면활성제인 PVP, SDS 및 Tween 20등을 첨가한 버퍼를 전개용매로 사용한 조건1에서 비특이적인 반응 없이 뚜렷한 실험 결과가 도출되어, 해당 조건을 최적화 조건으로 선정



P: positive; *B. abortus* DNA, N: negative; *E. coli* DNA

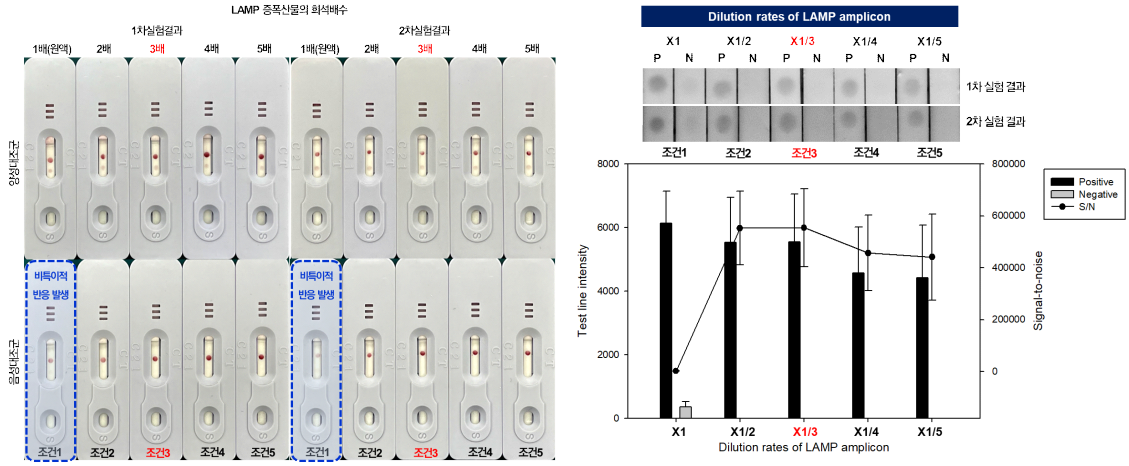
그림 77. 전개용매 선정을 위한 실험 결과
(좌) 스트립, (우) 스트립 중 test line (TL)에 대한 정량화 결과

✓ **전개용매를 이용한 LAMP 증폭산물의 희석배수 선정:** 전개용매를 이용해 1-5배 희석하는 조건으로 최적화를 진행함

표 14. LAMP 증폭산물의 최적 희석배수 선정을 위한 실험 조건

LAMP 증폭산물의 희석배수 (LAMP 증폭산물 첨가량 : 전개용매 첨가량, μL)				
조건1	조건2	조건3	조건4	조건5
원액 (100 : 0)	2배 (50 : 50)	3배 (33 : 66)	4배 (25 : 75)	5배 (20 : 80)

- 실험에 사용되는 시약 등 경제성을 고려하여 조건3을 최적화 조건으로 선정함



P: positive; *B. abortus* DNA, N: negative; *E. coli* DNA

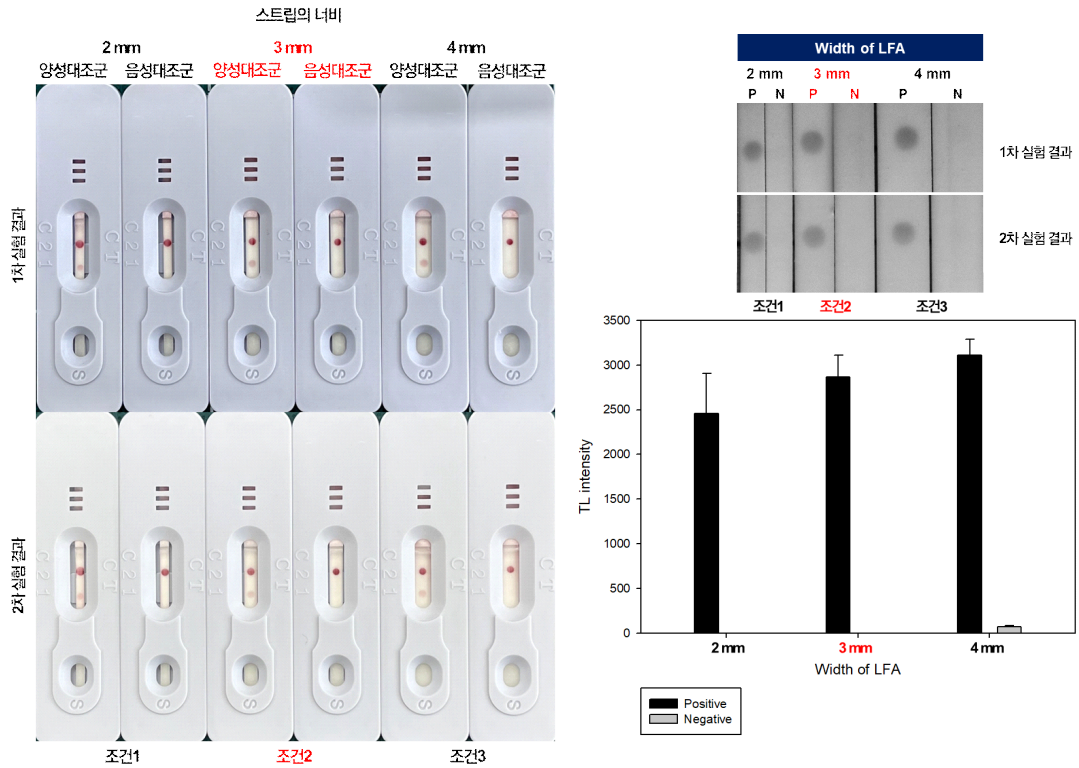
그림 78. 전개용매를 이용한 LAMP 증폭산물의 최적 희석배수 선정을 위한 실험 결과
(좌) 스트립, (우) 스트립 중 test line (TL)에 대한 정량화 결과

✓ **스트립의 너비:** 2-4mm의 너비를 사진 스트립을 이용하여 최적화 실험을 진행

표 15. 스트립의 최적 너비 확인을 위한 실험 조건

스트립의 너비 (mm)		
조건1	조건2	조건3
2	3	4

- 실험 결과 조건2의 너비(3mm)를 가진 스트립을 실험에 사용하는 것으로 결정하였음

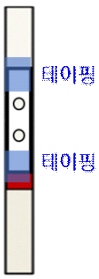


P: positive; *B. abortus* DNA, N: negative; *E. coli* DNA

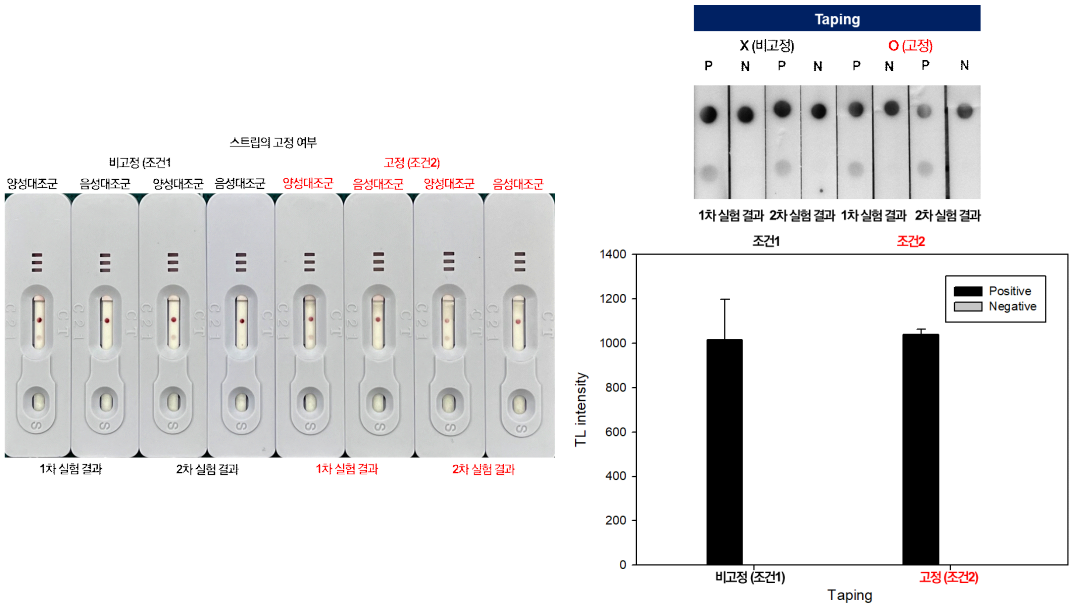
그림 79. 최적의 너비를 가진 스트립을 선정하기 위한 실험 결과
(좌) 스트립, (우) 스트립 중 test line (TL)에 대한 정량화 결과

✓ **테이핑(Taping)을 통한 스트립의 고정 여부:** 비고정과 고정 스트립을 이용하여 실험을 진행

표 16. 테이핑(Taping)을 통한 스트립의 고정 여부 확인을 위한 실험 조건

테이핑 여부	
조건1	조건2
	
X (비고정)	O (고정)

- 전개속도의 차이(조건1: 약 3분, 조건2: 1분 30초)와 test line에서 관찰되는 intensity를 고려하여 스트립을 고정(조건2)시키는 것으로 결정하였음



P: positive; *B. abortus* DNA, N: negative; *E. coli* DNA

그림 80. 최적의 너비를 가진 스트립을 선정하기 위한 실험 결과
(좌) 스트립, (우) 스트립 중 test line (TL)에 대한 정량화 결과

✓ **반응종결시점 선정:** 3-15분 이후 관찰하여 최적 반응종결시점을 선정함

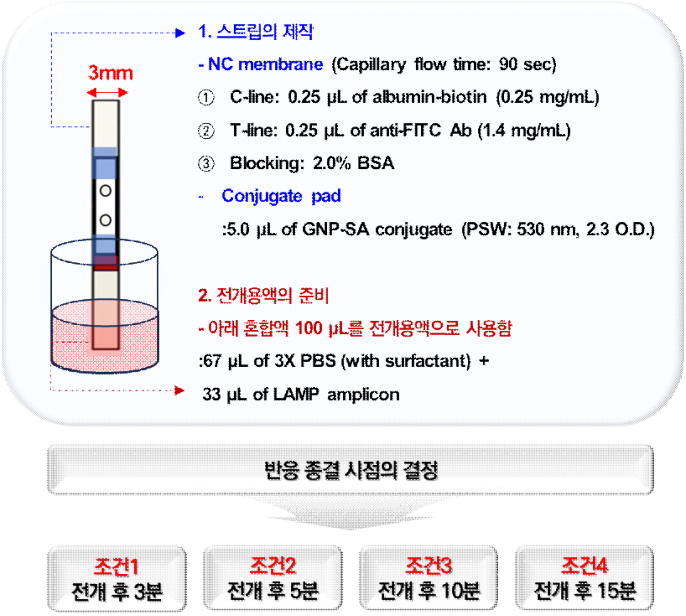


그림 81. 측방유동스트립 제작을 위해 확립된 조건 및 반응종결시점 선정을 위한 실험 조건

- 신속하고 정확한 결과의 판독을 위해 최적의 반응종결시점은 조건2(5분)로 결정하였음

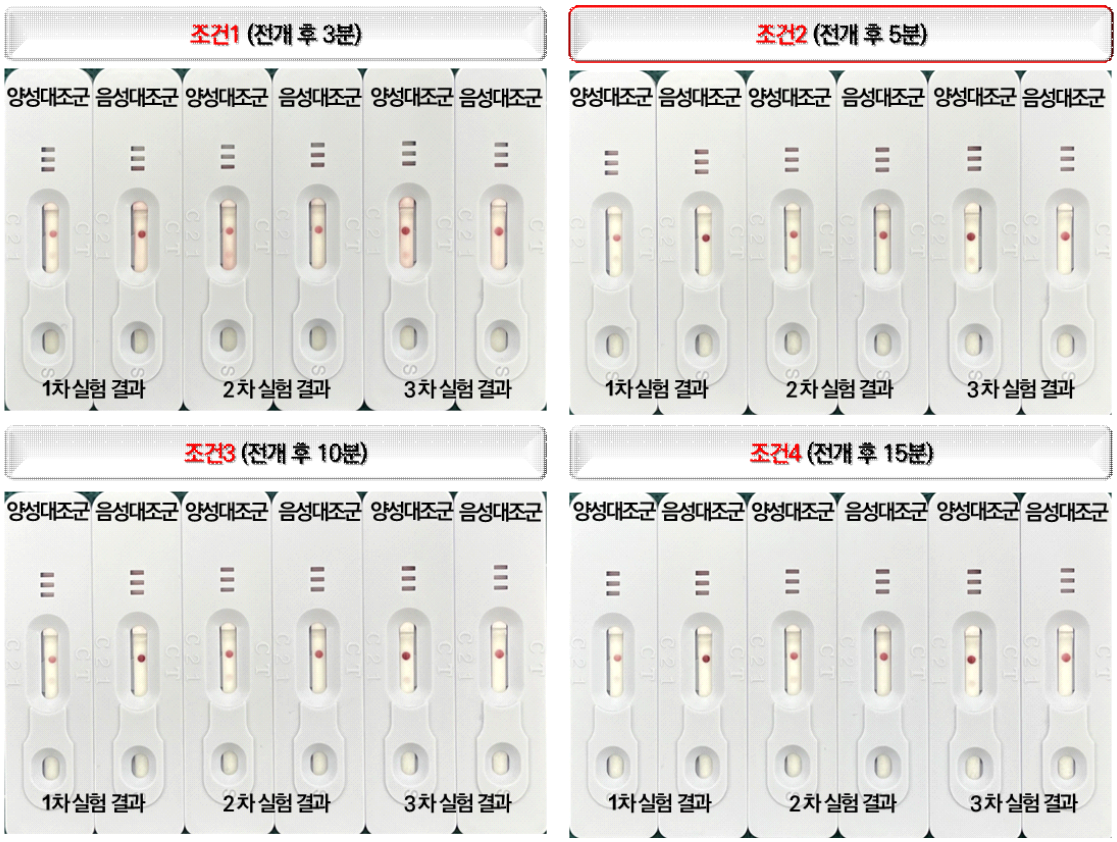


그림 82. 측방유동스트립의 최적 반응종결시점 선정을 위한 실험 결과

○ LAMP-LFA법의 평가

ⓐ **Standard buffer상 LAMP-LFA법의 검출한계 확인:** 0-8.85X10^{9} CFU/mL의 *B. abortus*로부터 추출한 genomic DNA를 template로 첨가하여 LAMP mixture를 제조하고 각각 40분, 50분 및 60분간 57.5℃에서 반응하였음

- 최적 반응시간은 50분으로 결정하였으며, 이 때 검출한계는 8.85X10^{0} CFU/mL로 확인됨

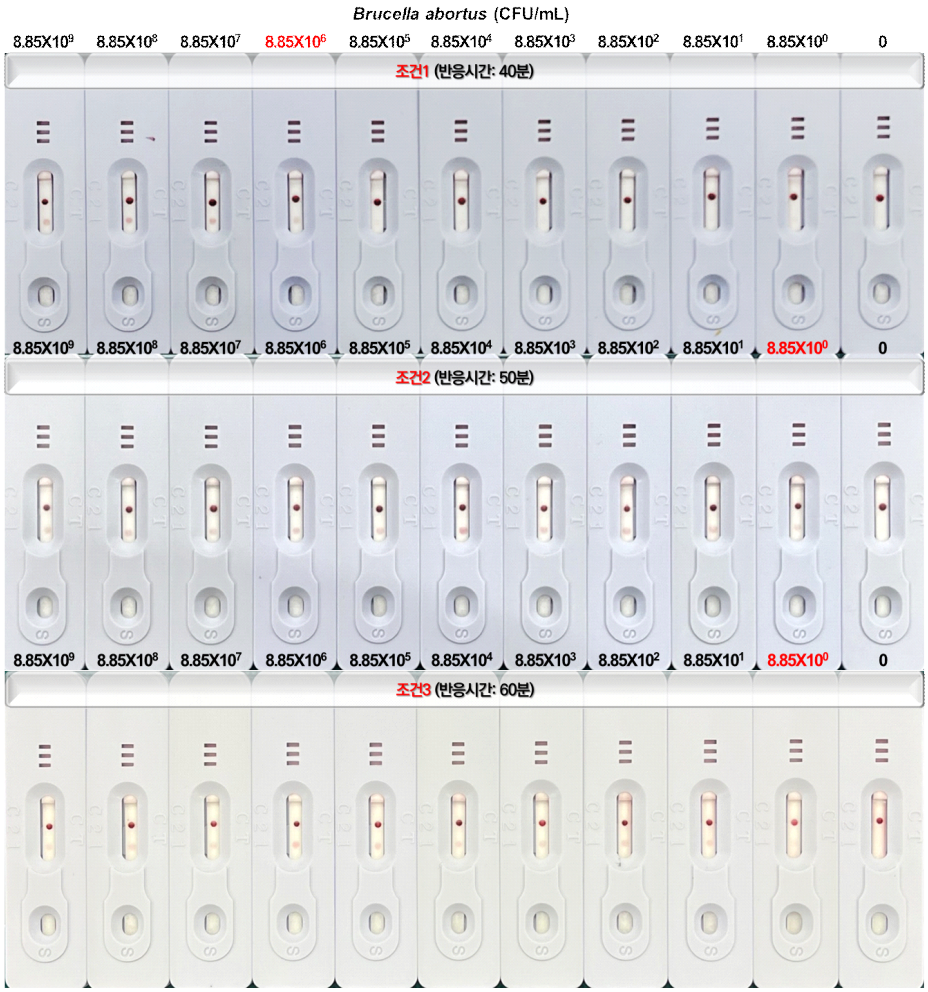


그림 83. LAMP 반응시간에 따른 분석법의 검출한계 확인 실험 결과

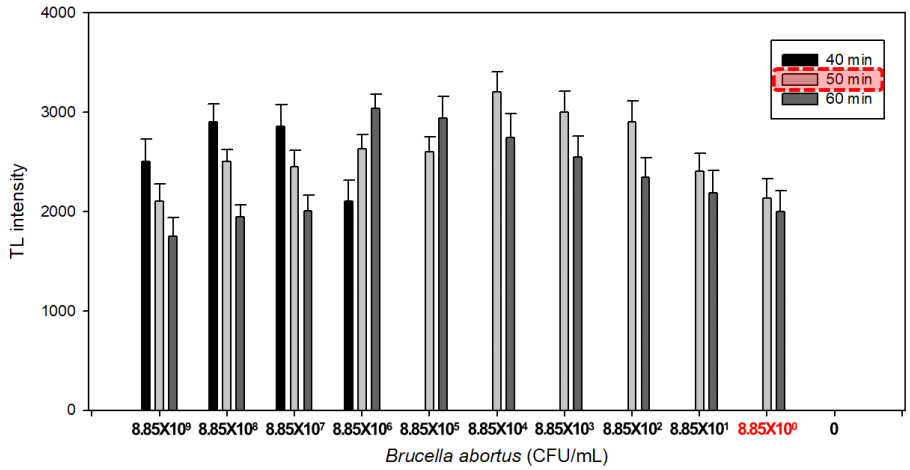


그림 84. LAMP 반응시간에 따른 분석법의 검출한계 확인 실험 결과물(스트립)에 대한 정량화 결과

ⓑ **교차반응성 확인:** 면역학적으로 교차반응을 일으키는 주요 원인균을 포함한 다양한 표준균주를 대상으로 분석법의 교차반응성을 확인하였음

표 17. LAMP-LFA법의 특이성 확인을 위해 사용한 균주 목록

시판 kit의 특이성 확인을 위해 사용한 균주			
A	B	C	D
Brucella abortus	*Yersinia enterocolitica*	*Escherichia coli*	*Bacillus cereus*
E	F	G	H
Staphylococcus aureus	*Salmonella Typhimurium*	*Listeria monocytogenes*	*Vibrio parahaemolyticus*

- 그 결과 아래 그림과 같이 개발한 분석법이 *B. abortus*에 대해서만 특이적으로 양성 반응을 나타내는 것을 확인할 수 있었음

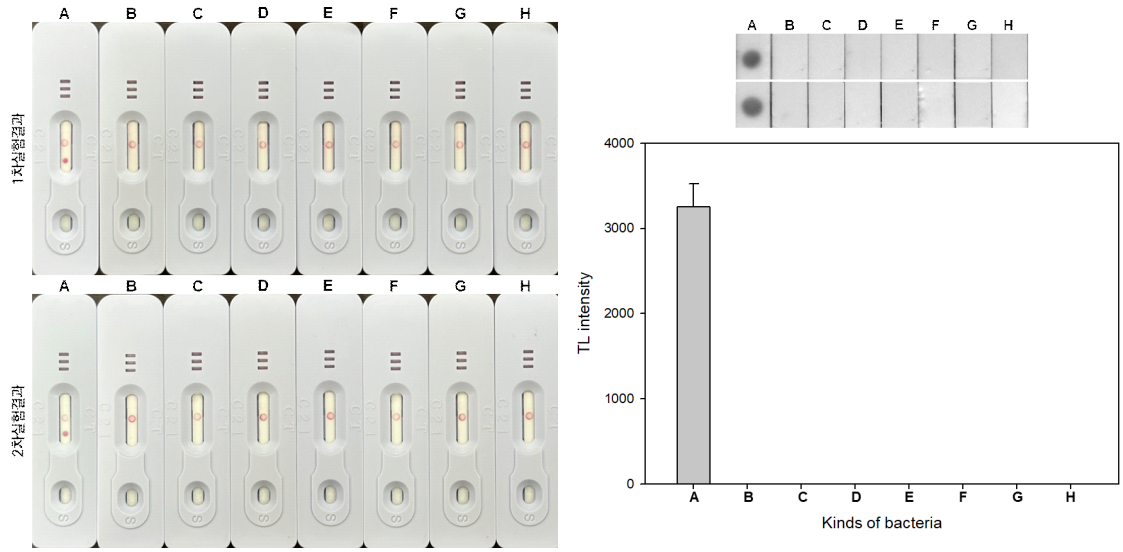


그림 85. 교차반응성 확인 실험 결과
(좌) 스트립, (우) 스트립 중 test line (TL)에 대한 정량화 결과

ⓒ 침전물(피로인산마그네슘; $Mg_2P_2O_7$)이 생성된 LAMP 증폭산물에 대한 분석법의 적용 가능성 확인: 아래 세 가지 조건의 LAMP 증폭산물을 이용하여 개발된 분석법으로의 적용 가능성을 확인하였음

표 18. 침전물이 생성된 LAMP 증폭산물에 대한 분석법의 적용 가능성 확인 실험 조건

LAMP 증폭산물의 종류		
조건1	조건2	조건3
침전물이 생성된 양성대조군	침전물이 없는 양성대조군	침전물이 없는 음성대조군

- 그 결과 조건1과 조건2의 양성대조군 LAMP 증폭산물을 전개한 스트립은 양성으로 판독됨

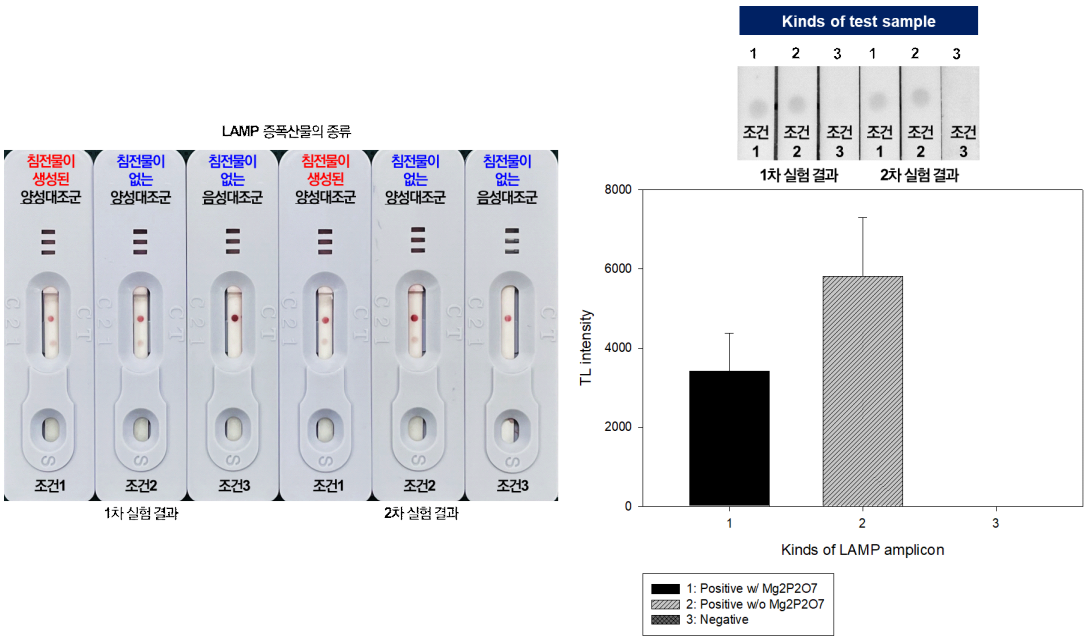


그림 86. LAMP 부산물(피로인산마그네슘)이 생성된 증폭산물에 대한 측방유동스트립 적용 결과
(좌) 스트립, (우) 스트립 중 test line (TL)에 대한 정량화 결과

○ **브루셀라 오진률 최소화를 위한 시료(전혈) 전처리법 확립 및 검증**

- 혈액 내 존재하는 *B. abortus* DNA의 검출을 위해 *B. abortus*-양성 전혈 시료로부터 백혈구와 혈장을 각각 분리하고, 각 시료를 대상으로 *B. abortus* DNA의 검출 가능 여부를 확인하였음

ⓐ Density gradient medium (Lymphoprep)를 이용한 *B. abortus*-양성 전혈 중 백혈구 및 혈장의 분리

- 전혈 시료로부터 백혈구를 분리하는 방법은 아래와 같음
  → 3 mL의 lymphoprep 배지를 15 mL의 tube에 분주한 뒤 전혈 시료 4 mL를 적층함
  → 800 xg에서 30분간 원심분리 실시함 (온도는 20±5℃, break-off 모드로 설정)
  → 아래 그림과 같이 밀도에 따라 분리된 혈액 시료 중 백혈구(buffy coat)와 혈장(plasma)를 채취하여 DNA 추출에 사용

그림 87. Density gradient medium을 이용한 *B. abortus*-양성 전혈 중 백혈구 및 혈장의 분리 과정
(좌) 배지 내 전혈 시료의 적층(원심분리 전), (우) 밀도에 따라 분리된 전혈 시료(원심분리 후)

ⓑ 분리된 백혈구 및 혈장 시료에 대한 DNA 추출 및 conventional PCR을 이용한 전처리법의 검증

- 이후 시판 DNA 추출 키트를 이용해 분리된 백혈구 및 혈장으로부터 genomic DNA를 추출하고, *B. abortus* 특이적 프라이머를 이용해 아래 표와 같은 조건대로 PCR을 실시하였음

표 19. *B. abortus* 특이적 프라이머의 염기서열 정보

Primer	Sequences (5'-3')	Amplicon Size (bp)
Forward primer	GGG CTT ACG CTT GGA TCG	212
Reverse primer	CGT AGC TGG GGC TAT TCG T	

표 20. *B. abortus* 검출을 위한 conventional PCR의 실험 조건

Num.	PCR steps	PCR conditions	
1	Initial denaturation	95℃, 5 min	X1 cycle
2	Denaturation	95℃, 30 sec	X30 cycles
3	Annealing	60℃, 30 sec	
4	Extension	72℃, 20 sec	
5	Storage	4℃, ∞	X1 cycle

- 이때, 앞서 언급한 바와 같이 네 가지 DNA 시료를 대상으로 실험을 진행하였음

표 21. 전혈 전처리법의 검증을 위해 사용한 시료의 종류

검증대상 시료의 종류			
시료1	시료2	시료3	시료4
*B. abortus*로부터 추출된 genomic DNA	백혈구 시료로부터 추출된 genomic DNA	혈장 시료로부터 추출된 genomic DNA	*E. coli* 로부터 추출된 genomic DNA

- 반응 후 전기영동을 실시한 결과, 백혈구(시료2) 및 혈장(시료3) 시료에서도 양성대조군과 동일한 크기의 증폭산물이 관찰됨
- 특히 PCR 증폭산물을 정량화한 결과, 백혈구보다 혈장 시료로부터 추출된 genomic DNA를

