

발간등록번호
11-1543000-000660-01

세균침습성 안티센스 펩타이드핵산 복합체를 이용한 젖소
유방염 및 항생제 내성제어 신기술 개발

(Development of a novel technology for control of bovine mastitis and
its related antibiotic resistance using bacterium-penetrating antisense
PNAs)

강원대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “세균침습성 안티센스 펩타이드핵산 복합체를 이용한 젖소 유방염 및 항생제 내성제어 신기술 개발”에 관한 연구 과제의 보고서로 제출합니다.

2014 년 11 월 28 일

주관연구기관명 : 강원대학교

주관연구책임자 : 윤 장 원

세부연구책임자 : 윤 장 원

협동연구기관명 : (주)중검

협동연구책임자 : 임 명 운

요 약 문

I. 제 목

세균침습성 안티센스 펩타이드핵산 복합체를 이용한 젖소 유방염 및 항생제 내성제어 신기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

■ 연구개발의 목적

▶인공 DNA 유도체로 알려진 안티센스 펩타이드핵산(Peptide Nucleic Acids; PNA)과 세균 침습성 펩타이드의 상호 복합체를 개발하여 주요 젖소 유방염 원인균에 존재하는 광범위 필수생존인자 및 항생제 내성인자를 암호화하고 있는 표적 유전자의 발현침묵(gene silencing)을 유도함으로써, 항균 및 항생제 내성 역전효과(reversion of antibiotic resistance)를 최적화할 수 있는 감염병 제어 신기술을 확립증하는 것임. 이를 통하여, 국내 축산 농가는 물론 국가 사회적으로 많은 손실을 야기하는 젖소 유방염 및 항생제 내성균 극복방안을 도출하고자 함.

■ 연구개발의 필요성

▶가축질병 제어는 최근 축산물 및 축산물 가공품의 소비증가, 국제교역 증대, 항생제 내성 확산, 그리고 신종 인수공통전염병 출현 등으로 인하여 커다란 국가 사회적 현안으로 대두되고 있음. 따라서 최근 국가재난 대응책의 일환으로 주요 신종 바이러스성 및 세균성 감염질환 제어를 위한 치료 및 백신제제의 개발과 관련된 R&D 전략이 수립성화되고 있으나, 대부분 기존 백신의 개량화, 신규 면역 증강제 개발, 혹은 항생제 대체제 개발 등 기존 치료 및 백신제제의 문제점을 보완선하는 연구에 집중되어 왔음.

▶또한 국가 간의 교류가 급속히 확대되고 가축 전염병의 국경 개념이 더욱 희박해지는 상황에서 국가 간의 기술개발 경쟁은 더욱 치열해지고 있고 기술선점을 위한 지적소유권 분쟁도 더욱 강화되고 있는 추세임. 따라서 국내에서도 기존 치료 및 백신제제 개발전략과 첨단 분자생물학적 기법을 잘 조화시킴으로써 부작용을 최소화하고 효능을 극대화 할 수 있는 가축 질병 및 항생제 내성 제어를 위한 신기술 개발에 총력을 기울여야 함.

▶감염질환은 국내 뿐만 아니라 중국, 일본, 태국, 말레이시아 등 대부분의 아시아 국가에서 발생하고 있으며(감염위험군 규모 약 20억인) 발생빈도도 매우 높고 역학적 연관성이 밀접하기 때문에, 국내에서 개발된 신종 치료 및 백신제제의 개발은 우선적으로 이들 국가에 수출하여 외화를 획득하는데 기여할 수 있을 것임. 이들 국가 대부분의 경우, 현재 경제적 어려움 때문에 감염성 질환 관련 백신 및 치료제제 개발에 많은 연구개발 투자를 하고 있지는 못하나 이들 국가들의 경제가 빠른 속도로 발전하고 있으므로 제품화되는 시기에는 연간 약 1

억불 이상의 수요시장이 형성될 것으로 기대됨.

▶대표적 전염성 소모성 가축질환의 하나인 젖소 유방염은 세균이 젖소의 유방 내에 침입하여 염증을 일으키는 질병으로 효과가 확실한 예방백신이나 치료제가 없어 감염 시에는 산유량 감소 우유등급 저하는 물론 소의 도태를 초래하여 국내에서는 연간 약 1,800억원, 미국에서는 약 20억불(USD) 등 막대한 직·간접적 경제 피해를 야기함.

▶유방염에 의한 경제적 손실에 관한 최근 보고가 제한적이지만, 미국 유방염검정협회가 조사한 바에 의하면, 유량손실, 유성분 저하 및 유제품 제조상의 손실, 우유폐기에 의한 손실, 그리고 대체우 갱신비용, 예방/치료비용, 그리고 추가 노동상의 손실액을 고려할 때 연간 1두당 181불(USD)의 경제 손실액이 발생함을 보고하였음. 이러한 이론적, 기술적 보고를 토대로 국내에서 유방염에 의한 경제적 손실 추정액은 착유우 농가당 평균 20두, 두당 유량 연간 6,100kg, 체세포수 70만/ml이라고 가정할 경우 하루 약 42,537원 이상이며, 유방염 치료기간을 15일로 가정할 때 63.8만원의 추정손실액이 예상됨 (1997, 한국농촌경제연구원 연구보고 R358). 이러한 추정손실액이 17년 전에 이루어졌다는 사실을 고려하면, 현재의 손실액은 최소 3-5배 이상일 것임.

▶향후 국내를 비롯하여 미국, 브라질 등 전 세계 유방염백신 시장의 규모는 약 1,600억원에 이를 것으로 추정하고 있음. 따라서 관련 산업시장 점유 및 국가 경쟁력 확보를 위하여 신개념의 유방염 치료 및 백신개발에 대한 연구가 절실히 필요한 실정임.

■ 본 과제 관련 핵심기술요소 분석

▶본 연구과제와 관련된 핵심기술요소로서 ① 국내 젖소 유방염 및 항생제 내성관련 주요 표적유전자 발굴기술, ② 표적유전자 발현침묵을 위한 유전자 안티센싱 기술, ③ 안티센스 PNA 합성 기술, 그리고 ④ PNA의 세포 내 도입기술이 있음.

▶국내 젖소 유방염 및 항생제 내성관련 주요 표적유전자 발굴기술은 포도상구균, 장구균, 연쇄상구균, 장관병원성대장균, 살모넬라균, 비브리오균, 탄저균 등 주요 가축 병원균의 병인조절인자 및 항생제 내성인자와 관련된 본 연구팀의 선행연구 및 국내외에서 발표된 문헌보고를 통해 확보할 수 있음. 특히 국내 젖소 유방염의 주요 원인균은 매우 다양한데, 농림축산검역본부의 최근 국내 역학 연구보고는 *Staphylococcus aureus*와 *E. coli*를 비롯하여 *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *S. pseudintermedius* 등으로 대표되는 CNS-staphylococci, 그리고 *Streptococcus uberis*, *S. oralis*, *S. bovis*, *S. agalactiae* 등으로 대표되는 Streptococci가 알려져 있음. 따라서 국내 젖소 유방염 제어를 위해서는 이들 다종 원인균을 모두 고려할 수 있는 광범위 제어전략 및 기술개발이 필요한 실정임.

▶표적유전자 발현침묵을 위한 유전자 안티센싱 기술은 이미 상당수의 문헌보고를 통해 확립되어 있음. 특히 암 및 유전질환에 적용된 바 있음. 이와 달리, 세균 감염병 제어를 위한 안티센싱 전략은 과거 안티센스 올리고머의 구조적·화학적 불안정성과 운반수단의 취약성으로 인하여 널리 응용되지 못하였음. 최근 이러한 문제점을 극복할 수 있는 인공 DNA 유도체의

개발 및 세균 침습성 펩타이드의 발견 등에 의하여 질병을 유발하는 바이러스 및 세균에 활용사례가 증가하고 있음. 하지만, 신규 세균 침습성 펩타이드의 탐색 및 발굴, intra-strain 혹은 inter-species를 겨냥한 광범위 안티센싱 제어기술 관련 연구는 매우 미약한 실정임.

▶인공 DNA 유도체인 PNA 합성기술은 과거 벨기에, 스웨덴의 발명자그룹을 중심으로 기술적으로 이미 다양한 합성기법이 개발되어 있는 실정이며, 현재 여러 응용에 적합한 형태로 합성이 가능한 상태임. 특히, 이 분야의 기술은 최근 국내 연구그룹에 의해 획기적으로 발전하였으며, 현재 대전에 위치한 (주)파나진이 PNA 합성 및 제작과 관련된 주문 공급에 대한 전 세계 독점 실시권을 확보하고 있는 실정임. 따라서 본 연구개발과제는 국내 기술력을 토대로 산업화할 수 있기 때문에 관련 분야에 대한 국가 경쟁력 확보에 커다란 기여를 할 수 있음.

▶안티센스 RNA를 이용한 유전자 발현조절과 PNA에 의한 유전자 발현조절은 서로 상이함이 보고되어 있음. 이는 두 물질의 구조적 유사성 때문으로 추정됨. 하지만, 안티센스 RNA의 경우 표적 유전자와 일시적인 complex 형성에 의존하는 반면, PNA의 경우 세포 내 효소들의 분해에 대하여 안정하기 때문에 안티센싱 효과는 3차 구조 복합체 형성에 의해 유도되는 것임.

III. 연구개발 내용 및 범위

■ 젖소 유방염 및 항생제 내성 제어를 위한 신규 안티센스 올리고머 발굴

- ▶국내 주요 젖소 유방염 원인균 및 항생제 내성패턴에 대한 분석
- ▶주요 원인균에 존재하는 광범위 필수생존인자 탐색 및 안티센스 올리고머 선발
- ▶주요 항생제 내성 관련 표적인자의 탐색 및 후보 안티센스 올리고머 선발
- ▶후보 안티센스 올리고머의 기능성 검증시스템 구축
- ▶안티센싱 효과의 비교 분석을 통한 최적 안티센스 올리고머 결정

■ 세균침습성 펩타이드(bacterium-penetrating peptides) 선별

- ▶세균 침습성 펩타이드 탐색, 설계 및 합성
- ▶표지물질을 이용한 세균침습성 검증시스템 구축
- ▶후보 펩타이드의 세균 침습효과 비교 분석

■ 주요 유방염 원인균에 대한 세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 기능성 평가

- ▶선발된 광범위 필수생존인자에 대한 세균침습성 안티센스 PNA 복합체 제작
- ▶합성된 안티센스 PNA 복합체에 의한 표적유전자 발현침묵효과의 정성·정량적 분석

■ 항생제 내성균에 대한 세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 내성제어능 평가

- ▶선발된 항생제 내성인자에 대한 세균침습성 안티센스 PNA 복합체 제작
- ▶합성된 안티센스 PNA 복합체에 의한 표적유전자 발현침묵효과의 정성·정량적 분석

- 자성나노복합체를 이용한 유방염 원인균의 신속 고효율 진단 기술 개발
 - ▶ 표준/분리주 중심의 특이 마커 탐색, 발현 및 특이항체(다클론) 제작
 - ▶ 혼합 및 조성의 최적화
 - ▶ 원유 내 다양한 오염 미생물 마커 탐색 및 특이항체 제작
 - ▶ 자성 복합체 제작
 - ▶ 주요 유방염 원인균 특이 자성 복합체의 활용 최적화 및 표준매뉴얼 개발
- 실험동물 감염모델을 이용하여 세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 in vivo 방어효능 분석
 - ▶ 실험동물을 이용한 젖소 유방염 감염모델 탐색 및 감염 프로토콜 확립
 - ▶ 공격접종에 따른 치사율/생존을 비교 분석
 - ▶ 실험동물을 이용한 항생제 내성균 감염에 따른 내성 제어효능 검증
- 세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 제형화 및 in vivo 안전성 분석
 - ▶ 개발된 안티센스 PNA 복합체의 제형화 및 산업화 전략 구축
 - ▶ 안티센스 PNA 복합체의 생물 및 환경 안전성 분석
 - ▶ PNA 복합체 유효농도에 비해 과용량을 각각의 실험동물에 제공하여 일정 기간 동안 관찰 후 급성 반응 또는 아급성 반응 여부 확인
- 목적동물을 활용한 임상평가
 - ▶ 현장 목적동물에 대한 치료제의 효능 평가
 - ▶ PNA 복합체 유효농도에 비해 과용량을 각각의 목적동물에 제공하여 일정 기간 동안 관찰 후 급성 반응 또는 아급성 반응 여부 확인

IV. 연구개발결과

- 국내 주요 젖소 유방염 원인균 및 항생제 내성패턴에 대한 분석
 - 지난 2003년 이후 국내 젖소 유방염 원인균의 분포 및 항생제 내성양상에 관한 문헌보고 분석을 통한 국내 주요 유방염 원인균 및 항생제 내성패턴을 확인하였으며, 2011년 1월-12월 전국 31개 목장, 711건의 유방염 관련 우유검사의뢰 샘플로부터 국내 주요 유방염 원인균 분포 및 항생제 내성양상을 분석완료 하였음
- 자성나노복합체를 이용한 유방염 원인균의 신속 고효율 진단 기술 개발
 - 국내 젖소 유방염의 주요 원인균종으로 규명된 총 7종에 대한 종 특이적 다클론항체 제작을 완료하였으며, 개발한 항체에 대한 자성 나노복합체를 제작하였음. 또한 다양한 희석배수에 대한 반응성을 비교 분석함으로써, 혼합 및 조성액을 최적화하였으며, 주요 유방염 원인균 표준균주를 활용하여 우유에 인공 접종한 뒤, 시료 전처리 및 자성나노 복합체 적용을 위한 프로토콜을 확립함은 물론 시제품 제작을 완료하였음.
- 젖소 유방염 및 항생제 내성 제어를 위한 신규 안티센스 올리고머 발굴
 - Duffield et al (2010)에 의하여 제시된 바 있는 후보유전자의 down-selection 기법을 토

대로 표적인자 후보유전자를 선별한 뒤, 최종 17종의 신규 후보유전자에 대한 선별을 완료하였고, 페니실린(*blaZ*) 및 메티실린(*mecA*) 내성유전자 총 2종에 대한 안티센스 올리고머 탐색 및 선별하였음. 또한 후보 안티센스 올리고머의 기능성 검증을 위하여 spot assay 기법을 확립하고, 검사 조건을 최적화하였음.

■ 세균침습성 펩타이드(bacterium-penetrating peptides) 선별

□변성 프라이머와 Invert fusion PCR cloning (IFPC)기법을 이용하여 녹색형광단백질(GFP)과 translational fusion 시켜 세균침습성 펩타이드 라이브러리 구축시스템을 완성하였고, 총 5,000여개의 세균침습성 펩타이드 라이브러리로부터 유효한 후보펩타이드를 선별하였음. 더불어 이들 후보펩타이드의 기능성 검증을 위하여, HTS (High-throughput screening)을 위하여 다양한 직경의 bead를 활용하여 효율적인 단백질 추출 기법을 확립하였음.

■ 주요 유방염 원인균에 대한 세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 기능성 평가

□표준 세균침습성 펩타이드와 PNA올리고머 중합체 (Peptide-PNA)를 제작하였고, 기능성 검증을 위하여 표적유전자 발현침묵효과의 정성분석을 위해 colony counting analysis 및 spot test를 실시하였고, 최소유효농도가 10~20uM 수준임을 확인하였음. 또한 transcriptional level에서의 정성정량적 분석을 위해 RNA isolation 과 Real time-quantitative PCR을 실시하였으나, 전사 수준에서 별 다른 차이를 확인하지 못하였음. Translation level에서의 발현을 모니터링하기 위하여, *cmK::lacZ* & *deoD::lacZ* translational fusion 시스템을 구축하였고, 검증 PNA 중합체가 표적유전자 발현을 용량 의존적인 방식으로 억제함을 확인하였음.

■ 항생제 내성균에 대한 세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 내성제어능 평가

□메티실린 내성 유전자(*mecA*)에 대한 표준 세균침습성 펩타이드와 PNA올리고머 중합체 (Peptide-PNA)를 제작하였고, transcription & post-transcription levels에서의 정성정량적 분석을 위해 real time-quantitative PCR과 Western 분석을 실시하였음. 병원 내 감염 MRSA의 대표 균주인 N315와 사회감염 MRSA의 대표 균주인 USA300 strain을 이용하여 분석을 실시한 결과, 전사수준보다는 단백질 합성 단계에서 발현 억제를 확인하였음.

■ 실험동물 감염모델을 이용하여 세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 in vivo 방어효능 분석

□마우스 복강접종 모델 및 마우스 유방염 감염모델을 확립하였고, 이들 모델에 개발한 세균침습성 PNA 후보물질을 다양한 농도의 유방염 원인균 공격접종에 대한 in vivo 방어효능을 검증하였음.

■ 세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 제형화 및 in vivo 안전성 분석

□제형화된 세균침습성 PNA 복합체에 대한 생체내 안전성 분석을 위하여, 마우스 유방염 감염모델을 활용하여, PPNA 과용량 처치군 과 비처치군을 10일간 관찰한 뒤, 일부 조직에 대한 조직병리학적 분석을 수행하였으며, 별 다른 독성을 확인하지 못하였음.

■ 목적동물을 활용한 임상평가

□현장 목적동물에 대한 치료제의 효능을 평가하기 위하여, 5개의 목장에서부터 체세포 50만 이상의 급성유방염 감염우의 분방에 개발된 PPNA 제제를 직접 적용한 결과, 체세포의 변화 및 분방 내 세균수의 감소 경향을 확인할 수 있었음.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

□본 연구과제로부터 개발된 세균침습성 PPNA 복합체는 2건의 특허출원을 완료하였으며, 다양한 군중에 효과적인 항균력을 발휘함은 물론, 마우스 및 목적동물인 젖소 유방염 감염우의 분방에 적용하였을 때 별 다른 부작용없이 유의성 있는 세균수 감소, 체세포수의 현저한 감소를 보였 주었음. 이러한 결과는 PPNA 기반 소재를 가축 감염질환에 사용할 수 있음을 암시함.

□따라서 개발된 세균침습성 복합체를 목적동물이 젖소에서 사용 가능하도록 승인 절차를 진행한 후, 자체상품화를 통하여 시장 선점을 기대함.

□국내 주요 젖소유방염 원인균 7종에 대한 자성복합체 역시 특허 출원을 준비 중이며, 제작된 시제품의 농가 적용을 통하여, 유방염 원인균의 신속 분리 동정 및 축산 식육가공품에 적용하여 먹거리 안전에 기여할 수 있도록 키트화하여 자체 상품화할 것임.

□본 과제로부터 개발된 성과물은 2건의 국내특허를 출원하였으며, 1건의 추가특허를 진행 중.

□선출원 후논문 원칙에 의거, 초기 계획대비 논문 발표 실적이 저조한 편이나, 2건의 특허출원이 완료된 현재 1편의 비SCI 논문과 1편의 SCI 논문을 투고 예정임.

□개발된 세균침습성 PPNA 복합체는 최초로 가축질환을 대상으로 검증된 제제이기 때문에, 향후 국가기관의 승인을 획득하기 위하여 목적동물에 대한 추가 실험 및 안전성, 안정성 분석을 시도할 예정임. 이를 위하여 과제 종료 후, 중기청 혹은 산업자원부 연구과제에 지원하여 추가 연구를 진행할 계획임.

□더불어 개발된 젖소유방염 원인균의 신속 분리 동정을 위하여, 개발된 자성복합체를 키트화 하고 실제 농장에서 기존 방법과의 비교 분석을 수행함은 물론 농가 실증 실험을 할 수 있도록 농림축산검역본부 등 유관 연구과제에 지원을 통하여 후속 연구에 활용할 계획임.

SUMMARY

(영문요약문)

The project was performed to develop a novel technology for control of bovine mastitis and the related antibiotic resistance using bacterium-penetrating antisense PNAs. To the end, we examined the prevalence and antibiotic resistance profiles of bovine mastitis-causing bacterial agents in Korea during the year 2011 and compared the data to those reported since the year 2003. The seven major causative bacterial agents associated with bovine mastitis in Korea were selected and used to develop the rapid and reliable immuno-separation technique with both the microorganism-specific polyclonal antibodies constructed in this project and the magnetic beads.

Staphylococcus aureus is an important zoonotic bacterial pathogen that has been frequently associated with food poisoning and nosocomial infections in humans as well as mastitis in dairy cows. Since the microorganism can easily acquire bacterial resistance to several antimicrobial drugs, novel antibiotics and/or non-antibiotic based anti-infective strategies need to be developed for the intervention of notorious methicillin- or multidrug-resistant *S. aureus*. Here we report a novel bactericidal peptide nucleic acid (PNA) that can antisense the cytidine monophosphate (CMP) kinase of *S. aureus*, a putative essential component for bacterial species. Based on the genome sequence of *S. aureus* N315, a set of PNA conjugates with a bacterial penetration peptide [(KFF)₃K-L-] were synthesized to antisense the seven potentially essential genes (*cmk*, *deoD*, *ligA*, *smpB*, *glmU*, *pyrH*, and *ftsA*) and further evaluated for their antibacterial properties *in vitro* as well as *in vivo*. Our experimental analyses demonstrated that two peptide conjugated-PNAs (P-PNAs) targeting either *cmk* or *deoD* genes, Pjyh-cmk1 and Pjyh-deoD1, had the strongest growth inhibitory effects against *S. aureus* ATCC 29740 (a bovine mastitic milk isolate) in a dose-dependent manner. Using a translational fusion system with the *lacZ* reporter gene, such an inhibitory effect was due to the antisense effect against the target genes rather than the antigene effect. *In vivo* application of Pjyh-cmk1 resulted in the significant reduction of bacterial loads in the

intra-peritoneally infected mice with a sublethal dose of *S. aureus* at 20 hrs post-infection. Moreover, Pjyh-cmk1 could dramatically increase the survival rate of the mice lactated after intra-mammary infection as well as seemed to be effective when applied to the mastitic cows with severe intramammary infection. Our characterization of Pjyh-cmk1 demonstrated the bactericidal activity against *S. aureus*, an important zoonotic bacterial pathogen, as well as *in vivo* effectiveness. This is another demonstration implying possible application of the antisense P-PNA as an alternative anti-infective agent.

Taken together, we developed a novel technology to control bovine mastitis and its related antibiotic resistance using bacterium-penetrating antisense PNAs as well as the rapid immuno-magnetic separation techniques against the major bacterial pathogens associated with bovine matitis in Korea. The developed anti-infective and diagnositic tools can be applicable for the clinical practice.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1.	Introduction -----	12
Chapter 2.	The status of the current technical development -----	21
Chapter 3.	The R&D contents and results -----	27
Chapter 4.	The achievement of objectives & contribution to the related fields -----	119
Chapter 5.	Research achievement & its utilization plan -----	122
Chapter 6.	International Science and Technology Information during the R&D -----	124
Chapter 7.	Research facilities & equipments -----	124
Chapter 8.	References -----	125

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	12
제 2 장	국내외 기술개발 현황	21
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	27
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	119
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	122
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	124
제 7 장	연구시설장비 현황	124
제 8 장	참고문헌	125

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적

인공 DNA 유도체로 알려진 안티센스 펩타이드핵산(Peptide Nucleic Acids; PNA)과 세균침습성 펩타이드의 상호 복합체를 개발·활용하여 주요 젓소 유방염 원인균에 존재하는 광범위 필수생존인자 및 항생제 내성인자를 암호화하고 있는 표적 유전자의 발현침묵(gene silencing)을 유도함으로써, 항균 및 항생제 내성 역전효과(reversion of antibiotic resistance)를 최적화할 수 있는 감염병 제어 신기술을 확립·검증하는 것임. 이를 통하여, 국내 축산농가는 물론 국가 사회적으로 많은 손실을 야기하는 젓소 유방염 및 항생제 내성균 극복방안을 도출하고자 함.

제 2절 연구개발의 필요성

1. 경제적 측면

가. 경제비용 손실에 따른 국가재난질환으로서 가축전염병

(1) 가축전염병의 발생으로 인한 경제적 손실은 직접피해와 간접피해 효과로 구분되며, 직접피해는 해당 가축의 수요 및 공급 측면에서 비용지불 유발액을 의미하는 반면, 간접피해는 연관산업의 판매 및 수요 감소로 인해 야기된 효과임. 국내에서 매년 발생하는 주요 소모성 가축전염병 발생으로 인한 축산농가의 직접손실액은, 소의 경우 매년 평균 약 1,100 억원, 돼지는 약 80 억원 그리고 닭은 8.8 억원으로 추정된다고 함 (송주호외, 2006).

<가축질병별 농가 직접손실액 추정>

구 분		피해금액 (억원)	총 피해액 (억원)
소	부루셀라병	673.9	1,117.9
	소결핵병	5.2	
	요네병	438.8	
돼지	콜레라	16.6	79.4
	호흡기생식기증후군	9.5	
	유행성설사병	53.3	
닭	뉴캐슬병	8.6	8.77
	추백리	0.17	

자료: 송주호 외(2006), 가축질병의 경제적 영향분석

(2) 특히 최근 국내에서 유행하였던 구제역(11개 시도, 75개 시군 총 150건; 매몰 6171호 3,453 천두) 및 조류인플루엔자(6개 시도, 21개 시군 총 47건; 매몰 261호 5,940 천수)의 발생 현황과 예상피해규모는 매몰보상비 등 직접피해액이 약 2조 9천 7백억원, 연관산업 등 간접피해액이 약 3조 5천억원으로 총 6조 4천억원에 달함 (2011.3.2. 기준). 전 세계적으로는, 2009년 5월 신종 인플루엔자 유행 당시 약 33개국 5,728명의 감염환자가 발생하였고, 이는 신종인플루엔자 대유행시 발병률을 30%라 가정할 때 총 사망비용, 직간접 의료비용 및 거시경제 비용의 합계는 27조 6천억원으로 추정되었음 ('06년 12월서울대학교 경제학부 신종 인플루엔

자 대유행의 사회·경제적 영향 추계 및 대응방안).

- (3) 이와 같이, 가축 혹은 가축유래 전염병 발생으로 인한 천문학적인 경제비용손실액은 과거와 달리 가축 전염병을 중요한 국가재난질환의 하나로 인식하게 만들었으며, 질병 발생빈도가 증가함에 따라 국가재난질환의 대응 확보가 국가 사회적 현안으로 대두되고 있는 실정임.

나. 가축전염병 관련 치료 및 백신개발에 따른 경제적 과급효과 분석

- (1) 가축 전염병의 제어전략은 크게 백신과 항감염 제제로 구별됨. 전 세계 동물약품시장을 약효별로 구분해 보았을 때 생물학적 제제로 분류되는 백신의 경우, 전 세계 동물약품시장의 약 23%인 28.5억불(USD)을 차지하고 있으며, 항감염 제제의 경우 약 16%(약 20.3억불 USD)에 이르고 있으나, 대부분 다국적 기업에 의해 주도되고 있음 (박영호, 한국미생물생명공학회지2006).
- (2) 현재 국내 동물용 백신산업은 선진국과 경쟁할 만큼 국내의 생명과학 및 수의학 관련분야 기술이 급속히 발전하였고, 국내 축산업 전반에 걸친 동물자원산업 발전에 기여하고 있음. 하지만, 동물용 백신 관련 기술이 가축 질병의 치료·예방 뿐만이 아니라 전 세계적으로 이슈화되고 있는 생물무기(두창, 탄저 등), SARS(중증 급성 호흡기증후군), AI(조류인플루엔자) 등 대유행성 인수공통전염병에 대한 대응기술 개발 등이 국가적 전략산업으로 인식되고 있는 국외 현실과 비교할 때, 국내 상황은 여전히 열악한 실정임. 특히 사회적으로 이슈화되고 있는 가축 및 인수공통의 전염성 바이러스 질병과 비교할때, 세균 유래의 감염병에 대한 대응기술 개발 및 연구기술 개발 분야의 재정 지원은 매우 취약한 실정임.
- (3) 감염성 질환은 국내 뿐만 아니라 중국, 일본, 태국, 말레이시아 등 대부분의 아시아 국가에서 발생하고 있으며(감염위험군 규모 약 20억인) 발생빈도도 매우 높고 역학적 연관성이 밀접하기 때문에, 국내에서 개발된 신종 치료 및 백신제제의 개발은 우선적으로 이들 국가에 수출하여 외화를 획득하는데 기여할 수 있을 것임. 이들 국가 대부분의 경우, 현재 경제적 어려움 때문에 감염성 질환 관련 백신 및 치료제제 개발에 많은 연구개발 투자를 하고 있지는 못하나 이들 국가들의 경제가 빠른 속도로 발전하고 있으므로 제품화되는 시기에는 연간 약 1억불 이상의 수요시장이 형성될 것으로 기대됨.

다. 젖소 유방염(bovine mastitis)에 따른 축산농가의 경제적 손실 분석

- (1) 젖소 유방염은 세균이 젖소의 유방 내에 침입하여 염증을 일으키는 질병으로 효과가 확실한 예방백신이나 치료제가 없어 감염 시에는 산유량 감소 우유등급 저하는 물론 소의 도태를 초래하여 국내에서는 연간 약 1,800억원, 미국에서는 약 20억불(USD) 등 막대한 직·간접적 경제 피해를 야기함 (2005.8.12. LG생명과학/환경일보 보도자료).
- (2) 유방염에 의한 경제적 손실에 관한 최근 보고가 제한적이지만, 미국 유방염검정협회가 조사한 바에 의하면, 유량손실, 유성분 저하 및 유제품 제조상의 손실, 우유폐기에 의한 손실, 그리고 대체우 갱신비용, 예방/치료비용, 그리고 추가 노동상의 손실액을 고려할 때 연간 1

두당 181불(USD)의 경제 손실액이 발생함을 보고하였음 (1997, 한국농촌경제연구원 연구보고 R358).

<유방염에 의한 추정 연간 손실액>

손실의 원인	소 두당 손실액 (USD)	%
생산량 감소	116.10	64
우유폐기	24.44	14
대체우 갱신비용	13.60	8
폐용우 매각액의 수익저감	9.94	5
약제비	9.68	5
진료비	4.84	3
추가노동	2.42	1
합계	181.02	100

참고자료: Current concepts of Bovine Mastitis, The National Mastitis Council, 3rd Ed, 1987

(3) 이러한 이론적, 기술적 보고를 토대로 국내에서 유방염에 의한 경제적 손실 추정액은 착유우 농가당 평균 20두, 두당 유량 연간 6,100kg, 체세포수 70만/ml이라고 가정할 경우 하루 약 42,537원 이상이며, 유방염 치료기간을 15일로 가정할 때 63.8만원의 추정손실액이 예상됨 (1997, 한국농촌경제연구원 연구보고 R358). 이러한 추정손실액이 14년 전에 이루어졌다는 사실을 고려하면, 현재의 손실액은 최소 3-5배 이상일 것으로 사료됨.

<국내 일일 경제적 손실 추정액>

종별	내역	일간추정손실액
젖소에 관련된 손실	사양관리면	215원 (0.5%)
	미감염분방 또는 젖소의 예방/치료	1,718원 (4.0%)
	감염우 폐사 및 갱신	2,792원 (6.6%)
우유에 관련된 손실	유량저하	13,500원 (31.7%)
	유성분 저하	11,030원 (25.9%)
	위생적 품질 저하	10,027원 (23.6%)
	우유폐기	3,254원 (7.7%)
기타손실	낙농가 단계	-
	유업 및 행정단계	-
계		42,536원 (100%) + a

참고자료: 한국농촌경제연구원 연구보고 R358, 1997

(4) 향후 국내를 비롯하여 미국, 브라질 등 전 세계 유방염백신 시장의 규모는 약 1,600억원에 이를 것으로 추정하고 있음. 따라서 관련 산업시장 점유 및 국가 경쟁력 확보를 위하여 신개념의 유방염 치료 및 백신개발에 대한 연구가 절실히 필요한 실정임.

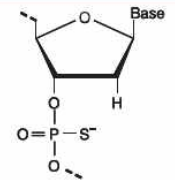
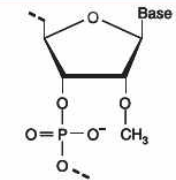
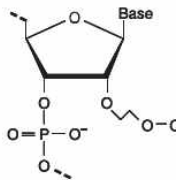
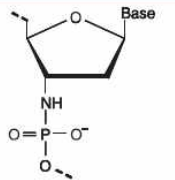
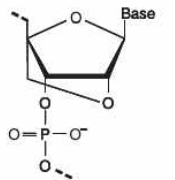
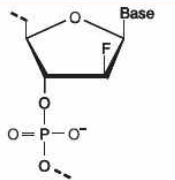
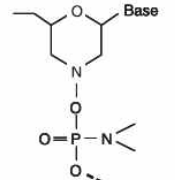
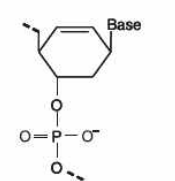
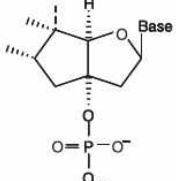
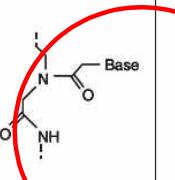
2. 기술적 측면

가. 본 과제 관련 핵심기술요소 분석

(1) 본 연구과제와 관련된 핵심기술요소로서 ① 국내 젖소 유방염 및 항생제 내성관련 주요 표적유전자 발굴기술, ② 표적유전자 발현침묵을 위한 유전자 안티센싱 기술, ③ 안티센스 PNA 합성 기술, 그리고 ④ PNA의 세포 내 도입기술이 있음.

- (2) 국내 젖소 유방염 및 항생제 내성관련 주요 표적유전자 발굴기술은 포도상구균, 장구균, 연쇄상구균, 장관병원성대장균, 살모넬라균, 비브리오균, 탄저균 등 주요 가축 병원균의 병원조절인자 및 항생제 내성인자와 관련된 본 연구팀의 선행연구 및 국내·외에서 발표된 문헌보고를 통해 확보할 수 있음. 특히 국내 젖소 유방염의 주요 원인균은 매우 다양한데, 농림축산검역본부의 최근 국내 역학 연구보고는 *Staphylococcus aureus*와 *E. coli*를 비롯하여 *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *S. pseudintermedius* 등으로 대표되는 CNS-staphylococci, 그리고 *Streptococcus uberis*, *S. oralis*, *S. bovis*, *S. agalactiae* 등으로 대표되는 Streptococci가 알려져 있음. 따라서 국내 젖소 유방염 제어를 위해서는 이들 다종 원인균을 모두 고려할 수 있는 광범위 제어전략 및 기술개발이 필요한 실정임.
- (3) 표적유전자 발현침묵을 위한 유전자 안티센싱 기술은 이미 상당수의 문헌보고를 통해 확립되어 있음. 특히 암 및 유전질환에 적용된 바 있음. 이와 달리, 세균 감염병 제어를 위한 안티센싱 전략은 과거 안티센스 올리고머의 구조적·화학적 불안정성과 운반수단의 취약성으로 인하여 널리 응용되지 못하였음. 최근 이러한 문제점을 극복할 수 있는 인공 DNA 유도체의 개발 및 세균침습성 펩타이드의 발견 등에 의하여 질병을 유발하는 바이러스 및 세균에 활용사례가 증가하고 있음. 하지만, 신규 세균침습성 펩타이드의 탐색 및 발굴, intra-strain 혹은 inter-species를 겨냥한 광범위 안티센싱 제어기술 관련 연구는 매우 미약한 실정임.
- (4) 인공 DNA 유도체인 PNA 합성기술은 과거 벨기에, 스웨덴의 발명자그룹을 중심으로 기술적으로 이미 다양한 합성기법이 개발되어 있는 실정이며, 현재 여러 응용에 적합한 형태로 합성이 가능한 상태임. 특히, 이 분야의 기술은 최근 국내 연구그룹에 의해 획기적으로 발전하였으며, 현재 대전에 위치한 (주)파나진이 PNA 합성 및 제작과 관련된 주문 공급에 대한 전 세계 독점 실시권을 확보하고 있는 실정임. 따라서 본 연구개발과제는 국내 기술력을 토대로 산업화할 수 있기 때문에 관련 분야에 대한 국가 경쟁력 확보에 커다란 기여를 할 수 있음.

<기 개발된 안티센스 인공 DNA 유도체들의 화학적 구조>

First generation	Second generation	Third generation	
 <p>Phosphorothioate DNA (PS)</p>	 <p>2'-O-methyl RNA (OMe)</p>  <p>2'-O-methoxy-ethyl RNA (MOE)</p>	 <p>N3'-P5' Phosphoroamidate (NP)</p>  <p>Locked nucleic acid (LNA)</p>	 <p>2'-fluoro-arabino nucleic acid (FANA)</p>  <p>Phosphoroamidate Morpholino (PMO)</p>  <p>Cyclohexene nucleic acid (CeNA)</p>  <p>Tricyclo-DNA (tcDNA)</p>  <p>Peptide nucleic acid (PNA)</p>

(5) 이러한 PNA의 응용기술 개발에 있어 가장 큰 장애요소는 해당 고분자 물질이 전기적으로 중성을 띠고 있어 지질로 구성된 생체막을 통과하는 효율이 너무 낮아 세포에 적용하기 어렵다는 것이었음. 즉, PNA는 전기적 성질이 없기 때문에 세포 내로 자연스럽게 확산되는 속도가 너무 낮아 지금까지 해당 응용기술 개발에 중요한 한계점으로 작용하였으나, 최근 이 부분에 대한 발전에 힘입어 세포 내부로의 침투성을 크게 증가시키는 것이 가능해 졌음. 그 결과 PNA는 임상에서의 응용이 벌써 시작되고 있음. 예를 들면, 진단 단계의 PNA를 이용한 PCR clamp는 단 하나의 염기서열 변화도 측정이 가능하여 임상연구 분야에서 활용하고 있는 실정임. 이 외에도 PNA를 FISH기법에 이용하여 염색체 상의 특정유전자 검출도 가능함이 보고된 바 있음.

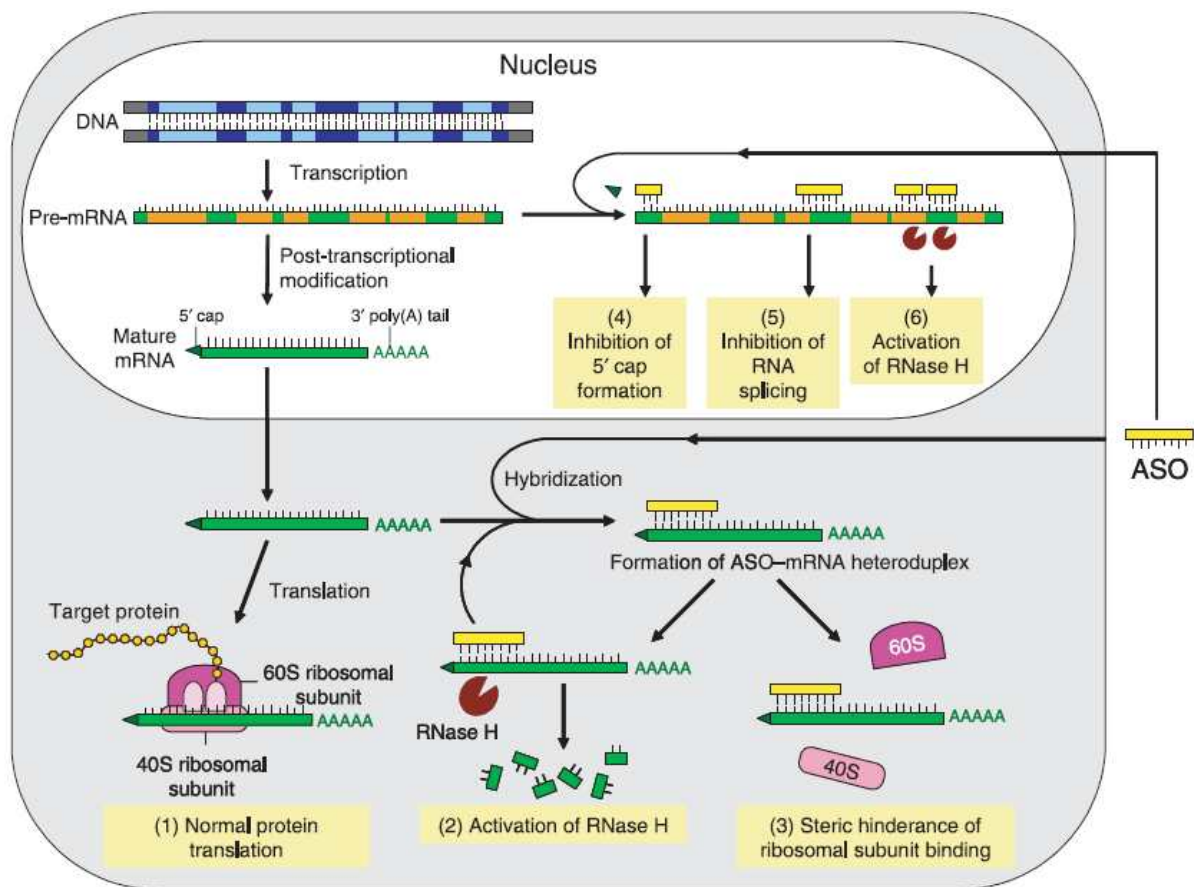
나. PNA에 의한 안티센싱 작용 관련 선행기술력 분석

(1) 안티센스 RNA를 이용한 유전자 발현조절과 PNA에 의한 유전자 발현조절은 서로 상이함이 보고되어 있음. 이는 두 물질의 구조적 유사성 때문으로 추정됨. 하지만, 안티센스 RNA의 경우 표적 유전자와 일시적인 complex 형성에 의존하는 반면, PNA의 경우 세포 내 효소들의 분해에 대하여 안정하기 때문에 안티센싱 효과는 3차 구조 복합체 형성에 의해 유도되는 것임.

(2) 또한 안티센스 RNA와 달리 PNA는 세포 내 단백질에 의하여 특별하게 인식되지 않는 화학물질이기 때문에 비특이적 면역반응을 일으키지 않는다고 알려져 있으며, 이런 이유로 안티센스 RNA를 사용하는 경우와 달리 PNA를 사용하는 경우 흔히 문제가 되는 TLR 반응이

생기지 않음. 물론 추가 연구가 필요하겠지만, 현재까지 알려진 PNA의 약리·화학적 성질은 임상에 적용하기에 충분하다고 알려져 있고, PNA 약물의 세포 내 분포도 PNA 합성기법을 변화시켜 어느 정도 수정할 수 있음.

<안티센스 올리고머(Antisense oligomer; ASO)의 활성화전에 대한 진핵세포 모델>



※ 그림설명: 세포내에 침습한 안티센스 올리고머에 의한 표적유전자 발현억제 활성화전

▶ 성숙 mRNA 활성 억제: RNaseH 활성화(2), 라이보솜 결합의 공간적 제한(3)

▶ mRNA 전구체 활성 억제: 5' cap 형성 억제(4), RNA splicing 억제(5), RNaseH 활성화(6).

(3) 위에서 언급했듯이, PNA의 세포 내 도입문제는 응용기술개발의 중요한 고려사항임. 흥미롭게도 쥐를 대상으로 한 생체 내 PNA 도입 성공연구결과는 PNA를 transferring receptor binding monoclonal antibody로 복합체를 만들어 적용할 경우 정맥주사에 의해 PNA를 뇌 부위로 도입할 수 있음을 증명하였음. 이러한 결과는 PNA가 blood-brain barrier를 넘어서 이동할 수 있음을 암시하는 것임. 이렇듯 PNA를 변화없이 그냥 사용하기 보다는 특정분자/단백질과 복합체로서 적용할 경우 세포 내부로 도입이 용이하다고 보고된 바 있음. 예를 들면, 세포 침습성을 가지는 HIV의 pTat를 사용하는 경우라든지 복합체를 구성한 물질의 translocation 작용을 이용하는 경우가 그러함. 본 연구과제에서는 세균 특이적인 침습성 펩

타이드를 기존 문헌보고를 토대로 탐색·개량함은 물론 신규 세균침습성 펩타이드를 개발·검증함으로써, 개발된 PNA의 세균 내 도입율을 최적화 할 것이며, 이는 본 연구팀 및 국내 기술력으로 충분히 수행 가능한 실정임.

3. 사회적 측면

가. 가축질병 제어용 신기술 개발에 대한 사회적 인식 증대

- (1) 가축질병 제어는 최근 축산물 및 축산물 가공품의 소비증가, 국제교역 증대, 항생제 내성 확산, 그리고 신·변종 인수공통전염병 출현 등으로 인하여 커다란 국가 사회적 현안으로 대두되고 있음. 따라서 최근 국가재난 대응책의 일환으로 주요 신·변종 바이러스성/세균성 감염병 제어를 위한 치료 및 백신제제의 개발과 관련된 R&D 전략이 수립·활성화되고 있으나, 대부분 기존 백신의 개량화, 신규 면역증강제 개발, 혹은 항생제 대체제 개발 등 기존 치료 및 백신제제의 문제점을 보완·개선하는 연구에 집중되어 왔음.
- (2) 또한 국가 간의 교류가 급속히 확대되고 가축 전염병의 국경 개념이 더욱 희박해지는 상황에서 국가 간의 기술개발 경쟁은 더욱 치열해지고 있고 기술선점을 위한 지적소유권 분쟁도 더욱 강화되고 있는 추세임. 따라서 국내에서도 기존 치료 및 백신제제 개발전략과 첨단 분자생물학적 기법을 잘 조화시킴으로써 부작용을 최소화하고 효능을 극대화 할 수 있는 가축 질병 및 항생제 내성 제어를 위한 신기술 개발에 총력을 기울여야 함.

나. 국가재난질환에 대한 대응기술개발의 필요성

- (1) 가축 및 인수공통의 국가재난질환에 대한 적절한 관리와 대응을 위해서는 우선적으로 부족한 감시시스템을 보강해야 할 필요성이 있음. 특히 지역 간, 국가 간의 상호 협력을 통한 초기 감시시스템을 보강하고 이를 위한 지속적인 관심과 투자가 필요함. 조기 발견 및 진단법의 미흡은 궁극적으로 국민의 건강과 재산에 더 많은 피해를 가져오기 때문에 이에 대한 인력과 예산 보강은 물론 보다 감도 높은 진단법과 신속한 대처가 필요함. 하지만 이러한 전염성 질환의 발생이 현실화될 경우, 이들 질병의 효과적인 제어를 위한 치료 및 예방제제의 지속적인 연구개발 및 사전 대응기술 확보는 국가 사회적인 요구임.
- (2) 이러한 추세에 부응하여, 본 연구에서는 최근 인공 DNA 유도체로서 구조적으로 DNA와 유사하지만, 기본 골격구조가 폴리펩타이드로 구성되어 매우 높은 안정성을 보유하고 있으며, 특히 기존에 알려져 있는 핵산분해효소들에 의하여 인식되지 않기 때문에 생체 내에서 거의 분해되지 않고, 국내에서 대량생산이 가능하여 비용절감을 이룰 수 있는 펩타이드 핵산(PNA)과 세균침습성 펩타이드 간 상호복합체 개발을 통하여 표적유전자 발현침묵(gene silencing)에 의한 국내 젓소 유방염 원인균 및 주요 항생제 내성인자 발현을 제어할 수 있는 신기술을 개발·검증하고자 함.

제 3절 연구개발의 범위

본 과제는 인공 DNA 유도체로 알려진 안티센스 펩타이드핵산(Peptide Nucleic Acids; PNA)과 세균침습성 펩타이드의 상호 복합체를 개발·활용하여 주요 젓소 유방염 원인균에 존재하는

광범위 필수생존인자 및 항생제 내성인자를 암호화하고 있는 표적 유전자의 발현침묵(gene silencing)을 유도함으로써, 항균 및 항생제 내성 역전효과(reversion of antibiotic resistance)를 최적화할 수 있는 감염병 제어 신기술을 확립·검증하는 것을 목표로 수행되었으며, 이를 통하여, 국내 축산농가는 물론 국가 사회적으로 많은 손실을 야기하는 젖소 유방염 및 항생제 내성 균 극복방안을 도출하고자 함. 연구목적 달성을 위하여, 본 과제는 제1 세부과제와 제1 협동과제로 구성, 과제 상호간 유기적인 협력체계를 구축하여 아래와 같은 세부연구내용을 연구범위에 포함.

