

11-1543
000-001
731-01

발간등록번호

11-1543000-001731-01

다축종
(산업동물
및
반려동물
포함)
적용
가능한
신속,
정확한
인플루엔자
검출기법
개발 및
상용화

최
종
보
고
서

2017

농림축산식품부

가축질병대응기술개발사업 R&D Report

다축종 (산업동물 및 반려동물 포함) 적용 가능한 신속, 정확한 인플루엔자 검출기법 개발 및 상용화 최종보고서

2017 . 1. 31.

주관연구기관 / (주)미코바이오메드
협동연구기관 / 경북대학교 산학협력단
협동연구기관 / 비아이티벨류
협동연구기관 / 농림축산검역본부

농림축산식품부

2. 제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “다축종 (산업동물 및 반려동물 포함) 적용 가능한 신속, 정확한 인플루엔자 검출기법 개발 및 상용화”(개발기간 : 2013.12.24 ~ 2016.12.23)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 03. 31.

주관연구기관명 : (주)미코바이오메드 (대표자) 전선규 (인)
협동연구기관명 : 경북대학교산학협력단 (대표자) 황의욱 (인)
협동연구기관명 : 비아이티밸류 (대표자) 조원창 (인)
협동연구기관명 : 농림축산검역본부 (대표자) 박봉균 (인)

주관연구책임자 : 박현규
협동연구책임자 : 여상건
협동연구책임자 : 조원창
협동연구책임자 : 신연경

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

| | | | | | |
|--|--------------------|--|----------------------------|---|---|
| 과제고유번호 | 313060-3 | 해당 단계 연구 기간 | 2015.12.24~2016.12.23 | 단계 구분 | 3/3 |
| 연구사업명 | 중사업명 | 가축질병대응기술개발사업 | | | |
| | 세부사업명 | 가축질병대응기술개발사업 | | | |
| 연구과제명 | 대과제명 | 다축종 (산업동물 및 반려동물 포함) 적용 가능한 신속, 정확한 인플루엔자 검출 기법 개발 및 상용화 | | | |
| | 세부과제명 | 다축종 (산업동물 및 반려동물 포함) 적용 가능한 신속, 정확한 인플루엔자 검출 기법 개발 및 상용화 | | | |
| 연구책임자 | 박현규 연구소장 | 해당단계 참여 연구원 수 | 총: 35명 내부: 35명 외부: 명 | 해당단계 연구개발비 | 정부:401,000천원 민간:112,200천원 계:513,200천원 |
| | | 총연구기간 참여 연구원 수 | 총: 99명 내부: 99명 외부: 명 | 총연구개발비 | 정부:1,200,000천원 민간:361,400천원 계:1,561,400천원 |
| 연구기관명 및 소속부서명 | (주)미코바이오메드 기술연구소 | | | 참여기업명 (주)미코바이오메드 비아이티밸류 (주)나노헬릭스 | |
| 위탁연구 | 연구기관명: (주)나노헬릭스 | | | 연구책임자: 고민수 | |
| 1. 고속 광학 스캔 방식을 적용한 RT-PCR 및 LAMP-PCR 2종의 제품화 2. 16종의 인플루엔자 관련 진단 키트 제품화 3. 장진단용으로 활용하기 위하여 핵산추출과정을 단순화한 direct RT-PCR 및 real time RT-PCR 진단법을 개발 4. 동물 인플루엔자 바이러스의 항 바이러스제제 내성 유전자 검출용 키트를 개발 5. 고정밀 온도제어 기술 개발 6. 국내 특허 출원 6건, PCT출원 2건, 국내 특허 등록 1건 7. 6편의 논문게재 및 2건의 기술이전 실시 | | | | 보고서 면수 171페이지 | |

4. 국문 요약문

| | 코드번호 | D-01 |
|-------------|--|------|
| 연구의 목적 및 내용 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 동물 인플루엔자 바이러스의 현장 진단을 위한 고효율, 비용절감형 RT-PCR 및 real time RT-PCR 진단키트 개발 및 상용화 ○ 개발된 현장적용 가능한 다축종용 인플루엔자 진단 키트 개발 및 활용을 통한 인플루엔자 확산의 조기 차단 ○ RT-PCR 진단 키트를 이용하여 현장에서 단시간내에 인플루엔자의 정확한 판정이 가능한 휴대용 고속 RT-PCR 진단기기, 기술 개발 및 상용화 | |
| 연구개발성과 | <p><주관></p> <ul style="list-style-type: none"> □ RT-PCR, real time RT-PCR, RT-LAMP PCR의 상용화를 위한 시스템 기구 설계 및 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 다중 분석을 위한 시스템 구축(16~24 sample 처리) - 다중 분석을 위한 Hole간의 균일한 온도 유지 기술 개발 - 정밀 온도 컨트롤 모듈 개발 - 2종의 시제품 개발 완료 □ 시스템 운영을 위한 Firmware 및 UI 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 온도 모듈 및 릴레이 등을 위한 정밀 온도 제어 - UI 개발 - 정밀 온도 제어를 위한 PID 제어 알고리즘 및 프로토콜 최적화 □ 시스템 운영 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - 광학모듈 및 온도제어를 위한 통한 보드 개발 및 알고리즘 최적화 - Debugging을 통한 프로그램 최적화 □ 현장 적용 용이성을 위한 키트 개발 □ 5건의 국내 특허 출원, 2건의 PCT출원, 1건의 국내 특허 등록 <p><제1협동></p> <ul style="list-style-type: none"> □ 동물 및 조류 인플루엔자 바이러스의 현장 진단을 위한 고효율, 비용절감형 RT-PCR, real time RT-PCR, RT-LAMP 진단키트의 개발을 추진하였으며 그 성과는 다음과 같음. <ul style="list-style-type: none"> ○ 동물 및 조류 인플루엔자 바이러스 진단용 RT-PCR 및 real time RT-PCR 진단키트 개발을 완료하였으며, 해당 진단키트들에 대한 진단효율(민감도 및 특이성)을 검증 완료한 다음, 시제품을 생산하여 평가기관(농림축산검역본부)에 제공 완료함. <ul style="list-style-type: none"> - 조류 인플루엔자 주요 아형 및 뉴캐슬병 바이러스 감별진단용 RT-PCR 및 real time RT-PCR 진단키트 - 돼지 인플루엔자 주요 아형 및 신종인플루엔자 바이러스 감별진단용 RT-PCR 및 real time RT-PCR 진단 키트 - 말 및 반려동물(개, 고양이) 인플루엔자바이러스 감별진단용 RT-PCR 및 real time RT-PCR 진단 키트 - 인플루엔자 바이러스 H 아형 (H1-H16) 분석용 RT-PCR 진단키트 - 인플루엔자 바이러스 N 아형 (N1-N9) 분석용 RT-PCR 진단 키트 ○ 현장진단용으로 활용하기 위하여 핵산추출과정을 단순화한 direct RT-PCR 및 real time RT-PCR 진단법을 개발하였고, 진단효율(민감도 및 특이도)을 검증 | |

| | |
|----------------------------|--|
| | <p>한 다음, 시제품을 제작하여 평가기관(농림축산검역본부)에 제공 완료함.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 현장진단용으로 활용 가능한 RT-LAMP 개발분야에 있어서는 모든 아형의 동물 인플루엔자 바이러스 검출이 가능한 RT-LAMP와 조류인플루엔자 H5아형 진단용 RT-LAMP를 개발하여 진단효율(민감도 및 특이성)을 검증하였고, 시제품을 생산하여 평가기관(농림축산검역본부)에 제공 완료함. 개발된 현장진단용 진단키트를 시판 신속 반응 장비와 접목한 결과, 목표한 30-40분 내에 인플루엔자 바이러스 진단이 가능하였음. ○ 동물 인플루엔자 바이러스의 항 바이러스제 내성 유전자 검출용 키트를 개발하여 진단효율 검증을 완료하였으며, 향후 임상시료에 대한 확대 적용시험이 필요함. ○ 상시 연구결과들은 6편의 논문게재 및 2건의 기술이전을 통하여 정량적 연구 성과 목표를 달성하였음. <p><제2협동></p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 소형 광학계 개발을 통한 고속 스캔형의 모듈 개발 완료 <input type="checkbox"/> RT-PCR용 및 LAMP-PCR용 광학 모듈 개발 완료 및 제품화(시스템 통합) <input type="checkbox"/> 24well에 대한 고속 스캔 방식과 측정 홀간 편차 최소화 알고리즘 구축 완료 <input type="checkbox"/> 형광 Data 취득 알고리즘 구축 완료 <p><제3협동></p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 인플루엔자 A 바이러스 HA subtype 별 (HA1 ~ HA16) 표준 바이러스 확보 <ul style="list-style-type: none"> ○ 인플루엔자 A 바이러스 공통 유전자 검출용 기존 RT-PCR 평가 ○ 인플루엔자 A 바이러스 HA subtype 감별형 기존 RT-PCR 평가 ○ 인플루엔자 A 바이러스 NA subtype 감별형 기존 RT-PCR 평가 ○ 인플루엔자 A 바이러스 공통 유전자 검출용 기존 realtime RT-PCR 평가 ○ 인플루엔자 A 바이러스 HA subtype 감별형 기존 realtime RT-PCR 평가 ○ 인플루엔자 A 바이러스 NA subtype 감별형 기존 realtime RT-PCR 평가 <input type="checkbox"/> 개발 진단 키트 비교 분석 평가 완료 <input type="checkbox"/> 개발 진단키트 인플루엔자 바이러스 고병원성 감별 여부 평가 완료 <input type="checkbox"/> 개발 진단키트 야외 적용 평가 완료 |
| <p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p> | <p><주관></p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 2종의 PCR 시스템 (RT-PCR 및 LAMP-PCR)의 제품화를 비롯한 새로운 비즈니스 모델 창출 예정 <input type="checkbox"/> 유전자 분석을 바탕으로한 제외진단 분야로의 사업 확장 기대 <input type="checkbox"/> PCR 진단 시스템을 비롯한 진단키트(OEM 형태)를 통해 매출 발생 기대 <input type="checkbox"/> 협동 기관과의 협력으로 상생관계 구축 <p><제1협동></p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 개발된 RT-PCR, real time RT-PCR 및 RT-LAMP 진단법은 동물 및 조류 인플루엔자 바이러스의 신속감별진단에 활용함으로써 국가 방역에 기여할 수 있을 것으로 기대됨. 또한 개발 기술의 협력업체 기술 이전을 통하여 향후 진단키트의 상용화 및 진단기관 보급으로 매출 증대가 기대됨. |

| | | | | | |
|----------------|---|---------------|--------|-----|------|
| | <p><제2협동> 개발된 제품을 바탕으로 지속적인 야외 적용 테스트 및 검증을 실시를 통해 경쟁력있는 제품이 될 수 있도록 지원할 예정</p> <p><제3협동> 주관기관과의 협력으로 PCR 시스템을 제품화 주관기관에 광학모듈의 납품 또는 자체 제품화로 새로운 비즈니스 모델 창출로 매출 확대 기대</p> | | | | |
| 중심어 (5개 이내) | 인플루엔자 바이러스 | 분자생물학적 진단법 | RT-PCR | PCR | 진단키트 |

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

| | | 코드번호 | D-02 |
|----------------------|--|------|------|
| Purpose& Contents | <p>○ Development and commercialization of high-efficiency, cost-saving RT-PCR and real-time RT-PCR diagnostic kit for on-site diagnosis of influenza virus in animals</p> <p>○ Development and application of developed multi-axis influenza diagnostic kit for early detection of spread of influenza</p> <p>○ Development and commercialization of portable high-speed RT-PCR diagnostic device capable of accurate determination of influenza in a short time on site using RT-PCR diagnostic kit</p> | | |
| Results | <p><General Cooperation></p> <p><input type="checkbox"/> Design and development of system equipment for commercialization of RT-PCR, real-time RT-PCR and RT-LAMP PCR</p> <ul style="list-style-type: none"> - Build system for multiple analysis (16 ~ 24 sample processing) - Development of homogeneous temperature maintenance technology between holes for multiple analysis - Developed precision temperature control module <p><input type="checkbox"/> Completed development of prototype of 2 species</p> <p><input type="checkbox"/> Firmware and UI development for system operation</p> <ul style="list-style-type: none"> - Precision temperature control for temperature modules and relays - UI development - PID control algorithm and protocol optimization for precise temperature control <p><input type="checkbox"/> Optimize system operation</p> <ul style="list-style-type: none"> - Development of board and algorithm optimization for optical module and temperature control - Debugging program optimization <p><input type="checkbox"/> Develop kit for easy application</p> <p><input type="checkbox"/> 5 domestic patent applications, 2 PCT applications, 1 domestic patent registration</p> <p><First Cooperation></p> <p><input type="checkbox"/> For development of pan-side diagnosis of animal and avian influenza viruses, RT-PCR, real time RT-PCR and RT-LAMP assays were developed and evaluated in this study, and the research results were as following:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ RT-PCR and real time RT-PCR assays were developed and evaluated for the detection of animal and avian influenza viruses, and the prototypes of commercial kits that produced by each partner company and provided it to the evaluation agency (QIA). | | |

| | |
|-----------------------|---|
| | <ul style="list-style-type: none"> - RT-PCR and real time RT-PCR kits for the detection of major subtypes of avian influenza viruses and Newcastle disease virus. - RT-PCR and real time RT-PCR kits for the detection of major subtypes of swine influenza viruses and pandemic H1N1 influenza virus. - RT-PCR and real time RT-PCR kits for the detection of major subtypes of equine and companion animals (dog and cat) influenza viruses. - RT-PCR kits for HA subtyping of influenza A viruses (H1-H16). - RT-PCR kits for NA subtyping of influenza A viruses (N1-N9). <p>○ Direct RT-PCR and real time RT-PCR assays without nucleic acid extraction step applicable for pan-side diagnosis of influenza viruses were developed and evaluated, and the prototypes of commercial kits were provided it to the evaluation agency (QIA). As a result of combining the developed pan-side kits with the rapid diagnostic equipment,, the entire test process was completed within 30-40 minutes of original target.</p> <p>○ Real time RT-PCR assays for the detection of anti-influenza virus agent (amantadine or oseltamivur)-resistant viruses were developed and evaluated for tested influenza viruses and in need further studies for clinical evaluation.</p> <p>○ Through these studies, six papers were published and 2 cases of technical transfer were completed as a quantitative research achievement.</p> <p><Second Cooperation></p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Development of high-speed scan type module through development of small optical system <input type="checkbox"/> Development and commercialization of optical module for RT-PCR and LAMP-PCR (system integration) <input type="checkbox"/> High speed scanning method for 24 wells and the algorithm for minimizing deviation between measurement holes is completed. <input type="checkbox"/> Complete fluorescence data acquisition algorithm <p><Third Cooperation></p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Influenza A virus HA subtype (HA1 ~ HA16) standard virus security <input type="checkbox"/> Evaluation of development kit <input type="checkbox"/> Development Diagnosis Kit completed assessment of whether influenza virus is highly pathogenic <input type="checkbox"/> Evaluation of development kit applied outdoor |
| Expected Contribution | <p><General Cooperation></p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> A new business model will be created including commercialization of two kinds of PCR systems (RT-PCR and LAMP-PCR) <input type="checkbox"/> Expect to expand into in vitro diagnostics based on gene analysis |

| | | | | | |
|----------|---|----------------------------|--------|-----|---------------|
| | <input type="checkbox"/> Expect to generate sales through diagnostic kit (OEM type) including PCR diagnosis system <input type="checkbox"/> Establish win-win relationship between organizations <First Cooperation> <input type="checkbox"/> RT-PCR, real time RT-PCR and RT-LAMP assays for the detection of animal and avian influenza viruses were applicable for rapid and differential diagnostic methods contributing to prevention of animal infection and spread of influenza viruses. And it is expected that sales of the diagnostic kits will be increased by commercialization by the partner companies. <Second Cooperation> <input type="checkbox"/> Based on the developed products, we will continue to apply to POC testing and verification to help you become a competitive product. <Third Cooperation> <input type="checkbox"/> Expect to increase sales by creating a new business model by delivering optical modules to its main agency or by making its own products | | | | |
| Keywords | Influenza virus | molecular diagnostic assay | RT-PCR | PCR | Diagnosis Kit |

6. 영문목차

< CONTENTS >

| | |
|--|-----|
| Chapter 1. Outline of research & development project..... | 1 |
| Section 1. Purpose of research & development..... | 1 |
| Section 2. Necessity of research & development..... | 1 |
| Chapter 2. Current states of domestic and international technical development.... | 3 |
| Section 1. Current states of domestic and international technology developments from analysis of paper, patent, and product..... | 3 |
| Chapter 3. Content and results of research & development..... | 11 |
| Section 1. Development and commercialization of quick and accurate influenza detection technology adaptable for multiple livestock | 11 |
| Section 2. Development of pan-side RT-PCR 및 real time RT-PCR kit for differential diagnosis of animal influenza virus | 57 |
| Section 3. Development of optical system for RT-PCR and analysis SW for on-site diagnosis of influenza virus | 108 |
| Section 4. Validation of field-applicable influenza diagnostic kits and POCT devices | 132 |
| Chapter 4. Goal achievement and the contribution of the related fields..... | 154 |
| Section 1. Goal achievement..... | 154 |
| Section 2. Contributiveness of related field..... | 156 |
| Chapter 5. Research & development results and result utilization plan..... | 157 |
| Chapter 6. Collected overseas scientific and technical information in research and development process..... | 158 |
| Chapter 7. Security level of research & development..... | 158 |
| Chapter 8. States of laboratorial facility and equipment that registered at national science and technology information system..... | 158 |
| Chapter 9. Implementation of safety measures for research carried out laboratory | 158 |
| Chapter 10. Representative performance in research & development..... | 159 |

