발간등록번호
11-1543000-001385-01

조류 폐사체·분변내 조류 인플루엔자 바이러스 대량 스크리닝이 가능한 자성 비드 활용 신속·간편 검사법 및 매뉴얼 개발

Development of rapid/convenient method and test manual for avian influenza virus mass-screening with the avian postmortem ans stool samples

주관연구기관 / 경상대학교 산학협력단

농 림 축 산 식 품 부

2. 제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “조류 폐사체·분변 내 조류 인플루엔자 바이러스 대량 스크리닝이 가능한 자성 비드 활용 신속·간편 검사법 및 매뉴얼 개발”(개발기간 : 2014. 06. ~ 2016. 06.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 08. 08.

주관연구기관명 :	경상대학교 산학협력단	(대표자)	(인)
협동연구기관명 :	한국세라믹기술원	(대표자)	(인)
협동연구기관명 :	㈜ 중겸	(대표자)	(인)

주관연구책임자 : 김상현
협동연구책임자 : 장정호
협동연구책임자 : 임명운

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

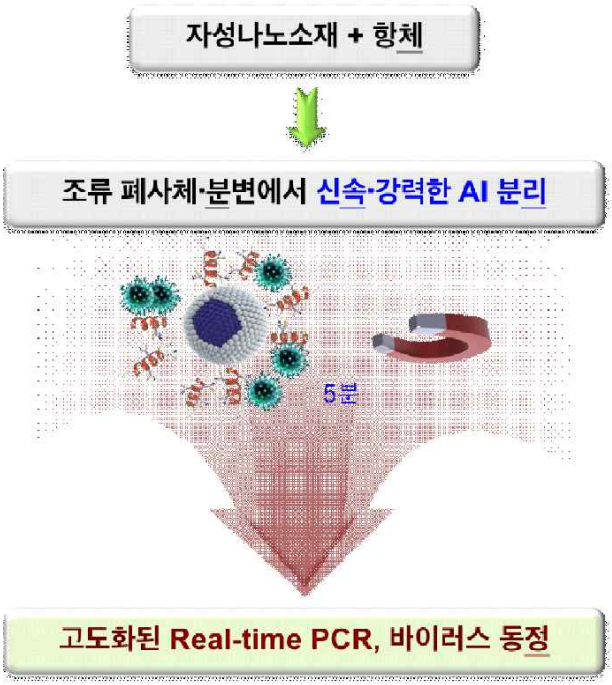
3. 보고서 요약서

보고서 요약서

<table>
<tr><td>과제고유번호</td><td>314002-2</td><td>해 당 단 계
연 구 기 간</td><td>2014. 06. ~
2016. 06.</td><td>단 계 구 분</td><td>2차년도/2차년도</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 사 업 명</td><td>중 사 업 명</td><td colspan="4"></td></tr>
<tr><td>세부 사업명</td><td colspan="4">2014년도 농생명산업기술개발사업(AI대응기술개발과제)
- 가축질병대응기술개발사업</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 과 제 명</td><td>대 과 제 명</td><td colspan="4"></td></tr>
<tr><td>세부 과제명</td><td colspan="4">조류 폐사체·분변 내 조류 인플루엔자 바이러스 대량 스크리닝이 가능한 자성 비드 활용 신속·간편 검사법 및 매뉴얼 개발</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 책 임 자</td><td rowspan="2">김상현</td><td>해당단계
참 여
연구원 수</td><td>총: 13명
내부: 2명
외부: 11명</td><td>해당단계
연 구 개 발 비</td><td>정부: 250,000천원
민간: 84,000천원
계: 334,000천원</td></tr>
<tr><td>총 연구기간
참 여
연구원 수</td><td>총: 13명
내부: 2명
외부: 11명</td><td>총 연구개발비</td><td>정부: 500,000천원
민간: 168,000천원
계: 668,000천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소 속 부 서 명</td><td colspan="3">경상대학교 산학협력단
한국세라믹기술원</td><td colspan="2">참여기업명
㈜ 중겸</td></tr>
<tr><td>위 탁 연 구</td><td colspan="3">연구기관명: 해당사항 없음</td><td colspan="2">연구책임자: 해당사항 없음</td></tr>
<tr><td colspan="4">조류인플루엔자 바이러스 검사시간을 단축하고, 대량의 시료를 빠르고 정밀하게 검사할 수 있는 검사방법을 개발하기 위하여 본 연구에서는 다중실시간 중합효소 연쇄반응 기법과 자성 나노입자 기반의 시료 전처리 기술을 바탕으로 AI 진단용 시제품을 개발하여 현장적용할 수 있는 검사방법 개발 및 비교평가를 시행함
- AI에 특이적인 단클론 항체를 자성비드에 접합시켜 바이러스가 포함된 분변 샘플을 전처리하는 과정에서 신속/간편하게 바이러스 파티클을 면역흡착하여 분리하는 방식으로 검사 소요 시간을 단축시키면서 real-time RT-PCR기법으로 항원을 정확하게 검사하는 방법을 확립함</td><td colspan="2">보고서 면수: 총 70쪽</td></tr>
</table>

4. 국문 요약문

		D-01
연구의 목적 및 내용	○ 연구의 목적 - 조류인플루엔자 바이러스 특이항체 및 자성나노입자 기반 진단키트 시제품 개발 ○ 연구의 필요성 - 기존의 종란접종법은 검사시간이 72시간 소요되며 종란의 수급문제, 고도의 숙련 인력 필요 등으로 신속한 검사에 한계가 있고, 현행 PCR 기법은 기존 종란 접종법 대비 민감도, 특이도가 80% 수준임으로 효율을 높일 필요가 있음 - 검역검사, 발생 농장의 진단, 오염 수송수단, 사람, 도축검사 등 모든 단계에서 생가축 뿐 아니라 오염된 분뇨, 사료, 공기 등 폭넓은 검사 재료에 대한 검사가 가능하여 항원 진단법을 획기적으로 효율화를 통해 비전문가에 의해서도 손쉽게 진단 프로세스가 진행될 수 있도록 하여 상시적인 감시체계 구축필요 ○ 연구의 내용 - AI 특이 재조합 항원제작 - AI 특이 단클론 항체개발 - 표준메뉴얼에 기반한 진단키트 시제품 개발 - 시제품의 반복평가를 통한 신뢰도 확보 - 진단키트 상용화를 위한 제반 조건 조사 및 구체적인 사업화 계획 수립	
연구개발성과	○ 조류 인플루엔자 진단을 위한 철새유래 표준시료 확보 ○ 표준 Realtime RT-PCR기법 확립 ○ 신속 핵산분리법 확립 ○ 최적 핵산 분리 및 Realtime RT-PCR적용법 확립 ○ 조류 인플루엔자 바이러스 대응 자성소재 개발 (TEM) ○ 자성소재 특이항체 융합 (FT-IR, TGA) ○ 조류 인플루엔자 바이러스 대응 자성소재 SCALE UP (TEM/SEM) ○ 자성소재 표면개질을 통한 결합성 최적화 ○ 자성소재 특징 및 안정성 평가 (FT-IR) ○ 조류인플루엔자 특이 항원/항체 개발 및 실제 바이러스와의 결합성 평가 ○ 표준매뉴얼에 기반한 진단키트 시제품 개발 ○ 시제품의 반복평가를 통한 신뢰도 확보 ○ 진단키트 상용화를 위한 시제품 제작	

연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	 - “철새의 유입 단계별 대응기술” 중 국내유입시 신속한 진단예방 시스템 구축 * 철새 유입 단계별 대응기술: ① 사전 인지·감시 분야(철새 국내 유입 전) → 진단·예방(국내유입 시) → 방역(발생 시) → 사후관리 → 인체감염 차단(백신) - 조류의 분변과 사체 등 검체에서 강력하고 신속한 AI 바이러스 농축/분리/동정이 가능토록 하여, 진단의 민감도와 특이도의 획기적 개선 (자기력을 이용한 5분 내 바이러스 추출 → 유전자 이용 real-time PCR, 바이러스 종란 감염) : real-time PCR법의 고도화는 물론 종란접종법 등의 병행 진단시에도 적극 적용될 수 있음 - 검역검사, 발생 농장의 진단, 오염 수송수단, 사람, 도축검사 등 모든 단계에서 생가축 뿐 아니라 오염된 분뇨, 사료, 공기 등 폭넓은 검사재료에 대한 검사가 가능하여 항원 진단법을 획기적으로 효율화함. - 검사시료 채취에서 검사결과를 얻는 데 소요되는 시간을 효과적으로 단축시켜 방역의 효율성을 높힘. - 오염된 분뇨나 사료 등 비특이 반응을 유도할 수 있는 유기물이 포함된 조건에서 바이러스만을 효과적으로 capture하여 항원진단의 효율성을 높힘. - 국내외에서 다발하는 다양한 혈청형의 조류인플루엔자에 대해 고호환적으로 적용될 수 있는 진단 키트 개발 : 구제역 등 여타 병원체에 대해서도 적용될 수 있는 원천기술 구축

	기개발된 항체들이 모두 적용될 수 있음! → 그간 개발된 많은 연구성과물들과 강력한 시너지 효과 창출 → 다방면의 적용성 확보를 통한 높은 사업성 (다양한 감염성 질병 진단에 공통활용, 시장 극대화) 기반 마련 - 비전문가에 의해서도 손쉽게 진단 프로세스가 진행될 수 있도록 하여 상시적인 감시체계 구축에 기여				
중심어 (5개 이내)	조류인플루엔자	대량 스크리닝 기법	신속·간편 검사법	매뉴얼	자성비드

5. 영문 요약문

〈 SUMMARY 〉

		D-02

Purpose& Contents	- To develop a rapid/convenient method for the mass-screening of the avian influenza viruses from the avian postmortem and stool samples by using magnetic beads coupled with antibodies to AI viruses - To develop a standard test manual for avian influenza detection by using magnetic-purified real-time RT-PCR ● Main contents of the research are summarized as follows: * Development of monoclonal antibodies against the recombinant HA antigens * Development of magnetic beads coupled with mAb to capture AI viruses from the test samples during the pre-processing procedure * Development of prototype kit based on the standard detection manual
Results	- Procurement of influenza virus test samples: over 2000 samples were secured from stools of migratory birds and nasal swabs of mammals - Comparative evaluations of AI virus detection methods between the conventional egg-based test and magnetic bead-purified real-time RT-PCR test - Establishment of a new AI virus detection method by using mAb-coupled magnetic bead-purified real-time RT-PCR test procedure - Development of optimized magnetic beads coupled to monoclonal antibodies against the recombinant HA antigens to capture AI viruses from the samples in the pre-processing stage - Development of prototype kit based on the standard detection manual by using magnetic bead-purified real-time RT-PCR test
Expected Contribution	- Contribution to rapid/convenient detection of the avian influenza viruses from the avian postmortem and stool samples by using magnetic beads coupled with antibodies to AI viruses - Saving pre-treatment times required for pre-processing of samples prior to RT-PCR test, which enables to detect AI viruses effectively in the heavily contaminated conditions - Contribution to rapid/convenient detection of other animal viruses like FMDV by application of the magnetic bead-based virus capturing concept

Key words	avian influenza	mass screening method	rapid·easy test method	standard manual	magenetic bead

6. 영문목차

〈 Contents 〉

1. Summary of the R&D project ····· 12
2. Current status of intra-/inter-national R&D for the project ····· 12
3. Contents and the results of the research project ····· 13
4. Level of achieving the goals and contributions to the subject · 51
5. Applications of the results of this research ····· 54
6. Information of oversea's science-tech. ····· 56
7. Security classification for the research achievements ····· 57
8. Research facility and equipments enrolled in NTIS ····· 58
9. Safety measures implemented for performing the project ····· 59
10. Representative achievements for the project ····· 60
11. Miscellaneous things to consider ····· 61
12. References ····· 62

7. 본문목차

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의개요 ····· 12
2. 국내외 기술개발 현황 ····· 12
3. 연구수행 내용 및 결과 ····· 13
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 51
5. 연구결과의 활용계획 등 ····· 54
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 ····· 56
7. 연구개발성과의 보안등급 ····· 57
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비현황 ····· 58
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 ····· 59
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 ····· 60
11. 기타사항 ····· 61
12. 참고문헌 ····· 62

<별첨> 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

	D-03

1-1. 연구개발 목적

○ 조류인플루엔자 바이러스 특이항체 및 자성나노입자 기반 진단키트 시제품 개발

1-2. 연구개발의 필요성

○ 기존의 종란접종법은 검사시간이 72시간 소요되며 종란의 수급문제, 고도의 숙련 인력 필요 등으로 신속한 검사에 한계가 있고, 현행 PCR 기법은 기존 종란 접종법 대비 민감도, 특이도가 80% 수준임으로 효율을 높일 필요가 있음

○ 검역검사, 발생 농장의 진단, 오염 수송수단, 사람, 도축검사 등 모든 단계에서 생가축 뿐 아니라 오염된 분뇨, 사료, 공기 등 폭넓은 검사 재료에 대한 검사가 가능하여 항원 진단법을 획기적으로 효율화를 통해 비전문가에 의해서도 손쉽게 진단 프로세스가 진행될 수 있도록 하여 상시적인 감시체계 구축필요

1-3. 연구개발 범위

○ AI 특이 재조합 항원제작
○ AI 특이 단클론 항체개발
○ 표준메뉴얼에 기반한 진단키트 시제품 개발
○ 시제품의 반복평가를 통한 신뢰도 확보
○ 진단키트 상용화를 위한 제반 조건 조사 및 구체적인 사업화 계획 수립

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04

○ 국내 기술개발 현황
- 국내의 경우 자성나노소재를 항체와 결합함으로써 이용되는 제품은 전량 수입에 의존하고 있으며, 일부 기술 개발된 예가 있으나 상용화된 경우는 전무한 실정임
- 수입품의 경우 지나치게 고가인 관계로 실험실적 수준에서만 활용 및 평가되고 있는 실정임

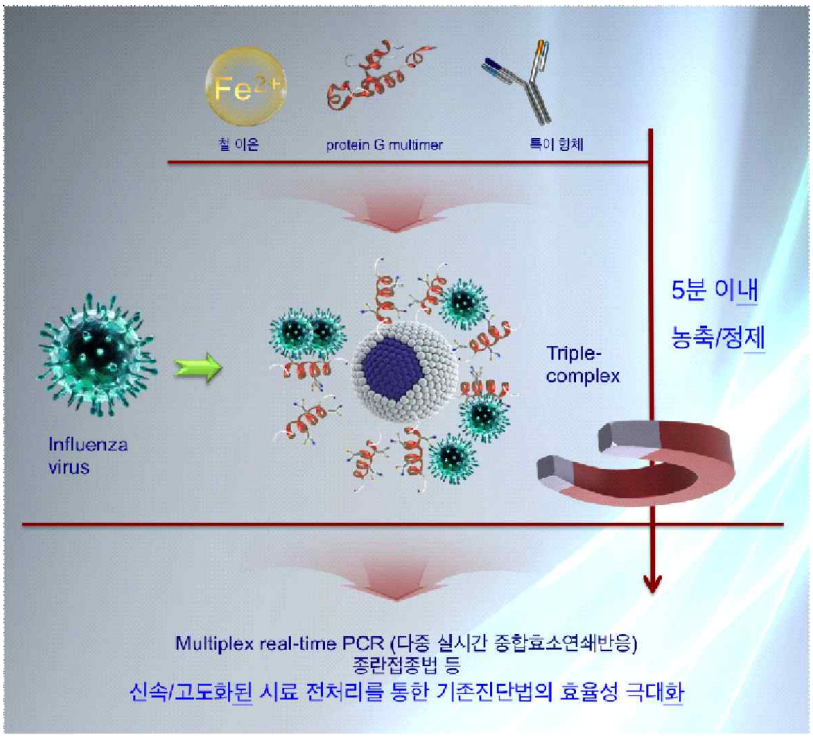
○ 국외 기술개발 현황
- 국외의 경우 자성비드 기반 항체 복합체 제품이 상용화되어 있으나, 본 과제와 같이 multi-protein G 등에 기반한 다종성 혹은 다량의 항체 복합체 형성 기술에 기반한 기술 내지 상품은 아직 개발된 바 없음
- 또한 조류 인플루엔자 바이러스 전용 항체와의 복합체 기술에 기반한 제품 또한 상용화된 바 없음

3. 연구수행 내용 및 결과

3-1. 연구수행 내용

1. AI 바이러스 특이 항원 개발
 - 베큘로바이러스 재조합 단백질 발현시스템 활용
2. AI 바이러스 특이 항체 개발 및 실제 바이러스와의 결합성 평가
 - 4차이상 항원이 투여된 마우스의 비장세포와 마우스 암세포를 융합(PEG 활용)하여 하이브리도마 세포주 확립 및 평가
3. 표준 매뉴얼에 기반한 진단키트 시제품 개발
 가. 진단키트의 포장 등 사용의 편리성 반영한 시제품 완성
  - 나노자성비드 및 항체 등 시제품 구성품들의 용량과 농도 설정, 구성품의 용기 개발 등
 나. 시제품에 표준 매뉴얼의 반영 효율화를 위한 방법 강구
  - 동영상 혹은 간편 설명서 등 현장에서 손쉽게 활용할 수 있는 방법 모색 및 반영
4. 시제품의 반복평가를 통한 신뢰도 확보
 - 시제품을 표준 매뉴얼에 따라 다양한 연구자에 의한 반복평가 시행
5. 진단키트 상용화를 위한 제반 조건 조사 및 구체적인 사업화 계획 수립
 가. 최근의 국내 조류인플루엔자 진단현황 및 시장 현황 조사
 나. 효과적인 사업화를 위한 전략 구축
 다. 진단제 종류별 장단점 분석 및 기존 진단용 제품들과의 경쟁력 등 기술적/경제적 분석

*총괄 개념



3-2. 연구방법 및 결과

1. 병원체 진단 표준물질 설정을 위한 조류 및 포유류 인플루엔자 바이러스 가검물 채취

○ 조류인플루엔자 다중실시간 중합효소 연쇄반응 기법에 적용할 표준물질을 확보하기 위해 2014년도 늦가을부터 겨울까지 국내 유입되는 철새의 가검물을 채집하기 위해 대표적 철새도래지인 천수만, 주남저수지 등 총 6개 지역을 순회하여 1861 점의 철새 가검물(분변)을 채집하였음.