제1 세부과제 (강원대)	국내 젖소 유방염 및 항생제 내성 제어를 위한 세균침습성 안티센스 PNA 복합체 개발
--------------------------	--

■ 젖소 유방염 및 항생제 내성 제어를 위한 신규 안티센스 올리고머 발굴

- ▶ 국내 주요 젖소 유방염 원인균 및 항생제 내성패턴에 대한 분석
- ▶ 주요 원인균에 존재하는 광범위 필수생존인자 탐색 및 안티센스 올리고머 선발
- ▶ 주요 항생제 내성 관련 표적인자의 탐색 및 후보 안티센스 올리고머 선발
- ▶ 후보 안티센스 올리고머의 기능성 검증시스템 구축
- ▶ 안티센싱 효과의 비교 분석을 통한 최적 안티센스 올리고머 결정

■ 세균침습성 펩타이드(bacterium-penetrating peptides) 선별

- ▶ 세균 침습성 펩타이드 탐색, 설계 및 합성
- ▶ 표지물질을 이용한 세균침습성 검증시스템 구축
- ▶ 후보 펩타이드의 세균 침습효과 비교 분석

■ 주요 유방염 원인균에 대한 세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 기능성 평가

- ▶ 선발된 광범위 필수생존인자에 대한 세균침습성 안티센스 PNA 복합체 제작
- ▶ 합성된 안티센스 PNA 복합체에 의한 표적유전자 발현침묵효과의 정성·정량적 분석

■ 항생제 내성균에 대한 세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 내성제어능 평가

- ▶ 선발된 항생제 내성인자에 대한 세균침습성 안티센스 PNA 복합체 제작
- ▶ 합성된 안티센스 PNA 복합체에 의한 표적유전자 발현침묵효과의 정성·정량적 분석

제1협동과제 [(주)중검]	세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 임상 적용성 분석
---------------------------	--------------------------------------

■ 자성나노복합체를 이용한 유방염 원인균의 신속 고효율 진단 기술 개발

- ▶ 표준/분리주 중심의 특이 마커 탐색, 발현 및 특이항체 (다클론) 제작
- ▶ 혼합 및 조성의 최적화
- ▶ 원유 내 다양한 오염 미생물 마커 탐색 및 특이항체 제작

- ▶ 자성 복합체 제작
- ▶ 주요 유방염 원인균 특이 자성 복합체의 활용 최적화 및 표준매뉴얼 개발

■ 실험동물 감염모델을 이용하여 세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 in vivo 방어효능 분석

- ▶ 실험동물을 이용한 젖소 유방염 감염모델 탐색 및 감염 프로토콜 확립
- ▶ 공격접종에 따른 치사율/생존율 비교 분석
- ▶ 실험동물을 이용한 항생제 내성균 감염에 따른 내성 제어효능 검증

■ 세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 제형화 및 in vivo 안전성 분석

- ▶ 개발된 안티센스 PNA 복합체의 제형화 및 산업화 전략 구축
- ▶ 안티센스 PNA 복합체의 생물 및 환경 안전성 분석
- ▶ PNA 복합체 유효농도에 비해 과용량을 각각의 실험동물에 제공하여 일정 기간 동안 관찰 후 급성 반응 또는 아급성 반응 여부 확인

■ 목적동물을 활용한 임상평가

- ▶ 현장 목적동물에 대한 치료제의 효능 평가
- ▶ PNA 복합체 유효농도에 비해 과용량을 각각의 목적동물에 제공하여 일정 기간 동안 관찰 후 급성 반응 또는 아급성 반응 여부 확인

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국내외 기술개발 현황

1. 국내 유방염 관리현황

가. 젖소 유방염 방제사업 실시

(1) 젖소 유방염은 국내 젖소 농가에 큰 피해를 주고 있는 질병 중 하나이기 때문에, 정부에서는 감염우의 조기 발견과 감수성 있는 항생제 선발을 통한 조기치료 및 원유 위생관리를 통해 유방염으로 인한 경제적 손실을 줄이고 소비자에게 안전하고 위생적인 축산물을 공급하기 위한 목적으로 지난 90년대 부터 매년 전국적으로 유방염 방제사업을 실시해오고 있음.

(2) 국내 젖소 유방염의 효율적 방제와 치료·예방을 위하여 지난 2004년부터 2007년까지 전국적으로 총 12,686농가의 젖소 약 21만두로부터 약 69만개 분방의 원유(quarter milk)에 대한 유방염검사를 실시한 결과, 44,391 두 (21.2%), 71,449 분방 (10.4%)이 유방염에 감염된 것으로 확인되었으며, 년도별 유방염 발생률은 2004년 26.4%, 2005년 23.9%에서 2006년과 2007년에는 각각 16.4% 및 17.4%로서 통계학적으로 유의성이 있는 감소 추세를 보여주었음.

- ▶ 가장 빈번하게 분리된 원인균은 포도상구균 (42.6%)이었고 이어서 대장균 (15.8%) 및 연쇄상구균 (13.7%)도 높은 분리율을 보여줌.
- ▶ 이들 유방염 원인균에 대한 약제감수성 결과를 보면 황색포도상구균의 경우 Cepha 계열, Streptomycin 등이 비교적 감수성이 높은 것으로 나타났으며, 대장균은 아미카신 및 겐타마이신에 연쇄상구균은 세파계열 및 암피실린에 대해 각각 높은 감수성을 나타내었음.

(3) 하지만, 젖소 유방염 치료 및 백신제제 개발을 위한 정부차원의 노력 및 연구개발 지원은 아직 미약함.

2. 유방염 제어용 치료 및 백신제제 개발 현황

가. 국내

(1) 국내 젖소 유방염 치료 및 백신제제 개발은 아직 미미한 실정이며, 최근까지 2건의 개발보고가 있음.

(2) 2005년 LG생명과학이 개발에 성공한 유방염백신(마스타백; MastarVac)은 미국 아이다호대학(University of Idaho)의 포도상구균 장내독소(SEC; Staphylococcal Enterotoxin C)에 대한 약독화기술을 원천특허로 이용하여 유전자 재조합 기술로 변형, 대량 배양에 성공한 젖소 유방염 백신(Bovine Mastitis Vaccine)으로 국내 최초 개발사례임. 특히, 이 제품은 포도상구균에 의한 감염 예방 효과 뿐만 아니라, 체세포 감소 등의 유방염 증상 완화 및 젖소의 면역력을 개선시켜 주는 면역증강 효과가 뛰어나, 유방염의 예방 및 증상 개선이 동시에 가능한 장점이 있음. 하지만, SEC를 겨냥한 백신이기 때문에, 균 자체에 대한 치료백신은 아님.

(3) 2007년 박테리오파지를 이용한 젖소 유방염의 주요 원인균 제거기술이 국내 바이오벤처회사인 인트론바이오테크놀로지에 의해 개발되었음. 개발된 박테리오파지(세균바이러스)를 이

용하여 젖소 유방염의 주요 원인균인 황색포도상구균을 제거할 수 있는 기술로서, 자연에서 추출한 박테리오파지를 황색포도상구균에만 작용하게 해 제거함. 즉 젖소에 투여된 박테리오파지가 황색포도상구균을 찾아 제거하는 반면, 다른 건강한 세포나 유익한 균들에게는 아무런 해가 없는 특징이 있음. 기존 SEC 재조합백신과 비교하여 주요 젖소 유방염 원인균인 황색포도상구균에 특이적임은 물론 항생제 내성균에 적용할 수 있다는 장점이 있음. 하지만, 자연계에서 박테리오파지 확산 및 유전자의 수평전파 등으로 인한 신·변종 병원균 출현 등과 같은 생물학적 안정성 문제가 있음.

- (4) 2010년 서울대 수의대 연구팀과 국립수의과학검역원의 공동연구에 의하여, 유방염 다제내성 주요 원인균에 대한 *Lactococcus lactis* NK34 균주로부터 추출한 박테리오파지 Lacticin NK34의 항균효과를 조사한 바 있음. 특히 국내 주요 젖소 유방염 원인균인 *S. aureus*와 *S. agalactiae*에 대한 항균효과를 증명하였으나, 아직 초보단계의 연구진행 중임.

나. 국외

- (1) 국내와 비교하여, 다양한 형태의 유방염 백신이 개발되어 시판되고 있으며, DNA 및 재조합단백질 백신개발 관련 연구가 활발히 진행 중임.
- (2) 현재 미국에서 상업적으로 시판되는 유방염 백신은 황색포도상구균(*S. aureus*) 과 대장균(*E. coli*)에 의해 유발되는 유방염에 대한 면역백신 주사제임. Somato-Staph과 Lysigin은 살균바이러스 타입 I, II, III, IV와 혼합 *S. aureus* 그룹이 포함된 체세포 항원인 반면, J-5 Bacterin과 Mastiguard는 대장균 세균백신으로 동일한 백신임. 또한 J Vac이라고 하는 세균백신-독소이드 제품도 시판되고 있음. 유럽에서는 Startvac이라고 하는 액체 파라핀 면역증강제가 함유된 유방염 백신이 herd 단위의 면역을 위하여 널리 사용되고 있음.

3. PNA에 의한 질병제어 관련 기술개발 현황

가. 국내

- (1) PNA(Peptide Nucleic Acid)는 DNA의 생화학적인 불안정성 보완을 위해 1991년 유기합성으로 개발된 인공DNA로서, 핵산화학 분야의 세계적 권위자인 닐슨박사(Dr.Nielsen)와 에그홀름 박사(Dr.Egholm) 등 4명의 인물로 구성된 코펜하겐 발명자그룹에 의해 개발되었음.
- (2) 미국의 글로벌 바이오 기업 ABI는 PNA 발명 다음해인 1992년부터 2006년까지 약 15년간 PNA를 생산, 판매해 왔으나, 국내 바이오소재 전문기업 (주)파나진이 연구개발 착수 4년만인 2005년 PNA 양산기술 개발에 성공하였고 PNA의 세계 시장 독점 사업권을 획득하였음. 따라서 향후 PNA는 세계적으로 한국 기술로만 생산 됨.
- (3) (주)파나진에 의한 PNA의 국내 대량생산기술 및 시스템 구축은 PNA의 가격을 현재의 1/100로, 주문에서 생산까지 소요 기간은 기존 2-6개월에서 20일 이내로 각각 줄어들며 순도는 20% 이상 향상되어, 95% 이상의 고순도 PNA 생산이 가능해 졌음. PNA 생산량에 있어서는 현재 기술적 한계로 지적돼온 최대 생산량 100g의 한계가 깨져, 전임상과 임상3상 적용이 가능한 1,000kg 규모의 PNA 생산이 가능한 상태임.

- (4) 하지만 이러한 국내 기술력에도 불구하고, 질병유전자 억제에 위한 PNA 응용기술 연구개발 분야는 아직 초보적인 수준임.

나. 국외

- (1) 국내와 달리, 국외연구그룹을 중심으로 miRNA 저해제, 안티젠 및 안티센스 치료제, 진단제 개발 연구에 폭 넓게 활용되어 왔음.
- (2) 특히, 최근 연구결과는 펩타이드와 결합된 PNA가 세균의 RNA를 억제하여 최종적으로 세균을 죽이는 역할을 함을 입증하였음(Nekhotiaeva et al., 2004). 세균의 경우 고등세포와 달리 유전자 발현기작이 비교적 단순하고 잘 알려져 있으므로 대부분 세균에 잘 보존되어 있는 유전자 부위를 PNA의 중요한 표적부분으로 이용하였음.
- (3) PNA를 사용한 질병 유전자 억제에 대한 최근 연구추세는 항생제에 저항성을 획득한 세균의 drug efflux pumping 시스템이 PNA를 인식하지 못하는 지에 집중되어 있음. 이는 여러 항생제에 복합저항성을 획득한 수퍼박테리아의 치료에 응용하기 위함인데, 즉 PNA가 다제내성 균주의 pumping 대상이 되지 않을 경우, 적절한 PNA를 고안·개발하여 세균의 성장을 항생제와 상관없이 억제할 수 있기 때문임. 현재 이 기법이 실용화 될 수 있는 가능성이 있는데, 실제로 PNA에 의해 RNA 발현을 억제할 경우 병원균의 항생제 예민성이 크게 증가함이 증명되었음 (Dryselius et al., 2005).
- (4) 최근까지 다수의 안티센스 PNA 임상적용사례가 보고되어 있음. 특히 HIV, B/C형 간염바이러스 등 의학적으로 중요한 바이러스의 경우 서로 간에 잘 보존된 구조 염기서열 부분을 표적으로 한 PNA의 적용은 바이러스 성장을 억제할 수 있음이 증명되어 앞으로 활용가능성이 매우 높음. 아래 표는 현재 임상적용이 진행 중인 안티센스 PNA를 예시하고 있음.

Table 1 Antisense oligonucleotides in clinical trials

ASO	Gene target	Generation	Delivery
LErafAON-ETU	<i>c-raf-1</i>	PS	Systemic
Oblimersen (G3139)	<i>Bcl-2</i>	PS	Systemic
RESTEN-MP	<i>c-myc</i>	PMO	Systemic
AVI-4126	<i>c-myc</i>	PMO	Systemic
OGX-011	Clusterin	2'-MOE	Systemic
GTI-2040	Ribonucleotide reductase	PS	Systemic
TPI-ASM8	Cytokine receptors	PS	Aerosol
ASO	Dystrophin	PMO	Systemic
AP 12009	TGF- β 2	PS	Intratumoral
Alicaforsen	ICAM-1	PS	Systemic/enema
ISIS 104838	TNF- α	2'-MOE	Subcutaneous
ISIS 3521	PKC α	PS	Systemic

ASO, antisense oligonucleotide; PS, phosphorothioate; PMO, phosphoroamidate morpholino oligomer; 2'-MOE, 2'-O-methoxyethyl; TGF- β 2, transforming growth factor- β 2; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; TNF- α , tumour necrosis factor- α ; PKC α , protein kinase C α .

4. PNA의 세포 내 도입 관련 연구현황

가. 국내: (주)파나진의 국내 PNA 대량생산체계 구축과 달리, PNA의 세포 내 도입 관련 연구는 현재 국내에서 전무한 실정임.

나. 국외: 활발한 연구가 진행 중임. 세포 내 PNA의 도입을 시도한 방법을 정리하면 아래 표와 같음. 과거에는 세포내 도입되는 PNA의 양을 생물학적 분석기법에 의해 측정하였으나, 최근의 기술발전은 PNA에 형광물질을 직접 붙여 형광발현양을 측정하는 방식이 가능함. 비록 국내 연구가 미진하지만, 현재 세포 내 도입을 위한 기법들은 이미 국내에서 충분히 적용 가능한 기술력을 보유하고 있다고 판단됨.

<PNA의 세포 내 도입 방법 및 검출법 요약>

PNA 형태	운반방법	PNA농도 (uM)	세포 종류	검출법	참고문헌
Mixed-base(Mb)-15mer/ unmodified	직접도입	>30	H9 세포 (HIV-infected)	antisense/ FACS	Sei et al., 2000
Mb-21mer/ Transportan	CPP (cell-penetrating protein)	1	Bowew melanoma	IF (avidin conjugated)	Pooga et al., 1998
Mb-13mer/ 4-Amino acids-fluorescein	Insulin-like growth factor receptor-mediated	1	P6 세포	¹⁴ C 흡수량	Basu and Wickstrom, 1997
Mb-13mer/ (Lactose)8-rhodamine	Asialoglycoprotein receptor-mediated	1	HepG2	IF (telomere inhibition)	Zang et al., 2001
Mb-13mer/ Thodamine	Liposome	1	DU145 (전립선 암세포)	IF/FACS (telomere inhibition)	Hamilton et al., 1997
bisPNA/ Lysine-fluorescein	Streptolysin O	1	3340 세포 (mouse fibroblast)	IF/FACS	Faruqiet al., 1998
bisPNA	Electroporation	2-5	K562세포	유전자발현	Wang et al., 1999
7-mer bisPNA (rRNA)	직접도입	-	대장균	성장억제	Good and Nielsen
10-15-mer (b-lactamase/b-galac tosidase)	직접도입	-	대장균	효소활성	Good and Nielsen
10-mer (acpP)	랩타이드복합체	-	대장균	성장억제	Good et al
참고문헌: BioWave 9(12), 2007					

5. 국내 가축질병 제어를 위한 연구기술개발 역량에 대한 SWOT 분석

강점(strength)	약점(weakness)
<ul style="list-style-type: none"> • 적극적인 정부의 의지 • 가축 및 인수공통전염병에 대한 국민의 관심 증가 • 연구개발 인프라 기반 우수 • 질병 진단, 예방 및 치료제 관련 시장의 지속적 성장 	<ul style="list-style-type: none"> • 원천기반 신기술 축적 부족 • 원천 기술 상용화 경험 미흡 • 선진국 대비 정부 지원규모 미약 • 현재 위협이 되는 일부 전염병에 대한 연구 지원 집중화
기회(opportunity)	위협(threat)
<ul style="list-style-type: none"> • 가축 전염병 등 국가재난질환에 대한 대응기술개발에 대한 수요 증가 • 항생제 내성균 확산에 따른 사회적 경각심 증대 • 첨단기술 접목에 따른 기술적 파급효과 • 관련 기술 기술선점 가능성 높음 • 신기술의 제품화 초기 단계 • 신기술의 상업화 가능성 	<ul style="list-style-type: none"> • 새로운 형태의 인수공통전염병 증가 • 선진국 대비 국내 요소 기술력 취약 • 신흥 기술 강국의 부상 가능성 • 치료 및 백신제제의 산업화 의지 미약

제 2절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

1. 기존 기술의 문제점 및 전망

- ▶ 표적유전자에 대한 유전자 침묵을 유발하는 인공 DNA 유도체의 일종인 안티센스 PNA의 기능은 최초 개발된 1991년 이후 지속적으로 확인되고 있음. 예를 들면, ① 실험실에서 합성하기 쉬우며, ② 펩타이드를 불임으로서 새로운 기능을 도입할 수 있고, ③ 필요에 따라 형광물질을 붙이거나 이온을 결합시켜 용해도와 세포내 흡수력을 증가시키기 용이하다는 점 등의 장점을 가지고 있음. 하지만, 안티센스 PNA의 기능성을 고려할 때 ① high-affinity binding, ② stringent sequence specificity, ③ 세포 내 도입 효율(침투성) 이상 세 가지 요인의 적절한 균형이 필수적임. 또한 PNA가 세포 내 분해에 아주 강하지만 임상에 도입되기 위한 약리·약동학적 연구는 거의 없는 상황이므로 이 부분에 대한 추가 연구가 필요함.
- ▶ 그럼에도 불구하고, PNA를 이용한 표적유전자의 안티센싱 전략 및 응용기술은 이미 다양한 의약산업 분야에서 적용되고 있으며, 앞으로 다양한 기초의학 연구분야로 확대될 것으로 예상됨. 또한 유전자 치료에 관한 PNA의 응용 역시, PNA 복합체 형태로의 다양한 치료전략 개념으로 활발히 연구되고 있음. 특히 PNA는 단 하나의 염기서열 차이가 있어도 전체 유전체에서 검출 가능할 정도의 specificity를 보유하고 있어, 향후 유전병을 일으키는 돌연변이 추적이나, 병원성 세균 및 바이러스 감염의 초기 진단 수단으로서, 암세포 억제 연구, 병원미생물학, 바이러스학 등에서 폭넓게 응용될 수 있을 것으로 전망함.

2. 본 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치 혹은 파급효과

- ▶ 최근까지 국내외에서 보고된 PPNA 기반의 기술은 대부분 암과 같은 질병 진단이나 유전질환의 조기진단에 집중되어 있었으며, 세포 수준에서 PPNA가 유효함을 증명하는 정도였음.
- ▶ 하지만, 본 연구과제에서는 기존의 PPNA 기반 기술을 진단분야에서 치료 분야로, 세포수준에서 개체수준으로 진일보하는 토대를 제공하였음. 특히 PPNA 복합체를 가축감염질환에 직접 적용하였고, 감염질환 억제 혹은 제어가 가능함을 실험동물과 목적동물에서 실증한 최초의 연구결과임.
- ▶ 따라서 본 연구과제를 통하여 획득한 연구성과물은 향후 PPNA 기반 기술을 사람과 동물의 감염질환에 광범위하게 적용 할 수 있는 proof-of-concept이 될 것이며, 관련 의약업계에 원천기술로 기여할 수 있음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1세부과제

국내 젖소 유방염 및 항생제 내성 제어를 위한 세균침습성 안티센스 PNA 복합체 개발

■ 젖소 유방염 및 항생제 내성 제어를 위한 신규 안티센스 올리고머 발굴

(1) 국내 주요 젖소 유방염 원인균 및 항생제 내성패턴 분석 결과 (2006년 이후)

가. 최근 문헌보고 분석 결과: 국내 젖소에서 주요 유방염 원인균 및 균종별 분리빈도 분석: 지난 2006년부터 2010년까지 국내 젖소 유방염 원인균 분리 및 항생제 내성 관련 문헌조사를 바탕으로, 최근 국내에서 발생하는 주요 유방염 원인균의 분리빈도 및 주요 원인균에서의 항생제 내성 추이에 대한 분석을 실시하였음.

▶ 국내 젖소에서 주요 유방염 원인균 및 균종별 분리빈도

- 원인균 분포양상: 2008년의 경우, 황색포도상구균이 12.2%, Coagulase negative staphylococci (CNS)가 40.7%로서 Staphylococcal spp.가 50% 이상의 높은 분리비율을 보였다. 대장균 (4.5%) 및 기타 그람음성균 (19.5%)이 그 다음으로 많은 비율을 차지하였고, *Streptococcus uberis*(5.3%) 및 기타 환경성연쇄상구균 (3.1%)도 비교적 분리율이 높았음. 한편, 장구균 및 *Corynebacterium*의 경우, 각각 4.8% 및 1.2%가 분리되었고, 그람음성균 중에서는 *Acinetobacter* spp.와 *Pseudomonas* spp.가 가장 빈번히 분리되었음. 그 외에 *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas* spp., 및 *Serratia marcescens*도 비교적 분리율이 높게 나타났음. 표1은 2006년-2010년 동안 국내 젖소 준임상형 유방염우의 분방별 우유샘플로부터 원인균 분포양상을 정리한 것으로, 56.2%가 포도상구균 종에 의해 문제가 되고 있음을 알 수 있음.

표1. 국내 젖소 준임상형 유방염 분방별 우유샘플로부터 원인균 분포양상 (2006년-2010년 결과)

Pathogens		Number of isolates %					
		Total	2010	2009	2008	2007	2006
Staphylo-cocci	<i>S. aureus</i>	386 (18.8)	72 (36.9)	78 (31.8)	56 (11.0)	115 (25.4)	65 (9.8)
	CNS	792 (38.4)	61 (31.2)	100 (40.8)	203 (40.1)	117 (25.9)	311 (46.9)
Enterococcispp.		99 (4.8)	4 (2.0)	12 (4.8)	21 (4.1)	34 (7.5)	28 (4.2)
Streptococci spp.		141 (6.8)	4 (2.0)	10 (4.0)	43 (8.5)	25 (5.5)	59 (8.9)
Gram-negative bacilli		503 (24.4)	24 (12.3)	13 (5.3)	107 (21.1)	160 (35.4)	199 (30.0)
Others		137 (6.6)	30 (15.3)	32 (13.0)	75 (14.8)	-	-
Total		2,058 (100.0)	195 (100.0)	245 (100.0)	505 (100.0)	451 (100.0)	662 (100.0)

* 자료: 농림수산검역검사본부 (2006-2010년)

- **국내 젖소 유방염의 주요원인균 분포 양상의 변화 감지:** 과거 전염성유방염의 주요 원인균으로 알려져 있는 *S. aureus*와 *Strep. agalactiae*의 분리율을 26.0% 및 10%라고 보고된 바 있으며 (1974, 손 등), 1986년 강 등은 20.6%와 24.7%, 1991년 박과 석 등의 경우 28.3% 및 9.1%이 보고했던 것을 볼 때, 상기 결과는 대조적이었음. 비록 한정된 지역만을 대상으로 하였지만, 2004년에 실시된 김 등의 결과는 *Strep. agalactiae*가 전혀 분리되지 않았으며, 이는 최근 2010년 조사한 결과와도 유사하였음 (표2). 상기에서 기술한 바와 같이 *S. aureus*와 CNS 균종의 빈도가 높았지만, *S. aureus*와 더불어 주요 전염성 유방염 원인균으로 알려져 있는 *Strep. agalactiae* 나 *Strep. dysgalactiae*는 분리율이 매우 낮거나 거의 분리가 되지 않았으며, 이는 국내 젖소 유방염의 주요 원인균 분포 양상이 과거와 달리 변화가 있음을 암시함.

표2. 2010년 유방염 우유샘플에서 원인균 분포율 (체세포수 20만/ml 이상)

Bacterial isolates	Number of isolates (%)	% of all milk samples
<i>Staphylococcus aureus</i>	51 (12.2)	4.0
CNS.	169 (40.7)	13.4
<i>E. coli</i>	19 (4.5)	1.5
Gram-negative bacteria	81 (19.5)	6.4
<i>Streptococcus uberis</i>	22 (5.3)	1.7
Environmental <i>Streptococcus</i> spp.*	13 (3.1)	1.0
<i>Enterococcus</i> spp.	20 (4.8)	1.5
<i>Corynebacterium</i> spp.	5 (1.2)	0.3
<i>Aerococcus</i> spp.	11 (2.6)	0.8
Unidentified bacteria	24 (5.7)	1.9
Total	415 (100.0)	1,255

* Environmental Streptococci other than *Streptococcus uberis* (Source) Nam et al.(2010).

- **CNS 종의 다양성:** 아래 표는 2003년-2008년 동안 국내 젖소 유방염 우유에서 분리된 14종의 CNS에 대한 분포율을 보여줌. 흥미롭게도, 다양한 CNS 종이 발견되었으며, 특히 *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *S. auricularis*가 상당히 높은 비율로 분포하고 있었음 (표3).

표3. 국내 젖소 유방염 우유로부터 분리된 CNS 균종 (2003-2008년)

Bacterial spp.	Number of isolated bacteria (%)						
	2003 (n=402)	2004 (n=286)	2005 (n=245)	2006 (n=273)	2007 (n=107)	2008 (n=131)	Total (n=1,444)
<i>S. simulans</i>	126 (31.3)	102 (35.6)	65 (26.5)	46 (16.8)	18 (16.8)	32 (24.4)	389 (26.9)
<i>S. haemolyticus</i>	83 (20.6)	71 (24.8)	53 (21.6)	34 (12.4)	24 (22.4)	10 (7.6)	275 (19.0)
<i>S. sciuri</i>	124 (30.8)	19 (6.6)	38 (15.5)	11(3.8)	7 (6.5)	11 (8.4)	210 (14.5)
<i>S. auricularis</i>	2 (0.5)	3 (1.0)	11 (4.5)	66 (24.1)	26 (24.3)	54 (41.2)	162 (11.2)
<i>S. xylosus</i>	18 (4.5)	41 (14.3)	35 (14.3)	16 (5.8)	7 (6.5)	9 (6.9)	126 (8.7)
<i>S. warneri</i>	14 (3.5)	10 (3.5)	7 (2.9)	14 (5.1)	8 (7.5)	4 (3.1)	57 (3.9)
<i>S. epidermidis</i>	10 (2.5)	13 (4.5)	12 (4.9)	10 (3.6)	2 (1.9)	1 (0.8)	48 (3.3)
<i>S. hominis</i>	6 (1.5)	6 (2.1)	6 (2.4)	10 (3.6)	4 (3.7)	4 (3.1)	36 (2.4)
<i>S. saprophyticus</i>	7 (1.7)	14 (4.9)	2 (0.8)	6 (2.1)	4 (3.7)	0 (0.0)	33 (2.2)
Others ^a	12 (3.0)	7 (2.4)	16 (6.5)	60 (21.9)	7 (6.5)	6 (4.6)	108 (7.4)

^aIncluded 38 CNS isolates identified to the species level (17 *S. cohnii*, 10 *S. hyicus*, 6 *S. capitis*, 4 *S. lentus*, and 1 *S. intermedius*) and 70 unidentified CNS isolates.

참고자료: Nam et al., JMB 20(10), 2010

▶ 국내 젖소에서 분리된 주요 유방염 원인균의 항생제 감수성 추이 분석 결과

- **황색포도상구균의 항생제 내성:** 황색포도상구균은 예나 지금이나 가장 중요한 유방염 원인체로서, 이 균에 의한 유방염은 치료가 어렵고 주변의 젖소에 계속 전파되기 때문에 감염우는 결국 도태할 것을 권장하고 있는 실정임. 2003-2010년까지 주로 준임상형 유방염 시료에서 분리된 황색포도상구균은 세파로틴, 클린다마이신, 반코마이신, 노보바이오신, 페니실린/노보바이오신 합제 등 조사한 대부분의 항생제에 감수성을 보인 반면, 페니실린(암피실린)에 대해서는 약 66%의 균주가 내성을 보여 예외적으로 높은 내성률을 나타내었음. 그 외에 10% 내외의 균주만이 내성을 나타냈던 항생제는 겐타마이신 (11.9%), 에리스로마이신 (7.7%), 세폭시틴 (메티실린, 6.2%), 및 테트라사이클린 (4.2%)의 순으로 나타났음. 페니실린내성뿐만 아니라 사람에서 특히 중요한 항생제인 겐타마이신 및 메티실린에 내성을 보이는 균주의 비율도 예전에 비해 점차 높아지고 있는 경향을 보여 주었음.

- **CNS종의 항생제 내성:** 최근 많은 국가에서 CNS가 젖소 유방염으로부터 가장 빈번하게 검출됨에 따라 유방염 원인체로서 CNS의 중요성이 증가함은 물론, 다제내성 CNS가 보고되고 있으며 이들 항생제 내성 유전자를 황색포도상구균에 전달하는 보균자로서의 가능한 역할이 보고고 있음. 국내의 경우, 대부분의 CNS는 세파로틴에 가장 높은 감수성을 보이며, 황색포도상구균과 마찬가지로 CNS가 가장 높은 내성을 보인 약제도 페니실린과 암피실린이었으나, 내성률은 황색포도상구균에 비해 약간 낮은 53% 및 45%로 보고된 바 있음.

나. 2011년 전국 단위 유방염 우유 시료에 대한 원인균 분리 및 내성 분석 결과

▶ **시료 분석 범위 및 방법:** 2011년 1월1일 - 12월 31일까지 전국 총 31개의 목장으로부터 711건의 유방염 조사 의뢰건수 중, 체세포수 50만/ml 이상을 보여준 158건의 유방염 우유 시료 건에 대하여 유방염 원인균 분리 및 분리균주에 대하여 CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) 지침서에 의거하여, disk diffusion 방식으로 in vitro antimicrobial susceptibility를 검사 및 판독하였음 (표4 & 표5).

표4. 2011년 유방염원인균 검사 의뢰건수 현황

월	목장수	검사의뢰 총 건수	유방염원인균 검사 시료건수*
1	0	0	0
2	1	50	4
3	1	1	1
4	3	119	15
5	1	45	10
6	4	105	25
7	2	12	11
8	3	63	20
9	3	73	9
10	5	96	31
11	7	116	29
12	1	31	3
계	31	711	158

표5. 2011년 지역별 검사 의뢰 현황

지역	목장수 (중복포함)	검사의뢰 총 건수	유방염원인균 검사 시료건수*
강원	1	2	0
경기	12	223	65
경남	9	345	54
경북	1	7	6
전남	1	23	2
전북	1	19	13
제주	2	36	8
충남	2	42	3
충북	2	14	7
미기재	0	0	0
계	31	711	158

- ▶ **분석 결과:** 2011년도 조사기간 동안 유방염 의심샘플(체세포수 50만개 이상)는 총 시료수의 22.2%(158건)이었음. 체세포 분석 결과, 평균 체세포수가 8.98×10^5 cells/ml 인 것으로 나타났으며, 정상우의 경우 1.74×10^5 cells/ml 이었던 반면, 유방염 의심우는 1.32×10^6 cells/ml 이었음. 유방염 의심우의 우유에서 원인균 분리 동정 결과, 총 183개 균주가 분리되었으며, CNS가 22%(41주)로 가장 높게 나타났으며, *Bacillus* spp. (20.7%, 38주), *Pseudomonas* spp. (14.0%, 26주), *E. coli*. (7.6%, 14주), *Enterococcus* spp. (7.0%, 13주), *S. aureus* (7.0%, 13주)의 순서로 분리되었음 (표6). 이는 국내의 경우 전파성 유방염 원인균과 더불어 환경 유래의 유방염 원인균이 높은 비율을 차지하고 있음을 보여주며, 착유장, 착유기, 착유자의 손을 비롯해 운동장 등 환경유래의 유방염 원인균에 대한 관리가 중요

더 이루어질 필요가 있음 암시함. 한편, 유방염 의심우로부터 분리된 균주를 대상으로 항생제 감수성 시험한 결과, GM(gentamycin)에 대한 감수성이 51.9%로 가장 높았으며, AN(Amikacin), ENR(enrofloxacin), S(Streptomycin) 순으로 나타났음. 흥미롭게도, P(Penicillin)과 OX(oxacillin)에 대한 감수성 정도가 각각 4.0%, 2.5%로서 내성정도가 보편화됨을 암시하였음.

표6. 2011년 국내 유방염 의심우의 우유에서 분리된 원인균 분포

균 종	분리균주수(%)	균 종	분리균주수(%)
<i>Bacillus</i> spp.	38	<i>Sphingomonas</i> spp.	1
CNS	41	<i>Kocuria</i> spp.	10
Coliform	0	<i>Aerococcus</i> spp.	0
<i>Escherichia coli</i>	14	<i>Stenotrophomonas</i> spp.	2
<i>Enterococcus</i> spp.	13	<i>Micrococcus</i> spp.	0
<i>Pseudomonas</i> spp.	26	<i>Pantoea</i> spp.	0
CPS	13	<i>Chryseobacterium</i> spp.	0
<i>Streptococcus</i> spp.	4	<i>Lactococcus</i> spp.	0
<i>Serratia</i> spp.	11	Fungi.	0
<i>Proteus</i> spp.	10		
총 분리 균주 수		183 개	

다. 대상 유방염 원인균 및 항생제 내성인자 선정 결과

- ▶ **대상 유방염 원인균 선정:** 본 연구과제 수행을 위한 대상균주 선정을 위하여 수행한, 2003년-2010년까지의 문헌조사와 전국단위의 유방염 우유시료 분석결과(2011년)를 토대로, 국내 주요 유방염원인균으로 파악되는 *S. aureus*, CNS의 일종인 *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. pyogenes*, *S. uberis*, 최근 국내에서 분리되고 있지 않으나 여전히 중요한 전염성 유방염 원인균인 *S. agalactiae*, *S. dysagalactiae* 등 대상 유방염 원인균으로 결정하였고, 본 과제의 연구수행과정에서 주요 대상균주로 사용하였음.
- ▶ **항생제 내성 패턴 분석을 통한 대상 내성인자 선별:** 상기에 기술한 바와 같이, 본 연구과제 수행을 위한 항생제 내성인자 선정을 위하여 최근까지의 문헌조사와 2011년 전국단위의 유방염 우유시료 분석결과를 토대로, 페니실린과 메티실린을 항생제 내성 대상인자로 결정하였고, 본 과제의 주요 표적인자로 적용하였음.

(2) 주요 원인균에 존재하는 광범위 필수생존인자 탐색 및 안티센스 올리고머 선별

▶ 광범위 필수생존인자의 탐색 및 선별:

- **연구수행전략 및 방법:** 주요 유방염 원인균에 존재하는 필수 생존인자 선별하기 위하여, 이들 유방염 원인균들 중 현재 여러 subspecies에 걸쳐 whole genome sequencing가 이루어진 *S. aureus* 유전자를 기준으로 유전자를 탐색하였음. 광범위한 필수인자를 확보를 위하여, DEG(Database of Essential Genes, <http://tubic.tju.edu.cn/deg/>) 분석을 통하여 *S. aureus* N315로부터 302개의 유전자(Mol Microbiol. 2002;43:1387-1400, J Microbiol

Biotechnol. 2006;16:623-632)와 *S. aureus* NCTC 8325로부터 351개의 유전자 (BMC Genomics. 2009;10:291)를 확보하였고, Human-originated MRSA 252와 Mu50으로부터 각각 133개와 134개의 필수 유전자를 확보하였음(Proc. Third International conference on Bioinformatics, Biocomputational System and Biotechnologies, BIOTCHNO 2011, pp. 91-99, IARIA XPS Press, ISBN: 978-1-61208-007-9). 위의 총 920개의 유전자를 서로 비교 분석한 뒤 최종적으로 Duffield et al. (2011)의 down-selection 방법에 의해 제시된 52개의 유전자와 다시 비교하여 일치하는 유전자를 최종 필수 유전자 후보군으로 선택하였음(그림1).

- **연구 결과:** 아래 그림1에서와 같은 방법으로, 최종 17개의 필수인자를 후보 유전자로 선정하였고, 이들 필수 유전자 17개중 Duffield et al. (2011)에 의해 실험적으로 증명된 6개 유전자 (*smpB*, *ftsA*, *cmk*, *deoD*, *glmU*, *pyrH*)에 hypothetical 유전자인 *ligA*를 추가하여 총 7개의 후보 유전자를 안티센스 올리고머 제작에 사용되었음(표7).

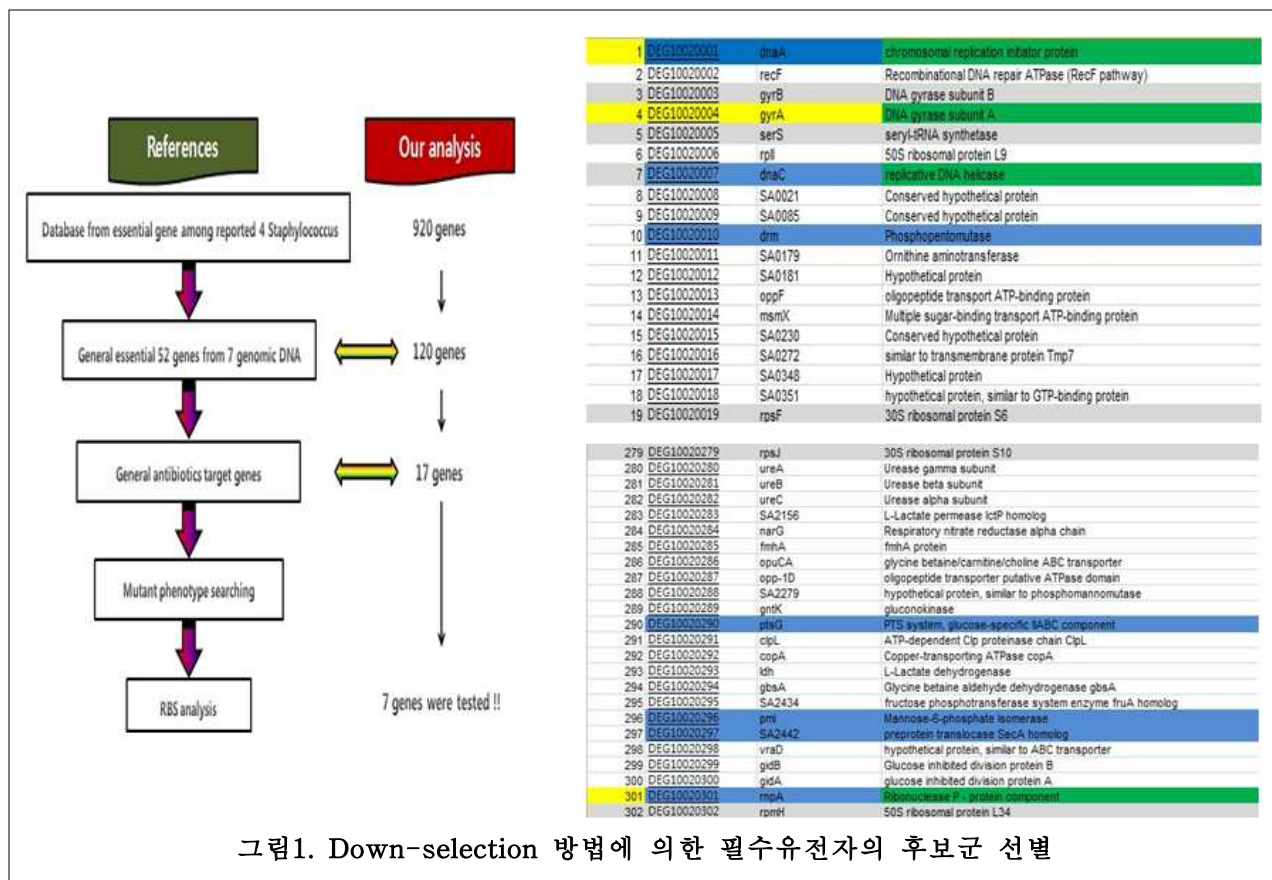


그림1. Down-selection 방법에 의한 필수유전자의 후보군 선별

표7. 최종 선발된 17개의 필수 유전인자 후보군과 기능

Genes	Known or hypothetical gene function
dnaA	chromosomal replication initiator protein
dnaC	replicative DNA helicase
ssrP/smpB*	ssrA-binding protein
murI	glutamate racemase
ftsA*	cell division protein FtsA
ftsZ	cell division protein
cmk*	cytidylate kinase
SA1359	translation elongation factorP
dnaG	DNAprimase
greA	transcription elongation factorGreA
deoD*	purine uncleotide phospholyase
ligA*	DNA ligase
nusA	transcription termination
pcrA	ATP-depentend DNA helicase
murA	UDP-N-acetylglucosamine1-carboxyvinyltransferase1
glmU*	N-acetylglucosamine1-phosphateuridyltransferase
pyrH*	uridylate kinase

* 본 연구에서 수행된 표적 유전자

▶ 안티센스 올리고머 디자인 및 제작:

- 실험전략 및 방법: Antisense를 통한 필수 유전자의 mRNA억제는 structure gene을 표적으로 하여 RNaseH에 의한 mRNA degradation을 유도하는 방법과 개시코돈 upstream의 RBS(Ribosomal Binding Site: AGGAGG)를 표적으로 antisense하여 단백질의 translation을 억제하는 방법이 있음. 기 선행연구에 따르면 후자의 방법이 더욱 효과적이므로 (Oligonucleotides. 2003;13(6):427-433) RBS를 표적하는 것을 선택하였음. 만약 선발된 유전자중 RBS가 없다면 ATG를 포함한 상위 6-9 amino acid를 표적으로 선택하였음. 표적 유전자의 개별 유전자의 정보는 NCBI와 EMBL-EBI로부터 염기서열의 정보를 획득하였고, 획득된 유전자의 개시코돈으로부터 -100bp를 포함한 ORF (Open Reading Flame)의 염기서열을 얻은 후 Blast 프로그램을 통하여 RBS등의 표적을 선별하였음. 기존의 보고와 같이 antisense의 최적화된 10-15mers의 PNA를 선발하였고, PNA자체는 세포내의 침습효과가 없음으로 기존의 잘 알려진 penetration peptide인 (KFF)₃K에 lysine 또는 leucine을 linker로 PNA와 결합하여 올리고머 복합체(PPNA)를 디자인하였음. 선별된 PPNA의 (주)Panagen에 의뢰/제작하였음
- 연구 결과: 유전체 분석을 통하여 얻어진 유전자의 mRNA와 ATG를 포함한 upstream 10-12bp를 주요 표적으로 기존의 세균 침습효과가 있는 (KFF)₃K를 leucine linker를 사이로 복합체를 디자인하여 (주)Panagen에 의뢰하여 제작하였음(표8).

표8. 선별된 유전자에 대한 PPNA 복합체 제작

Genes	Function	DNA sequence (5'-3')	PNA sequence (5'-3')
smpB	ssrA binding protein	gaggtgagtatgaat	(KFF) ₃ K-L-tcatactcac

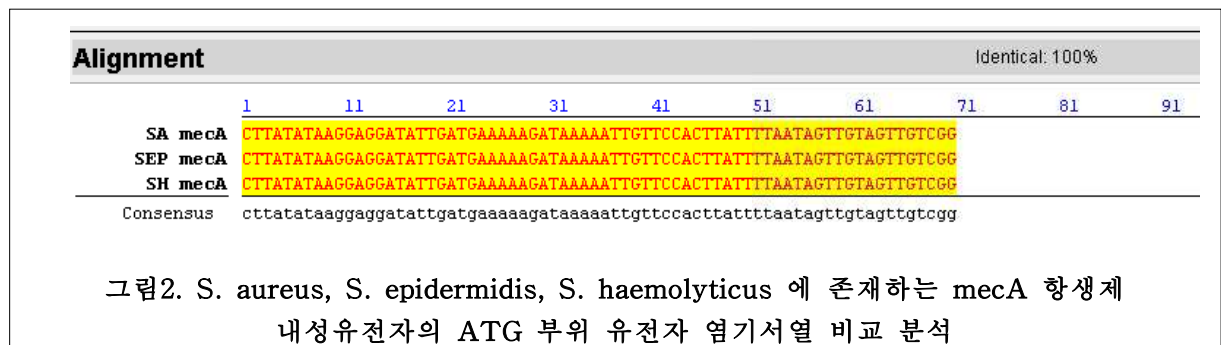
cmk	cytidylate kinase	aaatgacgcatgaaa	(KFF) ₃ K-L-tcatgcgtca
ligA	DNA ligase	gattaagggatggct	(KFF) ₃ K-L-ccatccctta
deoD	purine nucleotide phosphorylase	agataacaaatgaca	(KFF) ₃ K-L-tcatttgta
glmU	DDP-N-actyltransferase	ttaatgttcacgga	(KFF) ₃ K-L-gcatgaacat
pyrH	uridylate kinase	gataagaaaatggct	(KFF) ₃ K-L-ccattttctt
ftsA (1)	cell division protein	aggaggtgcctatctatggaa	(KFF) ₃ K-L-taggcacctct
ftsB (2)		aggaggtgcctatctatggaa	(KFF) ₃ K-L-catagataggcag

* 붉은 색 letter는 PNA target sequence

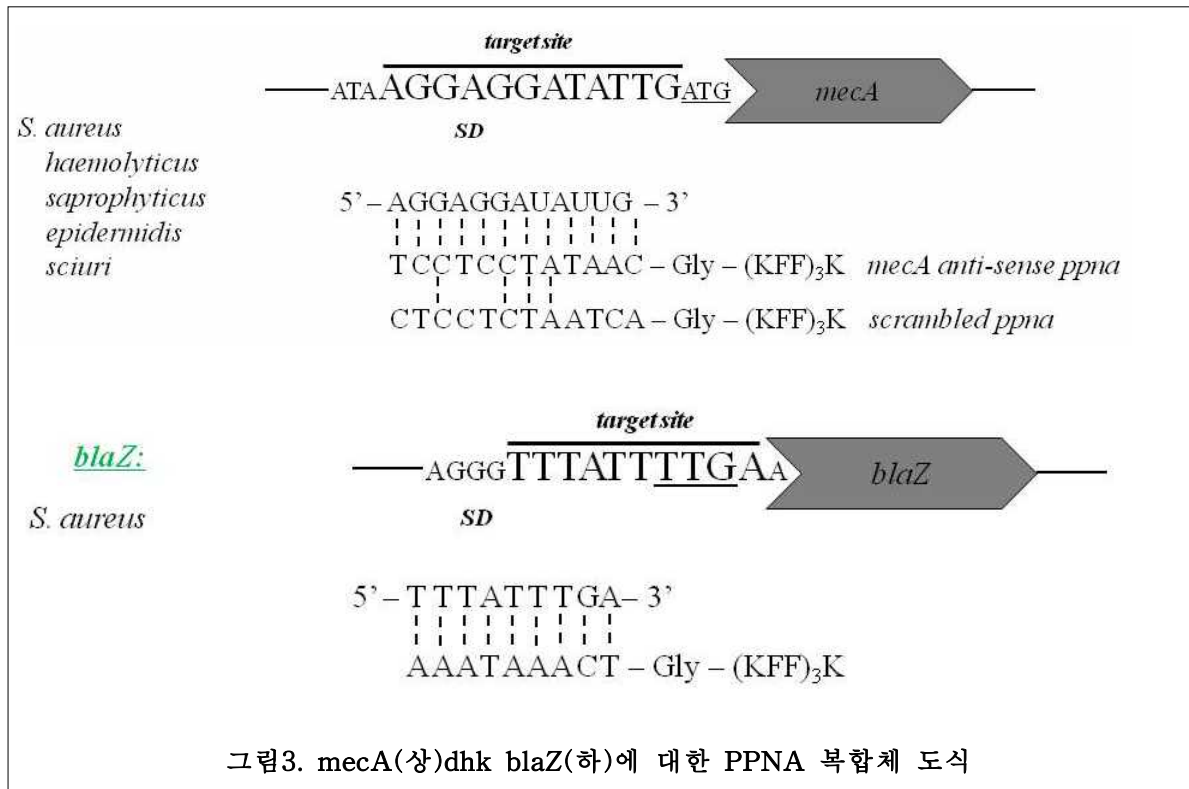
(3) 주요 항생제 내성 관련 표적인자의 탐색 및 후보 안티센스 올리고머 선발

▶ 안티센스 올리고머 디자인:

- 실험 전략 및 방법: 아래 그림2에서 제시된 것처럼, 주요 유방염 원인균 중 전장유전체 염기서열분석 정보가 이용가능한 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolytica*에 존재하는 *mecA* 항생제 내성유전자의 안티센스 올리고머 선발을 위한 개시코돈과 리보솜 결합부위 주변에 100% 상동성을 보이는 부위를 확인하였고, 이들 부위에 대한 안티센스 PNA 복합체를 (주)Panagen에 의뢰/제작하였음. BlaZ 에 대한 PNA 올리고머도 같은 방법으로 선발하였음.



- 연구 결과: 유전체 분석을 통하여 얻어진 유전자의 mRNA와 ATG를 포함한 upstream 10-12bp를 주요 표적으로 기존의 세균 침습효과가 있는 (KFF)₃K를 leucine linker를 사이로 복합체를 디자인하여 (주)Panagen에 의뢰하여 제작하였음(그림3).