Chapter 11. Other detail 159

Chapter 12. Reference 160

7. 본문목차

< 목 차 >

| | |
|---|-----|
| 제 1장. 연구개발과제의개요 | 1 |
| 제 1절. 연구개발 목적 | 1 |
| 제 2절. 연구개발의 필요성 및 범위 | 1 |
| 제 2장. 국내외 기술개발 현황 | 3 |
| 제 1절. 논문, 특허, 시장 분석을 통한 국내외 기술 및 시장 현황 | 3 |
| 제 3장. 연구수행 내용 및 결과 | 11 |
| 제 1절. 다축종 (산업동물 및 반려동물 포함) 적용 가능한 신속, 정확한 인플루엔자 검출 기법 개발 및 상용화 | 11 |
| 제 2절. 동물 인플루엔자 바이러스 현장감별용 Pan-side RT-PCR 및 real time Pan-side RT-PCR 키트 개발 | 57 |
| 제 3절. 동물 인플루엔자 현장 진단을 위한 RT-PCR 분석 광학계 및 분석 SW 개발 | 108 |
| 제 4절. 현장에서 적용 가능한 인플루엔자 진단 키트 및 휴대용 기기의 유효성 평가 | 132 |
| 제 4장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 | 154 |
| 제 1절. 목표달성도 | 154 |
| 제 2절. 관련분야 기여도 | 156 |
| 제 5장. 연구결과의 활용계획 등 | 157 |
| 제 6장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 | 158 |
| 제 7장. 연구개발성과의 보안등급 | 158 |
| 제 8장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 | 158 |
| 제 9장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 | 158 |
| 제 10장. 연구개발과제의 대표적 연구실적 | 159 |
| 제 11장. 기타사항 | 159 |
| 제 12장. 참고문헌 | 160 |

제 1장. 연구개발과제의 개요

제 1절. 연구개발 목적

1. 최종 목표

- 가. 현장적용 가능한 신속, 정확한 다축종 인플루엔자 진단 키트 개발 및 활용을 통한 인플루엔자 확산의 조기 차단
- 나. RT-PCR 진단 키트를 이용하여 현장에서 단시간 내에 인플루엔자의 정확한 판정이 가능한 휴대용 고속 RT-PCR 진단기기, 기술 개발 및 상용화
- 다. 개발된 현장 적용 가능한 다축종용 인플루엔자 진단키트 및 휴대용 기기의 유효성 평가

2. 세부 목표

- 가. RT-PCR 진단 키트를 이용하여 현장에서 단시간내에 인플루엔자의 정확한 판정이 가능한 휴대용 고속 RT-PCR 진단기기, 기술 개발 및 상용화
 - (1) 기존의 온도변환형 PCR 기기를 대체할 고속 항온도형 PCR 기기 개발
 - (2) RT-PCR 기능과 LAMP-PCR 기능을 통합한 복합기능 PCR 기기 개발
 - (3) 기존의 PCR Tube를 대체할 uTAS(Micro Total Analysis System)형 PCR Chip 개발
 - (4) 인플루엔자 바이러스 검출용 소형 광학계 개발
 - (5) Real time PCR 분석 SW개발
 - (6) Electronics 개발
- 나. 동물 인플루엔자 바이러스의 현장 진단을 위한 고효율, 비용절감형 Pan-side RT-PCR 및 real time RT-PCR 진단키트 개발 및 상용화
 - (1) 동물 인플루엔자바이러스 주요 아형에 대한 현장진단용 동시감별 진단키트 개발
 - (2) 조류인플루엔자 바이러스 아형 분석 및 고병원성 여부 판독을 위한 키트 개발
 - (3) 인플루엔자 바이러스의 내성 유전자 검출용 키트 개발
- 다. 현장에서 적용 가능한 인플루엔자 진단 키트 및 휴대용 기기의 유효성 평가

제 2절. 연구개발의 필요성 및 범위

1. 인플루엔자 바이러스는 다양한 동물과 조류 및 사람에게 감염되고 있으며, 표면유전자인 HA 및 NA 유전자의 항원적 특성에 따라 다양한 아형(subtype)으로 분류되고 있음.
2. 포유류에서는 동물종에 따라 감염되는 인플루엔자 바이러스의 아형이 제한적이거나 조류에서는 다양한 아형의 바이러스가 감염되고 있으며, 동일 아형 간에도 다양한 유전자 변이주가 출현하고 있음.
3. 인플루엔자 감염이 의심될 경우에는 현장에서 면역크로마토그래피법을 이용한 간이진단 키트를 이용하고 있으나 민감도가 낮고, 특히 동물종(오리, 토종닭 등)에 따라 위양성반응이 나타나는 결정적인 단점이 있음
 - 따라서 간이진단키트로 음성인 시료에 대해서도 재차 검사시료를 전문 진단기관으로 송부하여 정밀진단을 받아야 하며, 진단기관에서는 바이러스 분리 동정 및 유전자진단법(RT-PCR, real time RT-PCR 등)으로 인플루엔자 바이러스를 진단하고 있음.

4. 유전자진단법(RT-PCR, real time PCR)은 신속하며, 민감도와 특이도가 높아 세계 각국의 진단기관에서 보편적으로 사용되고 있으나 검사시료 전처리, 바이러스 핵산추출, cDNA 합성, RT-PCR, PCR 증폭결과를 확인하기 위한 전기영동 및 핵산 염색, UV 투사장비를 이용한 증폭밴드 확인 등 여러 단계의 실험과정을 거쳐야 하며, 각 실험단계별로 고가의 장비와 검사키트를 이용하게 됨으로 현 검사시스템으로는 현장진단법으로 이용하기가 곤란함.
5. 최근 Loop-mediated isothermal amplification(LAMP)기법이 개발되어 인플루엔자바이러스 진단에 적용된 보고가 있어 이에 대한 검토가 필요하며, 돼지 인플루엔자 바이러스 진단키트, 고병원성 여부 및 항바이러스 유전자 진단 키트에 우선 적용하여 효용성을 비교 검토.
6. 따라서 본 연구에서는 RT-PCR 이전의 모든 전처리과정이 생략되고, RT-PCR 이후의 확인과정이 현장에서 가능한 현장진단용 RT-PCR 시스템 즉, pan-side RT-PCR 및 pan-side real time RT-PCR 진단키트 및 장비를 개발하여 인플루엔자 바이러스의 현장진단이 가능하며, 진단에 소요되는 각종 키트와 고가 장비 사용에 따른 진단경비를 획기적으로 절감하고자 한다.

제 2장. 국내외 기술개발 현황

제 1절. 논문, 특허, 시장 분석을 통한 국내외 기술 및 시장 현황

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

| 개발기술명 | 관련기술 최고보유국 | 현재 기술수준 | | 기술개발 목표수준 | 비고 |
|--|---------------|---------|-------|--------------|----------------------|
| | | 우리나라 | 연구신청팀 | | |
| 다중 RT-PCR 및 real time RT-PCR 키트 개발 능력 | 미국, 유럽 | 70% | 90% | 100% | |
| 기존의 변온블록형 RT-PCR 외에 다른 방법으로 RT-PCR 을 개발할 수 있는 능력 | 미국, 유럽 | 50% | 90% | 100% | 본연구팀 주관기과 특허보유 |
| uTAS 기술 기반 PCR-Chip 개발 능력 | 미국, 유럽 | 70% | 70% | 100% | |
| 박막 히터 설계 능력 | 미국 | 50% | 50% | 80% | |
| 비정제 핵산 증폭 기술(Direct PCR) | 미국, 유럽 | 80% | 90% | 100% | 본연구팀 참여기업 특허보유 |

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

| | |
|-------|---|
| 대상국가 | 한국(KR), 미국(US), 국제특허(WO), 중국(CN), 일본(PAJ) |
| 특허 DB | 한국(KIPO), 미국(USPTO), 국제특허(WIPO) |
| 검색기간 | 최근 10년간 |
| 검색범위 | 특허공개 및 요약, 전체청구항 |

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

| 개발기술명 | 인플루엔자 바이러스 PCR 진단 키트 | | | |
|---------------|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Keyword | 검색식: AB=[Influenza*diagnosis*PCR] | | | |
| 검색건수 | 국내:58, 미국:333, 유럽:275, 일본:55, 중국:2 | | | |
| 유효특허건수 | 국내:2, 미국:4, 유럽:1, 일본:1, 중국:1 | | | |
| 핵심특허 및 관련성 | 특허명 | 신종 인플루엔자 A형 바이러스 진단용 | 인플루엔자 A형 바이러스 및 돼지 유래인플루엔자 | Multiple RT-PCR method for |

| | | | | |
|--|--------|--|---|---|
| | | 프라이머, 프로브, 이를 포함하는 키트 및 상기 키트를 이용한 진단 방법 | (신종 플루) 바이러스 검출용 프라이머와 이를 이용한 돼지 인플루엔자 검출 및 확진방법 | diagnosing equine influenza virus and identifying subtype thereof |
| | 보유국 | 대한민국 | 대한민국 | 중국 |
| | 등록년도 | 미등록(출원2010) | 2013 | 2008 |
| | 관련성(%) | 30 | 30 | 20 |
| | 유사점 | 사람의 신종인플루엔자 진단을 위한 PCR 기법 | 돼지를 대상으로 한 돼지 인플루엔자와 신종인플루엔자의 PCR 진단법 | 말 인플루엔자 바이러스 진단용 PCR 기법 |
| | 차이점 | <ul style="list-style-type: none"> •현장 진단용이 아니며, 진단 대상이 신종인플루엔자 바이러스에 국한됨 •본과제의 현장 진단용 다축종 감별진단기법 개발내용과 다름 | <ul style="list-style-type: none"> •진단 대상 축종이 돼지이며, 돼지 및 신종인플루엔자바이러스에 국한되며, 현장 진단용이 아님 •본과제의 현장 진단용 다축종 감별진단기법 개발내용과 다름 | <ul style="list-style-type: none"> •진단 대상이 말 인플루엔자 바이러스에 국한되며, 현장 진단용이 아님 •본과제의 현장진단용 다축종 감별진단기법 개발내용과 다름 |

| 개발기술명 | | 초고속 핵산 정제 및 direct PCR |
|------------|--------|---|
| Keyword | | 검색식: AB=[Rapid*Nucleic*acid*Purification*direct*PCR] |
| 검색건수 | | 국내: 161, 미국: 1,794, 유럽: 1,569, 일본: 84, 중국: 0 |
| 유효특허건수 | | 국내: 1, 미국: 0, 유럽: 0, 일본: 0, 중국: 0 |
| 핵심특허 및 관련성 | 특허명 | 초고속 핵산의 정제 방법 |
| | 보유국 | 대한민국 |
| | 등록년도 | 2012 |
| | 관련성(%) | 100 |
| | 유사점 | <ul style="list-style-type: none"> •현장 진단 적용이 가능하도록 하기 위해 필수적인 기술로 현재 사용되고 있는 복잡한 과정의 시료 전처리 및 바이러스 핵산 분리를 간편화한 기술 |
| | 차이점 | |

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

| | |
|-------|----------------------------------|
| 대상국가 | 미국, 일본, 유럽 |
| 논문 DB | Pubmed DB (www.ncbi.nlm.nih.gov) |
| 검색기간 | 최근 5년간 |
| 검색범위 | 제목, 초록 및 키워드 |

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

| | | |
|---------------|--|---|
| 개발기술명 | 인플루엔자 바이러스 RT-PCR 현장 진단 키트 | |
| Keyword | 검색식: AB=[Influenza virus*RT-PCR*diagnostic kit] | |
| 검색건수 | 33 | |
| 유효논문건수 | 12 | |
| 핵심논문 및 관련성 | 논문명 | Development and evaluation of a rapid influenza diagnostic test for the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus. |
| | 학술지명 | Journal of Clinical Microbiology |
| | 저자 | Kwon D, Shin K, Kwon M, Oh HB, Kang C, Lee JY |
| | 게재년도 | 2011 |
| | 관련성(%) | 30 |
| | 유사점 | PCR기법을 이용한 신종 인플루엔자 신속진단 (사람의 신종인플루엔자바이러스 만을 대상으로 함) |
| 차이점 | 본 과제에서 목표로 하는 현장진단용 및 다축종 동물 인플루엔자바이러스의 감별진단용이 아님 | |

| | | |
|---------------|--|--|
| 개발기술명 | 인플루엔자 바이러스 RT-PCR 현장 진단 키트 | |
| Keyword | 검색식: AB=[Influenza virus*RT-PCR*diagnostic kit] | |
| 검색건수 | 33 | |
| 유효논문건수 | 12 | |
| 핵심논문 및 관련성 | 논문명 | Detection of novel swine origin influenza A virus (H1N1) by real-time nucleic acid sequence-based amplification. |
| | 학술지명 | Journal of Virological Methods |
| | 저자 | Ge Y, Cui L, Qi X, Shan J, Shan Y, Qi Y, 썸 B, Wang H, Shi Z |
| | 게재년도 | 2010 |
| | 관련성(%) | 20 |
| | 유사점 | PCR을 이용한 돼지에서의 신종 인플루엔자바이러스 진단 |

| | | |
|--|-----|---|
| | | (돼지의 신종인플루엔자바이러스만 대상) |
| | 차이점 | 본 과제에서 목표로 하는 현장진단용 및 다축종 동물 인플루엔자바이러스의 감별진단용이 아님 |

| 개발기술명 | | 인플루엔자 바이러스 RT-PCR 현장 진단 키트 |
|------------------|--------|--|
| Keyword | | 검색식: AB=[Influenza virus*RT-PCR*diagnostic kit] |
| 검색건수 | | 33 |
| 유효논문건수 | | 12 |
| 핵심논문 및 관련성 | 논문명 | Optimization of one-step duplex real-time RT-PCR for detection of influenza and respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. |
| | 학술지명 | Journal of Virological Methods |
| | 저자 | de-Paris F, Beck C, Machado AB, Paiva RM, da Silva Menezes D, de Souza Nunes L, Luchenbecker R, Barth AL |
| | 게재년도 | 2012 |
| | 관련성(%) | 30 |
| | 유사점 | 인플루엔자 바이러스의 PCR 진단 (사람의 호흡기질병 시료로부터 인플루엔자 및 호흡기질병 진단용) |
| | 차이점 | 본 과제에서 목표로 하는 현장진단용 및 다축종 동물 인플루엔자바이러스의 감별진단용이 아님 |

| 개발기술명 | | 초고속 핵산 정제 및 direct PCR |
|------------------|--------|--|
| Keyword | | 검색식: AB=[rapid nucleic acid purification*direct PCR] |
| 검색건수 | | 190 |
| 유효논문건수 | | 12 |
| 핵심논문 및 관련성 | 논문명 | A five minute DNA extraction method for expedited detection of Phytophthora ramorum following prescreening using Phytophthora spp. lateral flow devices. |
| | 학술지명 | Journal of Microbiological Methods |
| | 저자 | Mens PF, de Bes HM, Sondo P, Laochan N, Keereecharoen L, van Amerogen A, Flint J, Sak JR, Proux S, Tinti H, Schalling HD |
| | 게재년도 | 2010 |
| | 관련성(%) | 20 |
| | 유사점 | 핵산 추출 과정의 간소화 |
| | 차이점 | -핵산 추출과정은 간소화 되었으나 추출과정에 장비를 필요로 함 |

| | |
|--|--|
| | -본 과제에서 목표로 하는 현장진단용 및 다축종 동물 인플루엔자바이러스의 감별진단용이 아님 |
|--|--|

| 개발기술명 | | 초고속 핵산 정제 및 direct PCR |
|---------------|--|--|
| Keyword | 검색식: AB=[rapid nucleic acid purification*direct PCR*diagnostic kit] | |
| 검색건수 | 26 | |
| 유효논문건수 | 3 | |
| 핵심논문 및 관련성 | 논문명 | development of a rapid DNA extraction method and one-step nested PCR for the detection of Naegleria fowleri from the environment |
| | 학술지명 | Water Research |
| | 저자 | Ahmad AF, Lonnen J, Andrew PW, Kilvington S. |
| | 게재년도 | 2011 |
| | 관련성(%) | 50 |
| | 유사점 | 핵산 추출의 간소화와 direct PCR system |
| | 차이점 | 본 과제에서 목표로 하는 현장진단용 및 다축종 동물 인플루엔자바이러스의 감별진단용이 아님 |

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

(1) 진단 시장 구조 및 경쟁현황

(가) 현재 감염성 질환 진단시장은 면역검사법, 분자진단법 및 바이오칩 제품들이 주종을 이루고 있음. 면역검사 시장은 효소면역검사용과 신속진단용 (응집 검사법 및 신속진단키트) 제품들이 개발되어 있으나, 효소면역검사는 감도 및 특이도는 높으나 시간이 오래 걸리고, 시료가 많이 드는 단점이 있으며, 신속진단법은 위음성(false negative) 등 잘못된 결과가 나타나는 단점이 있음. 그러나 신속진단키트는 휴대의 용이성, 신속성 때문에 2006년 52억\$의 시장이 형성되었고, 연평균 6% 성장을 이루고 있음

(나) 분자 진단법 중 PCR법이 가장 많이 사용되고 있는 방법으로, 시간 및 비용이 많이 소요되고, 특정 전문기관에서만 수행되고 있는 단점이 있음. 국내에서도 이미 많은 진단 키트들이 개발되어 판매되고 있음

(2) 국내외 바이러스 진단 키트 시장 조사 결과

<진단시장>

(단위 : 억원, 억 달러)

| 연도 | 2010년 | 2011년 | 2012년 | 2013년 | 2014년 |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 전세계(억 \$) | 455 | 487 | 521 | 558 | 597 |
| 국내(억원) | 6,835 | 7313 | 7825 | 8373 | 8959 |

Source: www.kosen21.org [국내시장: 세계시장의 1% 가정]

<분자 진단시장>

| 연도 | 2010년 | 2011년 | 2012년 | 2013년 | 2014년 |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 전세계(억 \$) | 16.15 | 18.73 | 21.73 | 25.00 | 31.25 |
| 국내(억원) | 226 | 262 | 304 | 250 | 438 |

Source: Jain PharmaBiotech [국내시장: 세계시장의 1% 가정]

<2005, 한국과학기술정보연구원, 진단키트>

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

(1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- (가) 시료전처리 및 핵산 추출과정이 one tube processing으로 처리되기 때문에 기존 시료 전처리 및 핵산추출에 소요되는 고가장비와 키트의 사용이 필요치 않으므로 진단경비 및 진단시간이 획기적으로 개선되어 인플루엔자 진단기관의 선호도가 기존 제품에 비해 매우 높을 것으로 예상됨(진단시간 및 경비 30% 이상 절감)
- (나) 초간편화된 시료 처리 및 핵산추출 과정을 거쳐 현장에서 RT-PCR 및 real time RT-PCR이 가능해지고, PCR 결과 또한 현장 확인이 가능해짐으로써 국가 및 민간 진단 기관에서 신속한 방역조치를 위한 현장진단 목적으로 구입 사용할 것으로 기대됨
- (다) 동물중병 인플루엔자 바이러스의 주요 아형은 물론 유사증상이 나타내는 감별 대상질 병들을 동시에 감별진단할 수 있는 방향으로 키트를 개발함으로써 일선 병원에서도 사용이 확대될 수 있을 것으로 기대됨
- (라) 동물중병 인플루엔자 바이러스 주요 아형을 벗어나는 다양한 아형의 바이러스에 대한 추가 진단이 가능한 보조진단키트를 개발 제공함으로써 모든 개발 키트를 패키지 형태로 제공할 수 있어 시장 확대가 기대됨
- (마) RT-PCR 은 시료를 변경하면 다양한 종류의 바이러스에 대응이 되기 때문에 제품의 완성도가 기존의 고가의 RT-PCR 에 버금가게 되면 산업적으로 큰 의미를 가질 수 있을 것으로 기대됨.
- (바) 또한 기존의 RT-PCR 대비 처리 속도를 30분이내로 줄이게 될 경우, 기존의 RT-PCR 시장에서 큰 반향을 일으킬 수 있을 것으로 판단함.