그림 1. 조류 인플루엔자 바이러스 분리를 위한 철새 도래지에서의 가검물 채취

○ 조류 뿐 만 아니라 국내 유기견 센터에서 개 인플루엔자 바이러스 분리를 위한 비말 검체를 210점 확보하였음.

그림2. 유기견센터에서의 개 인플루엔자 분리를 위한 비말검체 채취

○ 가검물내 존재하는 바이러스의 활성 유지 및 오염을 방지하기 위해 가검물 채취 시 필요한 수송배지를 제작하여 분변을 확보함. 수송배지는 50% 의 phosphate buffered saline (PBS) 과 50%의 Glycerol의 조성으로 다음과 같이 penicillin G (2×10^6 U/L), polymyxin B (2×10^6 U/L), gentamicin (250 mg/L), nystatin (0.5×10^6 U/L), ofloxacin HCl (60 mg/L), and sulphamethoxazole (0.2 g/L) 성분을 포함시켜 제조하였음.

○ 확보된 철새 가검물 1861점을 비롯해 유기견센터 개 비말검체 210점을 (총 2071점) 기존 방식인 종란에 접종하여 바이러스 존재 유무를 평가 함. 종란 접종시 50% 검체와 50%의 PBS+100X Antibiotic & Antimycotic가 포함된 총 100ul를 종란의 요막액에 접종한 후 37℃에서 72시간동안 배양한다. 배양 후 요막액 50ul와 0.5% chicken RBC 50ul을 서로 반응시켜 Hemagglutination 여부를 측정하여 양성 혹은 음성을 확인함.

그림 3. 검체의 종란 접종 및 배양 후 Hemagglutination assay

2. 가검물의 전처리 및 표준물질 평가

○ 양성으로 확인 된 검체는 정확한 인플루엔자 아형을 확인하기 위해 요막액을 확보하여 Qiagen 사의 RNeasy Mini kit를 사용하여 RNA extraction을 실시함.

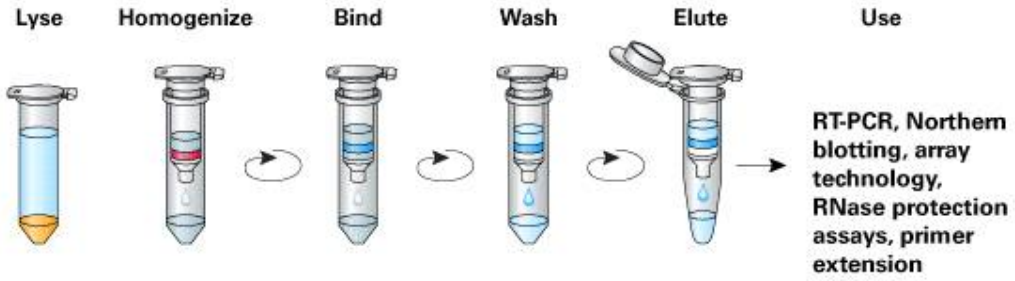


그림 4. 배양된 바이러스의 RNA분리 모식도

○ 분리된 RNA를 universal primer를 이용하여 one-step RT-PCR을 수행함. One-step RT PCR 조건으로서는, reverse transcription (50 °C for 30 min), Standard PCR (95 °C for 15 min, at 94 °C for 30s, at 56 °C for 30 s, and at 70 °C for 2min for 35 cycles), final elongation step at 72 °C for 7min 이며, RT-PCR을 거치고 증폭된 PCR산물은 electrophoresis로 확인 후 gel extraction하여 sequencing에 이용하여 정확한 분리 주 아형을 판별함.

Gene	Forward primer	Reverse primer	Expected size [bp]
PB2	Ba-PB2-1: TATTGGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTC	Ba-PB2-2341R: ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTCGTTT	2341 + 29
PB1	Bm-PB1-1: TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGCA	Bm-PB1-2341R: ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGCATTT	2341 + 29
PA	Bm-PA-1: TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTAC	Bm-PA-2233R: ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTACTT	2233 + 29
HA	Bm-HA-1: TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG	Bm-NS-890R: ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT	1778 + 29
NP	Bm-NP-1: TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTA	Bm-NP-1565R: ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTATTTTT	1565 + 29
NA	Ba-NA-1: TATTGGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGAGT	Ba-NA-1413R: ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT	1413 + 29
M	Bm-M-1: TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGTAG	Bm-M-1027R: ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT	1027 + 29
NS	Bm-NS-1: TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTG	Bm-NS-890R: ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT	890 + 29

그림 5. A형 인플루엔자 바이러스 universal primers

Cycling Step	Temperature	Time	# Cycles
Reverse transcription	50°C	30 min	1 cycle
Initial PCR	95°C	15 min	1 cycle
Denaturation	94°C	30 sec	35 cycles
Annealing	56°C	30 sec	
Extension	72°C	2 min	
Final extension	72°C	10 min	1 cycle
Hold	4°C	No limit	

표 1. One-step RT PCR 반응 조건

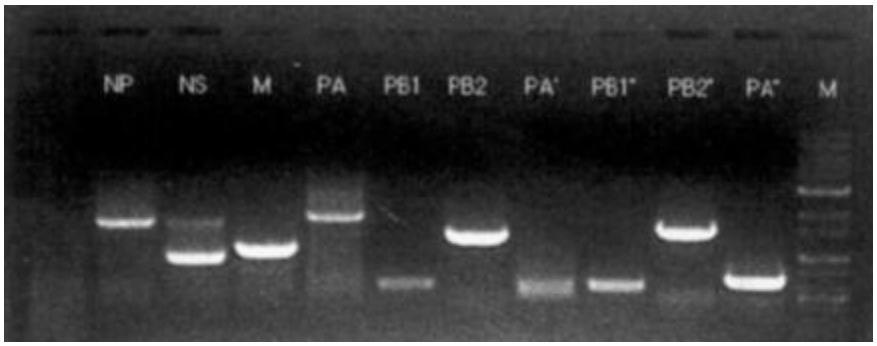


그림 6. RT-PCR수행 후 electrophoresis를 통한 PCR 산물 확인

○ Hemagglutinatin assay 및 연쇄중합반응 결과를 토대로 민감도와 특이도를 측정한 결과 종란접종법은 92%의 민감도 (sensitivity) 와 95%의 특이도 (specificity) 를 보였다.

HA \ PCR	Positive	Negative
Positive	35	90
Negative	3	1943

○ 새로운 분리주 바이러스는 다중실시간 중합효소 연쇄반응 기법에 적용할 표준물질로 이용하기 위해 기초적인 유전자 염기 서열 및 50% egg infectious dose 와 50% tissue culture infectious dose를 측정하여 표준화 하였음.

○ 기 확보된 표준 바이러스의 농도별 Realtime RT-PCR 농도 환산법 확립

	구	Cq	EID50
기구를 이용한 RNA prep.	RNA extraction : Virus 100μl – PBS 50μl 1	13.69	8.95
	RNA extraction : Virus 100μl – PBS 50μl 2	13.62	8.91
	RNA extraction : Virus 100μl – PBS 50μl 3	13.27	9.00
	RNA extraction : Virus 100μl – Bead(H5N2-1) 50μl 1	14.07	8.83
	RNA extraction : Virus 100μl – Bead(H5N2-1) 50μl 2	13.81	8.90
	RNA extraction : Virus 100μl – Bead(H5N2-1) 50μl 3	14.17	8.80
	RNA extraction : Virus 100μl – Bead(H5N2-2) 50μl 1	13.90	8.92
	RNA extraction : Virus 100μl – Bead(H5N2-2) 50μl 2	14.03	8.85
	RNA extraction : Virus 100μl – Bead(H5N2-2) 50μl 3	13.93	8.88
	RNA extraction : Virus 100μl – Bead(HA 95 +1C2) 50μl 1	14.32	8.76
	RNA extraction : Virus 100μl – Bead(HA 95 +1C2) 50μl 2	14.03	8.91
	RNA extraction : Virus 100μl – Bead(HA 95 +1C2) 50μl 3	14.06	8.84
	RNA extraction : Virus 100μl – Bead(HA RC 12F1) 50μl 1	15.14	8.51
	RNA extraction : Virus 100μl – Bead(HA 95 +2F1) 50μl 2	15.05	8.53
	RNA extraction : Virus 100μl – Bead(HA 95 +2F1) 50μl 3	14.97	8.56
	RNA extraction : Virus 100μl – Bead(HA mAb) 50μl 1	15.52	8.37
	RNA extraction : Virus 100μl – Bead(HA mAb) 50μl 2	15.27	8.47
	RNA extraction : Virus 100μl – Bead(HA mAb) 50μl 3	15.33	8.44

그림 7. 표준 바이러스 농도별 (Egg infectious dose 50/ml vs. Cq value

3. Immuno-magnetic separation방법을 활용한 진단검사법 평가

○ 단클론 항체- magnetic bead 복합체를 이용한 최적 핵산 추출 및 real time RT-PCR 적용

○ 5회의 최적화 단계를 거치면서, 기존의 바이러스 검출에 사용하는 real time RT-PCR에 비하여 핵산 추출시간은 10배 단축, 바이러스 검출 한계는 10배 이상 민감한 조건을 확립함.

가. 1차 실험

○ Method: 총 3종류의 인플루엔자 바이러스[H1N1, cH3N2, Nasal Swab (CA04 - pathology group-d3)]를 이용하여 총 3가지 방법으로 real time PCR을 진행하고 각 방법의 역가를 비교하여 Magnetic mAb를 이용한 샘플내 바이러스의 농축 분리능력을 확인하였다. H1N1과 cH3N2는 계란에서 배양하여 확보한 바이러스 샘플이며, MV-pathology group-d3의 경우 바이러스를 기니피그에 접종한 후 기니피그로부터 nasal swab을 통해 확보한 바이러스 샘플이다. 평가에 사용한 3가지 real time 방법은 다음과 같다.

○ RNA extraction Method : 바이러스 150㎕로부터 Qiagen RNA mini kit를 이용하여 50㎕의 RNA를 extraction하고 해당 RNA 중 4㎕를 template로 하여 real time PCR을 진행하였다. 사용된 키트는 bioline SensiFAST probe NO-ROD one-step real time PCR 키트이며, 해당 제품의 기본 프로토콜을 동일하게 사용하였다.

○ Magnetic mAb 이용: 바이러스 150㎕와 부유시킨 50㎕의 Magnetic mAb를 혼합한 뒤, 30분간 37℃에서 500rpm으로 shaking하며 반응시켰다. 이후 자석을 이용하여 자성비드-mAb를 고정한 후 상층액을 제거하고 다시 PBS 50㎕를 넣어 혼합한 후, 10분간 37℃에서 500rpm으로 반응시켰다. 이후 자석으로 자성비드-mAb를 고정한 후, 상층액을 제거하고 PBS 50㎕를 넣고 부유시킨 다음 4㎕을 real time PCR의 template로 사용하여 유전자 증폭을 시행하였다. 사용된 키트는vbioline SensiFAST probe NO-ROD one-step real time PCR 키트이며, real time PCR 프로토콜은 96℃에 5분간 유지하는 과정을 선행시킨 후, 이후부터 기본 프로토콜과 동일하게 진행하였다.

○ 바이러스만 이용(Virus only) : 바이러스 50㎕ 중 4㎕를 real time PCR에 사용하였다. 이때 사용한 PCR 키트는 bioline SensiFAST probe NO-ROD one-step real time PCR 키트이며, real time PCR 프로토콜은 96℃에 5분간 유지하는 과정을 선행시킨 후, 이후부터 기본 프로토콜과 동일하게 진행하였다.

○ 양성 대조군과 음성 대조군: 양성 대조군으로는 기존에 확인된 CA04 RNA sample을 이용하였으며 음성대조군의 경우 DW를 이용하였다.

Result

			RNA extraction			Magnetic mAb +Virus			Virus		
	(+)	(-)	H1N1	H3N2	nasal swab	H1N1	H3N2	nasal swab	H1N1	H3N2	nasal swab
cq	16.16	38.65	15.70	17.35	24.87	28.25	28.60	34.76	27.33	28.24	-

나. 2차 실험

○ Method: 총 3종류의 인플루엔자 바이러스[H1N1, cH3N2, Nasal Swab(CA04-pathology group-d3)]를 이용하여 총 3가지 방법으로 Real time PCR을 진행하고 각 방법의 역가를 비교하여 Magnetic mAb를 이용한 샘플내 바이러스의 농축 분리능력을 확인하였다. H1N1과 cH3N2는 계란에서 배양하여 확보한 바이러스 샘플이며, MV-pathology group-d3의 경우 바이러스를 기니피그에 접종한 후 기니피그로부터 nasal swab을 통해 확보한 바이러스 샘플이다. 평가에 사용한 3가지 real time PCR 방법은 다음과 같다.

○ 공통 전처리: 전처리로 바이러스를 모두 100배 희석하여 3가지 방법에서 각각 사용될 바이러스 양과 농도가 동일하도록 한 후 실험을 진행하였다. 100배 희석시 바이러스 100㎕와 PBS 900㎕를 합쳐 1ml을 만들고 여기에 PBS 9ml을 넣어 총 10ml의 100배 희석 바이러스액 만들었다.

○ RNA extraction Method : 100배 희석된 바이러스액으로 부터 150㎕를 Qiagen RNA mini kit를 이용하여 RNA 50㎕를 추출한 후, 추출한 RNA 중 4㎕를 template로 하여 Real time PCR을 진행하였다. 사용된 키트는 bioline SensiFAST probe NO-ROD one-step real time PCR 키트이며, 해당 제품의 기본 프로토콜을 동일하게 사용하였다.

○ Magnetic mAb 이용: 100배 희석된 virus 10ml과 1ml의 mAb를 혼합한 뒤, 10분간 Roller mixer에서 반응시켰다. 이후 자석을 이용하여 자성비드-mAb를 고정한 후 상층액은 버리고 PBS 1ml을 넣어 혼합한 한 후, 30초 간 부유시켰다. 이 후 자석으로 자성비드-mAb를 고정한 후 상층액을 제거하고 PBS 1ml을 넣고 부유시킨 후, 그 중 4㎕를 부유시킨 채로 따서 real time PCR을 진행하였다. 사용된 키트는 bioline SensiFAST probe NO-ROD one-step real time PCR 키트이며, real time PCR 프로토콜은 96℃에 5분간 유지하는 과정을 선행시킨 후, 이후부터 기본 프로토콜과 동일하게 진행하였다.

○ 바이러스만 이용(Virus only) : 100배 희석 용액으로부터 바이러스 4㎕를 real time

PCR에 사용하였다. 이때 사용한 PCR 키트는 bioline SensiFAST probe NO-ROD one-step real time PCR 키트이며, real time PCR 프로토콜은 96℃에 5분간 유지하는 과정을 선행시킨 후, 이후부터 기본 프로토콜과 동일하게 진행하였다.

○ 양성 대조군과 음성 대조군: 양성 대조군으로는 기존에 확인된 CA04 RNA sample을 이용하였으며 음성대조군의 경우 DW를 이용하였다.

○ Result

			RNA extraction			Magnetic mAb +바이러스			바이러스only		
	(+)	(-)	H1N1	H3N2	Nasal swab	H1N1	H3N2	Nasal swab	H1N1	H3N2	Nasal swab
cq	13.53	35.13	17.54	18.73	26.60	26.56	29.89	32.70	26.20	27.66	33.02

다. 3차 실험

○ Method: 총 3가지 바이러스[H1N1, cH3N2, Nasal Swab(CA04-pathology group-d3)]를 이용하여 총 4가지 방법으로 real time PCR을 진행하여 총 12가지 군의 역가를 비교하여 Magnetic bead의 인플루엔자 바이러스 농축 능력을 확인하였다. H1N1과 cH3N2는 계란에서 배양한 후 바이러스 샘플이며 CA04-pathology group-d3의 경우 바이러스를 기니피그에 접종한 후 기니피그로부터 nasal swab을 통해 확보한 바이러스 샘플이다. 4가지 방법은 다음과 같다.

○ RNA extraction Method 1: 바이러스 100㎕를 PBS 50㎕와 섞은 후, Qiagen RNA mini kit를 이용하여 RNA 50㎕를 추출하고, 추출한 RNA 중 4㎕를 template로 하여 real time PCR을 진행하였다. 사용된 키트는 bioline SensiFAST probe NO-ROD one-step real time PCR 키트이며, 해당 제품의 기본 프로토콜을 동일하게 사용하였다.

○ RNA extraction Method 2: 바이러스 100㎕를 Magnetic bead 50㎕를 혼합한 뒤, 10분간 Roller mixer에서 반응시켰다. 이후 자석을 이용하여 Magnetic bead를 고정한 후 상층액은 버리고PBS 150㎕을 넣어 혼합한 한 후, 30초 간 부유시켰다. 이 후 자석으로 Magnetic bead를 고정한 후 상층액을 제거하고 PBS 150㎕을 넣고 이것을 샘플로 하여 Qiagen RNA mini kit를 이용하여RNA 50㎕를 추출했다. 50㎕ RNA 중 4㎕를 따서 real time PCR을 진행하였다. 사용된 키트는 bioline SensiFAST probe NO-ROD one-step real time PCR 키트이며 기본 프로토콜과 동일하게 진행하였다.

○ Pre-heating 1 : 바이러스 100㎕를 PBS 50㎕와 섞은 후, 그 중 4㎕를 template로 하여 real time PCR을 진행하였다. 사용된 키트는 bioline SensiFAST probe NO-ROD one-step real time PCR 키트이며, 해당 제품의 기본 프로토콜을 시행하기 전에, 96도에서 5분간 pre-heating 하는 과정을 거쳐 RNA를 노출시킨 후, real time PCR을 진행하였다.

○ Pre-heating 2 : 바이러스 100㎕를 Magnetic bead 50㎕와 섞은 후, 10분간 Roller mixer에서 반응시켰다. 이후 자석을 이용하여 Magnetic bead를 고정한 후 상층액은 버리고 PBS 150㎕을 넣어 혼합한 한 후, 30초 간 부유시켰다. 이 후 자석으로 Magnetic bead를 고정한 후 상층액을 제거하고 PBS 150㎕을 넣고 부유시킨 후, 그 중 4㎕를 부유시킨 채로 따서 real time PCR을 진행하였다. 이때 사용한 PCR 키트는 bioline SensiFAST probe NO-ROD one-step real time PCR 키트이며, 해당 제품의 기본 프로토콜을 시행하기 전에, 96도에서 5분간 pre-heating 하는 과정을 거쳐 RNA를 노출시킨 후, Real time PCR을 진행하였다.