사용한 조건에서 상대적으로 많은 양의 PCR 증폭산물이 생성되는 것으로 확인됨
- 따라서 전혈 시료 중 *B. abortus*의 존재 여부를 확인하기 위해 전혈 시료 중 혈장을 분리하여 DNA 추출 및 분석하는 것으로 결정하였음

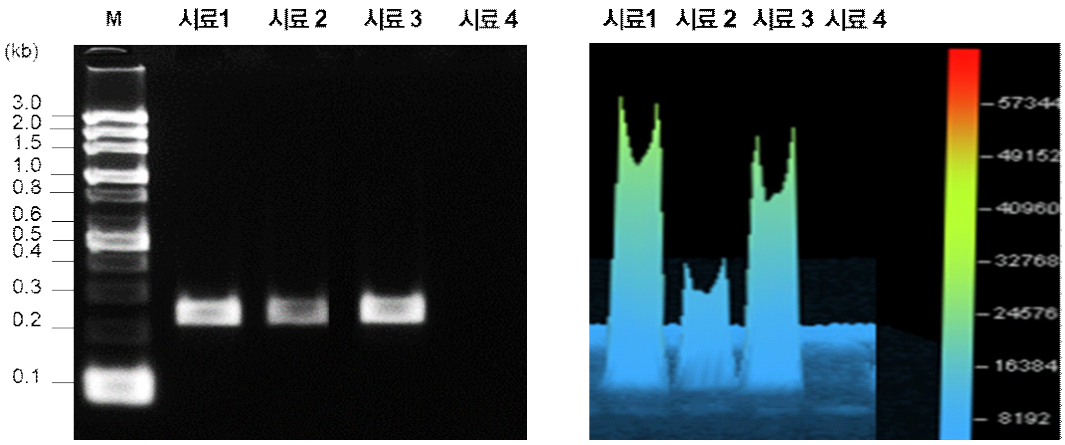


그림 88. 전혈 전처리법의 검증을 위한 conventional PCR 실험 결과
(좌) PCR 증폭산물에 대한 전기영동 결과, (우) 전기영동 데이터를 기반으로 PCR amplicon을 정량화한 이미지 결과

○ 혈액 등 실제시료 분석을 통한 적용 가능성 평가

ⓐ 10종의 *B. abortus* 양성 혈장 시료를 대상으로 한 LAMP-LFA법의 적용 가능성 평가: 수의대에서 제공받은 10종의 *B. abortus* 양성 혈장을 사용

표 22. *B. abortus* 양성 혈장 시료의 종류(10종, 수의대 제공)

B. abortus 양성 혈장 시료의 종류				
시료1 혈장 2번 시료	시료2 혈장 3번 시료	시료3 혈장 4번 시료	시료4 혈장 5번 시료	시료5 혈장 6번 시료
시료6 혈장 7번 시료	시료7 혈장 8번 시료	시료8 혈장 9번 시료	시료9 혈장 10번 시료	시료10 혈장 11번 시료

- 전기영동 및 스트립 전개 결과, 10종의 시료 모두 양성으로 확인됨

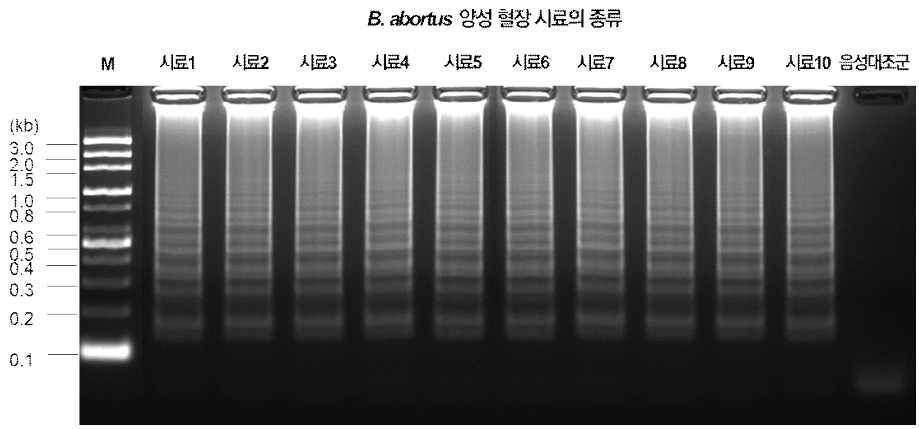


그림 89. 전기영동을 이용한 10종의 *B. abortus* 양성 혈장에 대한 LAMP amplicon 확인 결과

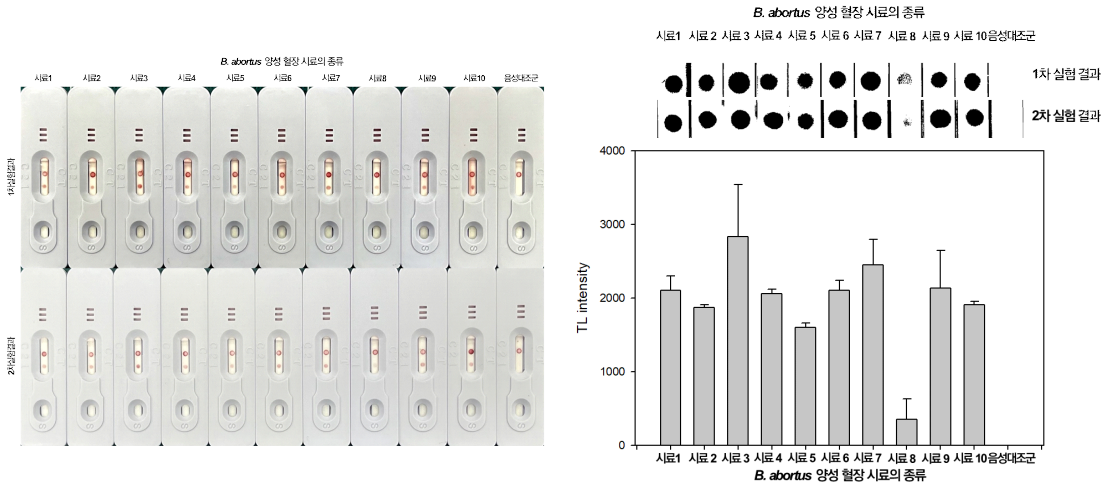


그림 90. LAMP-LFA법을 이용한 10종의 *B. abortus* 양성 혈장에 대한 분석 결과
(좌) 스트립, (우) 스트립 중 test line (TL)에 대한 정량화 결과

ⓑ **<u>2종의 *B. abortus* 음성</u> 혈장 시료를 대상으로 한 LAMP-LFA법의 적용 가능성 평가:** 2종의 *B. abortus* 음성 혈장 시료 분석함

표 23. *B. abortus* 음성 혈장 시료의 종류(2종, 수의대 제공)

B. abortus 음성 혈장 시료의 종류	
시료1	시료2
Foster cat 혈장 시료	Native cat 혈장 시료

- 전기영동 및 스트립 전개 결과, 10종의 시료 모두 음성으로 확인됨

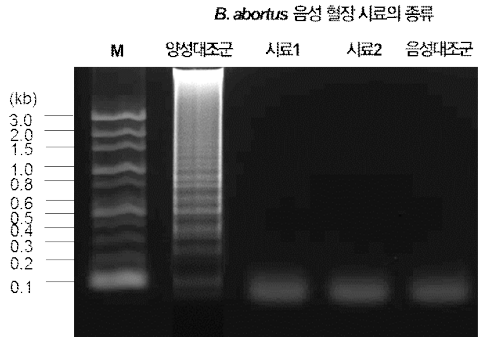


그림 91. 전기영동을 이용한 2종의 *B. abortus* 음성 혈장에 대한 LAMP amplicon 확인 결과

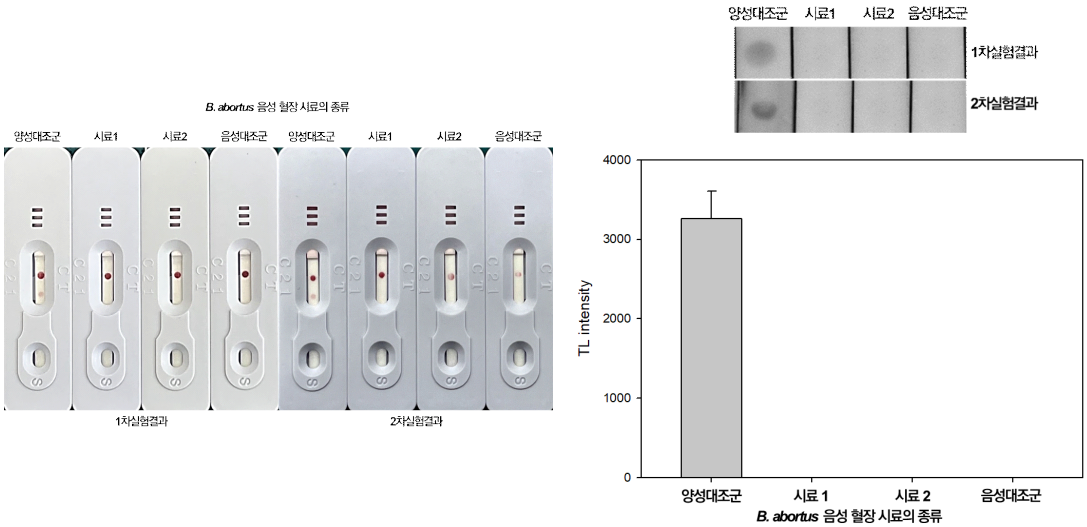


그림 92. LAMP-LFA법을 이용한 2종의 *B. abortus* 음성 혈장에 대한 분석 결과
(좌) 스트립, (우) 스트립 중 test line (TL)에 대한 정량화 결과

ⓒ <u>50종의 의양성 혈장 시료를 대상으로 한 LAMP-LFA법의 적용 가능성 평가</u>: 검역원으로부터 제공받은 50종(혈장 51-100번 시료)의 *B. abortus* 의양성 혈장 시료를 분석

- 본 연구에서 개발한 LAMP-LFA법과 시판 PCR kit (Bioneer, AccuPower Brucella PCR kit, Cat. K-2906)를 이용해 분석
- 브루셀라균 특이적 시판 PCR kit: 5개의 의양성 시료에 대해 양성 반응을 보임

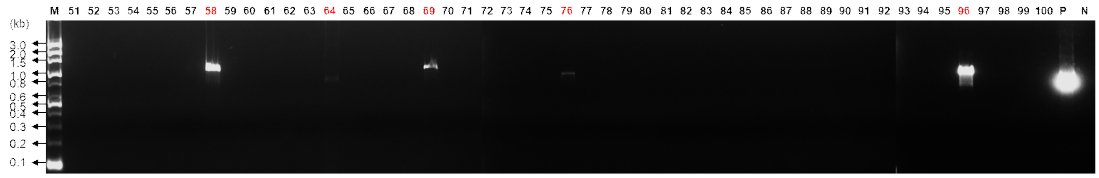


그림 93. 시판 PCR kit를 이용한 의양성 혈장 시료 50종에 대한 분석 결과

- LAMP-LFA법: 6개의 의양성 시료에 대해 양성 반응을 보여, 시판 PCR kit 와 비교하여 유사한 민감도를 보이는 것으로 확인 됨

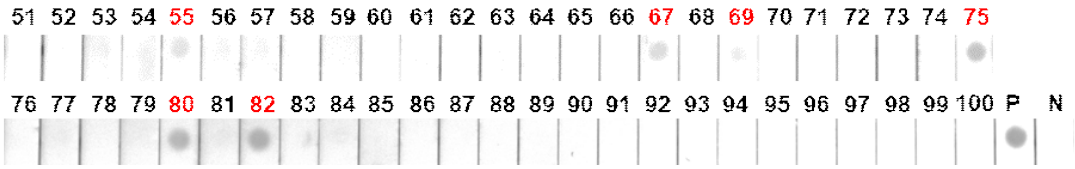


그림 94. LAMP-LFA법을 이용한 의양성 혈장 시료 50종에 대한 분석 결과

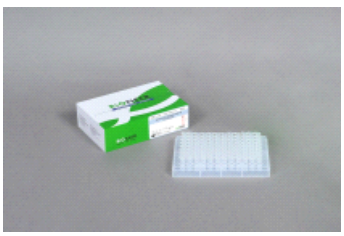
- 두 가지 분석기술로 교차검증을 한 결과 각각 5종 및 6종의 의양성 시료에 대해 양성의 반응을 보이는 것으로 확인되었으나, 앞서 기술한 바와 같이 본 연구를 통해 개발한 LAMP-LFA법의 경우 양성 시료에 대해 위음성의 반응은 나타내지 않으므로 현장에서 소 혈액을 대상으로 *B. abortus*의 존재 여부를 분석하는데 활용 가능할 것으로 판단됨

표 24. 시판 PCR kit 및 LAMP-LFA법을 이용한 의양성 혈장 시료(50종)에 대한 분석 결과
(+: 양성, -: 음성)

의양성 혈장 시료(50종)에 대한 분석 결과										
	혈장 51	혈장 52	혈장 53	혈장 54	혈장 55	혈장 56	혈장 57	혈장 58	혈장 59	혈장 60
시판 kit	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LAMP-LFA	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	혈장 61	혈장 62	혈장 63	혈장 64	혈장 65	혈장 66	혈장 67	혈장 68	혈장 69	혈장 70
시판 kit	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
LAMP-LFA	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	혈장 71	혈장 72	혈장 73	혈장 74	혈장 75	혈장 76	혈장 77	혈장 78	혈장 79	혈장 80
시판 kit	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
LAMP-LFA	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
	혈장 81	혈장 82	혈장 83	혈장 84	혈장 85	혈장 86	혈장 87	혈장 88	혈장 89	혈장 90
시판 kit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAMP-LFA	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	혈장 91	혈장 92	혈장 93	혈장 94	혈장 95	혈장 96	혈장 97	혈장 98	혈장 99	혈장 100
시판 kit	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
LAMP-LFA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

○ **시판 kit와의 비교·평가를 통한 개발한 진단기술의 현장 적용 가능성 평가**

- 개발한 분석법과 시판 kit의 비교·평가를 위해 아래 표와 같은 분자진단키트(PCR kit)와 면역진단키트(LFA kit)를 구입하였으며, 민감도, 특이성, 분석단계, 반응시간 등을 고려하여 현장 적용 가능성을 평가하였음



Bioneer, AccuPower Brucella PCR Kit
(Cat. K-2906)

Abbexa, Brucella Antibody Rapid Test Kit
(Cat. Abx092069)

그림 95. 개발한 분석법과의 현장 적용성 비교·평가를 위해 구입한 시판 kit의 종류
(좌) 시판 PCR kit (우) 시판 LFA kit

ⓐ 시판 PCR kit를 이용한 현장 적용 가능성 평가

- 구입한 Bioneer사의 AccuPower Brucella PCR Kit (Cat. K-2906)의 경우 균, 혈액, 혈청 등에 대해 분석이 가능한 특징을 가지고 있으며, 실험 조건은 아래와 같음

표 25. Bioneer사 AccuPower Brucella PCR Kit (Cat. K-2906)의 PCR mixture 조성

Num.	Components	Vol. (μL)
1	Nucleic acid-free water	15
2	Genomic DNA	5

표 26. Bioneer사 AccuPower Brucella PCR Kit (Cat. K-2906)의 실험 조건

Num.	PCR steps	PCR conditions	
1	Initial denaturation	94℃, 5 min	X1 cycle
2	Denaturation	94℃, 30 sec	X45 cycles
3	Annealing	57℃, 30 sec	
4	Extension	72℃, 60 sec	
5	Final extension	72℃, 10 min	X1 cycle

✓ 분석 시간: 약 2시간 30분 소요 (전기영동에 소요되는 시간 미포함)

✓ 민감도 확인

- 0~10^7CFU/mL의 *B. abortus*로부터 추출된 genomic DNA를 주형 DNA로 PCR mixture 제조 시 사용하였음
- 실험 결과 아래 그림과 같이 약 900 bp 부근에서 PCR 증폭산물이 관찰되었으며, 검출한계는 약 10^3CFU/mL로 확인됨

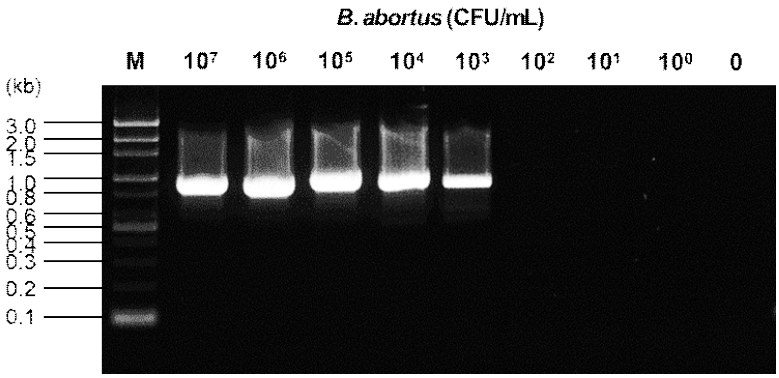


그림 96. Bioneer사 AccuPower Brucella PCR Kit (Cat. K-2906)에 대한 민감도 확인 결과

✓ 교차반응성 확인

- 시판 kit에 대한 교차반응성 확인을 위해 아래 목록과 같은 균주를 실험에 사용하였음

표 27. 시판 kit (Bioneer, AccuPower Brucella PCR Kit)의 특이성 확인을 위해 사용한 균주 목록

시판 kit의 특이성 확인을 위해 사용한 균주			
A	B	C	D
Brucella abortus	*Yersinia enterocolitica*	*Escherichia coli*	*Bacillus cereus*
E	F	G	H
Staphylococcus aureus	*Salmonella Typhimurium*	*Listeria monocytogenes*	*Vibrio parahaemolyticus*

- 그 결과 아래 그림과 같이 *B. abortus*에 대한 genomic DNA를 첨가한 조건에서만 PCR 증폭산물이 형성됨을 확인할 수 있었음

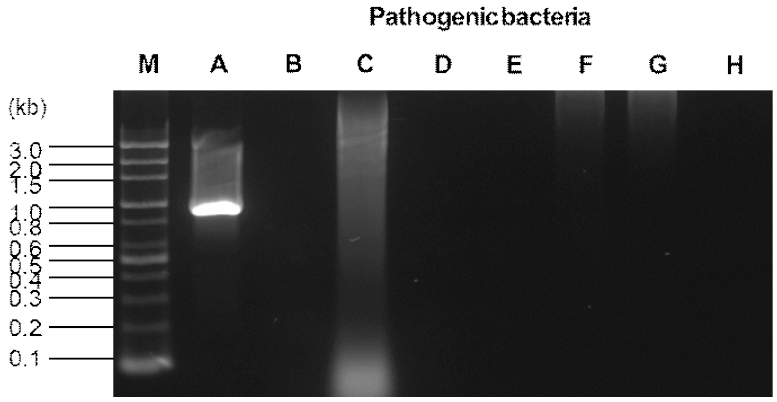


그림 97. Bioneer사 AccuPower Brucella PCR Kit (Cat. K-2906)에 대한 특이성 확인 결과

ⓑ 시판 LFA kit를 이용한 현장 적용 가능성 평가

- 구입한 Abbexa사의 Brucella Antibody Rapid Test Kit (Cat. Abx092069)의 경우 혈청 및 우유에 대해 분석이 가능한 특징을 가지고 있으며, 실험 방법은 아래와 같음

표 28. Abbexa사 Brucella Antibody Rapid Test Kit (Cat. Abx092069)의 매뉴얼

단계	방법
1	완충액에 시료를 1-2방울 분주하고 제공된 스포이드를 사용하여 시료를 희석
	↓
2	테스트 카세트를 평평하게 놓고 희석된 시료 3방울을 주입
	↓
3	실온에 10-15분간 방치한 후 결과를 분석

✓ 분석 시간: 약 20분 소요

✓ 민감도 확인

- 혈액 및 우유 시료를 대상으로 민감도 측정이 불가능하며, 제조사에서는 정성적 기법에 대해 민감도를 제시하지 않음

✓ 교차반응성 확인

- 시판 kit에 대한 교차반응성 확인을 위해 아래 목록과 같이 검역검사본부로부터 제공받은 *B. abortus* 양성 (균검출 및 항체가 양성) 및 음성 혈 각 5종과 의양성혈장 20종(균 미검출 및 항체가 양성)을 실험에 사용하였음.

표 29. 시판 kit (Abbexa, Brucella Antibody Rapid Test Kit)의 특이성 확인을 위해 사용한 시료

시판 kit의 특이성 확인을 위해 사용한 혈장 시료의 종류				
양성 혈장1 200 16	양성 혈장2 200 15	양성 혈장3 400 3165	양성 혈장4 400 1868	양성 혈장5 400 4568
음성 혈장1 6924	음성 혈장2 3675	음성 혈장3 9518	음성 혈장4 2032	음성 혈장5 8249
의양성 혈장1 혈장51	의양성 혈장2 혈장52	의양성 혈장3 혈장53	의양성 혈장4 혈장54	의양성 혈장5 혈장55
의양성 혈장6 혈장56	의양성 혈장7 혈장57	의양성 혈장8 혈장58	의양성 혈장9 혈장59	의양성 혈장10 혈장60
의양성 혈장11 혈장61	의양성 혈장12 혈장62	의양성 혈장13 혈장63	의양성 혈장14 혈장64	의양성 혈장15 혈장65
위의양성 혈장16 혈장66	의양성 혈장17 혈장67	의양성 혈장18 혈장68	의양성 혈장19 혈장69	의양성 혈장20 혈장70

- 그 결과 아래 그림과 같이 *B. abortus* 양성 혈장 5종 및 의양성 혈장 20종에 대해 양성의 반응이 관찰됨

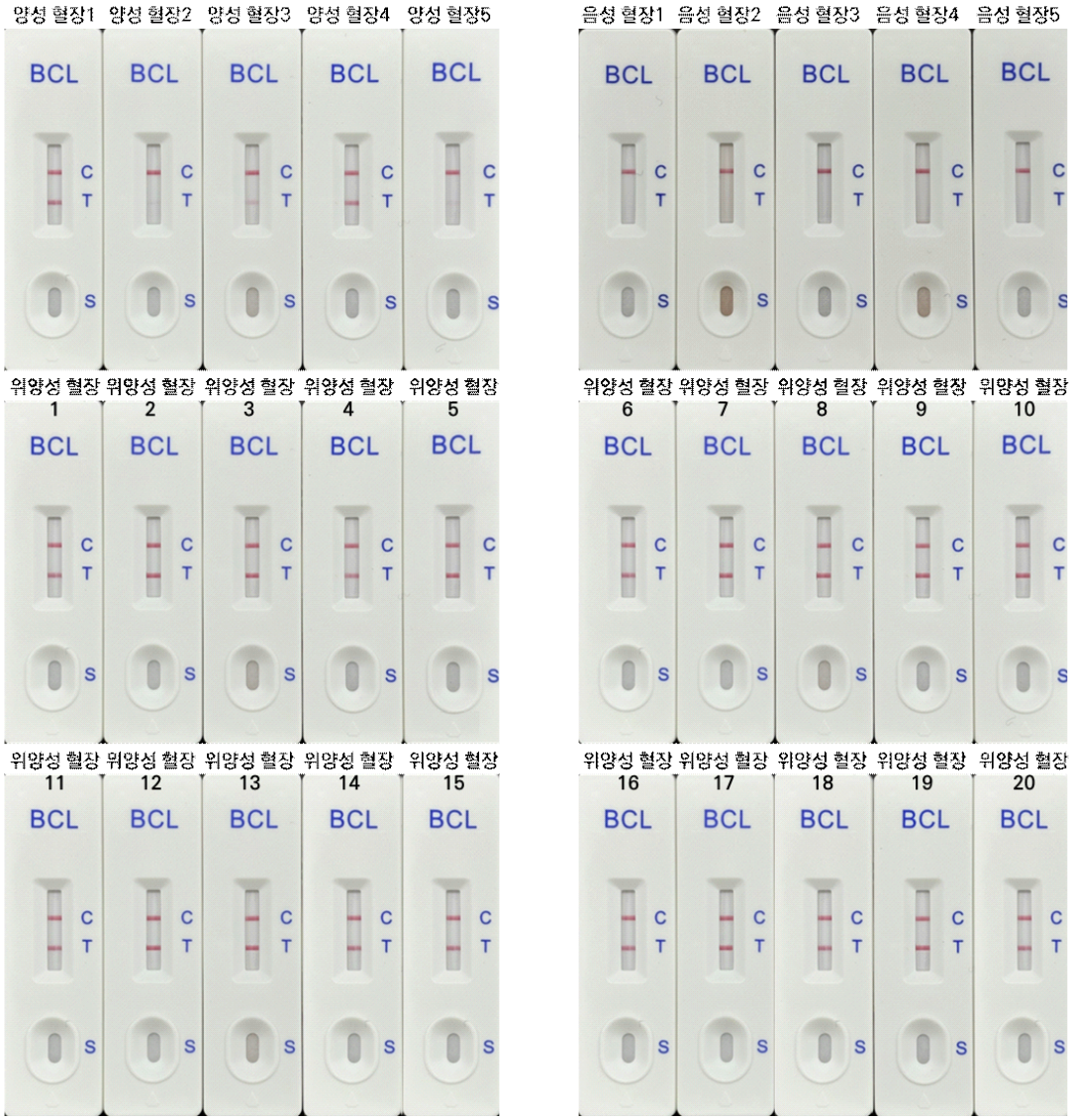


그림 98. Abbexa사 Brucella Antibody Rapid Test Kit (Cat. Abx092069)에 대한 특이성 확인 결과

표 30. Abbexa사 Brucella Antibody Rapid Test Kit (Cat. Abx092069)에 대한 특이성 확인 결과
(+: 양성, -: 음성)

시판 LFA kit를 이용한 혈장 분석 결과				
양성 혈장1	양성 혈장2	양성 혈장3	양성 혈장4	양성 혈장5
+	+	+	+	+
음성 혈장1	음성 혈장2	음성 혈장3	음성 혈장4	음성 혈장5
−	−	−	−	−
의양성 혈장1	의양성 혈장2	의양성 혈장3	의양성 혈장4	의양성 혈장5
+	+	+	+	+
의양성 혈장6	의양성 혈장7	의양성 혈장8	의양성 혈장9	의양성 혈장10
+	+	+	+	+
의양성 혈장11	의양성 혈장12	의양성 혈장13	의양성 혈장14	의양성 혈장15
+	+	+	+	+
의양성 혈장16	의양성 혈장17	의양성 혈장18	의양성 혈장19	의양성 혈장20
+	+	+	+	+

- LFA 진단키트의 시판되는 진단킷과 비교 분석해본 결과 민감도, 특이도 및 정확도가 모두 100%를 보임
- LFA 진단키트의 경우 단시간 내에 비전문가가 쉽고 간편하게 사용 가능한 진단 기술이라는 장점은 있으나, 형태학적 및 면역학적으로 바이러스나 *Y. enterocolitica* O9, *E. coli* O157, *Salmonella* Typhimurium 등의 병원성 균과 교차반응을 나타내며, 특히 양성 시료에 대한 위음성 결과가 빈번하게 나타나는 특징이 있음
- 이러한 특성을 고려할 때 본 연구를 통해 개발된 LAMP-LFA법은 민감도 및 특이도를 고려할

때 현장 적용이 용이한 현장진단기술로 판단됨

(3) 대사체 분석 기반 브루셀라증 진단용 유용 바이오 마커 발굴 및 산업화

가. 소 브루셀라증에서 특이적으로 발현되는 대사체 발굴

① 확보된 브루셀라 소 혈청에 대한 대사체 분석 (진양성, 진음성, 의양성 혈청 분석):

- 2017년도부터 검역검사본부에서 기 확보된 진양성(100점), 진음성 (100점), 의양성 (20점)과 함께, 2022년 이후 경남도내에서 확보한 브루셀라 진양성(50점) 및 진음성 브루셀라 소 혈청(50점)을 UPLC-Q-TOF MS 기반 대사체분석을 진행하여 진양성과 진음성이 다변량통계분석에서 유의적으로 분리되는 것을 확인하였으며 브루셀라 감염 소 혈청 특이 대사물질 16개를 확보하였으며 이들을 EZ1-EZ16으로 명명하였음. 이들 대사물질은 항체 역가에 따라 다소 차이가 나타나는 것이 확인 되었음 (그림99-105).