(2) 산업화를 통한 기대효과

- (가) 기존의 PCR 진단과정에 비하여 30% 이상 진단 경비와 시간이 절약된 개발 진단키트를 이용할 경우 인플루엔자 진단에 소요되는 가축방역 예산 절감이 가능함
- (나) 개발 키트를 이용한 신속한 현장진단으로 동물 인플루엔자 방역의 효율성이 증진되어 축산업의 피해 확산 방지 및 국민 공중보건에 기여
- (다) 개발 키트 국내사용을 통한 수입키트의 수입대체 효과 및 해외 수출을 통한 외화 획득

(단위 : 백만원)

| 산업화 기준 항 목 | 1차년도 | 2차년도 | 3차년도 | 계 |
|---------------|-----------|-----------|-----------|------------|
| 직접 경제효과 | 300,000 | 300,000 | 300,000 | 900,000 |
| 경제적 파급효과 | 4,000,000 | 4,000,000 | 4,000,000 | 12,000,000 |
| 부가가치 창출액 | 2,600,000 | 2,600,000 | 2,600,000 | 7,800,000 |
| 합 계 | 6,900,000 | 6,900,000 | 6,900,000 | 20,700,000 |

(“상기의 표는 전북대학교 농업생명과학대학 농업경제학과 양병우 교수가 작성한 주요 가축전염병의 발생동향과 대응과제“ 자료를 기반으로 하여 가축 전염병으로 인한 국가적 피해액을 기반으로 작성한 자료임)

- 동물 진단 시장은 2008년 250억 달러에서 2011년 300억 달러 규모로 성장해 2016년까지 연평균 복합 성장률 (CAGR) 7.2 % 로 성장, 420 억 달러를 넘어설 전망 (출처 : (주)글로벌인포메이션)

5. 연구결과가 국내외 기술개발에 차지하는 위치분석

가. 특허분석 측면

(1) 진단키트 분야 : 기존 특허는 대부분 특정 동물종이나 특정 인플루엔자 바이러스의 아형 진단에만 국한 되어 있으며, 현장에서의 직접 진단이 아닌 진단 전문 기관이나 실험실에서만 수행이 가능한 진단법을 대상으로 하고 있음

- 따라서 본 연구 과제에서는 다축종, 주요 아형의 인플루엔자바이러스 및 유사질병을 현장에서 진단할 수 있는 키트로 구성하고 있을 뿐 아니라, 보조 키트를 통해 모든 인플루엔자바이러스의 동정이 현장에서 가능한 방향으로 연구를 추진하여 현장 진단이 가능한 인플루엔자 및 유사질환 감별 키트 특허 등을 국내 및 국외에 출원

(2) 진단장비 분야 : RT-PCR 분야는 PCR 이 처음 개발된 이후에 기본적인 메커니즘은 거의 변한 것이 없음. 이것은 항온 블럭을 이용하는 현재의 PCR 기기가 높은 안정성과 성능을 보이고 있기 때문임. 다만, 그 크기가 휴대하기에는 지나치게 크기 때문에 PCR 개발은 휴대성을 강조한 소형화를 목적으로 진행되고 있음. 최근에 아람 바이오에서 손바닥 크기 정도의 Thermal Cycler를 개발하여 주목을 받았으나, 이 경우는 오직 Thermal Cycler 크기만을 축소시킨 것으로서 전처리 및 RT-PCR 기능은 추가로 수행해야 하는 것임. 즉, 분석을 위해서 Thermal Cycling 후에 전기영동 과정이 반드시 수반되어야 함. 따라서 조류 독감 바이러스나 구제역 바이러스와 같이 전염속도가 매우 빠르고 광범위하게 감염이 일어나는 경우에는 휴대성이 아무리 높다 하더라도 RT-PCR 아니면 크게 의미가 있다고는 볼 수 없음.

- PCR의 핵심은 “정확한 목표 온도에서의 등온 유지”라고 할 수 있다. 따라서 다양한 열처리 방법이 제시되더라도 등온 유지부분에 대한 대책을 제시하지 못하면 실제로 구현하기는 어려운 특허라고 할 수 있다. 그런데 현재 국내 특허로 발표되어 있는 PCR 에는 이 등온 유지 방법에 대한 부분이 누락된 채, 오직 열처리 그 자체에 대해서만 발표를 하고 있다. 따라서 많은 관련 특허가 발표되었음에도, 여전히 상용화 된 제품은 기존의 항온블록 방법을 재연하고 있다. 본 연구 개발에서는 이 부분을 중요시하여 등온 유지에 많은 연구 투자를 하고자 한다.

나. 논문분석 측면

(1) 진단키트 분야 : 기존 논문 또한 특허와 유사하게 특정 동물종이나 특정 인플루엔자 바

이러스의 아형 진단에만 국한 되어 있으며, 현장에서의 직접 진단이 아닌 진단 전문 기관이나 실험실에서만 수행 가능한 진단법 개발 내용이 대부분이며, 현장진단용으로 개발된 진단법일지라도 기존의 시료 전처리 및 핵산 추출 과정을 전제로 하고 있어 현장 적용에는 한계가 있음

- 따라서 본 연구과제에서 개발되는 pan-side direct RT-PCR 및 direct real time RT-PCR 기법을 이용한 동물종별 인플루엔자 바이러스 주요 아형 진단법은 학술적인 독창성과 진보성이 인정되므로 국내외 우수 학술지에 다수 게재할 수 있음

(2) 진단기기 분야 : 현재 발표되는 논문은 대체로 기존의 PCR Tube에서 벗어나 전처리 공정이 포함된 All-in-one Lab on a chip 형태를 추구하고 있음.

- 전처리 과정은 장비 보다는 Chip 상에서 해결이 되어야 함. 즉, 현재 사용하고 있는 Tube 형태의 RT-PCR 로는 번거로운 수동 전처리 과정은 불가피한 것임. 따라서 전처리 과정까지 포함하는 Chip을 개발하고자 많은 연구가 진행되고 있고, 본 개발팀이 2차년도에 PCR-Chip을 개발계획에 포함시킨 것은 이와 같은 목적을 가지고 있기 때문임.
- 지금은 Tube를 이용한 시스템이 완성도 높아 Chip으로 바뀌지는 않겠지만, 시간과의 싸움에서 승리하기 위해서는 전처리 과정이 포함될 수 있는 uTAS 기술기반 Lab on a chip이 결국 시장에 등장하게 될 것으로 판단함.

나. 제품 및 시장분석 측면

(1) 진단 키트분야 : 현재 시판되는 동물 인플루엔자 현장 진단키트는 면역크로마토그래피법이 대부분이며, RT-PCR 기반 기술은 실험실진단용으로 개발, 시판되고 있음.

- 본 과제에서 개발되는 pan-side direct RT-PCR 및 direct real time RT-PCR 키트는 실험실진단에서 기존의 진단키트보다 진단경비와 시간을 절감할 수 있어 제품 경쟁력에 있어 우위에 설 것으로 예상됨
- 또한 개발되는 현장진단용 휴대장비와 접목하여 현장진단에 활용할 경우, 기존의 면역크로마토그래피법에 비해 진단의 민감도와 특이성이 월등히 높기 때문에 현장진단키트로서도 제품의 경쟁력을 확보할 수 있음

(2) 진단 기기분야 : 현재 DNA 진단 시장은 100 % 기존의 항은 블록형 PCR 이 장악하고 있음. 그리고 다른 형태의 기기가 제시된 바도 거의 없다고 할 수 있음. 이것은 기존의 방법이 매우 안정적이고, 성능의 신뢰성이 높기 때문으로 볼 수 있음. 따라서 사용법도 대부분 통일되었을 것으로 판단하고, 새로운 개념의 제품이 시장에 나올 때 가장 먼저 극복해야 하는 부분으로 판단함. 성능이 월등하더라도 사용이 낫설면 수요의 발생 속도가 매우 늦어지게 됨. 따라서 최대한 사용법을 간단히 한 One Touch Type 이 먼저 개발되어야 하고, 여기에 성능이 보장되면 기존의 시장이 확장되거나, 혹은 시장의 일부를 선점할 가능성은 충분함. 특히 휴대성을 강조하고 사용법이 극히 단순한 RT-PCR 장비는 현재까지 시장에 없는 제품이므로 개발 후, 상용화하면 충분히 시장이 열릴 것으로 판단함.

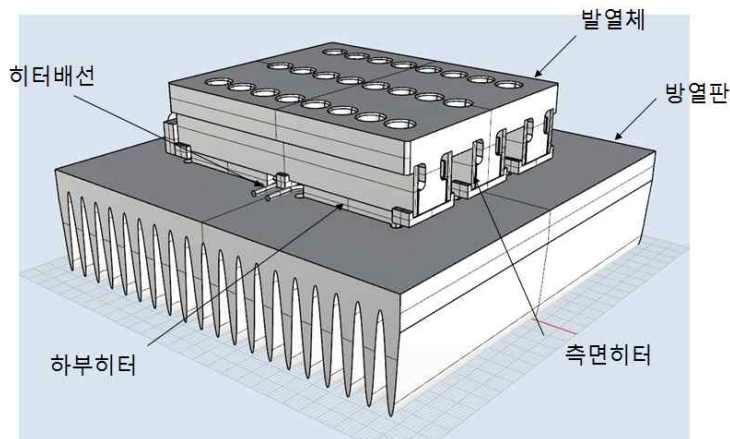
제 3장. 연구수행 내용 및 결과

제 1절. 다축종 (산업동물 및 반려동물 포함) 적용 가능한 신속, 정확한 인플루엔자 검출 기법 개발 및 상용화

1. 제품화를 위한 추진 사항 및 배경

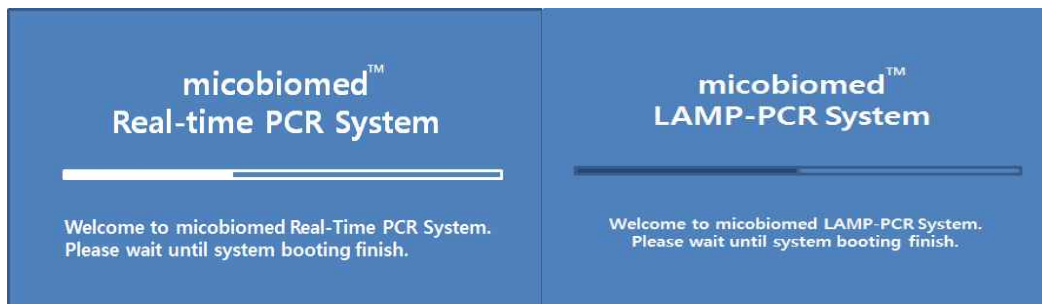
- RT-PCR 및 LAMP-PCR 성능 향상을 위한 설계 및 부품 조정, 회로설계 및 펌웨어 & debugging을 통해 제품화 추진
- 현재 RT-PCR 및 LAMP-PCR의 성능은 기존의 제품과 비교할 때, 히터의 성능이 다소 부족하여 개선을 실시함.

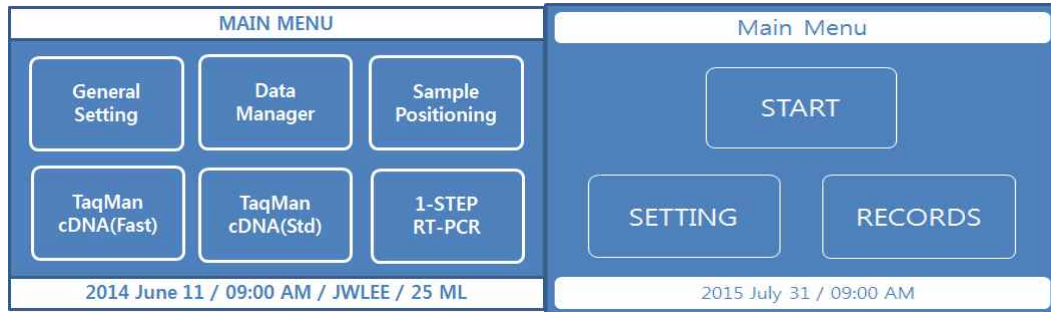
<히터 구조>



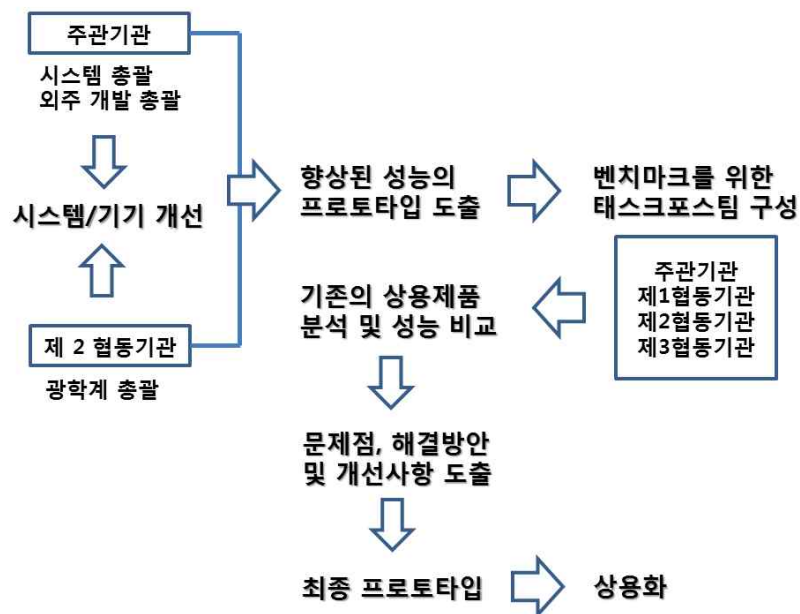
- 그림과 같이 RT-PCR (LAMP-PCR 도 동일함)의 히터 구조는 특허를 출원할 정도로 독창성을 가진 것으로서 각 Hole 자체가 발열체에 형성되어 있고, 주위의 두개의 히터가 측면에서 가열을 하여 열효율을 극대화 시킨 것임. 그러나 발열체 및 측면히터의 전력 설계의 측면에서 승온과 강온이 좀 더 빠른 히터가 요구됨. 따라서 히터의 설계를 수정하고 기존의 히터보다 향상된 제품을 확보해야 함.
- 히터 외에도 히터에서하우징으로 전도되는 열을 더욱더 차단할 수 있는 기구를 하우징 내에 마련해야 함. 현재 빗살무늬 모양의 표면을 가진 내열 플라스틱으로 히터에서 하우징으로의 열전달을 최대한 차단하고 있고, 좋은 효과를 나타내기 위한 시스템의 재설계 및 제작을 진행함.