○ 양성 대조군과 음성 대조군: 양성 대조군으로는 기존에 확인된 CA04 RNA sample을 이용하였으며, 음성대조군의 경우 DW를 이용하였다.

○ Result

군	Cq
Positive	17.09
Negative	None
RNA extraction (H1N1 100㎕+ PBS 50㎕)	16.06
RNA extraction (H1N1 100㎕+ Magnetic bead 50㎕)	17.60
Pre-heating(H1N1 100㎕+ PBS 50㎕)	32.49
Pre-heating(H1N1 100㎕+ Magnetic bead 50㎕)	28.42
RNA extraction (cH3N2 100㎕+ PBS 50㎕)	18.61
RNA extraction (cH3N2 100㎕+ Magnetic bead 50㎕)	19.97
Pre-heating(cH3N2 100㎕+ PBS 50㎕)	33.41
Pre-heating(cH3N2 100㎕+ Magnetic bead 50㎕)	33.49
RNA extraction (nasal swab 100㎕+ PBS 50㎕)	30.03
RNA extraction (nasal swab 100㎕+ Magnetic bead 50㎕)	29.83
Pre-heating(nasal swab 100㎕+ PBS 50㎕)	36.45
Pre-heating(nasal swab 100㎕+ Magnetic bead 50㎕)	None

라. 4차 실험

○ Method: H1N1 바이러스 원액 1ml, 5배 희석 용액 1ml, 10배 희석용액 1ml을 준비한 후, 각각을 음성 조류 분변 1ml과 합친 후 4℃ 7000 rpm에서 10분간 원심분리하여 바이러스를 분변에 spiking 하였다. 이하 spiking 된 분변 각각 원액

분변, 5배 희석 분변, 10배 희석 분변이라 칭하였다. 또한 PBS 500㎕를 음성 조류 분변 500㎕와 혼합한 후 4℃ 7000 rpm에서 10분간 원심분리하여 음성 분변 대조군을 만들었다.

○ 각 분변을 이용하여 총 3가지 방법으로 전처리를 진행한 후, real time PCR을 진행하여 각 방법의 바이러스 역가를 비교하여 magnetic bead을 농축 능력을 확인하였다. 바이러스 희석 분변은 3가지 전처리 과정을 triplicate로 진행하였고 음성 분변 대조군의 경우 한번씩만 처리하여 비교하는데 사용하였다. 각 전처리 방법은 다음과 같다.

○ Pre-heating : 바이러스 분변 150㎕를 96도에서 10분간 pre-heating 하는 과정을 거쳐 RNA를 노출시킨 후, 그 중 상등액 4㎕를 template로 하여 real time PCR을 진행하였다. 사용된 키트는 bioline SensiFAST probe NO-ROD one-step real time PCR 키트이며, 해당 제품의 기본 프로토콜을 따라 PCR을 진행하였다.

○ Magnetic bead : 바이러스 분변 150㎕에 100㎕의 magnetic bead를 넣은 후 10분간 상온에서 믹싱한 후 자석을 이용하여 magnetic bead를 고정시킨 후 상등액을 제거하였다. 그 다음 150㎕의 PBS를 넣어 30초간 상온에서 magnetic bead를 부유시킨 후 자석을 이용하여 magnetic bead를 고정시킨 후 상등액을 제거하였다. 이 후 50㎕의 PBS를 넣어 magnetic bead 농축액을 만든 후 이를 96도에서 10분간 pre-heating 하는 과정을 거쳐 RNA를 노출시킨 후, 그 중 상등액 4㎕를 template로 하여 real time PCR을 진행하였다. 사용된 키트는 bioline SensiFAST probe NO-ROD one-step real time PCR 키트이며, 해당 제품의 기본 프로토콜을 따라 진행하였다.

○ RNA extraction method : 바이러스 분변 150㎕에 100㎕의 magnetic bead를 넣은 후 10분간 상온에서 믹싱한 후 자석을 이용하여 magnetic bead를 고정시킨 후 상등액을 제거하였다. 그 다음 150㎕의 PBS를 넣어 30초간 상온에서 magnetic bead를 부유시킨 후 자석을 이용하여 magnetic bead를 고정시킨 후 상등액을 제거하였다. 이 후 150㎕의 PBS를 넣어 부유한 후 Qiagen RNA mini kit를 이용하여 RNA 50㎕를 추출한 후, 추출한 RNA 중 4㎕를 template로 하여 real time PCR을 진행하였다. 사용된 키트는 bioline SensiFAST probe NO-ROD one-step real time PCR 키트이며, 해당 제품의 기본 프로토콜을 따라 진행하였다.

군	cq
Positive	13.77
Negative	36.33
원액 pre-heating 1	20.33
원액 pre-heating 2	20.46
원액 pre-heating 3	20.68
원액 magnetic bead 1	21.22
원액 magnetic bead 2	22.5
원액 magnetic bead 3	21.6
원액 RNA extraction 1	20.78
원액 RNA extraction 2	18.44
원액 RNA extraction 3	22

군	cq
5 배 희석 pre-heating 1	21.92
5 배 희석 pre-heating 2	21.48
5 배 희석 pre-heating 3	21.79
5 배 희석 magnetic bead 1	23.77
5 배 희석 magnetic bead 2	23.43
5 배 희석 magnetic bead 3	23.99
5 배 희석 RNA extraction 1	23.63
5 배 희석 RNA extraction 2	22.77
5 배 희석 RNA extraction 3	22.89

군	cq
10배 희석 pre-heating 1	22
10배 희석 pre-heating 2	22.1
10배 희석 pre-heating 3	22.27
10배 희석 magnetic bead 1	25.09
10배 희석 magnetic bead 2	24.63
10배 희석 magnetic bead 3	24.08
10배 희석 RNA extraction 1	22.12
10배 희석 RNA extraction 2	25.24
10배 희석 RNA extraction 3	22.97
음성분변군 pre-heating	36.37
음성분변군 magnetic bead	-
음성분변군 RNA extraction	33.03

○ Result

Magnetic Bead 단클론항체 결합체를 이용한 바이러스 농축 및 Real time-PCR 최적 조건 확립

	군	Cq
키트를 이용한 RNA prep.	RNA extraction : Virus 100㎕+ PBS 50㎕1	13.69
	RNA extraction : Virus 100㎕+ PBS 50㎕2	13.82
	RNA extraction : Virus 100㎕+ PBS 50㎕3	13.27
	RNA extraction : Virus 100㎕+ Bead(H9N2-1) 50㎕1	14.07
	RNA extraction : Virus 100㎕+ Bead(H9N2-1) 50㎕2	13.85
	RNA extraction : Virus 100㎕+ Bead(H9N2-1) 50㎕3	14.17
	RNA extraction : Virus 100㎕+ Bead(H9N2-2) 50㎕1	13.80
	RNA extraction : Virus 100㎕+ Bead(H9N2-2) 50㎕2	14.03
	RNA extraction : Virus 100㎕+ Bead(H9N2-2) 50㎕3	13.93
	RNA extraction : Virus 100㎕+ Bead(HA 95 11c2) 50㎕1	14.32
	RNA extraction : Virus 100㎕+ Bead(HA 95 11c2) 50㎕2	13.83
	RNA extraction : Virus 100㎕+ Bead(HA 95 11c2) 50㎕3	14.06
	RNA extraction : Virus 100㎕+ Bead(HA 95 12F1) 50㎕1	15.14
	RNA extraction : Virus 100㎕+ Bead(HA 95 12F1) 50㎕2	15.05
	RNA extraction : Virus 100㎕+ Bead(HA 95 12F1) 50㎕3	14.97
	RNA extraction : Virus 100㎕+ Bead(HA mAb) 50㎕1	15.58
	RNA extraction : Virus 100㎕+ Bead(HA mAb) 50㎕2	15.27
	RNA extraction : Virus 100㎕+ Bead(HA mAb) 50㎕3	15.35
Heating 을 이용한 RNA prep.		
	Pre-heating(96℃10분) : Virus 100㎕+ PBS50㎕1	18.19
	Pre-heating(96℃10분) : Virus 100㎕+ PBS50㎕2	18.52
	Pre-heating(96℃10분) : Virus 100㎕+ PBS50㎕3	18.36
	Pre-heating(96℃10분) : Virus 100㎕+ Bead(H9N2-1)50㎕1	13.21
	Pre-heating(96℃10분) : Virus 100㎕+ Bead(H9N2-1) 50㎕2	13.79
	Pre-heating(96℃10분) : Virus 100㎕+ Bead(H9N2-1) 50㎕3	13.64
	Pre-heating(96℃10분) : Virus 100㎕+ Bead(H9N2-2) 50㎕1	14.49
	Pre-heating(96℃10분) : Virus 100㎕+ Bead(H9N2-2) 50㎕2	14.24
	Pre-heating(96℃10분) : Virus 100㎕+ Bead(H9N2-2) 50㎕3	13.77
	Pre-heating(96℃10분): Virus 100㎕+ Bead(HA 95 11c2) 50㎕1	13.49
	Pre-heating(96℃10분): Virus 100㎕+ Bead(HA 95 11c2) 50㎕2	13.95
	Pre-heating(96℃10분): Virus 100㎕+ Bead(HA 95 11c2) 50㎕3	13.78
	Pre-heating(96℃10분) : Virus 100㎕+ Bead(HA 95 12F1) 50㎕1	17.10
	Pre-heating(96℃10분) : Virus 100㎕+ Bead(HA 95 12F1) 50㎕2	15.03
	Pre-heating(96℃10분) : Virus 100㎕+ Bead(HA 95 12F1) 50㎕3	14.96
	Pre-heating(96℃10분): Virus 100㎕+ Bead(HA mAb) 50㎕1	17.59
	Pre-heating(96℃10분): Virus 100㎕+ Bead(HA mAb) 50㎕2	16.84
	Pre-heating(96℃10분): Virus 100㎕+ Bead(HA mAb) 50㎕3	15.85
	Positive	13.83
	Negative	None

: 95도 5분간 처리하여, 바이러스 샘플에서 RNA를 추출하고, Real time RT-PCR을 수행한 결과, 기존의 추출법과 비교할 때, 10배 이상의 농축 (32배)되는 효과를 확인함.

4. 자성비드 개발/제작

가. 이론적/실험적 접근방법

(1) 이론적 접근방법

○ 기본적으로 자성 세라믹 소재 제조를 위한 방법은 core-shell형 자성소재의 합성은 용액 합성, 공동 침전법, 졸-겔법, 열분해법 및 마이크로에멀션 등의 방법을 이용하여 나노에서 마이크로미터 크기로 소재를 제조할 수 있으며 본 과제에서는 이 중에서도 가장 합성이 수월한 공동 침전법을 이용함.

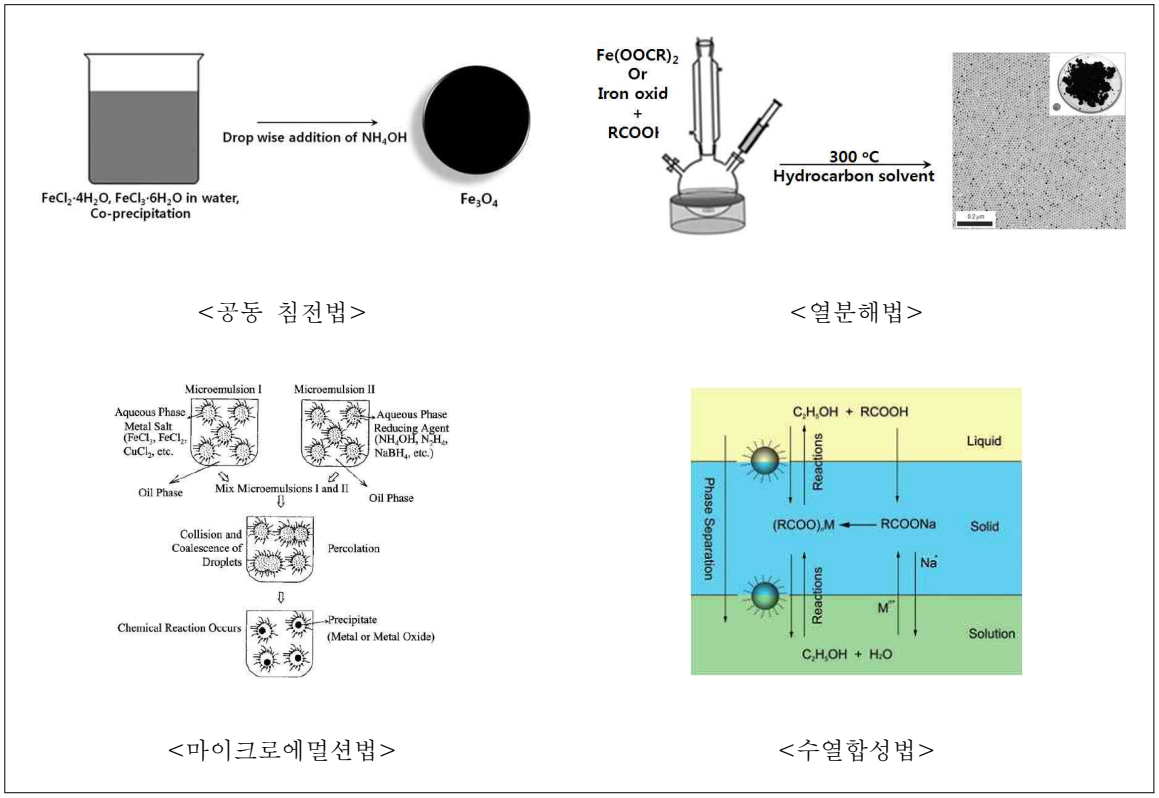


그림 8. 자성 세라믹 소재 제조 방법

(2) 실험적 접근방법

- ○ 자기적으로 감응하는 core와 기능기 shell로 이루어진 자성나노입자 및 비표면적이 큰 다공성 자성소재는 기능성 실란 가교제(silane coupling agent)를 이용한 입자의 표면 개질이 용이하며, 화학적 안정성이 우수해지기 때문에 최근 많은 관심을 받고 있음.
- ○ 특히, 이러한 자성나노입자는 저비용으로 합성이 가능하고, 물질의 분리와 재사용, 효율성, 단순성 등의 장점을 가지고 있음.
- ○ 하지만 본 소재의 경우 오랜 기간이 지나면 표면 에너지가 줄어들면서 서로 aggregation 되기도 하며, 공기 중에서 쉽게 산화 되어 자성을 잃거나 분산성을 잃게 되는 문제점이 발생함.
- ○ 이러한 현상은 자성나노입자를 polymer, silica, carbon 등으로 코팅을 하게 되면 막을 수 있고 이러한 코팅을 하게 됨으로써 촉매나 생체의약품에 응용 할 수 있음.
- ○ 또한, 소재의 안정화 및 최적 합성 비율, 특성 분석을 통해 기존 고가의 자성나노소재를 대체할 수 있음.

(3) 결과

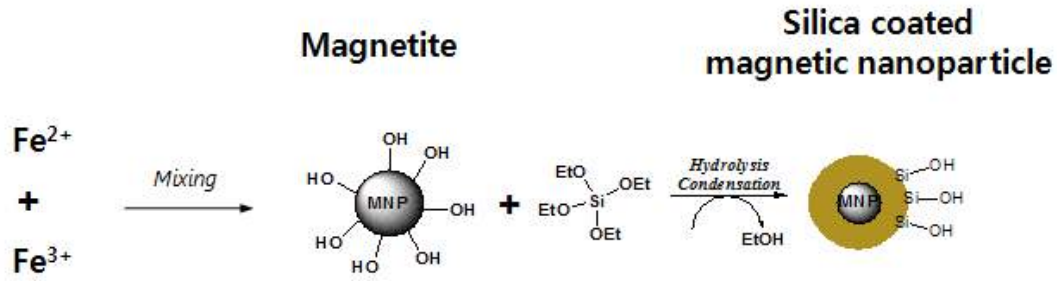
(가) AI 바이러스 진단을 위한 자성소재의 제조 및 수율향상

① 자성소재는 크게 구형 자성소재와 다공성 세라믹 소재를 템플릿으로 제조된 비표면적이 큰 다공성 자성소재로 나누어 소재를 제조하고 수율향상을 위한 실험을

진행함.

② 각 소재의 제조 방법을 도식화함.

(구형 자성소재)



(다공성 자성소재)

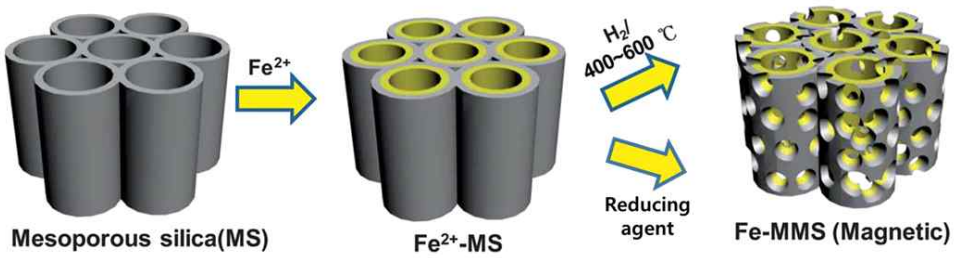


그림 9. 구형/다공성 자성소재 제조공정

③ 구형 자성소재

- ○ 구형의 자성소재를 합성하기 위해 먼저 자화력을 가진 마그네타이트를 습식 공침법을 이용하여 합성함.(2M $FeCl_2$과 1M $FeCl_3$ 용액으로 마그네타이트 제조)
- ○ 합성한 Fe_3O_4 자성나노입자의 표면에 실리카 코팅을 위해 Oleic acid, Igepal CO-520, Cyclohexane, NH_4OH 및 TEOS(tetraethyl orthosilicate)를 첨가하여 구형의 실리카 코팅 자성소재를 수득함.

④ 다공성 자성소재

- ○ 다공성 세라믹 소재를 템플릿으로 한 다공성 자성소재의 제조공정은 크게 두 가지로 나누어 실험을 진행함(고온수소법, 화학적환원법)

⑤ 고온 수소법

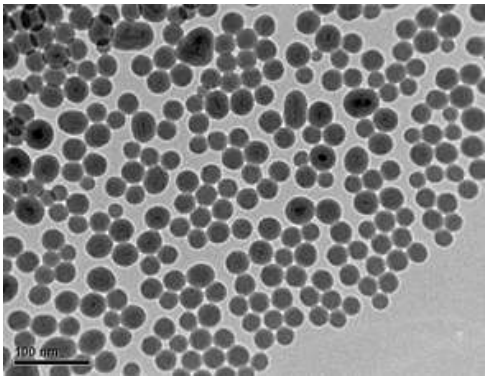
: 균일한 기공을 가진 다공성 실리카 소재를 고농도의 철 이온 전구체 수용액에 담지/흡착 과정을 거친 후 수소분위기 하에서 환원온도(400 ~ 800 °C)를 변화하여 환원을 진행함.