(4) 필수생존인자에 대한 후보 안티센스 올리고머의 기능성 검증

▶ 실험전략 및 방법:

- 균주 및 배지준비: 본 실험에서는 총 8종의 표준균주와 3종의 젖소 유방염 분리주를 사용하였음 (표9). *S. aureus* ATCC29740은 Newbould에 의해 유방염 젖소의 원유에서 분리한 균주로써 대조균으로 사용하였으며(Can Vet J. 1968;9:107-115), *S. aureus* 이외의 5종의 subspecies는 한국에서 유방염의 원인균으로 빈도 높게 분리되는 균주로써 모두 ATCC로부터 구입하였음.

표9. 본 실험에 사용한 균주목록

Species	Strain	Origin	Reference
<i>S. aureus</i>	ATCC 29740	Bovine isolate	Can Vet J. 1968;9:107-115.
	ATCC 19636	Human isolate	J exp Med. 1960;111:533-558.
	N315	Clinical isolate	FEMS lett. 1991;298:133-136.
	김기남농장	Bovine isolate	This study
	성창농장	Bovine isolate	This study
	중앙농장	Bovine isolate	This study
<i>S. hyicus</i>	ATCC 11249	Pig isolate	J Bacteriol. 1963;298:133-136.
<i>S. agalactiae</i>	ATCC 13813	Human isolate	Mol Microbiol. 2002;45(6):14993-1513.
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228	Human isolate	J Clin Microbiol. 2008;46(10):3355-3360.
<i>S. dysagactiae</i>	ATCC 27957	Bovine isolate	J Clin Microbiol. 1999;37:4194-4197.
<i>S. uberis</i>	ATCC 27958	Bovine isolate	Am J Vet Res. 1976;37:377-381.

- **PNA 복합체 (PPNA) Stock 준비 및 배지 조건:** 모든 PPNA는 3차 증류수를 희석농도에 맞게 추가하여 400 μ M의 농도로 사용하였음. 본 시험에는 액체배양을 위해 Mueller-Hinton broth (MHB) 혹은 Trypton soy broth (TSB)를 고체배지 상의 배양을 위해서 Mannitol Salt Agar (MSA) 또는 TSA(Trypton Soy Agar) 혹은 를 사용하였음.
- **Spot assay 및 CFU (Colony Forming Unit)의 정량 및 정성 분석:** 시험에 사용한 균주의 glycerol stock을 loop를 이용하여 blood agar에 접종하여 37°C에 16-24h 배양한 후 single colony를 취하여 blood agar에 계대 배양하였음. 계대 배양한 blood agar로부터 MHB 또는 TSB에 1ml에 16h 배양하여 OD₆₀₀에서 측정을 한 뒤 값을 3.0으로 맞춘 뒤 약 2×10^9 CFU/ml로 맞춘 뒤 1×10^{-4} 으로 희석하여 초기의 배양액의 균수를 약 1×10^5 CFU/ml로 맞추었음. Spot Assay는 균수를 각 time별로 원액으로부터 5 μ l를 취하여 0.85% 식염수에 10 fold serial dilution을 하여 MSA 혹은 TSA에 5 μ l씩 drop하여 37°C에 배양하여 18-24h 후 dilution factor에 적합하게 colonies가 형성되면 counting하여 CFU를 측정하였음. 동시에 필요에 따라서 고체 배지에 적정하게 희석을 하여 예측된 희석배수에 적합하게 약 100여개의 colonies가 생성되면 counting하여 CFU를 측정하였음.
- **Total RNA추출:** 균 배양액 200 μ l을 Centrifuge하여 RNase free water로 washing한 후 RNA를 추출하였음. 필요에 따라 -20°C 냉동 보관하였음. 13,000 rpm, 2min 원심분리하고 상층액을 제거한 후 enzymatic lysis buffer 100 μ l를 sample pellet에 첨가하여 재부유하고 37°C에서 30분간 반응시켰음. 약 5분 간격으로 enzymes이 골고루 섞일 수 있도록 vortexing 하였음. Enzymatic lysis buffer의 조성은 Tris-EDTA(TE, pH 8.0) buffer에, lysostaphin 100 μ g/ml 그리고 proteinase K (Qiagen) 10 μ l을 첨가하여 제조했고, 필요에 따라 beads를 섞은 뒤 vortexing을 통하여 mechanical lysis를 추가하였음. 이후 과정은 RNeasy Mini Kit (Qiagen)를 이용하였음. TE 100 μ l에 RLT buffer를 350 μ l 첨가하고 vortexing 한 후, 14,800 rpm, 2min 원심분리하여 상층액의 400 μ l을 취하여 새 tube에 담

은 후 sample당 100% ethanol 220 μ l씩 첨가하고 골고루 섞일 수 있도록 pipetting 하였음. RNeasy Mini spin column을 2 ml collection tube에 끼운 상태로 sample을 column에 적용하고 13,000 rpm, 15초간 원심분리 하였음. Column washing을 위하여 RW1 buffer를 sample당 700 μ l씩 첨가하고 13,000 rpm, 15초간 원심분리하고, RPE buffer를 sample당 500 μ l씩 첨가하고 13,000 rpm, 15초간 원심분리를 2번 실시하였음. Column을 새 collection tube에 바꿔 끼워넣고 ethanol등의 완벽한 제거를 위하여 추가로 14800rpm, 2분간 원심분리하였음. Column을 새 collection tube에 바꿔 끼워넣고 35 μ l RNase-free water를 첨가한 후 13,000 rpm, 1분간 원심분리해서 elution하였고, Elution된 solution을 다시 column에 적용하고 원심하여 농축하였음. Elution된 양은 대략 30 μ l이므로 Turbo DNase kit (Ambion) 중 10X DNase Buffer를 4 μ l, DNase I을 4 μ l, Nuclease free water 5 μ l 첨가하여 총 40 μ l volume으로 37°C에서 30분간 반응시켜 genomic DNA의 오염을 제거. 또한 DNase I의 불활화를 위해 DNase Inactivation Reagent 8 μ l 첨가하여 상온에서 2분간 반응시켰음. 추출된 RNA의 확인을 위해 1% TAE agarose gel에 전기영동하고 Nanodrop으로 RNA의 농도와 purity를 확인하였음.

- **cDNA 합성:** GoScript™ Reverse Transcription System Kit (Promega)를 이용하여 total RNA로부터 cDNA 합성하였음. RNA는 200ng으로 normalization 하였고, Random 6mers (5 μ g) 1 μ l, RNase free dH₂O X μ l, Template RNA X μ l를 농도에 맞게 혼합하여 총 5 μ l volume을 70°C에서 5분간 반응시킨 후 즉각 4°C로 냉각시켰음. 위의 5 μ l volume에 15 μ l reverse transcription reaction mix를 혼합하였음 (mixture: 5X GoScript™ Buffer 4 μ l, MgCl₂ 2mM, dNTP 0.5mM, RNase inhibitor 20U/ μ l, GoScript™ Reverse transcriptase 1 μ l, RNase free dH₂O X μ l). 총 20 μ l의 mixture를 25°C, 5분 → 42°C, 1시간 → 70°C, 15분 → 4°C 순으로 반응하였음.
- **RT (Reverse Transcriptase) PCR:** RT-PCR mixture의 조성은 다음과 같이 혼합한 뒤, 최적화 조건에서 RT-PCR을 실시하였음(표10, 11, 12).

표10. RT-PCR mixture의 조성

Reagent	Volume (μ l)
Solgt™ 2X EF-Tag mix	10
Primer Forward	1
Reverse	1
Template (cDNA)	2
Distilled water	7
Total	upto 20

표11. Real-time PCR cycle 구성

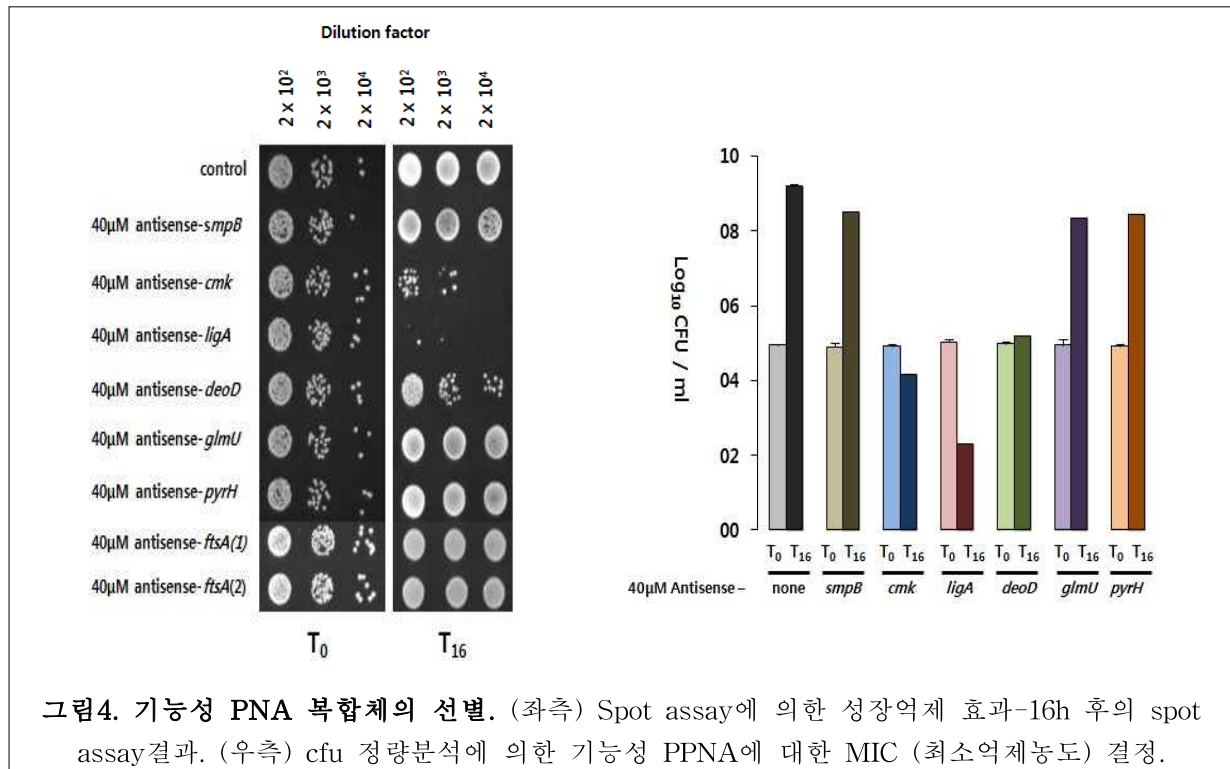
Thermal conditions		Condition
Initial denaturation		95°C, 3분
Denaturation		95°C, 1분
20 cycles	Annealing	54°C, 1분
	Extension	72°C, 1분
Final Annealing		72°C 10분

표12. 사용된 oligomer 염기서열 정보

gene	Primer	Sequence (5'-3')	Product	Reference
<i>cmk</i>	<i>cmk_F</i>	AAA CGT GTA GCC AGC GAA CT		This study
	<i>cmk_R</i>	TTC TGC TCG CTC TTC AAC TG		This study
<i>ligA</i>	<i>ligA_F</i>	AAA GCG AGC CAA GTG TTA GC		This study
	<i>ligA_R</i>	TAG CAC CTT GTG ATG CAA GC		This study
<i>deoD</i>	<i>deoD_F</i>	CTT GTG GCG CAT TAC AAG AA		This study
	<i>deoD_R</i>	TAC CAG CAT GAA TCG CAT TT		This study
16s rRNA	16s_F	GTT ATT AGG GAA GAA CAT ATG TG		This study
	16s_R	CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC		This study

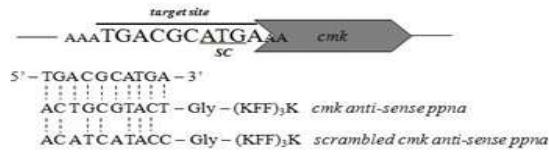
▶ 연구 결과:

- PNA 복합체 (PPNA)의 antisense 효과의 분석과 기능성 평가: PPNA의 antisense에 의한 growth inhibition의 효과를 확인하기 위하여 위의 8개의 PPNA 복합체를 *S. aureus* ATCC 29740과 함께 16 hr 배양함으로써 기능성 있는 PPNA를 초기 screening하였음(그림4, 좌). PPNA의 농도는 기존 보고의 분석결과 기능성을 평가할 수 있는 최대 농도라고 판단되는 40μM을 선택하였고, Spot-assay를 통하여 PPNA의 정성적 기능평가를 실시하였으며, 동시에 16 hr 이후 CFU 측정을 통하여 정량적 분석이 동시에 수행하였음. 약 10⁵ CFU/ml였던 초기 군수가 약 10⁹ CFU/ml까지 성장한 control에 비하여 *cmk*-, *ligA*-, *deoD*-PNA복합체의 경우 최대 대략 10² CFU/ml까지 성장 억제하는 효과가 있었으며, 약 10⁷배의 growth 차이를 나타내었음(그림4, 우).

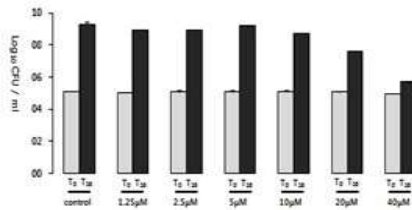


- **PNA 복합체 (PPNA)의 최소유효 농도 결정:** 위의 실험에서 초기 screening된 3개의 *cmk*, *ligA*, *deoD*-PNA의 MIC를 결정하기 위하여 40 μM에서 2진 희석된 농도로 CFU를 측정하였음(그림5). 16 hr 기준으로 1.25-35 μM에서는 성장억제 효과가 없었으며, 40 μM에서 최소한의 억제효과를 확인하였음. PPNA의 antisense에 의한 성장억제 효과를 재확인하기 위하여, 표적 DNA의 mRNA와 염기서열이 정확히 일치하지 않는 scrambled-PPNA를 이용하여 성장억제 효과를 확인한 결과 control과 마찬가지로 결과가 나왔다. 이로써 3개의 *cmk*, *ligA*, *deoD*-PNA 복합체에 의한 antisense효과로 인한 균주의 성장효과가 있음을 확인하였음.

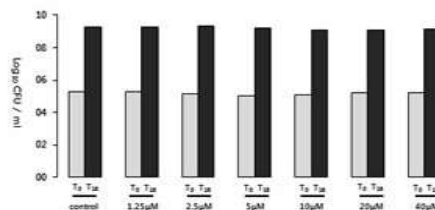
• cmk (cytidylate kinase)-antisense



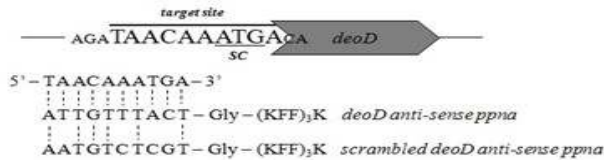
1. cmk anti-sense ppna



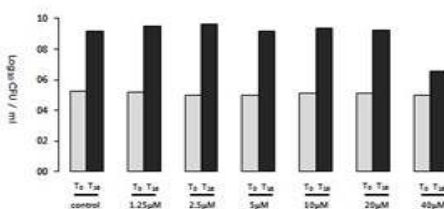
2. scrambled cmk anti-sense ppna



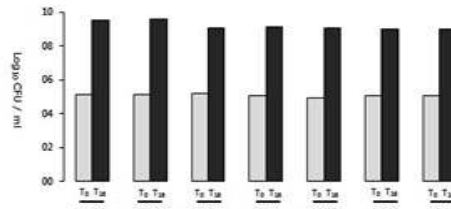
• deoD (purine nucleotide phosphorylase)-antisense



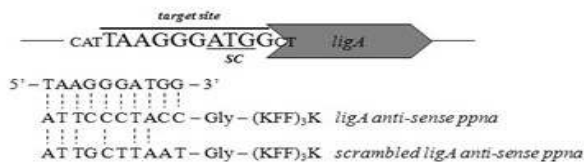
1. deoD anti-sense ppna



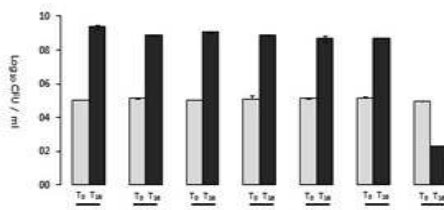
2. scrambled deoD anti-sense ppna



• ligA (DNA ligase)-antisense



1. ligA anti-sense ppna



2. scrambled ligA anti-sense ppna

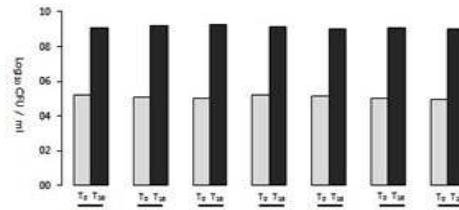
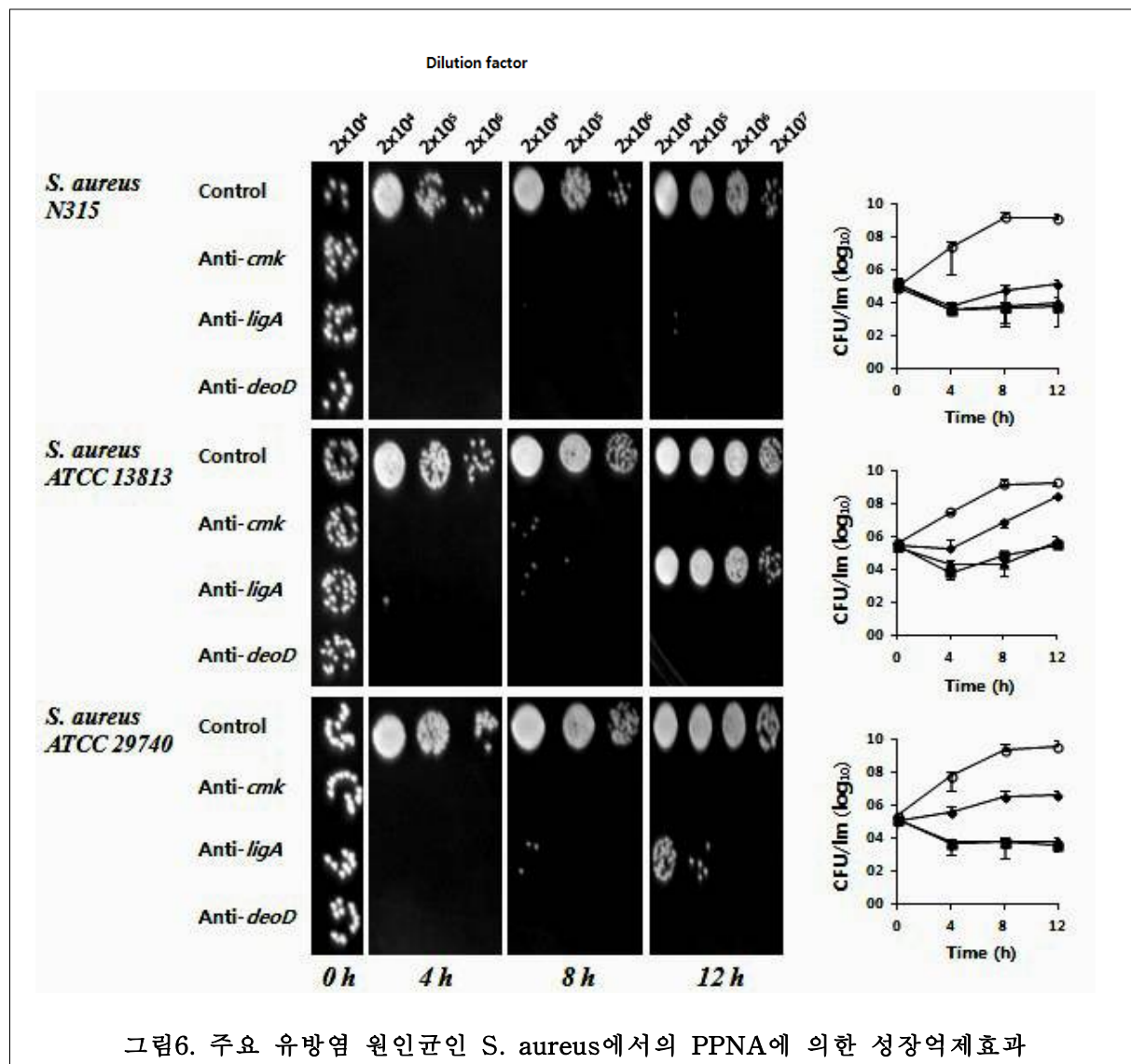


그림5. 발굴한 3개의 PNA 복합체의 MIC결정. (상) antisense-cmk PPNA, (중) antisense-deoD PPNA, (하) antisense-ligA PPNA의 mRNA target 모식도. 1. MIC의 결정, 2. scrambled PPNA에 의한 성장억제 negative effect.

- 여러 유방염 원인균에 대한 기능성 PPNA의 효과 검증(1): 위의 실험에서 초기

screening된 3개의 *cmk*, *ligA*, *deoD*-PNA의 MIC를 40 μ M로 결정한 뒤 유방염의 원인이 되는 다양한 *S. aureus* (실험방법 참조)에 대한 생장억제 효과를 측정하였음. 먼저 *S. aureus* 표준균주에서는 N315와 ATCC29740의 균주는 3개의 PPNA 복합체에 대하여 12 hr 동안 계속 억제효과가 있었으나, ATCC 13813 균주의 경우는 12시간부터는 생장억제 효과가 지속되지 못함을 확인하였음(그림6).



- 여러 유방염 원인균에 대한 기능성 PPNA의 효과 검증(2): 유방염 젖소의 원유에서 분리한 3개의 균주들에 대하여 PPNA 효과를 있는지 여부를 확인하였으며 8 hr 때 표준균주와 거의 유사한 패턴으로 *ligA*의 경우 12 hr 후 억제효과는 지속되지 못했음(그림7).

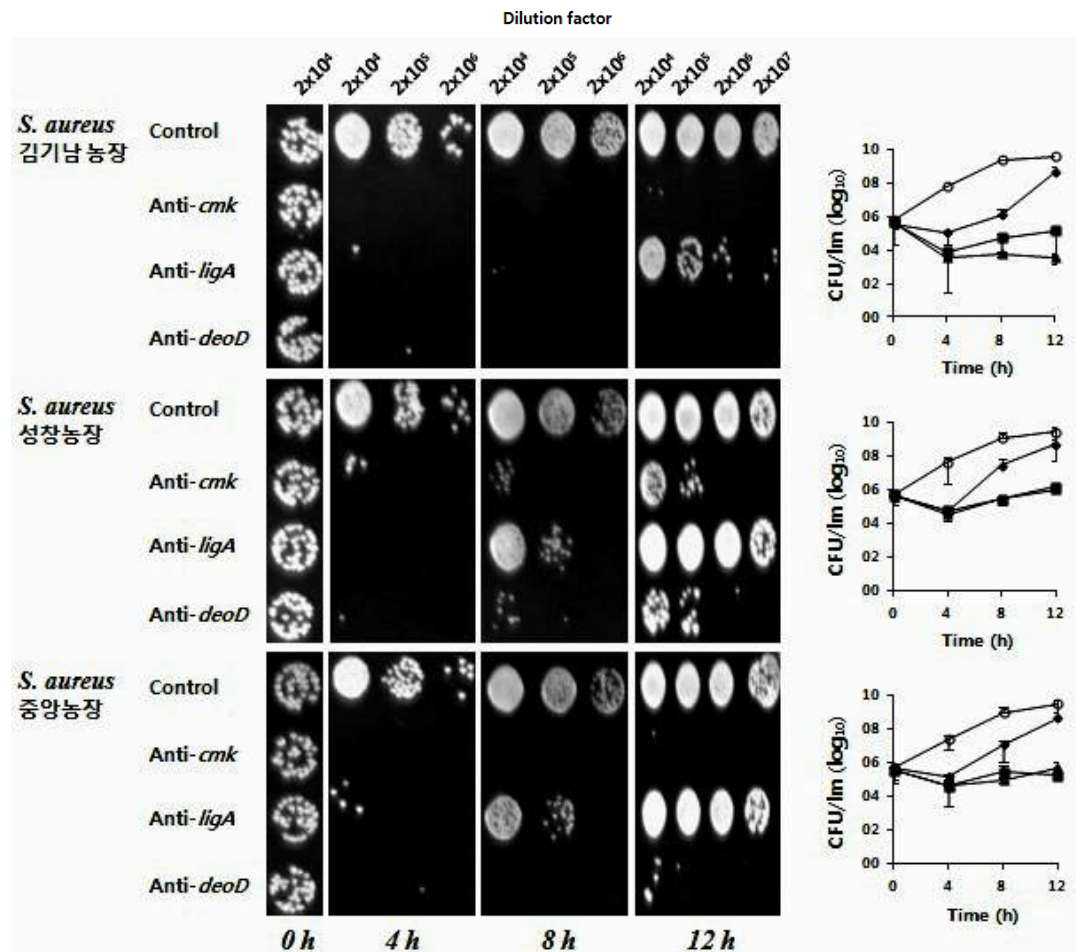


그림7. 3종의 *S. aureus* 유방염 분리주에 대한 PPNA의 성장억제효과

- 여러 유방염 원인균에 대한 기능성 PPNA의 효과 검증(3): 모든 subspecies 균주들이 다양한 조건에서의 성장을 선호하므로 배지를 크게 MHB와 TSB의 2개 배지 조건으로 나누어 실험을 하였고, 각각의 성장 속도 또한 다르므로 시간대 별로 성장억제 효과를 봤으며 spot-assay와 CFU를 동시에 측정하였던 바, 모든 균주에서 차이가 있으나 8 hr때 성장억제 효과를 뚜렷이 관찰할 수 있었음(그림8). 이러한 결과는 본 연구에서 개발한 PPNA가 다양한 유방염 원인균을 동시제어 할 수 있음을 암시함.

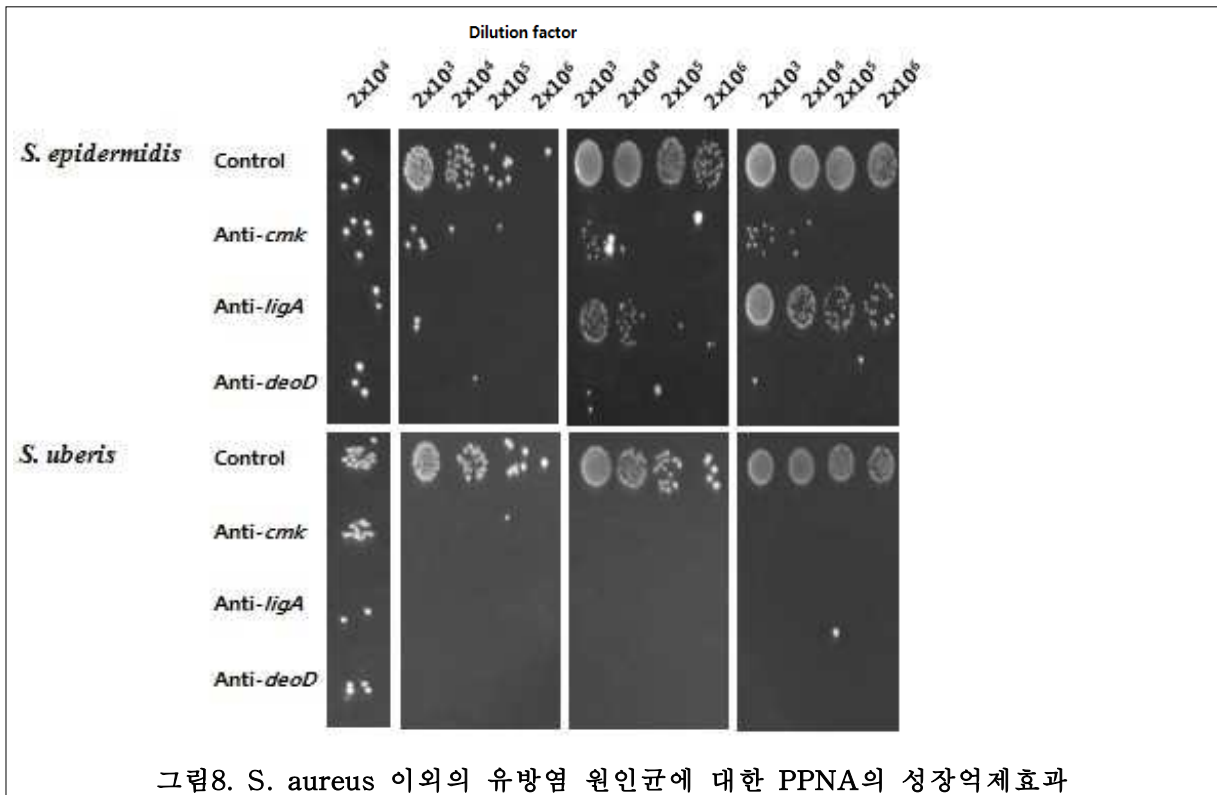


그림8. *S. aureus* 이외의 유방염 원인균에 대한 PPNA의 성장억제효과

- PPNA 복합체에 의한 mRNA 발현 억제효과 증명: 위의 실험결과, 8 hr을 기준으로 모든 균주에서 세포의 초기 생균수, 성장조건과 관계없이 성장억제 효과가 있음을 판단하여, mRNA의 분리 또한 8 hr으로 결정하였음. PPNA는 대표적으로 antisense *deoD*-PNA를 사용하였으며 농도는 1.25-40 μ M를 사용하였음. mRNA의 초기 농도를 standardization 하기 위하여 일반적인 structural gene인 16s rRNA를 control로 사용하였으며, 초기 세포수를 실험 volume (200 μ l)당 대략 1×10^9 CFU/ml 으로 맞춘 후 8h 이후 mRNA의 분리와 cDNA의 합성, 그리고 RT (Reverse Transcriptase)-PCR의 방법으로 mRNA의 발현 여부를 확인하였음. 실험 결과, 16s rRNA의 발현이 모두 동일한 반면, antisense *deoD*-PNA 첨가후의 mRNA 발현은 1.25, 2.5, 5.0 μ M에서 직접적인 발현 억제 효과가 있었음(그림9). 하지만, 고농도의 PPNA에서 mRNA 발현억제를 확인할 수 없었음.

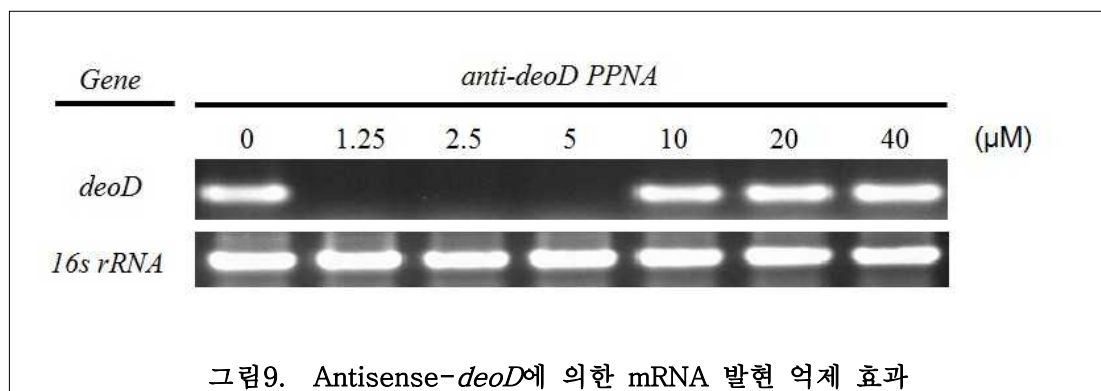


그림9. Antisense-*deoD*에 의한 mRNA 발현 억제 효과

(5) 주요 항생제 내성역전을 위한 안티센스 올리고머의 기능성 검증

▶ 실험전략 및 방법:

- **균주 및 배지준비(1):** 본 실험을 위하여 총 4개의 *S. aureus* 균주를 사용하였음. N315는 1982년 병원에서 분리된 hospital-acquired MRSA strain으로(FEBS Lett. 1991;298:133 - 136), 2001년 whole genome sequencing이 완료되었음(Lancet. 2001 Apr 21;357:1225-40). 이 균주의 경우 oxacillin 내성을 결정하는 *mecA*의 발현을 억제하는 *mecI* 자체와, *mecI*가 bind하는 *mecA*의 operator 부위에 mutation이 없기 때문에, *mecA*의 발현이 활발하게 이루어지기 위해서는 oxacillin에 노출된 후 일정 시간이 지나야 함(Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(3): 815 - 824). 이러한 성질 때문에 pre-MRSA라고도 불림. 더불어 *blaZ*를 포함하여 두 개의 beta-lactamase 유전자를 가지고 있음. M03-68은 한국에서 2003년에 원유에서 분리된 MRSA로서, *mecA*는 가지고 있으나 intact한 *mecI*가 없음(J Antimicrob Chemother. 2005;56:624 - 632). 또한 *blaZ*도 가지고 있는 것으로 확인됨. SJ41과 JA337은 젖소의 원유에서 분리된 균주로서, *blaZ*를 보유하고 있으며 penicillin에 내성을 나타내며, ATCC 29740은 *mecA*와 *blaZ*가 없으며 대조균으로 사용되었음(표13).
- **균주 및 배지준비(2):** Coagulase-negative *Staphylococcus* spp. (CNS)의 경우, *mecA*에 의한 anti-sensing이 *S. aureus* 이외의 다른 spp.에도 유효한지 확인하기 위하여 MR-CNS에 속하는 3개의 *S. epidermidis* strain과 3개의 *S. haemolyticus* strain을 이용하였음. 모든 MR-CNS의 species는 16s rRNA sequencing을 통해 확인하였음(표13).

표13. 본 연구를 위해 사용한 균주 목록

Strain	Species	Origin	Genotype	MIC (μg/ml)		Reference
				Oxacillin	Penicillin	
N315	<i>S. aureus</i>	Clinical isolate of 1982	<i>mecA</i> +/ <i>mecI</i> +/ <i>blaZ</i> +	4 to 128 ^a	64	FEMS lett 1991
M03-68	<i>S. aureus</i>	Bovine isolate	<i>mecA</i> +/ <i>mecI</i> -/ <i>blaZ</i> +	2 to 16 ^a	4	JAC 2005
SJ41	<i>S. aureus</i>	Bovine isolate	<i>mecA</i> -/ <i>blaZ</i> +	0.5	64	This study
JA337	<i>S. aureus</i>	Bovine isolate	<i>mecA</i> -/ <i>blaZ</i> +	0.5	8	This study
ATCC 29740	<i>S. aureus</i>	Purchased from ATCC	<i>mecA</i> -/ <i>blaZ</i> +	0.5	<0.12	
14K8	<i>S. epidermidis</i>	Community isolate	<i>mecA</i> +	2	-	This study
57K114	<i>S. epidermidis</i>	Community isolate	<i>mecA</i> +	1	-	This study
43K75-1	<i>S. epidermidis</i>	Community isolate	<i>mecA</i> +	2	-	This study
19K24-2	<i>S. haemolyticus</i>	Community isolate	<i>mecA</i> +	2	-	This study
81S3	<i>S. haemolyticus</i>	Hospitalized cat	<i>mecA</i> +	0.5	-	This study
92S34	<i>S. haemolyticus</i>	Hospitalized dog	<i>mecA</i> +	0.5	-	This study

^aThe former is the MIC checked after 24 h and the later is the MIC checked after 48 h.

- **PNA 준비 및 배지 조건:** *mecA*-antisensing PNA의 경우 400 μM, *blaZ*-antisensing PNA의 경우 800 μM의 농도로 DW 희석액을 만들어 시험에 사용하였음. 시험에 사용될 배지의 최종 PNA 농도는 최적농도 결정 실험을 거쳐 검증된 농도인 20 μM (*mecA*-antisensing PNA)과 40 μM (*blaZ*-antisensing PNA)이 각각 사용. 본 시험에는 모두 Mueller-Hinton broth (MHB) 혹은 agar (MHA)를 사용하였음.
- **Spot assay 및 colony counting:** 시험에 사용할 균주의 glycerol stock을 10 μl용량의

loop를 이용하여 blood agar에 접종하여 37°C에서 18 h 배양한 후 single colony를 취하여 blood agar에 계대 배양하였음. 계대 배양한 blood agar에서 적당량의 colony를 취하여 식염수에 희석하여 McFaland 0.5농도를 맞추었음. MHB 9 ml에 McFaland 0.5의 균 희석액 1 ml을 섞어 10배 희석한 후 시험을 실시할 배지의 1/40 용량을 접종하였음(예: 시험을 실시할 배지의 용량이 200 μ l일 경우 5 μ l의 균 희석액을 접종). *Staphylococcus* spp.의 경우 McFaland 0.5 탁도의 균 농도가 약 10^8 CFU/ml이므로 위와 같은 방법으로 접종할 경우 초기 배양액의 균 농도는 2.5×10^5 CFU/ml이 됨.

균 수를 측정하고자 하는 배양액을 진탕 혹은 pipetting하여 부유시킨 후 5 μ l를 취하여 식염수에 10 fold serial dilution을 실시하였음. 각각의 희석액에서 5 μ l를 취하여 MHA에 drop한 후 잠시 정치시켜 전부 흡수된 후 37°C에서 배양하여 18~22 h 후 2~25 개의 colony가 자란 spot의 colony를 counting 하였음. 위와 같은 방법으로 spot을 만들 경우 최초 spot의 희석 상수는 $\times 2,000$ CFU/ml이 됨.

- **RNA추출과 cDNA합성:** RNA 추출을 실시할 균 배양액 200 μ l당 RNeasy lysis buffer (Qiagen) 1 ml을 첨가하여 실온에서 5분간 반응시켜 RNA stabilization 하였음. 13,000 rpm, 2min 원심분리하고 상층액을 제거한 후 enzymatic lysis buffer 200 μ l를 sample pellet에 첨가하여 재부유하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후, Enzymatic lysis buffer의 조성은 Tris-EDTA buffer에 lysozyme 1mg/ml, lysostaphin 50 μ g/ml 그리고 proteinase K (Qiagen) 25 μ l을 첨가하여 제조하였음. 이후 과정은 RNeasy Mini Kit (Qiagen)를 이용하였음. 먼저 60°C에서 10분간 반응시킴으로써 enzyme를 inactivation 시키고 RLT buffer를 sample당 700 μ l씩 첨가하고 vortexing. 13,000 rpm, 2min 원심분리하고 상층액을 새 tube에 담은 후 sample당 absolute ethanol 500 μ l씩 첨가하고 vortexing. RNeasy Mini spin column을 2 ml collection tube에 끼운 상태로 sample을 column에 적용하고 13,000 rpm, 15초간 원심분리. RW1 buffer를 sample당 700 μ l씩 첨가하고 13,000 rpm, 15초간 원심분리함. Column을 새 collection tube에 바꿔 끼워넣고 RPE buffer를 sample당 500 μ l씩 첨가하고 13,000 rpm, 15초간 원심분리. RPE buffer를 sample당 500 μ l씩 첨가하고 13,000 rpm, 2분간 원심분리함. Column을 새 collection tube에 바꿔 끼워넣고 ethanol의 완벽한 제거를 위하여 추가로 1분간 원심분리. Column을 새 collection tube에 바꿔 끼워넣고 30 μ l RNase-free water를 첨가한 후 13,000 rpm, 1분간 원심분리해서 elution하였음. Elution된 solution을 다시 column에 적용하고 원심하여 농축함. Elution된 양은 대략 27 μ l이므로 Turbo DNase kit (Ambion) 중 10X DNase Buffer를 4 μ l, DNase I을 4 μ l, Nuclease free water 5 μ l 첨가하여 총 40 μ l volume으로 37°C에서 30분간 반응시켜 genomic DNA의 오염을 제거하였음. 또한 DNase I의 불활화를 위해 DNase Inactivation Reagent 8 μ l 첨가하여 상온에서 2분간 반응시킴. 추출된 RNA의 확인을 위해 1% agarose gel에 전기영동하고 Nanodrop으로 RNA의 농도와 purity를 확인하였음.
- **cDNA 합성:** PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kits (TaKaRa)를 이용하여 RNA로부터 cDNA 합성하였음. RNA는 500ng으로 normalization하여 준비함. Random 6mers (50 μ M) 1 μ l, dNTP mixture 1 μ l, RNase free dH₂O 6 μ l, Template RNA 2 μ l를 혼합하여 총 10 μ l volume을 65°C에서 5분간 반응시킨 후 4°C로 냉각시켰음. 위의 10 μ l volume

에 5X PrimeScript™ Buffer 4 μ l, RNase inhibitor (4U/ μ l) 0.5 μ l, PrimeScript™ II RTase (200U/ μ l) 1 μ l, RNase free dH₂O 4.5 μ l를 첨가하여 총 20 μ l를 반응시킴. 이 때 온도 조건은 30°C, 10분 → 42°C, 50분 → 95°C, 5분 → 4°C 냉각 순으로 구성하였음.

- **Real-time qPCR:** 아래와 같은 조성과 조건에서 실시하였음(표14, 15, 16). Real-time qPCR시에는 SYBR Green Master Mix (Qiagen)를 사용함.

표14. 반응물 조성

Reagent	Volume (μ l)
2X SYBR Premix	10
Primer Forward	1
Reverse	1
Template (cDNA)	1
Distilled water	7
Total	20

표15. Real-time qPCR cycle 구성

Thermal conditions	Condition
Initial denaturation	95°C, 2분
Denaturation	95°C, 30초
40 cycles Annealing	58°C, 30초
Extension	72°C, 30초
Melting	60°C~94°C까지 온도 상승

표16. 사용된 oligomer 염기서열 정보

Target gene	Primers	Sequence (5'-3')	Reference
<i>mecA</i>	SAmecA1	AGT TGT AGT TGT CGG GTT TGG	Pozzi 2012
	SAmecA2	GCA TTG TAG CTA GCC ATT CCT T	
<i>blaZ</i>	blaZ239f	AGG TTC AGA TTG GCC CTT AGG A	This study
	blaZ239r	ATA CTT CAA CGC CTG CTG CTT TCG	
16s rRNA	16s_F	GTT ATT AGG GAA GAA CAT ATG TG	
	16s_R	CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC	
<i>gyrB</i>	gyrB-forward	AGT AAC GGA TAA CGG ACG TGG TA	Beenken (2004)
	gyrB-reverse	CCA ACA CCA TGT AAA CCA CCA GAT	

1. Beenken, K.E., Dunman, P.M., McAleese, F., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S.J., Blevins, J.S., Smeltzer, M.S., 2004. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of Bacteriology* 186 (14), 4665-4684.
2. Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections. Pozzi C, Waters EM, Rudkin JK, Schaeffer CR, Lohan AJ, Tong P, Loftus BJ, Pier GB, Fey PD, Massey RC, O'Gara JP. *PLoS Pathog.* 2012 Apr;8(4):e1002626. Epub 2012 Apr 5.

▶ 연구 결과:

- PNA의 antisensing에 의한 항생제의 항균력 회복 효과 (*mecA* possessing *S. aureus* strain (MRSA)에 대한 oxacillin의 항균력 회복): N315는 *mecA*를 가지고 있으며

oxacillin이 높은 농도 ($>64 \mu\text{g/ml}$)로 포함된 배지에서 성장이 지속되는 MRSA 균주임. 본 시험에서는 *mecA*-antisensing PNA를 첨가하면 N315의 *mecA* 발현이 저하되어 이로 인해 N315가 oxacillin이 포함된 배지에서 성장하지 못하는 현상, 즉 oxacillin의 MRSA에 대한 항균력이 회복되는 효과를 확인하고자 하였음. 총 4가지 그룹의 대조군과 실험군이 설정 되었다. 첫 번째 대조군 (Group 1)은 oxacillin이 없는 MHB에서 N315가 성장하는 패턴을 관찰하고자 하였음. 두 번째 대조군 (Group 2)은 oxacillin이 $2 \mu\text{g/ml}$ 농도로 포함된 MHB 배지에서 N315의 성장 패턴을 관찰하였음. 세 번째는 실험군으로서 (Group 3), N315를 oxacillin $2 \mu\text{g/ml}$ MHB에 배양하되 $20 \mu\text{M}$ 의 *mecA*-antisensing PNA (PNA(A), 그림10)를 첨가하여 성장 패턴을 관찰하였음. 네 번째 그룹 (Group 4)은 음성대조군으로서 *mecA*를 가지고 있지 않은 표준균주인 ATCC29740이 oxacillin $2 \mu\text{g/ml}$ MHB 배지에서 어떻게 성장하는지 관찰하여 비교하였음(그림10).

아래 그림에서와 같이, N315는 oxacillin이 존재하는 경우 접종 후 4시간부터 oxacillin이 존재하지 않는 조건보다 성장이 억제되다가 21 시간 후에는 oxacillin이 존재하지 않는 배지에서와 유사한 수준으로 성장이 되어 있는 것을 확인할 수 있었음 (Group 1과 2 비교, 그림10). 그런데 *mecA*-antisensing PNA를 첨가할 경우 N315는 2시간 이후부터는 첨가하지 않은 그룹에 비해 유의적으로 균 수가 낮아졌고 (Group 2와 3 비교, 그림10) 이후 계속 성장이 억제 되어 8시간 후 부터는 *mecA* 유전자를 가지지 않은 균주와 유사한 정도의 성장 패턴을 나타냈음 (Group 3과 4 비교, 그림10). 이 실험을 통하여 MRSA에서 PNA에 의한 *mecA*-antisensing이 일어날 수 있음을 확인하였음(그림10).