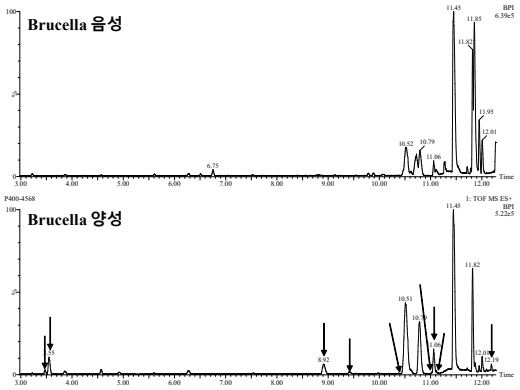


그림 99. UPLC-Q-TOF를 이용하여 분석한 브루셀라 소 혈청 대사물질 크로마토그램

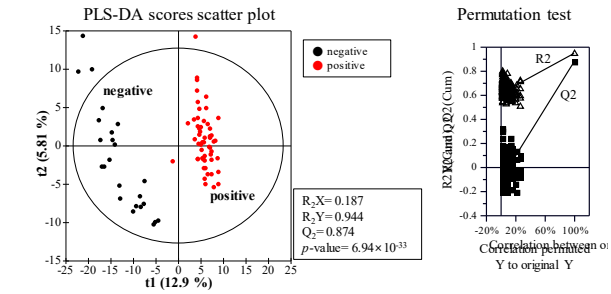


그림 100. UPLC-Q-TOF를 이용하여 분석한 브루셀라 소 혈청 대사물질들의 다변량통계분석 (브루셀라 음성 vs 양성)

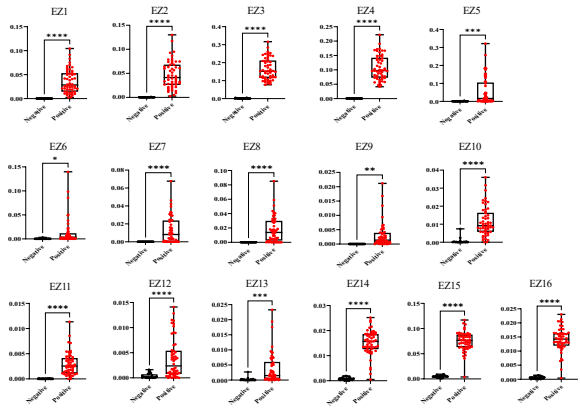


그림 101. 브루셀라 소 혈청 특이 대사물질들의 상대적 함량 비교(브루셀라 음성 vs 양성)

No.	RT (min)	Compound	Exact mass (M+H)	VIP	*p*-value
1	3.47	EZ1	503.9234	1.82	5.66E-15
2	3.47	EZ2	378.1927	1.94	7.28E-17
3	3.55	EZ3	399.9507	2.39	2.93E-26
4	3.55	EZ4	532.9342	2.34	7.79E-25
5	8.91	EZ5	946.4252	0.65	4.09E-03
6	8.91	EZ6	631.6153	0.78	5.45E-04
7	9.42	EZ7	502.7853	1.23	7.69E-08
8	9.42	EZ8	503.0365	1.39	2.76E-09
9	10.48	EZ9	805.4138	1.03	4.54E-06
10	11.02	EZ10	618.3478	1.73	1.05E-13
11	11.07	EZ11	697.7125	1.69	3.56E-13
12	11.11	EZ12	597.3261	1.27	3.59E-08
13	11.13	EZ13	403.2062	1.08	3.28E-06
14	12.19	EZ14	437.1931	2.43	3.27E-28
15	12.19	EZ15	415.2102	2.57	1.95E-33
16	12.19	EZ16	460.2683	2.49	4.00E-30

그림 102. 통계적 유의성을 갖는 브루셀라 소 혈청 특이 대사물질들에 대한 명명 (EZ1~16), 분자량, VIP 및 p-value

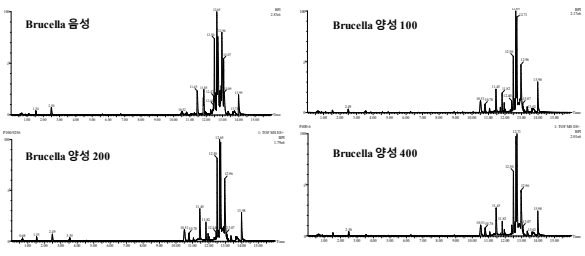


그림 103. 브루셀라 항체수치에 따른 소 혈청 대사물질 크로마토그램

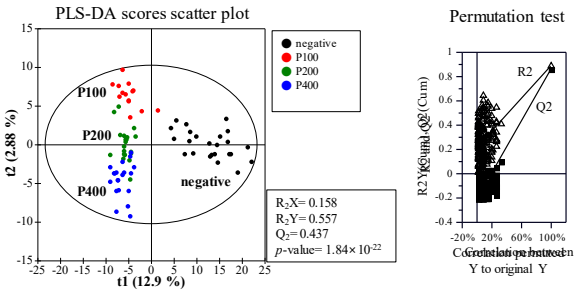


그림 104. 브루셀라 항체수치에 따른 소 혈청 대사물질들의 다변량통계분석 [브루셀라 음성 vs 양성 (100, 200, 400)]

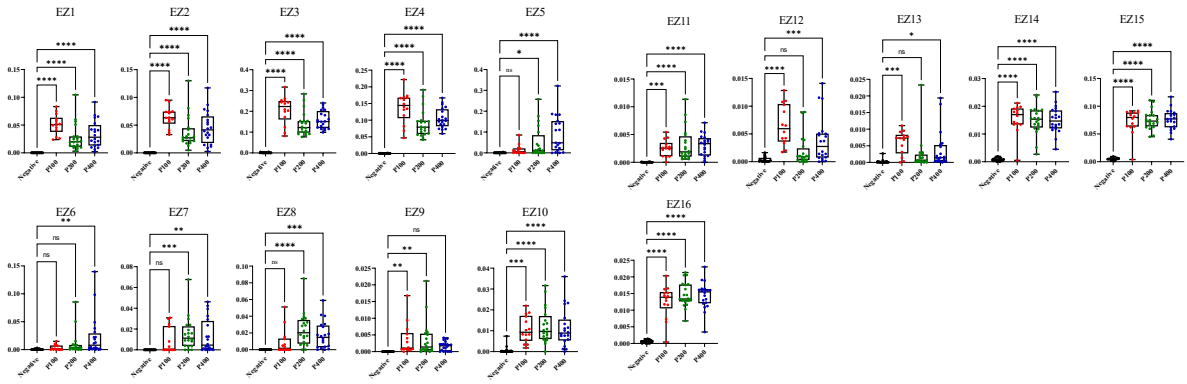


그림 105. 브루셀라 항체수치에 따라 유의적 차이를 보이는 소 혈청 대사물질들의 상대적 함량 비교 [브루셀라 음성 vs 양성 (100, 200, 400)] (EZ1~16)

- UPLC-Q-TOF MS를 이용하여 브루셀라 음성, 진양성, 의양성 소 혈청 대사체 분석한 결과, 크로마토그램 패턴뿐만 아니라 브루셀라 진음성-진양성 분석을 통해 확보한 16개의 물질들 중 8개 물질들(EZ1, EZ2 ,EZ3, EZ4, EZ7, EZ8, EZ9, EZ13)이 유의적으로 차이가 나는 것을 확인하였으며 다변량통계분석 결과와 종합하여 볼 때 의양성 시료들 모두 브루셀라 양성과 유사한 페턴을 보이는 것으로 보아 의양성 시료들은 모두 진양성인 것으로 판단됨(그림106-108).

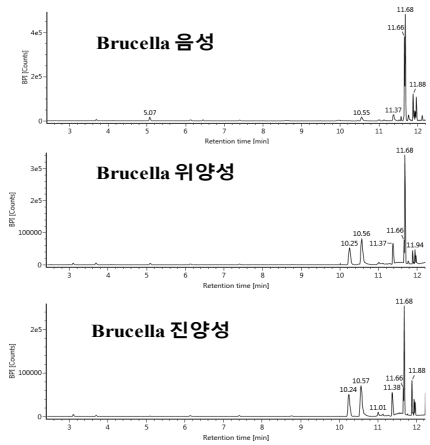


그림 106. UPLC-Q-TOF를 이용한 브루셀라 음성, 진양성, 의양성 소 혈청 대사체 분석

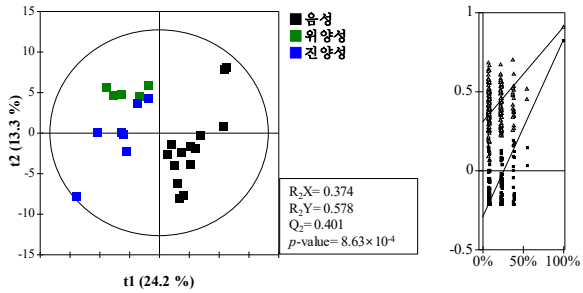


그림 107. 브루셀라 음성, 진양성, 의양성 소 혈청 대사물질들의 다변량통계분석

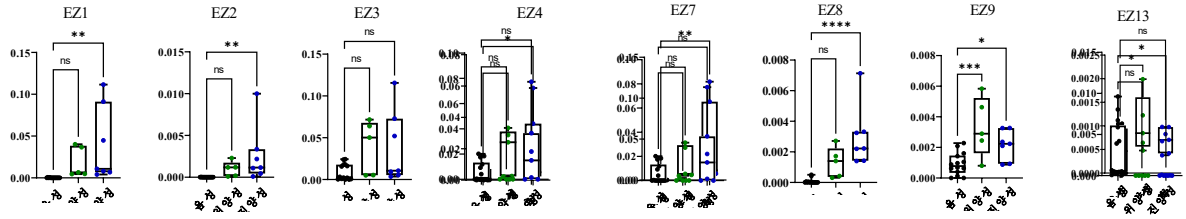


그림 108. 브루셀라 음성, 진양성, 의양성 소 혈청 대사체 분석에 따른 유의적 차이를 보이는 소 혈청 대사물질들의 상대적 함량 비교

② 확보된 브루셀라 감염시기별 소 혈청에 대한 대사체 분석(초기, 중기, 말기):

- 브루셀라 감염시 기별 (0, 29, 49, 70, 91일) 소 혈청 대사물질들을 분석한 결과, 앞에서 언급했던 16개 물질들의 함량이 유의적으로 차이가 났지만, 감염시기별로 유의적인 함량은 보인 물질들은 EZ1, EZ2, EZ3, EZ4, EZ9, EZ11, EZ12, EZ13 8개 물질인 것으로 확인됨(그림 109-111).

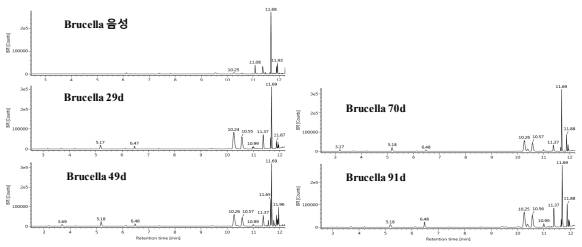


그림 109. UPLC-Q-TOF를 이용한 브루셀라 감염시기별 소 혈청 대사체 분석

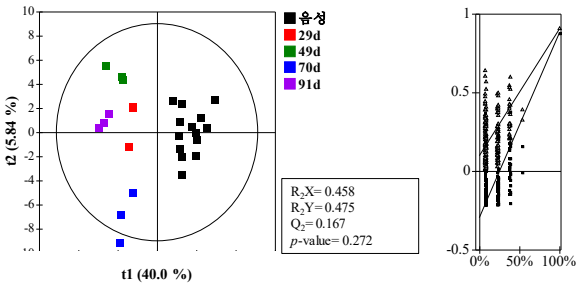


그림 110. 브루셀라 감염시기별 소 혈청 대사물질들의 다변량통계분석

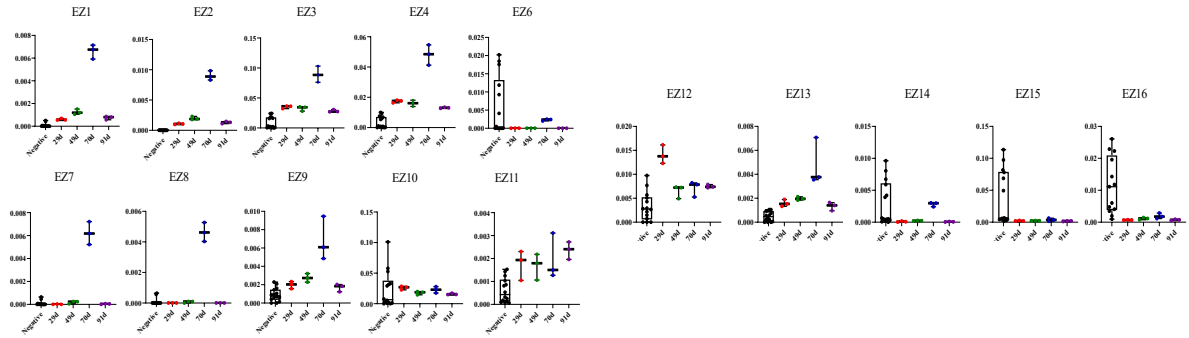


그림 111. 브루셀라 감염시기별 소 혈청 대사체 분석에 따른 유의적 차이를 보이는 소 혈청 대사물질들의 상대적 함량 비교

③ 진단을 위한 최적 대사체 조합 설정:

- UPLC-Q-TOF MS로 분석한 브루셀라 진음성과 진양성 소 혈청 대사체 분석에서 확보한 16개의 브루셀라 특이 대사물질 중 항체수치별, 의양성 및 감염 시기별 소 혈청 대사체 분석과 비교한 결과 브루셀라 진단을 위한 최적의 대사체 조합은 EZ1, EZ2, EZ3, EZ4, EZ9, EZ13으로 이들 물질들은 모든 분석조건에서 진음성에 비해 유의적으로 높게 나와 이후에 진행될 브루셀라 진단 기술 개발에 활용될 후보물질로 최적 확정하였음.
- 또한 UPLC-Q-TOF MS를 이용한 소 혈청 분석을 통한 다변량 통계분석도 현재까지 분석에서는 유의적인 경향을 보여 브루셀라 진단을 위한 분석방법으로 활용될 수 있을 것으로 판단됨.

나. 발굴 대사체의 브루셀라 외 감염혈청과의 감별 분석

① 소 감염혈청과의 감별 분석(교차반응 유발균 감염 혈청 대상 대사체 분석):

- 브루셀라 감염 소 혈청의 대사체 분석을 통해 확보한 지표물질들이 브루셀라 이외의 타 균주 (결핵, E.Coli, Yersinia)의 감염 소 혈청에서도 나타나는지 확인하기 위한 교차검증을 실시한 결과, 다변량통계분석인 PLS-DA score plot 상에서 결핵, E.Coli, Yersinia 감염 소 혈청인 경우 브루셀라 감염 소 혈청과 서로 분리되는 것을 확인하였으며 브루셀라 특이 소 혈청 대사물질 16개 중은 EZ5와 EZ6을 제외한 모든 물질들은 브루셀라 감염 소 혈청에서만 특이적으로 나온다는 것을 확인하였음. 따라서 교차검증을 통과한 나머지 물질들은 브루셀라 감염 진단을 위한 지표물질로 사용될 수 있을 것으로 판단됨(그림112-114).

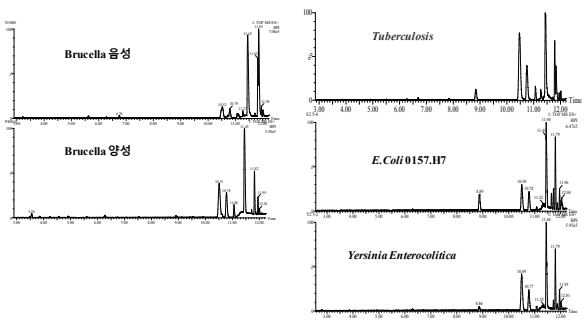


그림 112. UPLC-Q-TOF를 이용한 브루셀라, 결핵, *E. coli*, Yersinia 감염 소 혈청 대사체 분석

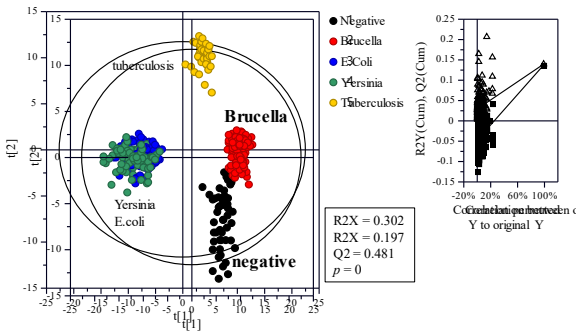


그림 113. 교차반응 감별을 위한 브루셀라, 결핵, *E. coli*, Yersinia 감염 소 혈청 대사물질들의 다변량통계분

석

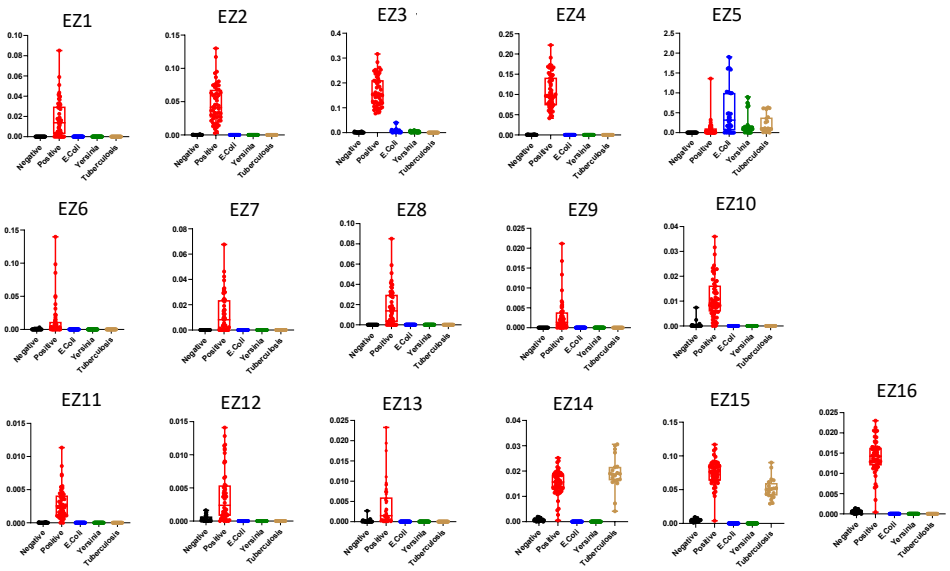


그림 114. 교차반응 감별을 위한 브루셀라, 결핵, *E. coli*, Yersinia 감염 소 혈청 대사체 분석에 따른 유의적 차이를 보이는 소 혈청 대사물질들의 상대적 함량 비교

② 브루셀라 감염 후 발현되는 특정 대사체 선발:

- 브루셀라 진단을 위한 최적의 대사체 조합으로 선발된 EZ1, EZ2, EZ3, EZ4, EZ9, EZ13은 교차검증을 통과하였음.
- 이들 물질들을 분석한 결과, 이들은 펩타이드 계열의 물질들이며 이중 EZ 1과 2에 해당되는 m/z 503과 378은 +3과 +4 charge를 가진 동일 펩타이드 [m/z 1509 (M+H)]의 fragment로 확인되었으며 EZ-A로 명명하였음.
- m/z 399와 532에 해당되는 EZ 3과 4 또한 +4과 +3 charge를 가진 동일 펩타이드[m/z 1596.76(m+H)]의 fragment로 확인되었으며 EZ-B로 명명하였으며, EZ 9과 13 또한 펩타이드인 것으로 확인되었으며 현재 분석 진행 중임.
- *De novo* peptide sequencing을 이용하여 EZ-A와 EZ-B는 각각 아미노산 12개와 13개를 갖는 분자량 1509와 1596 펩타이드로 동정되었음.
- 이들은 단백질 Chain A에서 유래된 펩타이드들인 것으로 확인되었으며 펩타이드 합성회사에 의뢰하여 펩타이드 EZ-A와 EZ-B를 합성한 후 시료와 혼합한 스파이크 테스트로 검증하였음.
- 이들 펩타이드의 분자량이 작아 항체 형성에 문제가 있을 수 있어서 Bovine serum albumin (BSA)를 N- 또는 S-terminal에 붙힌 펩타이드들을 합성한 후 항체 제작을 위해 공동연구기관에 제공하였음(그림113-119).
- Biomarker 기반 진단기술의 표준화 및 진단기술의 산업화를 위한 연구를 2차년도에 지속적으로 수행하겠음

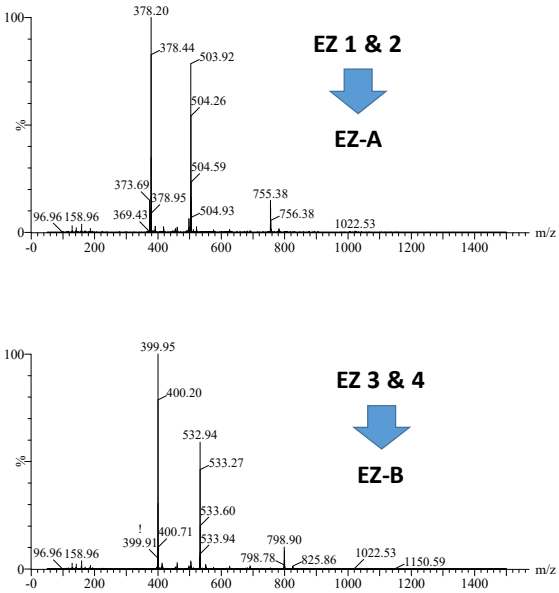


그림 115. 타깃 펩타이드들의 MS fragment

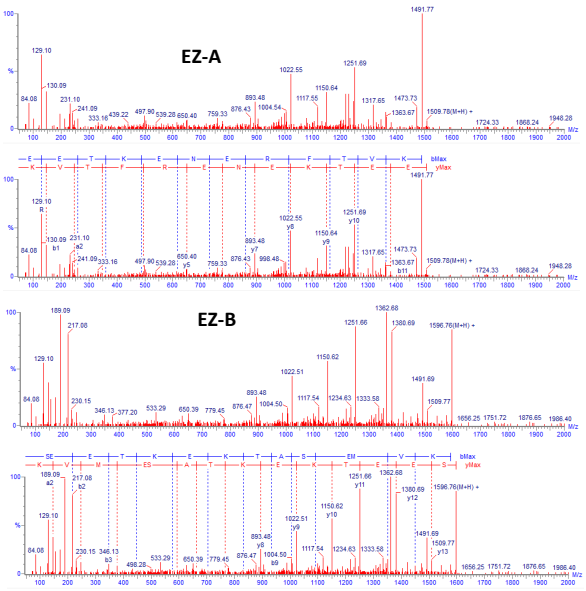


그림 116. *De novo* peptide sequencing를 이용한 펩타이드 동정

Chain A, C3

PDB: 2B39_A

>pdb|2B39|A Chain A, C3
MKPTSGPSLLLLLLASLPMALGNPMYSMITPNILRLESEETVVLEAHGGQGTIQVSVTVHDFPAKKQVLS
NENTQLNSNNGYLSTVTIKIPASKELKSDKGHKFVTVVATFGNVQVEKVVLISLQSGYLFIQTDKTIYTP
GSTVLYRVFTVDHKLLPVGQTVFITIETPDGIPVKRDSKSSQNQFGILTLSWNIPELVNMGVWKIKAYYE
DSPQQVFSAEFEVKEYVLPSFEVQLEPEEKFYYIDDPDGLKVNIIARFLYGEQVDGTAFVIFGVQDGDRR
ISLTHSLTRVPINDGNGEAILKRQVLLNGVQPSRADALVGKSIYVSATVILQSGSDMVEAERTGIPIVTS
PYQIHFTKTPKFFKPAMPFDLMVYVTNPDGSPARHIPVVTQGSNVQSLTQDDGVAKLSINTQNKRDPLTI
TVRTKKDNIPEGRQATRTMQALPYNTQGNSNNYLHLSVPRVELKPGETLNVNFHLRTDPGEQAKIRYYTY
MIMNKGKLLKVGRQYREPGQDLVVLPLTITSDFIPSFRLVAYYTLINAKGQREVVADSVWVDVKDSCMGT
LVVKNGGKEEKHHRPGQQITLKIEADQGARVGLVAVDKGVFVLNKKNKLTQRKIWDVVEKADIGCTPGSG
RNYAGVFTDAGLTLKTSQGLETQQRADPQCPQPATRRRRSVQLMEKRMDKAGQYSSDLRKCCEDGMRDNP
MKFPCQRRAQFILQGDACVKAFLDCCEYITQLRQQHSRDGALELARSDLDDDIIPEEDIISRSQFPESWL
WTVIEDLKQADKNGISTKLMNVFLKDSITTWEILAVSLSDKKGICVADPYEVTVMQDFFIDLRLPYSVVR
NEQVEIRAILYNYREAENLKVRVELLYNPAFCSLATAKKRHQQTITIPARSSVAVPYVIVPLKIGLHEVE
VKAAVYNHFISDGVKKTLKVVPEGVRVNKTVAVRTLNPEHLGQGGVQREEVPAADLSDQVPDTESETKIL
LQGTPVAQMTEDAIDGERLKHLIQTPSGCGEQNMIGMTPTVIAVHYLDSTDQWEKFGLEKRQESLELIRK
GYTQQLAFRQKSSAYAAFQYRPPSTWLTAYVVKVFALAANLIAIDSKDLCETVKWLILEKQKPDGIFQED
GPVIHQEMIGGFRDTREKDVSLTAFVLIALHEAKDICEAQVNSLGRSIAKAGDFLENHYRELRRPVTVAI
AAYALALLGKLEGDRLTKFLNTAKEKNRWEEPNQKLYNVEATSYALLALLARKDYDTTPPVVRWLNEQRY
YGGGYGSTQATFMVFQALAQYQKDVPDHKELNLDVSIQLPSRNSAVRHRILWESASLLRSEETKENERFT
VKAEGKGQGTLSVVTVYHAKLKGKVSCKKFDLRVSIRPAPETVKKPQDAKGSMILDICTKYLGDQDATMS
ILDISMMTGFSPDVEDLKTLSTGVDRYISKYEMNRDSNKNTLIIYLDKVSHTVEDCLSFKVHQYFNVGLI
QPGAVKVYSYYNLDETCIRFYHPDKEDGMLSKLCHKDTCRCAEENCFMHHTEKEVTLEDRLDKACEPGVD
YVYKTRLIQKKLEDDFDEYIMVIENIIKSGSDEVQVKQERKFISHIKCREALKLKEGAYLVWGVSSDLW
GEKPKISYIIGKDTWVELWPEAEECQDEENQKQCEDLANFTENMVVFGCPN

그림 117. EZ-A와 EZ-B 유래 단백질의 아미노산 서열

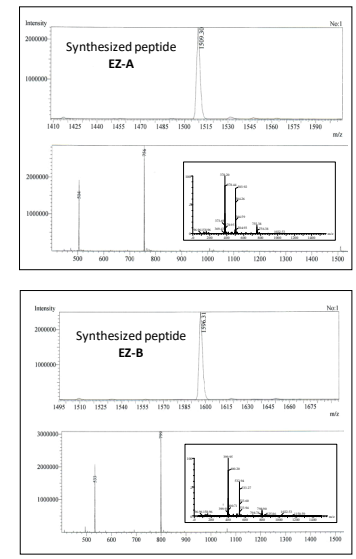


그림 118. 펩타이드 EZ-A와 EZ-B의 합성

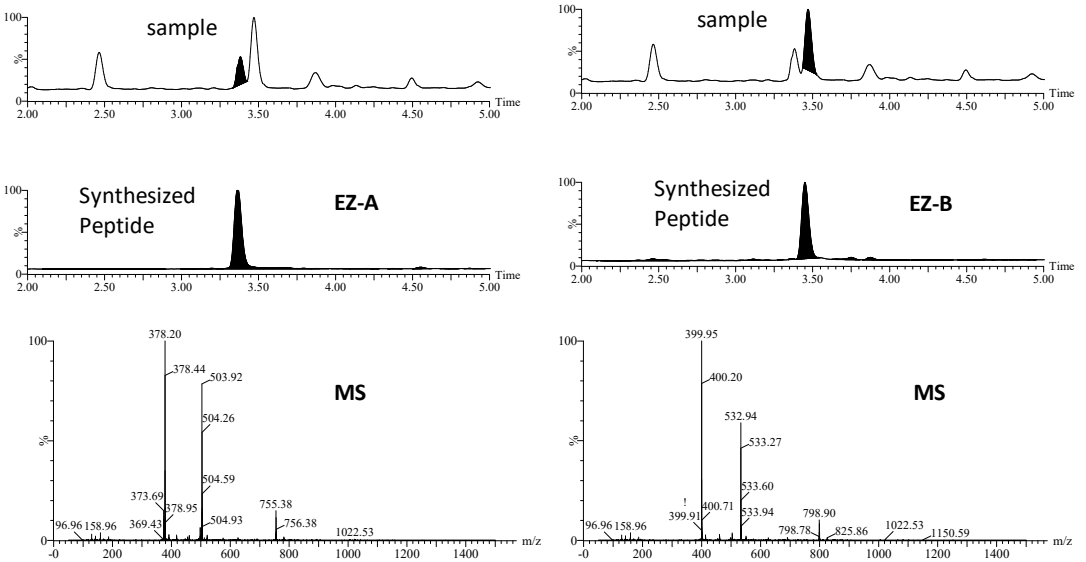


그림 119. 스파이크 테스트를 이용한 합성 펩타이드 검증 및 MS fragments

③ **브루셀라 감염 소의 혈액 전처리 최적화**:

- 혈액 펩타이드 추출 최적화를 위해 trichloroacetic acid (TCA) solvent 방법, methanol solvent 방법, HAS/Immunoglobulin 방법, HLB Column 방법, Sep-Pak C18 방법 총 5가지의 혈액 전처리 방법을 적용하여 비교분석하였음.
- 전처리 방법들을 비교한 결과, 기존에 사용하고 있는 methanol extraction 방법보다는 혈액 단백질들과 지질들이 제거된 Sep-Pak C18 방법과 HLB Column 방법이 최적 전처리 방법인 것으로 확인됨.