⑥ 화학적 환원법

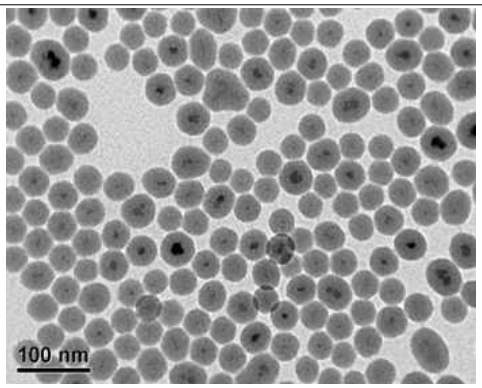
: 환원온도를 고온으로 제어하지 않고 화학적 환원제를 활용하여 다수 개의 기공이 형성된 다공성 자성 소재를 제조함.

○ 각 소재의 수율 향상을 위한 소재별 Scale up을 진행함.

○ 구형 자성소재의 경우 분산제로 사용된 Oleic acid, Igepal CO-520, Cyclohexane의 농도를 조절하여 동일한 실험을 진행한 결과 마그네타이트를 코어로 한 구형의 자성나노입자가 만들어 지고 생산 수율이 약 5배 이상 좋아지는 것을 확인함.



<합성 비율 A(1:1:1)>



<합성 비율 B (1.815:0.11:0.22)>

그림 10. 분산제 합성 비율에 따른 구형 자성소재 이미지(SEM)

샘플번호	합성비율	
	A (g)	B (g)
1	0.76	5.39
2	1.11	5.72
3	0.91	5.90
4	0.79	5.10
5	0.87	5.50
6	0.99	5.60
7	1.20	5.42
8	1.40	4.90
9	1.23	5.13
10	1.30	5.26
Ave.	1.055	5.392

표 2. 구형 자성소재의 분산제 합성비율에 따른 소재 수득량

○ 다공성 자성소재의 수율향상을 위한 공정으로 고온수소법을 화학적 환원법으로 변경 후 실험을 진행함.

○ 고온수소법의 경우 수소가스와 고온의 전기로를 이용하여 환원과정을 거치는 과정 중 발생하는 생산 비용 증가 및 위험성, 그리고 최적의 소재 제조를 위한 소량 생산과 같은 문제점이 있음.

○ 문제점 해결을 위해 화학적 환원법을 적용함으로서 고온 반응 과정의 불필요, 실험 과정 중 지속적으로 반응을 제어할 수 있기 때문에 소재의 생산 스케일 향상된다는 장점이 있음.

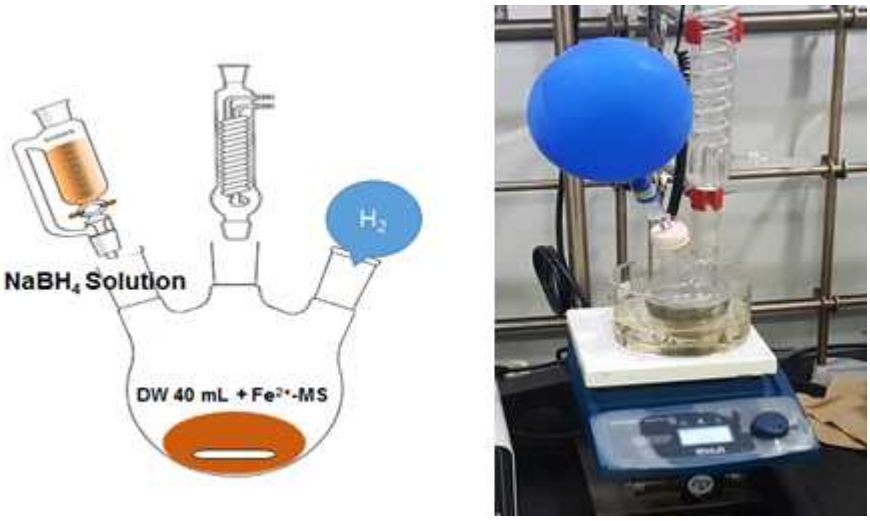


그림 11. 환원제를 이용한 다공성 자성소재 제조

○ 화학적 환원법 제조 조건 변수는 크게 Fe 이온 전구체의 농도와 온도로 제어함.

○ 전구체의 농도는 환원제 투입 전과 0.5 M부터 2M 까지 실험 하였으며 흡탈착 곡선 분석 결과 메조사이즈의 기공을 가지고 있는 것은 알 수 있었으나 자석을 이용한 자력 특성을 평가한 결과 자화력이 거의 없다는 것을 확인함.

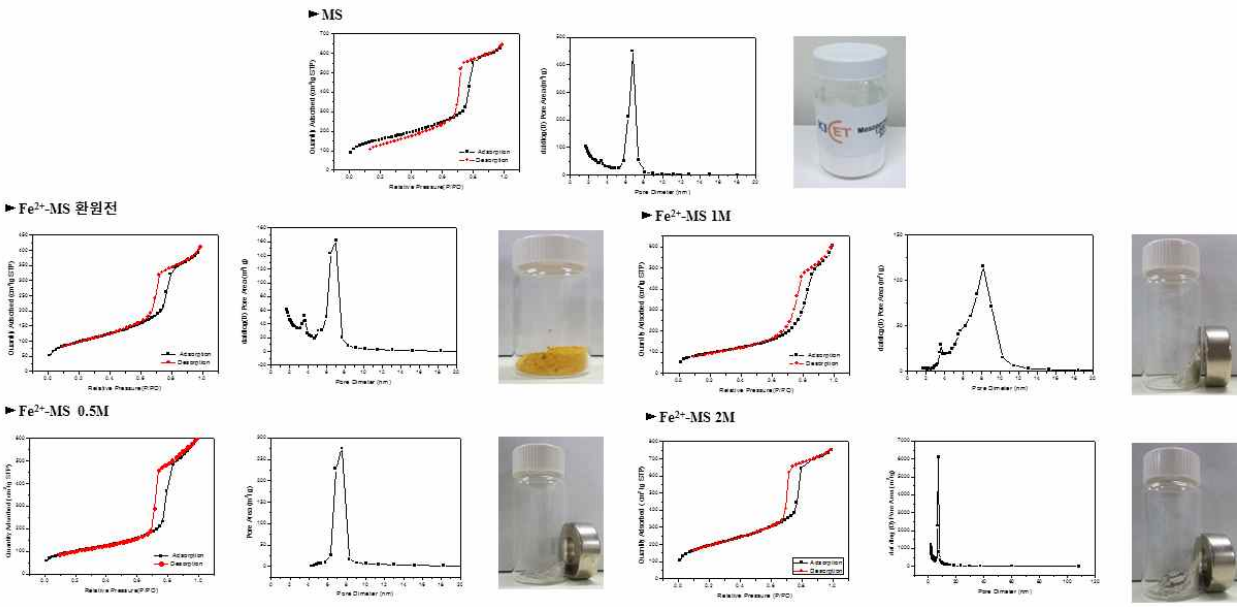


그림 12. Fe 이온 전구체의 농도에 따른 소재 특성 평가(BET, 자력 측정(자석)

○ 환원제 투입 후 반응 온도는 상온(25°C), 50°C, 75°C로 나누어 실험하였으며 농도는 0.5M의 Fe 이온 전구체를 사용함.

○ 흡탈착 곡선의 분석 결과 25°C일 때의 메조기공을 띄고 있는 소재가 온도가 승온됨으로써 기공의 모양이 변화하는 것을 확인 할 수 있으며 자력을 띄는 것을 확인 할 수 있음.

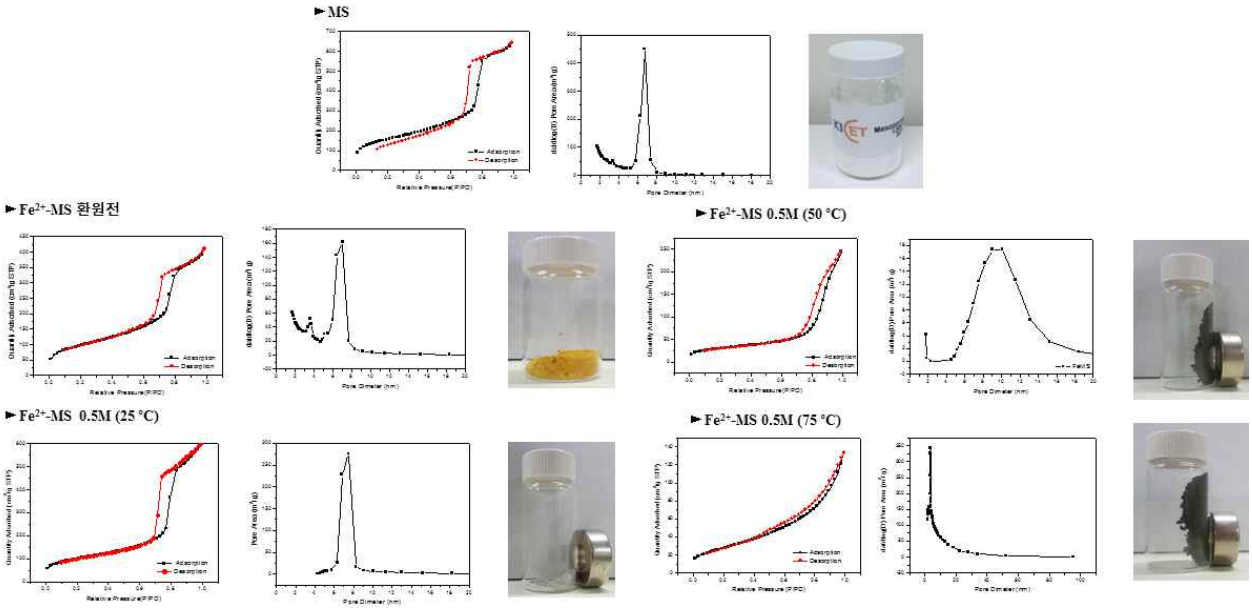


그림 13. 0.5M 환원제의 반응 온도에 따른 소재 특성 평가(BET, 자력 측정(자석)

○ 소재의 자화력을 확인하기 위한 VSM을 측정함.

○ 자화력 측정 결과 기존의 고온수소법에 비해 약 10 emu/g 높은 자화력 값을 갖는 자력 특성이 좋은 자성 다공성 소재가 제조된 것을 확인할 수 있음.

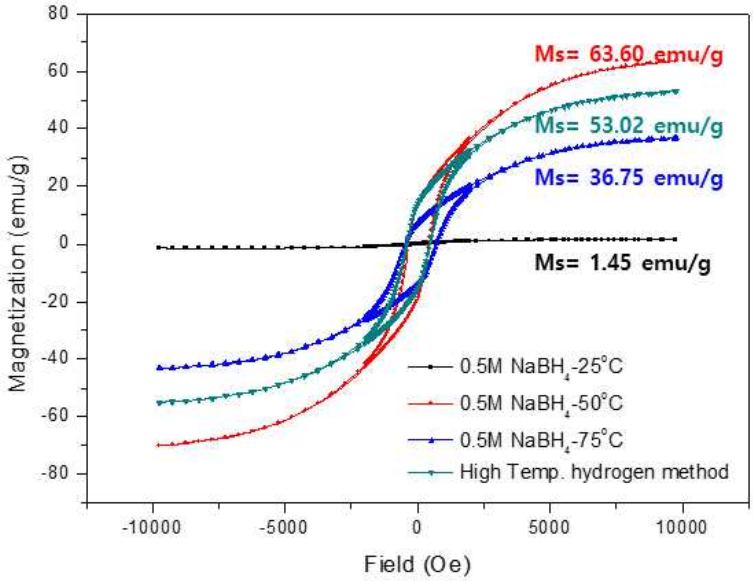


그림 14. 0.5M 환원제의 반응 온도에 따른 소재 특성 평가(자화력 측정(VSM)

5. 구형/다공성 자성소재를 이용한 특이항체의 융합효율 극대화

○ 결합 항체와의 안정화 및 소재 안정성을 평가하기 위한 cross-linking 방법을 도입함.

○ 기존의 cross-linking 방법은 기능성 소재의 합성이 복합하고 고가의

가교결합시약이 사용된다는 단점이 있음.

○ 새롭게 도입된 One-step 방법은 (chloromethyl)phenylethyl - trimethoxysilane을 이용하여 자성소재의 표면을 chloro-기로 치환하는 것으로 합성 방법이 간단하고, 저비용이 든다는 장점과 높은 생체물질의 결합 효율 확보가 가능함.

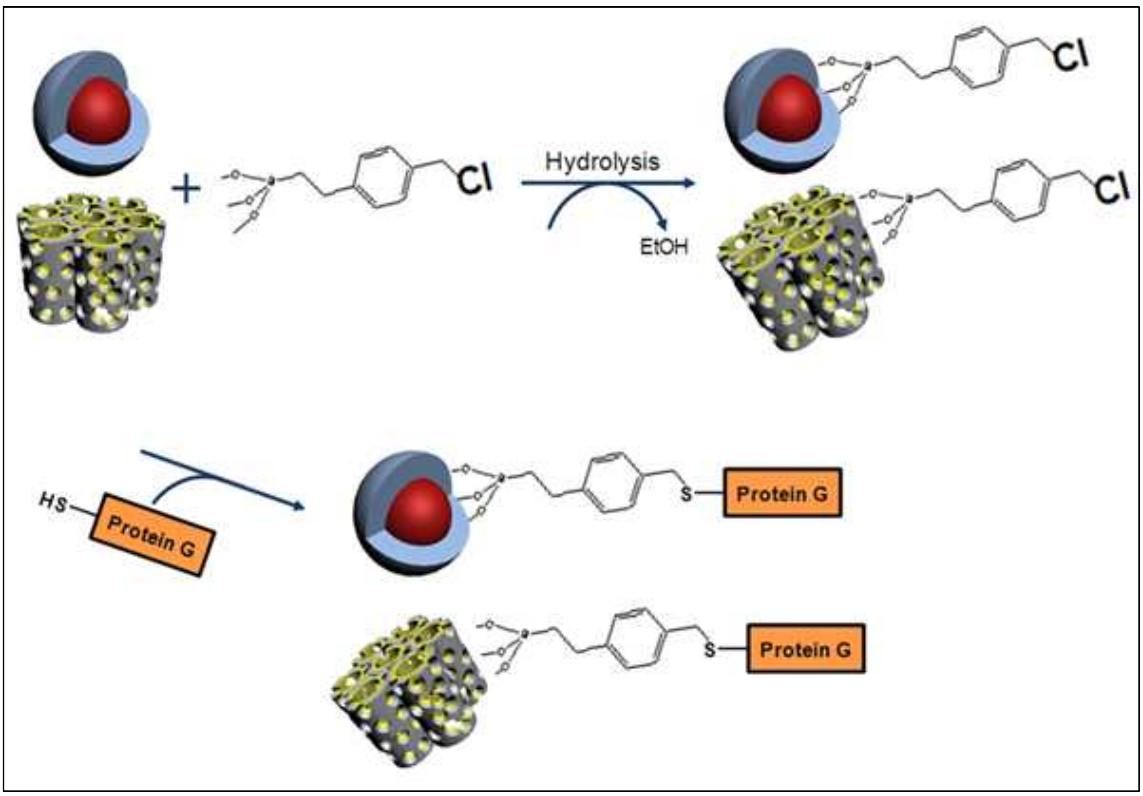


그림 15. 생체물질 고정화를 위한 one-step 방법의 자성소재 표면처리 기술

○ (chloromethyl)phenylethyl-trimethoxysilane을 이용하여 기능화한 silica coated MNPs (Cl-MNPs)의 특성을 확인하기 위해 FT-IR spectra 분석을 하였다. -CH peak 확인으로 자성소재가 기능화 되었음을 확인함.

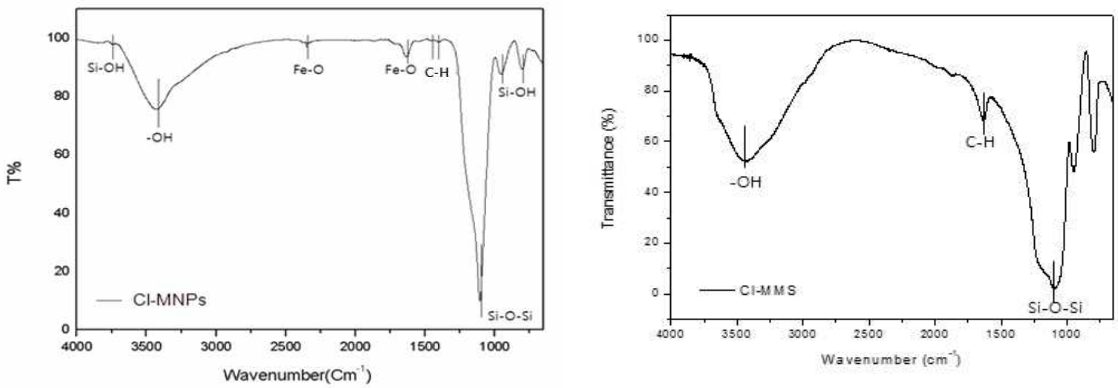


그림 16. Chloro-기가 치환된 자성소재의 FT-IR 분석

○ 화학적 결합을 이용한 생체물질 고정화를 평가하기 위한 histidine-tag 단백질 G가 고정화된 실리카 코팅된 자성나노입자는 아래에 도시된 바와 같이 histidine-tag 단백질 G가 자성실리카 나노입자에 고정 결합되어 BCA test를 통하여 결합 효율을 측정 하였고, 결합 효율은 98 % 이상의 효율을 확인함. 이때 사용한 단백질 G는 다중 결합 형태로 단일, 이중, 삼중 결합으로 이루어짐.