<UI (사용자 인터페이스)>





- 상기와 같은 현재의 사용자 인터페이스는 현장의 긴급한 상황에서 최대한 빨리 실험에 도달할 수 있도록 디자인 된 것으로서 세부 설정의 측면에서 좀 더 보강을 실시함(파일 처리, USB 복사 등).
- 주관기관 및 협동기관으로 구성된 벤치마크팀 구축 및 기기 테스트 실시



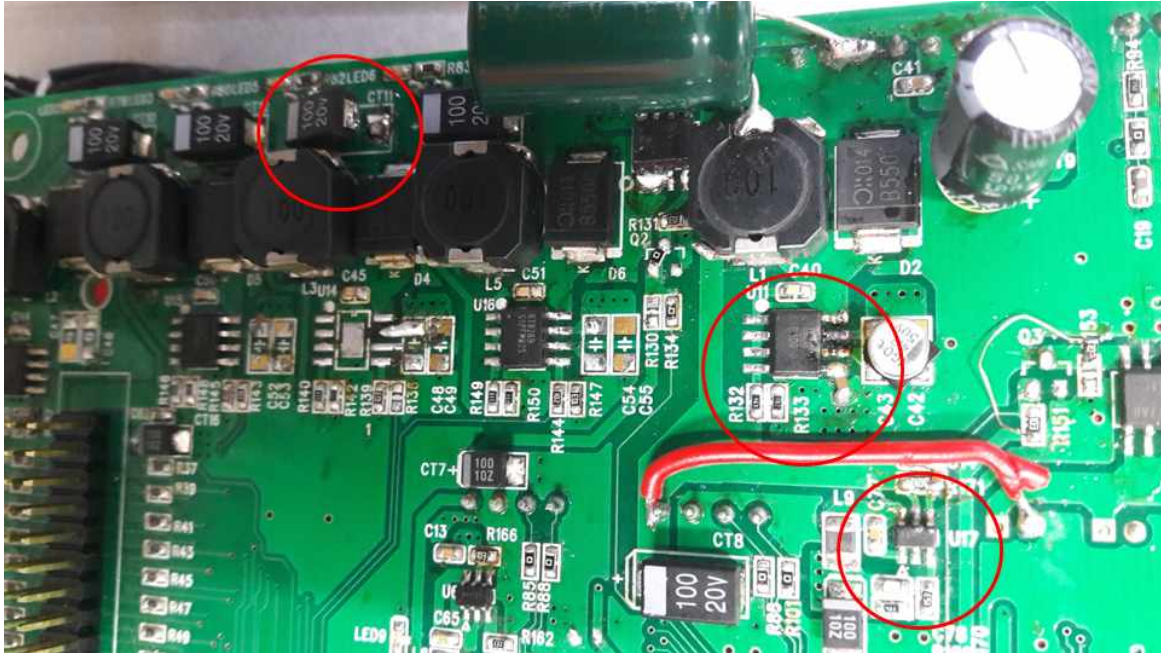
- 품질 및 안정화를 통해 시스템의 신뢰성이 향상된 2종의 PCR 시스템의 제품화를 수행함.

2. Real time RT-PCR 제품화

가. Main board 제작 및 보완

(1) 장애 발생 부분 해결

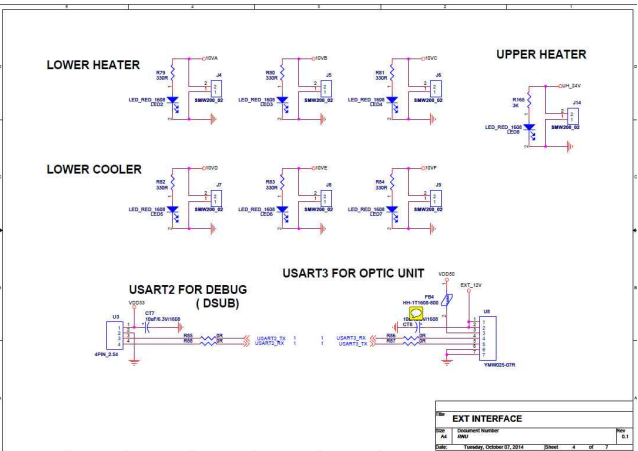
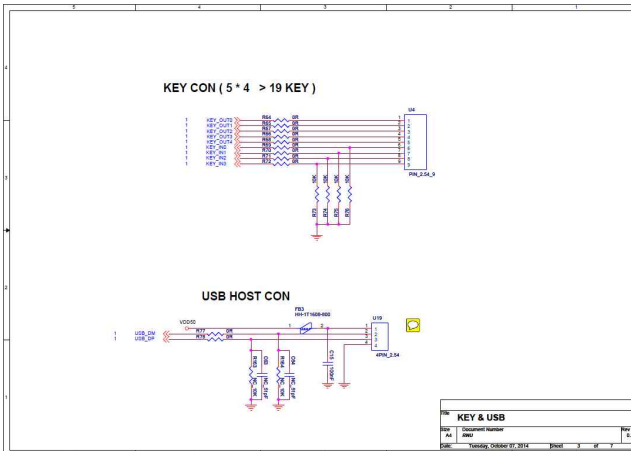
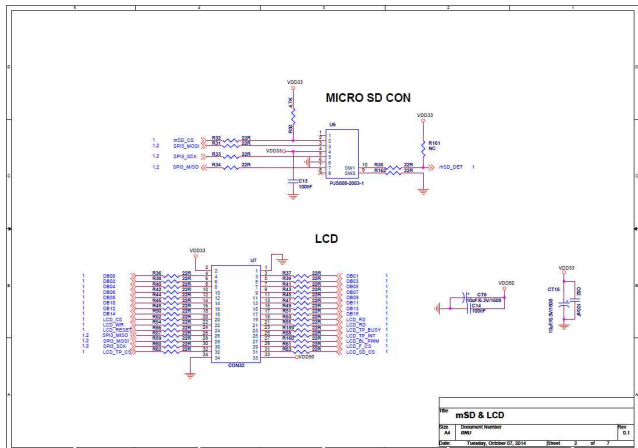
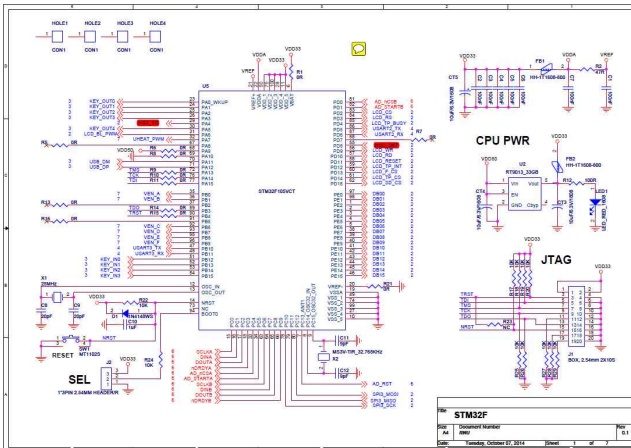
- U11 메인 전원 투입 직후 소실
- U17 메인 보드 12V 라인에 외부 전원 투입 시 소실
- CT11 Ground가 탈락

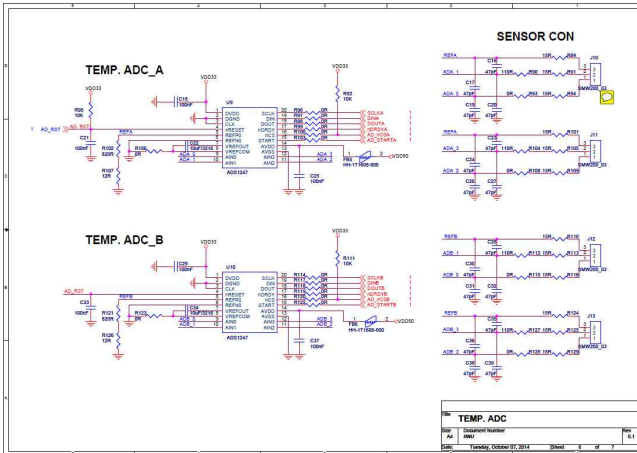


나. 회로설계 및 보완

(1) 회로설계(최종)

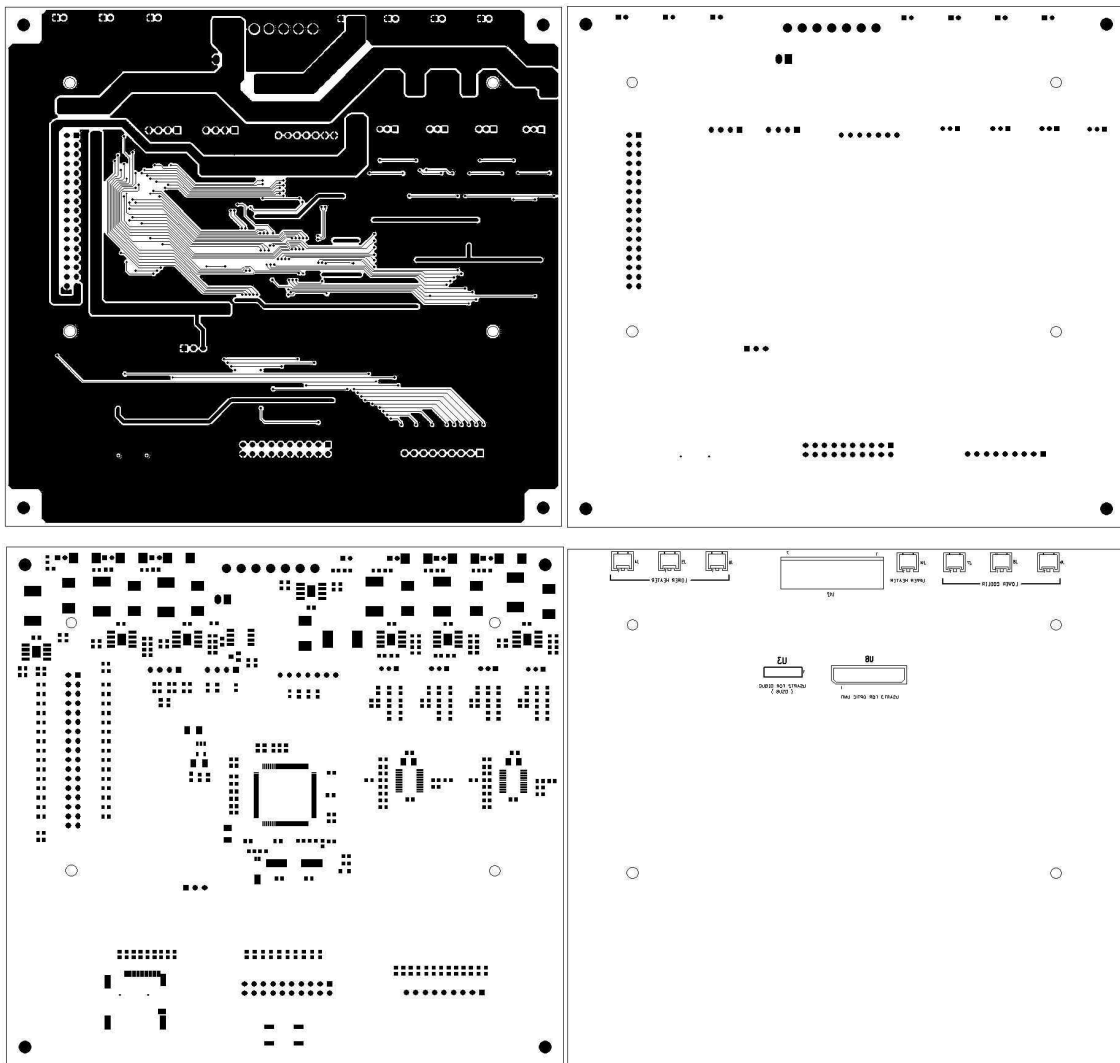
- 중앙 처리에 필요한 Heater, Heater control 및 주요 모듈간의 연계를 통합적으로 제어할 수 있는 회로 수정 및 변경

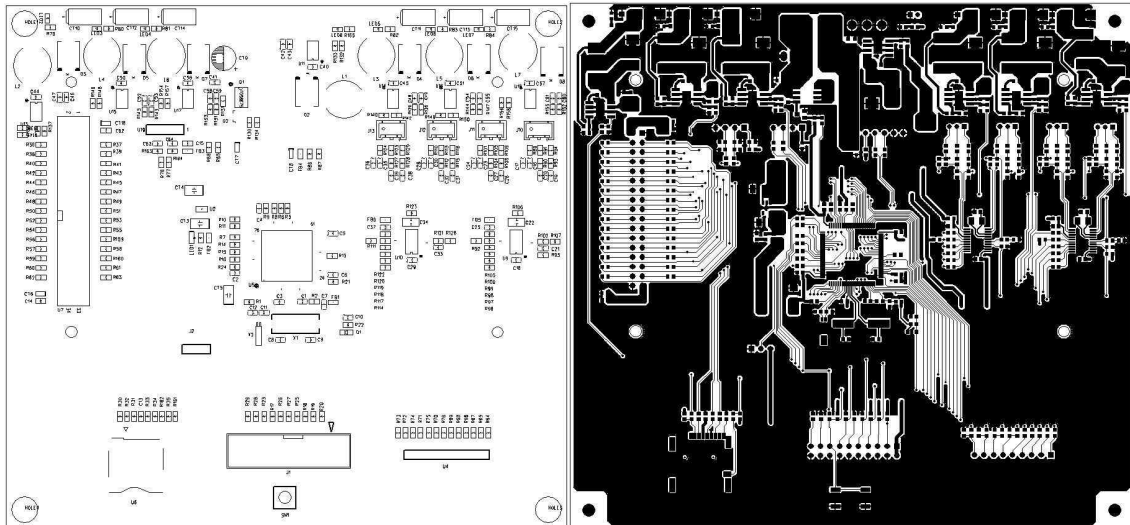




(2) 아트웍 최종

- 회로를 기반으로 PCB 보드를 제작하기 위한 작성 실시 및 보완 완료

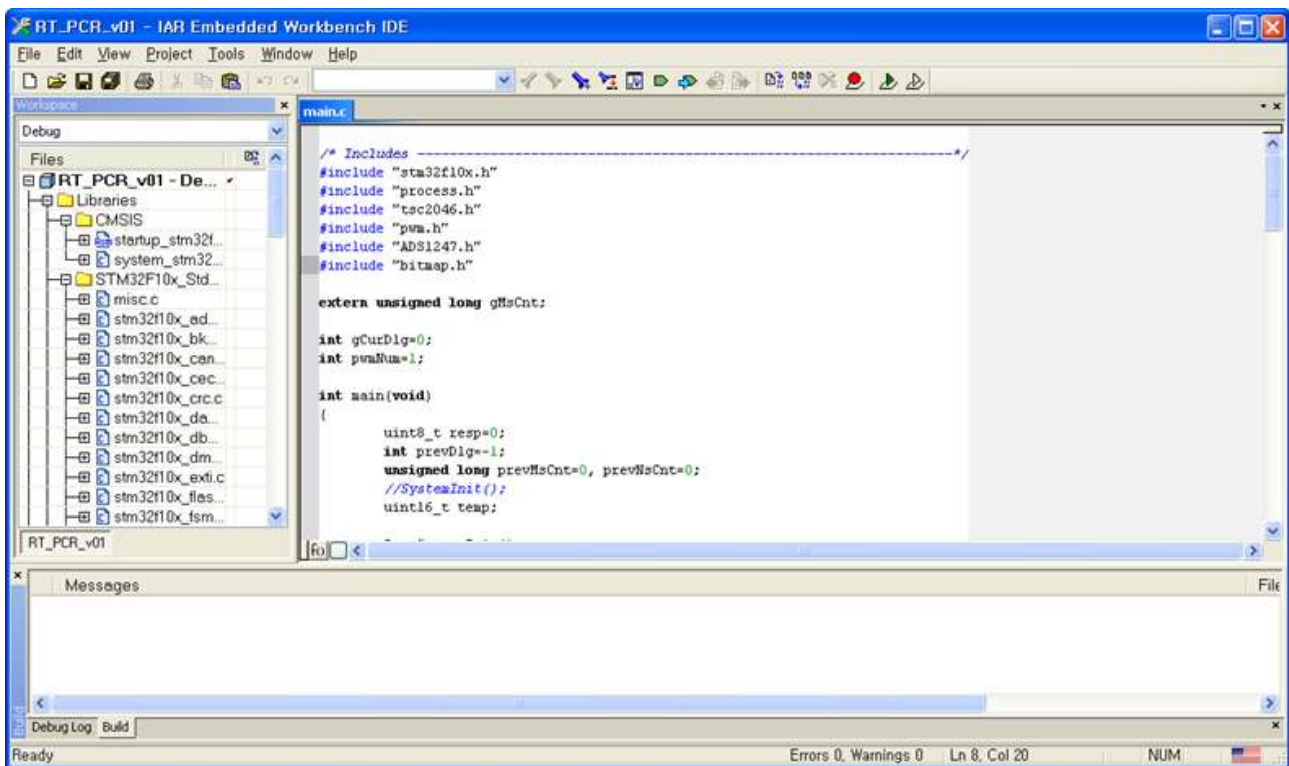




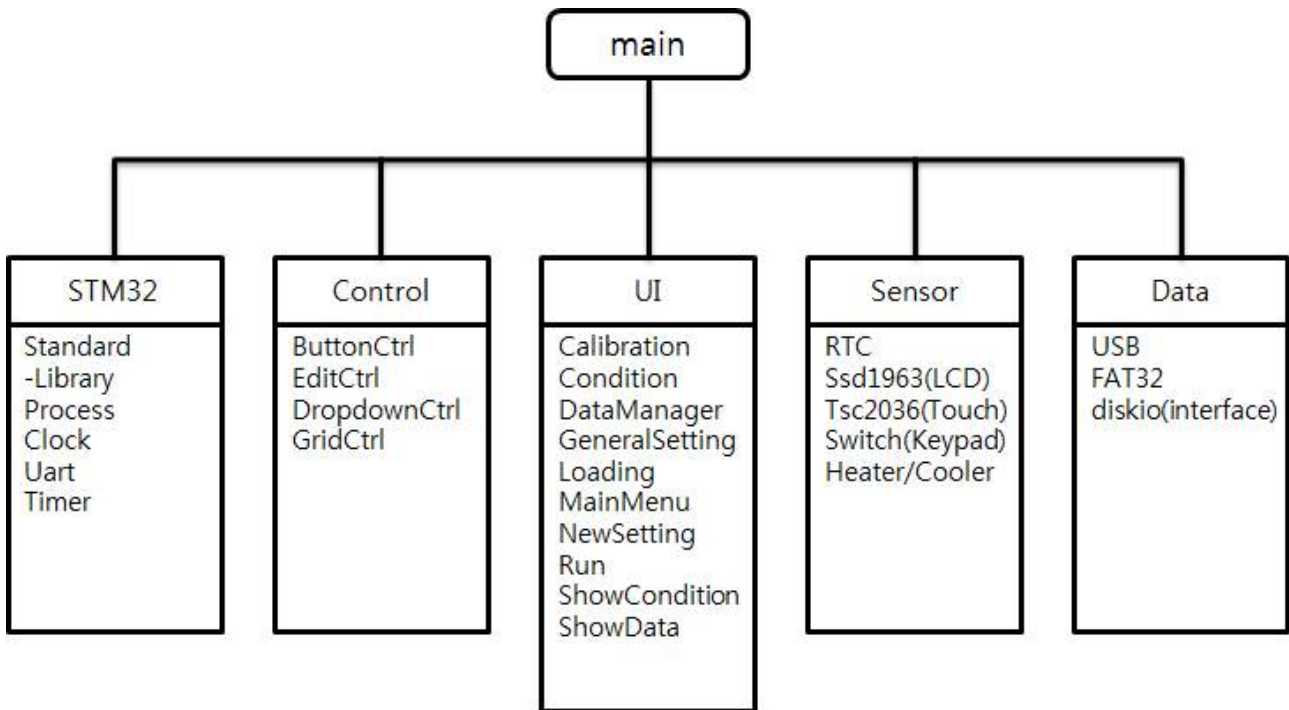
다. 펌웨어 개발 및 Debugging

(1) 시스템 펌웨어 구성 및 설계

- 개발 툴은 IAR(Imbedded Workbench for ARM 6.30) 활용하여 펌웨어를 개발하고 bug를 수정완료함.