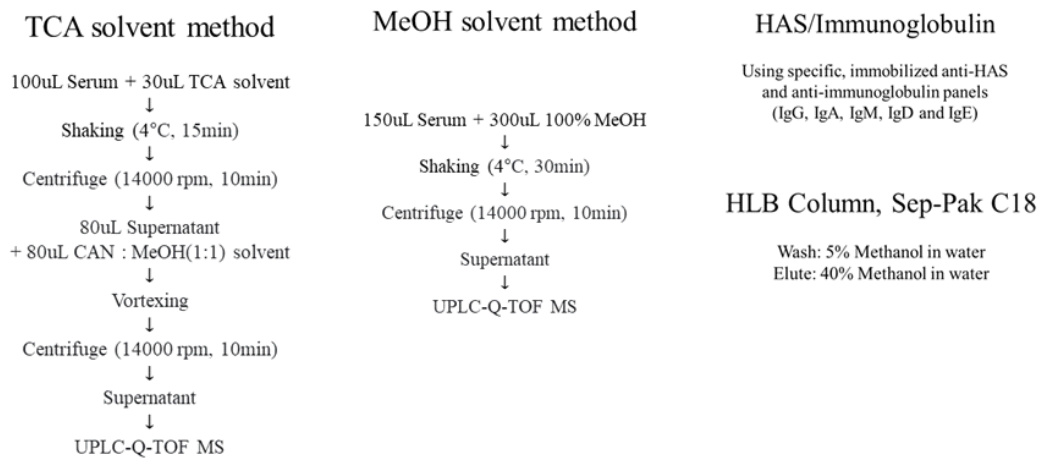


그림 120. 가지의 혈액 펩타이드 추출 방법

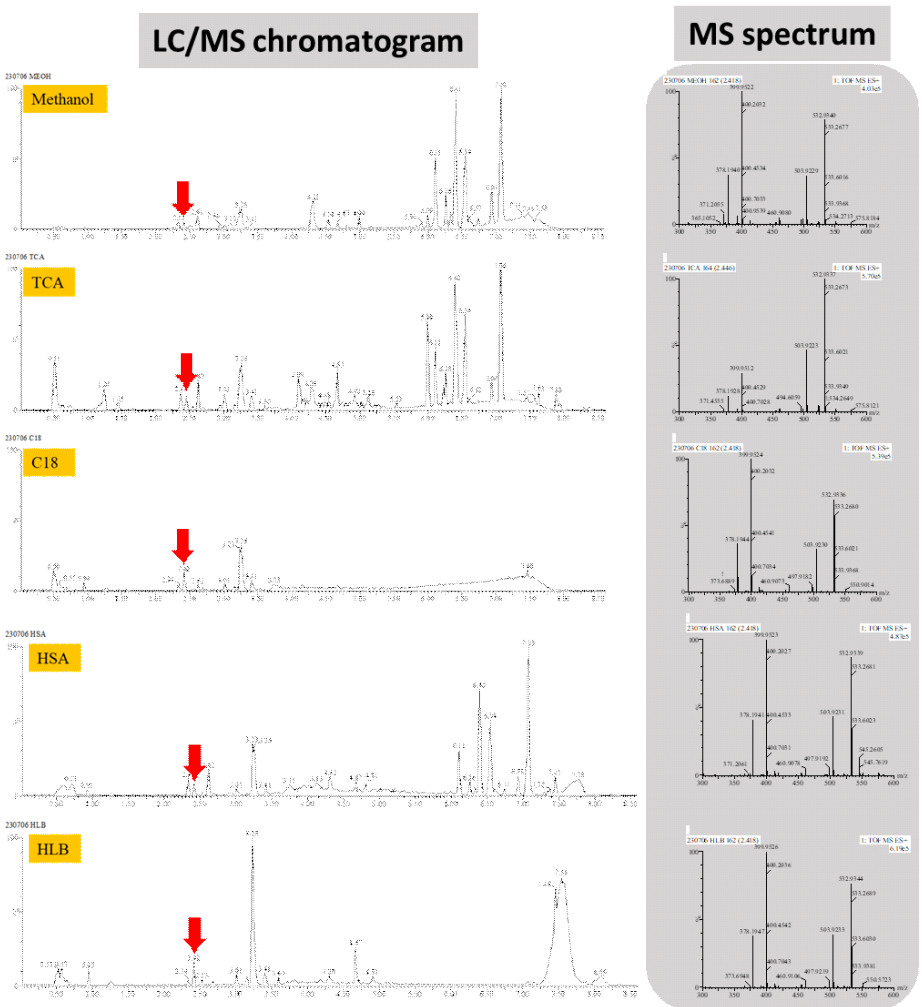


그림 121. 교차반응 감별을 위한 브루셀라, 결핵, *E. coli*, Yersinia 감염 소 혈청 대사체 분석에 따른 유의적 차이를

보이는 소 혈청 대사물질들의 상대적 함량 비교

다. 브루셀라 펩타이드의 항원 합성 시스템 선정

① 무세포 단백질 합성 시스템을 이용한 브루셀라 펩타이드 합성

- 무세포 단백지 합성 시스템은 codon usage를 밝히던 시험적인 *in vitro* 기법에서 최근에는 합성생물학 분야에서 널리 사용되는 재조합 단백질 합성 시스템이 되었음. 무세포 단백질 합성 시스템은 세포로부터 추출된 세포파쇄액에 단백질을 암호화하는 유전자를 첨가하여 2시간 이내에 재조합 단백질을 리터당 수백 mg 수준으로 합성할 수 있음(그림 122).

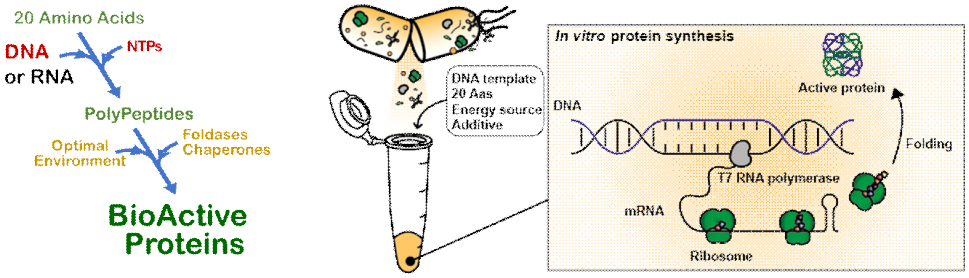


그림 122. 무세포 효소 합성 시스템의 모식도

② 브루셀라 펩타이드 암호화 유전자 설계 및 항원 합성

- 대장균 기반 항원 합성을 위한 유전자 서열 확보
  - ❍ 항원 펩타이드 합성과 정제를 위해서 유전자 구성은 브루셀라 펩타이드를 암호화하는 서열, 정제를 위한 6개의 연속된 histidine을 암호화하는 서열 그리고 각 요소를 이어주는 linker 서열을 암호화하는 서열이 주요한 요소들임. 대장균에서 발현을 위해서는 rare codon을 배제하여 수율을 최대화 하기 위해서 IDT 사에서 제공하는 codon optimization tool을 사용하여 펩타이드 서열로부터 유전자 서열을 확보함(그림 123).

Name	Amino acid sequence	Nucleotide sequence
6xHis tag	HHHHHH	CACCACCATCATCATCAC
GS-linker	GGGSGGSGSGS	GGCGGCGGTTCAGGTGGGA GCGGCTCCGGCTCA
Brucella peptide (B-peptide)	SEETKENERFTVK	AGCGAAGAAACAAAGGAGA ACGAACGTTTCACGGTCAAA

그림 123. 펩타이드 서열을 이용한 유전자 서열의 확보

- 항원 합성을 위한 유전자 설계
  - ❍ 전사/번역에 관련된 인자들과 함께 브루셀라 펩타이드를 암호화하는 서열로 구성된 유전자를 설계함. 전사에 관련된 T7 promoter, T7 terminator 서열이 양 끝에 위치하며, 번역에 관련된 서열인 RBS (Ribosome binding sequence) 다음에 브루셀라 펩타이드가 암호화된 서열이 위치하도록 설계(그림 124).

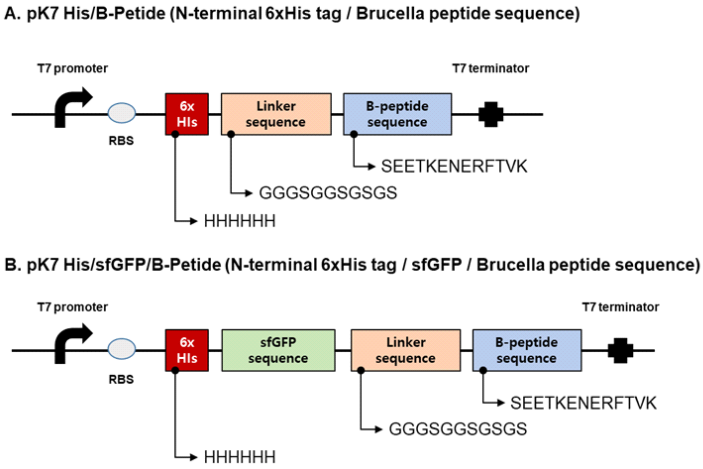


그림 124. 대장균 기반 무세포 단백질 합성을 위한 유전자 설계 모식도

❍ 동시에 sfGFP를 fusion partner로 사용하기 위해서 sfGFP의 C-말단에 브루셀라 펩타이드가 위치하도록 위치한 유전자도 함께 준비하였고, 시퀀싱 결과 설계된 서열 그대로 유전자가 클로닝 된 것을 확인함(그림 125).

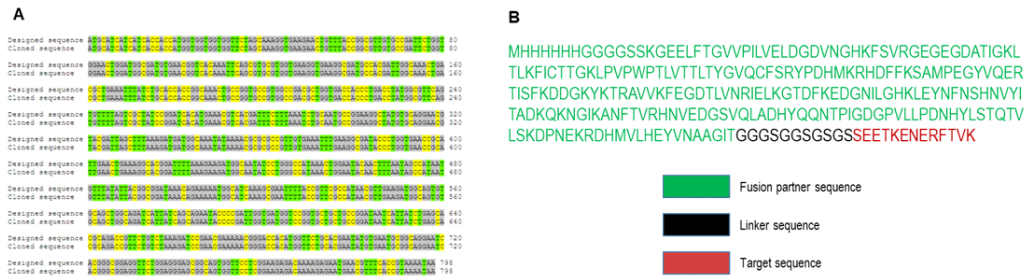


그림 125. 클로닝된 유전자의 시퀀싱 결과(A)와 번역 후 항원 단백질의 예상 아미노산 서열(B)

- 무세포 단백질 합성 시스템을 이용한 항원 단백질 합성

❍ 브루셀라 펩타이드만 합성하였을 경우에는 3.2kDa 정도의 목적 항원이 Coomassie Blue 염색된 SDS-PAGE gel 상에서 관찰할 수 없었음. 짧은 펩타이드의 경우에는 세포질이나 세포파쇄액에 존재하는 peptidase들에 의해서 안정적으로 합성이 힘들기 때문으로 판단됨.

❍ 이를 해결하고자, 수율과 가용성이 높은 sfGFP를 fusion partner로 사용하였고, 동일한 조건에서 sfGFP-브루셀라 펩타이드 융합체를 합성하였음. Coomassie Blue 염색된 SDS-PAGE gel 상에서 크기 29 kDa 정도의 위치에서 항원 단백질이 합성된 것을 확인함.

❍ 합성 수율 약 0.4 mg/ml 수준으로 발현되었으며, 가용성 또한 95% 이상으로 분리/정제에 사용할 수 있는 정도로 합성되었음(그림 126).

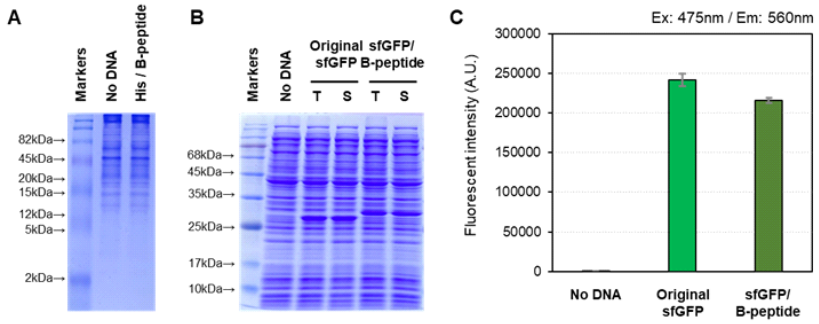
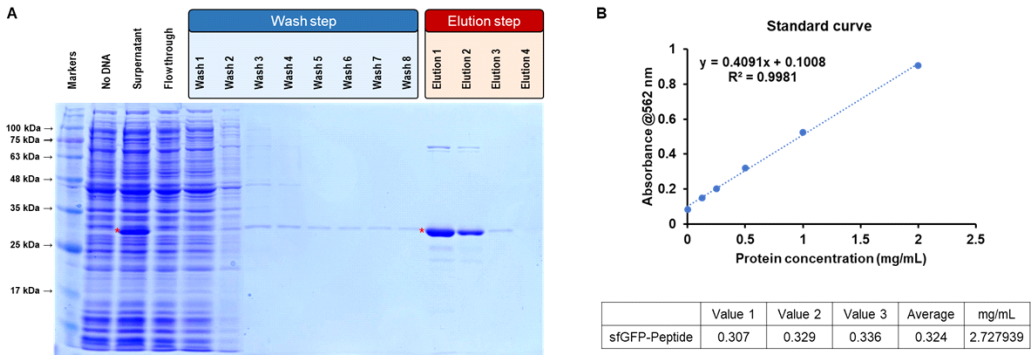


그림 126. Original sfGFP와 sfGFP/B-peptide의 무세포 단백질 합성

- 합성된 항원 단백질의 Ni-NTA resin 이용 크로마트그래피 분리/정제 및 정량

❍ 항원 단백질 N-말단에 His tag이 존재하기 때문에 Ni-NTA resin을 이용하여 chromatograph 기법을 이용하여 분리 진행함. Elution 과정 후에 목적 항원 단백질을 SDS-PAGE 상에서 Coomassie Blue 염색으로 확인하였고, 순도 약 95% 이상으로 분리된 것을 확인함(그림 127).

❍ 차후에 이어질 마우스 이용 면역반응에 사용하기 위해서 PBS를 이용하여 버퍼교환을 수행하였고, 준비된 항원 단백질을 BCA assay를 이용하여 정량하였음. 목적 항원 단백질은 약 1.5 mg/ml 수준으로 1.8 mg 확보함.



	Value 1	Value 2	Value 3	Average	mg/mL
sfGFP-Peptide	0.307	0.329	0.336	0.324	2.727939

그림 127. Ni-NTA resin을 이용한 크로마트그래피 수행 후 SDS-PAGE 결과(A) 및 버퍼교환된 항원 단백질의 BCA 정량

라. 브루셀라 검출 단백질 기반 Aptamer 발굴

① 브루셀라 검출용 단백질 기반 SELEX 실시

- Aptamer 발굴을 위한 Library 구축 제작 실시 (N30, N40)

DNA Library	Direction	nt	Sequence	Tm(℃)
N30	5'>3'	73	TTT CAG TCG TGA GGA AGG TAG NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN GCA TTT GAA ACT GGC AGA CTA G	80.1
N40	5'>3'	83	TTT CAG TCG TGA GGA AGG TAG NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN N GC ATT TGA AAC TGG CAG ACT AG	81.2

- 최적 SELEX 방법 고안 실시 후 금나노입자를 이용한 SELEX 기법으로 선택 실시(그림 128).

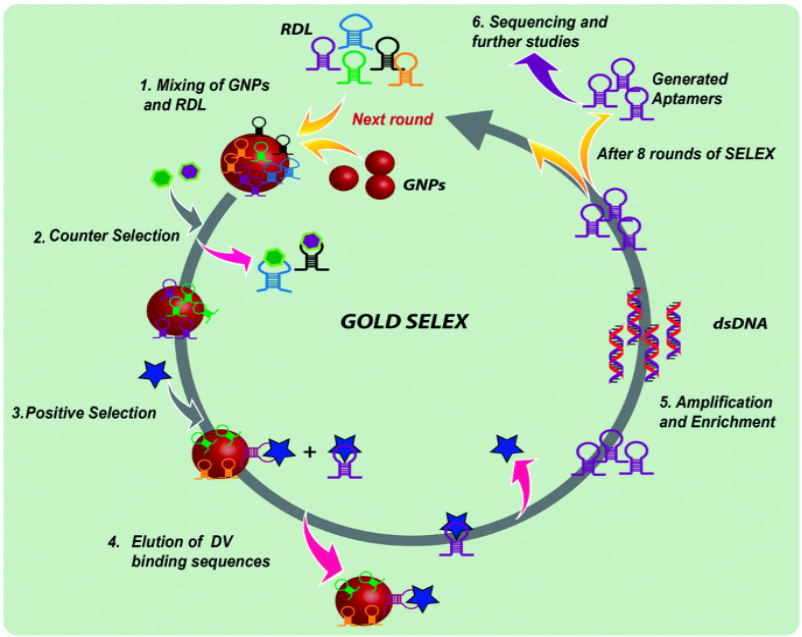


그림 128. 브루셀라 검출용 단백질을 이용한 Gold SELEX 과정

- Count SELEX는 소의 혈청을 이용하여 수행 실시하였음.
- 각 Round 별 결과는 real-time PCR을 통해 확인하였으며 PCR을 통해 해당 시료를 증폭하였음.
- 총 5번의 Positive SELEX 과정과 3번의 Negative SELEX 과정을 수행하였으며 최종 Round 수행 후 1번 더 증폭 과정을 수행하여 증폭 산물을 NGS를 통해 확인하는 과정을 수행하였음(그림 129).

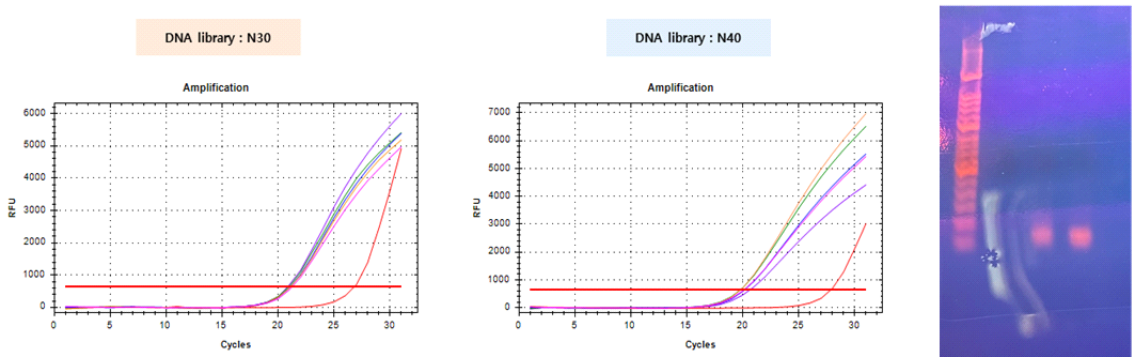


그림 129. 라운드 후 증폭 확인 결과

- NGS를 위해 해당 시료를 마크로젠에 의뢰 후 분석 결과 확인 실시

Sample ID	Total bases(bp)	Total reads	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
N30	3,523,287,092	58,267,392	49.2	50.8	99.4	97.5
N40	3,439,087,004	63,717,610	49.1	50.9	99.4	97.6

그림 130. NGS 후 Trimming 결과

- 총 발생된 유전자 서열은 N30의 경우 5천8백만개 정도이며 N40의 경우에는 6천 3백만개의 서열이 발굴되었음
- Bioinformatic tool을 이용하여 해당 서열을 분석하여 경우 유사성이 높은 서열 기준으로 N30는 4개, N40은 7개의 서열로 구분하여 선별 완료 하였음

- N30 서열 정보

1) TTTCAGTCGTGAGGAAGGTGGCAGACTAGGCATTTGAAACTGGCAGACTAG

2) TTTCAGTCGTGAGGAAGGTGGCAGACTAG( )CATTTGAAACTGGCAGACTAG

3) CTAGTCTGCCAGTTTCAAATGCCTAGTCTGCCACCTTCCTCACGACTGAAA

4)CTAGTCTGCCAGTTTCAAATGCGAATCTGGCGATGGGTGAAGTACTGAACGAGCAGCCACCTTCCT CACGACTGAAA

- N40 서열 정보

1) TTCAGTCGTGAGGAAGGTGGCAGACTAGGCATTTGAAACTGGCAGACTA

2) TTTCAGTCGTGAGGAAGGTGGCAGACTAGGCATTTGAAACTGGCAGACTAG

3) TTTCAGTCGGGAGGAAGGTGGCAGACTAGGCATTTGAAACTGGCAGACTAG

4) TNTCAGTCGTGAGGAAGGTGGCAGACTAGGCATTTGAAACTGGCAGACTA

5) TNTCAGTCGTGAGGAAGGTGGCAGACTAGGCATTTGAAACTGGCAGACTAG

6) CTAGTCTGCCAGTTTCAAATGCCTAGTCTGCCACCTTCCTCACGACTGAAA

7) CNAGTCTGCCAGTTTCAAATGCCTAGTCTGCCACCTTCCTCACGACTGAAA

② 브루셀라 검출 단백질의 Aptamer 이용 검출 기술 개발

- 발굴된 서열을 바탕으로 하여 Gold nanoparticle의 응집 반응을 이용한 검출 방법의 개발을 수행함

- 위에 발굴된 서열 중 3개를 우선 선정하여 실험을 실시 하였음(그림 131)

Aptamer No. 1 (49mer)	TTCAGTCGTGAGGAAGGTGGCAGACTAGGCATTTGAAACTGGCAGACTA
Aptamer No. 2 (51mer)	CTAGTCTGCCAGTTTCAAATGCCTAGTCTGCCACCTTCCTCACGACTGAAA
Aptamer No. 3 (77mer)	CTAGTCTGCCAGTTTCAAATGCGAATCTGGCGATGGGTGAAGTACTGAACGAGCAGCCACCTTCCTCACGACTGAAA

그림 131. 1차 선정 aptamer 서열 정보

- 해당 기술은 Gold nanoparticle 표면에 압타머를 고정 시킨 후 Target이 적용되면 압타머가 Target과 결합을 하게되고 Gold nanoparticle은 Bare 상태를 유지하게 됨, 이때 고염 (180nM NaCl)을 적용하게 되면 금나노입자가 엉겨 색변화 혹은 광학적 특성이 달라지는 현상을 이용하여 검출하는 방법을 의미함

· Gold nanoparticle 상에서 입자가 엉기는 최적 NaCl 농도 확인 실시(그림 132)

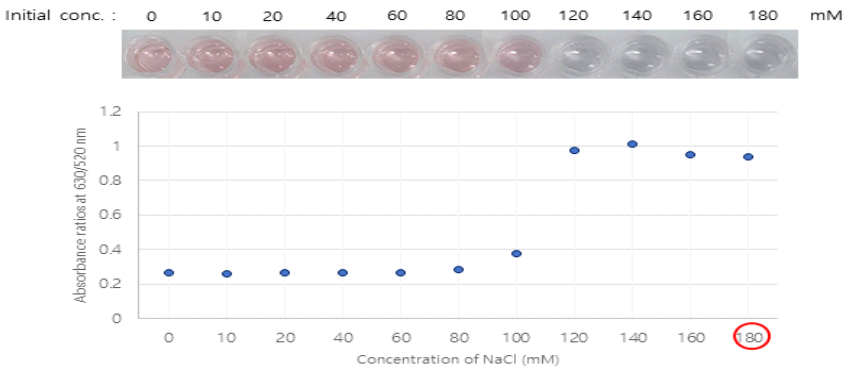


그림 132. 금나노입자 엉김현상이 나타나는 최적 NaCl 농도 확인

- 다음으로는 180nM의 NaCl에서 보호를 받는 최저 DNA aptamer의 농도 확인 실시 (그림 133)

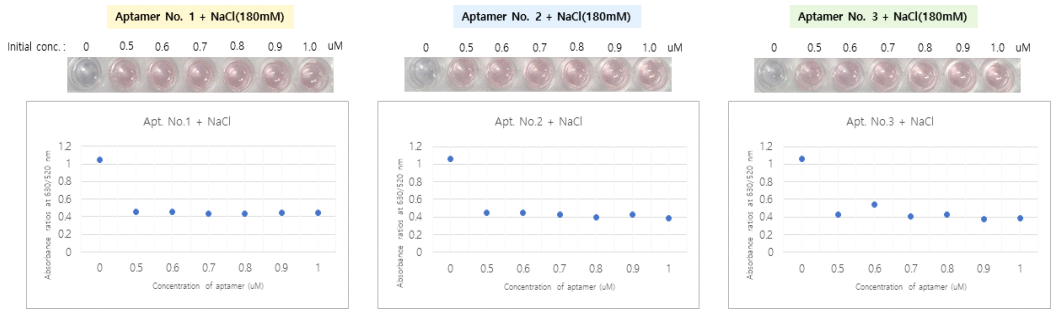


그림 133. DNA aptamer와 금나노입자 결합으로 인한 고염에서의 엉김현상 방지 농도 확인 결과

- 위에 그림에서처럼 브루셀라의 검출을 위한 농도 상에서는 금나노입자의 경우 엉김현상이 나타나지 않은 것으로 확인
- 최적 Buffer 조건을 확인 실시하였으며 최적 buffer의 경우는 Tris-Cl (pH 8.8)로 최적 선정 완료하였음 : MES pH 6.0, Borate buffer pH 7.4, PBS pH 7.2, HEPES pH 6.8, Tris-Cl pH 7.4.
- 아래 그림에서처럼 검출능 확인을 위한 평가 실시 Control의 경우 Target이 없는 경우를 의미하며 Target을 농도별로 희석하였을 때 확인 결과 아래와 같이 확인이 되었음 (그림 134)