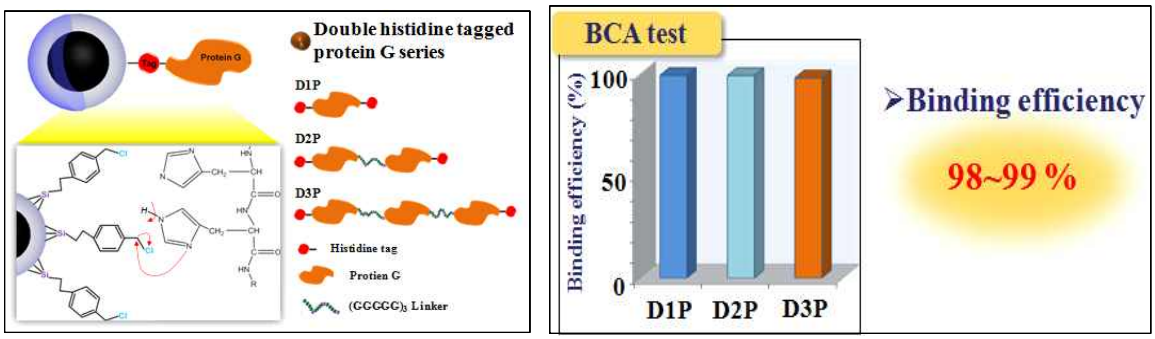


그림 17. 화학적 결합을 통한 생체분자의 고정화 효율

○ 자성 소재의 경우 자화력이 중요한 요인 중 하나로 장시간 보관 시 특성 저하의 문제에 대한 소재 안정성 확보를 위한 기기분석을 진행함.

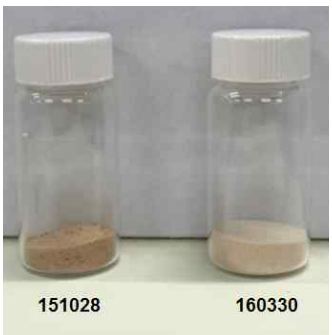


그림 18. 소재의 장시간 보관에 따른 안정성 평가분석(FT-IR, 5개월 보관 후 분석 진행)

4. AI 바이러스 특이 항원 제작

본 연구진은 사업평가시 제출한 바 있는 사업계획서에서와 같이 선행적으로 인플루엔자 특이 재조합 항원을 이미 개발 완료한 바 있으며, 이를 본 연구의 항체 제작을 위한 특이 항원으로 활용하였음.

특히 HA95 서열은 인플루엔자 바이러스 혈청형 간에 공통서열이라고 알려져 있어 다양한 혈청형의 인플루엔자 바이러스를 검출하기 위한 항체 제작에 매우 유용할 것이라고 판단되어 이를 적극 활용하였음. 이러한 재조합 항원은 제작된 단클론항체의 특이성 평가시 실제 다양한 혈청형의 바이러스와 함께 적용되었음.

○ 투여 항원정보

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/56548875

Influenza A virus (A/chicken/Korea/ES/03(H5N1)) hemagglutinin (HA) gene, complete cds

1.7 kb, 62 kDa

atggagaaaatagtgcttcttcttgcaatagtcagtcttgttaaaagtgatcagatttgcattggttaccat
gcaaacaactcgacagagcaggttgacacaataatggaaaagaacgtcactgttacacatgcccaag
acatactggaaaagacacacaacgggaagctctgcgatctagatggagtgaagcctctaattttaaga
gattgtagtgtagctggatggctcctcgggaacccaatgtgtgacgaattcatcaatgtgccggaatgg
tcttacatagtggagaaggccaatccacccaatgacctctgttacccagggaatttcaacgactatgaa
gaactgaaacacctattgagcagaataaaccattttgaaaaaattcagatcatccccaaaagttcttggt
ccgatcatgaagcctcatcaggggtgagctcagcatgtccataccagggaaggtcctccttcttcaga
aatgtggtatggcttatcaaaaagaacagtgcatacccaacaataaagagaagctacaataataccaa
ccaagaagatcttttggtactgtgggggattcaccatccaaatgatgcggcagagcagacaagactct
atcaaaacccaaccacctatatttccgttgggacatcaacactaaaccagagattggtaccaaaaata
gctactagatccaaagtaaacgggcaaagtggaaggatggagttcttctggacaattttaaaaccgaat
gatgcaatcagctttgagagtaatggaaatttcattgctccagaatatgcatacaaaattgtcaagaaag
gggactcagcaattatgaaaagtgaattggaatatggtaactgcaacaccaagtgtcaaactccaatg
ggggcgataaactctagtatgccattccacaacatacaccctctcaccatcggggaatgccccaaata
tgtgaaatcaagcagattagtccttgcgactgggctcagaaatagccctcaaagagagaaaagaaaa
aagagaggactatttggagctatagcaggttttatagagggaggatggcagggaatggtagatggttg
gtatgggtaccaccatagcaatgagcaggggagtgggtacgctgcagacaaagaatccactcaaaa
ggcaatagatggagtcaccaataaggtcaactcgatcattgacaaaatgaacactcagtttgaggccg
ttggaagggaatttaataacttagaaaggagaatagaaaatttaaacaagaagatggaagacggattc
ctagatgtctggacttataatgctgaacttctggttctcatggaaaatgagagaactctagactttcatga
ctcaaatgtcaagaacctttacgacaaggtccgactacagcttagggataatgcaaaggagctgggta
acggttgtttcgagttctatcacagatgtgataatgaatgtatagaaagtgtaagaaacggaacgtatgg
ctacccgcagtattcagaagaagcaagattaaaaagagaggaaataagtggagtaaaattggaatca
ataggaacttaccaaatactgtcaatttattcaacagtggcaagttccctagcactggcaatcatggtgg
ctggtctatctttatggatgtgctccaatggatcgttacaatgca gaatttgcat ttaa

○ 베큘로바이러스 재조합 단백질 발현 시스템을 활용하여 다양한 인플루엔자 바이러스에 대한 재조합 단백질 항원을 개발/발현/정제 완료하였음 (선행연구결과)

그림 19. 인플루엔자 바이러스들 상호간의 gene alignment 분석

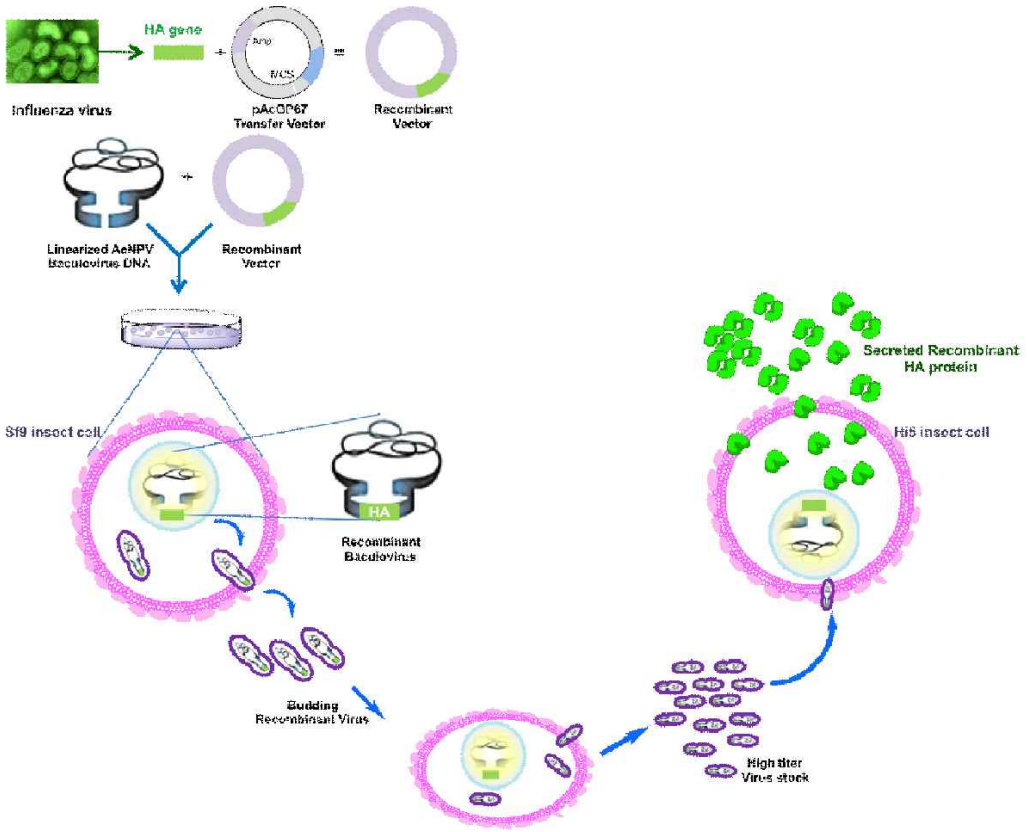


그림 20. 베큘로바이러스 발현 시스템을 활용한 재조합 항원 발현 과정 모식도

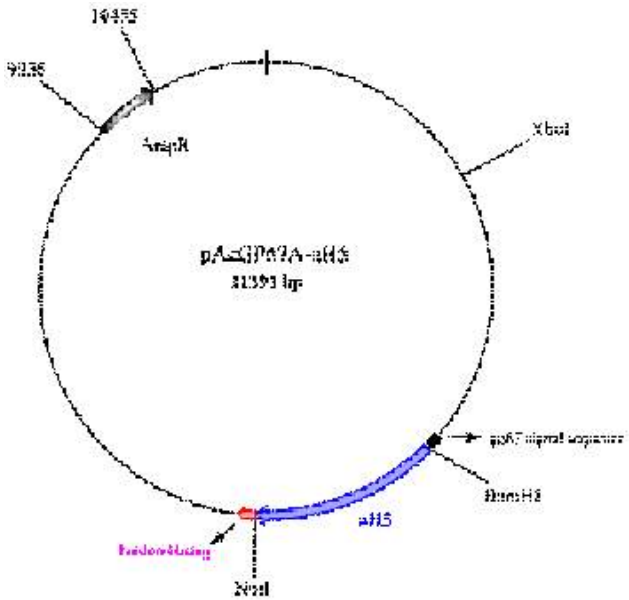


그림 21. 베큘로바이러스 시스템에 활용된 vector map

상기 그림에서 확인할 수 있는 바와 같이 유전자 발현 벡터로 pAcGP67A_aH5를 활용하였음.

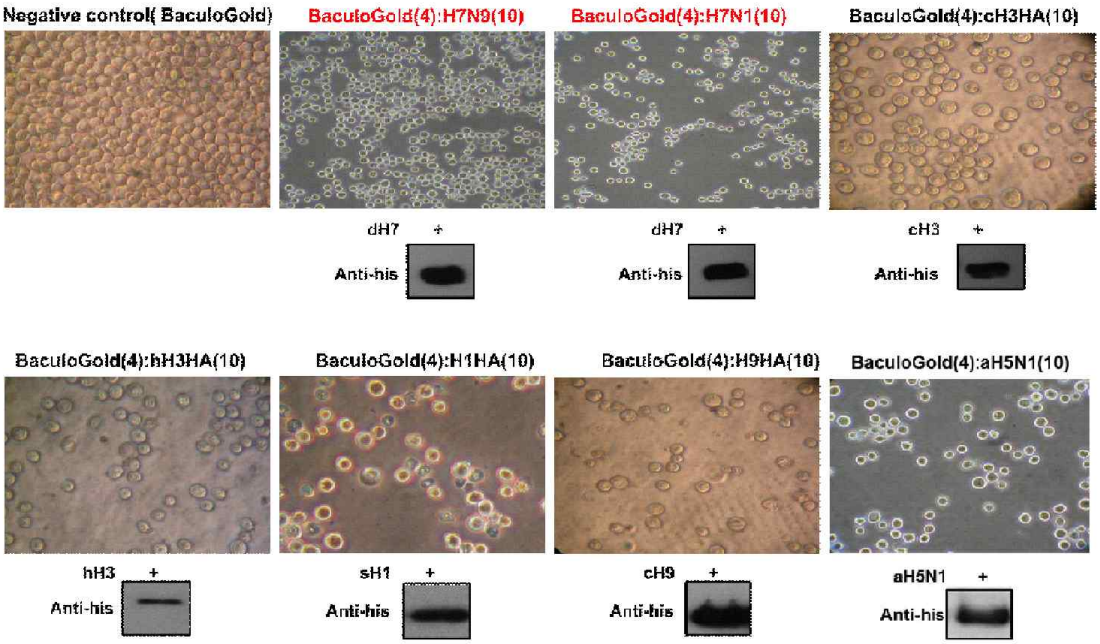


그림 22. sf9 세포주에 재조합 베큘로바이러스 감염 사진 및
재조합 단백질의 발현 확인 (Western blotting result)

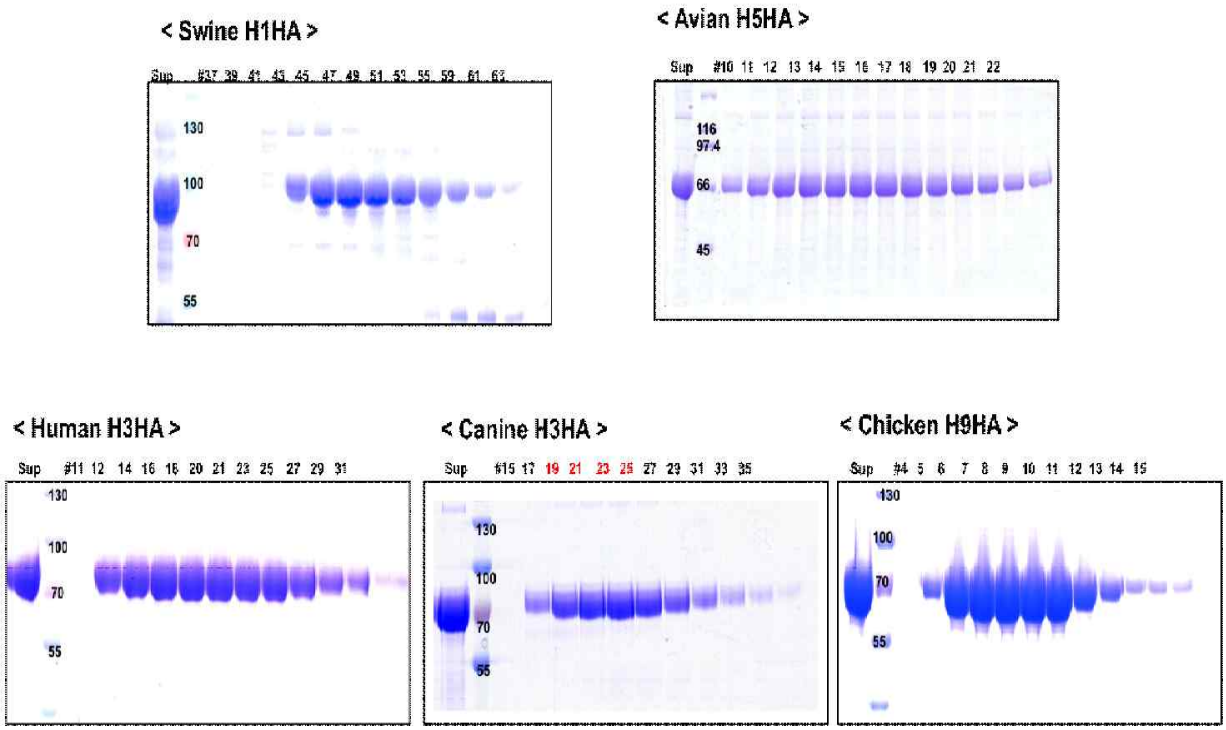


그림 23. 베큘로바이러스 시스템 활용한 재조합 단백질의 발현 후, 정제 결과 (SDS-PAGE)

6. AI 바이러스 특이 항체 개발 및 실제 바이러스와의 결합성 평가

가. 특이 단클론 항체 분비 세포주 확립 (단클론 항체 개발 과정 및 방법)

(1) 실험적 방법 및 과정

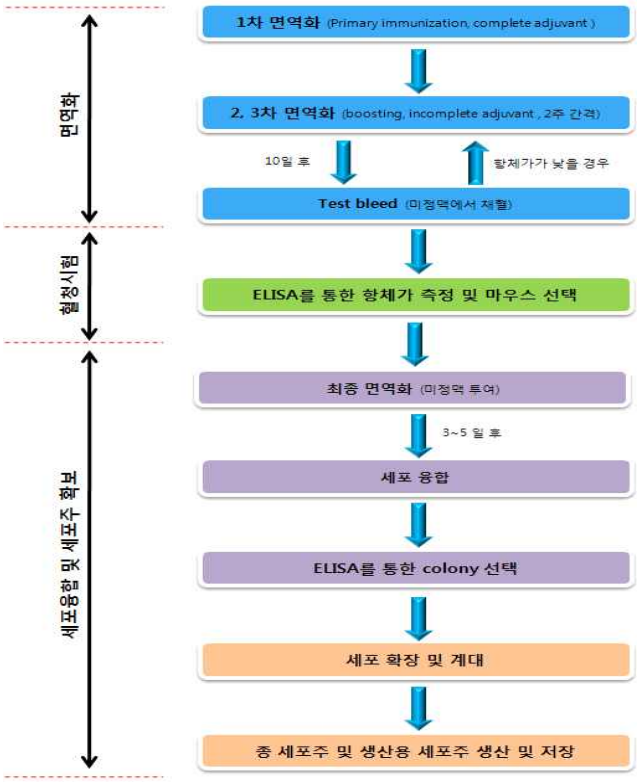


그림 24. 단클론 항체 제작과정 모식도

(2) 실험동물 활용 실험 및 세포주 배양

(가) BALB/c 마우스, 항원 투여 회차 마다 항원의 양을 tapering (항원에 대한 특이도 높은 B림프구들의 선택적인 증식유도)

사육실 복강 내 투여 미정맥 내 투여 세포배양

그림 25. 실험동물 및 세포배양

(나) 항원 투여 중의 혈청 항체가 검사 (Antibody titering)

3차 면역화 후 4일 뒤에 꼬리 미정맥에서 채혈하여 혈청을 얻은 뒤 1/1000로 인산염 완충액(PBS)에 희석하여 효소면역측정법 (ELISA, Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay)으로 항체가를 결정함. 측정된 흡광도 (optical density, O.D)값이 음성대조군의 마우스(항원을 주입하지 않은 쥐의 혈청)의 그것과 비교하여 양호한 결과가 얻어질 경우 면역화가 성공한 것으로 보고 세포 간 융합 준비함.