- 클래스 구성을 통한 시스템의 control를 위한 기반 구축



- 클래스 설계 및 기능 부여

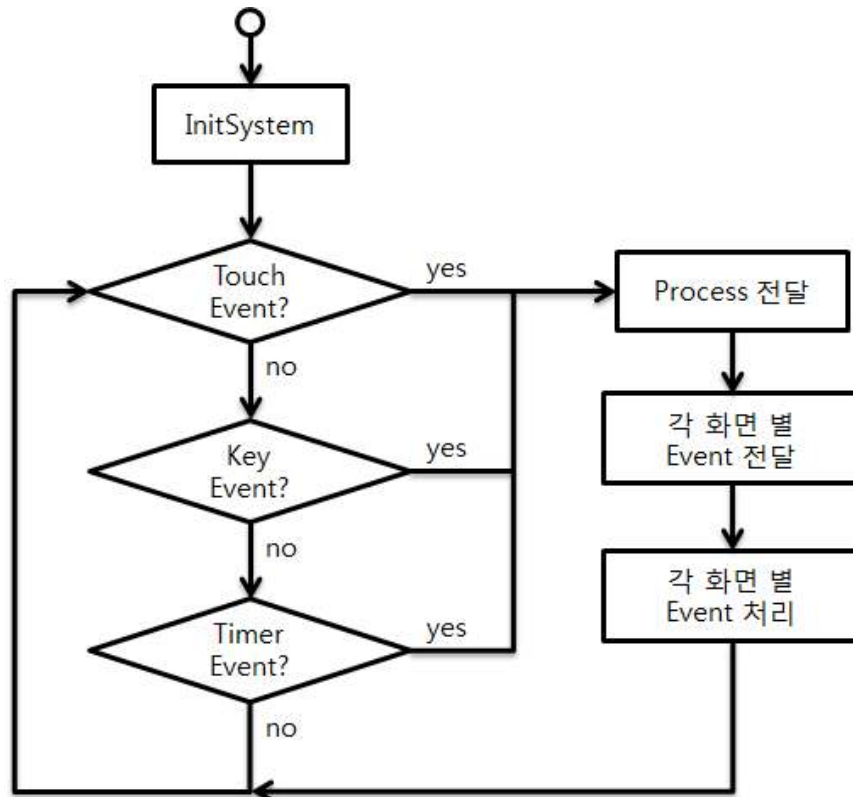
| 클래스 | 기능 | 파일 |
|---------|--|---|
| main | <ul style="list-style-type: none"> - Touch Event Check - Key Event Check - Timer Event Check - UI 화면 전환 - Process 클래스로 이벤트 전달 | main.c |
| Process | <ul style="list-style-type: none"> - 화면 별 Touch Event 전달 - 화면 별 Key Event 전달 - 화면 별 Timer Event 전달 - 화면 구성 - 하단 상태 바 구성 - SD 및 USB 초기화 | process.h process.c |
| clock | <ul style="list-style-type: none"> - 시스템 클럭 초기화 - 시스템 포트 클럭 설정 | clock.h clock.c |
| uart | <ul style="list-style-type: none"> - USART 통신 초기화 및 인터럽트 설정 - USART 데이터 송수신 루틴 | uart.h uart.c |
| timer | <ul style="list-style-type: none"> - 타이머 초기화 및 인터럽트 설정 - 타이머 인터럽트 루틴 | timer.h timer.c |
| RTC | <ul style="list-style-type: none"> - RTC 초기화 - RTC 설정 및 반환 (SetTime(), GetTime()) | rtc.h rtc.c |
| SSD1963 | <ul style="list-style-type: none"> - LCD 초기화 - Draw Dot, Line, Rectangle, Text | ssd1963.h ssd1963.c font.h arrowBitmap.c |

| 클래스 | 기능 | 파일 |
|---------------|--|----------------------------------|
| Switch | <ul style="list-style-type: none"> - 키 패드 포트 초기화 - 키 입력 인터럽트 루틴 및 키 값 변환 루틴 | switch.h switch.c |
| TSC2046 | <ul style="list-style-type: none"> - 터치 패드 초기화 - 터치 인터럽트 루틴 - 터치 좌표 변환 및 반환 - 터치 보정 데이터 저장 | tsc2046.h tsc2046.c |
| Heater/Cooler | <ul style="list-style-type: none"> - 온도조절 Relay 제어 - 가열/냉각 온도 제어 | DlgRun.h DlgRun.c |
| EditCtrl | <ul style="list-style-type: none"> - 입력 컨트롤 초기화 - 입력 문자열 반환 - 입력 문자열 길이 반환 - 입력 문자 숫자 변환 - 입력 컨트롤 화면 표시 | editControl.h editContrl.c |
| DropdownCtrl | <ul style="list-style-type: none"> - 드롭다운 컨트롤 초기화 - 드롭다운 컨트롤 항목 설정 및 추가 - 드롭다운 컨트롤 선택 항목 반환 - 드롭다운 컨트롤 화면 표시 | dropdownList.h dropdownList.c |
| GridCtrl | <ul style="list-style-type: none"> - 컨디션 표 상태 초기화 - 컨디션 표 상태 설정 및 항목 추가 - 컨디션 항목 값 반환 - 컨디션 표 화면 표시 | SetGrid.h SetGrid.c |

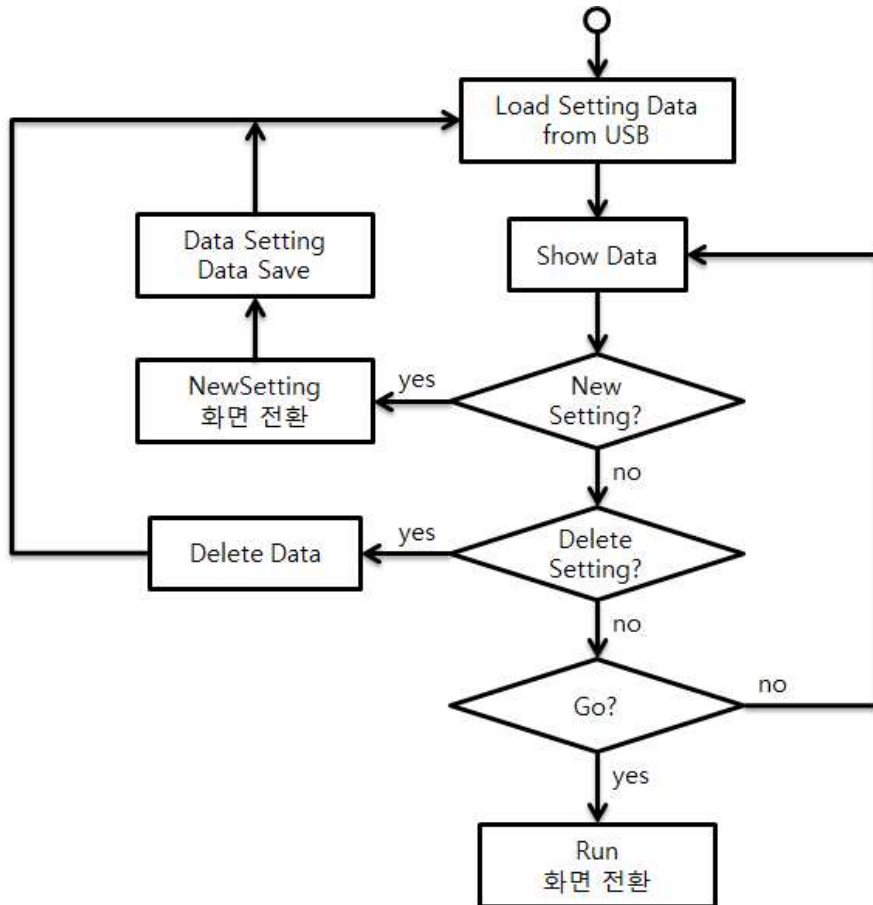
| 클래스 | 기능 | 파일 |
|------------------|---|---|
| USB | <ul style="list-style-type: none"> - USB Host 기능 초기화 및 통신 설정 - USB 읽기, 쓰기 | usb_bsp.h/usb_bsp.c usbh_usr.h/usb_usr.c USB_OTG_Driver 전체 USB_Host_Library 전체 |
| FAT32 | <ul style="list-style-type: none"> - 파일 시스템 초기화 - 부트 섹터 영역 읽기 및 분석 - 파일 시스템 분석 - 파일 읽기/쓰기 및 디렉터리 읽기/쓰기 - 파일 삭제 및 디렉터리 삭제 | ff.h/ff.c fattice.c ffconf.h diskio.h/diskio.c |
| UI – Calibration | <ul style="list-style-type: none"> - Calibration 화면 구성 - Calibration 좌표 입력 및 tsc2046 전달 | DlgCalibration.h/c |
| Condition | <ul style="list-style-type: none"> - Condition 화면 구성 - RT-PCR 시험 환경 정보 확인 및 저장 - 시험 시작 버튼 | DlgCondition.h/c |
| DataManager | <ul style="list-style-type: none"> - DataManager 화면 구성 - SD(내부 메모리) 및 USB 데이터 표시 및 선택 - 선택 파일 보기 및 삭제 - SD, USB 동기화 메뉴 - Help 메뉴 | DlgDataManager.h/c |
| GeneralSetting | <ul style="list-style-type: none"> - GeneralSetting 화면 구성 - 시간 설정 | DlgGeneralSetting.h/c |

| 클래스 | 기능 | 파일 |
|---------------|---|----------------------|
| Help | - Help 화면 구성 - 도움말 표시 | DlgHelp.h/c |
| Loading | - Loading 화면 구성 - Loading 상태 표시 | DlgLoading.h/c |
| MainMenu | - MainMenu 화면 구성 - 메뉴 선택 - 날짜, 시간, 샘플 데이터 표시 | DlgMainMenu.h/c |
| NewSetting | - NewSetting 화면 구성 - 시험 환경 설정 항목 표시 - 항목 추가 및 삭제, 초기화 - 시험 환경 설정 저장 | DlgNewSetting.h/c |
| Run | - Run 화면 구성 - 시험 동작 사이클 표시 - 측정 결과 데이터 표시 (그래프) - 셀 별 그래프 선택 및 Line/Log 그래프 선택 - Emergent Stop 선택 | DlgRun.h/c |
| ShowCondition | - ShowCondition 화면 구성 - 저장 중인 시험 환경 설정 항목 표시 | DlgShowCondition.h/c |
| ShowData | - ShowData 화면 구성 - 저장 중인 시험 결과 데이터 표시 | DlgShowData.h/c |

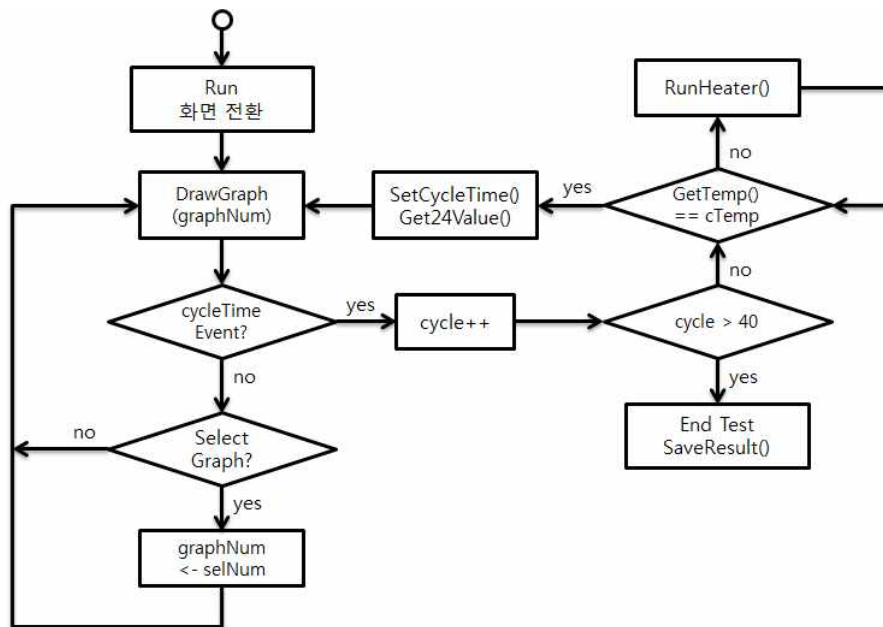
- Flow chart 구성 및 구축
단계별 알고리즘을 통한 컨트롤 실시



- 분석 환경 설정(Condition)

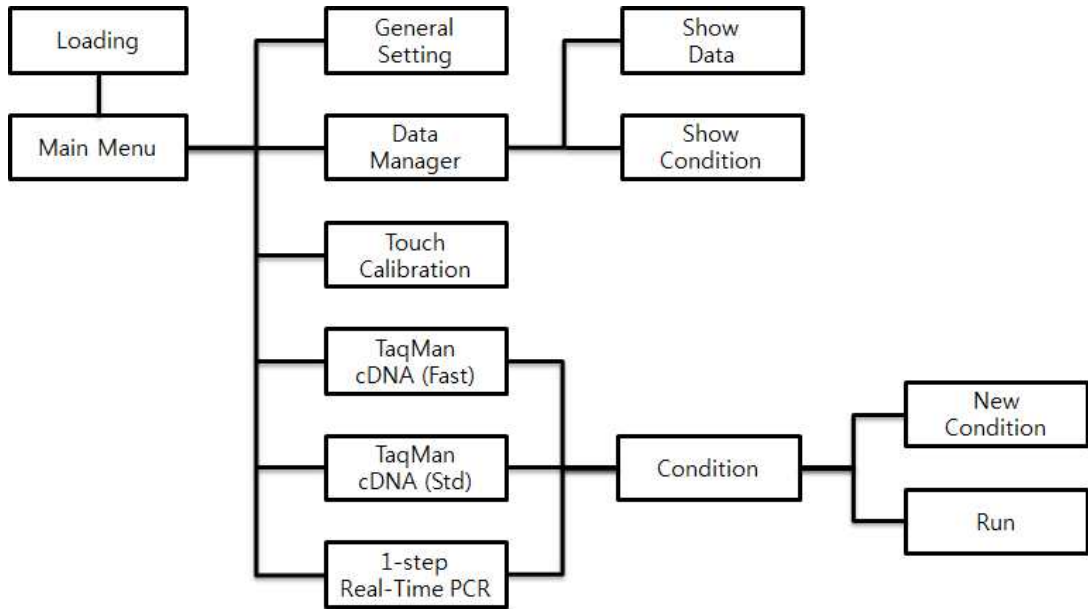


- 분석 동작 (Run)



(2) UI 개발 및 기능 부여 & Debugging

- Menu Tree 구축 완료



- UI 메뉴 및 기능
<시작 및 메인 메뉴>

| 화면 | UI | 기능 설명 |
|-----------|----|--|
| Loading | | <ul style="list-style-type: none"> - F/W 시작 화면으로 로딩 진행률 표시 - 메인 메뉴로 전환됨 - 기능 사용 전 USB 저장 매체 연결 : FAT32로 포맷 필요 |
| Main Menu | | <ul style="list-style-type: none"> - 세부 기능 진입을 위한 주 메뉴 표시 : 각 메뉴 터치시 세부 기능 진입 - [General Setting]: 기본설정 - [Data Manager]: 구 측정 결과 재확인 - [Touch Calibration]: 터치 스크린 조정 - [TaqMan cDNA(Fast)]: 측정시작 (빠른) - [TaqMan cDNA(Std)]: 측정시작 (보통) - [1-Step Real-Time PCR]: 측정시작 (보통) |

<기본 설정 및 구 측정 데이터 확인>

| 화면 | UI | 기능 |
|-----------------|----|---|
| General Setting | | <ul style="list-style-type: none"> - 기본 설정 화면 - Time Setting: 날짜 및 시간 설정 : 수치 터치 후 키 패드로 입력하거나 : [V] 터치 후 선택 가능 - Prev Menu: 터치 시 메인 메뉴로 이동 - Save: 날짜/시간 설정 저장 후 메인 메뉴로 |
| Data Manager | | <ul style="list-style-type: none"> - 구 시험 결과 파일 확인 화면 - 기본 폴더(루트)의 측정 파일 선택 후 "Show Data" 또는 "Show Cond." 터치 : Select File [V] - [Show Data]: 측정 데이터 그래프 출력 - [Show Cond.]: 시험 조건 보기 - Prev Menu: 터치시 메인 메뉴로 |