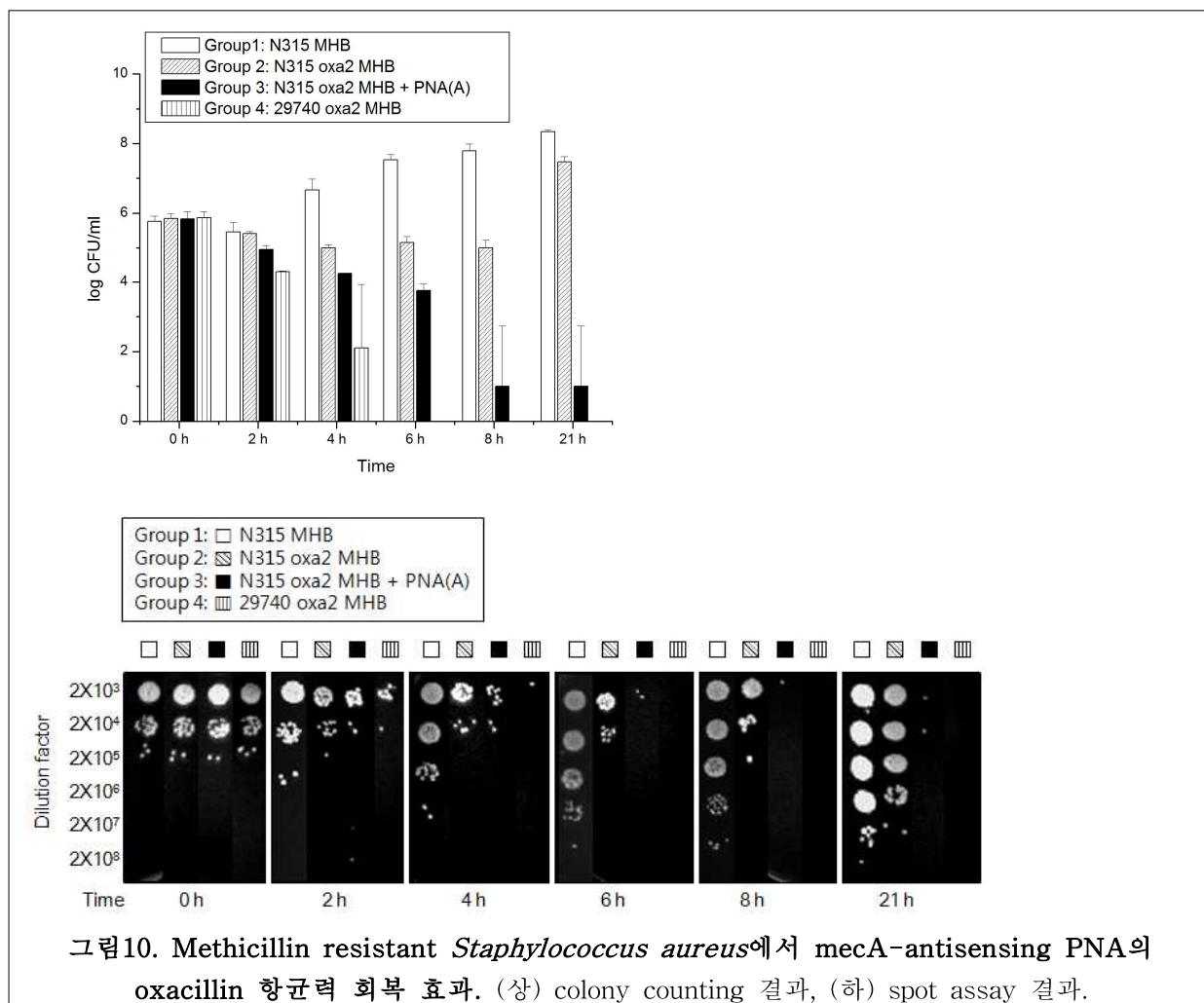
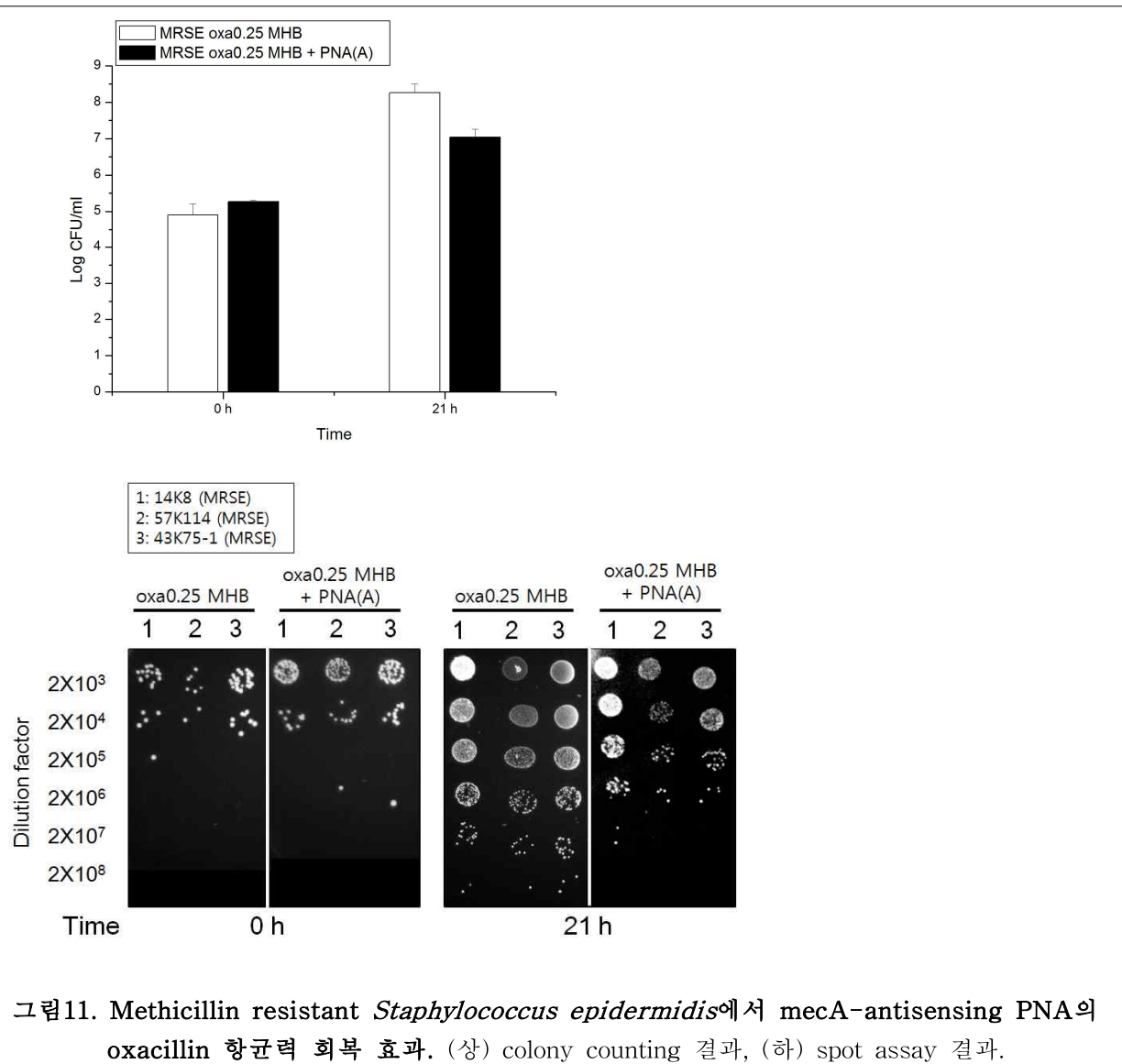
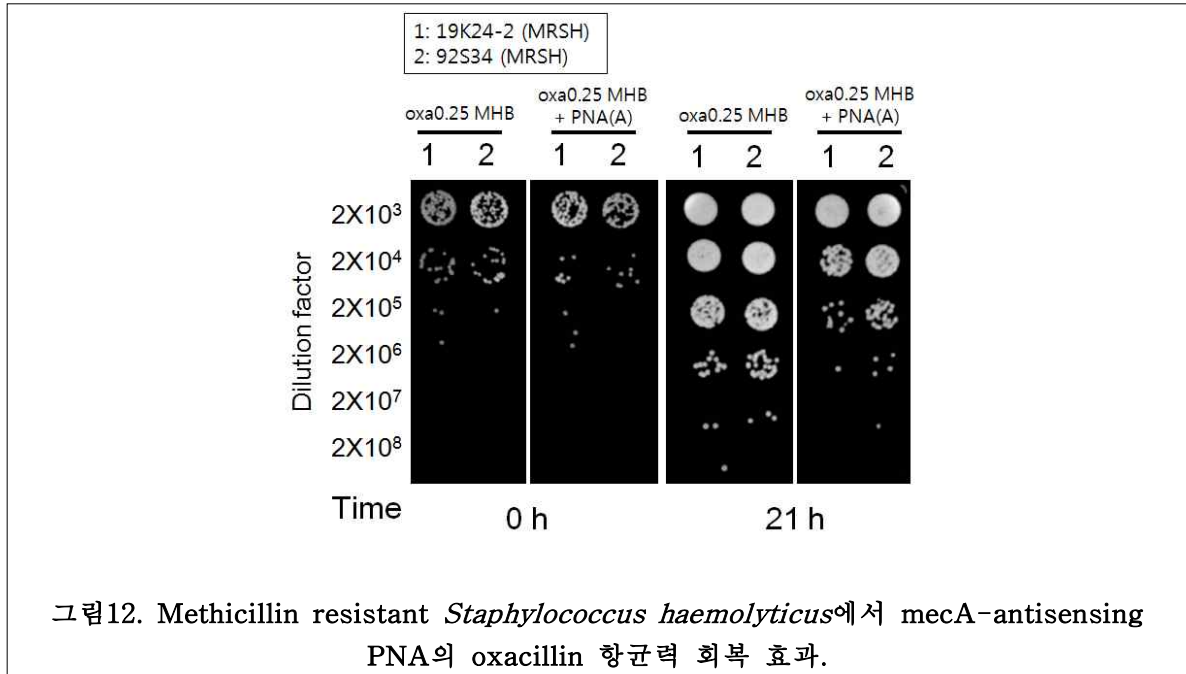


그림10. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*에서 mecA-antisensing PNA의 oxacillin 항균력 회복 효과. (상) colony counting 결과, (하) spot assay 결과.

- *mecA* possessing CNS strain (MR-CNS)에 대한 oxacillin의 항균력 회복: MRSA에서 확인된 PNA의 oxacillin 항균력 회복 현상이 다른 *Staphylococcus* spp.에서도 나타나는지 검증하기 위하여 우선 3개의 MR-*S. epidermidis* (MRSE) 분리주 (14K8, 57K114, 43K75-1)를 이용하여 시험하였음. 대조군으로는 MRSE 분리주를 oxacillin이 0.25 μ g/ml이 포함된 MHB에 배양하고, 실험군에는 oxacillin이 0.25 μ g/ml이 포함된 MHB에 20 μ M의 mecA-antisensing PNA를 첨가하여 배양하였음. 그 결과 세 가지 균주 모두 PNA가 첨가된 경우 성장이 유의적으로 억제 되는 것을 확인할 수 있었음. 이 실험을 통하여 MRSA만이 아니라 MRSE에 대해서도 PNA에 의한 mecA-antisensing이 일어날 수 있음을 확인하였음 (그림11).

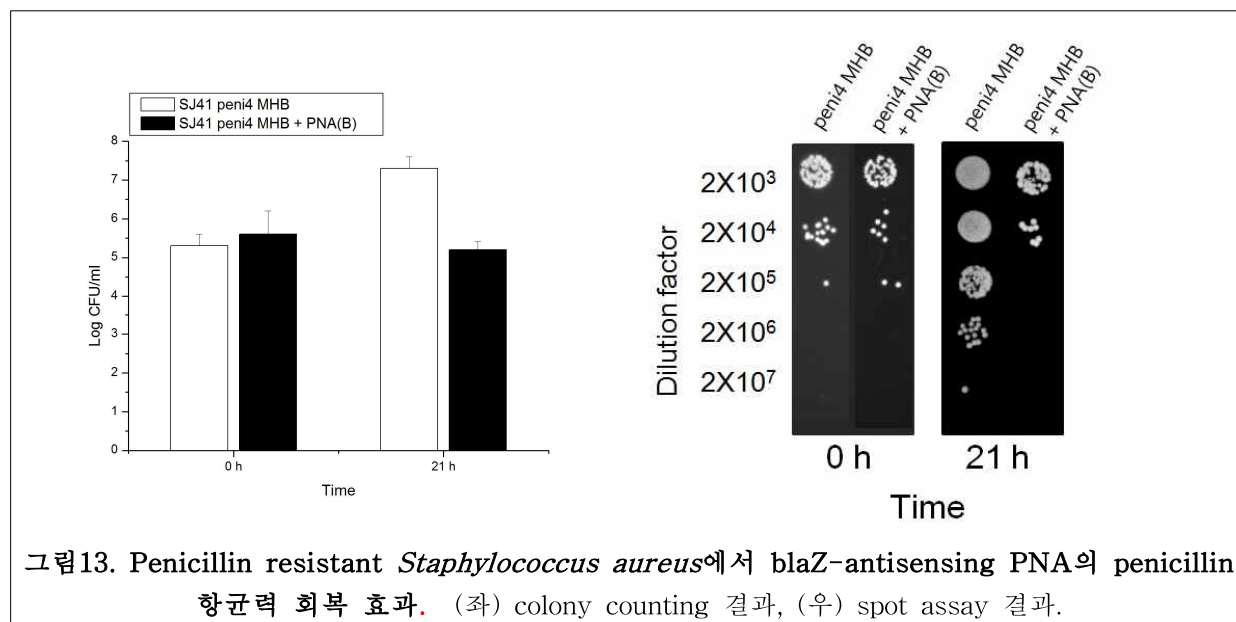


PNA의 oxacillin 항균력 회복 현상이 MR-*S. haemolyticus* (MRSH)에서도 나타나는지 검증하기 위하여 우선 2개의 분리주 (19K24-2, 92S34)를 이용하여 시험하였음. 대조군으로는 MRSE 분리주를 oxacillin이 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 이 포함된 MHB에 배양하고, 실험군에는 oxacillin이 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 이 포함된 MHB에 20 μM 의 mecA-antisensing PNA를 첨가하여 배양하였음. 그 결과 두 가지 균주 모두 PNA가 첨가 된 경우 성장이 유의적으로 억제 되는 것을 확인하였음. 이 실험을 통하여 MRSA만이 아니라 MRSH에 대해서도 PNA에 의한 mecA-antisensing이 일어날 수 있음을 규명하였음(그림12).



- **blaZ possessing *S. aureus* strain에 대한 penicillin의 항균력 회복:** blaZ-antisensing PNA에 의한 penicillin의 항균력 회복 효과를 검증하기 위해 blaZ를 가지고 있는 *S. aureus* 분리주인 SJ41균주를 이용하였음. 대조군으로는 penicillin이 4 µg/ml 농도로 포함된 MHB에 배양하고, 실험군으로는 이와 동일한 조건 하에 blaZ-antisensing PNA (PNA(B), 그림12)를 40 µM 농도로 첨가한 상태에서 배양하였음. 그 결과 blaZ-antisensing PNA가 첨가된 경우 SJ41 균주의 성장이 유의적으로 억제 되는 것을 확인하였고, 이 실험을 통하여 blaZ를 가지고 있는 penicillin resistant *S. aureus*에서 blaZ-antisensing PNA에 의한 penicillin의 항균력 회복 효과를 증명하였음(그림13).

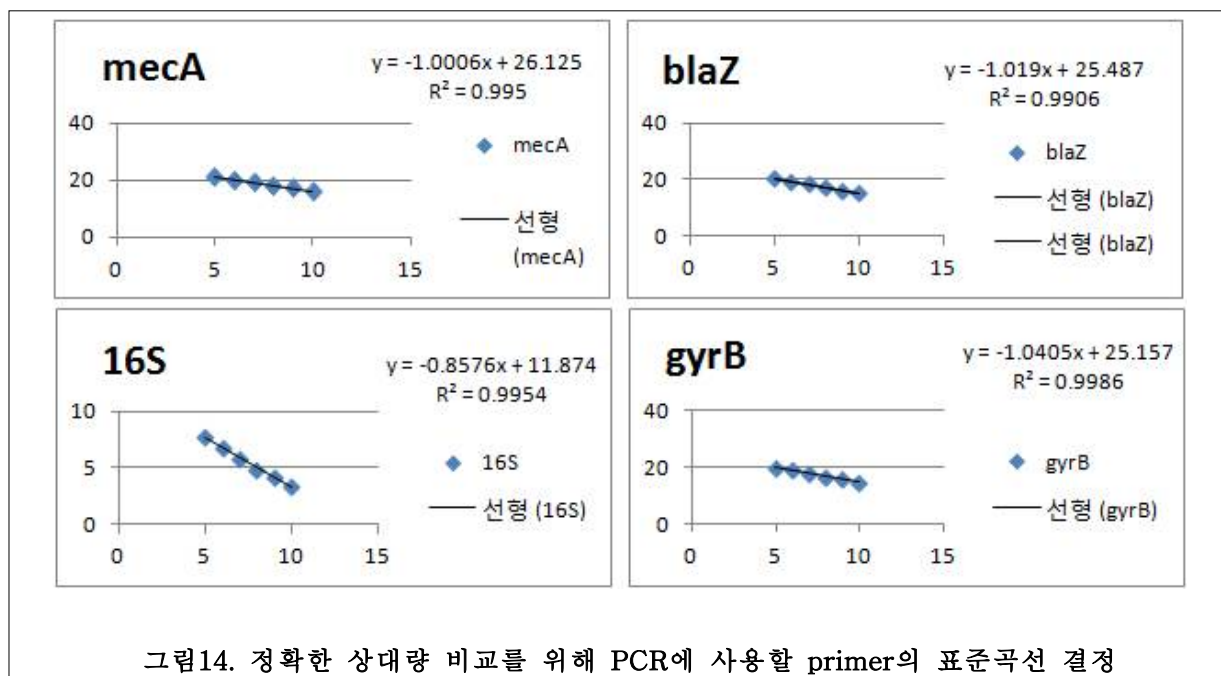
추후 다른 blaZ 보유 penicillin resistant *Staphylococcus* strain에 대한 blaZ-antisensing 효과도 검증할 예정임. 또한 이것이 PNA의 독성에 의한 성장억제가 아니라 유전자 발현억제에 의한 penicillin 효과의 회복 현상임을 증명하기 위해 penicillin이 포함되지 않은 배지에 blaZ-antisensing PNA만을 첨가하였을 때에는 성장이 억제되지 않음을 검증할 것임.



- PPNA에 의한 항생제 항균력 회복 현상의 분자적 기전 규명: PPNA에 의한 항생제 항균력 회복 현상의 분자적 기전 규명 real-time qPCR standard curve 산출하였음. mecA와 blaZ-antisensing이 mRNA transcription 단계에 영향을 미치는 지 검증하기 위해 PNA를 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹의 mRNA양을 reverse transcriptase real-time PCR을 이용하여 비교하였음. 정확한 상대량 비교를 위해 PCR에 사용할 primer의 standard curve를 아래 표17와 같이 측정하였음 (표17 & 그림14).

표17. RT-qPCR에 의한 mecA와 blaZ의 mRNA expression 분석을 위한 표준화

DNA concentration (ng/ul)	Ct			
	mecA	blaZ	16S	gyrB
1000	16.1	15.6	3.4	14.7
500	17.1	16.1	4.3	15.9
250	18.1	17.2	4.8	16.9
125	19.4	18.4	5.8	17.9
62.5	20.2	19.4	6.8	19.0
31.25	21.0	20.5	7.7	19.9



- **mecA-antisensing PNA 처리 그룹에서의 mRNA 변화량 측정:** N315를 MHB에 배양하면서 mecA-antisensing PNA를 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹에서 mRNA를 추출한 뒤 reverse transcriptase PCR을 실시하여 cDNA를 합성하였음. 합성된 cDNA를 template로 하여 real-time PCR을 실시하여 각 유전자에 대한 Ct 값을 측정함. realtime PCR은 target 유전자인 mecA, 그리고 N315가 보유하고 있는 또다른 beta-lactam계 항생제에 대한 내성 유전자인 blaZ, 마지막으로 두 개의 housekeeping 유전자 (gyrB, 16s rRNA)에 대해 실시하였음. 측정된 Ct값을 위에서 산출된 standard curve에 대입하여 DNA concentration으로 환산한 후, mecA, blaZ, gyrB의 concentration을 16s rRNA의 concentration으로 나누어 보정. 이러한 계산은 target 유전자의 Ct값에서 housekeeping 유전자의 Ct값을 빼주는 delta Ct method와 동일한 결과를 나타냄.

PNA처리 그룹의 16s rRNA로 보정된 mecA, blaZ, gyB 유전자의 상대량은, PNA 비처리 대조군 그룹의 그 값으로 다시 나누어 최종적으로 그룹 사이 상대적 차이 (relative ratio)를 산출하게 되며, 이것은 각 그룹의 delta Ct값을 빼주는 delta delta Ct method와 동일한 결과를 나타냄. 두 그룹 사이의 target 유전자의 mRNA량이 동일할 경우 relative ratio는 1.0임.

표18. mecA-antisensing PNA 처리 그룹에서의 mRNA 변화량

		Ct				Relative ratio		
		mecA	blaZ	gyrB	16s rRNA	mecA/16s	blaZ/16s	gyrB/16s
No PNA (Control)	Ave. Ct	16.35	14.34	15.1	4.283	-	-	-
	SD	0.785	0.526	0.241	0.104	-	-	-
PNA(A)	Ave. Ct	15.68	14.21	15.2	6.577	12.8	7.2	5.8
	SD	0.764	0.408	0.376	1.868	13.0	6.1	4.7

위의 표18에서 보는 바와 같이, mecA-antisensing PNA를 처리한 그룹의 mecA mRNA는 비처리 그룹보다 12.75 ± 13.04 배, blaZ는 7.216 ± 6.103 , 그리고 또다른 housekeeping 유전자인 gyrB는 5.79 ± 4.709 배 증가하였음. 세 유전자의 상대량은 서로 유의적 차이를 보이지 않았음 (ANOVA $p > 0.05$). Housekeeping 유전자인 gyrB의 relative ratio와 mecA의 relative ratio가 유의적으로 차이가 나지 않았으므로, mecA-antisensing PNA처리 그룹의 mecA mRNA양은 증가하거나 감소하지 않았다고 판단됨. 또한 blaZ mRNA의 상대량도 gyrB mRNA 상대량과 유의적 차이가 보이지 않았으므로, mecA-antisensing PNA처리에 의해 blaZ 유전자의 발현은 영향을 받지 않음을 암시함.

■ 세균침습성 펩타이드 선별

(1) 세균침습성 펩타이드 탐색, 설계 및 합성

▶ 기존 보고된 세균침습성 펩타이드::GFP chimeric protein 발현시스템 구축:

- 연구수행전략 및 방법: 기존 문헌보고에 따르면 $[KFF]_3K$ 서열을 가지는 합성 펩타이드가 세균 침습성을 나타냄을 보고한 바 있으며, mamalian에서 endocytosis 에 관여하는 receptor recycling 신호인자의 N-terminus 펩타이드인 VLTNENPFSDP (이하 VLT)가 세균 침습성이 있음이 보고된 바 있음. 따라서 세균침습성 펩타이드 기능성 검증을 위한 시스템 구축을 위하여, 두 종의 펩타이드를 GFPmut3의 N-end 부위에 6 histidine을 함유하는 in frame fusion을 구축하였음 (그림15). 이를 위하여 아래 염기서열정보를 토대로 디자인한 J295/J297, J296/J297 프라이머를 이용하여(표19) pKEN-gfpmut3 플라스미드(그림15A)를 주형 DNA로 하여 inverse PCR을 수행하였음(그림15). 이후, *dpnI* 제한효소 처리에 의해 intact plasmid를 제거한 뒤, *SalI* 으로 절단하여, self ligation을 수행하였음. 형광을 발현하는 클론에 대하여 플라스미드를 분리 정제한 후, 염기서열 분석에 의해 최종 확인 하였음.

표19. 세균침습성 펩타이드-GFP 재조합단백질 발현을 위한 primer sequences

J295	BPP Fuz F	CCCGTCGACCATCATCATCATCATCATAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCAC	50	Sall
J296	VLT Fuz R	ATGGTCGACGGGATCAGAAAACGGGTTTTCTGTTGGTCAGCACCATATGTATATCTCCTTCTTAAATC	67	Sall
J297	KFF Fuz R	ATGGTCGACTTTGAAGAATTTGAAGAATTTGAAGAATTTTATATGTATATCTCTTCTTAAATC	64	Sall

- 연구 결과: 구축된 시스템을 각각 pKFF-gfpmut2와 pVLT-gfpmut3라고 명명하였고, 과발현 후 형광 조사 후, 강한 녹색형광을 발휘함을 확인하였음 (그림15B와 C). 이들 형광단백질은 6 histidine 에피토프를 함유하고 있어, anti-his antibody를 이용하여 과발현 후, western 분석을 실시한 결과, 1 mM IPTG 유도발현에 의해 다량의 재조합단백질이 합성됨을 확인하였음 (그림16, 화살표)

Discovery of BPPs - building a template plasmid

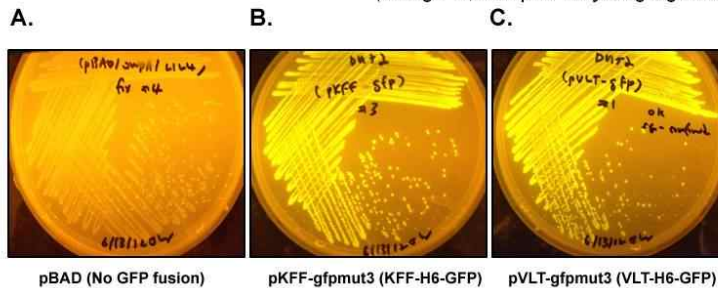
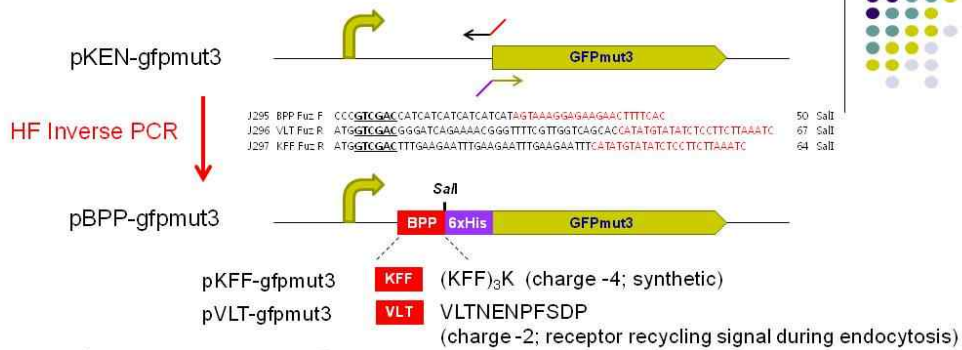


그림15. 기존 보고된 세균침습성 펩타이드::GFP chimeric protein 발현시스템 구축

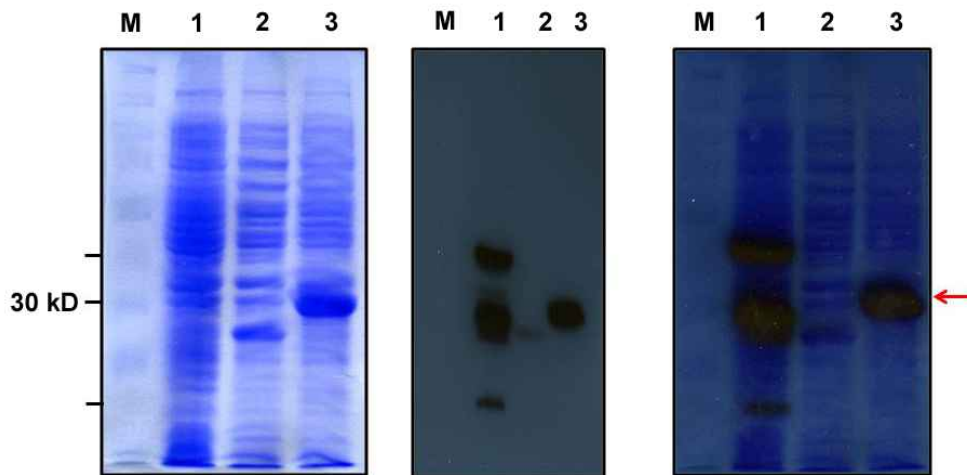
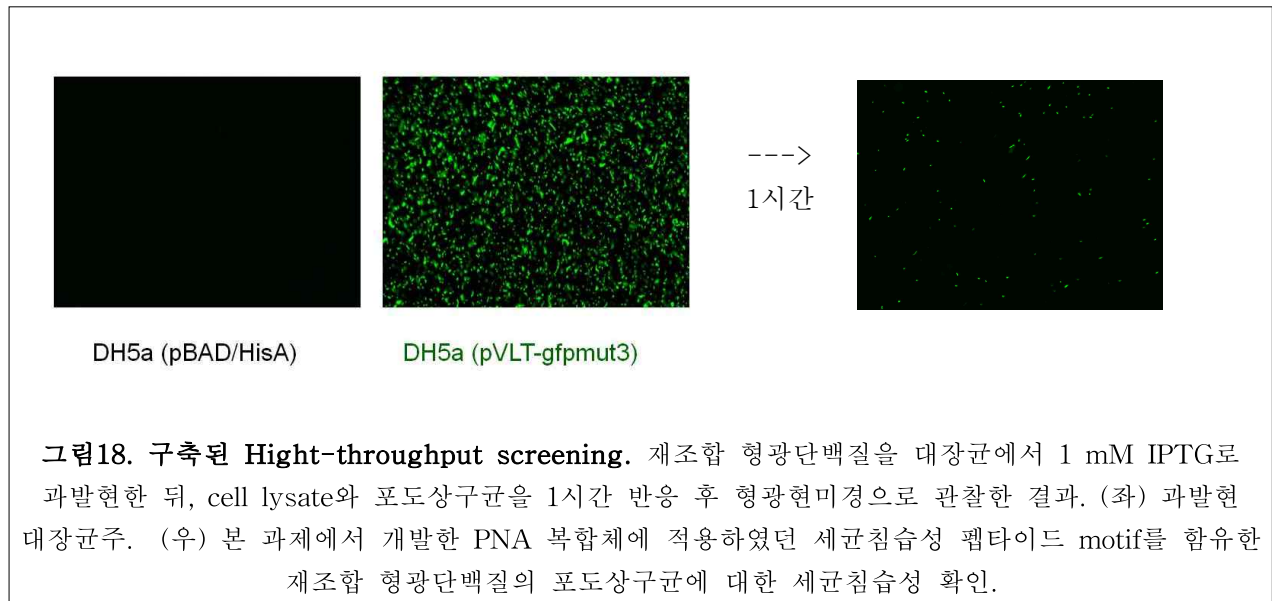


그림16. 기존 보고된 세균침습성 펩타이드::GFP chimeric protein 발현시스템으로부터 재조합단백질 발현 확인. (좌) 1% SDS-PAGE, (중) Western analysis with anti-His antibody, (우) overlapped SDS-PAGE gel & western blot. 화살표는 예상되는 재조합 단백질 (M, prestained protein marker; 1, KFF-GFPmut3; 2, GFPmut3; 3, VLT-GFPmut3).

▶ 신종 세균침습성 펩타이드의 발굴:

- 연구수행전략 및 방법: degenerate PCR을 이용한 무작위 펩타이드 라이브러리를 구축하였음. 아래 표에 있는 degenerate primers J298/J299를 디자인한 후(표20), high-fidelity Taq polymerase를 이용하여 pVLT-gfpmut3를 주형 DNA로 하여 inverse PCR을 통하여 증폭하였음. 이후, *dpnI* 제한효소 처리에 의해 intact plasmid를 제거한 뒤, *SalI* 으로 절단하여, self ligation을 수행하였음. 형광을 발현하는 클론의 경우, in frame GFP 재조합 단



▶ 펩타이드 제작: 후보 펩타이드는 상용화된 제작전문회사에 의뢰하여 제작 및 정제하였음.

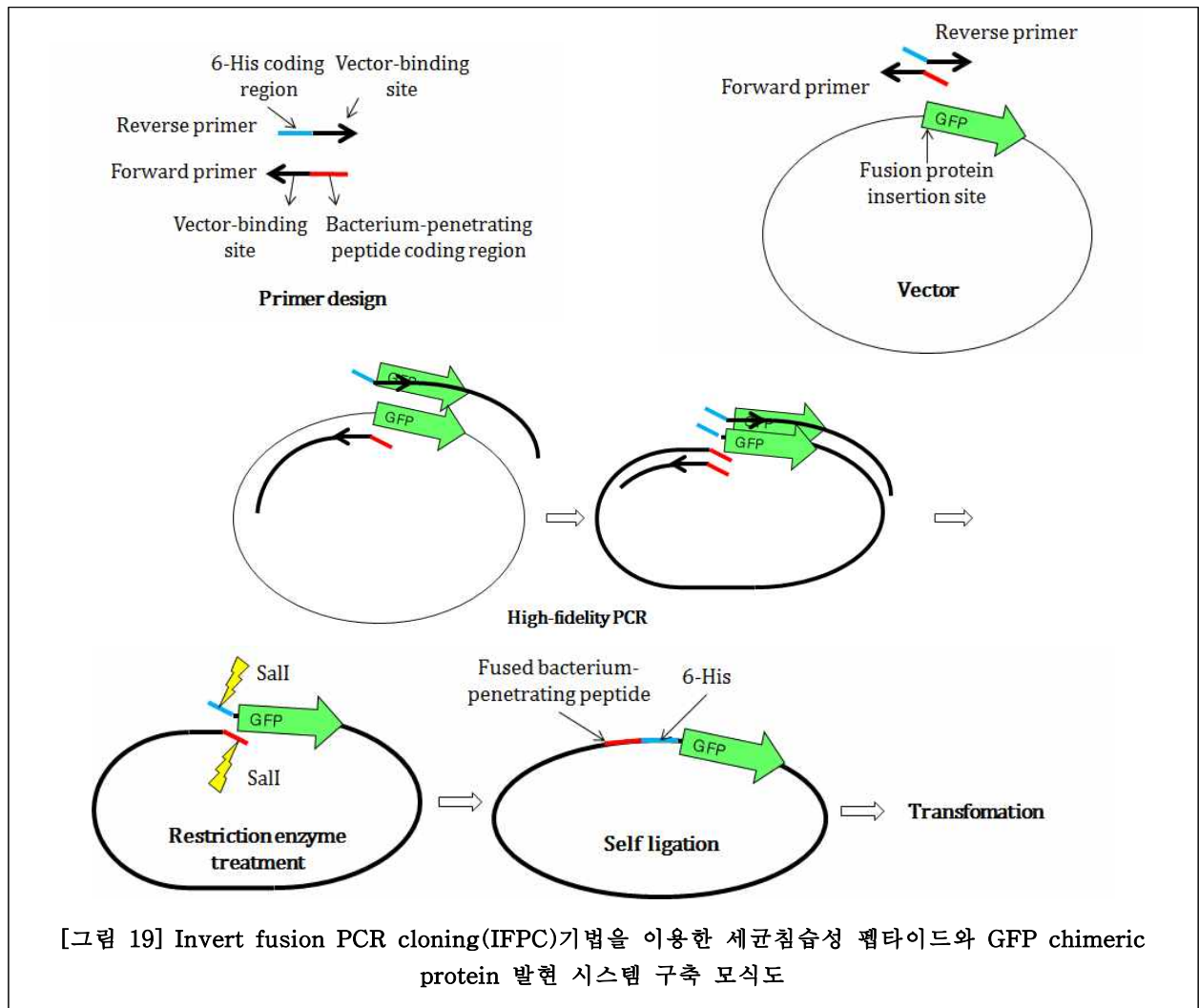
■ 세균침습성 펩타이드(Bacterium-penetrating peptides) 선별

(1) 세균침습성 펩타이드::GFP chimeric protein 생산 라이브러리 구축

가. 표준 세균침습성 펩타이드::GFP chimeric protein 발현 시스템 구축

▶ 연구수행전략 및 방법

- 기존 문헌보고에 따르면 $[KFF]_3K$ 서열을 가지는 합성 펩타이드가 세균침습성을 나타냄을 보고한 바 있으며, mammalian에서 endocytosis에 관여하는 receptor recycling 신호인자의 N-terminus 펩타이드인 VLTNENPFSDP(이하 VLT)가 세균침습성이 있음이 보고된 바 있음.
- 세균침습성 펩타이드 기능성 검증을 위한 표준 시스템 구축을 위하여, 이들 2종의 펩타이드를 invert fusion PCR cloning (IFPC)기법을 이용하여 GFP와 in-frame fusion 후, chimeric protein 발현 시스템을 구축하였음(그림19).
- Template이 되는 GFP expression vector로는 pKEN-gfpmut2를 사용하였음.



▶ Plasmid 고안

- 표준 세균침습성 펩타이드 VLT와 [KFF]₃K의 GFP chimeric protein 생산을 위한 primer 를 다음 [표21]과 같이 고안하였음. VLT::GFP chimeric protein 산생에는 J295/J297, [KFF]₃K-GFP 생산에는 J296/J297 프라이머를 이용하였음.
- [표21]에서 밑줄 친 부분은 SalI restriction site, 파란색은 6×histidine epitope, 붉은 색은 표준 세균침습성 펩타이드 coding region이며, 검은색은 restriction enzyme tail 혹은 vector binding region임.

[표21] 표준 세균침습성 펩타이드::GFP chimeric protin 발현을 위한 primer sequences

J295	BPP Fuz F	CCC <u>GTCGAC</u> CATCATCATCATCATCATAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCAC
J296	VLT Fuz R	ATG <u>GTCGAC</u> GGGATCAGAAAACGGGTTCGTTGGTCAGCACCATATGTATATCTCCTTCTTAAATC
J297	KFF Fuz R	ATG <u>GTCGAC</u> TTGAAGAATTGAAGAATTGAAGAATTCATATGTATATCTCCTTCTTAAATC

▶ High-fidelity PCR

- Master mix (total 50 uL)의 조성: DW (32 uL) + 10x buff w/o MgCl₂ (5 uL) + MgCl₂

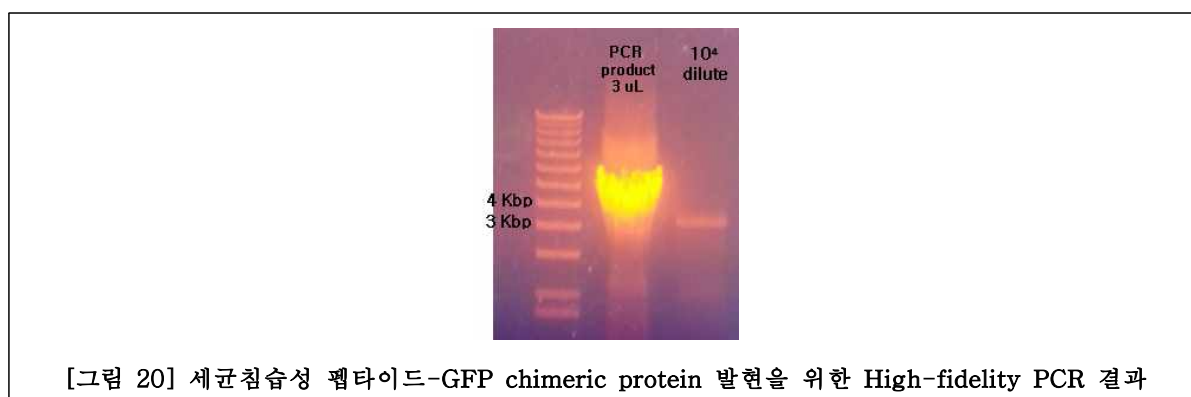
25 mM (5uL) + dNTP (2 uL) + primer 10 pM (각각 2 uL) + Template (1~0.5 uL) + HF taq polymerase (1 uL; Applied Biosystems, GeneAmp® High Fidelity PCR system)

- PCR cycle program:

95	95	68	95	68	68	
3 min	20 sec	3 min	20 sec	3 min*	20 min	12
	58	58	58	58		
	30 sec	30 sec	30 sec	30 sec		
	10 cycle		20 cycle			

* 한 cycle 당 extension time이 5 sec씩 증가

- PCR 결과: 약 3.5 kb 크기의 증폭물이 얻어짐(그림 20). Template인 pKEN-gfpmut2의 크기가 3,531 bp이므로 증폭물의 크기는 예상과 일치하였음.



▶ Cloning

- 이후, dpnI 제한효소 처리에 의해 intact plasmid를 불활화한 뒤, SalI 으로 절단하여, self ligation을 수행하였음. 형광을 발현하는 클론에 대하여 플라스미드를 분리 정제한 후, 염기서열 분석에 의해 최종 확인하였음.
- 해당 재조합 plasmid를 각각 pVLT-gfpmut2, pKFF-gfpmut2로 명명하였음.

나. 신종 세균침습성 펩타이드::GFP chimeric protein 발현 시스템 구축

▶ 연구수행전략 및 방법

- 표준 펩타이드 이외에도 세균침습성이 높은 후보 펩타이드를 선별하기 위하여 표준 펩타이드::GFP 재조합 단백질과 동일한 전략, 즉 IFPC 기법을 이용하였음.
- 이 단계에서 본 연구진이 도입한 창의적 전략은, reverse primer에 random 30 mer를 도입하여, 단 1회의 PCR을 실시하더라도 그 증폭물에 기하급수적으로 다양한 종류의 peptide coding sequence가 존재하도록 하였음(표22 참조).
- Random하게 합성한 30개의 oligonucleotide는 약 4^{30} 가지 unique한 조합을 만들어내며, 이것은 약 1.2×10^{18} 가지이며, 이론적으로 자연계에 존재할 수 있는 모든 펩타이드(10개 아미노산으로 구성)를 발현할 수 있음.

▶ Plasmid 고안

- 신종 세균침습성 펩타이드::GFP chimeric protein 생산을 위한 primer를 다음 [표22]와 같이 고안하였음.

- [표22]에서 밑줄친 부분은 SalI restriction site, 파란색은 6×histidine epitope, 붉은색은 표준 세균침습성 펩타이드 coding region이며, 검은색은 restriction enzyme tail 혹은 vector binding region임.

- High-fidelity PCR, restriction enzyme 처리, ligation 및 transformation은 표준 세균침습성 펩타이드를 구축할 때와 동일하게 실시하였음.

- 5000여개의 세균 침습성 펩타이드 라이브러리를 구축하였으며(그림 21), GFP발현이 확인된 클론은 7% DMSO stock을 만들어 -80℃에 저장하였고, HTS(high-throughput screening)을 통하여 세균 침습성을 확인, 염기서열 분석을 통해 최종 선별하였음.

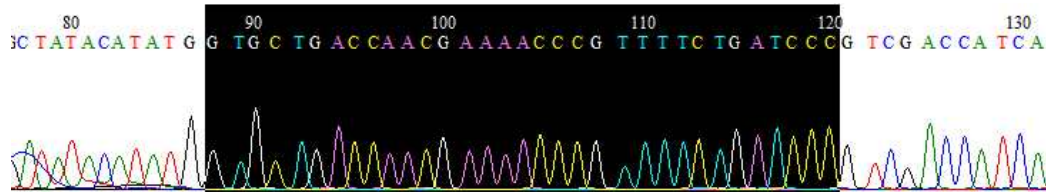
- 라이브러리 클론을 크게 세 가지 타입으로 나누면, ① template vector가 다시 cloning되어 들어간 경우(그림 22A), ② 신중펩타이드 사이에 stop codon이 들어간 경우 (GFP에도 ATG site가 있으므로 형광 발현이 정상적으로 이루어짐; 그림 22B), ③ intact한 신중펩타이드::GFP chimeric protein이 생산되는 경우(그림 22C)로 나눌 수 있음.
- ①번 경우를 최소화하기 위하여 충분한 DpnI 처리가 필요하며, ②보다 ③의 경우의 수가 더 많기 때문에 효율상 큰 문제는 없는 것으로 판단되었음.

A. Template vector가 다시 cloning되어 들어간 경우

>Clone: 130702KA-025

>Oligonucleotide서열: GTGCTGACCAACGAAAACCCGTTTTCTGATCCC

>Peptide서열: VLTNENPFSDP

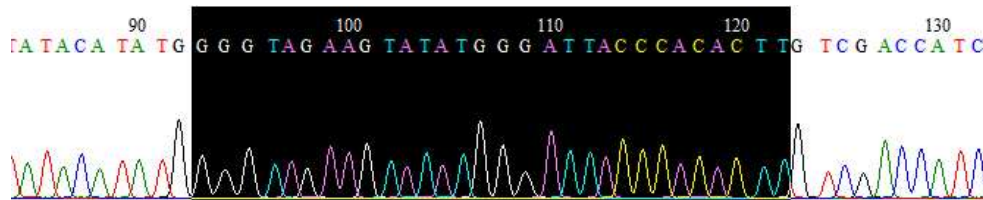


B. 신중펩타이드 사이에 stop codon이 들어간 경우

>Clone: 130408-31_A24

>Oligonucleotide서열: GGGTAGAAGTATATGGGATTACCCACACTT

>Peptide서열: G.KYMGLPTL

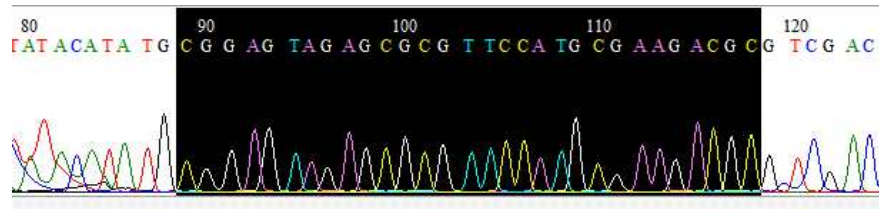


C. Intact한 신중 펩타이드-GFP chimeric protein이 생산되는 경우

>Clone: 130131-31_E24_BPP5-4

>Oligonucleotide서열: CGGAGTAGAGCGCGTTCCATGCGAAGACGC

>Peptide서열: RSRARSMRRR



[그림 22] 신중 펩타이드 라이브러리 clone type

(2) 세균침습성 펩타이드의 세균침습성에 대한 HTS (High-throughput screening) 시스템 구축

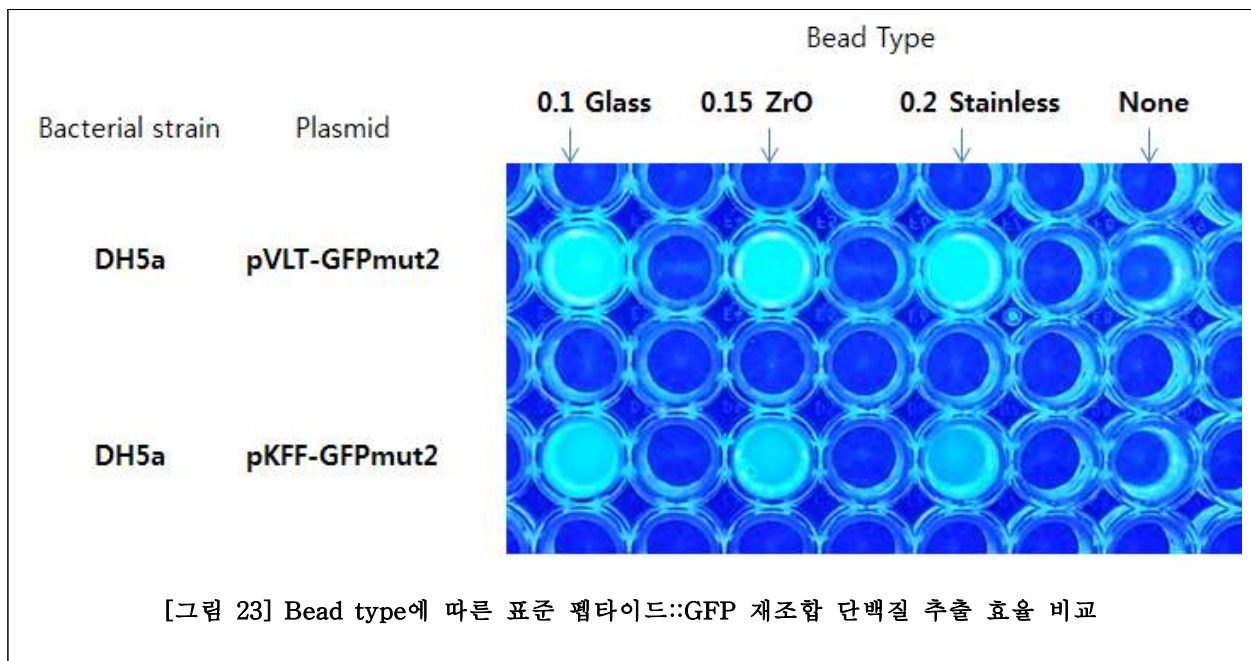
가. 단백질 추출 기법 구축

▶ 연구수행전략 및 방법

- Bullet Blenders® bead beater (Next advance. Inc.)를 이용하여 파쇄하는 방식으로 단백질을 추출하여 구축된 다종의 단백질을 screening하기 위한 system을 구축하였음. 이 방법을 이용하면 한번에 24개의 샘플 처리가 3분 이내에 이루어질 수 있으며, 특히 일반 eppendorf tube를 이용하기 때문에 소모품 가격이 매우 절약됨.

- 균주의 특성에 따라 효율적인 bead의 크기 및 재질이 다르기 때문에, 다음 세 가지 bead를 이용하여 단백질 추출 효율을 비교하였음: ① 직경 0.1 mm Glass bead, ② 직경 0.15 mm Zirconium Oxide bead, ③ 직경 0.2 mm Stainless Steel bead.
- 앞서 구축된 표준 펩타이드::GFP 재조합 단백질을 1 mM IPTG에 의해 과발현 한 후, 샘플에 각각 1 mg의 bead를 처리한 후 6,500 rpm으로 3분간 파쇄하였음. 그 후 13,000 rpm에서 3분간 원심분리 하여 상층액을 취하여 96 well plate에 100 uL 분주 후 자외선 램프에서 관찰하였음.

▶ **연구 결과:** 표준 펩타이드-형광 재조합 단백질 2종을 산생하는 클론에서 (각각 pVLT-gfpmut2, pKFF-gfpmut2 포함) 단백질 추출의 효율성을 관찰한 결과, VLT의 경우 bead 종류에 관계없이 다량의 단백질이 추출 되었으며, 이것은 pVLT-gfpmut2자체가 과발현이 잘 일어나기 때문으로 사료되었음. [KFF]₃K의 경우, 0.1 mm 직경의 glass bead에서 가장 많은 양의 형광단백질이 검출되었음(그림 23). 따라서 신종 펩타이드-형광 재조합 단백질의 추출에서 0.1 mm glass bead를 사용하기로 결정하였음.



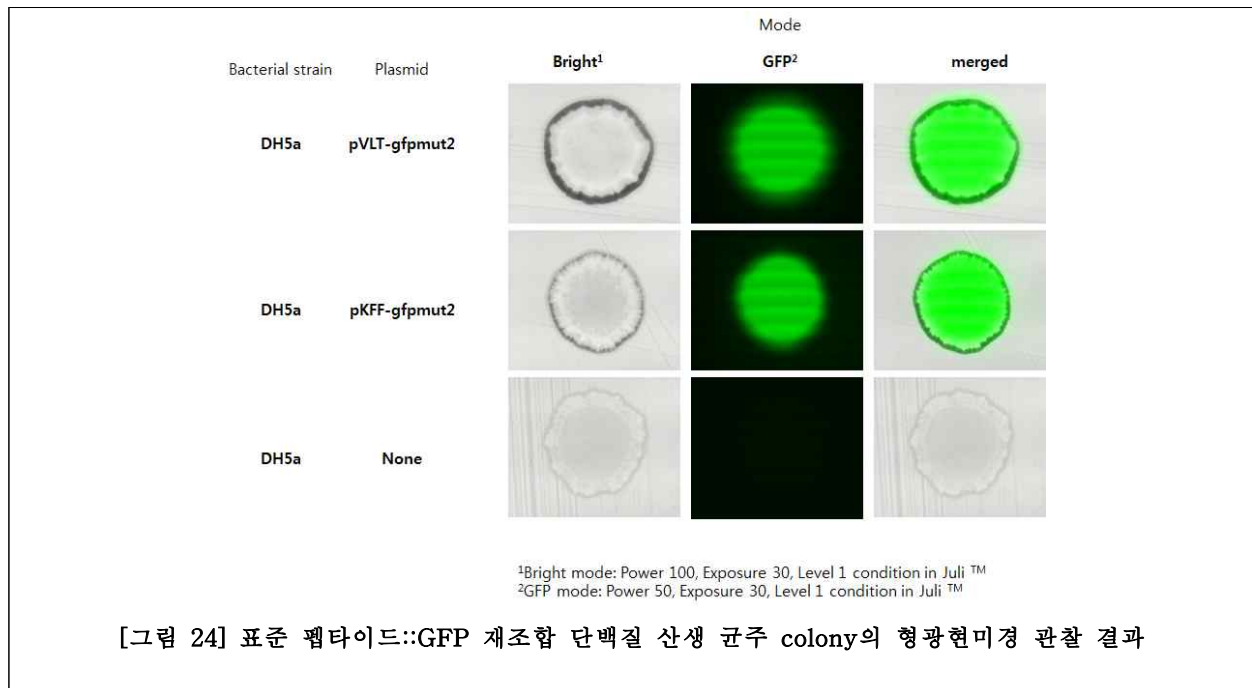
나. 형광현미경을 이용한 세균침습성 펩타이드의 침습 효율 분석 기법 구축

▶ 연구수행전략 및 방법

- 많은 양의 펩타이드::GFP 재조합 단백질의 세균 침습성을 대량으로 빠른 시간 안에 평가하기 위해 형광현미경을 이용하여 형광을 탐색하는 방법을 구축하였음.
- 우선 표준 펩타이드::GFP 재조합 단백질 산생 균주를 이용하여 조건을 수립한 후, 동일 조건 하에 신종 펩타이드::GFP 재조합 단백질을 평가하였음.