(다) Feeder cell 준비

D.W에 sucrose를 11.3 %로 녹여 멸균 (autoclave, 121 ℃, 15 분) 후 50 ㎖씩 분주하여 냉장고(4 ℃)에 보관함. 골수종세포 (myeloma)와 비장 세포의 융합 18 시간 이전에, 12 주령 이상의 마우스(암수 및 strain은 관계없으나 Balb/c 암컷을 기준으로 삼았음)의 복부 피부를 벗겨 낸 후 복근 속 복강 내로 8 ㎖의 4 ℃, 11.3 % sucrose (Sigma) 용액을 주입한 후 복강을 마사지 하여 복강 내 대식세포들의 유리를 촉진함.

이후 이를 회수하여 (약 6㎖ 이상) 1300 rpm으로 원심분리한 후 pellet을 PBS 혹은 RPMI-1640(Sigma) 배지를 이용한 세척한 후 1X HAT (hypoxanthine aminopterine tymidine, Sigma), 20 % FBS (fetal bovine serum, Sigma), RPMI-1640에 적절히 풀어 세포배양용 96 well plate (Nunc)에 분주한 후 37℃ CO_2 incubator (Binder)에서 배양함.

Feeder cell을 미리 준비하는 것은 융합과정 중 여러 단계를 거치면서 손상을 입은 융합세포들이 feeder cell들이 분비하는 다양한 cytokine들에 의한 치유를 촉진함과 아울러 지나친 세포희석으로 인한 성장 저해를 억제하기 위함임.

그림 26. Feeder cell 제작

(라) 비장세포와 골수종세포의 융합 (Kohler와 Milstein 방법)

세포융합 방법은 Kohler와 Milstein 방법에 따라서 PEG (polyethylene glycol, Sigma)를 fusogen으로 이용함. 세포융합 2주전부터 계대해온 골수종세포 (myeloma, Sp2/0-Ag14, HGPRT-, 한국세포주은행, 세포의 수가 7-8×10^5/㎖정도 되면 1/2로 희석 계대하여 다음날의 실험에 이용)와 항체가 (antibody titer)가 높게 나타난 마우스의 비장세포 (splenocyte)를 미리 준비한 후 이들을 혼합하여 FBS가 첨가되지 않은 세포 배양용 배지로 세척한 후, 미리 가열한 (37℃) 1㎖의 polyethylene glycol을 이용하여 1분간에 걸쳐 서서히 저어주면서 융합함. 융합 후 수분에 걸쳐 천천히 1X HAT 배지 (20% FBS, RPMI-1640)를 첨가해 주면서 융합과정을 마침. 이러한 전과정은 37℃ 항온수조 (water bath)를 이용하여 시행함.

전날 준비한 feeder cell이 깔린 96 well plate에 well 당 1개의 colony가 생길 정도의 농도로 세포를 HAT가 첨가된 배지로 희석하여 분주함. 분주된 96well plate들은 37℃ CO_2 incubator에 넣어 7일간 배양하며 screening 단계에 접어들 때까지 incubator를 열지 않고 배양함.

(마) 특이성 검사 대상 well의 선별

세포 융합을 실시한 후 1주일 (7일)이 경과하면, 각각의 96 well plate를 꺼내어 inverted microscopy에 올려 세포군 (cell colony)의 형성 여부 및 그 정도 (colony의 크기)를 관찰하여 각 well에 표시함. 표시된 well 중 colony의 크기가 전체 well 면적의 25% 내외를 차지하는 것들만을 골라 특이성 검사 대상으로 선정함. 형성되는 colony들의 형태학적 모습은 완전한 부유성, 포도상의 군집성, 부분적인 부착성, 완전한 부착성 등 다양한 형태가 나타나므로 각기 형태에 대한 세포 밀도 등을 감안하여 선별한 후 분류함.

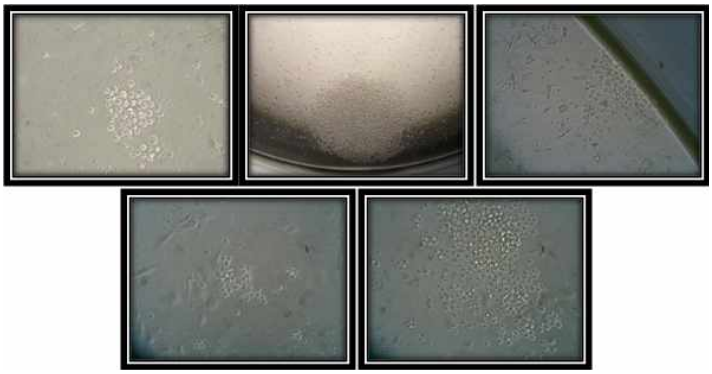


그림 27. Hybridoma colony 관찰

(바) 단클론항체의 특이성/민감성 검사

- 효소면역측정법(ELISA)을 이용한 특이성 검사

해당 항원 용액을 10㎍/㎖의 농도로 100㎕씩 96 well plate에 분주하고 37℃, 60분 반응시켰다. 희석액으로는 0.05M sodium bicarbonate용액을 사용함. 반응액을 제거하고 세척액 (인산염완충액, 0.05% Tween 20) well당 200㎕ 씩 첨가한 후 다시 제거하는 과정을 3회 반복함.

세척 후 각 well에 차단액(blocking solution, 1% BSA가 함유된 인산염 완충액)을 200㎕ 첨가하고 37℃, 30분 반응시킴. 차단액 반응액을 제거하고 상기 세척액을 well당 200㎕씩 첨가한 후 다시 제거하는 과정을 3회 반복함. 단클론 항체 (MAb)용액을 well당 100㎕씩 분주하고 음성대조군용 well에 희석액을 100㎕ 분주한 다음 37℃에서 60분간 반응시킴.

반응액을 제거하고 상기 세척액을 well당 200㎕씩 첨가한 후 다시 제거하는 과정을 3회 반복함. 항-마우스 IgG에 HRP (Horse reddish peroxidase)가 융합된 시약을 well당 100㎕씩 분주하고 37℃에서 60분간 반응시킴. 반응액을 제거하고 상기 세척액을 well당 200㎕씩 첨가한 후 다시 제거하는 과정을 3회 반복함.

효소 기질 용액 (o-phenylenediamine 0.4㎎/㎖ in phosphate citrate buffer pH 5.0))을 100㎕씩 분주하고 암실의 상온 에서 30분간 반응시킴. 492 nm (yellow)에서 흡광도값을 확인하여 음성대조군의 흡광도의 3배 이상 되는 흡광도 값을 양성 반응의 최소치로 기준하여 음성, 양성으로 판정함.

- Western blotting법을 이용한 특이성 검사

정제된 항원을 SDS-PAGE상에서 전기영동한 후 nitrocellulose membrane (0.45um; Bio-Rad)에 electrotransfer함. Towbin et al. (1979)의 방법으로 transfer후 membrane을 blocking buffer (0.01M PBS, 3% skim milk, Sigma)로 실온에서 하룻밤 동안 blocking하고, ELISA를 통해 검증된 항체액(hybridoma 세포배양액)을 blocking solution에 적정한 농도로 희석하여 1시간 30분 동안 실

온에서 반응시켰다. 각 반응 단계마다 PBS-Tween 20 (0.05%)으로 3번 씻어내며, peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Sigma)를 blocking solution에 적당한 농도로 희석하여 2시간 반응시킴. 신선한 substrate solution (ECL)을 준비하여 실온에서 1분간 반응 시킴. 반응 후 x-ray film에 감광시켜 발색함.

(사) 종세포주 및 생산용 세포주의 선별/관리

일단 원하는 항체를 분비하였다고 판단되는 융합 세포주는 limiting dilution 방법으로 1, 2차 클론닝을 수행하여 융합 세포 집단이 하나의 세포로부터 유래되는 클론이 되게 함. 만들어진 단클론 항체 세포주를 배지에 부유시켜 37℃, CO_2 세포배양기에서 3-4일간 증식시킨 뒤 얻은 세포 부유액을 1,300rpm에서 10분간 원심 분리한 후 침전된 세포는 동결방지 보호제(RPMI-1640 세포배양액에 10% DMSO, 20% FBS 첨가)에 부유시킨 후 동결보존용 앰플에 1㎖ ($1X10^6$cell/㎖)씩 분주하고 세포주명, 계대번호, 계대일자 등을 기록한 후 freezing container에 넣어 deep freezer(-70℃)에 하룻밤 보관 후 영하196℃ (액체질소)에 동결 보존하여 원종 세포주로 사용함. 이후 생산된 원종 단클론 항체 분비 세포주를 꺼내어 37℃ 항온수조에서 빠르게 해동시킨 뒤 배지에 부유시켜 37℃ CO_2 세포배양기에서 3-4일간 증식시킨 다음, 증식된 세포 부유액을 1,300rpm에서 10분간 원심 분리한 후 침전된 세포는 동결방지 보호제에 부유시킨 후 동결보존용 앰플에 1㎖ ($1X10^6$cell/㎖)씩 분주하고 세포주명, 계대번호, 계대일자 등을 기록한 후 영하 196℃ (액체질소)에 동결 보존하여 생산용 단클론 항체 분비 세포주로 사용함.

(아) 복수채취

생후 6-8주된 BALB/c 마우스의 복강에 pristane을 0.5-1 ml 주사하고 해당 항원에 대한 특이적인 항체를 생산하는 세포주를 배지 (RPMI-1640, 10%FBS)에서 키움. Pristane 처리 후 1주일 째 되는 날 세포주를 1300 rpm으로 5분간 원심분리하여 얻은 pellet에 적당량의 인산염 완충액(phosphate-buffered saline, PBS)에 현탁한 뒤 계수함. 마우스 한 마리당 1-5 x 10^6개 정도의 세포를 0.5 ㎖l 인삼염 완충액에 현탁하여 복강에 주사함. 1-2주가 지나서 마우스의 배가 부풀어 오르면 주사기를 이용하여 복수를 채취하며, 채취된 복수를 1500 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 취함. 취해진 상등액을 0.45 ㎛ syringe filter를 이용하여 여과한 후 protein G column (GE)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 얻음. 얻어진 항체액은 desalting column (GE)을 이용하여 차후 실험 목적에 따라 인산염 완충액 (PBS)등의 다양한 완충액으로 교환한 뒤 사용함.

(3) 단클론항체 선별 결과

- 위의 과정을 거쳐 40종의 투여 항원에 대한 특이 단클론 항체를 선별하고 이를 수차례 계대하며 세포주로 확립한 결과 총 12종의 건강한 세포주를 확립할 수 있었음.

ELISA plate 구성			Coated Ag							
			H1N1	H3N2	H5N2	H5N3	H6N5	H9N2	HA(P)	N
			A	B	C	D	E	F	G	H
Ab (mAb)	11C12	1								
	11D12	2								
	12F1	3								
	13F3	4								
	13G8	5								
	13G9	6								
	15E9	7								
	15H7	8								
	16G2	9								
	16H4	10								
	17G8	11								
	18A12	12								

Plate 1. Ab name

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	11B1	11B2	11B3	11B4	11B6	11B9	11B10	11B11	11B12	11C2	11C7	11C12
B	11D3	11D4	11D6	11D9	11D10	11D11	11D12	11E2	11E12	11F5	11F7	11F8
C	11F9	11F11	11G1	11G4	11G6	11G7	11H2	11H4	11H6	11H9	11H10	12A2
D	12A3	12A6	12A7	12A8	12A10	12B1	12B3	12B8	12B9	12B12	12C1	12C2
E	12C4	12C6	12C12	12D4	12D5	12D8	12D9	12D11	12D12	12E4	12E7	12E8
F	12F1	12F3	12F8	12F10	12G4	12G5	12G7	12G9	12H8	12H9	12H11	12H12
G	13A1	13A8	13B9	13B10	13C6	13C7	13C12	13D1	13D9	13D10	13D11	13E2
H	13E3	13E9	13E10	13E12	13F1	13F2	13F10	13F12	13G4	13G6	13G8	13G9

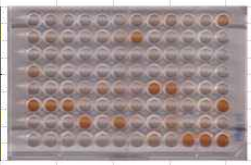


Plate 2. Ab name

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	13H4	13H7	13H9	13H10	14A2	14A4	14A7	14A9	14A10	14A11	14A12	14B2
B	14B11	14C6	14C9	14C10	14C11	14D3	14D5	14D10	14D12	14E3	14E4	14E6
C	14E10	14F7	14F8	14F10	14F11	14F12	14G2	14G6	14G7	14G11	14G12	14H1
D	14H2	14H4	14H5	14H6	14H12	15A2	15A5	15A8	15A10	15A12	15B4	15B7
E	15B10	15C4	15C10	15D4	15D9	15E3	15E8	15E9	15E11	15E12	15F6	15F7
F	15F10	15G1	15G8	15G12	15H7	16A6	16A12	16B4	16B7	16B77	16C4	16C10
G	16C12	16D3	16D4	16D5	16D11	16D12	16E2	16E6	16E8	16E10	16F1	16F5
H	16F7	16F8	16G2	16G6	16G7	16H2	16H4	16H9	16H12	17A3	17A4	17A9

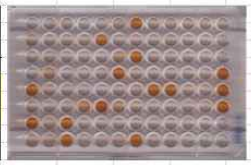


Plate 3. Ab name

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	17A10	17A11	17B10	17B12	17C5	17C7	17C9	17D2	17D4	17D9	17E4	17F4
B	17F8	17F10	17G1	17G5	17G6	17G8	17H4	17H6	17H9	17H10	18A3	18A12
C	18B1	18B7	18B9	18B10	18C2	18C8	18C10	18D1	18D2	18D4	18D6	18D7
D	18D8	18D11	18D12	18E2	18E7	18E8	18E10	18E11	18E12	18F5	18F8	18F9
E	18F12	18G11	18H2	18H8	19A1	19A6	19A11	19B8	19B11	19B12	19C1	19C9
F	19C10	19C11	19D1	19D4	19D5	19D6	19D8	19D10	19D11	19E3	19E6	19F1
G	19F5	19F6	19F7	19F9	19F10	19G3	19G9	19G10	19H7	20A2	20A3	20A5
H	20A6	20A7	20A12	20B4	20B6	20B10	20B12	20C2	20C6	20C8	20C11	20D1

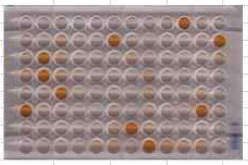


Plate 4. Ab name

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	20D4	20D9	20D11	20E2	20E5	20E8	20F4	20F10	20F11	20G5	20G9	20H1
B	20H7	20H10	Negative control									

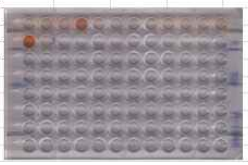


그림 28. 초기 40주의 단클론 세포주 선별 결과

(4) 12종의 단클론항체와 투여 항원 및 혈청형 별 인플루엔자 바이러스와의 특이성 평가

(가) 아래 결과와 같이 다양한 혈청형의 인플루엔자 바이러스와 특이성을 평가하였음. 세포주 별로 다양한 특이성을 보여 이를 적절히 혼합하여 qPCR을 진행함으로써 최적의 조합을 찾기 위한 바이오 마커로 활용하였음.

그림 29. 혈청형 별 인플루엔자 바이러스에 대한 특이성 평가(ELISA)

(나) 위에서 보이는 바와 같이, 11C12의 경우 H9N2 바이러스주를 제외한 모든 바이러스주와 특이성을 보였음. 이 단클론 항체의 경우 H9N2에 특이성을 보이는 12F1, 13G9, 15E9 등과 혼합하여 사용할 경우 대부분의 인플루엔자 바이러스를 검출할 수 있는 활용도가 있음을 알 수 있음. 이와 같이 각 단클론 항체의 특이성의 경향을 분석하여 향후 시제품에 활용함. 그리고 이들 항체의 안정성은 지난 30여년간 많은 연구를 통해 보고된 1년 이상의 냉장보관 안정성이 입증되어 있으며 이를 토대로 실용화 진단 키트에 활용함.

(5) 제1협동과제와 제2협동과제 연구결과물을 활용한 삼중복합체 제작

(가) protein G/A multimer 제작 개념 (선행연구결과)

protein G (*Streptococcus dysgalactiae* 유래)와 protein A (*Straphylococcus aureus* 유래)는 다양한 항체와 특이적으로 결합하는 특성을 가진 것으로 이미 널리 알려져 있으며, 혈청이나 복수에서 항체를 정제하는데 광범위하게 활용되고 있는 물질임. 이는 대장균에서의 재조합 단백질 발현시스템을 활용하여 매우 용이하게 발현 정제될 수 있는 기능성 단백질로서 protein G의 경우 한 분자 당 2분자의 항체가 결합하고, protein A의 경우는 6개의 항체 분자가 결합될 수 있음. 본 과제에서 활용할 마우스 유래 단클론 항체는 protein G에 잘 결합하는 것으로 알려져 있으며, 실제 개발 후 평가시 매우 우수한 결합력을 확인한 바 있음.

그러나 protein G monomer를 활용한 자성비드기반 복합체의 활용은 이미 타 연구자들에 의해 개발되어 활용된 바 있어 본 연구진은 protein G의 multimerization 과정을 통해 보다 많은 수의 항체 분자가 자성비드에 결합할 수 있는 방법을 개발하였음.

즉, 아래와 같이 protein G monomer를 glycine과 serine이 반복되는 peptide linker (SGGGGSGGGGSGGGG)를 이용하여 계속적으로 연결해 나가면 목표하는 multimer

protein G의 재조합 단백질 발현이 가능함. 특히 glycine과 serine이 반복되는 peptide linker는 매우 flexible한 특성을 가지고 있어 재조합 항체의 개발 시 heavy chain과 light chain의 결합 시에도 많이 사용되는 것으로 이러한 특성이 자성비드에 고정된 항체가 해당 항원과 결합할 경우에 결합 방향성에서의 flexibility를 극대화하여 항체의 수적 증가와 더불어 결합 방향성의 최적화에 크게 기여하는 것으로 확인하였음.