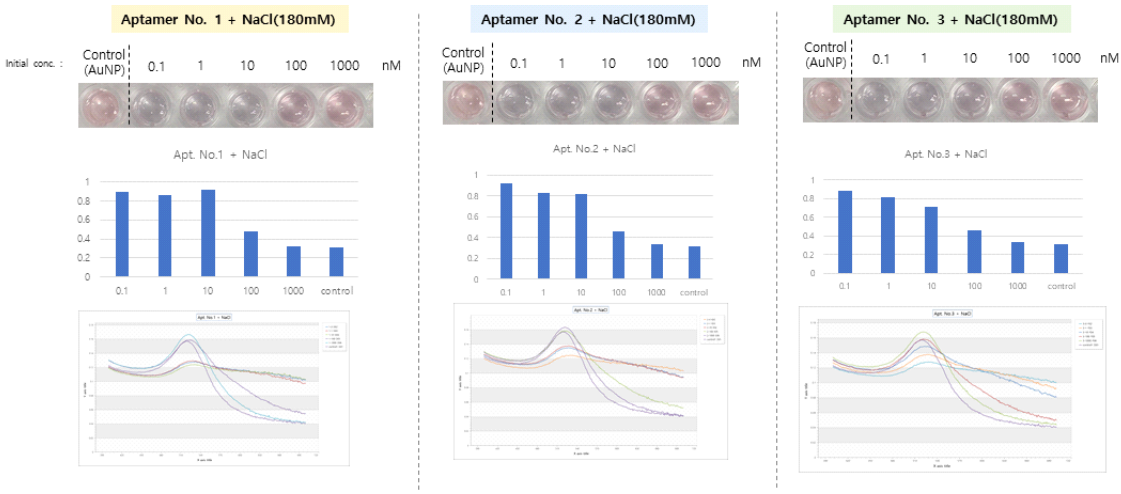


그림 134. 브루셀라 검출을 위한 Aptamer 금나노입자 엉김현상 기반 검출능 확인 결과

- 눈으로 확인할 수 있는 적정 농도는 100nM 수준의 브루셀라 단백질이였으며 압타머 2, 3번에서 장비를 활용하는 경우 1nM 농도의 검출 농도를 확인할 수 있었음

(4) 연구결과 산업화

① 항원 합성 및 대량 확보
ⓐ 펩타이드(GNU)-carrier protein 컨쥬게이트 항원 6종 합성
- GNU-carrier protein 컨쥬게이트 3종: GNU-BSA, GNU-OVA, GNU-KLH
- Carrier protein-GNU 컨쥬게이트 3종: BSA-GNU, OVA-GNU, KLH-GNU

ⓑ sfGFP-GNU 컨쥬게이트 항원 1종 합성
ⓒ NanoLuk-GNU 컨쥬게이트 항원 1종 합성
ⓓ GMBS-GNU 컨쥬게이트 항원 1종 합성

② 항체 및 면역진단기술의 개발
ⓐ 단클론성 항체 12종 개발
- G-B-1, G-B-2, G-B-3 및 G-G-1 (4종)
- BSA-GNU 1A5, 2A1, 3G5, 3A7 및 4E8 (5종)
- GNU-BSA 1D11, 2G3 및 4B8 (3종)

ⓑ 브루셀라균 대사체 peptide 신속 검출을 위한 간접효소면역분석법 개발
- G-B-2을 이용한 간접효소면역분석법의 검출한계: 1 ppm
ⓒ 브루셀라균 대사체 peptide 신속 검출을 위한 항체 기반의 LFA법 개발
- LFA법의 검출한계: 50 ppm
ⓓ 개발된 기술의 적용은 소를 포함한 반추류 뿐만 아니라 반려동물에서의 적용 검토를 통해 다양한 축종에 대한 적용 수행

③ LAMP-LFA법의 개발
- 개발된 LAMP-LFA법의 검출한계: 약 $8.85x10^0$ CFU/mL
- 실제 시료(전혈)을 이용한 분석법의 적용 가능성 평가 완료
- 시제품 개발을 통한 산업화 기반 구축 및 상용화 추진을 수행하며, 마케팅 활성화를 위해 검역검사본부, 시도가축위생시험소와의 협업체계를 구축하여 일반농가에서의 현장적용 가능토록 함

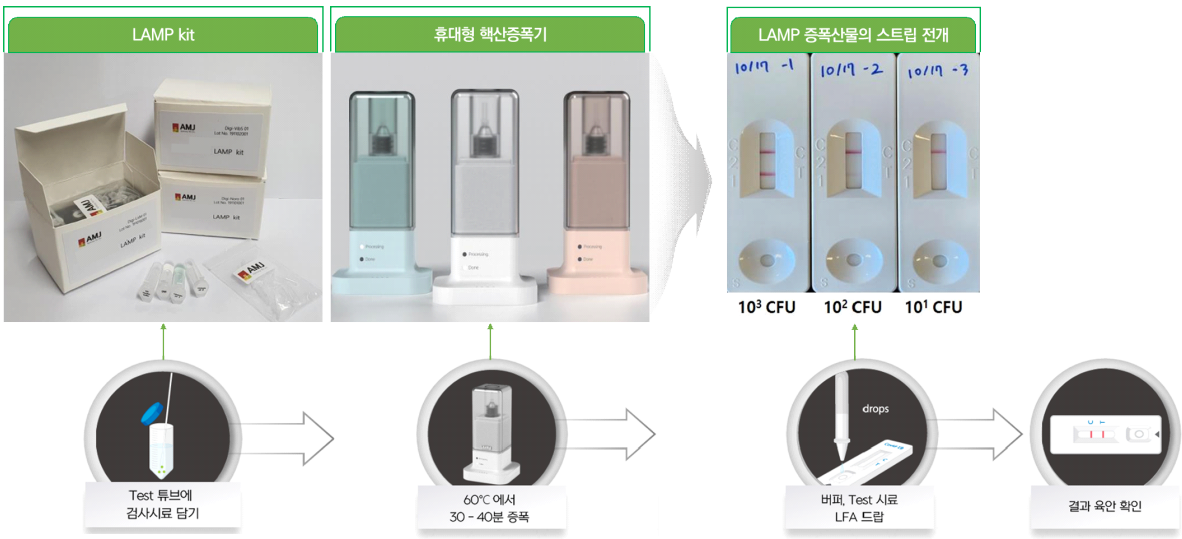


그림 135. 개발된 진단키트에 대한 시제품 제작 및 산업화 계획

④ 압타머 발굴
- 11종의 압타머 발굴 및 3종의 압타머를 이용한 금 나노입자 기반 비색법 확립

(2) 정량적 연구개발성과

성과 목표	사업화지표												연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
													논문		논문평균IF	학술 발표					
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	SMART	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자 유치		SCI	비SCI					정책 활용	홍보 전시	
단위	건	건	건	평균등급	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치	15	15			20	10									15	15		10			
최종목표	2	2			1	10							2	2	1.5	4		3			
연구기간 목표	1				1	10				1			1	2	1.5	3		1			
연구기간 내 달성 실적	1				2	10				1			4	1	4.8	6		4			
달성률(%)	100				200	100				100			400	50	300	200		400			

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Simvastatin Inhibits Brucella abortus Invasion into RAW 264.7Cells through Suppression of the Mevalonate Pathway andPromotes Host Immunity during Infection in a Mouse Model	International Journal of Molecular Sciences	김석	23	Switzerland	MDPI	SCI (IF: 6.28)	2022.10	35955474	100
2	Effects on the resistance to *Brucella abortus* 544 infection in a murine macrophage cell line and in a mouse model via treatment with sirtuin 1 activators – resveratrol, piceatannol and ginsenoside Rg3	Journal of Microbiology and Biotechnology	김석	33	R. Korea	Microbiological Society of Korea	SCI (IF: 3.28)	2023.01	22090928	100
3	The modulatory effect of sodium propionate treatment in the expression of inflammatory cytokines and intracellular growth of *Brucella abortus* 544 in Raw 264.7 cells	Journal of Microbiology and Biotechnology	김석	33	R. Korea	Microbiological Society of Korea	SCI (IF: 3.28)	2023.05	22030304	100
4	Intracellular Growth Inhibition and Host Immune Modulationof 3-Amino-1,2,4-triazole in Murine Brucellosis	International Journal of Molecular Sciences	김석	23	Switzerland	MDPI	SCI (IF: 6.28)	2023.12	24241735	100
5	Combination of recombinant Brucella abortus dapB and gpm proteins induces host immunity against B. abortus 544 infection using a mouse model	Journal of Preventive Veterinary Medicine	김석	47	R. Korea	한국예방수의학회	학진등재	2023.12	22878009	100

International Journal of *Molecular Sciences*

MDPI

Article

Simvastatin Inhibits *Brucella abortus* Invasion into RAW 264.7 Cells through Suppression of the Mevalonate Pathway and Promotes Host Immunity during Infection in a Mouse Model

Trang Thi Nguyen [1], Heejin Kim [1], Tran Xuan Ngoc Huy [1,2], Wongi Min [1], Hujang Lee [1], Alisha Wehdnesday Bernardo Reyes [3], Johnhwa Lee [4] and Suk Kim [1,*]

[1] Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea; nguyentrang29071996@gmail.com (T.T.N.); khjin0704@gnu.ac.kr (H.K.); txn.huy@hutech.edu.vn (T.X.N.H.); wongimin@gnu.ac.kr (W.M.); hujang@gnu.ac.kr (H.L.)
[2] Institute of Applied Sciences, HUTECH University, 475A Dien Bien Phu St., Ward 25, Binh Thanh District, Ho Chi Minh City 72300, Vietnam
[3] Department of Veterinary Paraclinical Sciences, College of Veterinary Medicine, University of the Philippines Los Baños, Laguna 4031, Philippines; abreyes4@up.edu.ph
[4] College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Iksan 54596, Korea; johnhlee@chonbuk.ac.kr
* Correspondence: kimsuk@gnu.ac.kr; Tel.: +82-55-772-2359; Fax: +82-55-772-2349

Abstract: Simvastatin is an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase and has been found to have protective effects against several bacterial infections. In this study, we investigate the effects of simvastatin treatment on RAW 264.7 macrophage cells and ICR mice against *Brucella* (*B.*) *abortus* infections. The invasion assay revealed that simvastatin inhibited the *Brucella* invasion into macrophage cells by blocking the mevalonic pathway. The treatment of simvastatin enhanced the trafficking of Toll-like receptor 4 in membrane lipid raft microdomains, accompanied by the increased phosphorylation of its downstream signaling pathways, including JAK2 and MAPKs, upon =*Brucella* infection. Notably, the suppressive effect of simvastatin treatment on *Brucella* invasion was not dependent on the reduction of cholesterol synthesis but probably on the decline of farnesyl pyrophosphate and geranylgeranyl pyrophosphate synthesis. In addition to a direct brucellacidal ability, simvastatin administration showed increased cytokine TNF-α and differentiation of $CD8^+$ T cells, accompanied by reduced bacterial survival in spleens of ICR mice. These data suggested the involvement of the mevalonate pathway in the phagocytosis of *B. abortus* into RAW 264.7 macrophage cells and the regulation of simvastatin on the host immune system against *Brucella* infections. Therefore, simvastatin is a potential candidate for studying alternative therapy against animal brucellosis.

Keywords: *Brucella abortus*; simvastatin; mevalonate pathway; phagocytosis; immune response; RAW 264.7 cell; ICR mouse

check for updates

Citation: Nguyen, T.T.; Kim, H.; Huy, T.X.N.; Min, W.; Lee, H.; Reyes, A.W.B.; Lee, J.; Kim, S. Simvastatin Inhibits *Brucella abortus* Invasion into RAW 264.7 Cells through Suppression of the Mevalonate Pathway and Promotes Host Immunity during Infection in a Mouse Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8337. https://doi.org/10.3390/ijms23158337

Academic Editor: Yoshiro Kobayashi

Received: 21 June 2022
Accepted: 27 July 2022
Published: 28 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 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

Brucellosis is one of the most common zoonotic diseases and is still neglected in developing countries. Indeed, it negatively affects not only livestock production but also public health. *Brucella* species are the pathogenic agents of brucellosis. The disease was first discovered by Bruce in 1887 on the island of Malta [1]. Among twelve recently recognized *Brucella* species, *Brucella* (*B.*) *abortus*, together with *B. melitensis* and *B. suis* are mainly the causative agents for brucellosis in cattle and are one of the most pathogenic to humans [2]. *Brucella* usually spreads through direct contact with infected birth tissues, broken skin, and can also be transmitted by contaminated objects. In humans, *Brucella* can be transmitted via the consumption of unpasteurized milk, meat, and animal products from infected animals [3]. Clinical manifestations of cattle brucellosis include abortion, death of young ones, stillbirth, male infertility, and orchitis, resulting in severe losses in the dairy industry [4]. The symptom of human brucellosis in the early stage is high and

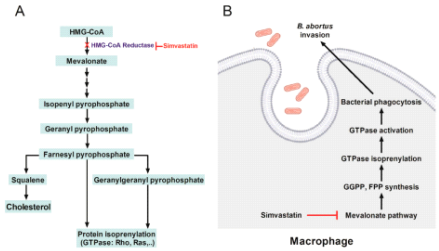


Figure 6. Schematic of mevalonic pathway and illustration of the inhibition effect of simvastatin on *Brucella* invasion through suppression of mevalonate pathway. Simvastatin inhibits the conversion of HMG-CoA to mevalonate, leading to the inhibition of GGPP and FPP synthesis, which regulates the prenylation of some GTPase such as Ras and Rho families (**A**). Inhibiting GTPase synthesis caused by simvastatin treatment affects the activation of GTPase lead to the reduced *B. abortus* internalization into RAW 264.7 cells (**B**). Abbreviations: HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A; FPP: farnesyl pyrophosphate; GGPP: geranylgeranyl pyrophosphate.

Author Contributions: Conceptualization and study conception, planning experiments, data analysis, interpretation, T.T.N., H.K. and T.X.N.H.; methodology and validation T.T.N., H.K. and T.X.N.H.; figure preparation, T.T.N.; statistical analysis, T.T.N.; data analysis and discussion, W.M., H.L. and J.L.; writing—original draft preparation, T.T.N. and T.X.N.H.; review and editing, A.W.B.R. and T.X.N.H.; supervision, S.K.; project administration, S.K.; funding acquisition, S.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Animal Disease Management Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (122001021SB0106138211653000).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Selsem, M.N.; Boyle, S.M.; Sriranganathan, N. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. *Vet. Microbiol.* **2010**, *140*, 392–398. [CrossRef] [PubMed]
2. El-Sayed, A.; Awad, W. Brucellosis: Evolution and expected comeback. *Int. J. Vet. Sci. Med.* **2018**, *6*, S31–S35. [CrossRef] [PubMed]
3. de Figueiredo, P.; Ficht, T.A.; Rice-Ficht, A.; Rossetti, C.A.; Adams, L.G. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: Review of *Brucella*-host interactions. *Am. J. Pathol.* **2015**, *185*, 1505–1517. [CrossRef] [PubMed]
4. Khan, M.Z.; Zahoor, M. An overview of brucellosis in cattle and humans, and its serological and molecular diagnosis in control strategies. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2018**, *3*, 65. [CrossRef]
5. Dean, A.S.; Crump, L.; Greter, H.; Hattendorf, J.; Schelling, E.; Zinsstag, J. Clinical manifestations of human brucellosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1929. [CrossRef]
6. Pedersen, T.R.; Tobert, J.A. Simvastatin: A review. *Expert Opin. Pharmacother.* **2004**, *5*, 2583–2596. [CrossRef]

JMB Journal of Microbiology and Biotechnology

J. Microbiol. Biotechnol. 2023. 33(3): 1–8
https://doi.org/10.4014/jmb.2209.09028

Protective Effects Against *Brucella abortus* 544 Infection in a Murine Macrophage Cell Line and in a Mouse Model via Treatment with Sirtuin 1 Activators Resveratrol, Piceatannol and Ginsenoside Rg3

Alisha Wehdnesday Bernardo Reyes[1†], Heejin Kim[2†], Tran Xuan Ngoc Huy[2], Trang Thi Nguyen[2], Wongi Min[2], Hu Jang Lee[2], Jin Hur[3], John Hwa Lee[3], and Suk Kim[2*]

[1]*Department of Veterinary Paraclinical Sciences, College of Veterinary Medicine, University of the Philippines Los Baños, College, Laguna 4031, Philippines*
[2]*Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea*
[3]*College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Iksan 54596, Republic of Korea*

Brucellosis is a contagious zoonotic disease that infects millions of people annually with hundreds of millions more being exposed. It is caused by *Brucella*, a highly infectious bacterial species capable of infecting humans with an estimated dose of 10-100 organisms. Sirtuin 1 (SIRT1) has been reported to contribute to prevention of viral diseases as well as a chronic infection caused by *Mycobacterium bovis*. Here, we investigated the role of SIRT1 in the establishment of *Brucella abortus* infection in both in vitro and in vivo systems using the reported SIRT1 activators resveratrol (RES), piceatannol (PIC), and ginsenoside Rg3 (Rg3). In RAW264.7 cells, SIRT1 activators did not alter the adherence of *Brucella* or *Salmonella* Typhimurium. However, reduced uptake of *Brucella* was observed in cells treated with PIC and Rg3, and survival of *Brucella* within the cells was only observed to decrease in cells that were treated with Rg3, while PIC treatment reduced the intracellular survival of *Salmonella*. SIRT1 treatment in mice via oral route resulted in augmented *Brucella* resistance for PIC and Rg3, but not RES. PIC treatment favors Th2 immune response despite reduced serum pro-inflammatory cytokine production, while Rg3-treated mice displayed high IL-12 and IFN-γ serum production. Overall, our findings encourage further investigation into the complete mechanisms of action of the different SIRT1 activators used as well as their potential benefit as an effective alternative approach against intracellular and extracellular pathogens.

Keywords: *Brucella abortus*, piceatannol, ginsenoside Rg3, resveratrol, sirtuin 1

Received: September 19, 2022
Accepted: January 9, 2023

First published online:
January 17, 2023

**Corresponding author*
Phone: +82-55-772-2359
Fax: +82-55-772-2349
E-mail: kimsuk@gnu.ac.kr

†These authors contributed equally to this work.

pISSN 1017-7825
eISSN 1738-8872

Copyright © 2023 by the authors. Licensee KMB. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license.

Introduction

As a widespread contagious zoonotic disease affecting both animals and humans, and despite considerable efforts to control it, Brucellosis inflicts significant economic impacts on various regions worldwide while representing an important health risk to livestock [1]. *Brucella* spp. are facultative intracellular bacteria reported to have the capacity to evade or interfere host immune responses. They currently comprise 12 species, including *Brucella* (*B.*) *abortus*, which is one of the most important pathogenic species in humans [1, 2]. These bacteria affect a wide variety of host species in addition to humans and leading to serious debilitating disease with no short-course treatment regimens or licensed vaccines available for human patients [3]. Nevertheless, the number of new, human brucellosis cases remains unclear despite its significant recognition as a threat to both agricultural and public health sectors across the globe. At the same time, there is no sufficient empirical evidence regarding the incidence of the disease, and hence the World Health Organization (WHO) has withdrawn its priority Neglected Zoonotic Disease status [4]. Although a group of researchers in 2006 attempted to determine the incidence of human brucellosis and concluded the number of new infections to exceed half a million cases each year, the number was revealed to be not evidence based. Laine and colleagues [4] then conducted a study and suggested that with billions of vulnerable people in areas, where in many cases the existence of this infection was unknown, hundreds of millions could possibly be exposed to *Brucella* and therefore millions of people would likely contract

within the host are the required steps for any pathogenic intracellular bacterium to be a successful infectious agent such as *Brucella* [23]. *Brucella* replicates and establishes infection in macrophages/monocytes, which are its primary target cells [24]. Here, we demonstrated that SIRT1 activators RES, PIC and Rg3 did not alter the adherence efficiency of either *Brucella* or *Salmonella* in a murine macrophage cell line RAW264.7, but act in the favor of the host cell in reducing internalized bacteria, particularly in PIC and Rg3 treatment. Chen *et al.* [25] reported that SIRT1 could directly interact with c-Fos and c-Jun basic leucine zipper domains that suppress AP-1 transcriptional activity and subsequent reduction of COX-2 expression. Hence, SIRT1 overexpression in macrophages reduced prostaglandin E2 which is an inhibitor of the phagocytic activity and bacterial killing. However, this is in contrast to the inhibitory effect observed in the action of PIC and Rg3 that resulted in the attenuation of the number of bacteria entering the macrophages. Interestingly, possible intracellular killing due to a lower number of bacteria recovered from PIC- and Rg3-incubated post-infected RAW264.7 cells against *Salmonella* and *Brucella*, respectively, could be attributed to its action on COX-2; however, this needs to be examined carefully in future studies in the context of intracellular pathogen infection. Nevertheless, these findings suggest a different mechanism of action for the control of internalized bacteria. In contrast to a report that SIRT1 expression has little influence on macrophage and neutrophil antimicrobial functions [13], the results in the present study suggest the possibility of SIRT1/COX-2-dependent microbial control within host cells.

SIRT1 has been associated with prevention of viral diseases, but its role in chronic bacterial infections has not been widely studied. However, its contribution against *Mycobacterium* (*M.*) *bovis* infection has already been investigated. Cheng *et al.* [26] reported that SIRT1-expressing cells were mainly macrophages and its downregulation is mediated by *M. bovis*. Furthermore, lower SIRT1 expression is connected with *M. bovis* infection as well as the pathogenesis of tuberculosis, indicating SIRT1 activators as a potential and effective host-directed therapeutic approach against tuberculosis. *Brucella*, when not treated properly, can lead to chronic infection that leads to severe health problems [27]; however, while the use of RES in the present study did not alter *Brucella* infection in either in vitro or in vivo experiments, other reported SIRT1 activators including PIC and Rg3 showed decreased susceptibility to *Brucella* infection. In a study by Nijampatnam et al. [28], a significant reduction in *Streptococcus mutans* in the gut of flies after 7 days of infection and a reduction in dental caries in a rat model accompanied by reduced but insignificant bacterial colonization was observed with PIC treatment suggesting that PIC inhibits *S. mutans* colonization or inhibits virulence factors in vivo. Rg3, on the other hand, had protective effect on *Escherichia coli* lipopolysaccharide-induced stress in chicks showing ameliorated growth inhibition and fever, and decreased production of stress-related hormones, possibly mediated by regulating inflammatory response and oxidative damage [29].

SIRT1 has been indicated to suppress innate inflammatory responses, but other studies reported otherwise [13]. Here, in vivo treatment with SIRT1 activators, particularly RES and PIC, showed reduced serum levels of IL-12, IFN-γ, TNF-α, and IL-6, which suggest inactivation of pro-inflammatory response during *B. abortus* infection. However, only PIC treatment is accompanied by augmented *Brucella* resistance in mice. Several studies on SIRT1 silencing or inactivation showed promotion of pro-inflammatory cytokine production, such as SIRT1 deletion or inactivation treatment in murine dendritic cells (DCs) that increased production of IL-12, which is a heterodimeric pro-inflammatory cytokine that induces IFN-γ production [25, 30]. IL-6, on the other hand, has also been demonstrated to be required for IFN-γ in addition to TNF-α [31]. NF-κB p65 hyperacetylation in SIRT1-deficient macrophages results in increased level of pro-inflammatory cytokines including TNF-α [32]. Therefore, suppression of inflammatory response could be due to inhibition of NF-κB activity via deacetylation of NF-κB p65. The reduction in the susceptibility to *Brucella* infection by PIC treatment despite attenuated pro-inflammatory cytokine production could be explained by an IFN-γ/IL-10 ratio of less than 1, hence suggesting a favorable Th2 immune response that is known to be important in the eradication of extracellular parasites and bacterial infection. Kim *et al.* [33] reported the transient IFN-γ production that promotes *B. abortus*-induced abortion using ICR mice. This then suggests the potential use of RES or PIC as an effective approach against extracellular parasites and prevention of abortion in animal brucellosis. However, Rg3 treatment in mice displayed induced serum levels of IL-12 and IFN-γ, suggesting a different mechanism of action from that of PIC treatment, but with a similar, corresponding favorable outcome against *Brucella* infection. This suggests also the potential use of Rg3 as a vaccine adjuvant. IL-12 is known to contribute to *B. abortus* resistance mainly via IFN-γ-dependent pathway, while IFN-γ has also been suggested to enhance resistance via activation of macrophages for brucellicidal activity [34, 35]. The differences in the in vitro and in vivo results could be due to the controlled environment using cell lines while in vivo tests include the whole living organism that could involve several factors in the action of the different activators used in the present study. Furthermore, our findings suggested the variation and specificity of the actions of the different SIRT1 activators. Nevertheless, further investigations are necessary for a complete understanding of the mechanisms involved in the control of *Brucella* infection using SIRT1 activators. Taken together, the use of SIRT1 activators individually or in combination could be a potential, effective alternative approach in the control of intracellular infection such as *Brucella* and *Salmonella*.

Acknowledgments

This work was supported by the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through the Animal Disease Management Technology Development Program, funded by the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (122001021SB0106138211653000).

JMB Journal of Microbiology and Biotechnology

J. Microbiol. Biotechnol. 2023. 33(8): 1006–1012
https://doi.org/10.4014/jmb.2303.03041

The Modulatory Effect of Sodium Propionate Treatment in the Expression of Inflammatory Cytokines and Intracellular Growth of *Brucella abortus* 544 in Raw 264.7 Cells

Heejin Kim[1], Tran Xuan Ngoc Huy[1,4], Trang Thi Nguyen[1], Alisha Wehdnesday Bernardo Reyes[2], WonGi Min[3], Hu Jang Lee[1], Jin Hur[3], and Suk Kim[1]*

[1]*Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea*
[2]*Department of Veterinary Paraclinical Sciences, College of Veterinary Medicine, University of the Philippines Los Baños, College, Laguna 4031, Philippines*
[3]*College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Iksan 54596, Republic of Korea*
[4]*Institute of Applied Sciences, HUTECH University, 475A Dien Bien Phu St., Ward 25, Binh Thanh District, Ho Chi Minh City 72300, Vietnam*

In this study, we investigated the effects of sodium propionate (SP) treatment on intracellular mechanism of murine macrophages and its contribution to host immunity during *Brucella abortus* 544 infection. The intracellular growth assay revealed that SP inhibited *Brucella* replication inside the macrophages. To determine intracellular signaling involved during SP treatment after *Brucella* infection, we analyzed the change of five different cytokines production relevant to SP such as TNF-α, IL-10, IFN-γ, IL-1β, and IL-6, and the results indicated that the boost with IL-10 was apparent throughout the culture period for 48 h as well as IL-1β which was apparent at 24 h post-infection and IFN-γ which was apparent at 24 h and 48 h in comparison to SP untreated groups. On the other way, SP-treated cells displayed suppressed production of TNF-α and IL-6 at all time points tested and 48 h post-infection, respectively. Furthermore, we conducted western blot to establish a cellular mechanism, and the result suggested that SP treatment attenuated p50 phosphorylation, part of the NF-κB pathway. These findings indicated that the inhibitory effect of SP against *Brucella* infection could be attributed through induction of cytokine production and interference on intracellular pathway, suggesting SP as a potential candidate for treating brucellosis.

Keywords: *Brucella abortus*, sodium propionate, macrophages, cytokines, NF-κB

Received: March 28, 2023
Accepted: May 12, 2023

First published online:
May 22, 2023

**Corresponding author*
Phone: +82-55-772-2359
Fax: +82-55-772-2349
E-mail: kimsuk@gnu.ac.kr

pISSN 1017-7825
eISSN 1738-8872

Copyright © 2023 by the authors. Licensee KMB. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license.

Introduction

Brucella are facultative intracellular Gram-negative bacteria that may cause brucellosis in a wide range of different mammals as host and result in enormous economic losses worldwide [1]. Human brucellosis is reported more than 500 thousands new cases with minimal mortality annually and mostly it comes from livestock [2]. Therefore, prevention of the transmission from animal to human and improve incidence in animals can be an effective method to eradicate brucellosis. Vaccination in animal is regarded as one of the prominent ways to control this disease but there is still no vaccine that provides full protection against brucellosis [2]. Understanding the underlying pathogenesis of *Brucella* would be useful in designing effect approaches for the control of the disease in animals and subsequently preventing the disease in human. Once it enters the host, *Brucella* invades phagocytic macrophages and non-phagocytic cells, and it can survive and replicate in the vacuolar phagocytic compartments of macrophages and the endocytic compartments of non-phagocytic cells [3]. *Brucella* has developed its own mechanism to take advantage of the host immune response in order to persist and establish chronic infection and inhibit macrophage apoptosis in infected cells [4, 5]. Furthermore, the infection also encourages macrophages to secrete pro- and anti-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), IL-6, interferon-γ (IFN-γ) and IL-10. These immune responses, including the release of ILs, are mediated by NF-κB in part [6]. NF-κB is a central transcription factor responsible for controlling the secretion of multiple cytokine genes involved in inflammatory response [5]. Therefore, the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine production through NF-κB pathway seems to be important for the host to block chronic infection as well as control survival [4].