▶ 연구 결과:

- 표준 펩타이드::GFP 재조합 단백질을 산생하는 균주를 Juli™ 형광현미경 하에서 관찰한 결과, [그림 24]에서와 같이 일반 광학모드(Bright mode)에서는 Power 100, Exposure 30, Level 1의 조건이 가장 적합하였으며, 형광검출모드(GFP mode)에서는 Power 50, Exposure 30, Level 1의 조건이 가장 적합함을 알 수 있었음. 추후 신종 펩타이드-형광 재조합단백질의 검출에도 위와 같은 조건을 적용하였음.

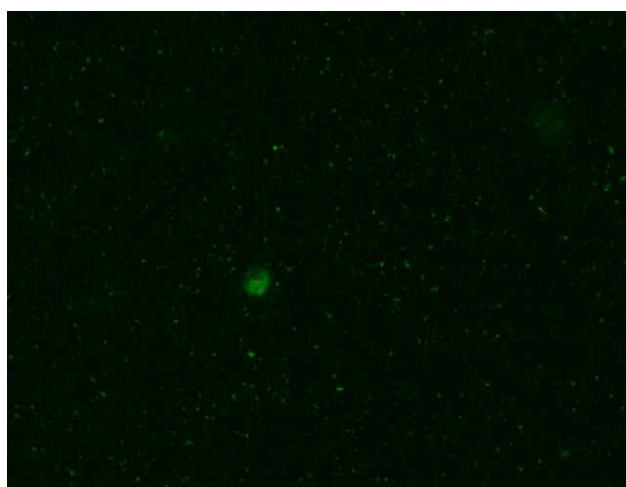


- 이후 표준 펩타이드-형광 재조합 단백질 산생 균주를 1 mM IPTG로 과발현한 뒤, bead로 파쇄하여 단백질을 추출하고, 원심분리한 후 상층액을 대상균주인 *S. aureus* ATCC29740과 37℃에서 1시간 반응 시킨 후, 형광 현미경 하에서 형광유무를 확인함으로써 이들의 세균 침습성을 검증하였음.
- [그림 25]에서와 같이, 표준 펩타이드의 세균침습성으로 인해, *S. aureus*가 형광을 띄는 것을 확인할 수 있었음. 확립된 검증 방법을 이용하여 기 구축된 약 20,000개의 라이브러리에 대하여 신종 세균 침습성 펩타이드의 발굴을 진행 중임.
- 현재까지는 신종 펩타이드가 표준 세균침습성 펩타이드보다 세균침습성이 월등히 높은 경우가 관찰되지 않았기 때문에, 당해연도 PNA에 중합되는 세균침습성 펩타이드는 기 확립된 [KFF]₃K를 활용하였음.
- 세균침습성이 [KFF]₃K와 유사한 정도로 나타나는 펩타이드의 경우, 염기서열분석을 통한 특허 출원을 준비 중이며 신종 펩타이드를 상용화된 제작전문회사에 의뢰하여 제작 및 정제하여 확보할 예정임.

A. 일반광학모드



B. 형광검출모드 ([KFF]₃K처리군)



C. 형광검출모드 (무처리군)



[그림 25] 세균침습성 펩타이드::GFP 재조합 단백질의 *S. aureus* 침습성 평가

■ 주요 유방염 원인균에 대한 세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 기능성 평가

(1) 선발된 광범위 필수생존인자에 대한 세균침습성 안티센스 PNA 복합체 제작

- ▶ **연구수행전략 및 방법:** 표준 세균침습성 펩타이드 및 신종 후보 펩타이드와 PNA 올리고머 중합체(PPNA) 중 세균침습성 펩타이드의 침습효과와 PNA의 안티센스 효과가 극대화되는 중합 형태를 선발하였음. 앞서의 연구결과를 통해 세균내의 침습효과가 높은 penetration peptide인 (KFF)₃K에 lysine 또는 leucine을 linker로 PNA와 결합하여 올리고머 복합체(PPNA)를 디자인하여 두 linker 중 효과가 더 좋은 linker 형태를 비교 분석하였음.
- ▶ **연구 결과:** 앞서의 연구를 통해 세균 침습효과가 좋은 (KFF)₃K를 PNA에 중합 하였으며, 중합 시 linker로서 lysine보다 leucine linker를 사용하였을 경우 상대적으로 안티센스 효과가 증대됨을 관찰하였음. 따라서 유전체 분석을 통하여 얻어진 유전자의 mRNA와 ATG를 포함한 upstream 10-12bp를 주요 표적으로 PNA 올리고머, (KFF)₃K, leucine linker 복합체를 디자인하여 (주)Panagen에 의뢰하여 제작하였음(표 23).

[표 23] 선별된 유전자에 대한 PPNA 복합체 제작

Name	Target gene	Protein	Function	5'to 3' sequence (location)
Pjyh-cmk1	<i>cmk</i>	Cytidylate kinase or cystidine monophosphate kinase	ATP + (d)C/UMP → ADP + (d)C/UDP	(KFF) ₃ K - L - tcatgcgtca (-6 to +4)
Pjyh-deoD1	<i>deoD</i>	Purine nucleoside phosphorylase (PNPase)	Nucleotide synthesis (inosine)	(KFF) ₃ K - L - tcatttggtta (-6 to +4)
Pjyh-ftsA2	<i>ftsA</i>	Cell division protein FtsA	Early component of the Z-ring required for cell division	(KFF) ₃ K - L - catagataggcag (-10 to +2)
Pjyh-glmU1	<i>glmU</i>	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	Acetyltransferase/uridylyltransferase essential for bacterial cell wall	(KFF) ₃ K - L - gcatgaacat (-6 to +3)
Pjyh-ligA1	<i>ligA</i>	DNA ligase	Ligation	(KFF) ₃ K - L - ccatccctta (-6 to +4)
Pjyh-pryH1	<i>pryH</i>	Uridylate kinase	UMP kinase catalyzing UMP phosphorylation	(KFF) ₃ K - L - ccattttctt (-6 to +4)
Pjyh-smpB1	<i>smpB</i>	SsrA(small stable RNA A)-binding protein	Required for recycling of ribosomes	(KFF) ₃ K - L - tcatactcac (-10 to -1)

(2) 안티센스 PNA 복합체(PPNA)에 의한 표적유전자 발현침묵효과의 정성·정량적 분석(1)

가. 목적균주에 대한 표적유전자 발현침묵효과의 분석

- ▶ 연구수행전략 및 방법: 목적균주인 *S. aureus* ATCC29740에 대한 PPNA의 발현침묵효과에 대한 정성분석을 위해 colony counting analysis 및 spot test를 실시하여 발현침묵효과가 높은 PNA를 선발하였으며, transcriptional level에서의 목적유전자에 대한 정량적 분석을 위해 RNA isolation 과 Real time-quantitative PCR을 실시함.
- PNA 복합체(PPNA) Stock 준비 및 배지 조건: 모든 PPNA는 3차 증류수를 희석농도에 맞게 추가하여 400 μ M의 농도로 사용하였음. 본 시험에는 액체배양을 위해 Mueller-Hinton broth(MHB) 혹은 Trypton soy broth(TSB)를 고체배지 상의 배양을 위해서 Mannitol Salt Agar(MSA) 또는 TSA(Trypton Soy Agar)를 사용하였음.
- Spot assay 및 CFU(Colony Forming Unit)를 통한 기능성의 정성 및 정량적 분석: 시험에 사용한 균주의 glycerol stock을 loop를 이용하여 blood agar에 접종하여 37°C에 16-24 hr 배양한 후 single colony를 취하여 blood agar에 계대 배양하였음. 계대 배양한 blood agar로부터 MHB 또는 TSB에 1 ml에 16 hr 배양하여 OD₆₀₀에서 측정을 한 뒤, 값을 3.0으로 조정하였음. 약 2.0×10^9 CFU/ml로 맞춘 뒤 10^{-4} 으로 희석하여 초기의 배양액의 균수를 약 1.0×10^5 CFU/ml로 맞추었음. Spot Assay는 균수를 각 time별로 원액으로부터 5 μ l를 취하여 0.85% 식염수에 10-fold serial dilution을 하여 MSA 혹은 TSA에 5 μ l씩 drop하여 37°C에 배양하여 18-24 hr 후 dilution factor에 적합하게 colonies가 형성되면 counting하여 CFU를 측정하였음. 동시에 필요에 따라서 고체 배지에 적정하게 희석을 하여 예측된 희석배수에 적합하게 약 100여개의 colonies가 생성되면 counting하여 CFU를 측정하였음.
- Total RNA추출: 균 배양액 200 μ l을 Centrifuge하여 RNase free water로 washing한 후 RNA를 추출하였음. 필요에 따라 -20°C 냉동 보관하였음. 13,000 rpm, 2 min 원심분리하고 상층액을 제거한 후 enzymatic lysis buffer 100 μ l를 sample pellet에 첨가하여 재부유하고 37°C에서 30분간 반응시켰음. 약 5분 간격으로 enzymes이 골고루 섞일 수 있도록 vortexing 하였음. Enzymatic lysis buffer의 조성은 Tris-EDTA(TE, pH 8.0) buffer에, lysostaphin 100 μ g/ml 그리고 proteinase K (Qiagen) 10 μ l을 첨가하여 제조했고, 필요에 따라 beads를 섞은 뒤 vortexing을 통하여 mechanical lysis를 추가하였음. 이후 과정은 RNeasy Mini Kit (Qiagen)를 이용하였음. TE 100 μ l에 RLT buffer를 350 μ l 첨가하고 vortexing 한 후, 14,800 rpm, 2 min 원심분리하여 상층액의 400 μ l를 취하여 새 tube에 담은 후 sample당 100% ethanol 220 μ l씩 첨가하고 골고루 섞일 수 있도록 pipetting 하였음. RNeasy Mini spin column을 2 ml collection tube에 끼운 상태로 sample을 column에 적용하고 13,000 rpm, 15초간 원심분리 하였음. Column washing을 위하여 RW1 buffer를 sample당 700 μ l씩 첨가하고 13,000 rpm, 15초간 원심분리하고, RPE buffer를 sample당 500 μ l씩 첨가하고 13,000 rpm, 15초간 원심분리를 2번 실시하였음. Column을 새 collection tube에 바꿔 끼워넣고 ethanol등의 완벽한 제거를 위하여 추가로 14,800 rpm, 2분간 원심분리하였음. Column을 새 collection tube에 바꿔 끼워넣고 35 μ l RNase-free water를 첨가한 후 13,000 rpm, 1분간 원심분리해서 elution하였고, Elution된 solution을 다시 column에 적용하고 원심하여 농축하였음. Elution된 양은 대략 30 μ l이므로 Turbo DNase kit (Ambion) 중 10X DNase Buffer를 4 μ l, DNase I을 4 μ l, Nuclease free water 5 μ l 첨가하여 총 40 μ l volume으로 37°C에서 30분간 반응시켜 genomic DNA의 오염을 제거. 또한 DNase I의 불활화를 위해 DNase Inactivation Reagent 8 μ l 첨가하여 상온에

서 2분간 반응시켰음. 추출된 RNA의 확인을 위해 1% TAE agarose gel에 전기영동하고 Nanodrop으로 RNA의 농도와 purity를 확인하였음.

- cDNA 합성: GoScript™ Reverse Transcription System Kit (Promega)를 이용하여 total RNA로부터 cDNA 합성하였음. RNA는 200ng으로 normalization 하였고, Random 6mers (5 µg) 1 µl, RNase free dH₂O X µl, Template RNA X µl를 농도에 맞게 혼합하여 총 5 µl volume을 70°C에서 5분간 반응시킨 후 즉각 4°C로 냉각시켰음. 위의 5 µl volume에 15 µl reverse transcription reaction mix를 혼합하였음 (mixture: 5X GoScript™ Buffer 4 µl, MgCl₂ 2mM, dNTP 0.5mM, RNase inhibitor 20 U/µl, GoScript™ Reverse transcriptase 1 µl, RNase free dH₂O X µl). 총 20 µl의 mixture를 25°C, 5분 → 42°C, 1시간 → 70°C, 15분 → 4°C 순으로 반응하였음.
- RT (Reverse Transcriptase) PCR: RT-PCR mixture의 조성은 다음과 같이 혼합한 뒤, 최적화 조건에서 RT-PCR을 실시하였음(표 24-26).

[표 24] RT-PCR mixture의 조성

Reagent	Volume (µl)
Solgt™ 2X EF-Tag mix	10
Primer Forward	1
Reverse	1
Template (cDNA)	2
Distilled water	7
Total	upto 20

[표 25] Real-time PCR cycle 구성

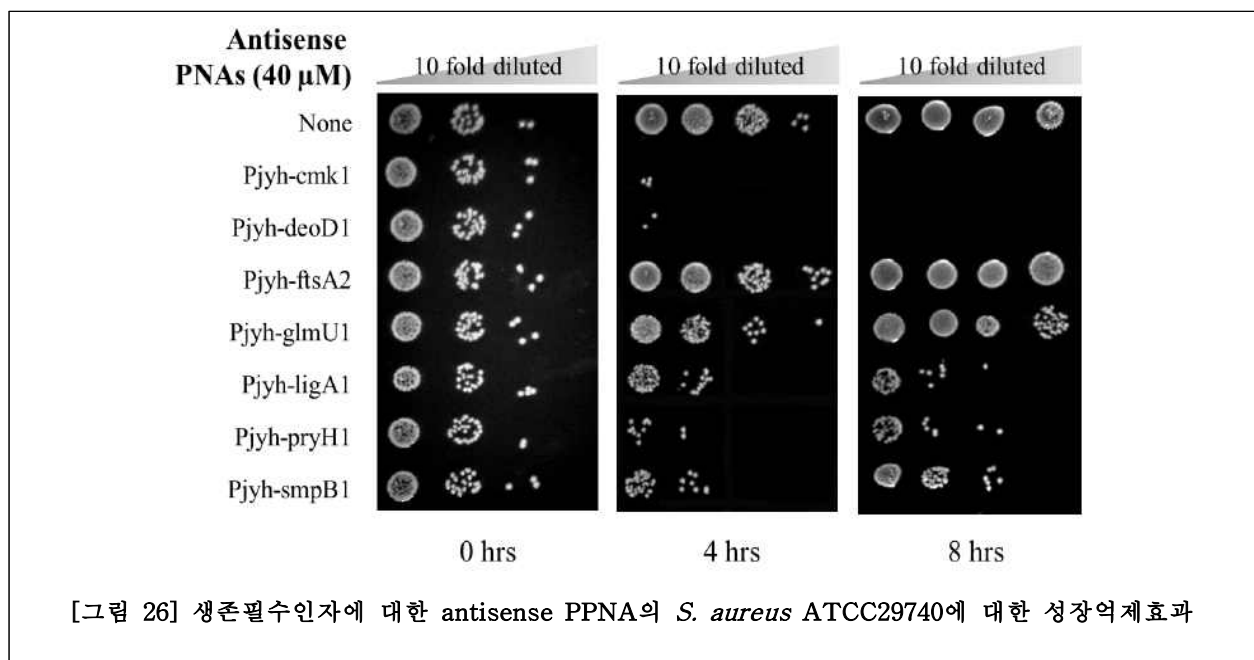
Thermal conditions	Condition
Initial denaturation	95°C, 3분
Denaturation	95°C, 1분
20 cycles Annealing	54°C, 1분
Extension	72°C, 1분
Final Annealing	72°C 10분

[표 26] 사용된 oligomer 염기서열 정보

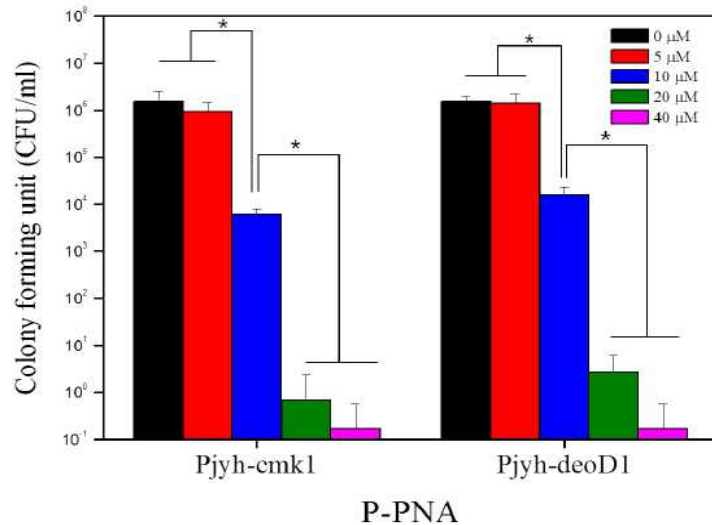
gene	Primer	Sequence (5'-3')	Reference
<i>cmk</i>	cmkRealF1	AAA CGT GTA GCC AGC GAA CT	This study
	cmkRealR1	TTC TGC TCG CTC TTC AAC TG	This study
<i>deoD</i>	deoRealF1	CTT GTG GCG CAT TAC AAG AA	This study
	deoRealR1	TAC CAG CAT GAA TCG CAT TT	This study
<i>gyrB</i>	gyr297F	TTA GTG TGG GAA ATT GTC GAT AAT	Infect Immun.
	gyr574R	AGT CTT GTG ACA ATG CGT TTA CA	2005;73(6):3415-21.

▶ 연구 결과

- **PNA 복합체 (PPNA)의 antisense 효과의 분석과 기능성 평가:** PPNA의 antisense에 의한 growth inhibition의 효과를 확인하기 위하여 위의 7개의 PPNA 복합체를 *S. aureus* ATCC 29740과 함께 8 hr 배양함으로써 기능성 있는 PPNA를 초기 screening하였음(그림 26). PPNA의 농도는 기존 보고의 분석결과 기능성을 평가할 수 있는 최대 농도라고 판단되는 40 μ M을 선택하였고, Spot-assay를 통하여 PPNA의 정성적 기능평가를 실시하였음. 7개 PPNA의 성장억제효과를 비교하였을 경우, Pjyh-cmk1과 Pjyh-deoD1이 유의적으로 가장 높은 성장억제효과를 나타내었음. 약 10^5 CFU/ml였던 초기 균수가 약 10^9 CFU/ml까지 성장한 control에 비하여 Pjyh-cmk1과 Pjyh-deoD1 PPNA의 경우 최대 대략 10^2 CFU/ml까지 성장 억제하는 효과가 있었으며, 약 10^7 배의 growth 차이를 나타내었음.

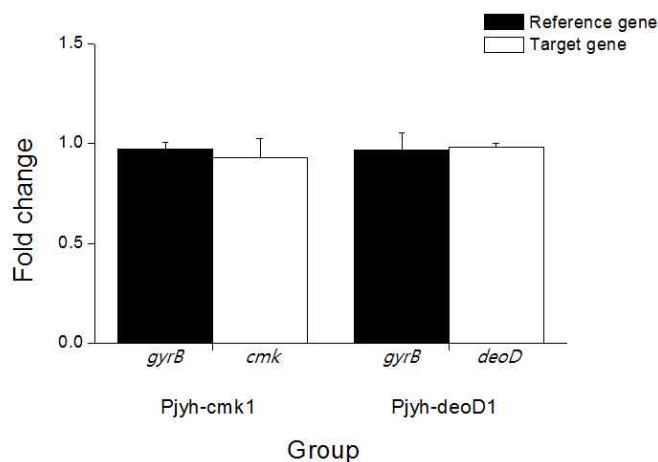


- **PNA 복합체 (PPNA)의 최소유효 농도 결정:** 위의 실험에서 선발된 Pjyh-cmk1과 Pjyh-deoD1의 최소유효억제농도 (minimal effective concentrations, MEC)를 결정하기 위하여 40 μ M에서 2진 희석된 농도로 CFU를 측정하였음(그림 27). 실험결과, 4 hr을 기준으로 5 μ M에서는 성장억제 효과가 없었으며, 20 μ M부터 최소한의 억제효과를 확인하였음.



[그림 27] Pjyh-cmk1과 Pjyh-deoD1의 최소유효억제농도 결정

- **PPNA 복합체에 의한 mRNA 발현량 측정:** 위의 실험결과, 4 hr을 기준으로 모든 균주에서 세포의 초기 생균수, 성장조건과 관계없이 성장억제 효과가 있음을 판단하여, mRNA의 분리 또한 4 hr으로 결정하였음. PPNA는 대표적으로 Pjyh-cmk1과 Pjyh-deoD1를 사용하였으며 농도는 20 μM를 사용하였음. mRNA의 초기 농도를 standardization 하기 위하여 일반적인 structural gene인 *gyrB*를 control로 사용하였으며, 초기 세포수를 실험 volume (200 μl)당 대략 1.0×10^9 CFU/ml 으로 맞춘 후 4 hr 이후 mRNA의 분리와 cDNA의 합성, 그리고 RT(Reverse Transcriptase)-PCR의 방법으로 mRNA의 발현 여부를 확인하였음. 실험 결과, [그림 28]에서와 같이 Pjyh-cmk1과 Pjyh-deoD1 처리군 모두에서 mRNA 상대량의 변화가 관찰되지 않았음.



[그림 28] Pjyh-cmk1 and Pjyh-deoD1처리에 따른 mRNA expression level의 상대적 변화

나. 다양한 대상균주에 대한 표적유전자 발현침묵효과의 분석

- ▶ **연구수행전략 및 방법:** 앞에서 목적균주에 대해 높은 발현침묵효과가 나타났던 PPNA를 다양한 유방염 원인균주에 적용하여 PPNA의 발현침묵효과에 대한 정성분석을 실시하였음. 이를 위해 colony counting analysis 및 spot test를 실시하였음.
- 균주 및 배지준비: 본 실험에서는 총 10종의 그람 양성 및 음성 표준균주를 사용하였음(표 27). *S. aureus* ATCC 29740은 Newbould에 의해 유방염 젖소의 원유에서 분리한 균주로써 대조균으로 사용하였으며(Can Vet J. 1968;9:107-115), *S. aureus* 이외의 species는 한국에서 유방염의 원인균으로 빈도 높게 분리되는 균주로써 ATCC로부터 구입하였음.

[표 27] 본 실험에 사용한 균주목록

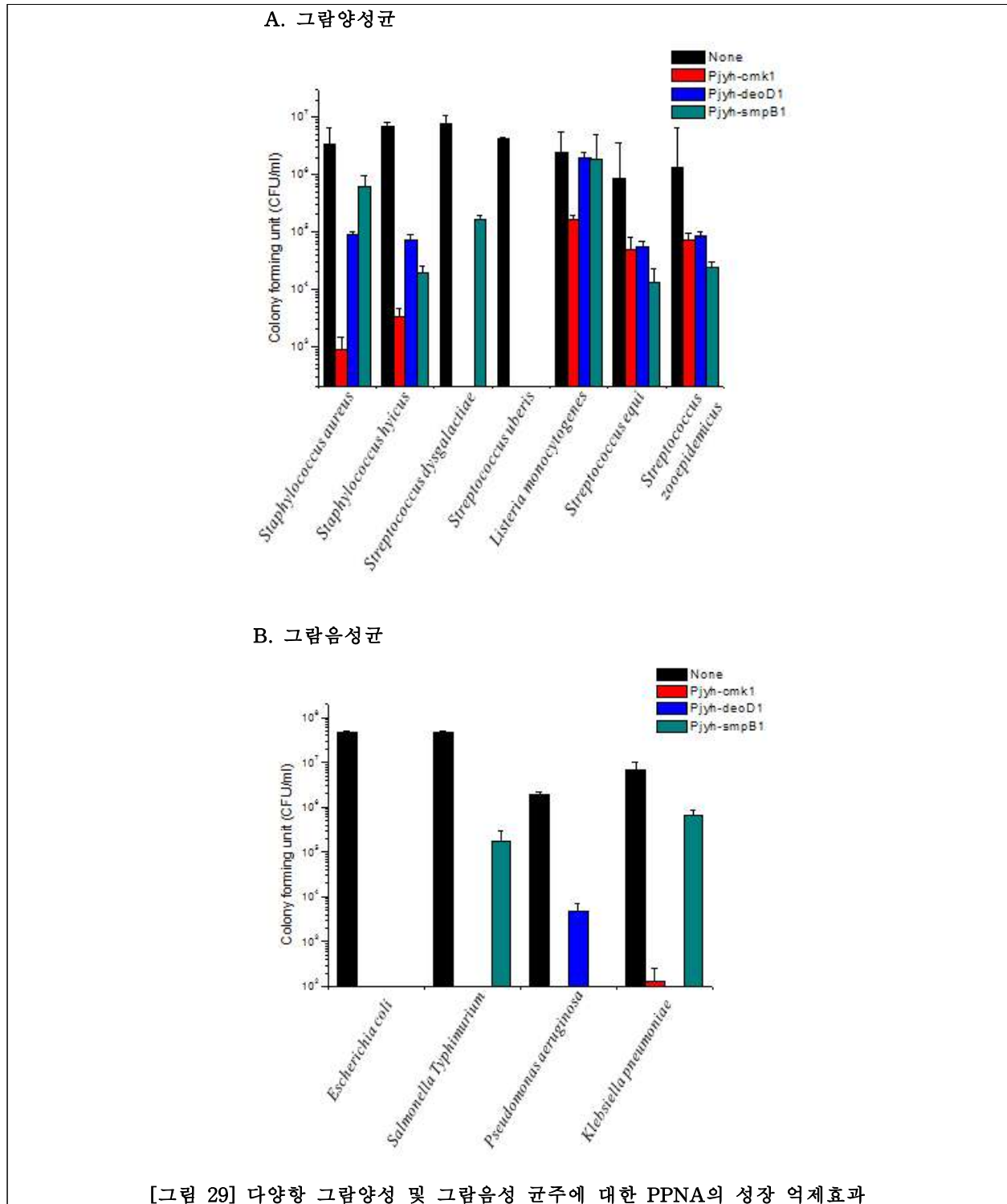
Bacterial strains	ATCC number ^a	Strain Designation	Isolation	Antigenic Properties
<i>Staphylococcus aureus</i>	29740	305	Bovine mastitic milk	
<i>Staphylococcus hyicus</i>	11249	CCM 2368, NCTC 10350	Pig with exudative epidermitis	
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	27957	NADC Z-8	Bovine udder infection	Lancefield's group C
<i>Streptococcus uberis</i>	27958	NADC C-1	Bovine udder infection	
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>equi</i>	33398	NCTC 9682		Lancefield's group C
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	43079	NCDO 1358, NCTC 4676, S34	Bovine mastitis	
<i>Listeria monocytogenes</i>	19117	Li 2108	Sheep	Serotype 4d
<i>Escherichia coli</i>	43894	CDC EDL 932	Human feces from outbreak of hemorrhagic colitis	Serotype O157:H7
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	700408	G10215		Phage type (PT) or definitive type (DT) 104
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15442	PRD-10, CIP 103467, NCIB 10421, PCI 812	Animal room water bottle	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	4352	CIP 104216, NCIB 1034	Bovine milk	

^aATCC; American Typing Culture collection

▶ 연구 결과

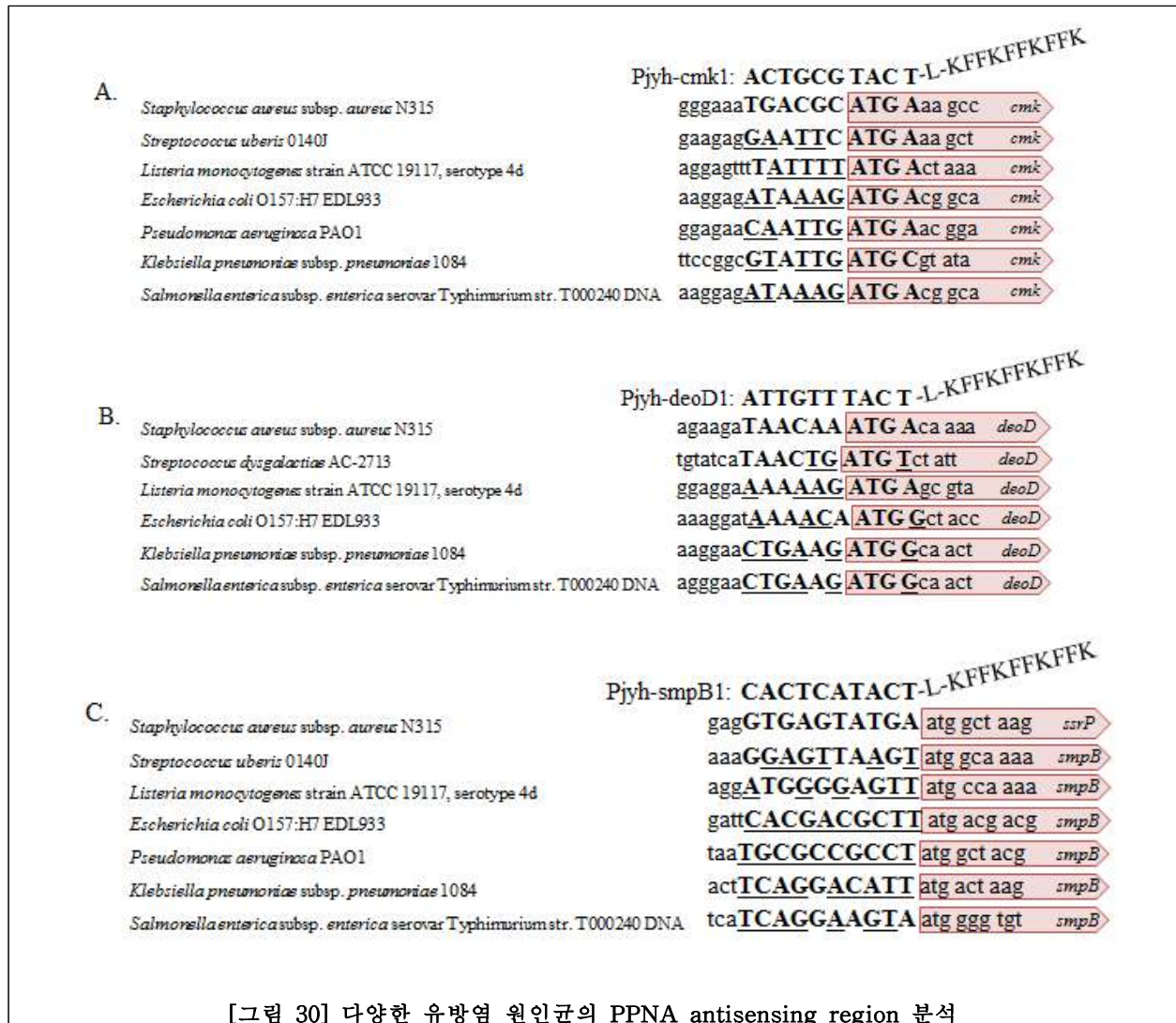
- **여러 유방염 원인균에 대한 신규 PPNA의 효능 검증:** 위의 실험에서 성장억제효과가 가장 높았던 신규 PPNA중에서, 3가지를 선발하여 다양한 유방염 원인균에 대한 성장억제 효과를 검증하였음. Pjyh-cmk1, Pjyh-deoD1, Pjyh-smpB1을 다양한 유방염 원인균에 MEC인 20 μ M로 처리한 후 4 hr 후 관찰하였음. 그 결과 *Listeria monocytogenes*를 제외하고 모든 균주에서 유의적인 성장 억제 효과가 관찰되었으며, *Listeria monocytogenes*에 대해서는 Pjyh-cmk1이 성장억제 효과를 나타내었음(그림 29). 이러한 결과는 본 연구에서

개발한 PPNA가 다양한 유방염 원인균을 동시제어 할 수 있음을 암시함.



- 위의 실험에서 나타난 바와 같이 Pjyh-cmk1, Pjyh-deoD1, Pjyh-smpB1이 다양한 유방염 원인균에 대해 성장억제효과를 나타내었음. 이러한 기전을 증명하기 위하여 PNA sequence와 해당 표적유전자의 유사도를 Blast를 통해 검증하였음(그림 30). 그 결과, homology가 약한 균주에 대해서도 성장억제 효과를 보인다는 사실을 알게 되었음. 현재 관찰된 현상에 대한 기전을 탐구 중이지만, 각 균주의 특성에 따라 성장필수인자의

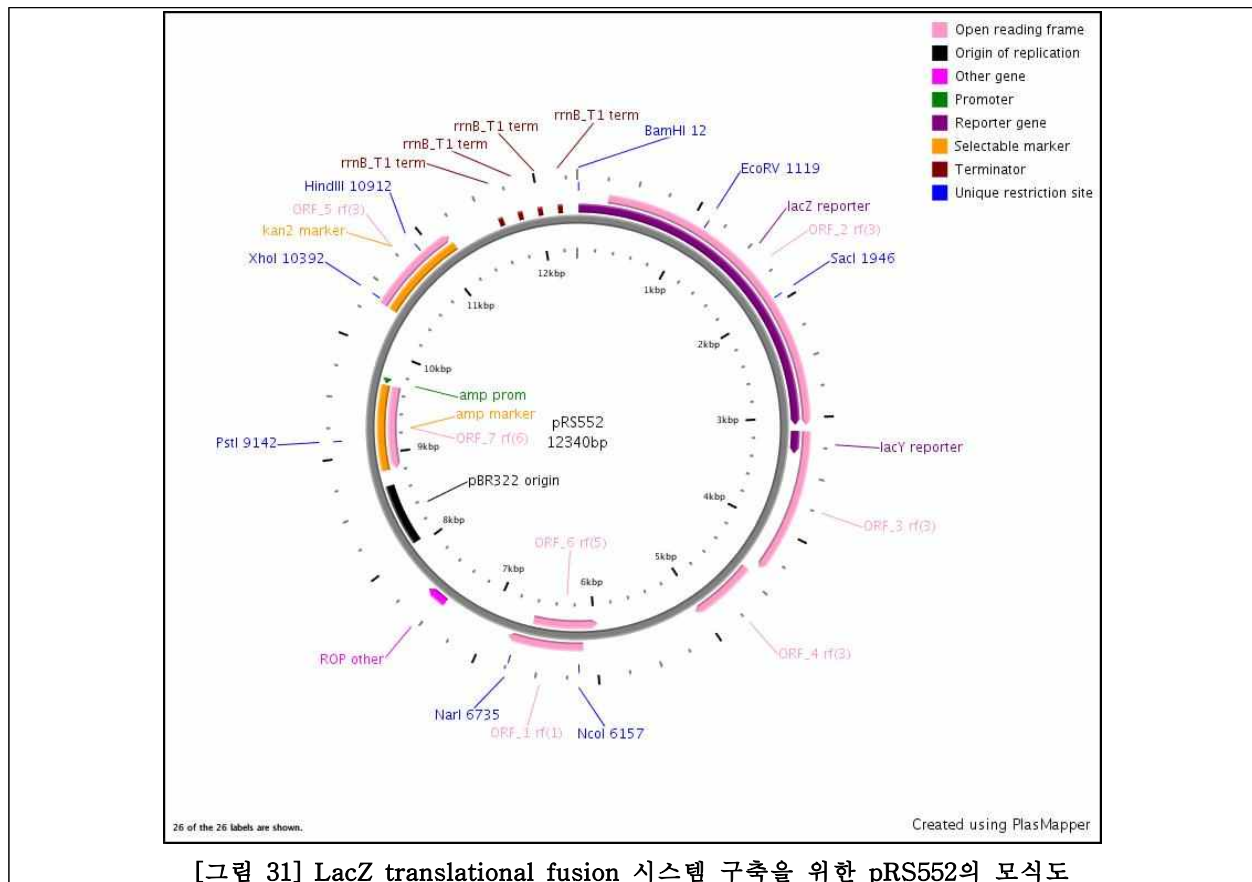
stringency에 차이가 있기 때문인 것으로 추정하고 있음.



[그림 30] 다양한 유방염 원인균의 PPNA antisensing region 분석

다. Post-transcriptional level에서의 정성·정량적 분석

- ▶ 연구수행전략 및 방법: 상기 기술한 바와 같이, 선발된 신규 PPNA에 대한 표적 유전자의 stringency가 높을수록 적은 양의 발현억제에도 성장억제효과가 뚜렷하게 나타날 수 있으며, 이러한 가설을 증명하기 위하여, beta-galactosidase를 표지인자로 하여 해당 유전자의 표적부위에 대한 translational fusion system을 구축하였음.
- beta-galactosidase producing하는 pRS552 plasmid의 lacZ reporter유전자 앞에 PNA의 안티센싱 target 부위를 translational fusion 시킨 형태이며, 성장억제효과가 가장 높았던 Pjyh-cmk1과 Pjyh-deoD1의 target 부위인 cmk, deoD 유전자를 in-frame fusion 하였음 (그림 31).



[그림 31] LacZ translational fusion 시스템 구축을 위한 pRS552의 모식도

▶ 연구 결과

– CMK repoter cloning:

① cmk 시작부분 서열 정보 NC_002745.2

>c1516600-1516100 Staphylococcus aureus subsp. aureus N315 chromosome, complete genome
 GTTCTTCTAACGTATCGGTACCATGCGTGATAACGAAACCATCATAATATTTATTTGTT
 ACTGCTTCTAAAATAATATCCTTTAATTGTTTAACATGTTGGATTGTCATATGAGGTGA
 TGGTACATTAAAAGGATTTAATTCATCTATTTGTGCATATTGATTTATGACATCTTGAT
 GCATTGAAATAGGGTTGATATCATTTGTTACTACTTTATTAGATTGGTCTTGTGACATA
 CTAATGGTGCCACCAGTATGAATAACAAGTAGATGTTTCATATATTTCTCCTATATTTA
 ATTTACCTAATTATGATAAAATATTATTCATAAAACGACAAGGAAGGGAAA**TGACGCAT**
GAAAGCCATTAATATTGCA**TTAGATGGTCCAGCTGCTGC**CGGAAAAAGTACAATTGCGA
 AACGTGTAGCCAGCGAACTATCAATGATTTATGTGCGATACAGGAGCAATGTATCGTGCA
 TAACATACAAATATTTAAAATTAAAC

- > box= cmk coding region
- > bold= cmk start codon
- > grey=forward primer binding region
- > bleu= reverse primer binding region
- > yellow= PNA target 서열 (Pjyh-cmk1)

② Primer design with RE site

> Forward = ggGAATTCGGTGCCACCAGTA**AAGAATAACA**

(bold=modified from ATG to avoid dimer, underlined=EcoRI site)

> Reverse = cgGATCC**GCAGCAGCTGGACCATCTAA**

C(underlined=BamHI site)

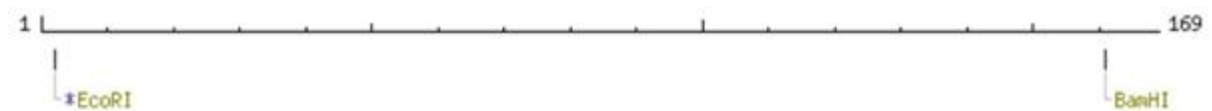
③ Expected PCR product (169 bp)

> 위에서 디자인된 primer set을 이용하여 *S. aureus* N315 strain을 주형으로 하여 PCR을 실시할 경우

ggGAATTCGGTGCCACCAGTAAGAATAACAAGTAGATGTTTCATATATTTTCCTCCTATAT
TTAATTTACCTAATTATGATAAAATATTATTCATAAAACGACAAGGAAGGGAAA**TGACG**
C**ATGA**AAGCCATTAATATTGCA**T****TAGATGGTCCAGCTGCTGC**GGATCCcg

④ RE map of PCR product

>예상되는 PCR product에 양쪽 말단을 제외하고 EcoRI 이나 BamHI site가 없음을 확인함.



⑤ 구축된 cloning product

> PCR product를 pRS552의 EcoRI과 BamHI site 사이에 성공적으로 cloning 할 경우 해당 PCR product와 lacZ의 fusion 결과를 예상하면 아래와 같음.

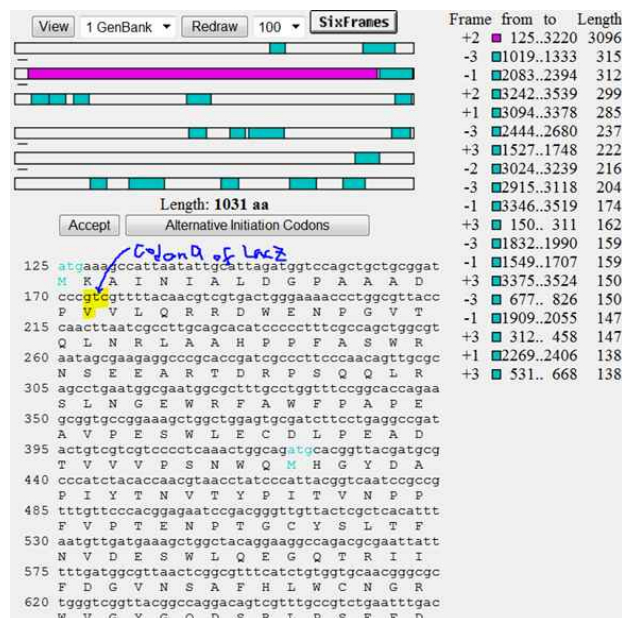
>red 소문자=vector의 lacZ gene / black 대문자=PCR product

>gaaTTCGGTGCCACCAGTAAGAATAACAAGTAGATGTTTCATATATTTTCCTCCTATATTT
AATTTACCTAATTATGATAAAATATTATTCATAAAACGACAAGGAAGGGAAATGACGC
ATGAAA GCC ATT AAT ATT GCA TTA GAT GGT CCA GCT GCT GCG Gaa**ccccgctg**
ttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcggttacccaacttaatcgcttcagcacatcccccttcgccagctggcgtaatagcgaagagg
cccgacccgatcgccctcccaacagttgcgagcctgaatggcgatggcgctttgcctggttcgggcaccagaagcggtgccgaaagc
tggtgctgagtgatcttcctgagggcgatactgctgctgcccctcaaaactggcagatgcacggttacgatgcgccatctacaccaacgtaa
cctatcccattacggtcaatccgctgttgttcccacggagaaatccgacgggtgttactcgctcacattaatgttgatgaaagctggctacagg
aaggccagacgcgaattatgttgatggcggttaactcgcggtttcatctgtggtgcaacgggctgggtcggttacggccaggacagtcgttt
gccgtctgaatttgacctgagcgcatttttacgcgcggagaaaaccgctcgcggtgatgggtgctgctgttgagtgacggcagttatctgga
agatcaggatagtggcggtatgagcgcatttccgtgacgtctggtgtgcataaaccgactacacaaatcagcgatttccatgttgcactc
gctttaatgatgatttcagccgcgctgtactggaggtgaagttcagatgtgcggcgagttgctgactacctacgggtaacagtttcttatgg
cagggtgaaacgcaggtcgccagcgccaccgcgctttcgcggtgaaattatcgatgagcgtggtggttatccgatcgctcacactacg
tctgaacgtcgaaaacccgaaactgtggagcgccgaaatcccgaatctctatcggtggtggaactgcacaccgacggcacgctga
ttgaagcagaagcctgcgatgtcggtttccgcgaggtgcggattgaaaatggtctgctgctgtaacggcaagccgttgctgattcgaggc
gttaaccgtcacgagcatcctctgcatggtcaggtcatggatgagcagacgatggtgcaggatcctgctgatgaagcagaacaacttta
acgccgtgcgtgttcgattatccgaacctccgctgtgttacacgtgtgcgacccgtacggcctgtatgtgttgatgaagccaatattga
aaccacggcatggtgccaatgaatcgcttgaccgatgatccgcgctggctaccggcgatgagcgaacgcgtaacgcgaatggtgcagcgc
gatcgtaatacccgagtgatgatctggtcgctggggaatgaatcaggccacggcgtaatacacgacgcgtgtatcgctggatcaaatct
gtcgatccttcccgggtgcagatgaaggcggcgagccgacaccacggccaccgatattttcccgatgtacgcgcgctggatga
agaccagcccttcccggctgtgccgaaatggtccatcaaaaaatggcttctgctacctggagagacgcgccgctgatcctttgcgaatacgc
ccacgcgatgggtaacagcttggcggtttcgctaaatactggcaggcgcttctgcagatccccgtttacagggcggttctgctgggactgg
gtggatcagtcgctgattaaatgatgaaaacggcaaccggtgctcggttacggcggtgattttggcgatacggcaacgatcgccagttc

tgtatgaacggctctggtctttgcccaccgcacgcccatccagcgctgacggaagcaaacaccagcagcagttttccagttccgtttatccg
 ggcaaaccatcgaagtaccagcgaatacctgttccgtcatagcgataacgagctcctgcactggatggtggcgctggatggttaagccgctg
 gcaagcgggtgaagtgcctctggatgtcgtccacaaggtaaagcgttgattgaactgcctgaactaccgcagccggagagcgcggggaac
 tctggctcacagtacgcgtagtgaaccgaacgcgaccgcatggtcagaagccgggcacatcagcgctggcagcagtggtgctctggcgg
 aaaacctcagtgtagcgtccccgcgcgtccacgccatcccgcatctgaccaccagcgaatggattttgcatcgagctgggtaataagc
 gttggcaatttaaccgccagtcaggctttctttcacagatgtggattggcgataaaaaaactgctgacgccgctgcgcgcatcagttcacccgt
 gcaccgctggataacgacattggcgtaagtgaagcgaccgcattgacctaacgcctgggtcgaacgctggaaggcggcgggccattacc
 aggccgaagcagcgttgttcagtgacggcagatacacttgcgtatgcgggtgctgattacgaccgctcacgcgtggcagcatcaggggaa
 aaccttatttatcagccgaaaacctaccggattgatggtagtgtcgaatggcgattaccgttgatgttgaaaggcgagcgataccgcgat
 ccggcgcggtattggcctgaactgccagctggcgaggttagcagagcgggtaactggctcggattagggccgaagaaaactatcccgc
 cgccttactgcgcctgtttgaccgctgggatctgccattgtcagacatgtatacccgcgtactcttcccgagcgaacgggtctgcgtgcgg
 gacgcgcgaattgaattatggcccacaccagtggtgcgcggcgacttccagttcaacatcagccgctacagtaacagcaactgatggaaacca
 gccatgcctatctgtgcacgcggaagaaggcacatggctgaatatcgacggtttccatattggggattggtggcgacgactcctggagcccg
 tcagtatcggcggaattccagctgagcgccggtcgcctaccattaccagttggtctggtgtcaaaaataa*

⑥ In frame 확인

> 위의 예상 fusion protein이 in frame으로 fusion되어 protein 발현이 성공적으로 이루어지는지에 대한 검증을 실시.