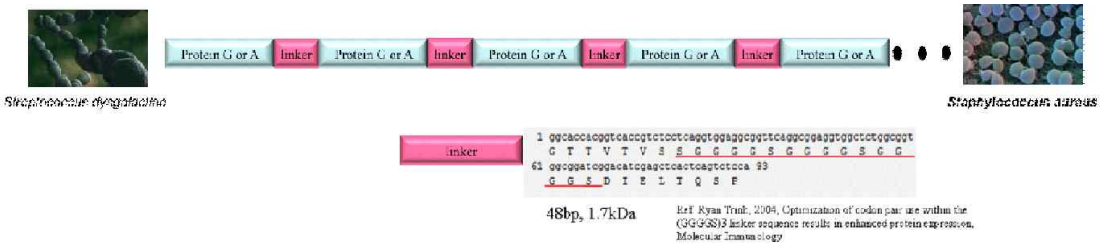


그림 30. multimer protein G 개발 개념 모식도

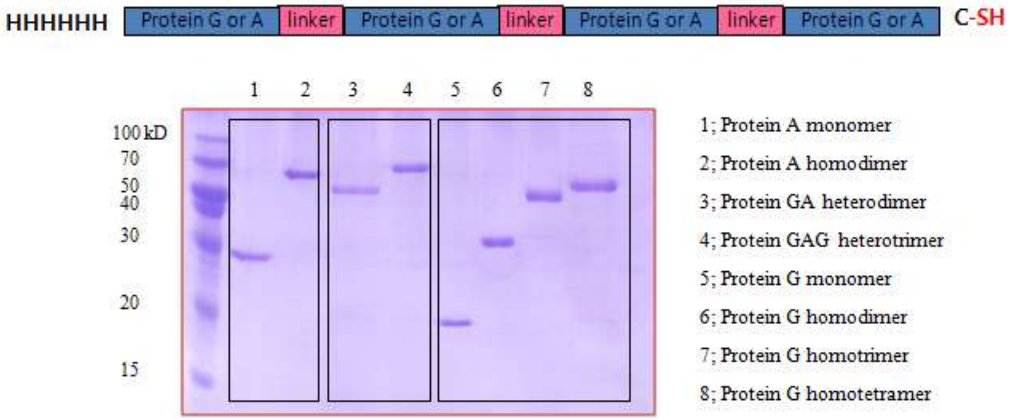


그림 31. protein G/A multimer 발현 및 정제 결과

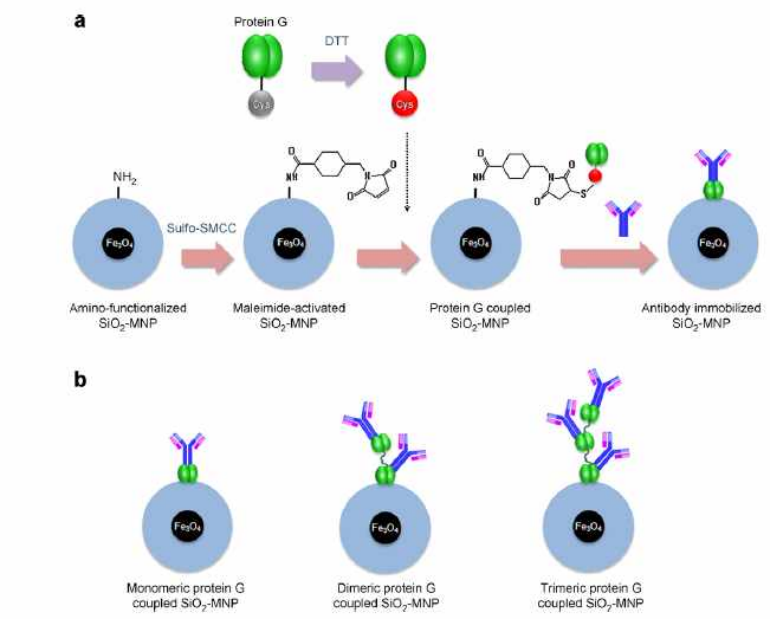


그림 32. 삼중복합체의 제작과정 도시
a: 아미노그룹이 활성화된 자성 실리카 나노입자의 생성과정,
b: protein G monomer, dimer, trimer의 결합 모식도

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 G multimer를 결합시켜 수행하였음.

상기와 같은 protein G multimer가 부착된 나노자성비드와 인플루엔자 바이러스에 대한 단클론항체와 결합시킨 삼중 복합체를 검체와 반응시켜 1세부과제에서 진행하는 qPCR에 활용함.

7. 표준 메뉴얼에 기반한 진단키트 시제품 개발

가. 진단키트의 포장 등 사용의 편리성 반영한 시제품 완성
- 나노자성비드 및 항체 등 시제품 구성품들의 용량과 농도 설정, 구성품의 용기 개발 등

나. 시제품에 표준메뉴얼의 반영 효율화를 위한 방법 강구
- 동영상 혹은 간편 설명서 등 현장에서 손쉽게 활용할 수 있는 방법 모색 및 반영

8. 시제품의 반복평가를 통한 신뢰도 확보
- 시제품을 표준메뉴얼에 따라 다양한 연구자에 의한 반복평가 시행

9. 진단키트 상용화를 위한 제반 조건 조사 및 구체적인 사업화 계획 수립

가. 최근의 국내 조류인플루엔자 진단현황 및 시장 현황 조사

○ 인플루엔자바이러스 진단법 연구 동향

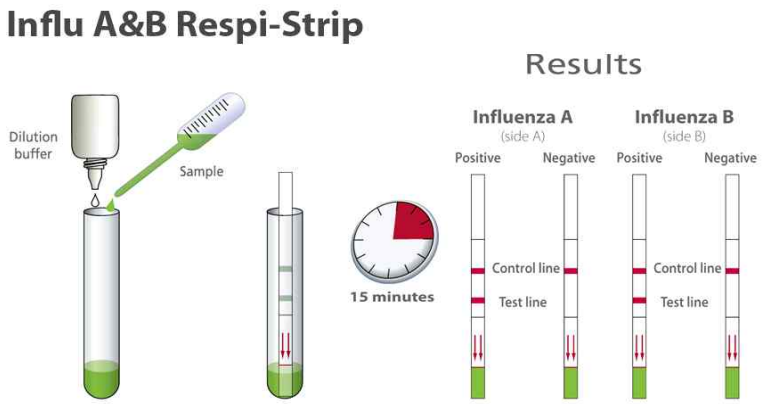
: 인플루엔자의 진단에 사용되고 있는 방법은 크게는 바이러스의 세포배양을 통해 검출하는 방법, 인플루엔자 바이러스의 RNA를 검출하는 방법, 인플루엔자의 항원 단백질을 검출하는 방법으로 나눌 수 있으며, 표준시험법으로는 세포배양을 통해 인플루엔자 바이러스를 분리 검출하는 방법이 적용되고 있음

: 시료의 경우 면봉을 이용하여 조류의 구강인도 또는 총 배설강의 시료를 채취하거나 조류의 분변을 주로 사용하고 있으며, 바이러스의 진단을 위하여 종란 접종을 통한 바이러스 증폭 또는 PCR법 등의 분자생물학적 기법을 주로 이용하고 있음. 종란 접종법의 경우 시료에 포함되어 있는 바이러스가 종란에서 증식되는 특성을 보유한 경우에만 바이러스가 검출되므로 결과의 해석에 주의해야 함.

○ 항체 기반의 면역 크로마토그래피 기법

: 인플루엔자 바이러스 감염의 진단을 위한 다양한 검사법들이 사용되고 있으나, 대부분의 검사법들이 부수적인 실험기기 및 인력이 필요하고 결과를 얻는데 많은 시간이 소요됨. 신종인플루엔자의 감염여부에 대한 확진결과를 기다리는 보호자에게 있어 현장에서 바로 인플루엔자의 감염여부를 확인 할 수 있는 검사방법은 인플루엔자의 항원을 검출하는 항체 기반의 면역 크로마토그래피인 '신속인플루엔자검사(Rapid Influenza Diagnostic Test; RIDT)'가 거의 유일함.

: 현재 상용화되어 사용되고 있는 RIDT는 20여종으로 그 형태에 따른 크게는 Strip형과 Well형이 있고, 대부분 RIDT의 경우 인플루엔자 바이러스 아형간에 상당한 유사도(highly conserved)를 보이는 Nucleoprotein에 특이적인 항체를 사용하게 제작됨.



[NP 단백질 항체 기반 면역 크로마토그래피 기법]

: 2009년 신종인플루엔자가 유행했을 때 기존에 계절 인플루엔자를 타겟으로 개발·사용

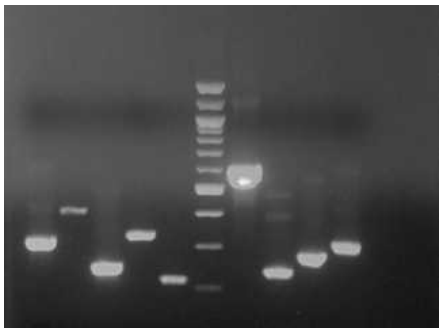
되어온 RIDT에 대해 신종인플루엔자 진단에 대한 민감도 및 특이도가 낮은 것으로 확인되었음. 그 원인으로 신종인플루엔자와 계절인플루엔자의 nucleoprotien(NP)의 아미노산 서열의 차이에 의해 계절인플루엔자에 대해 개발된 RIDT에 NP 특이적인 항체의 신종인플루엔자의 NP에 대한 친화력이 계절인플루엔자의 NP에 대한 친화력에 비해 떨어져 발생하는 것으로 추측되어짐.

■ RIDT를 통한 인플루엔자 바이러스의 진단은 신속한 결과를 얻는 장점이 있지만, 검사방법의 특성상 Viral culture 및 Realtime RT-PCR에 비하여 민감도가 떨어지는 단점이 있음. 하지만, 환자의 호흡기 검체에서 인플루엔자의 항원 단백질을 검출하는 검사법인 RIDT가 비교적 저렴한 비용과 현장에서 인플루엔자 감염여부를 바로 판단 할 수 있다는 장점이 있기 때문에 민감도와 특이도가 높은 진단 키트가 개발이 필요한 상황임.

○ 분자생물학적 기법

■ Traditional RT-PCR

: one-step 혹은 two-step으로 진행되며 바이러스 분리법과 유사한 민감도를 가지고 있음. 그러나 조류의 분변이나 사체 유래 total RNA에서 증폭된 DNA를 활용하므로 교차오염의 위험이 상존하여 AI와 같이 긴급하고 정확한 진단 결과를 얻어야 하는 경우에 사용하는데 문제가 커 real-time PCR로 대체되고 있음.



[기존 RT-PCR 진단기법 agarose gel 분석결과]

■ Real-time PCR 기법을 활용한 진단법

: 현재 현장에서 이용되는 real-time PCR 기법은 전통적인 일반 PCR 기법과 비교하여 빠른 장점이 있으며, fluorescent Taqman probe 등이 개발되어 인플루엔자 바이러스의 typing과 subtyping을 one-step으로 할 수 있는 시험법이 개발되어 있음.

그러나 이 또한 분변 및 사체 등의 검체에서 total RNA를 추출한 이후 유전자 증폭과정을 거치는데 이때 조류인플루엔자 바이러스 유래 RNA만이 추출되는 것이 아니라 분변 내 엄청난 수의 세균 등에서 유래한 유전자들이 혼입되어 특이적인 probe를 사용하여 높은 특이도를 얻을 수 있더라도 이에 따른 민감도 상승에는 한계가 있음.

또한, 검체의 전처리 시간이 오래 소요되어 진단시간 단축에 한계를 가짐.

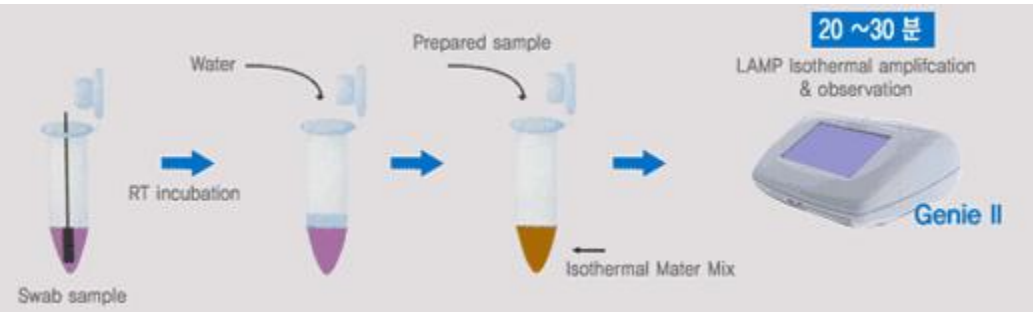
따라서 다양한 검체로부터 고순도 바이러스 추출 및 분리를 신속하게 할 수 있는 방법과 병행한다면 고도화된 real-time PCR 기법의 확립이 가능할 것임.

[Real-time PCR 진단법]

■ 기존 분자생물학적 기법의 문제점

: 분자생물학적 기법 통한 바이러스 진단 시 시료에 PCR 저해물질이 포함된 경우 위음성의 결과를 초래할 수 있다는 위험성이 상존함. 특히 분변 시료를 이용할 경우 분변 내에 다양한 PCR 저해물질이 포함되어 있으므로 효율적으로 PCR저해물질을 제거하는 방법이 요구됨. 또한 내부 정도관리 물질을 이용하여 PCR 저해 여부 확인이 필요함. 뿐만 아니라 신속한 진단이 항시 요구됨에도 불구하고 시료에서 RNA 등을 추출 정제하는데 상당히 시간을 오래 소모하며, total RNA 추출에 따른 AI 바이러스 유래 RNA의 농도 저하로 인한 민감도 저하, PCR 기기에 따라 결과가 달리 나타나는 등의 문제점들이 제기되고 있는 상황임.

: 최근 현장 진단과 샘플오염 및 긴 분석 시간의 한계를 극복하기 위해 칩 기반의 마이크로 등온PCR의 시스템 개발되고 있음. LAMP(Loopmediated isothermal amplification)의 등온PCR법은 기존의 중합효소 연쇄반응법과 유사하지만 기존의 중합효소 연쇄반응이 변성(denaturation), 접합(annealing), 신장(extension) 세 가지 단계를 거치면서 온도의 변화를 주어야 하는 반면, 일정한 온도에서 접합 및 신장이 가능하기 때문에 오직 칩과 단순한 온도제어 시스템만으로 휴대성이 높은 시스템을 구축할 수 있음.



[LAMP를 이용한 진단 방법]

■ LAMP 기법을 활용한 인플루엔자 바이러스 진단법 개발

: 최근 연구논문에서 LAMP 기법을 이용한 다양한 인플루엔자 바이러스 진단 연구가 활발하게 진행되고 있는 상황임. Dr. Yi Guan (University of Hong Kong)그룹에서는 고병원성 H5N1 조류인플루엔자 바이러스에 대한 연구를 수행하였으며, Dr. Cheng-Feng Qin (Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, China) 그룹에서도 LAMP 기법을 이용하여 인체감염 H7N9 진단연구를 수행하고 있음.

: 현재까지 국내 연구진은 LAMP 기법을 이용하여 조류인플루엔자 바이러스 진단법 개발

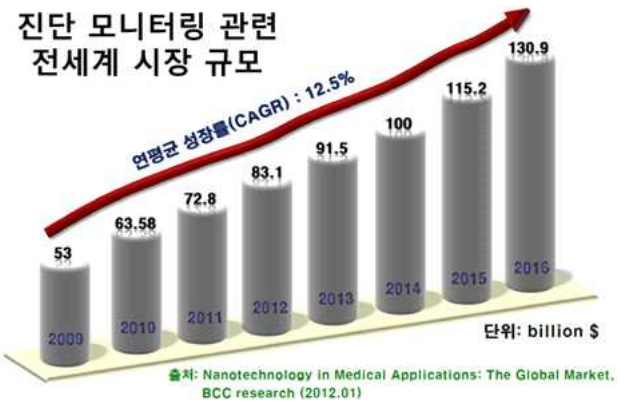
연구가 진행되고 있지 않으며, 국외의 경우에도 일부 연구진들에서만 한정적으로 연구가 수행되어지고 있는 상황임

■ ELISA를 이용하여 감염병 병원체의 항원/항페 유무를 확인하는 과정은 TLC 기반 신속진단키트 및 real-time PCR 기반 유전자 동정 단계를 거쳐 스크리닝된 바이러스나 세균의 확진 및 병원성 확인을 위해 필수적인 단계임에도 아직 국내에 도래하지 않은 바이러스에 대해서는 개발이 되어 있지 않을 뿐 더러, 해외에서도 대상 바이러스가 유행하는 지역의 국지성이나 산발적 수요 등으로 인해 상업성이 크지 않다는 이유로 개발이 미미한 형편이다. 그럼에도 항원/항체기반의 진단 기술로서의 ELISA는 신속진단키트나 유전자 추적기술로 발견된 바이러스를 확인하는 과정에서 western blot와 더불어 가장 핵심적인 기술이므로 대유행이 가능할 수 있거나 치사율이 높아서 사회적 위험도가 큰 바이러스들에 대해서는 사전에 미리 개발하여 두어야만 한다. 보건안보에 위협이 될 수 있는 바이러스에 대한 ELISA 기반 항원/항체 진단기술의 국내 개발 현황은 대표적으로 인플루엔자의 여러 종에 대해서 개발이 되어 있으며, 에이즈, 간염등 만성감염 병원체에 대해서도 다양하게 개발이 되어 있으며, 국가기관인 질병관리본부의 용역과제를 통해서도 수인성 바이러스와 뎅기 바이러스 등 일부 바이러스에 대해서는 기반기술이 개발되어 있으나, 전체적으로는 크게 부족한 상황이며, 특히 해외에서의 유입이나 기후변화 등에 의한 신변종 출현을 가정할 필요가 있는 위험군 바이러스에 대해서는 특별히 개발이 진행된 적이 없다. 니파 바이러스나 조류인플루엔자 등에 대해서도 마찬가지로 제품화 된 ELISA 키트는 물론이고 개발되어 검증된 ELISA 실험법은 아직 없는 실정이다.

■ 시장분석

-전 세계 바이오 유해물질 진단 및 모니터링 시장은 연평균 12.5%의 증가율을 가지고 2013년 약 900억 달러에서 2016년 약 1,300억 달러로 성장할 것으로 예상된다 (출처 : BCC Research 2012). 이 중 감염성 유해물질 진단시장은 2012년 300억 달러 규모에서 2017년 약 400억 달러 규모로 증가하면서 전체 체외진단시장의 70%수준을 유지할 것으로 예상된다 (출처 : Frost & Suillivan 보고서 및 Nat. Biotech. 2007).

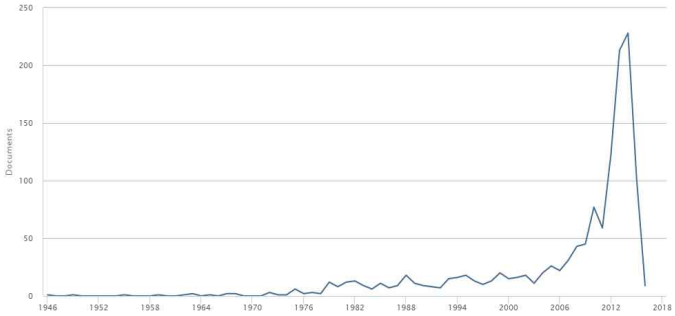
2012)



< 그림 > 전 세계 진단 및 모니터링 시장 규모 (출처: BCC Research)

■ 국외기술 수준 및 시장현황

: 미국과 중국, 일본을 중심으로 인플루엔자 바이러스 관련 연구들이 활발하게 진행되고 있으며, 특허 출원 및 등록도 활발하게 진행되고 있음.