Taken together, this study suggested that SP inhibits intracellular growth of *Brucella* in macrophages by inhibiting NF-κB activation, which in turn changes the level of cytokines expression. Although further studies are needed to determine the exact mechanism involved, all the results supported the beneficial therapeutic potential of SP against *Brucella*, indicating the underlying molecular insights in changing inflammatory conditions to the host advantage.

Acknowledgments

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Animal Disease Management Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (122001021SB0106138211653000).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

1. Hop HT, Reyes AWB, Huy TXN, Arayan LT, Min WG, Lee HJ, *et al.* 2017. Activation of NF-κB-mediated TNF-induced antimicrobial immunity is required for the efficient *Brucella abortus* clearance in RAW 264.7 cells. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7:** 437.
2. Pasquevich KA, Estein SM, Samartino CG, Zwerdling A, Coria LM, Barrionuevo P, *et al.* 2009. Immunization with recombinant *Brucella* species outer membrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD4$^+$ and CD8$^+$ T cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection. *Infect. Immun.* **77:** 436–445.
3. He Y. 2012. Analyses of *Brucella* pathogenesis, host immunity, and vaccine targets using systems biology and bioinformatics. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2:** 2.
4. Xavier MN, Winter MG, Spees AM, Nguyen K, Atluri VL, Silva TMA, *et al.* 2013. CD4$^+$ T cell-derived IL-10 promotes *Brucella abortus* persistence via modulation of macrophage function. *PLoS Pathog.* **9:** e1003454.
5. Hop HT, Arayan LT, Reyes AWB, Huy TXN, Min WG, Lee HJ, *et al.* 2018. Heat-stress-modulated induction of NF-κB leads to brucellacidal pro-inflammatory defense against *Brucella abortus* infection in murine macrophages and in a mouse model. *BMC Microbiol.* **18:** 44.
6. Gutierrez MG, Mishra BB, Jordao L, Elliott E, Anes E, Griffiths G. 2008. NF-κB activation controls phagolysosome fusion-mediated killing of mycobacteria by macrophages. *J. Immunol.* **181:** 2651–2663.
7. Cox MA, Jackson J, Stanton M, Rojas-Triana A, Bober L, Laverty M, *et al.* 2009. Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E2 and cytokines. *World J. Gastroenterol.* **15:** 5549–5557.
8. Wang J, Wei Z, Zhang X, Wang Y, Yang Z, Fu Y. 2017. Propionate protects against lipopolysaccharide-induced mastitis in mice by restoring blood-milk barrier disruption and suppressing inflammatory response. *Front. Immunol.* **8:** 1108.
9. Stranahan LW, Khalaf OH, Garcia-Gonzalez DG, Arenas-Gamboa AM. 2019. Characterization of *Brucella canis* infection in mice. *PLoS One* **14:** e0218809.
10. Inan MS, Rasoulpour RJ, Yin L, Hubbard AK, Rosenberg DW, Giardina C. 2000. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-κB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology* **118:** 724–734.
11. Liu T, Li J, Liu Y, Xiao N, Suo H, Xie K, *et al.* 2012. Short-chain fatty acids suppress lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and proinflammatory cytokines through inhibition of NF-κB pathway in RAW264.7 cells. *Inflammation* **35:** 1676–1684.
12. Celli J. 2006. Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res. Microbiol.* **157:** 93–98.
13. Jeong S, Kim HY, Kim AR, Yun CH, Han SH. 2019. Propionate ameliorates *Staphylococcus aureus* skin infection by attenuating bacterial growth. *Front. Microbiol.* **10:** 1363.
14. Guinan J, Wang S, Hazbun TR, Yadav H, Thangamani S. 2019. Antibiotic-induced decreases in the levels of microbial-derived short-chain fatty acids correlate with increased gastrointestinal colonization of *Candida albicans*. *Sci. Rep.* **9:** 8872.
15. Zhang J, Zhang H, Liu M, Lan Y, Sun H, Mai K, *et al.* 2020. Short-chain fatty acids promote intracellular bactericidal activity in head kidney macrophages from Turbot (*Scophthalmus maximus L.*) via hypoxia inducible factor-1α. *Front. Immunol.* **11:** 615536.
16. Vinolo MAR, Rodrigues HG, Hatanaka E, Sato FT, Sampaio SC, Curi R. 2011. Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *J. Nutr. Biochem.* **22:** 849–855.
17. Meijer K, De Vos P, Priebe MG. 2010. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **13:** 715–721.
18. Silva LG, Ferguson BS, Avila AS, Faciola AP. 2018. Sodium propionate and sodium butyrate effects on histone deacetylase (HDAC) activity, histone acetylation, and inflammatory gene expression in bovine mammary epithelial cells. *J. Anim. Sci.* **96:** 5244–5252.
19. Jiang X, Baldwin CL. 1993. Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* **61:** 124–134.
20. Van Deun K, Haesebrouck F, Van Immerseel F, Ducatelle R, Pasmans F. 2008. Short-chain fatty acids and L-lactate as feed additives to control *Campylobacter jejuni* infections in broilers. *Avian Pathol.* **37:** 379–383.
21. Filippone A, Lanza M, Campolo M, Casili G, Paterniti I, Cuzzocrea S, *et al.* 2020. The anti-inflammatory and antioxidant effects of sodium propionate. *Int. J. Mol. Sci.* **21:** 3026.
22. Lührs H, Gerke T, Müller JG, Melcher R, Schauber J, Boxberger F, *et al.* 2002. Butyrate inhibits NF-κB activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. *Scand. J. Gastroenterol.* **37:** 458–466.
23. Singh N, Thangaraju M, Prasad PD, Martin PM, Lambert NA, Boettger T, *et al.* 2010. Blockade of dendritic cell development by bacterial fermentation products butyrate and propionate through a transporter (Slc5a8)-dependent inhibition of histone deacetylases. *J. Biol. Chem.* **285:** 27601–27608.

International Journal of *Molecular Sciences*

MDPI

Article

Intracellular Growth Inhibition and Host Immune Modulation of 3-Amino-1,2,4-triazole in Murine Brucellosis

Trang Thi Nguyen [1], Tran Xuan Ngoc Huy [1,2], Ched Nicole Turbela Aguilar [1], Alisha Wehdnesday Bernardo Reyes [3], Said Abdi Salad [1], Won-Gi Min [1], Hu-Jang Lee [1], Hyun-Jin Kim [1], John-Hwa Lee [4] and Suk Kim [1,*]

[1] Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea; nguyentrang29071996@gmail.com (T.T.N.); txn.huy@hutech.edu.vn (T.X.N.H.); cntaguilar24@gmail.com (C.N.T.A.); dheerow2323@gmail.com (S.A.S.); wongimin@gnu.ac.kr (W.-G.M.); hujang@gnu.ac.kr (H.-J.L.); hyunjkim@gnu.ac.kr (H.-J.K.)
[2] Institute of Applied Sciences, HUTECH University, 475A Dien Bien Phu St., Ward 25, Binh Thanh District, Ho Chi Minh City 72300, Vietnam
[3] Department of Veterinary Paraclinical Sciences, College of Veterinary Medicine, University of the Philippines Los Baños, Los Baños 4031, Philippines; abreyes4@up.edu.ph
[4] College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Iksan 54596, Republic of Korea; johnhlee@chonbuk.ac.kr
* Correspondence: kimsuk@gnu.ac.kr; Tel.: +82-55-772-2359; Fax: +82-55-772-2349

Abstract: Catalase, an antioxidant enzyme widely produced in mammalian cells and bacteria, is crucial to mitigating oxidative stress in hostile environments. This function enhances the intracellular survivability of various intracellular growth pathogens, including *Brucella* (*B.*) *abortus*. In this study, to determine whether the suppression of catalase can inhibit the intracellular growth of *B. abortus*, we employed 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT), a catalase inhibitor, in both RAW 264.7 macrophage cells and an ICR mouse model during *Brucella* infection. The intracellular growth assay indicated that 3-AT exerts growth-inhibitory effects on *B. abortus* within macrophages. Moreover, it contributes to the accumulation of reactive oxygen species and the formation of nitric oxide. Notably, 3-AT diminishes the activation of the nucleus transcription factor (NF-κB) and modulates the cytokine secretion within infected cells. In our mouse model, the administration of 3-AT reduced the *B. abortus* proliferation within the spleens and livers of infected mice. This reduction was accompanied by a diminished immune response to infection, as indicated by the lowered levels of TNF-α, IL-6, and IL-10 and altered CD4$^+$/CD8$^+$ T-cell ratio. These results suggest the protective and immunomodulatory effects of 3-AT treatment against *Brucella* infection.

Keywords: *Brucella abortus*; 3-AT; catalase inhibitor; intracellular growth; immune response; RAW 264.7 cell; ICR mouse

check for updates

Citation: Nguyen, T.T.; Huy, T.X.N.; Aguilar, C.N.T.; Reyes, A.W.B.; Salad, S.A.; Min, W.-G.; Lee, H.-J.; Kim, H.-J.; Lee, J.-H.; Kim, S. Intracellular Growth Inhibition and Host Immune Modulation of 3-Amino-1,2,4-triazole in Murine Brucellosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 17352. https://doi.org/10.3390/ijms242417352

Academic Editor: Agnieszka Daca

Received: 31 October 2023
Revised: 6 December 2023
Accepted: 7 December 2023
Published: 11 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

Brucellosis is a common zoonotic disease caused by *Brucella* species. Despite its low fatality rate, it imposes a substantial burden in terms of morbidity and economic costs, making it a concern for public health and the economy in regions where it is endemic. Brucellosis is a major concern in livestock, leading to abortion, the death of young ones, and reduced milk production in infected animals [1]. *Brucella*, when present in animals, has the potential to transmit and induce brucellosis in humans, leading to symptoms such as fever, joint pain, and muscle pain. *Brucella* spp. are characterized by their Gram-negative nature and their ability to thrive as facultative intracellular bacteria. This pathogen can evade the host immune system, enabling it to survive and replicate within host cells. It can multiply within both professional phagocytes and non-professional phagocytes. However, professional phagocytes, such as dendritic cells, macrophages, and neutrophils, are more efficient at eliminating the ingested *Brucella* [2].

4.11. Infection of Mice with B. abortus and Mice Treatment with 3-AT

Seven-week-old female ICR mice were purchased from Samtako (Osan, Republic of Korea). The animal experiment protocol in this study was approved by the Animal Ethical Committee of Chonbuk National University (authorization number: CBNU-2021-037). After one week of acclimation, mice were administered 3-AT via oral gavage at a dose of 400 mg/kg/day or 600 mg/kg/day three days before infection. PBS was used as a control. For infection, mice were intraperitoneally injected with 2×10^5 CFUs of *B. abortus* or PBS. Mice were treated with 3-AT or PBS according to a schedule of two consecutive days of treatment, followed by a one-day rest, for 12 days pi. Mice were sacrificed on the 12th day pi for heart blood, spleen, and liver collection. Collected organs were homogenized in 1 mL of PBS to examine the *B. abortus* growth in the mouse tissues within these organs. Serial dilution of homogenates was prepared in PBS and plated on the *Brucella* agar plate. Colonies were enumerated after 72 h incubation at 37 °C. The number of CFUs was subjected to log10 base. The collected blood was subjected to serum cytokine measurement and CD4$^+$/CD8$^+$ T-cell population differentiation experiment 4.12 with serum cytokine measurement.

The serum was obtained by centrifuging blood at 2000 rpm at 4 °C for 10 min. The concentrations of cytokines, including TNF-α, INF-γ, IL-6, IL-12p70, IL-10, and MCP-1, were measured using a CBA mouse inflammation kit, following the manual instruction. Data were acquired and analyzed using a BD FACVerse flow cytometer and FCAP array software (Version 3.0, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

4.12. CD4+/CD8+ T-Cell Ratio in Peripheral Blood

The ratio of differential CD4$^+$/CD8$^+$ T cells was defined in 100 µL of blood. Blood was incubated with a 75 µL mixture of PE-conjugated rat anti-mouse CD8a monoclonal antibodies and CD4 monoclonal antibodies in 1% BSA for 30 min in the dark at RT. The red blood in the mixture was lysed by adding 2 mL of red blood cell lysis buffer and incubated for 10 min. Three milliliters of PBS was added to terminate the lysis reaction. White blood cells were then collected by centrifuging at 380× *g* for 5 min, washed twice with 3 mL of PBS, and suspended in 0.5 mL PBS. White blood cells were analyzed using a BD FACVerse flow cytometer to determine the populations of CD4$^+$ and CD8$^+$ T cells, and the CD4$^+$/CD8$^+$ T-cell ratio was analyzed using BD FACSuite software (version 1.2.1, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)

4.13. Statistical Analysis

The data are presented as the mean ± standard deviation. Statistical analysis was conducted using an unpaired Student's *t*-test through GraphPad Instat (version 3.00, GraphPad Software, Boston, MA, USA). Significance levels were denoted as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$, indicating the statistically significant differences between the groups.

Author Contributions: Conceptualization and study conception, planning experiments, data analysis, and interpretation, T.T.N., C.N.T.A. and T.X.N.H.; methodology and validation, T.T.N., T.X.N.H. and S.A.S.; figure preparation, T.T.N.; statistical analysis, T.T.N.; data analysis and discussion, W.-G.M., H.-J.L. and J.-H.L.; writing—original draft preparation, T.T.N. and T.X.N.H.; writing—review and editing, A.W.B.R., T.X.N.H. and H.-J.K.; supervision, S.K.; project administration, S.K.; funding acquisition, S.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through the Animal Disease Management Technology Development Program, funded by the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (122001021SB0106138211653000).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

pISSN 2287-7991, eISSN 2287-8009
J. Prev. Vet. Med. Vol. 47, No. 4: 171-178, December 2023
https://doi.org/10.13041/jpvm.2023.47.4.171

Combination of recombinant *Brucella abortus* dapB and gpm proteins induces host immunity against *B. abortus* 544 infection using a mouse model

Tran Xuan Ngoc Huy[1], Alisha Wehdnesday Bernardo Reyes[2], Ched Nicole Turbela Aguilar[1], Trang Thi Nguyen[1], Said Abdi Salad[1], Hu Jang Lee[1], Jin Hur[3], Dong-Kwan Lee[4], Suk Kim[1]*

[1]Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, 52828, Korea
[2]Department of Veterinary Paraclinical Sciences, College of Veterinary Medicine, University of the Philippines Los Baños, Laguna 4031, Philippines
[3]College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Iksan, 54596, Korea
[4]College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, 34134, Korea

Abstract: The primary therapeutic approach for *Brucella* species infections has mainly been based on antibiotic treatment. However, the development of vaccines for brucellosis control remains controversial. Furthermore, there is currently no licensed vaccine available for human brucellosis. This study aims to evaluate the effect of a combination of recombinant protein vaccines against *Brucella* (*B.*) *abortus* infection using a mouse model. Two *B. abortus* genes, namely *dapB* and *gpm*, were cloned and expressed in competent *Escherichia* (*E.*) *coli* DH5α using the pCold-TF vector. Successfully cloned vectors were subjected to PCR amplification using specific primer pairs. The apparent sizes of *dapB* and *gpm* were detected at 807 bp and 621 bp, respectively. Besides, the purified recombinant proteins dapB and gpm were detected using SDS-PAGE electrophoresis with correct sizes of 82.86 kDa and 87.61 kDa, respectively. These recombinant proteins were used to immunize mice as a combined subunit vaccine (CSV) to elicit host immunity against *B. abortus* infection. Mice immunized with CSV exhibited increased proliferation of $CD4^+$ and/or $CD8^+$ T cells at week 7th and 9th before sacrifice, in comparison to the control group. Notably, CSV immunization showed a significant decrease in bacterial burden in the spleen compared to the control group. Altogether, CSV using dapB and gpm induced host adaptive immune response against *Brucella* infection, suggesting its potential as an effective new subunit vaccine candidate.
Key words: *B. abortus*, *dapB* gene, *gpm* gene, Subunit vaccine, T cell proliferation, Immunity

INTRODUCTION

Brucellosis is one of the major zoonotic diseases, also known as "Mediterranean fever", or "Malta fever". The disease is caused by *Brucella* spp., which are facultative intracellular Gram-negative bacteria. To date, *Brucella* comprises twelve species, each with specific host preferences. These species have infected a wide range of hosts, from terrestrial mammals to marine mammals, including *B. melitensis* (goats, sheep and camels), *B. abortus* (cattle and buffaloes), *B. canis* (dogs), *B. suis* (pigs, hares, wild boars, reindeers and rodents), *B. ovis* (sheep), *B. neotomae* (desert woodrats), *B. microti* (common vole), *B. inopinata* (human), *B. papionis* (baboons), *B. vulpis* (foxes), *B. pinnipedialis* (seals, sea lions and walruses), and *B. ceti* (whales, porpoises and dolphins) [6, 21, 23]. In animals, brucellosis can be transmitted through skin penetration, exposure to animal discharges, ingestion of contaminated feed, infection from an infected fetus in the uterus, or immunization with live attenuated *Brucella* vaccines. Transmission of brucellosis to humans can occur through ingestion of contaminated dairy foods and direct exposure to infected animal tissues, blood, urine and aborted fetuses. Besides, occupational aerosol infection or accidental inoculation of live vaccines is also a possibility [1, 9]. The characteristics of intracellular growth of the pathogen in the preferred sites pose a challenge in brucellosis treatment. The current approach for the treatment depends on the use of antibiotics such as doxycycline, rifampicin, aminoglycosides (streptomycin or gentamicin) and quinolones (ciprofloxacin or ofloxacin) in single or specific combination depending on ages, infectious period, treatment duration and doses [4, 6]. On the other hand, vaccines continue to effectively contribute to controlling and preventing brucellosis. Live attenuated

•Received 09 November 2023, Revised 28 November 2023, Accepted 01 December 2023
*Corresponding Author. Suk Kim. Tel: +82-55-772-2389, Fax: +82-55-772-2349, E-mail: kimsuk@gnu.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/.

dihydrodipicolinate reductase (dapB) had a function related to amino acid transport and metabolism, while phosphoglyceromutase (gpm) functioned in carbohydrate transport and metabolism. They were both identified as immunoreactive proteins against *B. abortus*-positive bovine antisera. Indeed, gpm was not only a key enzyme in the Embden-Meyerhof pathway but also an effector contributing to heat sensitivity in *Treponema pallidum* [3]. Meanwhile, dapB was proven as an anti-tuberculosis drug target since it is known to be involved in cell wall biosynthesis as well as playing essential roles in the intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* [2]. Because of these crucial characteristics of these two proteins in *Brucella* or other bacteria, we next carried out the *in vivo* experiment using a mouse model to evaluate their effects on the stimulation of host immunity. $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes were demonstrated to display a wide range of adaptive immune responses against *Brucella* infection, including producing IFN-γ and capable of cytolytic activity [17, 19]. Notably, dapB and gpm were proven to activate Th1 and Th2 immunity in the context of *Brucella* infection as subunit vaccine candidates [16]. Furthermore, immunization with other *B. abortus* recombinant proteins such as Omp16, Omp19, Omp31, and L7/L12 also substantially activated $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells, contributing to control brucellosis [5, 14, 22]. Consistently, our results indicated that CSV using recombinant proteins dapB and gpm significantly activated $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells after the last vaccination compared to the control group. By effectively inducing cellular immunity, the results in this study showed that this CSV enhanced the protective efficiency against *B. abortus* infection. On the other hand, the result in the present study was similar to previous publication which also reported a higher level of protective efficiency exhibited by the vaccine strain RB51 against *B. abortus* in BALB/c mice. However, in the current study, the differentiation of T cells was not positively affected by RB51 vaccination. In fact, the vaccine strain RB51 is well-known to induce strong Th1 immune responses as well as the production of antibodies, leading to the opsonization of bacteria, which favored the elimination of intracellular bacteria [8, 18, 24].

Brucella is an intracellular bacterium and treating this type of bacteria with antibiotics can be challenging due to the limited ability of current antibiotics to effectively penetrate intracellular environments. Therefore, given the challenges of treating intracellular bacteria such as *Brucella* with antibiotics, it is advisable to prioritize therapies that stimulate host immunity as a preferable approach. This study demonstrated the efficacy of two recombinant *B. abortus* proteins, specifically dapB and gpm, as a CSV in stimulating the host cellular immunity with mild protection in controlling *Brucella* infection. Nonetheless, it is recommended to conduct further experiments related to *in vitro* evaluation, host innate immunity, or humoral immunity to provide a more comprehensive understanding of the effects of these recombinant proteins as potential subunit vaccine candidates. Moreover, optimization of vaccine doses, antigenic components with a combination of different adjuvants, and administration routes also should be carried out. These additional experiments would be helpful in clarifying the efficacy and suitability of the CSV used in the present study in combating *Brucella* infections.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Animal Disease Management Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (122001021SB0106138 2116530000).

REFERENCES

1. **Addis M**. Public health and economic importance of brucellosis: A review. Public Health. 2015, 5(7): 68-84.
2. **Angrish N, Lalwani N, Khare G**. In silico virtual screening for the identification of novel inhibitors against dihydrodipicolinate reductase (DapB) of *Mycobacterium tuberculosis*, a key enzyme of diaminopimelate pathway. Microbiol Spectr. 2023, 2023: e01359-01323.
3. **Benoit Sp, Posey JE, Chenoweth MR, Gherardini FC**. *Treponema pallidum* 3-phosphoglycerate mutase is a heat-labile enzyme that may limit the maximum growth temperature for the spirochete. J Bacteriol. 2001, 183(16): 4702-4708.
4. **Bosilkovski M, Keramat F, Arapović J**. The current therapeutical strategies in human brucellosis. Infection. 2021, 49(5): 823-832.
5. **Cassataro J, Estein SM, Pasquevich KA, Velikovsky CA, de la Barrera S, Bowden R, Fossati CA, Giambartolomei GH**. Vaccination with the recombinant *Brucella* outer

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	한국식품영양과학회	김현진	2022.10.20	제주 컨벤션센터	대한민국
2	한국식품과학회	이정은	2022.07.08	부산 벡스코	대한민국
3	한국식품위생안전성학회	이정은	2022.11.11	부산 벡스코	대한민국
5	한국예방수의학회	김석	2023.07.08	충남대학교	대한민국
6	한국예방수의학회	김석	2023.07.08	충남대학교	대한민국
7	한국예방수의학회	김석	2023.07.08	충남대학교	대한민국

P02-126 Active ingredient analysis and Stability evaluation of Raw and Dried Deer Antler (*Cervus elaphus* L.) extracts
Min-Ju Kim[*], Ramakrishna Chilakala, Hyeonjoeng Moon, Kangho Ko, Jinsol Ra, Seongheon Jeong, Yeji Cheon, Sun Hee Cheong. Department of Marine Bio Food Science, College of Fisheries and Ocean Science, Chonnam National University

P02-127 Development of a new diagnostic method for Brucella
Bo-Min Kim[1], Ju-Hong Oh[1], Suk Kim[2], Won-Bo Shim[3], Hyun-Jin Kim[1,2*]. [1]EZmass, Corp., [2]College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, [3]Department of Food Science and Technology & Division of Applied Life Sciences (BK21 Four), Gyeongsang National University

P02-128 Influence of boiling and acid treatment on removal of arsenic and sodium of green algae, Codium fragile
Yunjin Lim[1*], Joon Ho Hong[1], Mi Jin Lee[1], Seul Hee Han[2], Seul Ah Lee[2], Chun Sung Kim[2,3]. [1]Nano-Bio Research Center, Jeonnam Bioindustry Foundation, [2]Marine Healthcare Research & Evaluation Center, Chosun University, [3]Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

P02-129 Comparison of components of total phytochemicals of Korean seaweed extracts
Yunjin Lim[1*], Joon Ho Hong[1], Mi Jin Lee[1], Seul Ah Lee[2], Chun Sung Kim[2,3]. [1]Nano-Bio Research Center, Jeonnam Bioindustry Foundation, [2]Marine Healthcare Research & Evaluation Center, Chosun University, [3]Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

P02-130 A study on the arsenic removal of brown algae, *Sargassum fusiforme* using boil-cooking and acid treatment
Mi Jin Lee, Yunjin Lim, Daun Kim, Joon Ho Hong*. Nano-Bio Research Center, Jeonnam Bioindustry Foundation

P02-131 Quality characterization of wine jelly using various mixed gelling agents
Seo-Yeon Choi[1*], Jong-Won Lee[2], Seung-Seok Yoo[3]. [1]Department of Culinary & Food Service Management, Sejong University, [2]Department of Food Science and Biotechnology and Carbohydrate Bioproduct Research Center, Sejong University

P02-132 QuEChERS 잔류농약 다성분 동시분석법을 이용한 국내산 해조류의 잔류농약 모니터링
김다운[1], 홍준호[2*], 이미진[1], 임윤진[1], 이슬아[1], 김춘성[2,3], [1](재)전남바이오산업진흥원 나노바이오연구센터, [2]조선대학교 해양헬스케어유효성분증지원센터, [3]조선대학교 치의예과

P02-133 Galbitang characteristics according to the amount of licorice powder added
Jong-Won Lee[1*], Ya-Chan Kim[2]. [1]Department of Food Science and Biotechnology and Carbohydrate Bioproduct Research Center, Sejong University, [2]Department of Culinary & Food Service Management, Sejong University

P02-134 Physicochemical Characteristics of Three Varieties of Barley Grown in the Cultivated Area or the Cultivation Limit Area
Jihye Song[1*], Hakyoung Oh[1], Dae-Wook Kim[2], Jong-Tak Yoon[2], Kwang-Yeol Yang[1]. [1]Department of Applied Biology, College of Agriculture and Life Science, Chonnam National University, [2]Crop Production and Physiology Division, National Institute of Crop Science, RDA

P02-135 Pre-column derivatization HPLC를 이용한 국내산 해조류 유래 다당류의 단당체 구성 및 조성에 관한 연구
홍준호[1*], 임윤진[1], 이미진[1], 이슬아[1], 김춘성[2,3], [1](재)전남바이오산업진흥원 나노바이오연구센터, [2]조선대학교 해양헬스케어유효성분증지원센터, [3]조선대학교 치의예과

P02-136 Biogenic Amines in Agricultural, Livestock, Marine Products in Korea: Approaches of Total Diet Study with the consideration of food processing
Ki Won Lee[1*], Jin Song Shin[1], Ji In You[2], Jun Hyuk Choi[2], Young Hun Jin[1], Jong Hyoung Hong[1], Sohyeon Kim[1], Dabin Kim[1], Jae-Hyung Mah[1], Jo-Won Lee[2], Bokyung Moon[2], Myung-Sub Chung[4], Tae Jin Cho[3]. [1]Department of Food and Biotechnology, College of Science and Technology, Korea University, [2]Department of Biotechnology, College of Life Sciences & Biotechnology, Korea University, [3]Department of Food and Nutrition, Chung-Ang University, [4]Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University

P02-137 Effective follow-up management method through comparative analysis of HACCP systems

2022 KFN International Symposium and Annual Meeting

New Frontiers for Green Biotechnology in Food Science and Nutrition

Oct. 19 (Wed) – 21 (Fri), 2022
ICC JEJU, Jeju Island, Korea

CARVING A NEW ERA IN FOOD SCIENCE & BIOTECHNOLOGY

Eun Her[1*], Md. Ashrafudoulla[1], Senakpon Isaie Ulrich Mevo[1], Md. Anamul Hasan Chowdhury[1], Shamsun Nahar[1], Md. Furkanur Rahaman Mizan[1], Sang-Do Ha[1]
[1]*Chung-Ang University, Korea*

P10-115 **The application of bacteriophage to control *Cronobacter sakazakii* planktonic and biofilm growth in infant formula milk**
Byoung-hu Kim[1*], Md. Ashrafudoulla[1], Senakpon Isaie Ulrich Mevo[1], Md. Anamul Hasan Chowdhury[1], Shamsun Nahar[1], Md. Furkanur Rahaman Mizan[1], Sang-Do Ha[1]
[1]*Chung-Ang University, Korea*

P10-116 **Quantitative and qualitative microbiological analysis of fishery and processed-fishery products frequently consumed in South Korea**
Ji Seop Song[1*], Young Hoon Lee[1], Eunjin Choi[2], Hary Yu[3], Min Suk Rhee[3], Sun Ae Kim[2], Tae Jin Cho[1]
[1]*Department of Food and Biotechnology, Korea University, Korea,* [2]*Department of Food Science and Biotechnology, Ewha Womans University, Korea,* [3]*Department of Biotechnology, Korea University, Korea*

P10-117 **Comparison of reduction effect of 'Green vin' as a disinfectant against *Escherichia coli, Staphylococcus aureus,* and *Bacillus cereus***
Seh Eun Kim[1*], Kyung Sik Park[1], Jin-Hyun Kim[1], Won Kim[2], Seung-Hyeon Jung[1]
[1]*Food Safety Center, Ottogi Corporation, Korea,* [2]*R&D Center, Ottogi Corporation, Korea*

P10-118 **In-package cold plasma effect on the pathogen growth and microbiome in mixed vegetable salad in hydrogen peroxide pad-attached plastic container and on the concentration of endocrine-disrupting compounds from the container**
Hye Won Lee[1*], Sea Cheol Min[1]
[1]*Department of Food Science and Technology, Seoul Women's University, Korea*

P10-119 **The development of multiplex fluorescence LAMP (mfLAMP) for simultaneous detection of *mecA* and *spa* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***
Jeong-Eun Lee[1*], Sazzard Hossen Toushik[1], Sol-A Kim[2], Dong-Hyun Kim[2], Won-Bo Shim[1,3,4]
[1]*Institute for Smart Farm, Gyeongsang National University, Korea,* [2]*Division of Applied Life Science, Graduate School, Gyeongsang National University, Korea,* [3]*Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Korea,* [4]*Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Korea*

P10-120 **Antibiofilm effects of quercetin against *Salmonella enterica* biofilm formation and molecular mechanism on food and food-contact surfaces**

P4-35

Growth Analysis of Indicator Bacteria and Foodborne Pathogens According to the Raw Materials and Fermentation Period in Salted Shrimp

Jeeyeon Lee[1], Hyun Jin Cho[1], Minkyoung Ryu[1], Yeongsil Lim[1], Heeyoung Lee[2], Sunhyun Park[2,3], You-Shin Shim[1*]
[1]*Department of Food & Nutrition, Dong-eui University, Busan 47340, Korea*
[2]*Food Standard Research Center, Korea Food Research Institute, Wanju 55365, Korea*
[3]*Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea*

As most of the traditional fermented foods in Korea are produced by small-scale companies, research on safety and standardized production processes is limited. Accordingly, this study aimed to obtain basic data for safety and production standardization by analyzing the growth of indicator bacteria and foodborne pathogens based on the raw materials and fermentation period of salted shrimp. Salted shrimp (6 types) manufactured from products harvested in May, June, and autumn were provided by a domestic salted shrimp company and stored at 15℃ for fermentation. Samples we examined for indicator bacteria (total aerobic bacteria [TAB], coliforms, and Escherichia coli) and foodborne pathogens (Staphylococcus aureus and Vibrio spp.) every 2-3 days until the 2nd week of fermentation. A sample under fermentation at 15℃ was aseptically transferred to a sterile filter bag with 30 mL of sterile saline added, and homogenized for 2 min. The 1 mL of the homogenate was appropriately diluted in sterile saline, spread on a selective medium for each bacterium, and aerobically incubated at 37℃ for 24 h. In the case of TAB, there was no difference in growth by sample and fermentation period, with an average of 3.2 Log CFU/g (minimum 2.4 Log CFU/g, maximum 4.0 Log CFU/g) observed. Vibrio spp. mainly exist in seawater and seafood, and presumptive Vibrio colonies were detected at an average level of 1.3 Log CFU/g (minimum 0.6 Log CFU/g, maximum 3.0 Log CFU/g). Presumptive coliform, E. coli, and S. aureus colonies were below the detection limit (< 0.6 Log CFU/g) in all samples. It is expected that these results will be used as a basis to ensure the safety of salted shrimp, and to develop standardized production processes in small-scale companies.