<터치 좌표 보정 및 측정 시작>

| 화면 | UI | 기능 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|--|-------|--|--|-------|---|---|--|-------|---|----|--|------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|---|
| Touch Calibration | | <ul style="list-style-type: none"> - 터치 좌표 보정 - 모서리 4곳 붉은 사각형을 차례로 터치하면 좌표 보정 완료 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TaqMan nDNA(Fast) TaqMan nDNA(Std) 1-Step RT-PCR | <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">1-Step Real-Time PCR</th> <th colspan="2"></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Stage</td> <td>1</td> <td colspan="2">2</td> </tr> <tr> <td>Cycle</td> <td>1</td> <td colspan="2">40</td> </tr> <tr> <td>Temp</td> <td>48.00</td> <td>95.00</td> <td>60.00</td> </tr> <tr> <td>Time</td> <td>30:00</td> <td>10:00</td> <td>00:15</td> </tr> </tbody> </table> | 1-Step Real-Time PCR | | | | Stage | 1 | 2 | | Cycle | 1 | 40 | | Temp | 48.00 | 95.00 | 60.00 | Time | 30:00 | 10:00 | 00:15 | <ul style="list-style-type: none"> - 저장된 RT-PCR 시험 조건 선택 : 세 가지 측정은 시험 조건만 다름 - ▲▼: 저장된 시험조건 선택 변경 - New: 터치 시 신규 실험 조건 생성 화면 : 우측 [수치] 값은 저장된 조건 개수 - Delete: 터치 시 현재 실험 조건 삭제 : 우측 [수치] 값은 선택된 실험 조건 - Go: 측정 시험 시작 - Prev Menu: 터치 시 메인 메뉴로 이동 |
| 1-Step Real-Time PCR | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Stage | 1 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cycle | 1 | 40 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Temp | 48.00 | 95.00 | 60.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Time | 30:00 | 10:00 | 00:15 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

<신규 분석 조건 생성>

| 화면 | UI | 기능 |
|-------------|----|--|
| New Setting | | <ul style="list-style-type: none"> - 신규 시험 조건 생성 화면 - Cycle 수, Temp, Time 수정 : 수정할 셀 선택 후 키패드로 수치 수정 - Add: 선택 열 하단에 새로운 Step 추가 - Del: 선택된 현재 Step 행 삭제 - Reset: 1개 Step만 남기고 설정 초기화 - Save: 저장 후 시험시작 화면으로 - Prev Menu: 이전 화면으로 이동(저장 안됨) |
| RT-PCR Run | | <ul style="list-style-type: none"> - RT-PCR 측정 시험 그래프 표시 (매 Cycle) : 세 가지 측정은 동일한 화면 구성 - ◀: 그래프 유형 선택 탭 활성화 - Cycle[2-40-1] : Stage-Cycle-Step 진행표시 - [1] Line: 그래프 출력 측정 번호 (1~24, All) - Emergency Stop: 시험 중단 후 이전으로 - Condition: 이전화면으로 |

<결과 출력 그래프 번호 및 유형 선택>

| 화면 | UI | 기능 |
|------------------|----|---|
| Select Graph Tab | | <ul style="list-style-type: none"> - 출력 그래프 번호 선택 화면 - 측정값 24개 중에 하나의 측정값만 보거나 전체 출력을 선택 (1~24, All) - Line/ Log Graph: 그래프 종류 선택 - ▶: 탭 닫기 |

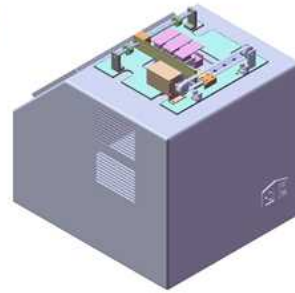
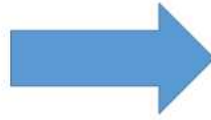
라. 시스템 제작

(1) 시스템 설계 변경 및 제작

- 정밀 온도 제어를 위한 Heater의 재설계 및 제작으로 시스템 신규 제작 실시
<시스템 개선 및 재제작 형태>

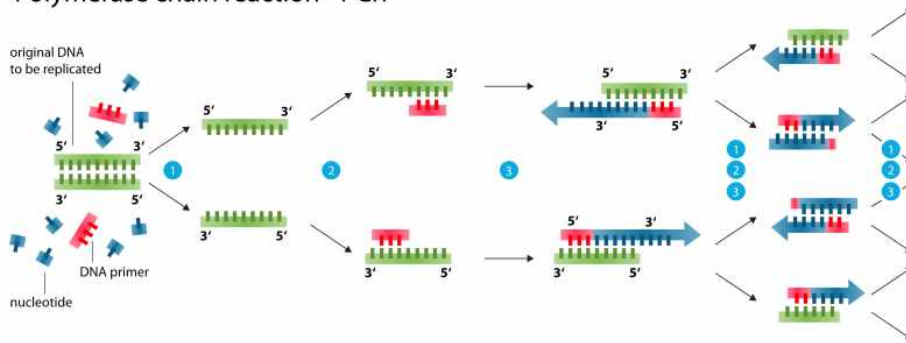


Heater 재설계를 통한
시스템 신규 제작



- Heater의 정밀 제어에 중요한 Ramping time을 의 기본 사양 컨셉

Polymerase chain reaction - PCR



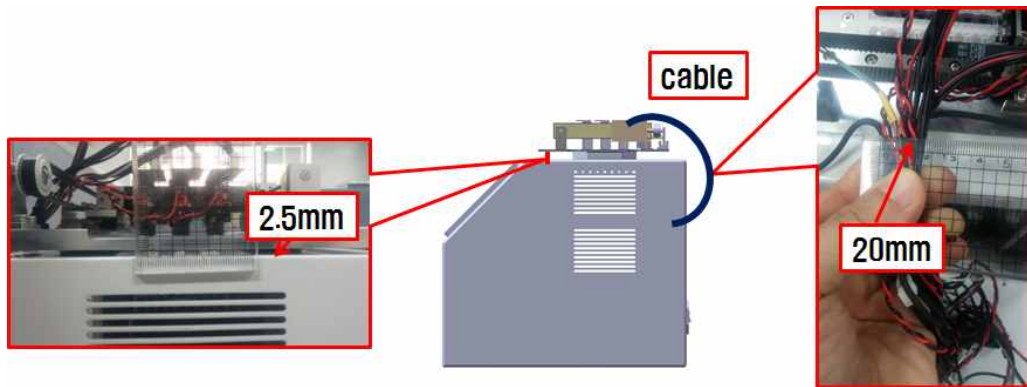
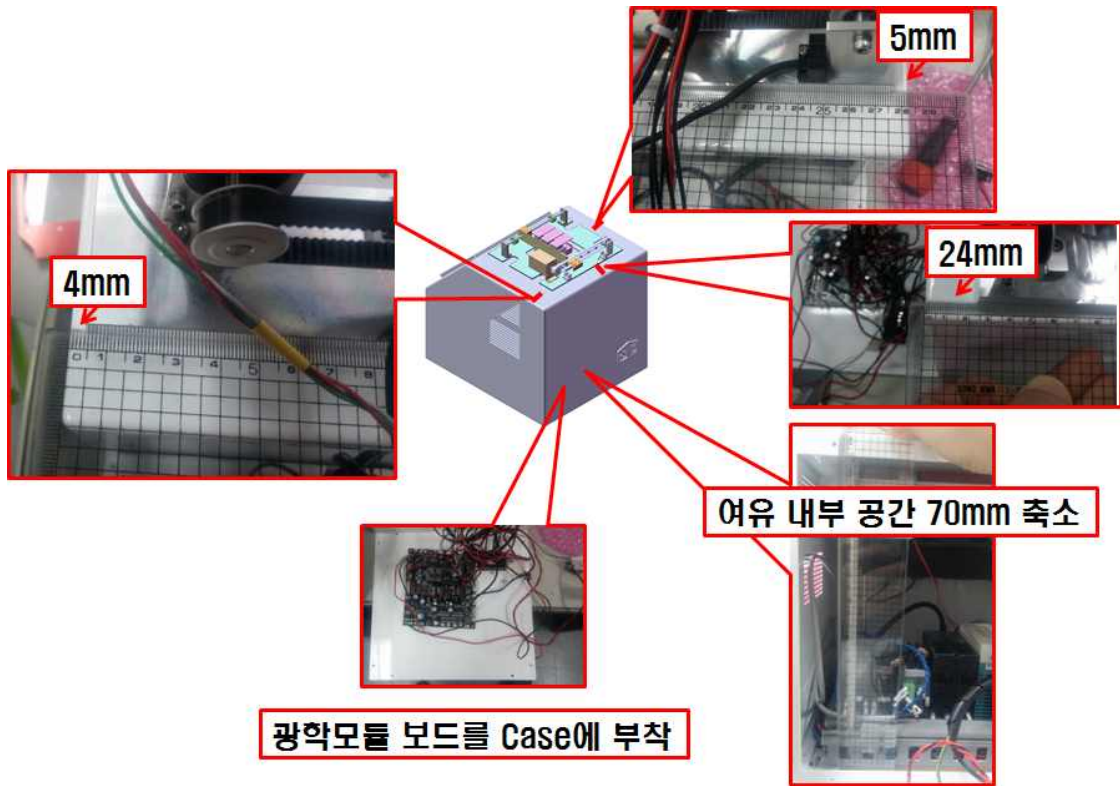
1. Denaturation at 94~96°C : 30초
2. Annealing at 50~65°C : 20~40초
3. Elongation at 70~74°C : 30초~5분

➔ 1~3번을 20~40회 반복

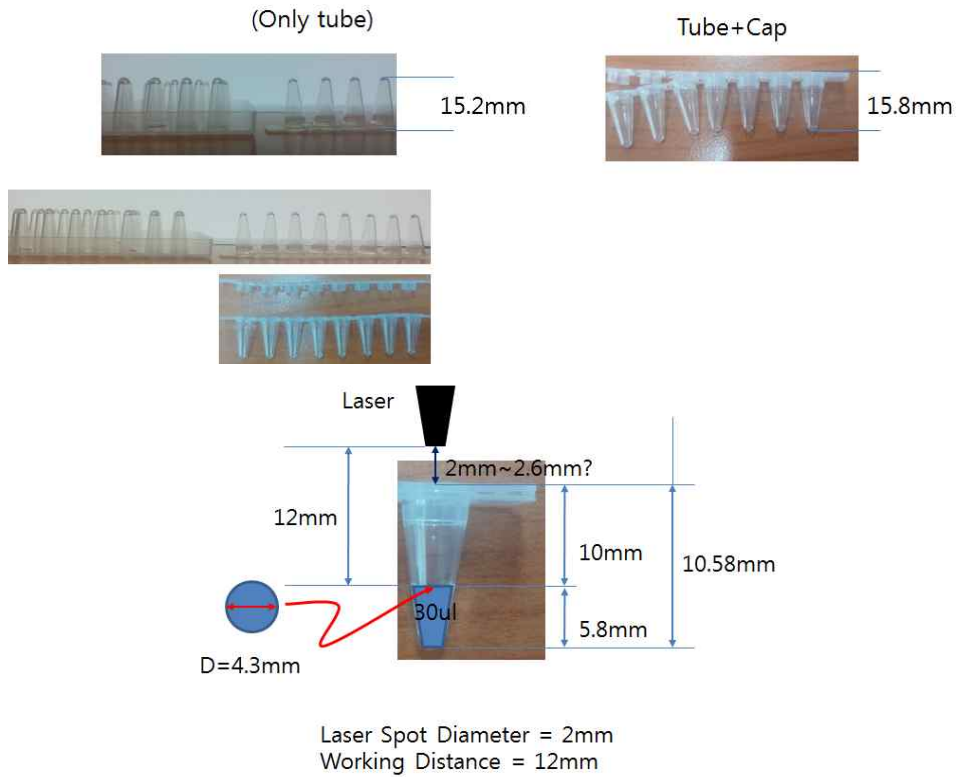
➔ 온도 상승: 초당 4.5~5°C
온도 하강: 초당 4.5~10 °C

- 제작 현황

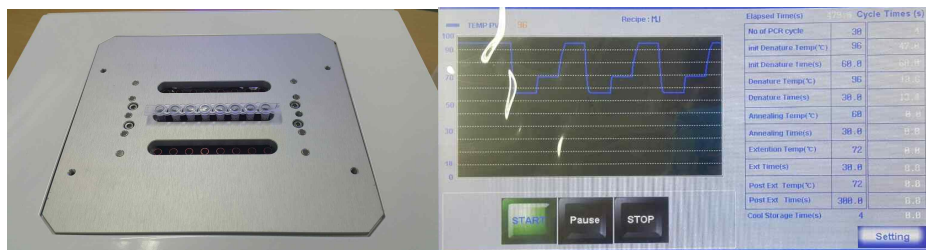
Heater의 내장 및 제어를 위한 Board 및 관련 소자들의 적절한 배열을 통한 신규 시스템 제작



- PCR tube는 상용제품도 적용하기 위하여 tube rack을 디자인 및 제작을 실시함.



- PCR tube rack(24well) 제작 및 Heater의 성능 테스트를 실시했을 때 온도 상승 및 하강이 잘 이루어짐을 확인함.



- 제작된 PCR 및 Tube를 안정적으로 눌러줄 수 있는 Cover 수정 제작

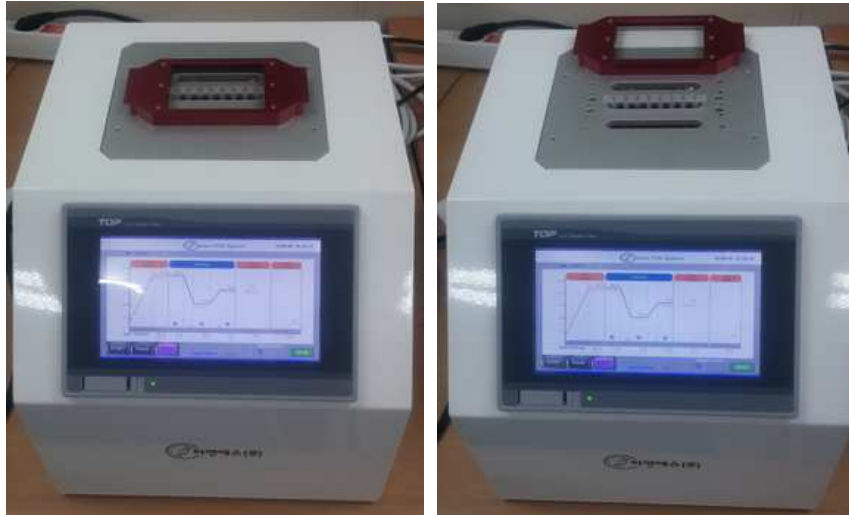
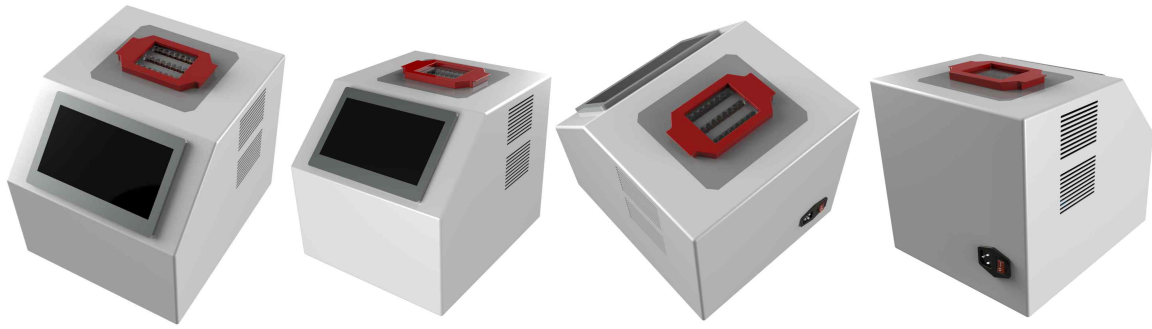