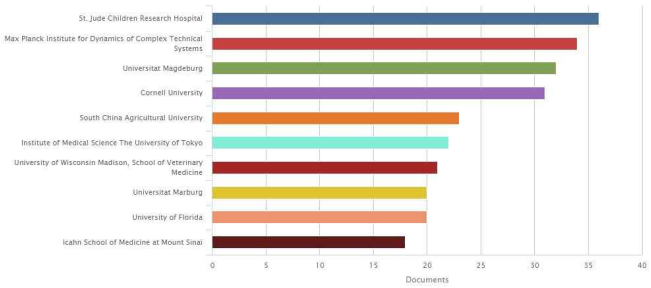


[인플루엔자 바이러스 관련 논문 연도별 국외 발표 현황]

: 인플루엔자 바이러스를 포함한 세계 인체용 백신 시장은 5개의 제약기업 (Glaxo SmithKline, Sanofi-Pasteur, Novatis, Pfizer, Merck & Co)이 전 세계를 주도하고 있으며, 미국 (Merk Animal Health)에서 "Nobivac® Canine Flu H3N8"의 개 인플루엔자 백신이 상용화 되어있음. 또한, 베링거인겔하임 동물약품(주), 메리알코리아(주) 등의 국외 유명한 동물약품 회사에서는 다양한 축종에 대한 백신과 치료제를 제조 및 시판하고 있음.

: 최근 전 세계적으로 신변종 감염병 바이러스의 창궐로 유용항원을 기반 진단 및 백신시장은 해마다 증가 할 것으로 예상됨.

: 미국 (St. Jude children's Research Hospital), 중국 (South China Agricultural University), 일본 (Institute of Medical Science The University of Tokyo), 독일 (Max Plank Institute of Dynamics of Complex Technical Systems) 등의 감염병 연구기관에서 많은 연구 결과이 발표되고 있음.



[인플루엔자 바이러스 관련 국외 논문발표 주요 기관 현황]

나. 효과적인 사업화를 위한 전략 구축
: 본 과제를 통해 도출된 표준 진단법의 강점

기존기술의 한계	내용	차별성
낮은 민감도	○ 전처리 공정이 체계화 되어 있지 않고 검체 내 낮은 항원 농도에 의해 검지가 어려움	○ 강자성 나노복합체를 이용한 항원농축기술 개발을 통해 항원-항체 반응을 증가시킴
정량분석이 어려움	○ 기존의 신속진단키트는 정성검사 수준에 그쳐 정량검사기술이 필요함	○ 광학특성을 이용하여 항원과 결합한 항체-나노입자의 정량적 분석이 가능함
고비용으로 인한 상업화 제한	○ 최근 금 나노입자를 체외진단에 대한 연구가 진행중이나 분자진단에 비해 민감도가 떨어지고 기존 면역진단에 비해 높은 제조비용이 필요함	○ 강자성을 이용한 손쉬운 항원농축이 가능한 나노복합체를 개발하여 제조비용을 낮춤
낮은 검지 신뢰도	○ 입자 표면에 균일하게 항체가 수식되지 않아 항원과 나노입자-항체 복합체의 결합 정도의 판단이 어려움	○ 나노복합체의 표면 항체 수식조건을 최적화하여 검지 신뢰도를 높임 ○ 고특이도 항체 사용

다. 진단제 종류별 장단점 분석 및 기존 진단제들과의 경쟁력 등 기술적/경제적 분석

(1) 국내 제품생산 및 시장 현황
국내의 경우 자성나노소재를 항체와 결합함으로써 이용되는 제품은 모두 수입에 의존하고 있어 자체 생산 시장이 형성되지 않음.

(2) 국외 제품생산 및 시장 현황
기존 구형 자성소재의 경우 원천특허를 해외 선진국에서 소유하고 있는 이유로 인해 국내 기업들의 시장 장악이 한계가 있음.

(3) 자성나노입자-multi protein G 기반 삼중복합체 산업화
기존에 기개발된 protein G-자성나노입자 복합체는 monomer protein G만을 기반으로 한 것으로써 단위 나노입자 당 결합시킬 수 있는 항체의 양이 제한적인 문제가 있어 왔음. protein G는 한 분자 당 두 분자의 항체를 결합시킬 수 있으므로 dimer, trimer, tetramer 등으로 확장될 때마다 2배씩의 항체 결합력이 커지기 때문에 소량의 자성나노입자만으로도 충분한 양의 항체 결합력을 확보할 수 있어 검출키트 중 자성나노입자의 소모량을 줄임으로써 경제성 및 분석 과정의 간편함을 추가로 확보함으로써 산업화에 기여할 것임.

또한 항체를 직접 나노입자에 결합시키려면 각각의 항체를 순수 분리 정제하여야 할 뿐만 아니라 결합 시에도 항체의 constant region이 아닌 variable region이 붙을 수 있어 항체의 기능성을 약화시킬 수 있다는 점도 간과할 수 없음. 따라서 항체의 정제비용을 감소시켜 역시 경제성 확보에 획기적으로 기여할 것으로 기대됨. 그리고 다른 연구자들의 결과물 즉, 본 과제를 통해서 개발된 바이오 마커 이외의 새로운 바이오 마커를 본 검출 시스템에 적용할 경우에도, 사용자가 직접 제작하였거나 획득한 항체를 손쉽게 결합시킬 수 있음으로 해서 사용의 호환성 및 적용성의 극대화를 통한 시장성 확대가 기대됨.

항체의 경우 제작된 실험동물의 종류에 따라 protein G 혹은 protein A에 편향적으로 잘 결합하는 특성을 보인다. 따라서 본 연구과제에서는 multi-protein G 뿐만 아니라 multi-protein A를 제작하여 다양한 항체에 대한 대응력을 확보할 계획이며, multi-protein G & A heteromer들의 제작 및 생산을 아울러 진행함으로써 국내 및 국외에서 광범위하게 개발 생산되고 있는 항체들에 대한 본 시스템 적용성을 극대화할 계획임. 이러한 장점은 국내외 시장의 확대 뿐만 아니라 새로운 검출체계 (다양한 항체들의 최적의 조합을 통한 다양한 특이도와 높은 민감도의 복합적 분석 가능 tool 제공)의 발전에 상당히 기여할 것으로 기대됨.

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

	D-06

4-1. 목표달성도

1. 제1세부과제 (경상대학교 김상현)

○ 조류인플루엔자 다중실시간 중합효소 연쇄반응 기법의 고도화 및 삼중복합체기반 진단 시스템의 현장적용 기반구축

년도	최종성과목표 및 평가방법	단계 성과목표 및 평가방법	연차별 성과목표	개발내용 및 개발 범위	가중치 (%)	달성도 (%)
2014	‘조류인플루엔자 다중실시간 중합효소 연쇄반응 기법의 고도화 및 삼중복합체기반 진단 시스템의 현장적용 기반구축’ (자체평가)	- 표준시료 확보	- 기존 real-time PCR 방법과 삼중복합체기반 진단시스템의 비교평가 분석을 위한 표준물질 설정 및 제작	- 표준시료로서 인플루엔자 바이러스에 대한 철새의 분변 및 포유류 비말 검체 2000여점 확보	30	100
		- 표준 RT-PCR 기법 개발	- Magnetic-purified real-time RT-PCR 기법 개발 및 효율화 : 기존 검사방법과의 비교평가	- 기 확보된 표준시료를 활용하여 기존 종란 검사법 대비 Magnetic-purified real-time RT-PCR 기법 검사방법 비교 완료	20	100
2015		- 표준 real time RT-PCR 기법 개발	- Magnetic-purified Virus-Direct real-time RT-PCR 기법 개발 및 효율화 : 기존 검사방법과의 비교 평가	- 기 확보된 표준시료를 활용하여 기존 종란 검사법 대비 Magnetic-purified Virus-Direct real-time RT-PCR 검사 방법 비교 완료	25	100
		- 간단 RNA법 확립 및 비교	- 표준 RNA추출 방법과 효율은 동일하고, 추출시간이 짧고 간단한 추출방법 확립 및 비교 : 기존 검사방법과의 비교평가	- 기 확보된 표준시료를 이용하여 기존 RNA추출보다 시간이 절약되고, 효율은 동일한 추출방법을 적용함	20	100
		최적 핵산 분리 및 real time RT-PCR 기법 확립	- Magnetic 항체 접합체 bead를 이용한 real time RT-PCR 기법 확립	- 기존의 추출방식 대비 10배 이상의 바이러스를 고감도로 검출하는 real time RT-PCR기법을 확립함	5	100

2. 제1협동과제(한국세라믹기술원 장정호)

○ 조류인플루엔자 바이러스 특이항체 및 real-time PCR 기법에 최적화된 자성나노소재 개발

년도	최종성과목표 및 평가방법	단계 성과목표 및 평가방법	연차별 성과목표	개발내용 및 개발 범위	가중치 (%)	달성도 (%)

2014	조류인플루엔자 바이러스 특이항체 및 real-time PCR 기법에 최적화된 자성나노소재 개발 (자체평가)	AI 바이러스 대응 자성소재 개발 (TEM)	- 자성소재 제조	- 구형 자성소재 제조 - 다공성 자성소재 제조 (금속염 환원)	30	100
		자성소재 - 특이항체 융합 (FT-IR, TGA)	- 기능기를 이용한 표면개질	- 화학적 기능기를 이용한 표면개질 - 생물학적 소재 적용 표면개질	20	100
2015		AI 바이러스 대응 자성소재 Scale up (TEM/SEM)	- 자성소재 제조수율 향상	- 구형 및 다공성 자성소재 수득량 증가를 위한 조건 제어(합성비율, 화학적 환원법 적용)	25	100
		자성소재 표면개질을 통한 결합성 최적화 (FT-IR, TGA)	- 특이항체 융합효율 극대화	- Cross-linking 방법도입 - 생체분자 결합효율 확인	20	100
		자성소재 특징 분석 및 안정성 평가 (FT-IR)	- 소재 안정성 확보	- 보관시간에 따른 자성소재 특성변화 확인	5	100

3. 제2협동과제((주) 중겸 임명운)

○ 조류인플루엔자 바이러스 특이항체 및 자성나노입자 기반 진단키트 시제품 개발

년도	최종성과목표 및 평가방법	단계 성과목표 및 평가방법	연차별 성과목표	개발내용 및 개발 범위	가중치 (%)	달성도 (%)
2014	조류인플루엔자 바이러스 특이항체 및 자성나노입자 기반 진단키트 시제품 개발 (자체평가)	AI 바이러스 특이 항원 개발	- 베큘로바이러스 재조합 단백질 발현시스템 활용	- 인플루엔자 바이러스에 대한 재조합 단백질을 확보하여 이를 항원으로 Balb/c 마우스에 투여함으로써 단클론 항체 제작을 위한 특이 항원으로서 활용	30	100
		AI 바이러스 특이 항체 개발 및 실제 바이러스와의 결합성 평가	- 특이 단클론항체 분비세포주 확립	- 단클론 항체 세포주를 확립하고, 이를 실제 인플루엔자 바이러스와의 반응성 평가를 통해 다양한 조류인플루엔자 혈청형과의 반응성을 평가 완료	20	100
2015		표준매뉴얼에 기반한 진단키트 시제품 개발	- 시제품개발 및 표준메뉴얼 제작	- 매뉴얼과 시제품의 사용 편리성 반영한 제품 기획	25	100
		시제품의 반복평가를 통한 신뢰도 확보	- 시제품의 신뢰도 확보	- 인공표준품 및 야외 시료 적용	20	100
		진단키트 상용화를	- 사업화계획 수립	- 시장조사, 제품유통 체계 반영	5	100

		위한 제반 조건 조사 및 구체적인 사업화 계획 수립				

4-2. 관련분야 기여도

○ 검사시료 채취에서 검사결과를 얻는 데 소요되는 시간을 효과적으로 단축시켜 방역의 효율성을 높일 수 있을것으로 판단됨.

○ 국내외에서 다발하는 다양한 항혈청형의 조류인플루엔자에 대해 고호환적으로 적용될 수 있는 진단 키트개발 기반 마련.(구제역 등 여타 병원체에 대해서도 적용될 수 있는 원천기술 구축)

○ 비전문가에 의해서도 손쉽게 진단 프로세스가 진행 될 수 있도록 하여 상시적인 감시체계 구축에 기여함.

○ 자성소재 제조기술은 막대한 연구비와 연구인력이 필요하며 관련기술들을 선진국이 독점하고 있는 상황임.

○ 따라서 고가의 비용을 들여 수입에 의존해야 하는 자성소재를 본 연구과제의 기술 개발을 통해 빠른 시일 안에 대체품으로의 적용이 가능할 것으로 기대하며 자성소재의 국내시장을 활성화 시킬 수 있을 것으로 판단됨.

5. 연구결과의 활용계획

	D-07

○ 시제품 제작 및 상용화 준비

1. 키트의 구성 및 자성비드 복합체 제조, 사용 매뉴얼

가. 키트의 구성

그림. Avian influenza 신속검출 키트 제품사진

- Magnetic bead conjugate 10 vials
  (Avian monoclonal antibody 100ug + Magnetic bead 10mg / vial)
- Wash buffer 1 bottle (50ml / bottle)

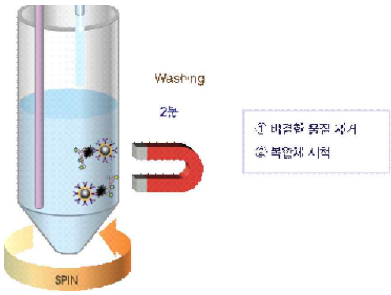
나. 현장용 시스템 구현방향

- real-time PCR 방법
- 역학적으로 원인 바이러스의 분리/동정 또한 매우 중요하므로, 검체와 반응한 자성비드 복합체를 기존 진단방법에 적용할 수 있도록 함으로써 신규 진단방법과 기존 진단방법의 호환성이 극대화되도록 고안하였음.
- 이는 바이러스성 질환의 진단 시 자성비드와 바이러스의 복합체를 바로 real time PCR 할 수 있도록 함

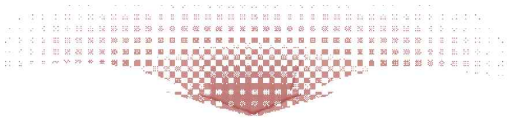
다. 제공되는 자성비드 복합체 제조법

- 자성비드와 항체 복합체를 제작하기 위해서 Avian influenza 바이러스의 monoclonal antibody를 반응시킨 후(5분) 자력을 이용한 2회 세척(세척액 사용) 시행

라. 제공되는 자성비드 복합체를 사용한 real time PCR 사용법



- 자성비드 항체복합체에 바이러스가 있는 조류 폐사체나 폐사체의 분변을 유화하여 반응 시킨 후(5분) 자력을 이용한 2회 세척(세척액 사용) 시행하고 real time PCR 적용 및 판별



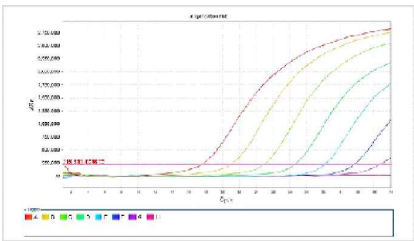


그림 . real time PCR 키트 적용

○ 추가 연구의 필요성, 타 연구에의 응용, 기업화 추진방안 등을 기술

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

		D-08
○ 해당사항 없음		

7. 연구개발결과의 보안등급

해당사항 없음

8. 등록한 연구시설·장비 현황

해당사항 없음

9. 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	D-11

○ 연구과제에 있어 기술적 위험요소는 없으며 본 연구팀의 경우 실험실 안전관리 교육에 정기적으로 참여함

○ 연구실 비상사태 발생 시 필요한 소화기, 샤워기, 방독면 등의 안전 장비를 각 실험실마다 비치해 두고 있으며, 정기적인 연구실 안전 및 소방점검 시행함.

○ 연구원 안전교육: 실험 중 발생할 수 있는 안전사고를 미연에 방지하고자 전 연구원을 대상으로 연 4회 법정의무교육을 통하여 연구원 안전교육을 실시하고 있으며, 신입연구원의 경우 연구 시작 전에 별도의 안전교육을 실시함.

○ 생물안전관리

- LMO법에 따른 연구 안전장비의검증 및 관리
- 연구시설 설치 운영 관련 기록 관리 및 유지
- 실험사고에 대한 기록 작성 보고 및 보관
- 화학물, 의료 폐기물, 동위원소 폐기물 관리

○ 안전조치 이행사항

1) 연구실 안전관리규정 비치

- 법령, 안전관리규정, MSDS, 비상연락망, 연구실 안전수칙 비치 및 게시

2) 연구실 안전점검 실시

- 연간 1회 이상 의무적으로 실시
- 자체 안전점검 실시 후 연구실 위험 요소, 전기시설 등 보완설치

3) 연구실 정밀안전진단 실시

- 2년에 1회 이상 의무적으로 반드시 실시
- 정밀안전진단 진단 결과에 의거 전기 및 안전시설 등 보완설치 진행

4) 연구실 안전교육 실시

- 모든 연구활동종사자는 월 1시간 이상 안전교육 실시
- 교육내용 : 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 연구실 유해, 위험요인 등

5) 연구활동종사자 보험 가입

- 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 제14조 제1항 및 시행령 제15조 제1항에 의거 의무적 가입

6) 연구실 안전시설 보완

- 연구실 출입문 위험물 안전표시 부착
- 연구실 전도방지 가스고장장치 설치
- 연구실 비상기구함, 복도 비상기구함 설치

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

									D-12
번호	구분 (논문 /특허 /기타	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인용횟수 등)
1	논문	High efficient chromogenic catalysis of tetramethylbenzidine with horseradish peroxidase immobilized magnetic nanoparticles	한국 세라믹 기술원	교신 저자	Biochemical Engineering Journal	2.467	2015.10.28	중복사사	SCI

11. 기타사항

	D-13

○ 해당사항 없음

12. 참고문헌

		D-14
○		