P4-36

Development of multiplex fluorescence loop-mediated isothermal amplification based on lateral flow assay (mfLAMP-LFA) for simultaneous detection of mecA and spa genes in Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)

Jeong-Eun Lee[1], Sazzad Hossen Toushik[1], Sol-A Kim[2], Dong-Hyun Kim[2], Song-Min Lee[4], Won-Bo Shim[1,3,4*]
[1]*Institute for Smart Farm, Gyeongsang National University, Korea*
[2]*Division of Applied Life Science, Graduate School, Gyeongsang National University, Korea*
[3]*Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Korea*
[4]*Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Korea*

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is an important nosocomial and community pathogen worldwide. Although its incidence has recently declined in some regions, MRSA still poses a formidable clinical threat, with persistently high morbidity and mortality. Therefore, there is a great demand to develop a rapid, low-cost, and accurate detection assay to prevent the spreading of MRSA. In this study, we designed multiplex fluorescence loop-mediated isothermal amplification based on lateral flow assay (mfLAMP-LFA) that can simultaneously detect spa and *mecA* genes as a *S. aureus*-specific marker and a PBP2a-specific marker, respectively for the rapid identification of MRSA. Sensitive and specificity of the mfLAMP-LFA were investigated, and the method was validated with artificially contaminated agricultural water samples with known amounts of MRSA (10^0–10^7 CFU/ml). The detection limit of the mfLAMP-LFA optimized at 62℃ was 10^0 CFU/ml, and the method was confirmed to be specific to MRSA. The cut-off value of the method for the artificially inoculated agricultural water samples was 10^0 CFU/mL. This study suggests that the mfLAMP-LFA for MRSA is expected to be used as a point-of-care molecular diagnostic technology.

3. The effects of Barbadin treatment during Brucella abortus virulent strain 544 infection in RAW 264.7 cells and ICR mice
Ched Nicole Turbela Aguilar, Trang Thi Nguyen, Tran Xuan Ngoc Huy, Said Abdi Salad, Suk Kim 68

4. The effects of five plant extracts on Brucella abortus 544 survivability in axenic culture condition and Brucella abortus 544 infection in RAW 264.7 macrophage cell line
Said Abdi Salad, Tran Xuan Ngoc Huy, Trang Thi Nguyen, Ched Nicole Turbela Aguilar, Suk Kim 69

5. Effects of DNA starvation/stationary phase protection protein of virulent strain Brucella abortus 544 on its survivability and intracellular growth within macrophage cell line
Tran Xuan Ngoc Huy, Trang Thi Nguyen, Ched Nicole Turbela Aguilar, Said Abdi Salad, Suk Kim 70

6. Catalase activity mediated intracellular growth inhibition and host immune modulation of 3-amino-1,2,4-triazole in murine brucellosis
Trang Thi Nguyen, Tran Xuan Ngoc Huy, Ched Nicole Turbela Aguilar, Said Abdi Salad, Suk Kim 71

7. Efficacy evaluation of the chlorhexidine-inactivated *Salmonella* Enteritidis, *S.* Gallinarum, and *S.* Typhimurium in a chicken model
Yeong Ju Yu, Jeong Hee Yu, Jin Hur 72

8. Protective efficacy of the recombinant modified Stx2e toxoid against porcine edema disease in post weaning piglets of Korea
Jeong Hee Yu, Yeong Ju Yu, Jin Hur 73

9. Prevalence and characterization of *Cryptosporidium*, *Cystoisospora* and *Giardia* from cats in South Korea
Chi Sun YUN, Bo-youn Moon, Jae-Won Byun, Bok-Kyung Ku, Mi-Hye Hwang 74

10. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Cystoisospora* and *Giardia* from dogs in South Korea
Chi Sun YUN, Bo-youn Moon, Jae-Won Byun, Bok-Kyung Ku, Mi-Hye Hwang 75

11. The inhibition of prion fibriliation by resveratrol using RT-QuIC assay
Hyun Joo Sohn, Yu-Ran Lee, Kyung Je Park, Hoo-Chang Park, Hae Eun Kang 76

12. Serological monitoring of rabies in Korea in 2020-2022
A-Rang Lee, Hye-Young Jeoung, Bok-Kyung Ku, Kyoung-Ki Lee 77

13. Ethylene glycol toxicosis in cats by antifreeze ingestion
Ah-Young Kim, Namhee Moon, Bok-Kyung Ku, Suncheun Kim, Kyung Hyun Lee 78

14. Pathological findings and phylogenetic analysis of winter dysentery cases caused by Bovine coronavirus in Korean native cattle
Eun-Mi Kim, Jongho Kim, Hyun-Kyoung Lee, Hye-Young Jeoung, Bok-Kyung Ku, You-Chan Bae 79

P-03

The effects of Barbadin treatment during Brucella abortus virulent strain 544 infection in RAW 264.7 cells and ICR mice

Ched Nicole Turbela Aguilar, Trang Thi Nguyen, Tran Xuan Ngoc Huy, Said Abdi Salad, Suk Kim*

Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, 52828, Republic of Korea

Brucella abortus infection poses a threat to the health of humans and animals. Brucellosis is continually being studied in an attempt to find a cure or control it. The purpose of this study was to determine if Barbadin, an inhibitor of the B-arrestin/AP2B1 complex, has an effect on Brucella abortus infection in vitro and in vivo. Firstly the cytotoxic effects of Barbadin on RAW 264.7 cells was evaluated. 75 μM was the highest non-cytotoxic concentration hence this concentration was used for the succeeding experiments including the in vivo test. Secondly, the internalization and intracellular replication in macrophages were investigated. The uptake of Brucella into RAW 264.7 cells was reduced by Barbadin at concentrations of 0.75 and 7.5 μM 30 min after infection, however it did not affect Brucella's growth within cells. This finding suggests that it may affect Brucella infection at the early stage. After 24 h and 48 h infection, nitric oxide production was reduced, but the differences were not statistically significant. Barbadin-treated mice had less weight and bacterial load in their spleen and liver compared to control mice; However, it is not statistically significant. At 7- and 14-days post-infection, serum levels of TNF-α and IFN-γ in the treated-group were also lower than the control group. The reduction of these cytokines suggests a potential anti-inflammatory effect of Barbadin. Overall, the results show that treatment with Barbadin reduced the amount of internalized Brucella abortus, suggesting a potential alternative for managing brucellosis.

3/5

3. The effects of Barbadin treatment during Brucella abortus virulent strain 544 infection in RAW 264.7 cells and ICR mice
Ched Nicole Turbela Aguilar, Trang Thi Nguyen, Tran Xuan Ngoc Huy, Said Abdi Salad, Suk Kim 68

4. The effects of five plant extracts on Brucella abortus 544 survivability in axenic culture condition and Brucella abortus 544 infection in RAW 264.7 macrophage cell line
Said Abdi Salad, Tran Xuan Ngoc Huy, Trang Thi Nguyen, Ched Nicole Turbela Aguilar, Suk Kim 69

5. Effects of DNA starvation/stationary phase protection protein of virulent strain Brucella abortus 544 on its survivability and intracellular growth within macrophage cell line
Tran Xuan Ngoc Huy, Trang Thi Nguyen, Ched Nicole Turbela Aguilar, Said Abdi Salad, Suk Kim 70

6. Catalase activity mediated intracellular growth inhibition and host immune modulation of 3-amino-1,2,4-triazole in murine brucellosis
Trang Thi Nguyen, Tran Xuan Ngoc Huy, Ched Nicole Turbela Aguilar, Said Abdi Salad, Suk Kim 71

7. Efficacy evaluation of the chlorhexidine-inactivated *Salmonella* Enteritidis, *S.* Gallinarum, and *S.* Typhimurium in a chicken model
Yeong Ju Yu, Jeong Hee Yu, Jin Hur 72

8. Protective efficacy of the recombinant modified Stx2e toxoid against porcine edema disease in post weaning piglets of Korea
Jeong Hee Yu, Yeong Ju Yu, Jin Hur 73

9. Prevalence and characterization of *Cryptosporidium*, *Cystoisospora* and *Giardia* from cats in South Korea
Chi Sun YUN, Bo-youn Moon, Jae-Won Byun, Bok-Kyung Ku, Mi-Hye Hwang 74

10. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Cystoisospora* and *Giardia* from dogs in South Korea
Chi Sun YUN, Bo-youn Moon, Jae-Won Byun, Bok-Kyung Ku, Mi-Hye Hwang 75

11. The inhibition of prion fibriliation by resveratrol using RT-QuIC assay
Hyun Joo Sohn, Yu-Ran Lee, Kyung Je Park, Hoo-Chang Park, Hae Eun Kang 76

12. Serological monitoring of rabies in Korea in 2020-2022
A-Rang Lee, Hye-Young Jeoung, Bok-Kyung Ku, Kyoung-Ki Lee 77

13. Ethylene glycol toxicosis in cats by antifreeze ingestion
Ah-Young Kim, Namhee Moon, Bok-Kyung Ku, Suncheun Kim, Kyung Hyun Lee 78

14. Pathological findings and phylogenetic analysis of winter dysentery cases caused by Bovine coronavirus in Korean native cattle
Eun-Mi Kim, Jongho Kim, Hyun-Kyoung Lee, Hye-Young Jeoung, Bok-Kyung Ku, You-Chan Bae 79

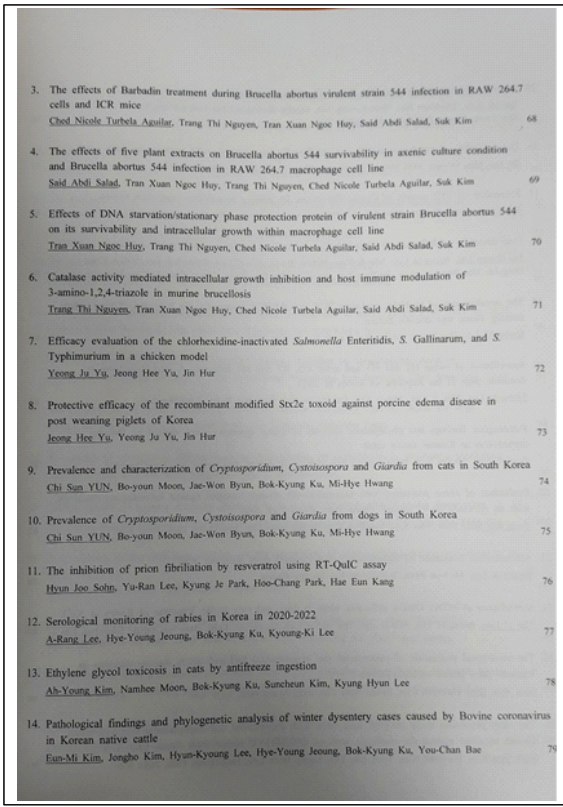
P-05

Effects of DNA starvation/stationary phase protection protein of virulent strain Brucella abortus 544 on its survivability and intracellular growth within macrophage cell line

Tran Xuan Ngoc Huy, Trang Thi Nguyen, Ched Nicole Turbela Aguilar, Said Abdi Salad, Suk Kim*

Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, 52828, Republic of Korea

IBrucella abortus (B. abortus), a causative agent of brucellosis, has the ability to survive and replicate within professional and non-professional phagocytes resulting in chronic disease. The role of the DNA starvation/stationary phase protection protein (Dps) in modulating B. abortus growth and infection has not been evaluated so far. Firstly, iron supplementation promoted free-living B. abortus growth in using the bactericidal effect assay. This result suggested that B. abortus Dps related to ferrous oxidation and ferric storage. Moreover, Dps contributed to B. abortus resistance to oxidative stress which was demonstrated by exposure of wild-type or dps mutant B. abortus (Δdps B. abortus) with different concentrations of H2O2 in three days. Secondly, the result of the infection assay showed that Δdps B. abortus failed to grow in macrophages compared to the wild-type B. abortus infection. The B. abortus Dps localization in macrophages after a time-course infection was tested by using the immunoblotting analysis. Notably, B. abortus Dps was found in phagosomal and predominantly in cytosolic but not nuclear fraction. An independent analysis with immunofluorescence assay at 12-hour post-infection also showed the presence of Dps in macrophage cytosol. In addition, ROS plays an important role in controlling B. abortus in macrophages. Interestingly, Δdps B. abortus-infected macrophages induced remarkable ROS production at 12-hour post-infection. In summary, this study demonstrated that Dps was crucial for B. abortus survival in macrophages as well as an essential effector for B. abortus survivability in axenic culture conditions.



3. The effects of Barbadin treatment during Brucella abortus virulent strain 544 infection in RAW 264.7 cells and ICR mice
Ched Nicole Turbela Aguilar, Trang Thi Nguyen, Tran Xuan Ngoc Huy, Said Abdi Salad, Suk Kim 68

4. The effects of five plant extracts on Brucella abortus 544 survivability in axenic culture condition and Brucella abortus 544 infection in RAW 264.7 macrophage cell line
Said Abdi Salad, Tran Xuan Ngoc Huy, Trang Thi Nguyen, Ched Nicole Turbela Aguilar, Suk Kim 69

5. Effects of DNA starvation/stationary phase protection protein of virulent strain Brucella abortus 544 on its survivability and intracellular growth within macrophage cell line
Tran Xuan Ngoc Huy, Trang Thi Nguyen, Ched Nicole Turbela Aguilar, Said Abdi Salad, Suk Kim 70

6. Catalase activity mediated intracellular growth inhibition and host immune modulation of 3-amino-1,2,4-triazole in murine brucellosis
Trang Thi Nguyen, Tran Xuan Ngoc Huy, Ched Nicole Turbela Aguilar, Said Abdi Salad, Suk Kim 71

7. Efficacy evaluation of the chlorhexidine-inactivated *Salmonella* Enteritidis, *S.* Gallinarum, and *S.* Typhimurium in a chicken model
Yeong Ju Yu, Jeong Hee Yu, Jin Hur 72

8. Protective efficacy of the recombinant modified Stx2e toxoid against porcine edema disease in post weaning piglets of Korea
Jeong Hee Yu, Yeong Ju Yu, Jin Hur 73

9. Prevalence and characterization of *Cryptosporidium*, *Cystoisospora* and *Giardia* from cats in South Korea
Chi Sun YUN, Bo-youn Moon, Jae-Won Byun, Bok-Kyung Ku, Mi-Hye Hwang 74

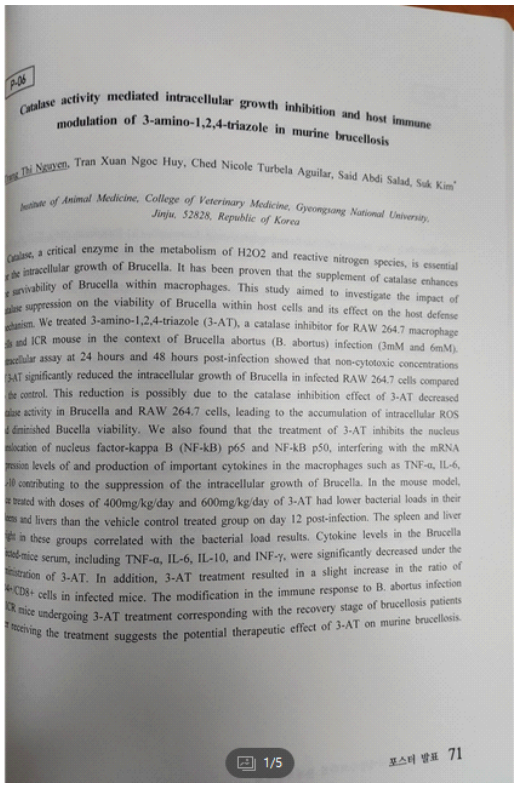
10. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Cystoisospora* and *Giardia* from dogs in South Korea
Chi Sun YUN, Bo-youn Moon, Jae-Won Byun, Bok-Kyung Ku, Mi-Hye Hwang 75

11. The inhibition of prion fibriliation by resveratrol using RT-QuIC assay
Hyun Joo Sohn, Yu-Ran Lee, Kyung Je Park, Hoo-Chang Park, Hae Eun Kang 76

12. Serological monitoring of rabies in Korea in 2020-2022
A-Rang Lee, Hye-Young Jeoung, Bok-Kyung Ku, Kyoung-Ki Lee 77

13. Ethylene glycol toxicosis in cats by antifreeze ingestion
Ah-Young Kim, Namhee Moon, Bok-Kyung Ku, Suncheun Kim, Kyung Hyun Lee 78

14. Pathological findings and phylogenetic analysis of winter dysentery cases caused by Bovine coronavirus in Korean native cattle
Eun-Mi Kim, Jongho Kim, Hyun-Kyoung Lee, Hye-Young Jeoung, Bok-Kyung Ku, You-Chan Bae 79



P-06

Catalase activity mediated intracellular growth inhibition and host immune modulation of 3-amino-1,2,4-triazole in murine brucellosis

ang Thi Nguyen, Tran Xuan Ngoc Huy, Ched Nicole Turbela Aguilar, Said Abdi Salad, Suk Kim*

Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, 52828, Republic of Korea

Catalase, a critical enzyme in the metabolism of H2O2 and reactive nitrogen species, is essential e the intracellular growth of Brucella. It has been proven that the supplement of catalase enhances e survivability of Brucella within macrophages. This study aimed to investigate the impact of talase suppression on the viability of Brucella within host cells and its effect on the host defense chanism. We treated 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT), a catalase inhibitor for RAW 264.7 macrophage ls and ICR mouse in the context of Brucella abortus (B. abortus) infection (3mM and 6mM). tracellular assay at 24 hours and 48 hours post-infection showed that non-cytotoxic concentrations 3-AT significantly reduced the intracellular growth of Brucella in infected RAW 264.7 cells compared the control. This reduction is possibly due to the catalase inhibition effect of 3-AT decreased talase activity in Brucella and RAW 264.7 cells, leading to the accumulation of intracellular ROS d diminished Bucella viability. We also found that the treatment of 3-AT inhibits the nucleus nslocation of nucleus factor-kappa B (NF-kB) p65 and NF-kB p50, interfering with the mRNA pression levels of and production of important cytokines in the macrophages such as TNF-α, IL-6, -10 contributing to the suppression of the intracellular growth of Brucella. In the mouse model, e treated with doses of 400mg/kg/day and 600mg/kg/day of 3-AT had lower bacterial loads in their eens and livers than the vehicle control treated group on day 12 post-infection. The spleen and liver ght in these groups correlated with the bacterial load results. Cytokine levels in the Brucella ected-mice serum, including TNF-α, IL-6, IL-10, and INF-γ, were significantly decreased under the nistration of 3-AT. In addition, 3-AT treatment resulted in a slight increase in the ratio of 4+CD8+ cells in infected mice. The modification in the immune response to B. abortus infection CR mice undergoing 3-AT treatment corresponding with the recovery stage of brucellosis patients r receiving the treatment suggests the potential therapeutic effect of 3-AT on murine brucellosis.

1/5

포스터 발표 71

□ 기술 요약 정보

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

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 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	소브루셀라균 검출을 위한 고리매개등온증폭법 기반 측방유동스트립	대한민국	심원보, 이정은	2024.03.29	10-2024-0043285					100	활용

관 인 생 략

출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자 2024.03.29
특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)
출 원 번 호 10-2024-0043285 (접수번호 1-1-2024-0354566-09)
(DAS접근코드8B57)
출원인 명칭 경상국립대학교산학협력단(2-2004-010719-4)
대리인 성명 최규환(9-2005-001504-0)
발명자 성명 심원보 이정은
발명의 명칭 소 브루셀라균 검출을 위한 고리매개등온증폭법 기반 측방유동스트립

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
※ 심사제도 안내 : https://www.kipo.go.kr-지식재산제도

o 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		

210mm×297mm[(백상지(80g/m^2) 또는 중질지(80g/m^2)

(23쪽 중 8쪽)

□ 표준화

ㅇ 국내표준

번호	인증구분[1」]	인증여부[2」]	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류[3」]	제안/인증일자

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

ㅇ 국제표준

번호	표준화단계구분[1」]	표준명	표준기구명[2」]	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식[3」]	제안자	표준화 번호	제안일자

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

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	브루셀라-LAMP-LFA kit	2023.12	압티지엠제이㈜	경상국립대학교	브루셀라 진단	1-2년		

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	노하우	소 브루셀라 감염증 진단을 위한 소 혈액 펩타이드 분석기술	㈜이지메스	2023.12.18	5,000,000	-
2	노하우	단크론성 항체 생산을 위한 하이브리도마 세포주의 안정적인 개발과 관리	㈜압티지엠제이	2023.12.15	5,000,000	-

* 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 방식[1]	사업화 형태[2]	지역[3]	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

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

□ 매출 실적(누적)

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

210㎜×297㎜[(백상지(80g/㎡) 또는 중질지(80g/㎡)

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과			소 브루셀라 감염증 진단키트 개발		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		2년		
	소요예산(천원)		200,000		
	예상 매출규모(천원)		현재까지	3년 후	5년 후
			-	500,000	1,000,000
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내	-	5	10
		국외	-	-	-
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		3종의 기술 기반 소브루셀라 감염증 혈액 진단키트 개발 (항체, LAMP, 압타머)		
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)		현재	3년 후	5년 후
			-	500,000	1,000,000
	수출		-	-	-

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			yyyy년	2023년	
1	가축질병대응기술개발사업	㈜이지메스		1	1
합계					

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	
		생산인력	
	개발 후	연구인력	1
		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

210mm×297mm[(백상지(80g/m^2) 또는 중질지(80g/m^2)

□ 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				
		2024	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				4			2	2			4		

□ 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

210mm×297mm[(백상지(80g/m^2) 또는 중질지(80g/m^2)

[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)

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

<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

210mm×297mm[(백상지(80g/m^2) 또는 중질지(80g/m^2)

(23쪽 중 12쪽)

2) 목표 달성 수준

추 진 목 표		달 성 내 용	달성도(%)
제 1세부:브루셀라 감염과 숙주 대사체 상관관계 및 진단적 가치 평가	① 브루셀라 감염병에 대응하는 숙주 대사체의 항균 효과 증명 (실험동물 및 세포 실험)	◦ 브루셀라 감염증에 반응하는 다양한 대사체 (simvastatin, lipoxygenase(LOX) pathway 저해제인 Nordihydroguaiaretic acid (NDGA, SIRT1 activators, sodium propionate, Regulatory enzyme, DapB/gpm 등) 에 대하여 숙주 세포 독성 및 항균효과, 숙주 세포 내 균 저해능력 평가 균감염 대응기전 규명을 실험동물인 마우스를 이용하여 평가 하였으며, 이들 대사체 및 대사조절물질이 브루셀라 균의 감염에 중요한 역할을 담당하는 것을 확인 함	100
	② 발굴 대사체 이용 분석 기법 확립 및 진단 적용	◦ 브루셀라 감염증에 발현하는 2종의 대사체를 면역원으로 하여 단크론성 항체를 개발하고, 간접효소면역분석법을 개발하여 특이성이 높은 진단 기법을 개발함	100
	③ 발굴 대사체가 브루셀라 감염 숙주의 면역반응 유도 규명	◦ 브루셀라 감염증에 반응하는 다양한 대사체 (simvastatin, lipoxygenase(LOX) pathway 저해제인 Nordihydroguaiaretic acid (NDGA, SIRT1 activators, sodium propionate, Regulatory enzyme, DapB/gpm 등) 에 대하여 실험동물 면역반응을 규명하였고, 면역물질에 대한 분석을 수행하여 대사체의 브루셀라 감염증 억제 및 활성 능력을 평가함	100
	④ 동물실험을 통한 브루셀라 특이적 대사체 발현 규명 (목적 및 실험동물)	◦ 브루셀라 감염증에 발현하는 2종의 대사체와 다양한 대사체(simvastatin, lipoxygenase(LOX) pathway 저해제인 Nordihydroguaiaretic acid (NDGA, SIRT1 activators, sodium propionate, Regulatory enzyme, DapB/gpm 등)의 목적동물(소)의 감염혈청 및 실험동물(마우스)의 접종 실험을 수행하여 발현 및 발병 메커니즘에 대한 규명을 수행함	100
	⑤ 대사체에 대한 단클론 항체 기반 혈청학적 진단 기술 확립 및 산업화	◦ 브루셀라 감염증에 발현하는 2종의 대사체를 면역원으로 하여 단크론성 항체를 이용 간접효소면역분석법을 개발하였으며, 브루셀라균의 단백 발현 조절 유전자인 BruAb2_0168 gene을 이용하여 민감도 및 특이도가 높은 LAMP-LFA방법을 구축하여 숙주의 면역반응과 균측 인자를 진단하기 위한 최적의 진단 기법을 확립함	100
제 2세부:대사체 분석 기반 브루셀라증 진단용 유용 바이오 마커 발굴 및 산업화	① 소 브루셀라증에서 특이적으로 발현하는 대사체 발굴 (10종 이상)	◦ UPLC-Q-TOF MS 기반 대사체분석을 진행하여 진양성과 진음성이 다변량통계분석에서 유의적으로 분리되는 대사체를 16종 분리 하였으며, 이들 대사체를 이용한 진단방법 및 발병기전 규명을 위한 토대를 구축함	100
	② 발굴 대사체의 브루셀라 외 감염혈청과의 감별 분석(결핵, *Y. entericolitica* O9, 바이러스 등)	◦ 브루셀라 감염 소 혈청의 대사체 분석을 통해 확보한 지표물질들이 브루셀라 이외의 타 균주 (결핵, E.Coli, Yersinia)의 감염 소 혈청을 이용하여 다변량통계분석인 PLS-DA score plot 비교 분석을 수행해본 결과 이들 물질이 브루셀라 감염 혈청에만 특이적으로 발현되는 것을 확인하여 진단적 가치가 우수한 물질로 확인됨	100
	③ 발굴 대사체 분석방법 첨단화 및 대량 생산체계 구축	◦ UPLC-Q-TOF MS, *De novo* peptide sequencing, codon optimization tool, Ni-NTA resin 이용 크로마트그래피 분리/정제 방법, Aptamer 활용 등의 분자생물학적 분석 방법을 이용하여 대사체의 무질 특성을 규명하였으며, 대량생산 체계를 구축함	100
	④ 개발 진단기술의 경제성 평가 및 산업화	◦ 본 과제 수행을 통해 얻어진 결과는 브루셀라 감염증 오진률을 최소화 하는 획기적인 진단법 개발이 가능하게 되었으며, 이들 진단 기법은 국내는 물론 전 세계적으로 발생하는 브루셀라 감염병에 대한 고효율 진단 기술로 적용이 가능한 신개념 진단법이 확립 됨	100