- DeoD repoter cloning:

① deoD 시작부분 서열 정보 NC_002745.2

>2189200-2189999 Staphylococcus aureus subsp. aureus N315 chromosome, complete genome

AACAATACCGTCTCAATAATCACTTTTACTGTGTGACCTTTCGCAGCTTTCACCACTGCT
 TCAATGTCTTGTGTGACATCATCAAAACGTCCATCTTTTAATGCGCCGATGTTGATGACC
 ATGTCAATTTTCATCTGCACCATTTTGAATCGCATCTTCTGTTTCAAATGCTTTCGTCGCA
 GTTGTCGATGCACCTAATGGGAATCCTATTACCGTACAACTAACACCTCTGAATCAGCT
 AGTCGCTCTGCTGCATATTTAACATGCGTTGGATTACACATACAGATTTAAATGGTAT
 GCTTTCGCTTCATCGATGATTTGATCGATTTGCGTACGTGTTGACTCAGGCTTCAATAAA
 GTGTGATCAATCAATTTTGCATATTCATTTCTATCTCCTCCTTTATGGTTGATTATAAA

AATACGGTTGTAAATTAGTTGATTGAGCGTCAGGTTCAATTTAAATATCAGGTTAGATGT
 TCGCTTTTTATGTAACCGCATACATATACTATTACATTAATTCATTTCCCATAAACAAAC
 AATACAATTGAACGTGATATCTTCATTATGAACGATGACTTGACAACAAGCTAATCAGG
 ATTATATTTTTATAATTCTTTAATTCTATAGTACAAAAATTTCGAAAAAAGGGAAACAA
 ATGTTATCTTAAAATTATTAATGAATATTAAGGAGAAGA **TAACAAATG** **ACAAAAGGTA**
CACCACATATTCAACCAAATGGAGTAAAAATTGCTAAAACAGTATTAATGCCTGGCGATC
 CGCTACGCGCAAAATATATTGCTGA~

- > box= deoD coding region
- > bold= deoD start codon
- > grey= forward primer binding region
- > bleu= reverse primer binding region
- > yellow= PNA target 서열 (Pjyh-deoD1)

② Primer design with RE site

Forward = caGAATTCCGTACGTGTTGACTCAGGCT

(underlined=EcoRI site)

Reverse = caGGATCCGGTTGAATATGTGGTGTACCT

(underlined=BamHI site)

③ Expected PCR product

- > 위에서 디자인된 primer set을 이용하여 *S. aureus* N315 strain을 주형으로 하여 PCR을 실시할 경우

ggGAATTCCGTACGTGTTGACTCAGGCTTCAATAAAGTGTGATCAATCAATTTTGCAC
 TTCATTTCTATCTCCTCCTTTATGGTTGATTATAAAAAATACGGTTGTAAATTAGTTGAT
 TGAGCGTCAGGTTCAATTTAAATATCAGGTTAGATGTTTCGCTTTTTATGTAACCGCATACA
 TATACTATTACATTAATTCATTTCCCATAAACAAACAATACAATTGAACGTGATATCTT
 CATTATGAACGATGACTTGACAACAAGCTAATCAGGATTATATTTTTATAATTCTTTAA
 TTCTATAGTACAAAAATTTCGAAAAAAGGGAAACAAATGTTATCTTAAAATTATTAATG
 AATATTAAGGAGAAGA **TAACAAATG** **ACAAAAGGTA** **CACCACATATTCAACC**GGATCCcg

④ RE map of PCR product

- > 예상되는 PCR product에 양쪽 말단을 제외하고 EcoRI 이나 BamHI site가 없음을 확인함.



⑤ 구축된 cloning product

- > PCR product를 pRS552의 EcoRI과 BamHI site 사이에 성공적으로 cloning 할 경우 해당 PCR product와 lacZ의 fusion 결과를 예상하면 아래와 같음.

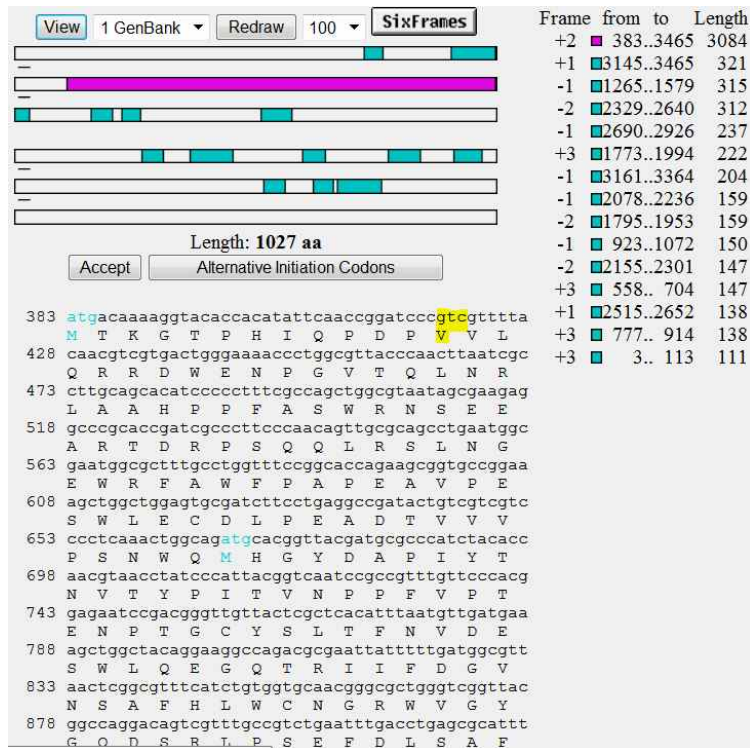
> red 소문자=vector의 lacZ gene / black 대문자=PCR product

ggatcggaaTTCCGTACGTGTTGACTCAGGCTTCAATAAAGTGTGATCAATCAATTTTGCAC
 ATTCATTTCTATCTCCTCCTTTATGGTTGATTATAAAAAATACGGTTGTAAATTAGTTGA

TTGAGCGTCAGGTTTCATTTAAATATCAGGTTAGATGTTTCGCTTTTTTATGTAACCGCATAAC
 ATATACTATTACATTAATTCATTTCCCATAAACAAACAATAACAATTGAACGTGATATCT
 TCATTATGAACGATGACTTGACAACAAGCTAATCAGGATTATATTTTTATAATTCTTTA
 ATTCTATAGTACAAAAATTCGCAAAAAAAGGGAAACAAATGTTATCTTAAAATTATTAAT
 GAATATTAAGGAGAAGATAACAA**ATG**ACAAAAGGTACACCACATATTCAACCG**Gatccc**
gtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaacctggcggttacccaacttaatcgcttgcagcacatccccctttcgccagctggcgtaatagcga
agaggcccgaccgatcgcccttccaacagttgctgcagcctgaatggcgaatggcgctttgctggtttccggcaccagaagcggtgccgg
aaagctggctggagtgcatcttctgaggccgatactgtcgtcgtccctcaaactggcagatgcacggttacgatgcgccatctacacaa
cgtaacctatcccattacgggtcaatccgccgtttgttcccacggagaatccgacgggttggtactcgtcacatttaattggtgatgaaagctggct
acaggaaggccagacgcgaattatgttgatggcggttaactcggcggttcatctgtggtgcaacggcgctgggtcggttacggccaggaca
gtcgtttgccgtctgaatttgacctgagcgcattttacgcgccggagaaaaccgcctcgcggtgatggtgctgctggttgagtgacggcagtta
tctggaagatcaggatatgtggcggtgatgcggcattttccgtgacgtctcgttgctgcataaaccgactacacaaatcagcgatttccatgttg
ccactcgttttaattgatgatttcagccgcgtgtactggaggctgaagttcagatgtgcggcgagttgcgtgactacctacgggtaacagtttct
ttatggcaggggtgaaacgcaggtcgccagcgccaccgcgcctttcgcggtgaaattatcgatgagcgtggtggttatgccgatcgcgtcac
actacgtctgaacgtcgaaaaccgaaactgtggagcgccgaaatcccgaaatctctatcgtgcgggtggtgaaactgcacaccgccgacggca
cgtgatgtaagcagaagcctgcgatgtcggtttccgcgaggtgcggattgaaatggtctgctgctgtaacggcaagccgttgctgattc
gaggcgtaaacgtcacgagcatcatcctctgcatggtcaggtcatggatgagcagacgatggtgcaggatatactgctgatgaagcagaac
aactttaacgcgtgcgctgttcgcattatccgaacctccgctgtggttacacgctgtgcgaccgtacggcctgtatgtggtggatgaagcca
atattgaaaccacggcatggtgccaatgaatcgtctgacctgatccgcgtggtaccggcgatgagcgaacgcgtaacgcgaatggtg
cagcgcgatcgtaatcaccgagtgatgatcctgtggtcgtgggaatgaatcaggccacggcgctaatacagacgcgtgtatcgtggtg
caaatctgtcgtccttcccgcgggtgcagtatgaaggcgccggagccgacaccacggccaccgatattttgccgatgtacgcgcgcgt
ggatgaagaccagcccttcccggctgtgcccgaatgttccatcaaaaaatggctttcgtacctggagagacgcgcccgtgatcctttgcga
atacggccacgcgatgggtaacagtccttggcggtttcgttaaatactggcaggcggtttcgtcagtatccccgtttacaggcggttcgtctgg
gactgggtggatcagtcgtgattaaatgatgaaaacggcaaccgttgctcggttacggcggtgattttggcgatacggcaacgatcg
ccagttctgtatgaacggtctggtctttgccgaccgcacgcgcgatccagcgtgacggaagcaaaacaccagcagcagttttccagttccgt
ttatccgggcaaaccatgaagtaccagcgaatacctgttccgtcatagcgataacgagctcctgcactggatggtggcgctggatggtaag
ccgttggaacgggtgaagtgcctctggatgtcgtccacaaggtaaacagttgattgaactgcctgaactaccgcagccggagagcgcgg
ggcaactctggctcacgtacgcgtagtcaacgaacgcgaccgatggtcagaacggggcacatcagcgctggcagcagtggtgctct
ggcggaaaaacctcagtgtagcgtccccgcgcgtcccacgccatcccgcatctgaccaccagcgaatggattttgcatcgagctgggttaa
taagcgttggcaatttaaccgccagtcaggctttcttccacagatgtggattggcgataaaaaaactgtgacgcgcgtgcgcgatcagttca
cccgtgcaccgctggataacgacattggcgtaagtgaagcgaccgcattgacctaacgcctgggtcgaacgctggaaggcgggggcc
attaccaggccgaagcagcgttgttgagtgacggcagatacactgtgatgcgggtgctgattacgaccgctcacgcgtggcagcatcag
gggaaaacctattttacagccggaaaacctaccggattgatggttagtggtcaaatggcgattaccggtgatgtgaagtggcgagcgataca
ccgatccggcgcggttggtgctgaactgccagctggcgcgagtagcagagcggtgtaactggctcggttagggccgcaagaaaactat
cccgaccgccttactgccgctgttttgaccgctgggatctgccattgtcagacatgtataccccgtacgtcttcccgagcgaacgggtctgcg
ctgcgggacgcgcgaattgaattatggccacaccagtggcgcgcgacttccagttcaacatcagccgtacagtcacagcaactgatgg
aaaccagccatcgccatctgctgcacgcggaagaaggcacatggctgaatatgcaggtttccatattggggattggtggcgacgactcctgg
agccccgtcagtatcgcggaattccagctgagcgccggtcgtaccattaccagttgggtctggtgtcaaaaataa*****

⑥ In frame 확인

> 위의 예상 fusion protein이 in frame으로 fusion되어 protein 발현이 성공적으로 이루어지는지에 대한 검증을 실시.



- 위와 같이 디자인된 primer set를 이용하여, 아래 [표 28]과 같은 PCR cycle 하에 PCR을 실시하였음.

[표 28] PCR cycle 구성

Thermal conditions		Condition
Initial denaturation		95°C, 3분
30 cycles	Denaturation	95°C, 30초
	Annealing	56°C, 30초
	Extension	72°C, 45초
Final Annealing		72°C 10분

- 위에서의 PCR product를 TA cloning을 실시하여 sequence를 확인하였음. 추후 pRS552로의 subcloning을 실시하여 repoter system 구축하였고, 후보 클론에 대하여 염기서열분석을 통하여 검증 중임.
- 이렇게 구축된 repoter 균주에 Pjyh-cmk1과 Pjyh-deoD1을 각각 처리하였을 경우 LacZ의 발현이 억제되는지 여부를 beta-galactosidase assay를 통해 증명하였음.

■ 항생제 내성균에 대한 세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 내성제어능 평가

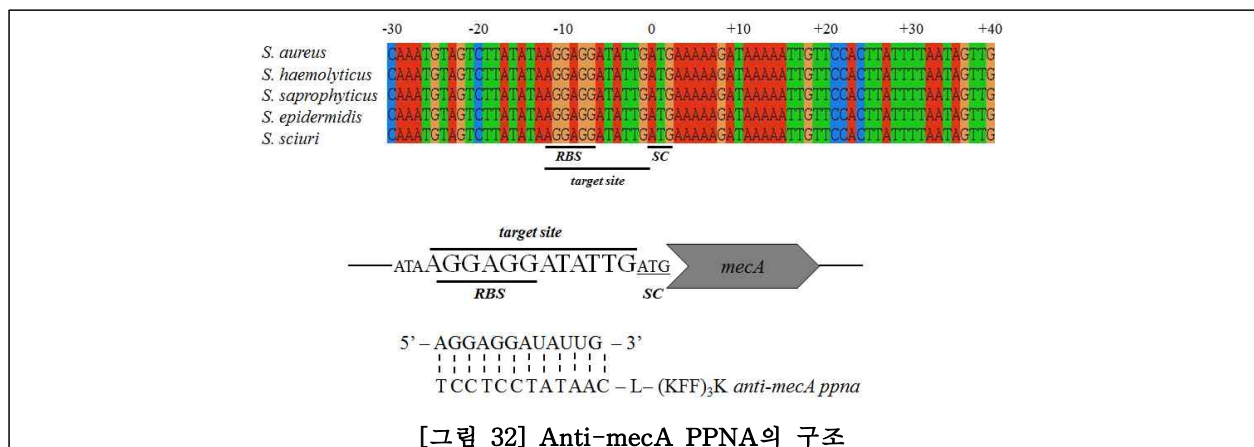
(1) 선발된 항생제 내성인자에 대한 세균침습성 안티센스 PNA 복합체 제작

- ▶ 연구수행전략 및 방법: 표준 세균침습성 펩타이드 및 신종 후보 펩타이드와 PNA올리고머 중합체 (PPNA) 중 세균침습성 펩타이드의 침습효과와 PNA의 안티센스 효과가 극대

화되는 중합 형태를 선발하였음. 선행 연구결과를 통해 세균내의 침습효과가 높은 penetration peptide인 (KFF)₃K에 lysine 또는 leucine을 linker로 PNA와 결합하여 올리고머 복합체(PPNA)를 디자인하여 두 linker 중 효과가 더 좋은 linker 형태를 비교 분석하였음.

▶ 연구 결과:

- 선행 연구를 통해 세균 침습효과가 좋은 (KFF)₃K를 PNA에 중합하였으며, 중합 시 linker로서 lysine보다 leucine linker를 사용하였을 경우 상대적으로 안티센스 효과가 증대됨을 관찰하였음.
- 1차년도 수행과제를 통해 선발된 *mecA*, *blaZ*, *norA* 세 가지 항생제 내성 인자 중에서 항생제내성인자의 발현침묵효과가 뛰어났던 anti-*mecA* PNA를 대상으로 당해년도 연구를 수행하였음.
- Anti-*mecA* PNA, (KFF)₃K, leucine linker를 PNA에 중합하여 (주)Panagen에 의뢰하여 제작하였음(그림 32).



(2) 합성된 안티센스 PNA 복합체에 의한 항생제내성 제어능의 정성·정량적 분석(1)

가. 항생제 내성균주에 대한 내성제어능 분석

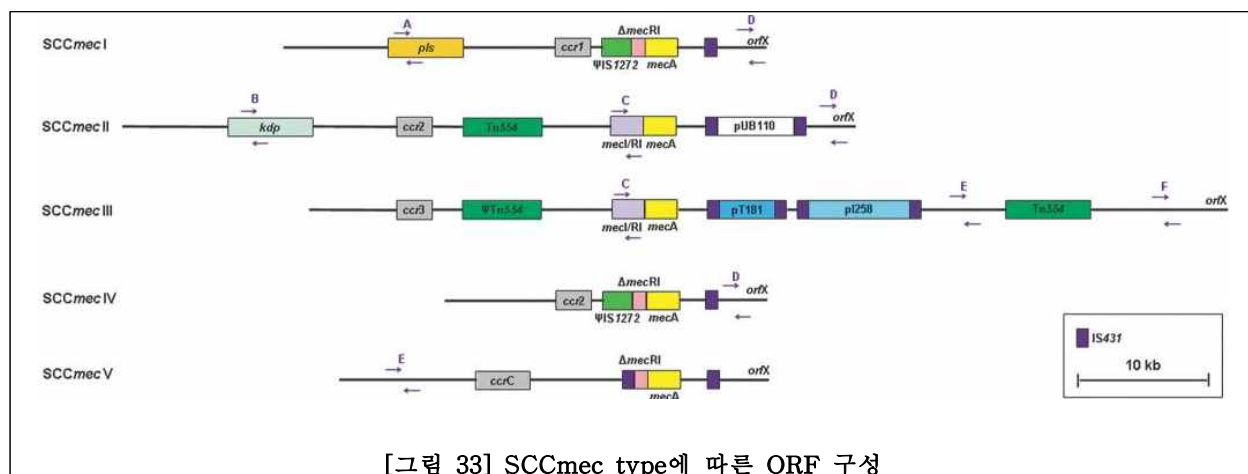
- ▶ 연구수행전략 및 방법: PPNA의 항생제내성제어 효과의 정성분석을 위해 항생제내성세균에 대한 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 결정하고, 항생제내성 유전자의 발현침묵을 Transcriptional level에서 정성·정량적으로 분석하기 위해 RNA isolation 과 Real time-qantitative PCR을 실시하였음.

- 대상 내성세균으로는 *mecA*를 보유하고 있어 메티실린 내성을 가지는 methicillin resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA)의 대표적 균주인 N315와 USA300을 이용하였음. N315는 대표적인 원내감염 균주로서, hospital-associated(HA)-MRSA에 속하며, USA300 strain은 대표적인 community-associated(CA)-MRSA임.

- HA-MRSA와 CA-MRSA의 가장 큰 차이점은 *mecA*유전자를 둘러싼 ORF의 구성임. *mecA*를 포함한 일련의 ORF family를 SCCmec이라고 함. HA-MRSA는 주로 SCCmecI,II,III를 보유하는데, 이들은 intact한 *mecA* regulatory gene들을 가지고 있음 (그

림 33). 그러나 CA-MRSA는 이들보다 짧은 SCCmecIV를 가지고 있으며 *mecA* regulatory gene이 불완전함 (그림 33). 이러한 regulatory ORF구성에 따라 *mecA*의 발현 정도가 달라질 수 있기 때문에, HA-MRSA와 CA-MRSA를 모두 시험에 사용하는 것이 적절한 것으로 판단되었음.

- 본 시험에 사용한 N315균주는 SCCmecII를 보유하고 있으며, USA300은 SCCmecIV를 보유하고 있음.



- PNA 준비 및 배지 조건: anti-*mecA* PPNA의 경우 400 μ M의 농도로 DW 희석액을 만들어 시험에 사용하였음. 본 시험에는 모두 Mueller-Hinton broth(MHB) 혹은 agar(MHA)를 사용하였음.
- MIC 측정: 최소억제농도를 CLSI(Clinical laboratory standard institute) 기준에 따라 broth dilution법으로 시험하였음. 시험항균제는 규정에 의거하여 methicillin대신 활성이 안정적인 oxacillin을 사용하였음. 검사하고자하는 균주는 tryptic soy agar (TSA) agar에 37°C에서 16~18 hrs 배양한 후 멸균증류수 4 ml에 McFarland No. 0.5가 되도록 조정함. oxacillin은 농도구배로 조성하여 45 μ l 씩 96 well plate에 분주. 조정한 균액 1 ml를 10 ml의 MHB에 접종한 후 96 well plate에 5 μ l 씩 접종함. 접종한 plate는 실링(sealing)한 후, 37°C에서 18시간 배양함. MIC는 육안으로 관독하였으며, 정도관리(Quality control)를 위해 사용한 표준균주인 *S. aureus* ATCC 25923의 CLSI에서 규정한 표준균주 허용범위와 비교하였음.
- RNA추출과 cDNA합성: RNA 추출을 실시할 균 배양액 200 μ l당 RNAlater (Ambion) 1 ml를 첨가하여 실온에서 5분간 반응시켜 RNA stablization 하였음. 13,000 rpm, 2min 원심분리하고 상층액을 제거한 후 enzymatic lysis buffer 200 μ l를 sample pellet에 첨가하여 재부유하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후, Enzymatic lysis buffer의 조성은 Tris-EDTA buffer에 lysozyme 1mg/ml, lysostaphin 50 μ g/ml 그리고 proteinase K (Qiagen) 25 μ l를 첨가하여 제조하였음. 이후 과정은 RNeasy Mini Kit (Qiagen)를 이용하였음. 먼저 60°C에서 10분간 반응시킴으로써 enzyme를 inactivation 시키고 RLT buffer를 sample당 700 μ l씩 첨가하고 vortexing. 13,000 rpm, 2min 원심분리하고 상층액을 새 tube에 담은 후 sample당 absolute ethanol 500 μ l씩 첨가하고 vortexing. RNeasy Mini spin

column을 2 ml collection tube에 끼운 상태로 sample을 column에 적용하고 13,000 rpm, 15초간 원심분리. RW1 buffer를 sample당 700 μ l씩 첨가하고 13,000 rpm, 15초간 원심분리함. Column을 새 collection tube에 바꿔 끼워 넣고 RPE buffer를 sample당 500 μ l씩 첨가하고 13,000 rpm, 15초간 원심분리. RPE buffer를 sample당 500 μ l씩 첨가하고 13,000 rpm, 2분간 원심분리함. Column을 새 collection tube에 바꿔 끼워 넣고 ethanol의 완벽한 제거를 위하여 추가로 1분간 원심분리. Column을 새 collection tube에 바꿔 끼워 넣고 30 μ l RNase-free water를 첨가한 후 13,000 rpm, 1분간 원심분리해서 elution하였음. Elution된 solution을 다시 column에 적용하고 원심하여 농축함. Elution된 양은 대략 27 μ l이므로 Turbo DNase kit (Ambion) 중 10X DNase Buffer를 4 μ l, DNase I을 4 μ l, Nuclease free water 5 μ l 첨가하여 총 40 μ l volume으로 37°C에서 30분간 반응시켜 genomic DNA의 오염을 제거하였음. 또한 DNase I의 불활화를 위해 DNase Inactivation Reagent 8 μ l 첨가하여 상온에서 2분간 반응시킴. 추출된 RNA의 확인을 위해 1% agarose gel에 전기영동하고 Nanodrop으로 RNA의 농도와 purity를 확인하였음.

- cDNA 합성: PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kits (TaKaRa)를 이용하여 RNA로부터 cDNA 합성하였음. RNA는 500ng으로 normalization하여 준비함. Random 6mers (50 μ M) 1 μ l, dNTP mixture 1 μ l, RNase free dH₂O 6 μ l, Template RNA 2 μ l를 혼합하여 총 10 μ l volume을 65°C에서 5분간 반응시킨 후 4°C로 냉각시켰음. 위의 10 μ l volume에 5X PrimeScript™ Buffer 4 μ l, RNase inhibitor (4U/ μ l) 0.5 μ l, PrimeScript™ II RTase (200U/ μ l) 1 μ l, RNase free dH₂O 4.5 μ l를 첨가하여 총 20 μ l를 반응시킴. 이 때 온도 조건은 30°C, 10분 → 42°C, 50분 → 95°C, 5분 → 4°C 냉각 순으로 구성하였음.
- Real-time qPCR: 아래와 같은 조성과 조건에서 실시하였음(표29-31). Real-time qPCR시에는 SYBR Green Master Mix (Qiagen)를 사용함.

[표 29] 반응물 조성

Reagent		Volume (μ l)
2X SYBR Premix		10
Primer	Foward	1
	Reverse	1
Template (cDNA)		1
Distilled water		7
Total		20

[표 30] Real-time qPCR cycle 구성

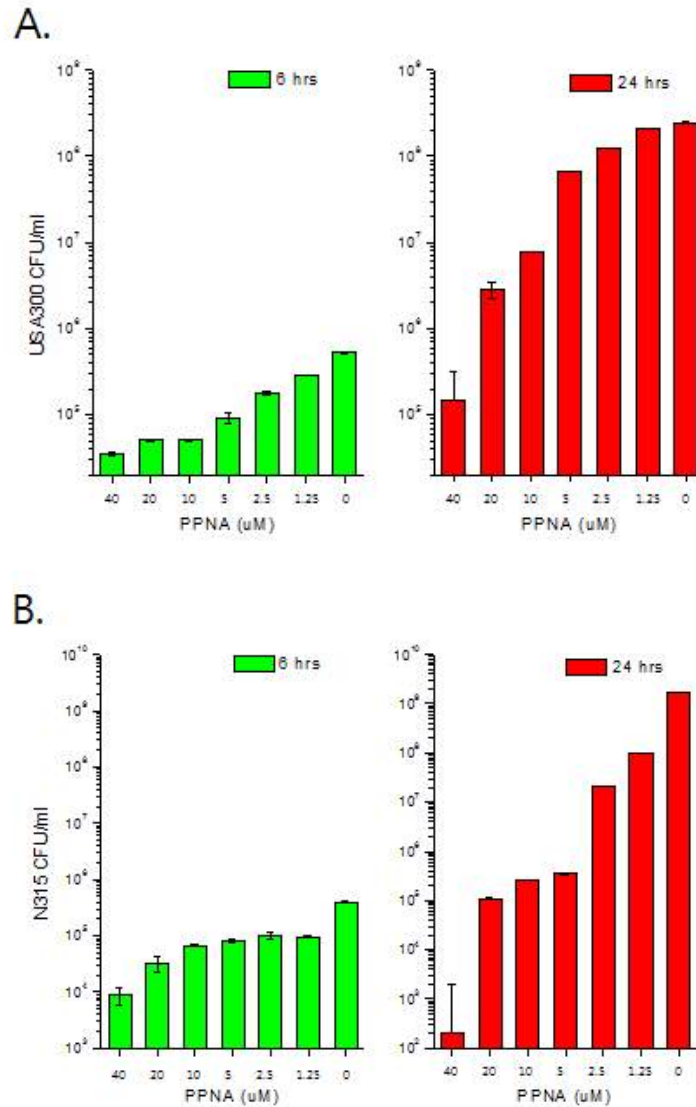
Thermal conditions		Condition
Initial denaturation		95°C, 2분
40 cycles	Denaturation	95°C, 30초
	Annealing	58°C, 30초
	Extension	72°C, 30초
Melting		60°C~94°C까지 온도 상승

[표 31] 사용된 oligomer 염기서열 정보

Target gene	Primers	Sequence (5'-3')	Reference
<i>mecA</i>	SAmecA1	AGT TGT AGT TGT CGG GTT TGG	Journal of Bacteriology 2012; 186 (14), 4665 - 4684.
	SAmecA2	GCA TTG TAG CTA GCC ATT CCT T	
<i>gyrB</i>	gyr297F	TTA GTG TGG GAA ATT GTC GAT AAT	Infect Immun. 2005;73(6):3415-21.
	gyr574R	AGT CTT GTG ACA ATG CGT TTA CA	

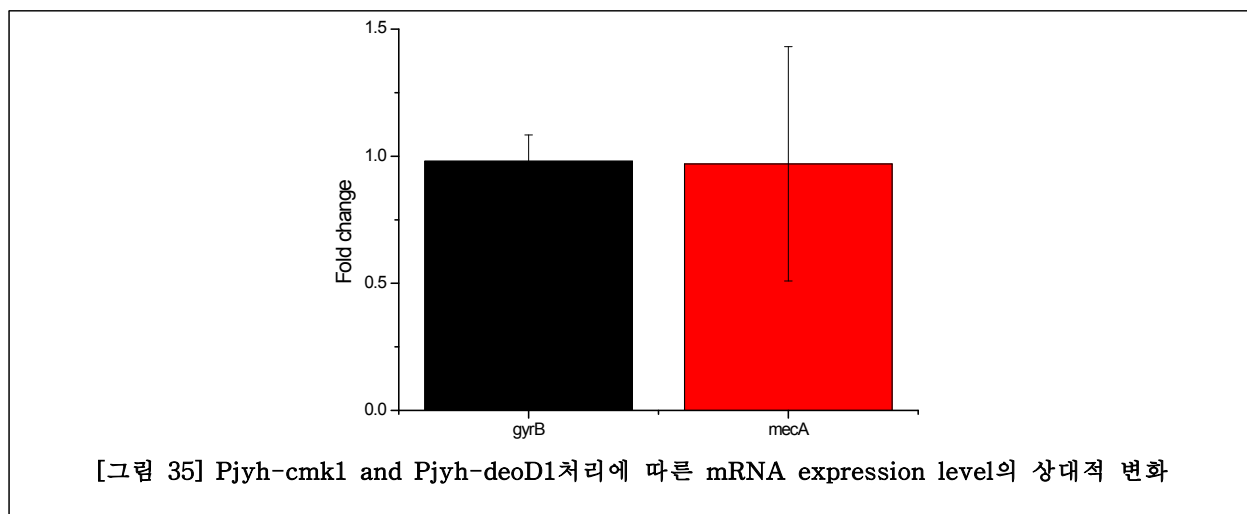
▶ 연구 결과

- **Anti-mecA PPNA첨가에 따른 MIC 변화 측정:** N315와 USA300은 *mecA*를 가지고 있으며 oxacillin이 높은 농도 (>64 $\mu\text{g/ml}$)로 포함된 배지에서 성장이 지속되는 MRSA 균주임. 전년도 연구에서는 anti-mecA PPNA를 첨가하면 N315와 USA300의 *mecA* 발현이 저하되어 이로 인해 N315가 oxacillin이 포함된 배지에서 성장하지 못하는 현상, 즉 oxacillin의 MRSA에 대한 항균력이 회복되는 효과를 확인하였음. 당해연도 연구에서는 PPNA 20 μM 첨가에 의해 MRSA 균주의 실제 MIC가 저하되는 정도를 정량하고자 하였으며 1차적으로 oxacillin 64 $\mu\text{g/ml}$ 이하 농도 범위 (oxacillin이 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 농도)에서 성장이 정지되는 MIC 지점에 변화가 있는지 여부를 관찰하였음. 그 결과, 1차적으로 관찰하였던 oxacillin 64 $\mu\text{g/ml}$ 이하 농도 범위에서는 MIC 저하 현상이 관찰되지 않았음. 즉 USA300과 N315 모두 PPNA 20 μM 첨가 여부에 관계 없이 최고농도인 oxacillin 64 $\mu\text{g/ml}$ 에서 성장하는 것이 관찰 되었음. 그러나 해당 조건에서 성장한 균수를 측정하였을 때, N315의 경우 oxacillin 64 $\mu\text{g/ml}$ 에서 유효한 균수 측정이 가능한 범위 까지 성장이 억제되는 현상이 관찰 되었으므로, 그 이상의 oxacillin 농도에서 MIC 저하 현상이 관찰될 것으로 사료됨(그림 34).



[그림 34] Anti-mecA PPNA 첨가에 의해 USA300(A)과 N315(B)균주에서 나타나는 항균력 회복 효과 (oxacillin 64 μ g/ml 포함 MHB에서 배양하였을 경우)

- PPNA 복합체에 의한 mRNA 발현량 측정: 1차년도와 당해년도 시험 결과를 근거로 4 hr을 기준으로 모든 균주에서 세포의 초기 생균수, 성장조건과 관계없이 성장억제 효과가 있음을 판단하여, mRNA의 분리 또한 4 hr으로 결정하였으며, Anti-mecA PPNA는 20 μ M를 적용하였음. mRNA의 초기 농도를 standardization 하기 위하여 일반적인 structural gene인 *gyrB*를 control로 사용하였으며, 초기 세포수를 실험 volume (200 μ l)당 대략 1.0×10^9 CFU/ml 으로 맞춘 후 8 hr 이후 mRNA의 분리와 cDNA의 합성, 그리고 RT (Reverse Transcriptase)-PCR의 방법으로 mRNA 양을 정량하였음. 실험 결과, [그림 35]에서와 같이 PPNA 첨가에 따른 mRNA 상대량의 변화가 관찰되지 않았음.

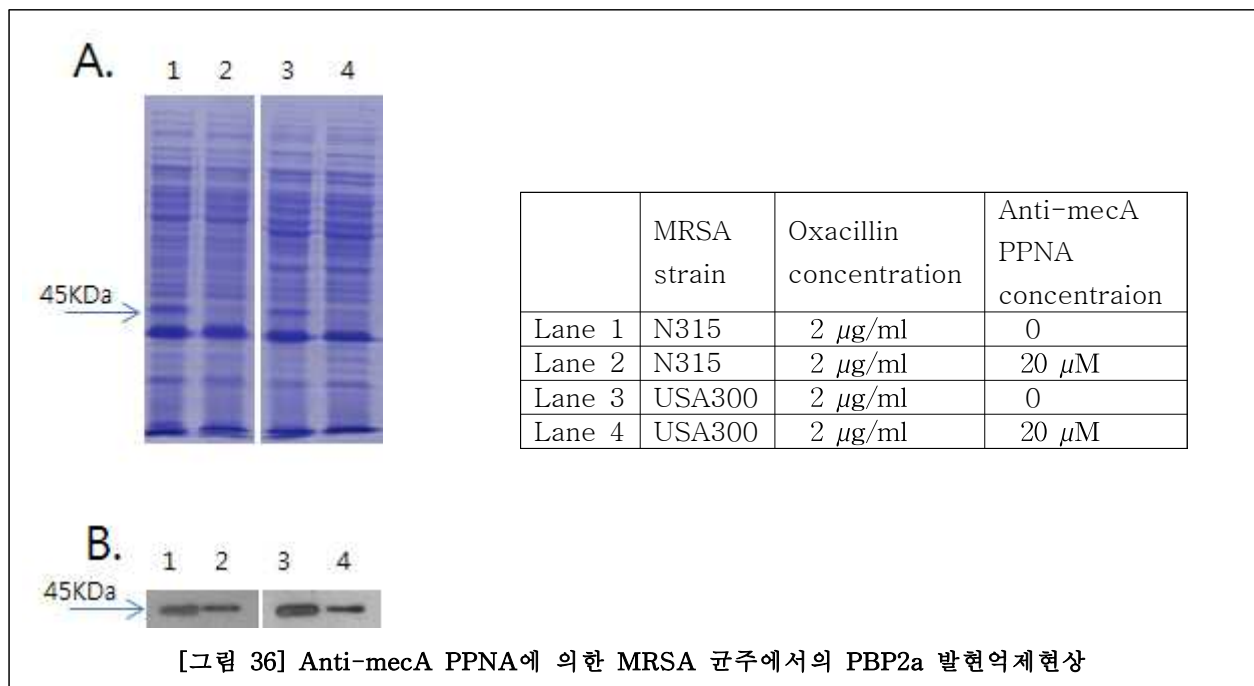


나. Post-transcriptional level에서의 정성·정량적 분석

- ▶ **연구수행전략 및 방법:** Post-transcriptional level에서의 발현억제현상을 관찰하기 위하여 PNA를 처리한 균에 대한 western blot 실시하여 MecA(PBP2A)의 단백질 발현량을 정량 분석하였음.
- Protein 추출: 균주를 OD600 0.8~1까지 배양한 후 13,000 rpm에서 원심분리 하여 pellet을 남김. 1 mg/ml lysostaphin을 300 μ l 처리후 37℃에서 1시간 배양 실시. 0.1 mm glass bead 1mg 처리 후 bead beater로 3분간 파쇄 실시. 잠시 가라앉힌 후 상층액을 취하여 동량의 2x sample buffer와 섞은 후 95℃에서 5분간 정치. 10% SDS-PAGE gel에 한 well당 10 μ l 씩 loading 실시. 150V 50분간 전기영동을 실시하였음.
- Protein transfer: PVDF membrane을 gel 크기에 맞게 자른 후 100% methanol에 1-5분간 담가둠. Methanol 처리를 한 membrane을 1x transfer buffer로 옮겨준 후 10분간 방치함. Trasfer할 gel을 1x transfer buffer로 살짝 적셔주고 membrane위에 기포가 생기지 않도록 주의하며 올려 놓음. Gel과 membrane을 밀착시킨 후 양면에 1x transfer buffer로 미리 적셔준 스펀지를 대고 Transfer 키트에 장착함. Transfer가 끝난 후 장치를 해체하고 membrane을 분리하여 1×TBST로 세척함.
- Antibody Reaction: Membrane을 blocking solution(5% Skim milk)에 담그고 1시간동안 shaker위에 올려 놓고 진탕함. 1차항체(anti-PBP2a antibody, Sunnyslab)를 판매회사의 1:2000으로 Blocking solution에 희석하고 membrane에 1시간동안 처리함. TBST로 15분씩 4회 세척. 2차 항체(anti-mouse IgG)를 1:10,000으로 blocking solution에 희석하고 membrane에 처리함. TBST로 15분씩 4회 세척.
- Detection: ECL (enhanced chemiluminescence) Solution A (Luminol과 enhancer 포함)와 Solution B (Hydrogen peroxide포함)를 동량으로 섞어준 후 1분간 잘 흔들어 줌. TBST에서 membrane을 꺼내 물기를 적당히 제거해 준 후 혼합한 ECL용액에 담그고 1분간 흔들어주면서 고루 적심. Membrane을 꺼내 물기를 적당히 제거한 후 랩으로 싸서 필름카세트에 잘 붙이고 암실로 가서 현상하였음.

▶ 연구 결과:

- 본 연구에서 시험한 두가지 MRSA균주 모두 oxacillin 존재 하에 mecA 유전자의 product 인 PBP2A가 발현되는 것이 관찰되었음. 또한 Anti-mecA PPNA를 처리한 경우 두 균주 모두 mecA 발현이 억제되었음. SDS-PAGE 상에서 PBP2A로 예상되는 45-KDa 정도의 protein 양이 감소되는 것이 관찰 되었으며(그림 36A), Western blot에서도 anti-PBP2a antibody에 의한 signal이 감소된 것을 확인 할 수 있었음(그림 36B). N315의 경우 PPNA 무처리균에 비해 약 0.8배 감소하였으며 (그림 36B, Lane2), USA300의 경우 PPNA 무처리 균에 비해 약 0.7배 감소하였음 (그림 36B, Lane 4).



- 결론적으로, anti-mecA PPNA는 MRSA 세균 내부로 침습하여, mecA gene에서 유래한 mRNA의 발현을 억제하여 PBP2a의 생산량을 감소시켜 최종적으로 항생제 내성을 역전시키는 기전(reversion of antibiotic resistance)으로 항생제내성 제어능을 가지고 있는 것으로 판단됨.

1. 자성나노복합체를 이용한 유방염 원인균의 신속 고효율 진단 기술 개발

▶ 연구수행전략 및 방법:

(1) 표준/분리주 중심의 특이 마커 탐색, 발현 및 특이항체 (다클론) 제작

- 유방염 주요 원인균들의 균주 확보 및 고역가의 항체 제작을 위한 항원의 효율적 제작/투여 방법 모색
- 원인균별 제작된 항체의 역가 평가 및 특이도/민감도 평가

(2) 혼합 및 조성의 최적화

- 국내 젖소 유방염 원인균별 분포 분석 및 다양한 역가의 다클론 항체 조합의 최적화

(3) 자성 복합체 제작

- 자성 나노물질 - protein G/A multimer - 원인균 특이 다클론 항체로 구성된 triple complex의 최적화

(4) 주요 유방염 원인균 특이 자성 복합체의 활용 최적화 및 표준매뉴얼 개발

- 현장에서의 적용성 분석을 통한 사용자 중심의 활용도 극대화
- 유방염 진단 및 치료제 효과 분석을 위한 표준 매뉴얼 개발 및 적용성 평가

▶ 연구 결과:

(1) 가토 면역용 항원의 제조

1) 균종

제 1세부과제와의 협의 하에 선정된 아래와 같은 주요 유방염 유발 병원체들을 활용하여 가토 다클론 항체를 제작하였음

S. aureus (ATCC 29740), *S. hyicus*, *S. aureus* (ATCC 19636), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. agalactiae* (ATCC 13813), *S. pyogenes* (ATCC 120306), *S. uberis* (ATCC 27958), *S. dysagalactica* (ATCC 27959) 이상 8종 균주들을 활용함.

2) 균 배양

위 8개의 균주를 TSA (Tryptic Soy Agar) 평판배지에 접종하여 37℃에서 하룻밤(18~24시간) 배양한 후 잘 자란 colony를 선택하여 37℃에서 하룻밤(18~24시간) 재배양한 후 4℃ 냉

장고에 보관하면서 가토에 면역할 항원 제조용 균주로서 활용하였음.

3) 가토 면역용 항원의 제조

4℃ 냉장고에 보관중인 균주를 TSB에 접종한 후 37℃에서 6시간 배양한 것을 식균용 균주로 사용하였음. 각각의 균주별로 배양된 균액을 배양병을 이용하여 3~5ml씩 분주한 후 배지 전체에 퍼지도록 하여 37℃에서 18-24시간 배양한 이후 saline을 이용하여 균을 배지에서 부유시킨 뒤 균 부유액을 모았음.

모아진 균 부유액은 100℃에서 2시간 동안 가온한 후 식히고, 이후 8,000rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 99.5% 이상의 ethyl alcohol을 이용하여 균 pellet을 부유시켰음. 이후 water bath를 이용하여 37℃에서 4시간 동안 정치시킨 후 원심 분리하여 상층액을 제거하였음. 이러한 알코올을 이용한 고정화 과정을 한차례 더 반복하였음.

원심 분리하여 모은 균 pellet에 acetone 50ml을 첨가하여 부유시킨 후 8,000rpm에서 30분간 원심 분리하였음. 이후 상층액을 제거하고 이와 같은 과정을 재차 반복하였음. 얻어진 균 pellet에 10ml정도의 acetone을 가하여 부유시킨 뒤 적절한 용기에 부어 37℃ 진공건조기를 이용하여 건조시켰음.

(2) 가토 면역용 항원의 면역

1) 가토 검수

2.5~3.0kg 정도의 건강한 뉴질랜드산 화이트 토끼를 사용하여 면역을 실시하되, 면역에 사용되는 토끼가 면역하고자하는 항원에 대한 항체를 가지고 있는가에 관해 먼저 조사를 한 뒤, 면역화에 이용하였음.

2) 가토 면역

6차례에서 7차례에 걸쳐 3~4일마다 면역(immunization, boosting)을 실시하였음. 면역방법은 이정맥(耳靜脈)을 통해 투여하며 준비된 균체 분말을 saline에 희석(1.5-1.7mg/ml)하여 1차 접종 시에는 250 μ l 정도 투여하여 매회 반복시마다 2배씩 접종량을 증가하여 실시하였음. 접종량을 증가시키는 이유는 혈중 항체가의 증가에 따라 투여되는 항원이 비례적으로 중화되기 때문이며, 따라서 지속적인 면역세포의 자극으로 인한 면역세포의 세포 증식과 이에 따르는 항체 분비의 증가를 유도하기 위함임.



그림 1. 이정맥을 통한 가토 면역

마지막 면역 후 3일이 경과하면 이정맥에서 소량의 혈액을 채취한 후 혈청만을 분리하여 이를 PBS를 이용하여 단계희석한 후, 효소면역측정법(ELISA)을 이용하여 반응도가 양호할 경우 전신의 혈액을 채취하며, 양호하지 않을 경우 추가적인 면역을 실시하여 높은 역가의 혈청을 확보하도록 하였음.

(3) 효소면역측정법(ELISA)을 이용한 특이성 검사

해당 항원 희석액을 600nm에서 흡광도값을 확인하여 1.0으로 맞춘 후 100 μ l씩 96 well plate에 분주하고 37 $^{\circ}$ C, 60분 반응시켰음. 희석액으로는 0.05M sodium bicarbonate용액을 사용하였음. 반응액을 제거하고 세척액 (인산염 완충액, 0.05% Tween 20) well당 200 μ l 씩 첨가한 후 다시 제거하는 과정을 3회 반복하였음. 세척 후 각 well에 차단액 (blocking solution, 1% BSA가 함유된 인산염 완충액)을 200 μ l 첨가하고 37 $^{\circ}$ C, 30분 반응하였음. 차단액 반응액을 제거하고 상기 세척액을 well당 200 μ l씩 첨가한 후 다시 제거하는 과정을 3회 반복하였음. 단클론 항체 (MAb)용액을 well당 100 μ l씩 분주하고 음성대조군용 well에 희석액을 100 μ l 분주한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시켰음.

반응액을 제거하고 상기 세척액을 well당 200 μ l씩 첨가한 후 다시 제거하는 과정을 3회 반복하였음. 항-마우스 IgG에 HRP (Horse reddish peroxidase)가 융합된 시약을 well당 100 μ l씩 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시켰음. 반응액을 제거하고 상기 세척액을 well당 200 μ l씩 첨가한 후 다시 제거하는 과정을 3회 반복하였음. 효소 기질 용액 (o-phenylenediamine 0.4mg/ml in phosphate citrate buffer pH 5.0)을 100 μ l씩 분주하고 암실의 상온 에서 30분간 반응시켰음. 492 nm (yellow)에서 흡광도값을 확인하였음.