(2) BOM

| NO | PART | VALUE | Location No | Q'ty |
|----|------|------------------------|---|------|
| 1 | CAP | 100nF | C1,C2,C3,C4,C5,C6,C7,C13,C14,C15,C18,C21,C25,C29,C33,C37,C41,C62 | 18 |
| 2 | CAP | 100uF/50V_6.3Pi_Dip | CT9 | 1 |
| 3 | CAP | 10nF | C40,C44,C45,C50,C51,C56,C57 | 7 |
| 4 | CAP | 10uF/3216 | C22,C34 | 2 |
| 5 | CAP | 10uF/6.3V/1608 | CT3,CT4,CT5,CT6,CT7,CT8,CT16 | 7 |
| 6 | CAP | 1uF | C10 | 1 |
| 7 | CAP | 20pF | C8,C9 | 2 |
| 8 | CAP | 4.7uF | C42,C43,C46,C47,C48,C49,C52,C53,C54,C55,C58,C59,C60,C61 | 14 |
| 9 | CAP | 47pF | C16,C17,C19,C20,C23,C24,C26,C27,C28,C30,C31,C32,C35,C36,C38,C39 | 16 |
| 10 | CAP | 68uF/16V_6032 | CT10,CT11,CT12,CT13,CT14,CT15 | 6 |
| 11 | CAP | 9pF | C11,C12 | 2 |
| 12 | CAP | NC_51pF | C63,C64 | 2 |
| 13 | CON | 1*3PIN 2.54MM HEADER/R | J2 | 1 |
| 14 | CON | 4PIN_2.54 | U3,U19 | 2 |
| 15 | CON | BOX, 2.54mm 2X10S | J1 | 1 |
| 16 | CON | CON32 | U7 | 1 |
| 17 | CON | PIN_2.54_9 | U4 | 1 |
| 18 | CON | PJS008-2003-1 | U6 | 1 |
| 19 | CON | SMW200_02 | J4,J5,J6,J7,J8,J9,J14 | 7 |
| 20 | CON | SMW200_03 | J10,J11,J12,J13 | 4 |
| 21 | CON | YMW025-07R | U8 | 1 |
| 22 | CON | YW396-07V | U12 | 1 |
| 23 | DIO | 1N4148WS | D1 | 1 |
| 24 | DIO | B550C-13-F | D2,D3,D4,D5,D6,D7,D8 | 7 |
| 25 | DIO | LED_RED_1608 | LED1,LED2,LED3,LED4,LED5,LED6,LED7,LED8 | 8 |
| 26 | IC | ADS1247 | U9,U10 | 2 |
| 27 | IC | FDS6675 | Q1 | 1 |
| 28 | IC | MMBT3904 | Q2 | 1 |
| 29 | IC | RT8289GSP | U11,U13,U14,U15,U16,U17,U18 | 7 |
| 30 | IC | RT9013_33GB | U2 | 1 |
| 31 | IC | STM32F105VCT | U5 | 1 |
| 32 | IND | HH-1T1608-800 | FB1,FB2,FB3,FB4,FB5,FB6 | 6 |
| 33 | IND | NR10050_10uH | L1,L2,L3,L4,L5,L6,L7 | 7 |
| 34 | RES | OR | R1,R5,R6,R7,R8,R9,R10,R11,R13,R14,R15,R16,R21,R64,R65,R66,R67,R68,R69,R70,R71,R72,R77,R78,R85,R86,R87,R88,R93,R96,R97,R98,R99,R100,R103,R106,R108,R114,R115,R117,R118,R119,R120,R122,R123,R128,R134 | 47 |
| 35 | RES | 1.5K | R133,R141,R142,R148,R150,R157,R158 | 7 |
| 36 | RES | 100K | R131 | 1 |
| 37 | RES | 100R | R12 | 1 |
| 38 | RES | 10K | R17,R18,R19,R20,R22,R24,R25,R26,R27,R28,R29,R73,R74,R75,R76,R92,R95,R111,R130,R137,R139,R145,R147,R153,R155 | 25 |
| 39 | RES | 110R | R90,R104,R112,R127 | 4 |
| 40 | RES | 11K | R132,R138,R140,R146,R149,R154,R156 | 7 |
| 41 | RES | 12R | R107,R126 | 2 |
| 42 | RES | 15R | R89,R91,R94,R101,R105,R109,R110,R113,R116,R124,R125,R129 | 12 |
| 43 | RES | 1K | R135,R136,R143,R144,R151,R152 | 6 |
| 44 | RES | 22R | R31,R32,R33,R34,R35,R36,R37,R38,R39,R40,R41,R42,R43,R44,R45,R46,R47,R48,R49,R50,R51,R52,R53,R54,R55,R56,R57,R58,R59,R60,R61,R62,R63,R159,R160,R162 | 36 |
| 45 | RES | 330R | R79,R80,R81,R82,R83,R84 | 6 |
| 46 | RES | 3K | R165 | 1 |
| 47 | RES | 4.7K | R30 | 1 |
| 48 | RES | 47R | R2 | 1 |
| 49 | RES | 820R | R102,R121 | 2 |
| 50 | RES | NC | R23,R161 | 2 |
| 51 | RES | NC_10K | R163,R164 | 2 |
| 52 | SW | MT1102S | SW1 | 1 |
| 53 | XTL | 25MHz | X1 | 1 |
| 54 | XTL | MS3V-TIR_32.768KHz | X2 | 1 |

(3) 완제품

- 시스템 설계 및 3D 렌더링 이미지 & 완제품 이미지



| Operating specification | |
|----------------------------|--------------|
| Method of heating/ cooling | Peltier |
| Temperature range | 4.0°C-99.9°C |
| Block type | Fast block |
| Max heating rate | 5.0°C/sec |
| Max cooling rate | 2°C/sec |
| Temperature accuracy | ± 0.1°C |
| Temperature uniformity | < 0.1°C |

• Experimental Data

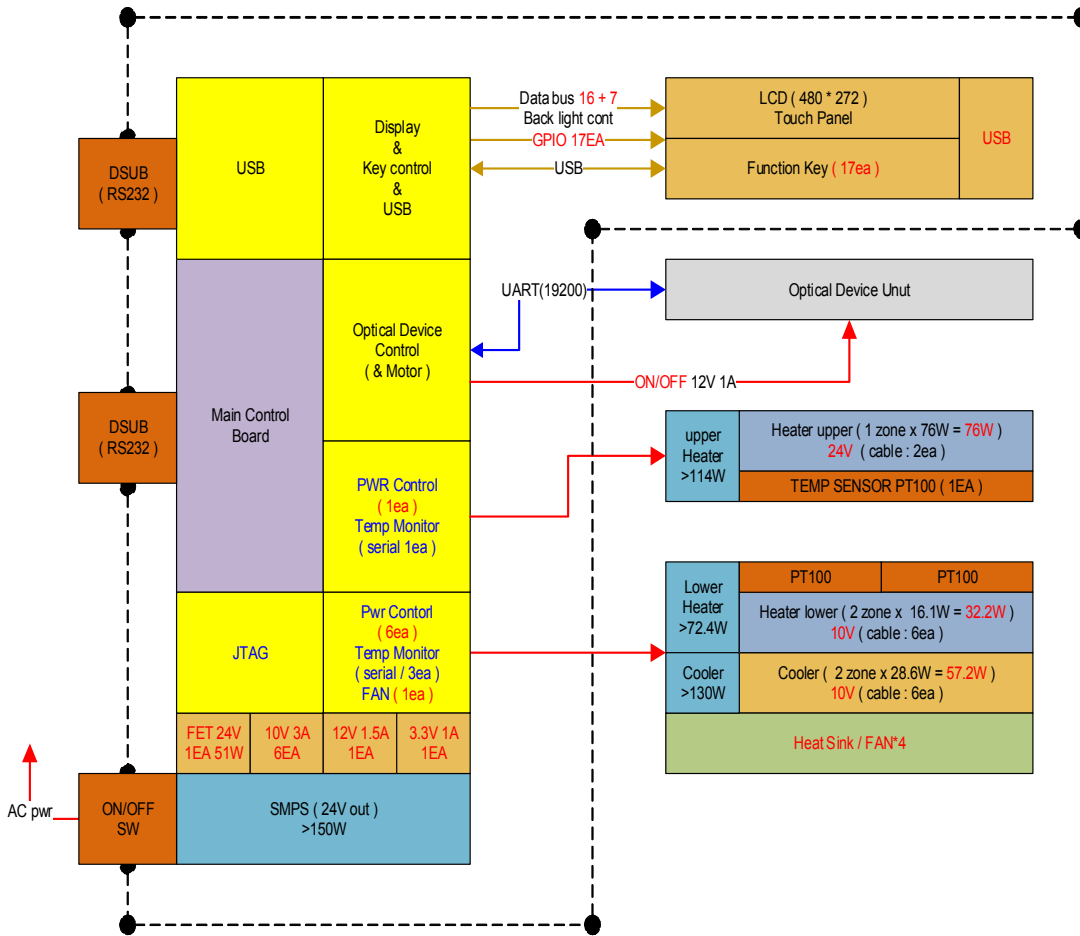
Fig 1. 실제 PCR실험을 통해, 기존 Tube PCR 장비와 유사한 증폭 효율을 확인하였습니다(*E. coli* O157:H7, 384bp).

3. LAMP-PCR 제품화

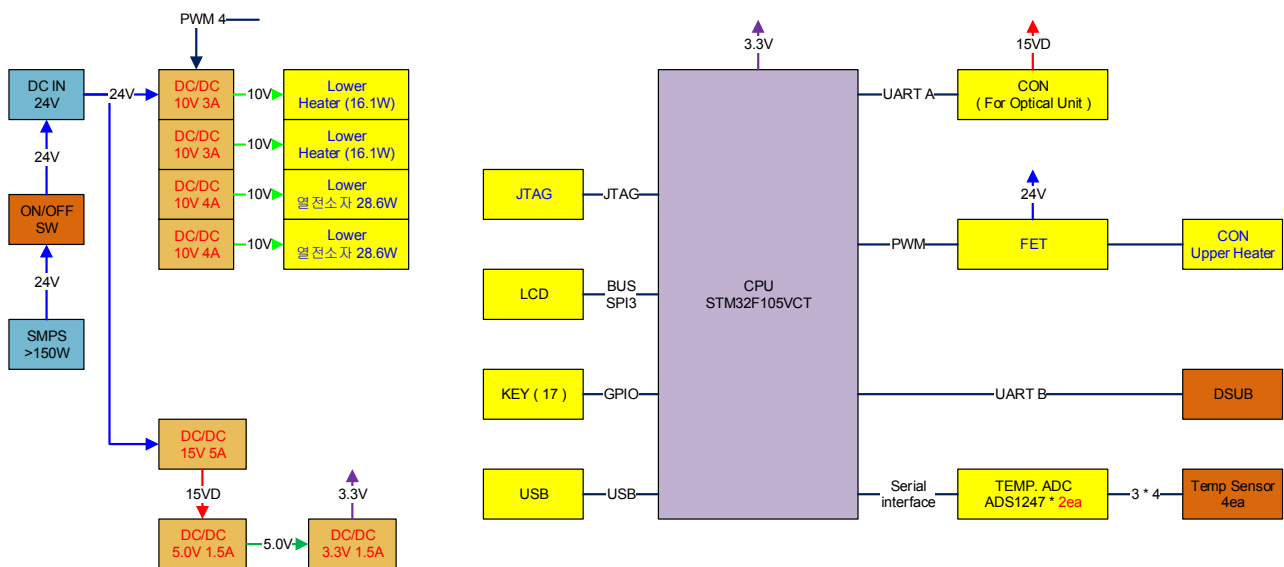
가. 기구 및 회로설계 & 보완

(1) 시스템 구성도

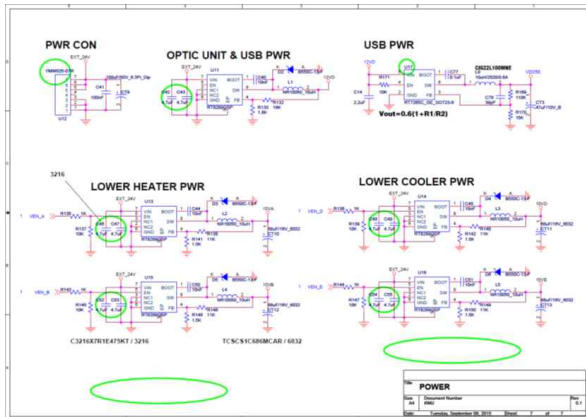
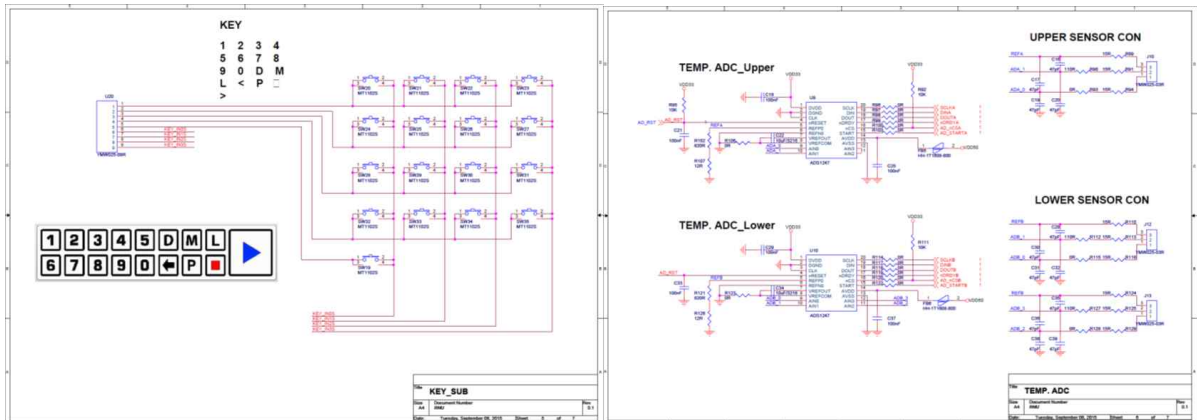
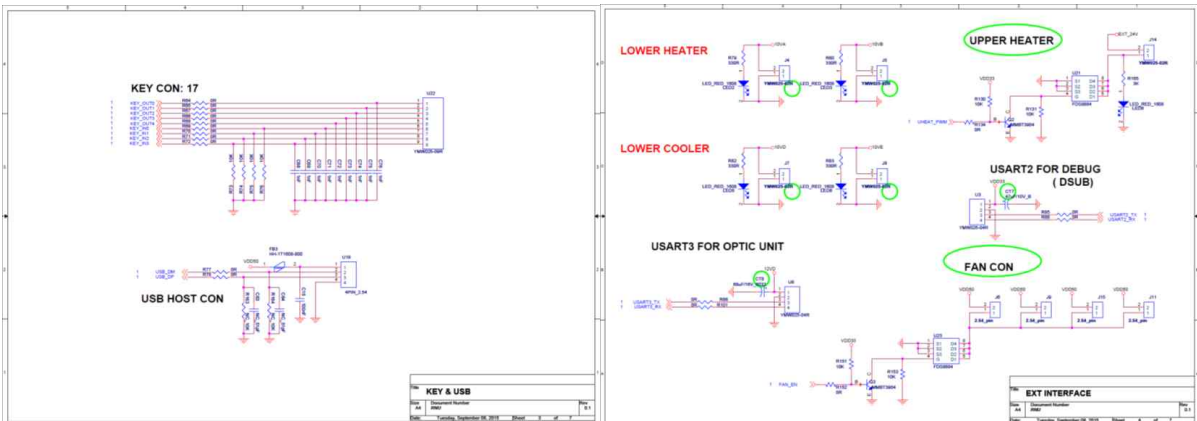
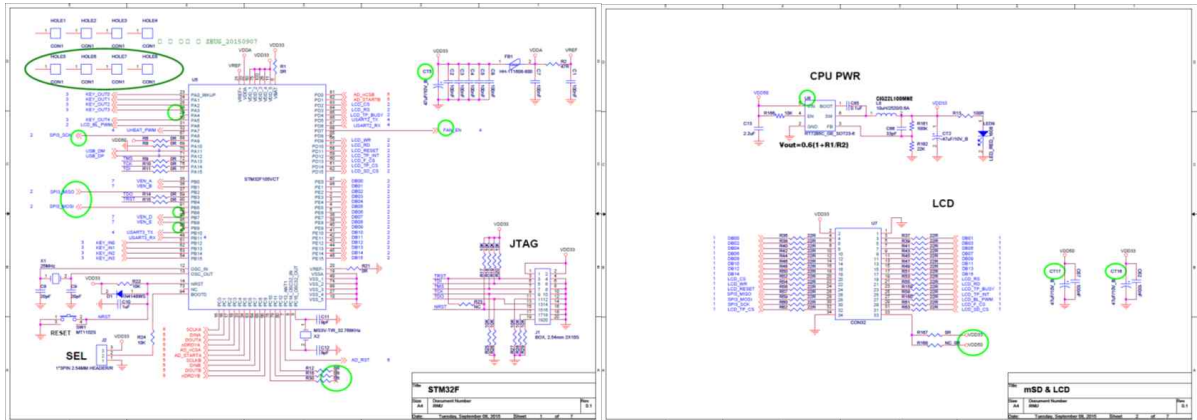
<블럭다이어그램>