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

○ 해당 사항 없음

2) 자체 보완활동

○ 브루셀라 감염 혈청 확보를 위해 지자체 및 농림축산 검역본부를 통해 감염 우 혈청을 확보 함
○ 브루셀라 균의 단백 조절 유전자를 이용한 현장 적용 진단 기법을 개발 함

3) 연구개발 과정의 성실성

○ 본 과제 수행을 통하여 브루셀라 감염증에 특이적으로 발현하는 숙주의 대사체를 10종 이상 발굴하였으며, 이들 대사물질을 이용한 혈청학적 진단 방법을 개발하였고, 균의 단백질과 대사체를 조절하는 유전자를 이용하여 브루셀라 균을 진단할 수 있는 분자생물학적 진단 기법을 확립함
○ 본 과제 수행을 통해 얻어진 결과물은 연구 계획 대비 특허, 기술이전, 논문, 학술발표, 인력양성 등 100% 이상 초과 달성하여 성실성이 우수한 것으로 판단 됨
○ 본 과제를 통해 얻어진 브루셀라 감염증 진단 기법은 현재 브루셀라 감염증의 진단에서 발생하는 문제점을 획기적으로 개선할 것으로 판단 되며, 향후 산업화를 통해 국가 경쟁력 제고에 기여할 것으로 판단 됨

210mm×297mm[(백상지(80g/m^2) 또는 중질지(80g/m^2)

(23쪽 중 13쪽)

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

○ 대표적인 인수공통전염병인 브루셀라 감염증에 대한 진단법 개선을 위하여 숙주의 감염에 대응하는 대사체 및 균측 대사체 관련 유전자를 이용하여 혈청학적 진단방법과 유전학적 진단 방법을 구축하여 현재 브루셀라 감염증 진단에서 발생할 수 있는 오진률을 줄이고 브루셀라 감염증에 특이적인 진단 기법을 개발에 기여 함

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표 >

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

< 별첨 자료 >

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

210mm×297mm[(백상지(80g/m^2) 또는 중질지(80g/m^2)

(23쪽 중 14쪽)

자체평가의견서

1. 과제현황

	과제번호				
사업구분					
연구분야	가축질병			과제구분	단위
사 업 명	가축질병대응기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과 제 명	브루셀라 오진률 최소화를 위한 대사체 바이오마커진단 기술 개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구개발기관	경상국립대학교 산학협력단			연구책임자	김석
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	9개월	240,000	60,000	300,000
	2차년도	12개월	320,000	80,000	400,000
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
	계		560,000	140,000	700,000
참여기업	㈜이지메스				
상 대 국		상대국연구개발기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2024. 2. 28

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
경상국립대학교	교수	김 석

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확 약	

자체평가의견서

1. 과제현황

	과제번호				
사업구분					
연구분야	가축질병			과제구분	단위
사 업 명	가축질병대응기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과 제 명	브루셀라 오진률 최소화를 위한 대사체 바이오마커진단 기술 개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구개발기관	경상국립대학교 산학협력단			연구책임자	김석
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	9개월	240,000	60,000	300,000
	2차년도	12개월	320,000	80,000	400,000
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
	계		560,000	140,000	700,000
참여기업	㈜이지메스				
상 대 국		상대국연구개발기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2024. 2. 28

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
경상국립대학교	교수	김 석

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확 약	김석

Ⅰ. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히 불량)

우수

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히 불량)

우수

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히 불량)

우수

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히 불량)

우수

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히 불량)

우수

210mm×297mm[(백상지(80g/m^2) 또는 중질지(80g/m^2)

Ⅱ. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)		비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
제 1세부: 브루셀라 감염과 숙주 대사체 상관관계 및 진단적 가치 평가	① 브루셀라 감염병에 대응하는 숙주 대사체의 항균 효과 증명 (실험동물 및 세포 실험)	10	100	◦ 브루셀라 감염증에 반응하는 다양한 대사체 (simvastatin, lipoxygenase(LOX) pathway 저해제인 Nordihydroguaiaretic acid (NDGA, SIRT1 activators, sodium propionate, Regulatory enzyme, DapB/gpm 등) 에 대하여 숙주 세포 독성 및 항균효과, 숙주 세포내 균 저해능력 평가 균감염 대응기전 규명을 실험동물인 마우스를 이용하여 평가 하였으며, 이들 대사체 및 대사조절물질이 브루셀라 균의 감염에 중요한 역할을 담당하는 것을 확인 함
	② 발굴 대사체 이용 분석기법 확립 및 진단 적용	10	100	◦ 브루셀라 감염증에 발현하는 2종의 대사체를 면역원으로 하여 단크론성 항체를 개발하고, 간접효소면역분석법을 개발하여 특이성이 높은 진단 기법을 개발함
	③ 발굴 대사체가 브루셀라 감염 숙주의 면역반응 유도 규명	10	100	◦ 브루셀라 감염증에 반응하는 다양한 대사체 (simvastatin, lipoxygenase(LOX) pathway 저해제인 Nordihydroguaiaretic acid (NDGA, SIRT1 activators, sodium propionate, Regulatory enzyme, DapB/gpm 등) 에 대하여 실험동물 면역반응을 규명하였고, 면역물질에 대한 분석을 수행하여 대사체의 브루셀라 감염증 억제 및 활성 능력을 평가함
	④ 동물실험을 통한 브루셀라 특이적 대사체 발현 규명 (목적 및 실험동물)	10	100	◦ 브루셀라 감염증에 발현하는 2종의 대사체와 다양한 대사체(simvastatin, lipoxygenase(LOX) pathway 저해제인 Nordihydroguaiaretic acid (NDGA, SIRT1 activators, sodium propionate, Regulatory enzyme, DapB/gpm 등)의 목적동물(소)의 감염혈청 및 실험동물(마우스)의 접종 실험을 수행하여 발현 및 발병 메커니즘에 대한 규명을 수행함
	⑤ 대사체에 대한 단클론 항체 기반 혈청학적 진단 기술 확립 및 산업화	20	100	◦ 브루셀라 감염증에 발현하는 2종의 대사체를 면역원으로 하여 단크론성 항체를 이용 간접효소면역분석법을 개발하였으며, 브루셀라균의 단백 발현 조절 유전자인 BruAb2_0168 gene을 이용하여 민감도 및 특이도가 높은 LAMP-LFA방법을 구축하여 숙주의 면역반응과 균측 인자를 진단하기 위한 최적의 진단 기법을 확립함
제 2세부: 대사체 분석 기반 브루셀라증 진단용 유용 바이오마커 발굴 및 산업화	① 소 브루셀라증에서 특이적으로 발현하는 대사체 발굴 (10종 이상)	10	100	◦ UPLC-Q-TOF MS 기반 대사체분석을 진행하여 진양성과 진음성이 다변량통계분석에서 유의적으로 분리되는 대사체를 16종 분리 하였으며, 이들 대사체를 이용한 진단방법 및 발병기전 규명을 위한 토대를 구축함
	② 발굴 대사체의 브루셀라 외 감염혈청과의 감별 분석(결핵, *Y. entericolitica* O9, 바이러스 등)	10	100	◦ 브루셀라 감염 소 혈청의 대사체 분석을 통해 확보한 지표물질들이 브루셀라 이외의 타 균주(결핵, E.Coli, Yersinia)의 감염 소 혈청을 이용하여 다변량통계분석인 PLS-DA score plot 비교 분석을 수행해본 결과 이들 물질이 브루셀라 감염 혈청에만 특이적으로 발현되는 것을 확인하여 진단적 가치가 우수한 물질로 확인됨
	③ 발굴 대사체 분석방법 첨단화 및 대량 생산체계 구축	10	100	◦ UPLC-Q-TOF MS, *De novo* peptide sequencing, codon optimization tool, Ni-NTA resin 이용 크로마트그래피 분리/정제 방법, Aptamer 활용 등의 분자생물학적 분석 방법을 이용하여 대사체의 무질 특성을 규명하였으며, 대량생산 체계를 구축함
	④ 개발 진단기술의 경제성 평가 및 산업화	10	100	◦ 본 과제 수행을 통해 얻어진 결과는 브루셀라 감염증 오진률을 최소화 하는 획기적인 진단법 개발이 가능하게 되었으며, 이들 진단 기법은 국내는 물론 전 세계적으로 발생하는 브루셀라 감염병에 대한 고효율 진단 기술로 적용이 가능한 신개념 진단법이 확립 됨
합계		100점	100	

Ⅲ. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

○ 대표적인 인수공통전염병인 브루셀라 감염증에 대한 진단법 개선을 위하여 숙주의 감염에 대응하는 대사체 및 균측 대사체 관련 유전자를 이용하여 혈청학적 진단방법과 유전학적 진단 방법을 구축하여 현재 브루셀라 감염증 진단에서 발생할 수 있는 오진률을 줄이고 브루셀라 감염증에 특이적인 진단 기법을 개발에 기여 함

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

○ 본 과제 수행을 통해 얻어진 진단 기술은 현장 적용 평가를 통하여 브루셀라 감염증 진단 기관 및 현장 농가와의 연계를 통한 사업화가 가능할 것으로 판단 됨 ○ 향후 브루셀라 감염증에 대하여 소 이외의 동물 (염소, 개, 사슴, 고양이 등)에 적용할 수 있는 범용 진단 기법의 개발이 가능할 것으로 판단 됨

210mm×297mm[(백상지(80g/m^2) 또는 중질지(80g/m^2)

Ⅳ. 보안성 검토

o 해당사항 없음

※ *보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.*

1. 연구책임자의 의견

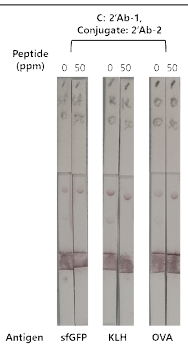
o 해당사항 없음

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

o 해당사항 없음

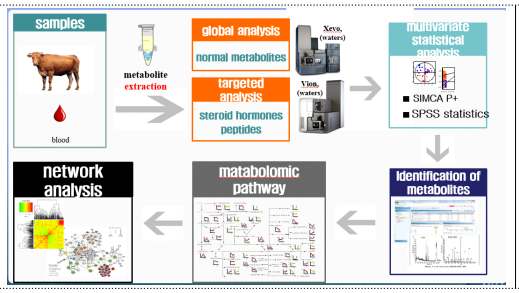
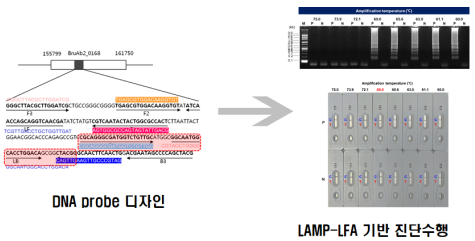
<붙임 2>

< 종료과제 성과요약서(서식) >

<table>
<tr><td rowspan="3">과제명
(연구기관,
책임자)</td><td colspan="5">브루셀라 오진률 최소화를 위한 대사체 바이오마커진단 기술 개발</td></tr>
<tr><td colspan="2">주관기관(1세부)</td><td colspan="2">위탁</td><td>-</td></tr>
<tr><td colspan="2">경상국립대학교 산학협력단</td><td colspan="2"></td><td>-</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연구기간</td><td rowspan="2">2022. 04. 01. - 2023. 12. 31.(21개월)</td><td>'22년</td><td>'23년</td><td>'**년</td><td>총 예산
(정부출연금, 억)</td></tr>
<tr><td>3.0</td><td>4.0</td><td></td><td>7.0
(5.6)</td></tr>
<tr><td>연구목적</td><td colspan="5">○ (배경)소 브루셀라 진단의 오진으로 인해 발생농가의 동거축 이동제한, 재검사, 비감염축 살처분과 같은 피해는 물론 국가 방역 신뢰 저하로 끊임없는 방역 분쟁이 발생하고 있음
○ (목적)본 연구의 최종 목표는 브루셀라 감염 소의 혈청에 대하여 대사체 분석을 통해 특징적으로 발현된 바이오마커를 이용 브루셀라 감염증 오진률을 최소화 하는 고민감도 진단기법을 개발하는데 있음</td></tr>
<tr><td>핵심연구내용
및 성과</td><td colspan="5">○ 소 브루셀라증에서 특이적으로 발현하는 대사체와 질병과의 상관관계 규명(10종 이상)
○ 브루셀라 감염 대응 특이 대사체 성분 규명
○ 발굴 대사체 유용 분석기법 확립 및 진단 적용
○ 대사체 대응 단클론 항체 제작 및 혈청학적 진단 기술 확립
○ 대사체/유전체 기반 고민감도 진단기법 산업화</td></tr>
<tr><td>대표성과</td><td colspan="3">○ 브루셀라 감염증에 발현하는 숙주 대사체와 균 대사체의 발병기전 해석을 통해 당초 계획했던 2건(IF: 1.5)을 초과, 국제 전문 학술지 4편을 발표함(SCI(E)급, 평균 IF: 4.7).
○ 브루셀라 감염증에 특이적 발현하는 대사체 분석 기술과 이에 대응하는 단클론 항체 기반 혈청학적/유전학적 진단법 확립, 기술이전 2건
○ 브루셀라 감염증의 고민감도 신속 진단법을 기반으로 오진률을 최소화 할 수 있고, 이들 질병으로 인한 피해 저감 효과 기대됨</td><td> 

[대표성과1-대사체 기반 혈청학적 신속 진단법]</td><td>

[대표성과2-균 유전체 기반 고민감도 신속 진단법]</td></tr>
<tr><td>연구의 의의
및 파급효과</td><td colspan="5">○ 브루셀라 의양성 반응에 의한 경제적/사회적 피해 최소화
○ 면역반응에 의해 초래되는 낮은 민감도, 오진, 교차반응 등 진단적 단점 극복
○ 세포내 기생성 난치성 질병 극복을 위한 토대구축
○ 브루셀라 감염병 발병기전 및 신개념 진단법 제시
○ 개발된 진단의 해외 수출을 통한 국가 경쟁력 제고</td></tr>
</table>

	 
특이사항 (연구수행 중 에피소드, 연구수행 계기 등)	○ 혈청학적 진단법에 기초한 진단법을 개발하는 중 숙주 측 요인과 균 측 요인을 모두 고려한 진단기술의 필요성이 제기 되어 숙주의 반응(혈청학적 진단방법) 과 균의 반응(유전학적 진단방법)을 개발하게 되어 진단의 정밀성과 특이성을 증대시킴
용어해설	○ 브루셀라 감염증: 사람과 소에서 주로 발생하는 세균성 감염병으로 현재까지 진단의 정확성과 특이성에 대한 문제가 제기 되어 이에 대한 현장 요구가 증대되는 대표적인 인수공통전염병의 하나임.

최종평가정량성과 실적종합표

사업명	과제명	주관연구기관	연구책임자

(단위 : 건, %, 점)

성과지표	계획(A)	실적(B)	목표달성률 (C:B/A)	지표달성률 (C'≒C)	가중치	점수(D)
특허 출원	1	**1**	100.0%	100.0 %		0.00
특허 등록			–	–		-
품종 등록			–	–		-
기술이전(건)	1	**2**	200.0%	100.0 %		0.00
기술료(백만원)	10	**10**	100.0%	100.0 %		0.00
제품화(건)			-	-		-
매출액(백만원)			-	-		-
수출액(백만원)			-	-		-
고용창출(명)	1	**1**	100.0%	100.0 %		0.00
투자유치(백만원)			-	-		-
기술인증			-	-		-
논문(SCI)	1	**4**	-	-		-
논문(비SCI)	2	**1**	-	-		-
논문평균 IF	1.5	**4.7**	313.3%	100.0 %		0.00
학술발표	3	**6**	200.0%	100.0 %		0.00
교육지도			-	-		-
인력양성	1	**4**	400.0%	100.0 %		0.00
정책활용			-	-		-
홍보전시			-	-		-
기타			-	-		-
계	**21.5**	**32.7**				0.00점

*** 논문성과는 정량평가에서 점수화 되진 않지만 주로 정성평가에 반영되고 있습니다.**

**** 점수는 수식이 걸려 있어서 자동으로 계산됩니다. 그러므로 계획(A)과 실적(B) 및 가중치 항목만 기입해 주시기 바랍니다.**

***** 가중치는 당초 연구개발계획서 상 명시된 수치를 입력해 주시기 바랍니다.(예 : 0.500 / 0.250)**

****** 모든 성과건수는 개별성과 기준으로 업로드 하여야 정량평가에 반영됩니다.**

(예) 고용창출이 5명인 경우 5건을 등록하여야 5건 인정, 1건 등록에 5명을 첨부할 경우 1건으로 인정

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	■자유응모과제 □지정공모과제		분 야	
연 구 과 제 명	브루셀라 오진률 최소화를 위한 대사체 바이오마커진단 기술 개발			
주관연구개발기관	경상국립대학교 산학협력단		주관연구책임자	김석
연 구 개 발 비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	560,000	140,000		700,000
연구개발기간	2022. 04. 01. - 2023. 12. 31.(21개월)			
주요활용유형	■산업체이전 □교육 및 지도 □정책자료 □기타( ) □미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표		당초연구목표 대비 연구결과
제 1세부:브루셀라 감염과 숙주 대사체 상관관계 및 진단적 가치 평가	① 브루셀라 감염병에 대응하는 숙주 대사체의 항균 효과 증명 (실험동물 및 세포 실험)	◦ 브루셀라 감염증에 반응하는 다양한 대사체(simvastatin, lipoxygenase(LOX) pathway 저해제인 Nordihydroguaiaretic acid (NDGA, SIRT1 activators, sodium propionate, Regulatory enzyme, DapB/gpm 등) 에 대하여 숙주 세포 독성 및 항균효과, 숙주 세포내 균 저해능력 평가 균감염 대응기전 규명을 실험동물인 마우스를 이용하여 평가 하였으며, 이들 대사체 및 대사조절물질이 브루셀라 균의 감염에 중요한 역할을 담당하는 것을 확인 함
	② 발굴 대사체 이용 분석기법 확립 및 진단 적용	◦ 브루셀라 감염증에 발현하는 2종의 대사체를 면역원으로 하여 단크론성 항체를 개발하고, 간접효소면역분석법을 개발하여 특이성이 높은 진단 기법을 개발함
	③ 발굴 대사체가 브루셀라 감염 숙주의 면역반응 유도 규명	◦ 브루셀라 감염증에 반응하는 다양한 대사체(simvastatin, lipoxygenase(LOX) pathway 저해제인 Nordihydroguaiaretic acid (NDGA, SIRT1 activators, sodium propionate, Regulatory enzyme, DapB/gpm 등) 에 대하여 실험동물 면역반응을 규명하였고, 면역물질에 대한 분석을 수행하여 대사체의 브루셀라 감염증 억제 및 활성 능력을 평가함
	④ 동물실험을 통한 브루셀라 특이적 대사체 발현 규명 (목적 및 실험동물)	◦ 브루셀라 감염증에 발현하는 2종의 대사체와 다양한 대사체(simvastatin, lipoxygenase(LOX) pathway 저해제인 Nordihydroguaiaretic acid (NDGA, SIRT1 activators, sodium propionate, Regulatory enzyme, DapB/gpm 등)의 목적동물(소)의 감염혈청 및 실험동물(마우스)의 접종 실험을 수행하여 발현 및 발병 메커니즘에 대한 규명을 수행함
	⑤ 대사체에 대한 단클론 항체 기반 혈청학적 진단 기술 확립 및 산업화	◦ 브루셀라 감염증에 발현하는 2종의 대사체를 면역원으로 하여 단크론성 항체를 이용 간접효소면역분석법을 개발하였으며, 브루셀라균의 단백 발현 조절 유전자인 BruAb2_0168 gene을 이용하여 민감도 및 특이도가 높은 LAMP-LFA방법을 구축하여 숙주의 면역반응과 균측 인자를 진단하기 위한 최적의 진단 기법을 확립함
제 2세부:대사체 분석 기반 브루셀라증 진단용 유용 바이오 마커 발굴 및 산업화	① 소 브루셀라증에서 특이적으로 발현하는 대사체 발굴 (10종 이상)	◦ UPLC-Q-TOF MS 기반 대사체분석을 진행하여 진양성과 진음성이 다변량통계분석에서 유의적으로 분리되는 대사체를 16종 분리 하였으며, 이들 대사체를 이용한 진단방법 및 발병기전 규명을 위한 토대를 구축함
	② 발굴 대사체의 브루셀라 외 감염혈청과의 감별 분석(결핵, *Y. entericolitica* O9, 바이러스 등)	◦ 브루셀라 감염 소 혈청의 대사체 분석을 통해 확보한 지표물질들이 브루셀라 이외의 타 균주 (결핵, E.Coli, Yersinia)의 감염 소 혈청을 이용하여 다변량통계분석인 PLS-DA score plot 비교 분석을 수행해본 결과 이들 물질이 브루셀라 감염 혈청에만 특이적으로 발현되는 것을 확인하여 진단적 가치가 우수한 물질로 확인 됨
	③ 발굴 대사체 분석방법 첨단화 및 대량 생산체계 구축	◦ UPLC-Q-TOF MS, *De novo* peptide sequencing, codon optimization tool, Ni-NTA resin 이용 크로마트그래피 분리/정제 방법, Aptamer 활용 등의 분자생물학적 분석 방법을 이용하여 대사체의 무질 특성을 규명하였으며, 대량생산 체계를 구축함
	④ 개발 진단기술의 경제성 평가 및 산업화	◦ 본 과제 수행을 통해 얻어진 결과는 브루셀라 감염증 오진률을 최소화 하는 획기적인 진단법 개발이 가능하게 되었으며, 이들 진단 기법은 국내는 물론 전 세계적으로 발생하는 브루셀라 감염병에 대한 고효율 진단 기술로 적용이 가능한 신개념 진단법이 확립 됨

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표		사업화지표												연구기반지표									
		지식재산권				기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
														논문								
		특허출원	특허등록	품종등록	SMART	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI	논문평균IF	학술발표			정책활용	홍보전시	
단위		건	건	건	평균등급	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치		15	15			20	10									15	15		10			
최종목표		2	2			1	10							2	2	1.5	4		3			
당해년도	목표	1	0			1	10							1	2	1.5	2		1			
	실적	1	0			2	10							4	1	4.8	6		4			
달성률(%)		100				200	100							400	50	300	300		400			

210mm×297mm[(백상지(80g/m^2) 또는 중질지(80g/m^2)

[별첨 2] (23쪽 중 21쪽)

4. 핵심기술

구분	핵 심 기 술 명
①	브루셀라 감염 소에서 특이적으로 발현하는 대사체 발굴 10종 이상
②	브루셀라 감염증에서 발굴된 대사체와 타 병원체 감염 소 혈청의 비교를 통한 특이성 확인
③	대사체 기반한 항체를 이용한 혈청학적 진단 기술 개발
④	브루셀라 균 검출을 위한 균 측 대사조절 유전자 이용 진단기술 개발
⑤	브루셀라 감염증에 있어서 숙주 대사체와의 상관관계 및 발병기전 규명
⑥	대사체를 활용한 브루셀라 감염증 치료 및 예방법 적용 가능

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계최초	국내최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허출원	산업체이전(상품화)	현장애로해결	정책자료	기타
①의 기술		√								
②의 기술		√								
③의 기술		√								
④의 기술		√								
⑤의 기술		√								
⑥의 기술		√								

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	브루셀라 감염증 진단 및 치료법 개발 적용
②의 기술	브루셀라 감염증 진단 개발 적용
③의 기술	브루셀라 감염증 진단 개발 적용
④의 기술	브루셀라 감염증 진단 개발 적용
⑤의 기술	브루셀라 감염증 진단 및 치료법 개발 적용
⑥의 기술	브루셀라 감염증 진단 및 치료법 개발 적용

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표												연구기반지표								
	지식재산권				기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
													논문								
	특허출원	특허등록	품종등록	SMART평균등급	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI	논문평균IF	학술발표			정책활용	홍보전시	
단위	건	건	건		건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치	15	15			20	10									15	15		10			
최종목표	2	2						900	1000												
연구기간내 달성실적	1																				
연구종료후 성과창출 계획	1	2						900	1000												

210mm×297mm[(백상지(80g/m^2) 또는 중질지(80g/m^2)

[별첨 2] (23쪽 중 22쪽)

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함): 김현진, 심원보 작성 요망

핵심기술명[1]	소 브루셀라 감염증 진단을 위한 소 혈액 펩타이드 분석기술		
이전형태	□무상 ■유상	기술료 예정액	5,000천원
이전방식[2]	□소유권이전 □전용실시권 □통상실시권 □협의결정 ■기타(노하우 기술이전)		
이전소요기간	-	실용화예상시기[3]	-
기술이전시 선행조건[4]	기술지도		

핵심기술명[1]	단크론성 항체 생산을 위한 하이브리도마 세포주의 안정적인 개발과 관리		
이전형태	□무상 ■유상	기술료 예정액	5,000천원
이전방식[2]	□소유권이전 □전용실시권 □통상실시권 □협의결정 ■기타(노하우 기술이전)		
이전소요기간	-	실용화예상시기[3]	-
기술이전시 선행조건[4]	기술지도		

1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성

2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리

3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등

4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

구분	번호	내용	예	아니오
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	○	
변조	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	○	
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	○	
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	○	
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	○	
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	○	
부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	○	
	12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	○	
	13	저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	○	
부당한 중복 게재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	○	
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	○	
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	○	

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우「국가연구개발혁신법」제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2024. 2. 28.

기관명 : 경상국립대학교 산학협력단

점검자 : 김 석 (서명)

농림식품기술기획평가원장 귀하

연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

구분	번호	내용	예	아니오
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	○	
변조	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	○	
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	○	
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	○	
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	○	
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	○	
부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	○	
	12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	○	
	13	저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	○	
부당한 중복 게재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	○	
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	○	
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	○	

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우「국가연구개발혁신법」제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2024. 2. 28.

기관명 : 경상국립대학교 산학협력단

점검자 : 김 석 (서명)

농림식품기술기획평가원장 귀하

연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

구분	번호	내용	예	아니오
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	○	
변조	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	○	
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	○	
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	○	
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	○	
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	○	
부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	○	
	12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	○	
	13	저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	○	
부당한 중복 게재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	○	
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	○	
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	○	

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우「국가연구개발혁신법」제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2024. 2. 28.

기관명 : ㈜ 이지메소

점검자 : 김 현진 (서명)

농림식품기술기획평가원장 귀하

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.