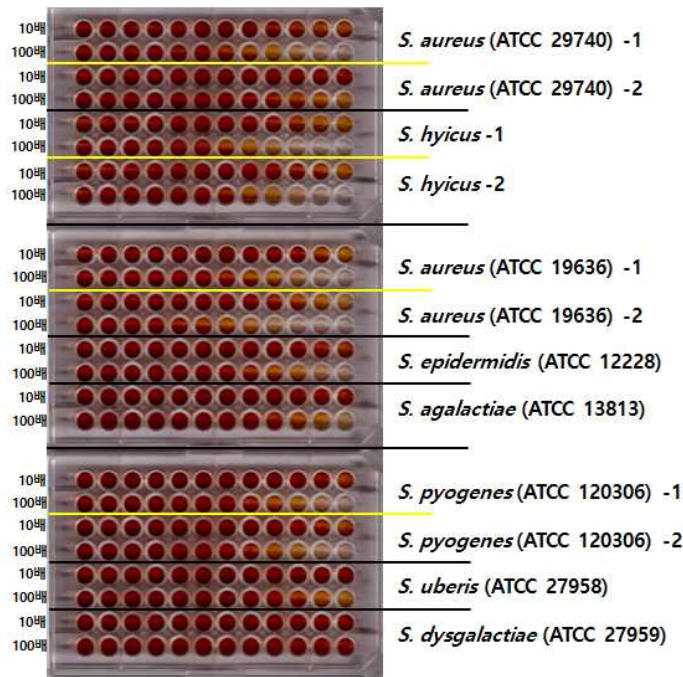
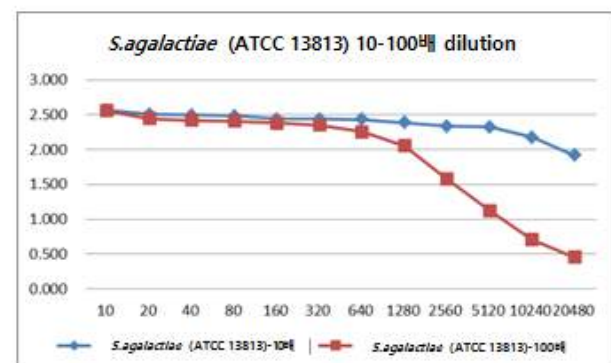
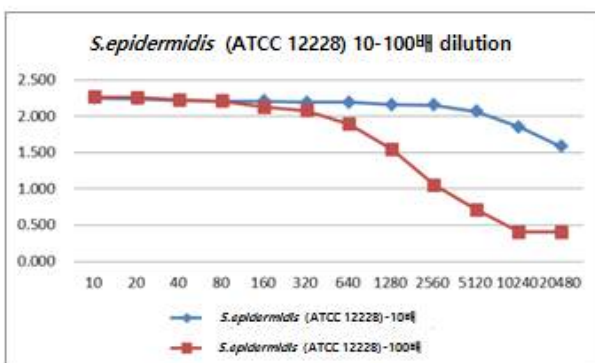
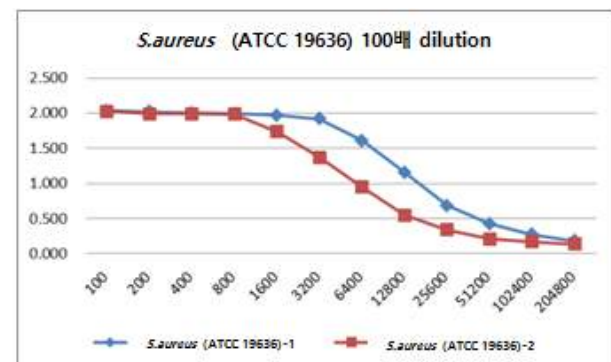
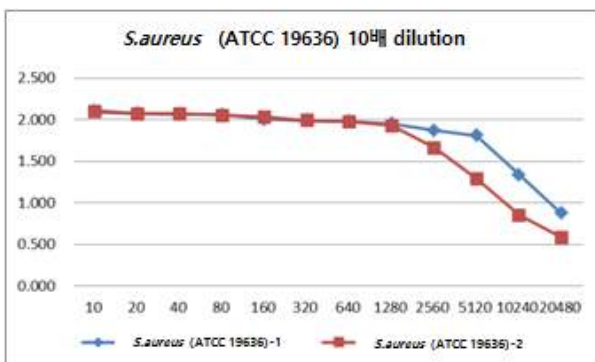
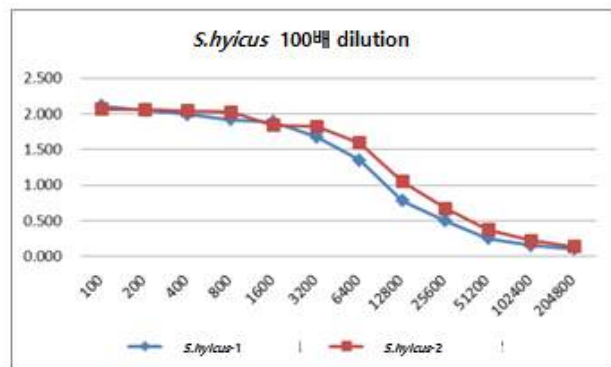
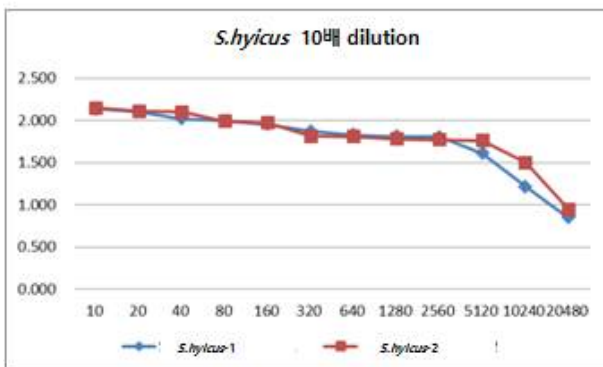
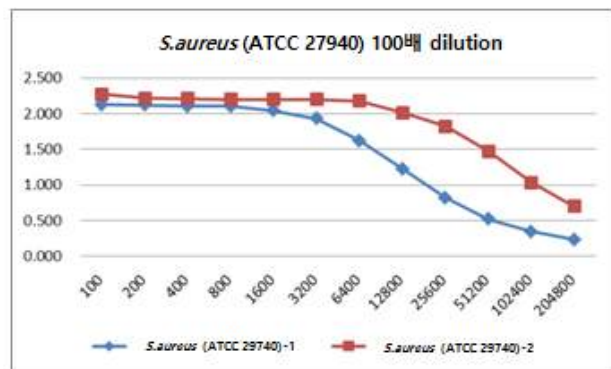
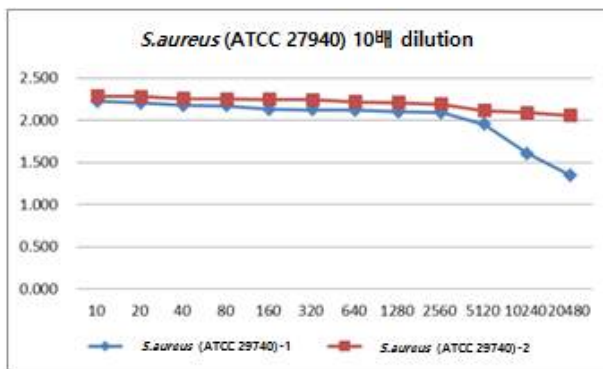


표 1. 효소면역측정법(ELISA)을 이용한 흡광도(492nm) 측정 결과



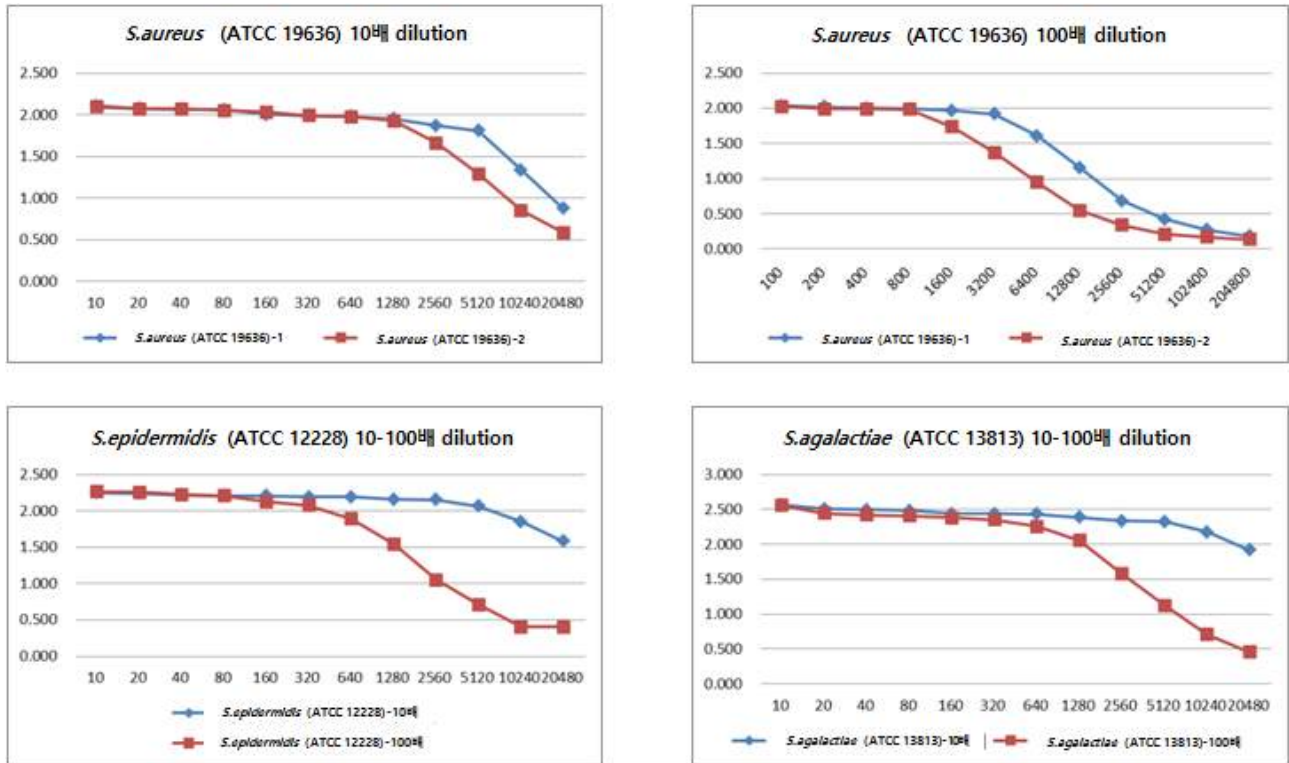


그림 3. 흡광도를 이용한 Saturation curve 분석

혈청내의 항체의 유효성을 측정하기 위해 효소면역측정법(ELISA)을 이용해 얻어진 saturation curve 값은 위와 같았고, 본 연구소에서는 다클론 항체의 역가값이 3,200배 이상 확보 시 다클론 항체 확보를 위해 양호한 결과라고 판단하는 바, 각 가토의 전채혈을 시행하였음.

상기 결과를 정리하면,

S. aureus (ATCC 29740)-1 : 3,200배, *S. aureus* (ATCC 29740)-2 : 6,400배

S. hyicus-1 : 3,200배, *S. hyicus*-2 : 3,200배

S. aureus (ATCC 19636)-1 : 3,200배, *S. aureus* (ATCC 19636)-2 : 1,600배

S. epidermidis (ATCC 12228) : 3,200배

S. agalactiae (ATCC 13813) : 6,400배

S. pyogenes (ATCC 120306)-1 : 3,200배, *S. pyogenes* (ATCC 120306)-2 : 3,200배

S. uberis (ATCC 27958) : 12,800배

S. dysgalactiea (ATCC 27959) : 12,800배

의 역가값으로 확인할 수 있었음.

다음으로 위에서 얻어진 혈청(항체)의 균주별 교차반응성을 확인해 보았음. 확인방법은 효소면역측정법(ELISA)을 사용하였으며, 결과는 그림 4.와 같은 항원 항체 반응을 확인할 수 있음.

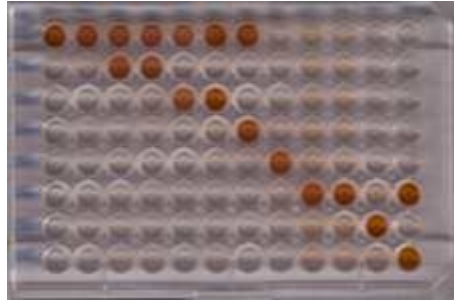


그림 4. 효소면역측정법(ELISA)을 이용한 교차반응 이미지

표 2. 효소면역측정법(ELISA)을 이용한 교차반응 흡광도(492nm)

Coated Antigen	Antibody(Rabbit serum)											
	<i>S.aureus</i> (29740)-1	<i>S.aureus</i> (29740)-2	<i>S.hyicus</i> -1	<i>S.hyicus</i> -2	<i>S.aureus</i> (19636)-1	<i>S.aureus</i> (19636)-2	<i>S.epidermidis</i> (12228)	<i>S.agalactiae</i> (13813)	<i>S.pyogenes</i> (120306)-1	<i>S.pyogenes</i> (120306)-2	<i>S.uberis</i> (27958)	<i>S.dysagalactiae</i> (27959)
<i>S.aureus</i> (29740)	1.781	1.774	1.77	1.795	1.219	1.777	1.758	0.126	0.308	0.268	0.121	0.107
<i>S.hyicus</i>	0.12	0.129	1.758	1.758	0.116	0.138	0.102	0.126	0.237	0.258	0.131	0.116
<i>S.aureus</i> (19636)	0.135	0.124	0.137	0.14	1.201	1.732	0.092	0.118	0.226	0.242	0.13	0.114
<i>S.epidermidis</i> (12228)	0.129	0.132	0.136	0.134	0.112	0.142	1.744	0.145	0.24	0.232	0.132	0.097
<i>S.agalactiae</i> (13813)	0.141	0.125	0.136	0.135	0.104	0.129	0.097	1.741	0.239	0.218	0.123	0.121
<i>S.pyogenes</i> (120306)	0.137	0.122	0.138	0.133	0.11	0.14	0.088	0.117	1.775	1.774	0.133	1.761
<i>S.uberis</i> (27958)	0.137	0.128	0.137	0.136	0.111	0.135	0.094	0.118	0.243	0.23	1.785	0.094
<i>S.dysagalactiae</i> (27959)	0.139	0.133	0.142	0.14	0.114	0.143	0.091	0.128	0.243	0.264	0.123	1.755

위 결과를 보면 *S.aureus* (ATCC 29740), *S. agalactiae* (ATCC 13813), *S. pyogenes* (ATCC 120306), *S. uberis* (ATCC 27958) 혈청은 자가항원에 대해서만 반응을 확인할 수 있었으며, *S. hyicus*, *S. aureus* (ATCC 19636), *S. epidermidis* (ATCC 12228) 혈청은 자가항원 이외에 *S. aureus* (ATCC 29740) 균주와도 교차반응이 있음을 확인하였음. *S. dysagalactiae* (ATCC 27959) 혈청은 자가항원 이외에 *S. pyogenes* (ATCC 120306) 항원에 대한 교차 반응을 확인하였음. 이때, *S. aureus* (ATCC 29740) 혈청은 *S. aureus* (ATCC 19636) 항원과 교차 반응을 나타내지 않았으나 *S. aureus* (ATCC 19636) 혈청은 *S.aureus* (ATCC 29740) 항원과 교차 반응을 확인할 수 있었음.

(4) 전채혈

채혈법은 심장채혈을 전제로 하되, 대한실험동물학회에서 권고하는 주사마취제를 이용하여 전신마취 후 실시하였음. 다만, 본 연구소에서 실시하고 있는 채혈법(peristaltic pump)를 이용한 수동적인 박동이용 채혈법)을 활용하여 실시하였음.

Phosphate buffered saline(pH7.2)
 NaCl 8.0 g
 KH₂PO₄ 0.2 g
 KCl 0.2 g
 Na₂HPO₄ 1.15 g
 D.W 1 ℓ
 121℃/15min 고압습윤 멸균(autoclave)

채집된 혈액은 4℃에서 24시간 정치하여 응고되도록 한 후, 8,000rpm에서 20분간 원심 분리하여 상청액 즉, 맑은 혈청만을 취하였음.

(5) 항체의 정제

전체혈을 통해 얻어진 혈청을 0.45 μ m syringe filter에 여과한 후 protein G column (Amersham pharmacia)으로 통과시켜 항체만을 결합시킨 후 column 3배량의 세정액 (0.05M Tris, 0.15M NaCl, 0.1% Tween 20)으로 2번 세척한 후 용출액 (0.1M glycine, pH 3.0)을 통과시킴으로써 fraction collector를 이용하여 항체분획을 얻었음. 얻어진 항체액은 desalting column (Amersham pharmacia)을 이용하여 인산염 완충액 (PBS)으로 dialysis 후 다음 단계의 실험에 활용하였음.

정제된 항체는 SDS PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 그 순도를 평가하였음. 이때 acrylamide gel은 12%를 이용하며, Hoefer auto-processor를 이용하여 coommasie blue 염색하여 그 순도를 개략적으로 알아내었음. Bradford method (Bio-rad Bradford reagent)를 이용하여 정량하여 다음 단계의 실험에 이용하였음.

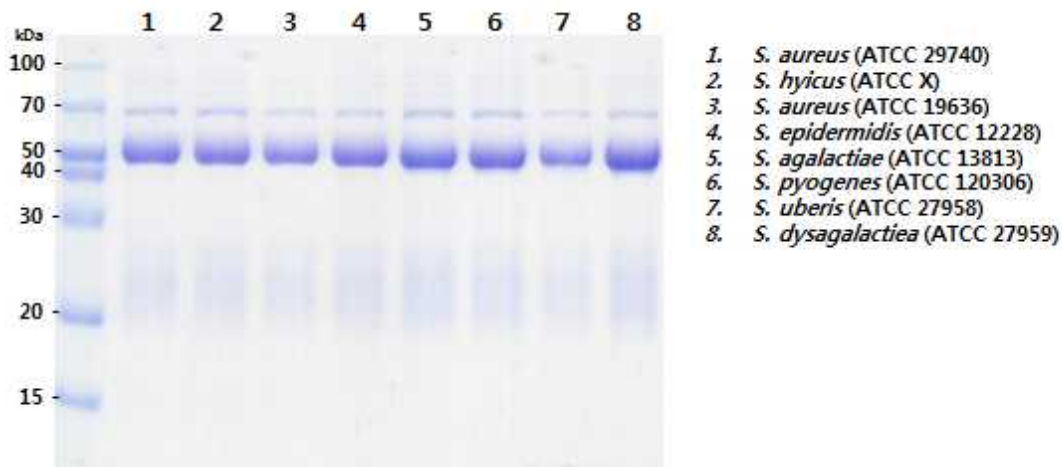


그림 5. 정제된 항체의 SDS PAGE 결과

(6) 슬라이드 응집반응 검사

1) 균주의 배양, 선별 및 항원의 준비

가) day 1

-70 ℃ deep freezer에 보관된 해당 균들을 TSA에 접종한 후, 37 ℃에서 16 ~ 18 시간동안 배양한 후, 항원성이 우수한 균 콜로니 (colony)를 선발하여 평가용 항원 준비용 균주로 활용함.

나) day 2

- ① 10 μl 1회용 loop를 이용하여 배양된 균을 500 μl 0.85% NaCl solution에 3 loop를 현탁하여 균을 완전히 풀어줌.



그림 6. 1회용 loop 1회의 양

- ② 0.85% NaCl (in DW)을 이용하여 준비된 균액을 1/10 ~ 1/80 까지 희석하여 OD₆₀₀에서 McFarland standard turbidity 3.0 ~ 3.5 사이가 되는 희석배율을 확인함.

표 3. McFarland standard turbidity

McFarland standard No.	0.5	1	2	3	4
1.0% Barium Chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
1.0% Sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
Approx. cell density (1x10 ⁸ CFU/ml)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
% Transmittance	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5
Absorbance	0.132	0.257	0.451	0.582	0.669

※ McFarland standard 3.0 ~ 3.5 \approx OD₆₀₀ 0.582 ~ 0.628

2) 슬라이드 응집 시험

가) 준비된 항원 균주 3 loop / 500 μl 0.85% NaCl (in DW)로 준비된 혈청과 반응시켜 슬라이드 응집반응시험을 진행함.

나) 특이적인 응집반응을 보일 것으로 기대되는 균주의 균부유액으로 응집반응을 실시할 경우 30~60초 이내에 응집도가 3+ 이상의 반응을 보여야 함.

다) 비특이 응집소가 검사

특이적인 응집반응을 보일 것으로 기대되는 균주 이외 균주의 균부유액으로 응집반응을 실시할 경우 180초 이내에 명확한 반응이 일어나서는 안 됨.

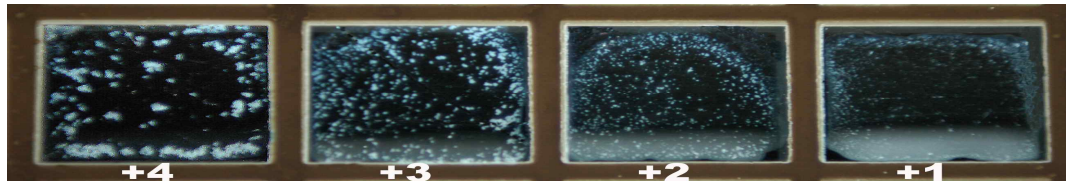


그림 7. 슬라이드 응집반응 (4+ : 상층이 맑고 완전응집(100%), 3+ : 상층이 맑고 밑면에 다소 퍼진 응집괴(75%), 2+ : 상층이 다소 흐리고 시험관 밑면에 확산응괴(50%), 1+ : 상층이 흐리고 시험관 밑면에 약간의 균 응괴현상 모임(20%), 음성반응 : 혼탁액)

표 4. 슬라이드 응집반응 결과

응집반응 균주명	Antibody(Rabbit serum)											
	Saureus(29740)-1	Saureus(29740)-2	Shyicus-1	Shyicus-2	Saureus(19636)-1	Saureus(19636)-2	Seppidermidis(12228)	Sagagictiae(13813)	Spyogene(120306)-1	Spyogene(120306)-2	Subens(27958)	S.dysagalactiae(27959)
Saureus(29740)	●	●	●	●	●	●	●	-	-	-	-	-
Shyicus	-	-	●	●	-	-	-	-	-	-	-	-
Saureus(19636)	-	-	-	-	●	●	-	-	-	-	-	-
Seppidermidis(12228)	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-	-	-
Sagagictiae(13813)	-	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-	-
Spyogene(120306)	-	-	-	-	-	-	-	-	●	●	-	●
Subens(27958)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●	-
S.dysagalactiae(27959)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●
저가액가	100X	200X	10X	20X	4X	2X	50X	80X	40X	40X	50X	40X

위의 방법으로 혈청(항체)과 균(항원)간의 응집반응 확인결과 효소면역측정법 (ELISA)을 사용하여 교차반응성 실험을 한 결과와 동일한 양상의 응집반응을 확인 할 수 있었음.

(7) Multi-protein G/A 및 자성 복합체 제작

1) 재조합 multi-protein G/A의 발현 및 정제

아래의 모식도는 앞서 본 연구소에서 기개발한 protein G monomer, dimer, trimer 등 multimer의 제작과정을 나타낸 것이며 protein A homo-multimer 및 G/A hetero-multimer의 제작과정은 이와 유사함.

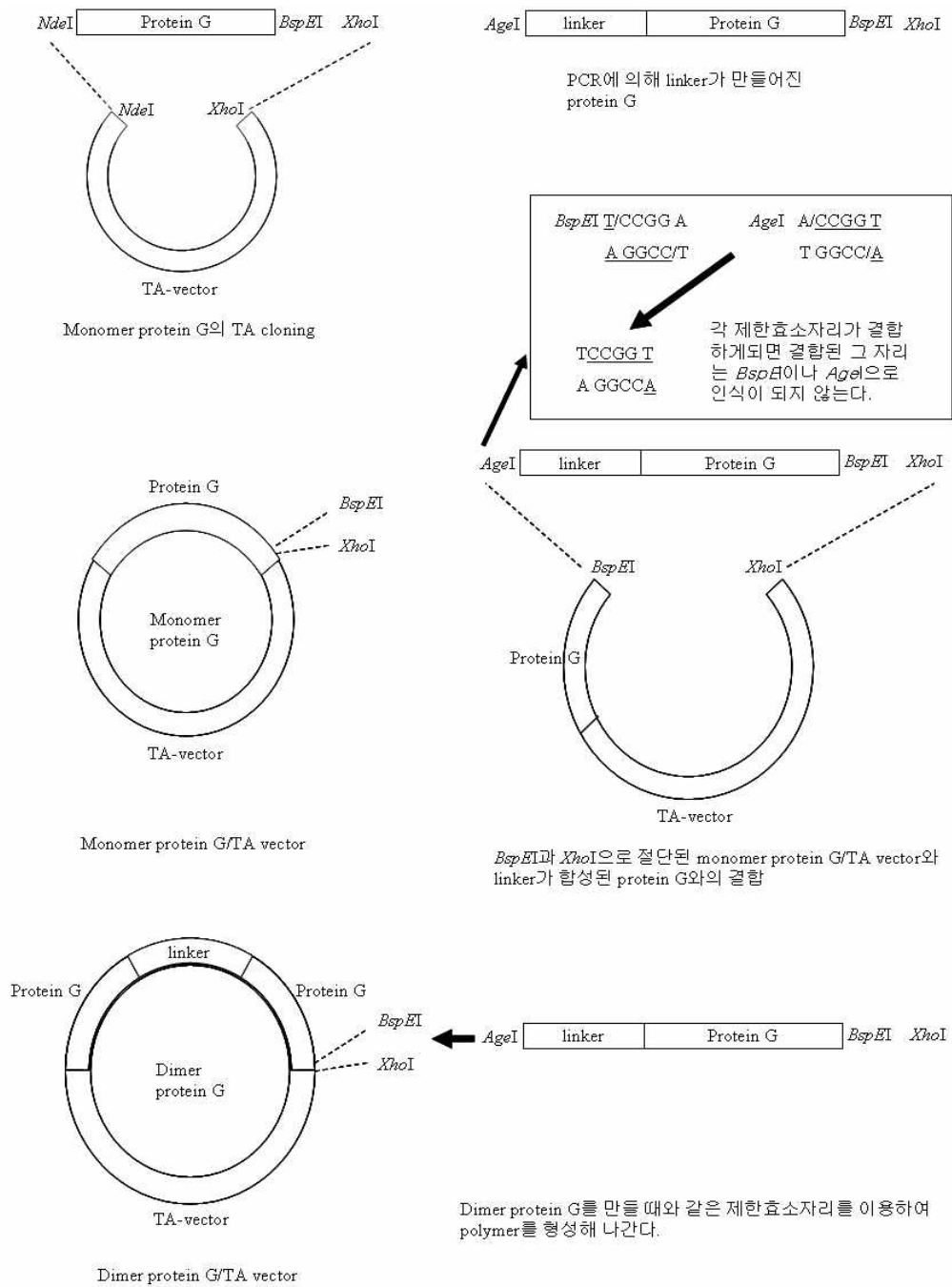


그림 8. Protein G의 multimer 제작과정의 모식도

위의 도식도에서 protein G 또는 A의 multimer 제작과정을 위해 사용된 linker의 서열은 다음과 같다.

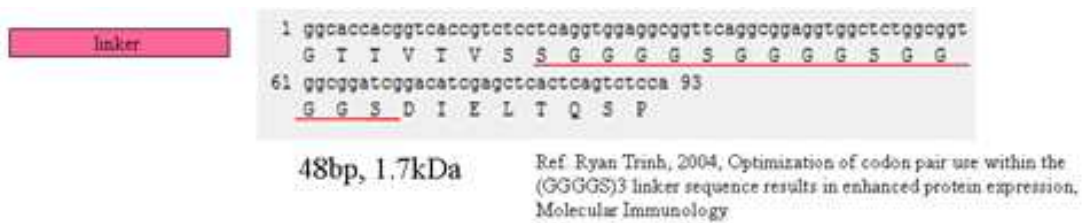


그림 9. protein A/G multimer에 사용된 linker 서열

위의 도시도와 같이 제작된 multi-protein G/A는 pET28a vector 시스템을 이용하여 성공적으로 발현되었으며 그 정제사진은 다음과 같음.

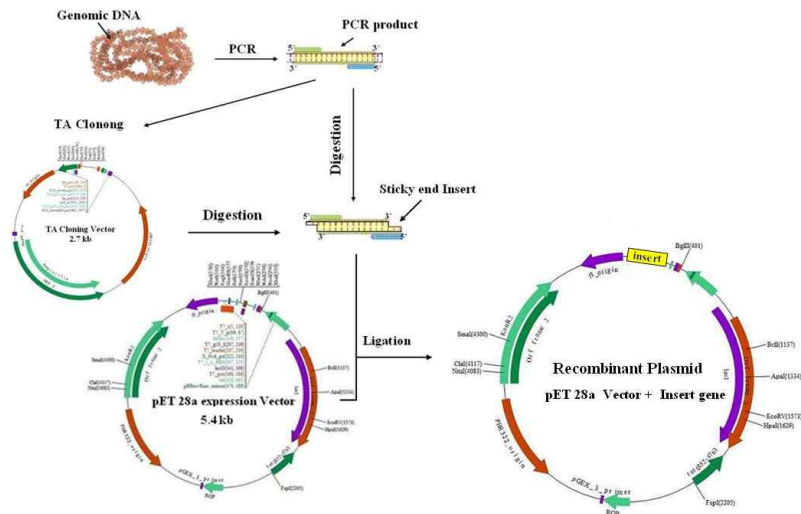


그림 10. Protein G multimer 제작과정 (pET28a vector 활용)

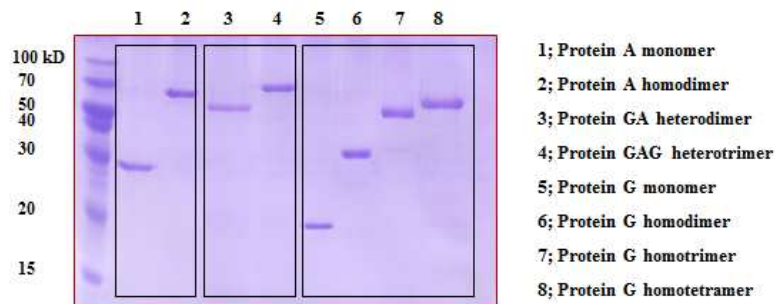


그림 11. 제조한 multi-protein G/A의 정제사진

2) 정제된 protein G/A와 토끼 항체와의 결합량 비교

위와 같이 제조된 protein G monomer, dimer, trimer와 protein A monomer와 dimer는 토끼 항체의 결합량을 비교환산하기 위해 다음과 같은 공식을 활용하여 단위 개수(동일 개

수)의 재조합 단백질을 ELISA plate에 코팅한 후 토끼 다클론 항체를 농도별로 희석하여 1차 항체로 활용하고 그 값을 비교하였음. 단 protein G tetramer는 재조합 단백질의 정제의 어려움과 이후 자성나노입자와의 복합체 형성에 낮은 수율을 보여서 이후의 실험에 제외되었음.

1kDa protein 1kg이 1mol로 정의되므로 각 protein G의 1nmol은 아래와같이 환산될 수 있음.

Protein A monomer	29kDa	1mg = 34.48nmol	1nmol = 29.00ug
Protein A dimer	55kDa	1mg = 18.18nmol	1nmol = 55.00ug
Protein G monomer	19kDa	1mg = 52.6nmol	1nmol = 19.01ug
Protein G dimer	35kDa	1mg = 28.57nmol	1nmol = 35.00ug
Protein G trimer	51kDa	1mg = 19.22nmol	1nmol = 52.02ug

ELISA 항원 코팅 시 각 재조합 단백질은 4.7 pmol/100ul (최적의 조건으로 예비실험을 통해 결정함)에서 시작하여 2배씩 단계 희석하여 진행하였음.

<protein A,G rabbit antibody ELISA test>

<plate1>

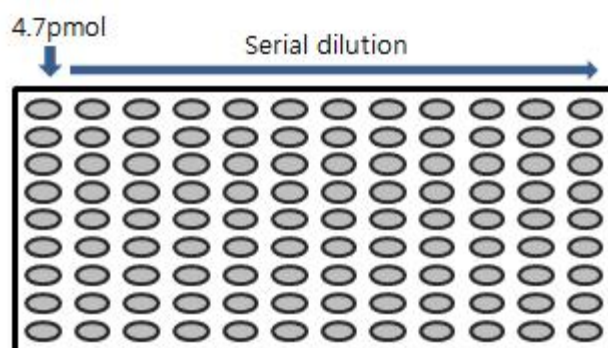
PA	1.815	1.779	1.578	1.408	1.006	0.721	0.469	0.291	0.201	0.152	0.13	0.12
P2A	1.982	1.921	1.677	1.548	1.319	0.884	0.593	0.326	0.203	0.153	0.121	0.101
PG	1.796	1.498	1.217	0.829	0.484	0.283	0.179	0.121	0.095	0.085	0.08	0.08
P2G	1.84	1.759	1.548	1.348	0.918	0.577	0.337	0.219	0.137	0.122	0.112	0.093
P3G	1.85	1.704	1.686	1.484	1.057	0.656	0.401	0.236	0.177	0.142	0.118	0.098

<plate2>

PA	1.907	1.984	1.843	1.501	1.097	0.72	0.451	0.368	0.186	0.142	0.115	0.109
P2A	2.094	2.014	1.84	1.716	1.252	0.978	0.557	0.356	0.223	0.154	0.127	0.126
PG	1.879	1.716	1.215	0.925	0.695	0.318	0.198	0.13	0.104	0.095	0.085	0.097
P2G	2.103	1.887	1.803	1.462	1.017	0.663	0.379	0.218	0.14	0.12	0.09	0.105
P3G	2.022	2	1.758	1.521	1.163	0.808	0.476	0.289	0.177	0.135	0.113	0.108

<average>

PA	1.861	1.8815	1.7105	1.4545	1.0515	0.7205	0.46	0.3295	0.1935	0.147	0.1225	0.1145
P2A	2.038	1.9675	1.7585	1.632	1.2855	0.931	0.575	0.341	0.213	0.1535	0.124	0.1135
PG	1.8375	1.607	1.216	0.877	0.5895	0.3005	0.1885	0.1255	0.0995	0.09	0.0825	0.0885
P2G	1.9715	1.823	1.6755	1.405	0.9675	0.62	0.358	0.2185	0.1385	0.121	0.101	0.099
P3G	1.936	1.852	1.722	1.5025	1.11	0.732	0.4385	0.2625	0.177	0.1385	0.1155	0.103



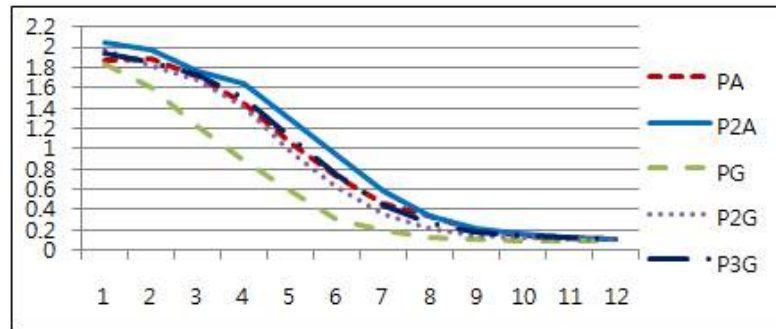


그림 12. 각 재조합 단백질의 토끼 다클론 항체와의 결합력 비교결과

위 그림에서 확인할 수 있듯이, 토끼 다클론 항체는 protein A dimer의 결합력이 가장 우수한 것으로 나타났음.

3) 자성나노입자 및 Protein A dimer - Ab 삼중복합체 완성

아미노그룹이 발현된 실리카코팅 자성나노입자의 제작과정은 아래 그림과 같음.

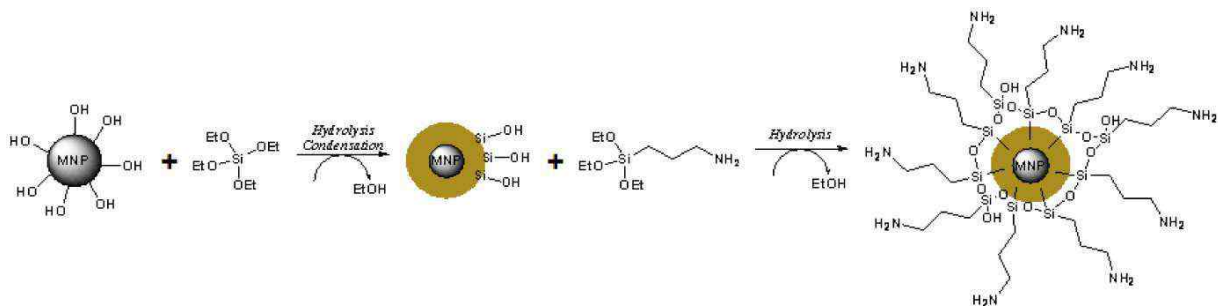


그림 13. 자성나노입자의 제작과정 도시

자성실리카 나노입자는 중심핵 (core)으로 나노자성체 산화물에 실리카 코팅된 자성실리카 나노입자의 표면에 아미노그룹이 도출되어 치환시킨 후, 아미노그룹이 치환된 자성나노입자의 표면을 쌍방결합시약 (cross linking reagent)에 침지시켜 아미노그룹에 아마이드결합을 형성하고, 아마이드결합이 형성된 자성실리카 나노입자의 아미노그룹에 protein A dimer, protein G trimer를 결합시켜 수행하였음.

(8) 자성 복합체의 활용 모식도



그림 14. 자성복합체를 이용한 균의 검출, 자성펜 및 tip을 활용한 균 분리 동정 과정 (step3에서 사용한 tip은 실리콘으로 제작되어 agar 배지에 스크래치를 남기지 않고 세균이 접종될 수 있도록 제작하였음)

(9) 자성 복합체를 활용하여 주요 유방염 원인균의 검출

1) Protein A dimer가 결합되어 있는 자성복합체를 이용한 유방염균의 검출

Protein A dimer 단백질이 결합되어 있는 자성복합체 10mg에 각 유방염 원인 균주별로 제작된 다클론항체를 넣고 자성복합체 자동화 장비에서 30분간 400rpm으로 반응시켰음. 그 후 자력으로 자성복합체들을 tube 벽으로 모은 후 solution을 제거한 뒤, 멸균된 saline solution 1 ml를 넣고 Bio-magnetic processor 장비에서 5분간 400rpm으로 2회 세척하였음. 세척 후 자성복합체를 1 mg씩 분주하고 각종 유방원인균 그리고 대장균을 OD 600nm에서 0.6으로 맞추고 유방염 원인 균주만 10배 더 희석한 상태에서 동량을 혼합한 후 멸균된 흰 우유에 단계 희석하였음. 희석한 균주 혼합액 1 ml에 자성복합체를 첨가한 뒤 30분간 반응 후 solution을 제거하였음. 그 후 세척은 PBST (0.05% Tween-20이 첨가된 PBS 완충액)로 2회 세척한 후에 TSA 배지에 도말하였음. Control은 각 단계 희석한 균주 혼합액 100ul를 도말하였음. 그 결과는 아래 그림에서 확인할 수 있는 바와 같이 균주 혼합액을 바로 도말한 것 보다 자성복합체를 이용하여 도말하였을 때 균주의 검출량이 증가된 것을 확인할 수 있었으며 자성 복합체의 기능 확인은 *S. aureus* (ATCC 29740)균주를 대상으로 MSA 선택배지를 활용하여 확인하였음. MSA 선택배지에는 살모넬라균과 대장균이 자라지 않으므로 *S. aureus* (ATCC 29740)균주만을 용이하게 검출이 가능하였으며 자성복합체를 이용하였을 때 해당균의 검출량이 증가된 것 또한 쉽게 확인할 수 있었음.

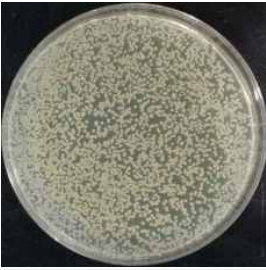

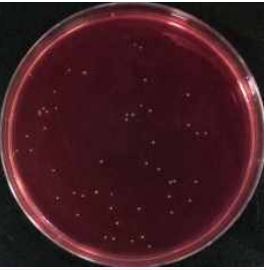

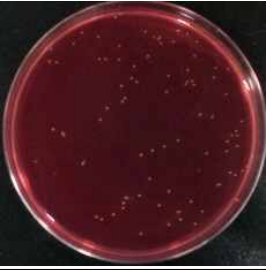
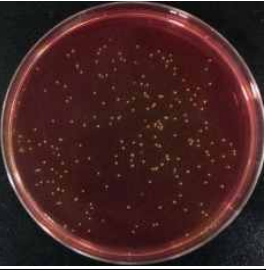
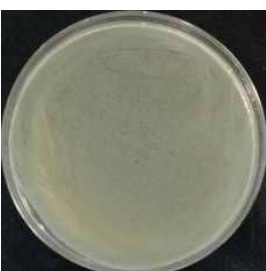

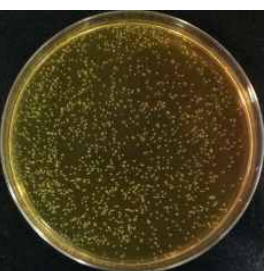
TSA		MSA		자성복합체를 이용한 MSA	
					
혼합균주	TNTC	<i>S. aureus</i>	6	<i>S. aureus</i>	53
					
혼합균주	TNTC	<i>S. aureus</i>	91	<i>S. aureus</i>	253
					
혼합균주	TNTC	<i>S. aureus</i>	285	<i>S. aureus</i>	TNTC

그림 15. 자성복합체를 이용하여 *S. aureus* (ATCC 29740)균의 검출 결과

2) Protein G trimer가 결합되어 있는 자성복합체를 이용한 유방염균 검출

Protein G trimer 단백질이 결합되어 있는 자성복합체 10mg에 *S. aureus* (ATCC 29740) 균, *S. aureus* (ATCC 19636)균 및 *S. epiderdis* (ATCC 12228)균에 대한 다클론 항체를 넣고 상온에서 30분간 반응시켰음. 그 후 자력으로 자성복합체들을 tube 벽쪽으로 모은 후 자성복합체와 반응하지 않는 혈청(항체)을 제거하였음. 그 후 멸균된 saline solution 1ml를 넣고 5분간 2회 세척하였음. 세척 후 *S. aureus* (ATCC 29740)균에 대한 다클론 항체를 처리한 자성복합체에 *S. aureus* (ATCC 29740)균, 살모넬라와 대장균을, *S. aureus* (ATCC 19636)균에 대한 다클론 항체를 처리한 자성복합체에 *S. aureus* (ATCC 19636)균, 살모넬라 균과 대장균을, *S. epiderdis* (ATCC 12228)균에 대한 다클론 항체를 처리한 자성복합체에 *S. epiderdis* (ATCC 12228)균, 살모넬라와 대장균을, *S. aureus* (ATCC 19636)균에 대한 다클론 항체를 처리한 자성복합체에 *S. aureus* (ATCC 19636)균, *S. epiderdis* (ATCC 12228)균, 살모넬라균과 대장균을 *S. epiderdis* (ATCC 12228)에 대한 다클론 항체를 처리한 자성복합체에 *S. aureus* (ATCC 19636)균, *S. epiderdis* (ATCC 12228)균, 살모넬라와 대장균을 OD 600nm에서 0.6으로 맞추고 *S. aureus* (ATCC 29740),

S. aureus (ATCC 19636)균주와 *S. epidermidis* (ATCC 12228)균만 10배 더 희석한 상태에서 동량을 혼합한 후 멸균된 흰 우유에 단계 희석하였음. 희석한 균주 혼합액 1ml에 자성복합체를 첨가 후 30분간 반응 후 solution을 제거하였음. 그 후 세척은 PBST (0.05% Tween-20이 첨가된 PBS 완충액)로 2회 세척한 후 TSA (Tryptic Soy Agar), MSA(Mannitol Salt Agar), EMB(Eosin Methylene Blue Agar), XLD 선택배지에 도말하였음. Control은 항체를 처리하지 않은 자성복합체에 *S. aureus* (ATCC 29740)균, 살모넬라와 대장균을 위 조건과 동일하게 처리하여 TSA, MSA, EMB, XLD 배지에 도말하였음. 그 결과는 아래 그림에서 확인할 수 있는 바와 같이, *S. aureus* (ATCC 29740)균, *S. aureus* (ATCC 19636)균과 *S. epidermidis* (ATCC 12228)균에 대한 다클론 항체를 처리한 자성복합체를 이용하면 살모넬라 균과 대장균이 혼합되어 있다 하더라도 *S. aureus* (ATCC 29740)균, *S. aureus* (ATCC 19636)균과 *S. epidermidis* (ATCC 12228)균만을 특이적으로 검출되는 것을 확인 할 수 있었으며 같은 유방염을 일으키는 *S. aureus* (ATCC 19636)균과 *S. epidermidis* (ATCC 12228)균을 동시에 처리하더라도 98% 특이적으로 해당균만을 선택적으로 검출할 수 있음을 확인하였음(그림 21).

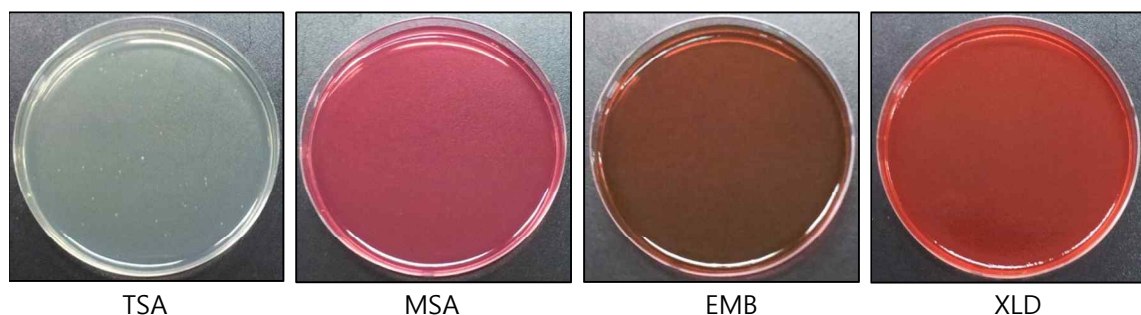


그림 16. 유방염균에 대한 특이항체를 처리하지 않고 자성비드와 *S. aureus* (ATCC 29740)균, 살모넬라 균과 대장균을 처리하여 배양한 결과

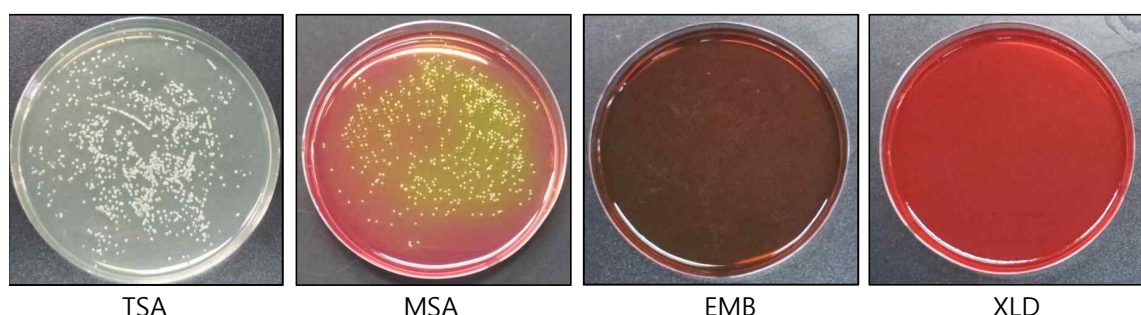


그림 17. *S. aureus* (ATCC 29740)균에 대한 항체를 처리한 자성복합체에 *S. aureus* (ATCC 29740)균, 살모넬라 균과 대장균을 처리하여 배양한 결과

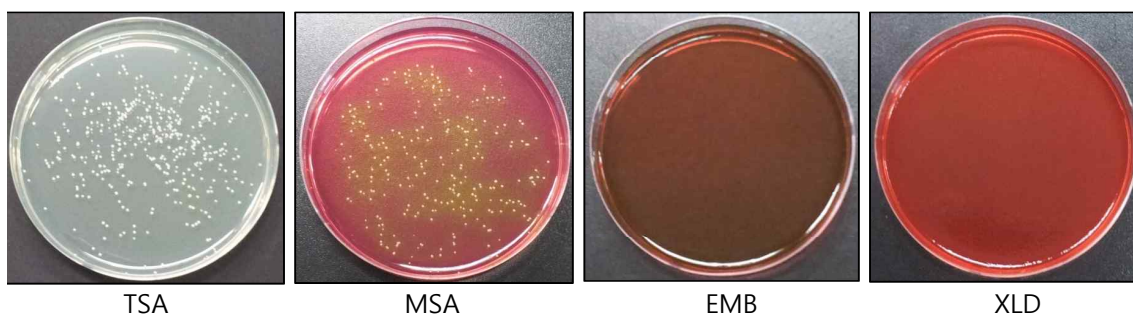


그림 18. *S. aureus* (ATCC 19636)균에 대한 항체를 처리한 자성복합체에 *S. aureus* (ATCC 19636)균, 살모넬라 균과 대장균을 처리하여 배양한 결과

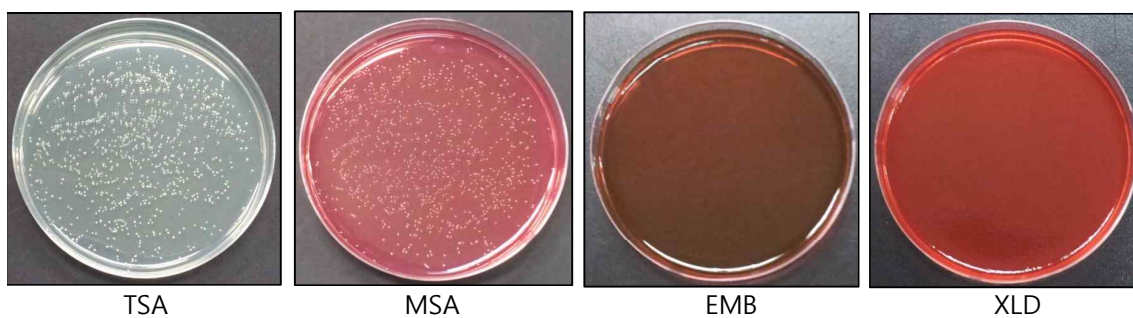


그림 19. *S. epidermidis* (ATCC 12228)균에 대한 항체를 처리한 자성복합체에 *S. epidermidis* (ATCC 12228)균, 살모넬라 균과 대장균을 처리하여 배양한 결과

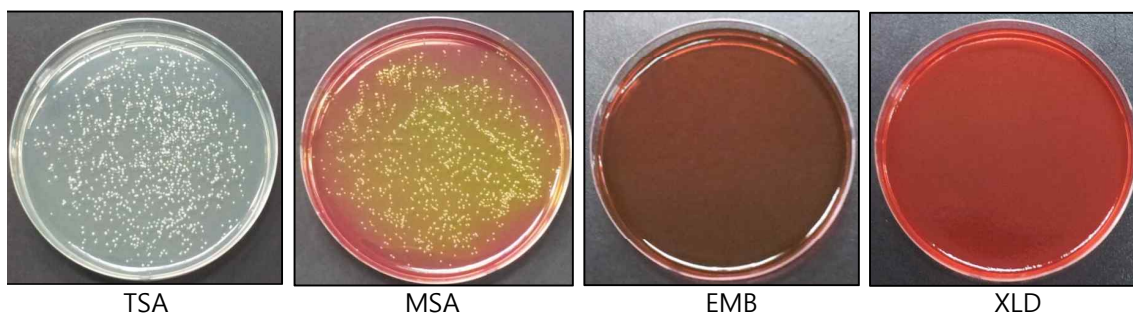


그림 20. *S. aureus* (ATCC 19636)균에 대한 항체를 처리한 자성복합체에 *S. aureus* (ATCC 19636)균, *S. epidermidis* (ATCC 12228)균, 살모넬라 균과 대장균을 처리하여 배양한 결과

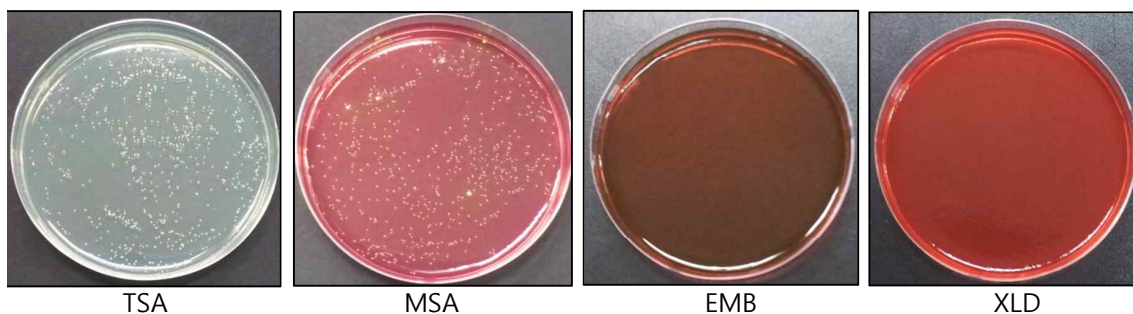


그림 21. *S. epidermidis* (ATCC 12228)균에 대한 항체를 처리한 자성복합체에 *S. epidermidis*

(ATCC 12228)균, *S. aureus* (ATCC 19636)균, 살모넬라 균과 대장균을 처리하여 배양한 결과

3) 자성복합체를 이용하여 검출한 유방염균들의 확인

상기의 실험으로 검출된 각각의 유방염 균들은 해당 혈청과의 응집반응을 통해 유방염균들을 확인하였음. 즉, *S. aureus* (ATCC 29740), *S. epidermidis* (ATCC 13813), *S. pyogenes* (ATCC 120308), *S. uberis* (ATCC 27958) 혈청에 응집반응이 일어나면 해당 균종으로 확인하였고, *S. hyicus* 혈청에 응집반응이 나타나고 *S. aureus* (ATCC 29740) 혈청에 응집반응이 일어나지 않을 경우, *S. hyicus* 균주로 확인하였음. 그리고 *S. aureus* (ATCC 19636), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. dysagalactiae* (ATCC 27959) 균주도 각 해당 혈청에 응집반응이 일어날 경우 서로 다fms 혈청에서의 응집반응 여부를 재확인하여 균주를 판명하였으며 그 결과는 아래의 표와 같음.

표 5. 유방염 원인균 확인을 위한 응집반응 결과 (O: 양성, blank: 무반응)

혈청명 균주명	<i>S. aureus</i> (ATCC 29740)	<i>S. hyicus</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 19636)	<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	<i>S. agalactiae</i> (ATCC 13813)	<i>S. pyogenes</i> (ATCC 120306)	<i>S. uberis</i> (ATCC 27958)	<i>S. dysagalactiae</i> (ATCC 27959)
<i>S. aureus</i> (ATCC29740)	O	O	O	O				
<i>S. hyicus</i>		O						
<i>S. aureus</i> (ATCC 19636)			O					
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)				O				
<i>S. agalactiae</i> (ATCC 13813)					O			
<i>S. pyogenes</i> (ATCC 120306)						O		O
<i>S. uberis</i> (ATCC 27958)							O	
<i>S. dysagalactiae</i> (ATCC 27959)								O



TSA



자성비드 이용 후 TSA

그림 22. 혼합균주 도말과 자성비드를 사용하여 TSA에 도말한 사진 [예: *S. uberis* (ATCC 27958)]

그리고 도말 후 나온 colony는 적절한 희석배율에서 무작위로 100개씩 골라 응집반응 여부로 해당 균주의 양성여부를 확인하였으며, 응집반응은 자체 제작한 응집슬라이드를 이용하였음 (그림 23).



그림 23. 응집슬라이드를 이용한 응집반응 사진

아래 표에서 확인할 수 있는 바와 같이 균주 혼합액을 바로 도말한 것 보다 자성복합체를 이용하여 도말하였을 때 해당 유방원인균주의 검출량이 현저히 증가된 것을 확인할 수 있었음. 따라서 개발된 자성복합체를 이용한 유방염 원인균주 분리 및 동정과정은 매우 효과적임을 확인하였음.

표 6. 자성복합체를 이용하여 유방원인균주의 검출 결과

원인균	TSA	자성복합체 이용 후 TSA
<i>S. aureus</i> ATCC 29740	2/100	86/100
<i>S. hyicus</i>	0/100	74/100
<i>S. aureus</i> ATCC 19636	3/100	85/100
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0/100	62/100
<i>S. agalactiae</i> ATCC 13813	2/100	67/100
<i>S. pyogenes</i> ATCC 120306	2/100	66/100
<i>S. uberis</i> ATCC 27958	0/100	82/100
<i>S. dysagalactiae</i> ATCC 27959	0/100	77/100

표 7. 효소면역측정법, 응집반응 및 자성비드 활용법 상의 자가 및 교차반응 여부

원인균	<i>S. aureus</i> (ATCC 29740)			<i>S. hyicus</i>			<i>S. aureus</i> (ATCC 19636)			<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)			<i>S. agalactiae</i> (ATCC 13813)			<i>S. pyogenes</i> (ATCC 120306)			<i>S. uberis</i> (ATCC 27958)			<i>S. dysagalactiae</i> (ATCC 27959)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
<i>S. aureus</i> (ATCC29740)	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
<i>S. hyicus</i>	×	×	×	O	O	O	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
<i>S. aureus</i> (ATCC 19636)	×	×	×	×	×	×	O	O	O	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	×	×	×	×	×	×	×	×	×	O	O	O	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
<i>S. agalactiae</i> (ATCC 13813)	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	O	O	O	×	×	×	×	×	×	×	×	×
<i>S. pyogenes</i> (ATCC 120306)	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	O	O	O	×	×	×	O	O	O
<i>S. uberis</i> (ATCC 27958)	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	O	O	O	×	×	×	×
<i>S. dysagalactiae</i> (ATCC 27959)	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	O	O	O	O

*A; 효소면역측정법, B; 응집반응, C; Magnetic bead 활용

위 표 7에서 확인할 수 있는 바와 같이 효소면역측정법, 응집반응, 그리고 자성비드 활용법 상에서의 자가 및 교차반응 결과는 동일한 패턴으로 나옴을 확인할 수 있었음.

(10) 자성복합체의 활용 표준메뉴얼 개발

1) 시료 채취 및 전처리 방법

- 현장에 적용되기 위하여 비슷한 환경에서 자성비드의 성능을 확인하기 위하여 시판되는 우유에 표적 균주와 다른 여타 균주를 혼합하여 혼입시킨 후, 표적 균주에 특이적인 항체가 결합된 자성입자 복합체를 반응시켜 표적균주의 분리/동정 효율을 확인하였음. 각종 표적균주와 다른 여타 균주를 OD 600nm에서 0.6으로 맞추고 표적균주만을 10배 더 희석한 상태에서 동량을 혼합한 후 멸균된 흰 우유에 단계 희석하였고, 희석한 균주 혼합액 1 ml에 자성복합체를 넣어 반응시켜 자성입자를 자동으로 분리하는 장비 (Bio-magnetic processor)에 장치한 후 일련의 세척과정 등을 포함한 분리과정에 적용하였음.

2) 주요 유방염 원인균 분리 동정을 위한 자성복합체 적용 매뉴얼

① 자성입자-protein A(G)-특이 항체 삼중복합체 제작: Protein A dimer, protein G trimer 단백질이 결합되어 있는 자성복합체 10mg에 해당되는 다클론항체를 넣고 Bio-magnetic processor에서 30분간 400rpm으로 반응시킨 후, 자력으로 자성복합체들을 tube 벽으로 모은 후 solution을 제거하였음. 또한 비결합 항체를 제거하기 위하여 멸균된 saline solution 1ml를 넣고 5분간 400rpm으로 2회 세척하였고, 자력에 의해 분리된 자성입자만을 포집하여 시험에 사용할 삼중 복합체를 완성하였음(아래 모식도 참조).

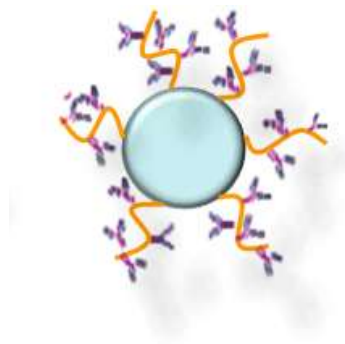


그림 24. 삼중복합체의 모식도

② 삼중복합체와 시료와의 반응 및 세척: 희석한 균주 혼합액 1ml에 삼중복합체를 첨가 후 30분간 반응 후 solution을 제거한 후, 세척은 PBST (0.05% Tween-20이 첨가된 PBS 완충액)로 5분간 2회 시행하였음(그림 24).



그림 25. 삼중복합체와 시료의 반응 후 세척과정

③ 삼중복합체를 이용한 시료 내 표적 병원체의 확인: 세척이 완료된 삼중복합체는 선택 배지에 배양하여 colony의 color 등을 확인하거나 응집반응을 통하여 해당균임을 확인하였음 (그림 26).

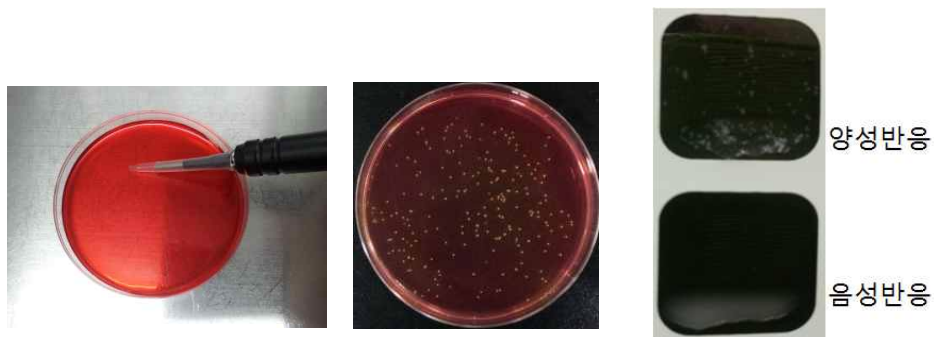


그림 26. 시료 내 표적 병원체의 확인 (선택배지 배양 및 응집반응 활용)

(11) 자성복합체를 이용한 균검출 시제품 구성·생산

1) 자성복합체를 이용한 균검출 시제품 구성

시제품내의 구성품으로는 protein G trimer 단백질이 결합되어 있는 자성복합체, *S. aureus* 다클론 항체, washing buffer, suspension buffer로 각각 구성되어 있는데 이는 protein G trimer 단백질이 결합되어 있는 자성복합체와 *S. aureus* 다클론 항체를 결합 할 때 발생하는 보관상의 문제점을 원인으로 함; protein G trimer 단백질이 결합되어 있는 자성복합체는 4℃보관을 원칙으로 하지만, 항체의 경우 냉장 보관 할 경우 항체의 activity가 떨어질 가능성이 있기 때문에 자성복합체를 사용하기 전에 protein G trimer 단백질이 결합되어 있는 자성복합체와 *S. aureus* 다클론 항체 각각을 별도 보관 및 사용해야 함.

2) 자성복합체를 이용한 유방염균의 검출 키트 시제품

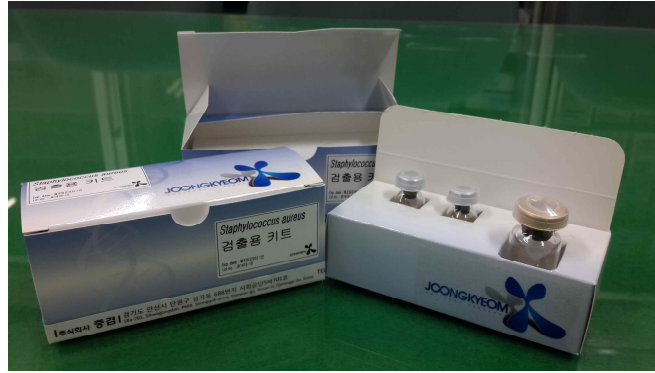


그림 27. 유방염균 검출용 키트

2. 실험동물 감염모델을 이용한 세균 침습성 안티센스 PNA 복합체의 in vivo 방어효능 분석

▶ 연구수행전략 및 방법:

(1) 실험동물을 이용한 젖소 유방염 감염모델 탐색 및 감염 프로토콜 확립

- 마우스를 이용하여 젖소 유방염 감염모델 탐색 및 프로토콜 확립

(2) 공격접종에 따른 치사율/생존율 비교 분석

- 확립된 감염동물모델을 이용하여 공격 접종 후 치사율 및 생존율 비교

(3) 실험동물을 이용한 항생제 내성 감염에 따른 내성 제어효능 검증

- 마우스에 PNA 복합체를 공격접종 처리하여 유방염균에 대한 치료 효과 확인

▶ 연구 결과:

(1) 개발된 PPNA 의 in vivo 효능에 대한 예비실험

- 마우스 감염모델을 이용한 생체 내 효능 분석: *S. aureus* (ATCC 29740)의 sublethal dose를 Balb/C 마우스 복강에 감염 후, 30분 뒤 개발된 신규 PPNA (20 uM Pjyh-cmk1)를 투여하여 20시간 뒤 마우스를 안락사 하였고, 복수와 신장조직에서 균수를 direct plate 기법을 이용하여 측정하였음. 그 결과, 아래 그림에서 제시된 바와 같이, PPNA 처치한 그룹에서 4-5 log scale 정도의 유의적으로 낮은 농도의 균이 존재함을 확인하였으며 이는 개발된 PPNA가 생체 내에서 유효한 항균기능을 발휘함을 암시함.

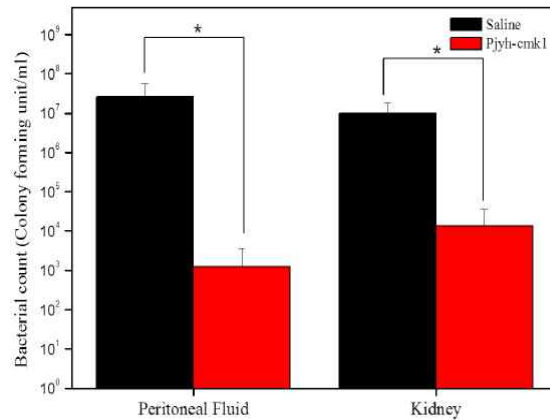


그림 28. 개발된 PPNA 복합체의 일종인 Pjyh-cmk1의 생체 내 항균효능 분석

(2) 마우스를 이용한 젖소 유방염 감염모델 탐색 및 감염 프로토콜 확립

1) 마우스 종: ICR strain

2) 접종 세균 및 감염용량: *S. aureus* (ATCC 29740)을 접종균으로 하여, 4가지 group으로 나누어 0.9×10^1 , 1.4×10^2 , 4.0×10^2 , 2.1×10^3 cfu/ml 농도로 접종하였음.

3) 감염 프로토콜 및 결과 분석: 신규 개발된 PPNA 혹은 균주 단독, 또는 PNA와 균주의 혼합물의 투여는 출산 12-14일차 어미의 4번째 좌, 우 유두에 30G 주사 바늘을 이용하여 100 μ l씩 투여하였으며, 또한 폐사여부 관찰은 6, 12, 24, 48, 72 시간을 간격으로 관찰하여 결과를 기록하였음.

(3) 공격접종에 따른 치사율/생존율 비교 분석

1) PNA와 유방염 원인균의 준비

가) 세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 사용

본 과제에서 발굴된 PPNA는 (주)파나진에 주문하여 제작·사용하였으며, 합성 구조는 KFFKFFKFFK-L-tactgcgtca이며 HPLC로 정제하였음. PPNA의 사용을 위하여 1 mM의 농도가 되게 용해시킨 후, 단위접종 용량 100 μ l당 4 μ l를 첨가하여 혼합하여 주었음. 이때 뿌옇게 응집이 생길 경우에는 37°C에서 3분간 녹여준 후 마우스에 접종하였음.

나) 유방염 원인균주의 준비

유방염 원인균주로서 *S. aureus* (ATCC 29740) 균주를 사용하였으며 해당 균주를 평판배지에 접종하여 37°C에서 하룻밤(18~24시간) 배양한 후 colony를 선택하여 37°C에서 하룻밤(18~24시간) 재배양 하였고 배양액은 4°C 냉장고에 보관하면서 투여용 항원 제조용 균주로서 활용하였음. 4°C 냉장고에 보관중인 균주를 TSB에 접종한 후 37°C에서 6시간 배양한 것을 식균용 균주로 사용하였음. 배양된 균액을 배양병을 이용하여 3~5ml씩 분주한 후 배지 전체에 퍼지도록 하여 37°C에서 18-24시간 배양하였고, 이후 saline을 이용하여 균을 배지에서 부유시킨 뒤 균 부유액을 수집하였음. 얻어진 부유액의 OD

600nm을 측정하여 균수를 확인한 결과 0.9×10^4 cells/ml 이었으며 본 실험에서 사용한 접종균수는 총 4가지 group으로 0.9×10^1 , 1.4×10^2 , 4.0×10^2 , 2.1×10^3 cfu/ml이었음.

2) 유방염 모델 국소 접종 실험(공격접종에 따른 치사율/생존율 비교분석) 결과

1차 실험으로 PNA 복합체 없이 4 group의 균주만을 투여하여 2set 씩 또 PNA 복합체로 인한 폐사가 있는지 확인하기 위해 대조군으로 PNA만을 과용량으로 투여한 결과 흥미롭게도 PNA만을 투여한 실험군의 경우 폐사가 전혀 관찰되지 않음을 확인하였음(표 8).

표 8. ICR mouse의 미정맥에 PNA 과용량 투여 후 생존여부

Inoculum	PNA 투여 후 경과 시간(hr)	Number of mice survived 투여 후 mouse/투여 전mouse
과용량 투여군	6	10/10
	12	10/10
	24	10/10
	48	10/10
	72	10/10

- 이에 반하여, PNA 복합체 없이 4 group의 균주를 30G 주사 바늘을 이용하여 출산 12-14 일차 어미의 4번째 좌·우 유두에 100 ul씩 투여한 그룹의 경우, 모든 투여군의 mice가 24 hr 내에 모두 폐사함을 확인하였음(표 9과 10).

표 9. *S. aureus* (ATCC 29740)균만을 투여한 그룹의 마우스 생존율 결과 (PNA 무처리 그룹; 1차 실험)

Inoculum (cfu/ml)	Time of infection(hour)				
	6	12	24	48	72
0.9×10^1 (1/2)	O	O	×	×	×
0.9×10^1 (2/2)	O	O	×	×	×
1.4×10^2 (1/2)	O	O	×	×	×
1.4×10^2 (2/2)	O	O	×	×	×
4.0×10^2 (1/2)	O	O	×	×	×
4.0×10^2 (2/2)	O	O	×	×	×
2.1×10^3 (1/2)	O	O	×	×	×
2.1×10^3 (2/2)	O	O	×	×	×

*각 실험군은 성숙 암컷 마우스와 갓 태어난 5수의 마우스로 구성됨.

**표에서 O는 모든 마우스가 생존하였음을, ×는 폐사하였음을 나타냄.

표 10. *S. aureus* (ATCC 29740)균만을 투여한 그룹의 마우스 생존율 결과 (PNA 비처리 그룹; 2차실험)

Inoculum (cfu/ml)	Time of infection(hour)				
	6	12	24	48	72
0.9×10^1 (1/2)	O	O	×	×	×
0.9×10^1 (2/2)	O	O	×	×	×
1.4×10^2 (1/2)	O	O	×	×	×
1.4×10^2 (2/2)	O	O	×	×	×
4.0×10^2 (1/2)	O	O	×	×	×
4.0×10^2 (2/2)	O	O	×	×	×
2.1×10^3 (1/2)	O	O	×	×	×
2.1×10^3 (2/2)	O	O	×	×	×

*각 실험군은 성숙 암컷 마우스와 갓 태어난 5주의 마우스로 구성됨.

**표에서 O는 모든 마우스가 생존하였음을, ×는 폐사하였음을 나타냄.

공격접종 후 PNA를 처리한 그룹의 경우, 모든 4 그룹의 균 농도에서 24 hrs 후에 100% 생존율을 보여 주었으며(표 11) 따라서 세균침습성 안티센스 PNA 복합체와 혼합하여 투여한 균은 모두 생존함을 확인하였음. 이는 *in vitro* 실험에서와 같이 *in vivo*에서도 안티센스 PNA가 세균의 증식 및 생존을 효과적으로 억제할 수 있음을 제시하는 것이라고 볼 수 있음.

표 11. *S. aureus* (ATCC 29740)균과 PNA 복합체 혼합 후 마우스의 생존율 (PNA 처리군; 2차실험)

균 투여량	Time of infection(h)	Number of mice survived 투여 후 mouse/투여 전mouse
0.9×10^1 (1/2)	6	13/13
	12	13/13
	24	13/13
	48	13/13
	72	13/13
0.9×10^1 (2/2)	6	13/13
	12	13/13
	24	13/13
	48	13/13
	72	13/13
1.4×10^2 (1/2)	6	12/12
	12	12/12
	24	12/12
	48	12/12
	72	12/12
1.4×10^2 (2/2)	6	13/13
	12	13/13
	24	13/13
	48	13/13
	72	13/13
4.0×10^2 (1/2)	6	9/9

	12	9/9
	24	9/9
	48	9/9
	72	9/9
4.0×10^2 (2/2)	6	13/13
	12	13/13
	24	13/13
	48	13/13
	72	13/13
2.1×10^3 (1/2)	6	11/11
	12	11/11
	24	11/11
	48	11/11
	72	11/11
2.1×10^3 (2/2)	6	10/10
	12	10/10
	24	10/10
	48	10/10
	72	10/10

3. PNA의 안전성, 독성 및 약리/약동학적 시험

▶ 연구수행전략 및 방법:

(1) PNA의 in vivo 안전성 분석

- PNA의 생물 및 환경 안전성 분석
- 과용량의 PNA 복합체 처리한 실험동물에서의 급성 및 아급성 반응 확인

▶ 연구결과:

(1) PNA의 안전성, 독성 시험

1세부과제에서 개발한 PNA 복합체 유효농도에 비해 과용량을 실험동물에 투여하여 급성 또는 아급성 반응을 확인하였으며 투여한 농도는 유효농도의 2배인 마리당 10 nmole을 미정맥으로 투여하였으며 10마리의 개체에 대하여 시험하였고 240시간까지 활동성과 사료 및 물의 섭취 등을 육안으로 관찰한 결과, 10마리 모두 정상으로 폐사하거나 이상을 보이는 개체가 없음을 확인하였음.

(2) 유방염 모델 국소 접종 실험 개체의 조직염색 결과

생리식염수를 투여한 것과 PNA 복합체를 혼합하여 투여한 마우스 실험동물군의 조직을 비교하였음. 개체는 성숙한 암컷 마우스와 갓 태어난 마우스를 혼합하여 두 가지 투여군으로 나뉘어서 시행하였으며 성숙한 암컷 마우스의 경우는 간, 폐, 장, 유선을, 갓 태어난 마우스의 경우는 간, 폐, 장의 조직을 확인하였음.

1) 조직염색

얻어진 조직을 4% 중성 포르말린용액에 담그고, 24hr 이후 새 중성 포르말린용액으로 옮겨 담아 조직염색을 시행하였음(표 12).

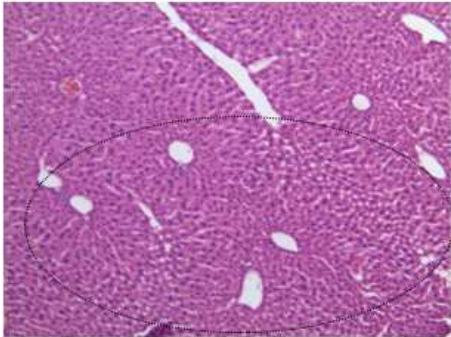
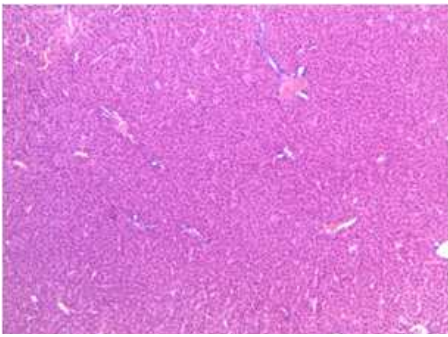
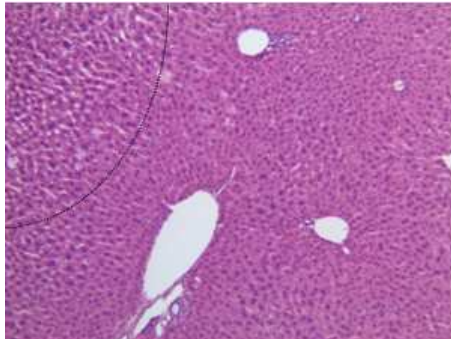
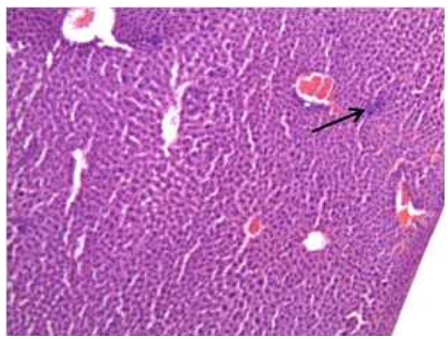
표 12. 중성 포르말린용액 (4%) 조성

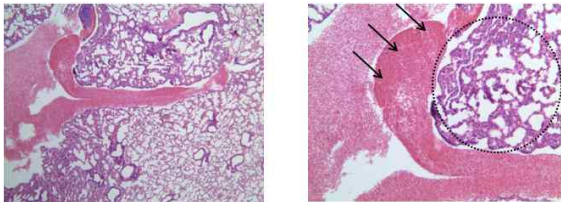

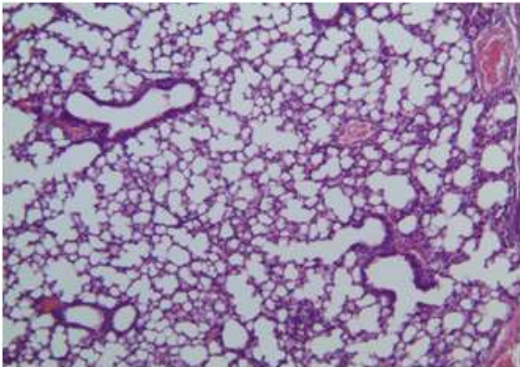
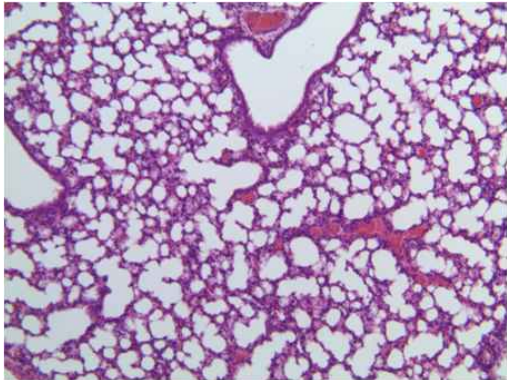
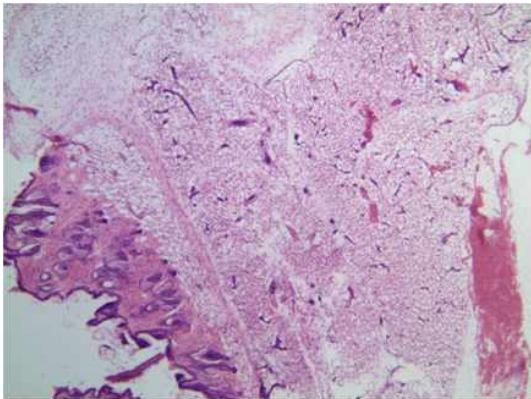
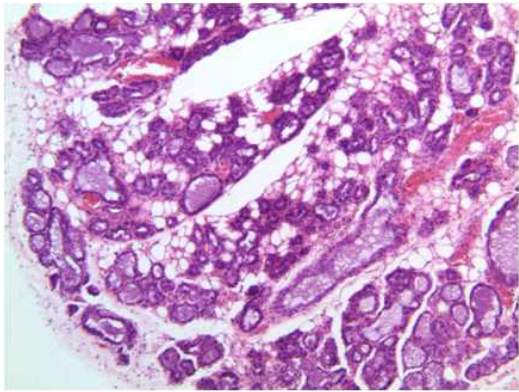
40% 포르말알데하이드	100ml
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.52g
$\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	16.38g
D.W	900ml
Total	1000ml

2) 조직염색결과

PNA 과용량 투여군과 비투여군의 간, 폐, 유선, 공장, 결장, 회장 조직을 비교한 결과, 두드러진 조직 독성을 확인하지 못하였고(그림 29). 이러한 결과는 개발된 PPNA 복합체가 생체 내에서 안전함을 제시하는 것이며 따라서 향후 중장기 안정성 및 안전성에 대한 지속적인 검증을 할 계획에 있음.

부위	Non-PNA	PNA
----	---------	-----

간	 <p>갓 태어난 마우스 (X100)</p>	 <p>갓 태어난 마우스 (X40)</p>
	<p>- 부분적인 간세포 괴사 & 경미한 간세포간 해리 (focal necrosis & hepatocyte dissociation)</p>	<p>- 비교적 정상</p>
	 <p>성숙한 암컷마우스 (X100)</p>	 <p>성숙한 암컷마우스 (X100)</p>
	<p>- 부분적인 간세포 괴사 & 경미한 간세포간 해리 (focal necrosis & hepatocyte dissociation)</p>	<p>- 부분적인 간세포 괴사 & 경미한 간세포간 해리 (focal necrosis & hepatocyte dissociation) - 조직 국소적인 lymphoid nodule 형성(black arrow)</p>

폐	 <p>성숙한 암컷 마우스 (X40, X100)</p>	 <p>성숙한 암컷 마우스 (X100)</p>
	<ul style="list-style-type: none"> - 광범위한 조직 괴사(diffuse necrosis) - 조직 내 충 출혈(congestion & hemorrhage) - 폐포벽의 증생(septal hyperplasia), 중증도의 간질성 폐렴(moderate interstitial pneumonia) 	<ul style="list-style-type: none"> - 폐포벽의 증생(septal hyperplasia), 경미한의 간질성 폐렴(mild interstitial pneumonia)
	 <p>갓 태어난 마우스 (X100)</p>	 <p>갓 태어난 마우스 (X100)</p>
	<ul style="list-style-type: none"> - 폐포벽의 증생(septal hyperplasia), 경미한의 간질성 폐렴(mild interstitial pneumonia) 	<ul style="list-style-type: none"> - 폐포벽의 증생(septal hyperplasia), 경미한의 간질성 폐렴(mild interstitial pneumonia)
유선	 <p>성숙한 암컷 마우스 (X100)</p>	 <p>성숙한 암컷 마우스 (X100)</p>
	<ul style="list-style-type: none"> - 피하지방조직 내 국소적인 염증세포(림프구)의 침윤 	<ul style="list-style-type: none"> - 정상

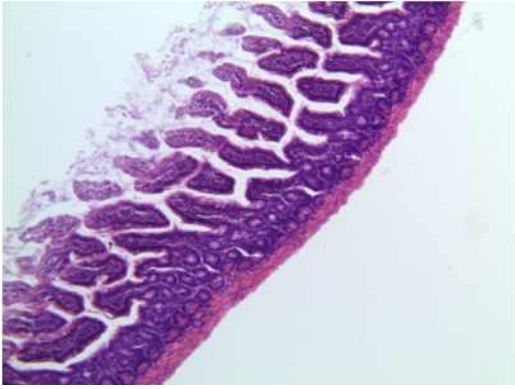
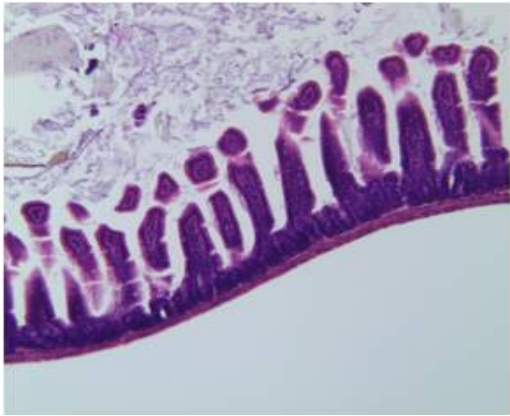
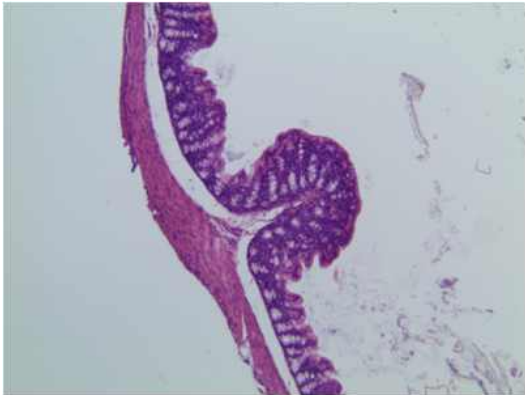
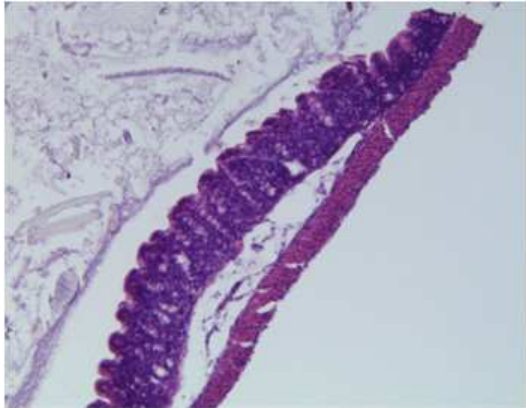
공장	 <p>성숙한 암컷 마우스 (X100)</p>	 <p>갓 태어난 마우스 (X100)</p>
	<ul style="list-style-type: none"> - 용모의 괴사 & 위축 (villus necrosis & atrophy) - 음와의 증생(crypt hyperplasia) - 조직 내 염증세포 침윤 	<ul style="list-style-type: none"> - 용모의 괴사 & 위축 (villus necrosis & atrophy) - 음와의 증생(crypt hyperplasia) - 조직 내 염증세포 침윤
결장	 <p>성숙한 암컷 마우스 (X100)</p>	 <p>갓 태어난 마우스 (X100)</p>
	<ul style="list-style-type: none"> - 조직 내 염증세포 침윤 - 점막의 염증반응으로 인한 점액세포 (goblet cell) 소실 - 점막 하 조직의 부종(edema, black arrow)) 	<ul style="list-style-type: none"> - 조직 내 염증세포 침윤 - 점막의 염증반응으로 인한 점액세포 (goblet cell) 소실 - 점막 하 조직의 부종(edema, black arrow))

그림 29. 조직염색 결과 비교

4. 세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 제형화

▶ 연구수행전략 및 방법:

(1) 개발된 안티센스 PNA 복합체의 제형화 및 산업화 전략 구축

- 안티센스 PNA 복합체의 생물 및 환경 안전성 분석에 따른 제형화

▶ 연구결과:

(1) 안티센스 PNA 복합체 시제품 구성 및 제작



그림 30. PNA 복합체 시제품

5. 목적동물을 활용한 임상평가

▶ 연구수행전략 및 방법:

(1) 실험동물 및 목적동물에 대한 임상평가

- PNA 복합체 유효농도에 비해 과용량을 각각의 실험동물 및 목적동물에 처리하여 급성 반응 또는 아급성 반응 여부 확인
- 제형화된 PNA 복합체에 대한 현장 목적동물에서의 치료제로서의 효능 평가

- ▶ **연구결과:** 자연 감염 유방염 젖소에 대하여 800 nM을 함유한 주사제형 시제품을 유두로 직접 주입하였고, 2주 가량 우유 시료를 채취하여, 체세포수 및 우유 내 세균수를 측정하였던 바, 체세포수의 감소경향을 확인할 수 있었으며, 흥미롭게도 우유 내 세균수의 현저함 감소 경향을 관찰하였음(표 13). 모든 관찰 기간 동안 유방의 종대, 발열, 염증악화 등의 소견을 확인할 수 없었고, 마우스 안전성 검사에서와 같이 목적동물에서 안전함을 확인하였음.

(표 13) 800 nM P-PNA 농도에 대한 급성유방염 젖소 치료 효능 평가

일련 번호	목장 이름	개체 번호	분리세균	SCC (X 1,000)				CFU/ml			
				T-1	T+1	T+4	T+8	T-1	T+1	T+4	T+8
1	참**	92	Enterococcus	2,060	1,376	2,768	3,187	33,900	31,500	13,750	7,350
2	동**	93	Kocuria	3,372	135	110	447	45,000	14,250	1,600	4,240,000
3	동**	441	E. coli	2,080	1,208	2,374	2,943	505,500	47,550	650	4,250
4	성*	168	Bacillus, Pseudomonas, E. coli	16,200	2,274	308	1,600	285,000	85,300	10,500	2,578

*** P-PNA 처치 유방에서 종창, 발열, 염증악화 등의 소견을 확인할 수 없었음.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 연도별 연구목표에 입각한 연구개발목표의 달성도

구분 (연도)	연구개발의 목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	관련분야의 기술발전예의 기여도
1차 년도 (2012)	젯소 유방염 및 항생 제 내성 제어를 위한 신규 안티센스 올리고 머 발굴	100	국내 주요 젯소 유방염 원인균 및 항생제 내성패턴에 대한 분석	국내 젯소 유방염 관련 주요 원인균 의 최근 변화를 감지함으로써 향 후 국내 방역정책 수립의 기초자료 제공함은 물론, 신 규 항균성 안티센 스 P-PNA의 후 보물질 발굴 기술 확립
		100	주요 원인균에 존재하는 광범위 필수생존인 자 탐색 및 안티센스 올리고머 선발	
		100	주요 항생제 내성 관련 표적인자의 탐색 및 후보 안티센스 올리고머 선발	
		100	후보 안티센스 올리고머의 기능성 검증시스 템 구축	
		100	안티센싱 효과의 비교 분석을 통한 최적 안 티센스 올리고머 결정	
	세균 침습성 펩타이드 선별(1)	100	세균 침습성 펩타이드 탐색, 설계 및 합성	세균침습성 펩타 이드 선발 및 검 증 기술 확립
		100	표지물질을 이용한 세균침습성 검증시스 템 구축	
		50	후보 펩타이드의 세균 침습효과 비교 분석	
	자성나노복합체를 이 용한 유방염 원인균의 신속 고효율 진단 기 술 개발(1)	100	표준/분리주 중심의 특이 마커 탐색, 발현 및 특이항체 (다클론) 제작	국내 젯소 주요원 인균의 신속 검출 자 성 나 노 복 합 체 개발을 통한 유방 염 제어 후보물질 의 효능 평가를 위한 검증기술 확 립
		100	혼합 및 조성의 최적화	
		100	원유 내 다양한 오염 미생물 마커 탐색 및 특이항체 제작	
		100	자성 복합체 제작	
		100	주요 유방염 원인균 특이 자성 복합체의 활 용 최적화 및 표준매뉴얼 개발	

구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	관련분야의 기술발전에의 기여도
2차 년도 (2013)	세균 침습성 펩타이드 선별(2)	90	후보 펩타이드의 세균 침습효과 비교분석	신규 P-PNA의 기능 성 검증 시스템 확립 및 안티센싱 효능 검 증을 위한 모니터링 기술 확립
	주요 유방염 원인균에 대한 세균침습성 안티 센스 PNA 복합체의 기능성 평가	100	선발된 광범위 필수생존인자에 대한 세균 침습성 안티센스 PNA 복합체 제작	
		90	합성된 안티센스 PNA 복합체에 의한 표 적유전자 발현침묵효과와 정성·정량적 분석(1)	
	항생제 내성균에 대한 세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 내성 제어능 평가	100	선발된 항생제 내성인자에 대한 세균침습 성 안티센스 PNA 복합체 제작	항생제 내성 역전효과 를 지닌 P-PNA 효능 검증 기술 개발
		100	합성된 안티센스 PNA 복합체에 의한 항 생제내성 제어능의 정성·정량적 분석(1)	
	자성나노복합체를 이용 한 유방염 원인균의 신 속 고효율 진단기술 개 발(2)	100	주요 유방염 원인균 특이 자성 복합체의 활용 최적화 및 표준매뉴얼 개발	자성나노복합체의 임 상적용을 위한 활용 기술 확립
	세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 in vivo 방어 및 제어효능 분석	100	실험동물을 이용한 젖소 유방염 감염모델 탐색 및 감염 프로토콜 확립	젖소 유방염 감염모델 확립 및 P-PNA의 생 체내 방어 효능 검증 기술 개발
		100	공격접종에 따른 치사율/생존율 비교분석	
	안전성, 독성 및 약리/약 동학적 시험	80	PNA 복합체 유효농도에 비해 과용량을 각각의 목적동물에 제공하여 일정 기간 동안 관찰 후 급성 또는 아급성 반응 여 부 확인	PNA 복합체의 생체 안전성 및 안정성 검 증 기술 확립

구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	관련분야의 기술발전예의 기여도
3차 년도 (2014)	주요 유방염 원인균에 대한 세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 기능성 평가	100	선발된 광범위 필수생존인자에 대 한 세균침습성 안티센스 PNA 복 합체 제작 완료	P-PNA 기능성 검증 및 효능발휘 기전 규명
		100	선발된 항생제 내성인자에 대한 세균침습성 안티센스 PNA 복합체 제작 완료	
		100	합성된 안티센스 PNA 복합체에 의한 표적유전자 발현침묵효과의 정성·정량적 분석	
	항생제 내성균에 대한 세균 침습성 안티센스 PNA 복합 체의 내성 제어능 평가	100	마우스를 이용한 항생제 내성균 감염에 따른 내성 제어효능 검증 완료	P-PNA의 항생제 내성억진효과의 생체내 검증 및 제어능 평가 기술 확립
	실험동물 감염모델을 이용 하여 세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 in vivo 방 어효능 분석	100	마우스를 이용한 유방염감염질환 모델을 활용, 생체 내에서 후보물 질의 방어효능 검증 완료	유방염 감염모델 을 통한 P-PNA 의 생체내 효능 규명
	세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 제형화 및 in vivo 안전성 분석	100	제형화 실험 완료	P-PNA의 조직병 리학적 안전성 및 안정성 규명
		100	마우스 감염동물 모델에서 생체 내 단기 안전성 분석	
	목적동물을 활용한 전임상 및 임상평가	80	목적동물인 젖소유방염 감염우에 서 개발된 시제품의 효능 평가 및 임상적용 프로토콜 확립	목 적 동 물 에 서 P-PNA의 임상적 용기술 개발 및 효능 규명

제 2절 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

구분	평가의 착안점 및 척도		
	착 안 사 항	척도 (%)	달성도 (%)
1차년도 (2012)	-젖소 유방염 및 항생제 내성 제어를 위한 신규 안티센스 올리고머 발굴 유무	35	100
	-세균침습성 펩타이드(bacterium-penetrating peptides) 확보 유무	35	100
	-자성나노복합체를 이용한 유방염 원인균의 신속 고효율 진단 기술 개발	30	100
2차년도 (2013)	-주요 유방염 원인균에 대한 세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 기능성 평가	30	100
	-항생제 내성균에 대한 세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 내성제어능 평가	30	100
	-실험동물 감염모델을 이용하여 세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 in vivo 방어효능 분석	40	100
3차년도 (2014)	-세균침습성 안티센스 PNA 복합체의 제형화 및 in vivo 안전성 분석	50	100
	-현장 목적동물에 대한 치료제의 효능 평가 수행여부	50	100
최종 평가	-젖소 유방염 제어용 세균 침습성 안티센스 PNA 복합체의 개발 및 상품화	35	100
	-주요 항생제 내성 제어용 세균 침습성 안티센스 PNA 복합체의 개발 및 상품화	35	100
	-논문 및 특허출원	30	90

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1절 실용화사업화 계획(기술실시 등)

- ▶ 본 연구과제로부터 개발된 세균침습성 PPNA 복합체는 2건의 특허출원을 완료하였으며, 다양한 균종에 효과적인 항균력을 발휘함은 물론, 마우스 및 목적동물인 젓소 유방염 감염우의 분방에 적용하였을 때 별 다른 부작용없이 유의성 있는 세균수 감소, 체세포수의 현저한 감소를 보였주었음. 이러한 결과는 PPNA 기반 소재를 가축 감염질환에 사용할 수 있음을 암시함.
- ▶ 따라서 개발된 세균침습성 복합체를 목적동물이 젓소에서 사용 가능하도록 승인 절차를 진행한 후, 자체상품화를 통하여 시장 선점을 기대함.
- ▶ 국내 주요 젓소유방염 원인균 7종에 대한 자성복합체 역시 특허 출원을 준비 중이며, 제작된 시제품의 농가 적용을 통하여, 유방염 원인균의 신속 분리 동정 및 축산 식육가공품에 적용하여 먹거리 안전에 기여할 수 있도록 키트화 하여 자체상품화할 것임.

제 2절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

- ▶ 본 과제로부터 개발된 성과물은 2건의 국내특허를 출원하였으며, 1건의 추가특허를 진행 중임.
- ▶ 선출원 후논문 원칙에 의거, 초기 계획대비 논문 발표 실적이 저조한 편이나, 2건의 특허출원이 완료된 현재 1편의 비SCI 논문과 1편의 SCI 논문을 두고 예정임.

제 3절 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

- ▶ 개발된 세균침습성 PPNA 복합체는 최초로 가축질환을 대상으로 검증된 제제이기 때문에, 향후 국가기관의 승인을 획득하기 위하여 목적동물에 대한 추가 실험 및 안전성, 안정성 분석을 시도할 예정임. 특히, 향후 추가 연구과제 도출을 통하여 제품 개발 전 단계에서 동물에 대한 중기 및 장기 안전성 데이터를 확보를 위한 실험이 반드시 필요할 것임. 이를 위하여 과제 종료 후, 중기청 혹은 산업자원부 연구과제에 지원하여 추가 연구를 진행할 계획임.
- ▶ 더불어 개발된 젓소유방염 원인균의 신속 분리 동정을 위하여, 개발된 자성복합체를 키트화하고 실제 농장에서 기존 방법과의 비교 분석을 수행함은 물론 농가 실증 실험을 할 수 있도록 농림축산검역본부 등 유관 연구과제에 지원을 통하여 후속 연구에 활용할 계획임.
- ▶ 더불어 기존 유방염 치료제로 시판되고 있는 항생제, 박테리오파지와 같은 시제품과 효능의 비교 평가 및 세균침습성 펩타이드에 대한 항체 생성 여부, 시제품의 보관 조건에 대한 추가 검증 실험은 과제 종료 후 지속적으로 검증하여, 시제품의 사업화를 달성할 것임.

제 4절 연구성과 및 활용목표

■ 연구성과목표(달성)건수

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	생산 수입 판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	0(0)							0	1(0)	
2차년도	1(1)							1(0)	0	
3차년도	2(1)	1(0)						2(0)	0(0)	
과제 종료후		2(0)								
계	3(2)	3(0)						3(0)	1(0)	

■ 연구성과활용목표(달성)건수

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수		2 (과제종료후)				

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- ▶ 해당사항 없음.

제 7 장 연구시설·장비 현황

- ▶ 해당사항 없음.

제 8 장 참고문헌

- 한국농촌경제연구원, (1997) 연구보고 R358.
- 송주호 외, (2006) 가축질병의 경제적 영향분석.
- 서울대학교 경제학부 이철희 외, (2006) 신종 인플루엔자 대유행의 사회·경제적 영향 추계 및 대응방안.
- 박영호, (2006) 한국미생물생명공학회지.
- LG생명과학/환경일보 보도자료 (2005.8.12.).
- Nekhotiaeva et al., 2004. Inhibition of *Staphylococcus aureus* gene expression and growth using antisense peptide nucleic acids. *Mol Ther.* 10(4):652-9.
- Dryselius et al., 2005. Antimicrobial synergy between mRNA- and protein-level inhibitors. *J Antimicrob Chemother.* 56(1):97-103. 이창복, (2007) Peptide Nucleic Acid를 활용한 antigene 치료현황. *BioWave* 9(12).
- Forsyth RA et. al., (2002) A genome-wide strategy for the identification of essential genes in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 43:1387-1400.
- Park SE et al., (2007) Expression profiles and pathway analysis in HEK 293 T cells overexpressing HIV-1 Tat and nucleocapsid using cDNA microarray. *J Microbiol Biotechnol.* 16:623-632
- Chaudhuri RR et al., (2009) Comprehensive identification of essential *Staphylococcus aureus* genes using Transposon-Mediated Differential Hybridisation (TMDH). *BMC Genomics.* 10:291
- Proc. Third International conference on Bioinformatics, Biocomputational System and Biotechnologies, BIOTCHNO (2011), pp. 91-99, IARIA XPS Press, ISBN: 978-1-61208-007-9.
- Duffield M et al. (2010) Predicting conserved essential genes in bacteria: in silico identification of putative drug targets. *Mol Biosyst.* 6(12):2482-9.
- Dryselius R et al., (2003) The translation start codon region is sensitive to antisense PNA inhibition in *Escherichia coli*. *Oligonucleotides.* 13(6):427-433.
- Prasad LB and Newbould FH. (1968) Inoculation of the bovine teat duct with *Staph. Aureus*: the relationship of teat duct length, milk yield and milking rate to development of intramammary infection.. *Can Vet J.* 9:107-115.
- Hiramatsu K et al., (1992) Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *FEBS Lett.* 298(2-3):133-6.
- Kuroda M et al., (2001) Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 357:1225-40.
- Kondo N et al., (2001) Eagle-type methicillin resistance: new phenotype of high methicillin resistance under *mec* regulator gene control. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(3):815 - 824.
- Kwon NH et al., (2005) *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) characterization

- and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCCmec subtype IVg isolated from bovine milk in Korea.. *J Antimicrob Chemother.* 56:624 - 632.
- Wang G, Xu XS. 2004. Peptide nucleic acid (PNA) binding-mediated gene regulation. *Cell Res* 14:111-116.
- Lundin KE, Good L, Stromberg R, Graslund A, Smith CI. 2006. Biological activity and biotechnological aspects of peptide nucleic acid. *Adv Genet* 56:1-51.
- Ray A, Norden B. 2000. Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *Faseb J* 14:1041-1060.
- Eriksson M, Nielsen PE, Good L. 2002. Cell permeabilization and uptake of antisense peptide-peptide nucleic acid (PNA) into *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 277:7144-7147.
- Rajarao GK, Nekhotiaeva N, Good L. 2002. Peptide-mediated delivery of green fluorescent protein into yeasts and bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 215:267-272.
- Tan XX, Actor JK, Chen Y. 2005. Peptide nucleic acid antisense oligomer as a therapeutic strategy against bacterial infection: proof of principle using mouse intraperitoneal infection. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3203-3207.
- Good L, Awasthi SK, Dryselius R, Larsson O, Nielsen PE. 2001. Bactericidal antisense effects of peptide-PNA conjugates. *Nature biotechnology* 19:360-364.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.