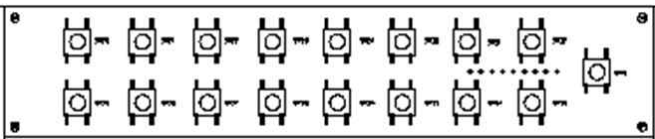
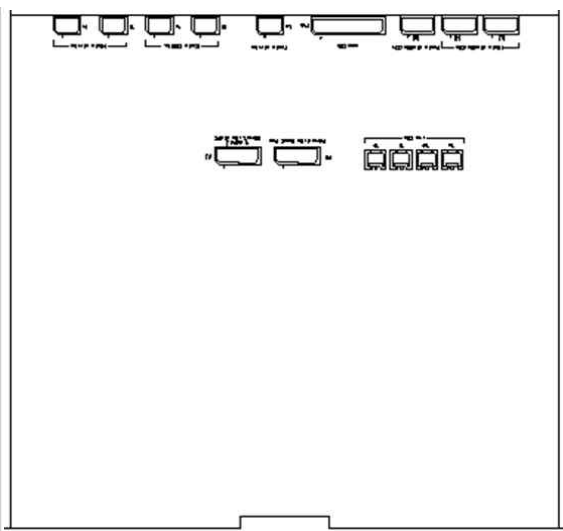
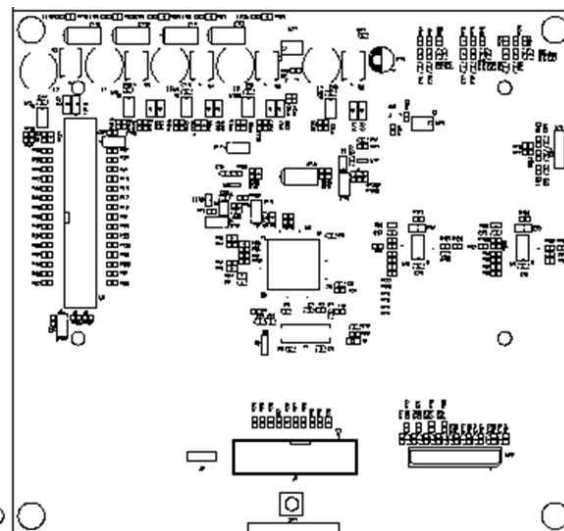
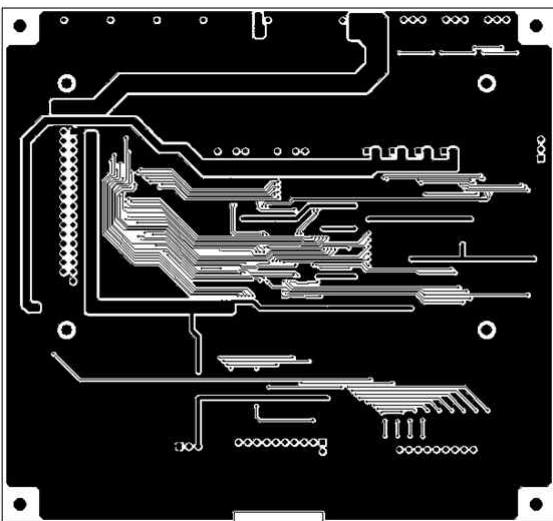
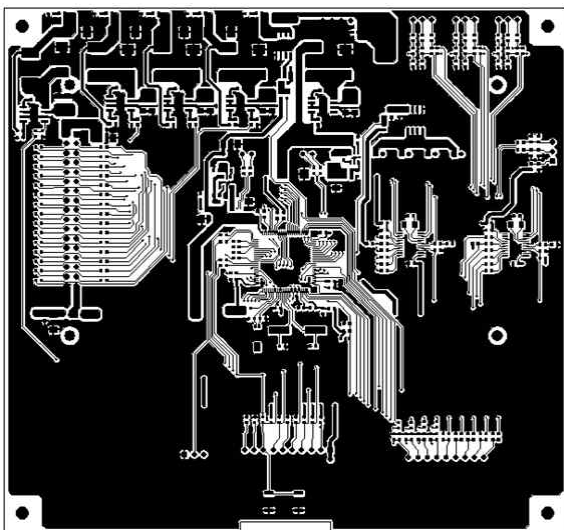
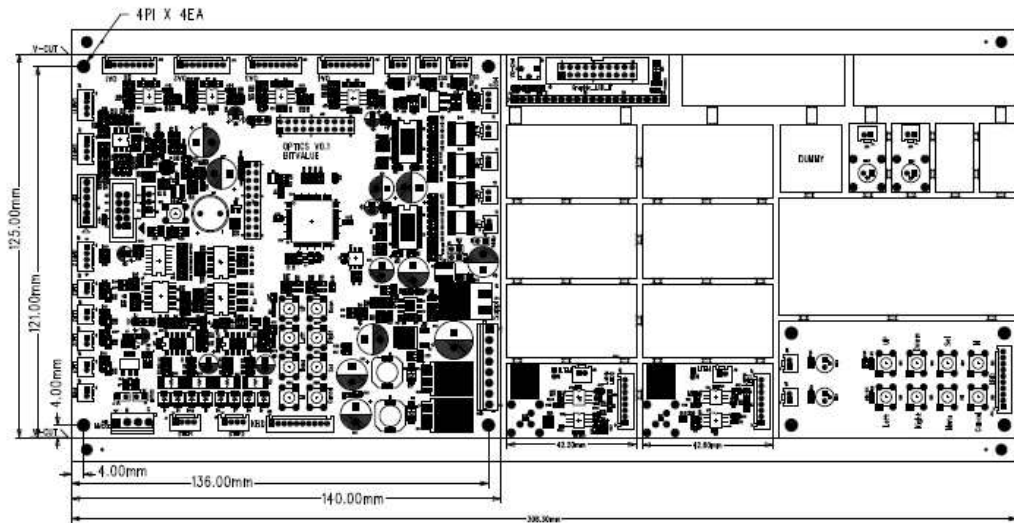
<메인 유닛 블럭다이어그램>



(2) 회로설계 및 제작 & 보완

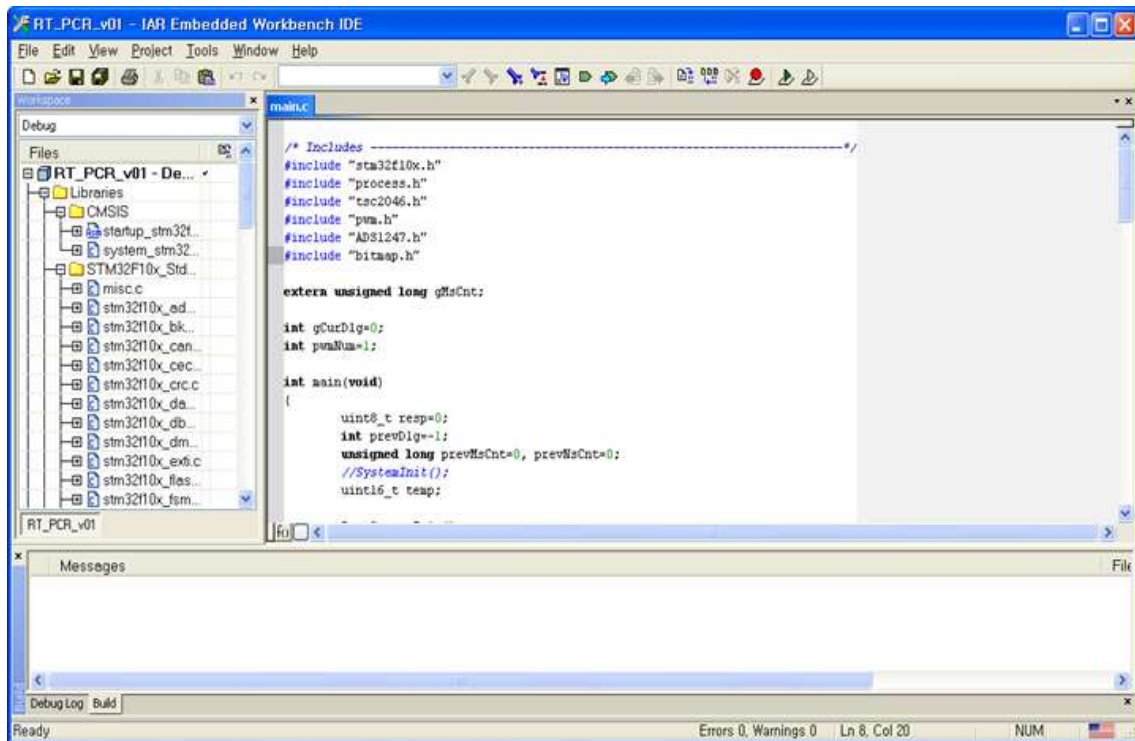


나. Main board 제작 및 보완
 (1) Main board 및 아트웍

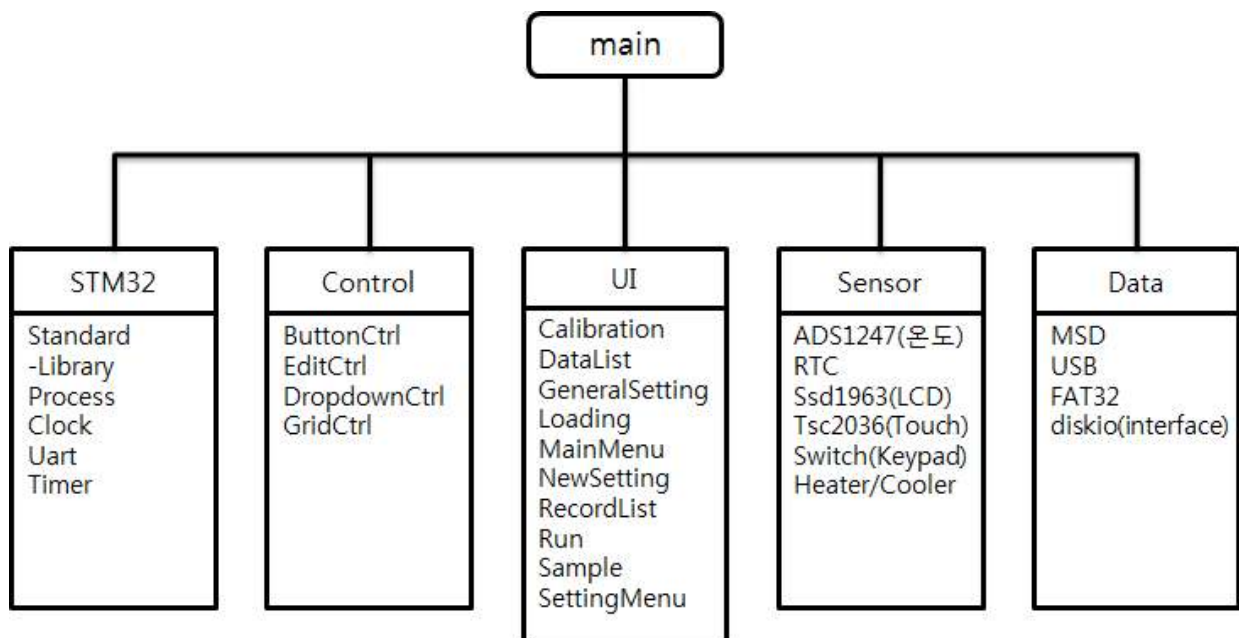


(2) 시스템 펌웨어 구성 및 설계

- 개발 툴은 IAR(Imbedded Workbench for ARM 6.30) 활용



- 클래스 구성



- 클래스 설계 및 기능 부여

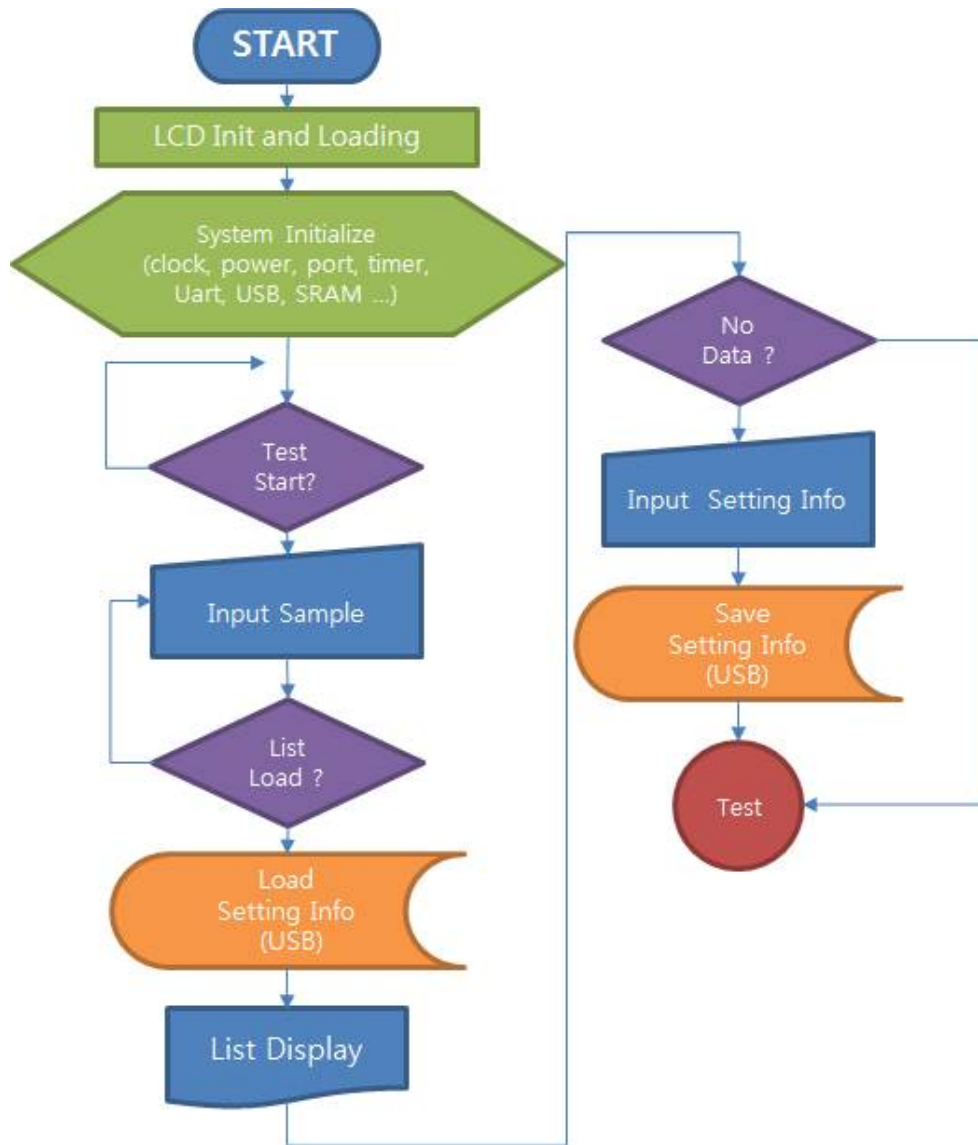
| 클래스 | 기능 | 파일 |
|---------|---|---|
| main | <ul style="list-style-type: none"> - Touch Event Check - Key Event Check - Timer Event Check - UI 화면 전환 - Process 클래스로 이벤트 전달 | main.c |
| Process | <ul style="list-style-type: none"> - 화면 별 Touch Event 전달 - 화면 별 Key Event 전달 - 화면 별 Timer Event 전달 - 화면 구성 - 하단 상태 바 구성 - USB 초기화 | process.h process.c |
| clock | <ul style="list-style-type: none"> - 시스템 클럭 초기화 - 시스템 포트 클럭 설정 | clock.h clock.c |
| uart | <ul style="list-style-type: none"> - USART 통신 초기화 및 인터럽트 설정 - USART 데이터 송수신 루틴 | uart.h uart.c |
| timer | <ul style="list-style-type: none"> - 타이머 초기화 및 인터럽트 설정 - 타이머 인터럽트 루틴 | timer.h timer.c |
| ADS1247 | <ul style="list-style-type: none"> - 온도 센서 초기화 - ADC 값 변환 및 온도 데이터 변환 | ADS1247.h ADS1247.c |
| RTC | <ul style="list-style-type: none"> - RTC 초기화 - RTC 설정 및 반환 (SetTime(), GetTime()) | rtc.h rtc.c |
| SSD1963 | <ul style="list-style-type: none"> - LCD 초기화 - Draw Dot, Line, Rectangle, Text | ssd1963.h ssd1963.c font.h arrowBitmap.c |

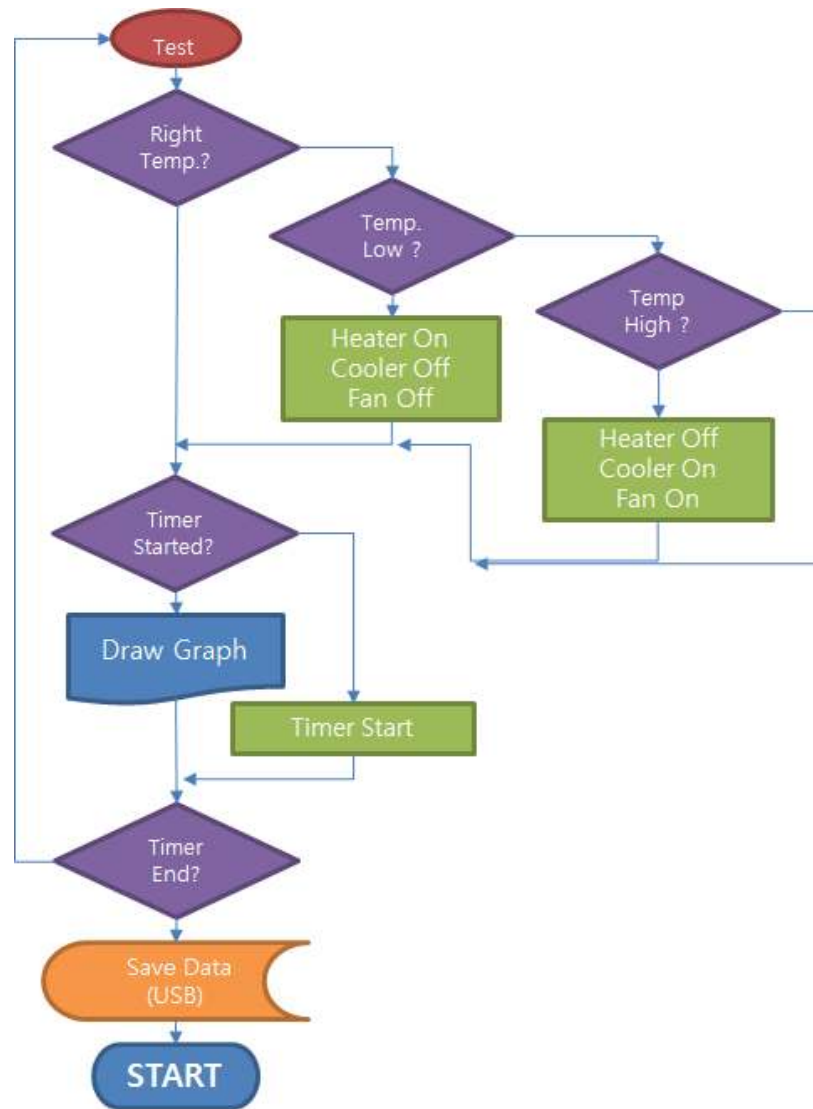
| 클래스 | 기능 | 파일 |
|---------------|--|----------------------------------|
| Switch | <ul style="list-style-type: none"> - 키 패드 포트 초기화 - 키 입력 인터럽트 루틴 및 키 값 변환 루틴 | switch.h switch.c |
| TSC2046 | <ul style="list-style-type: none"> - 터치 패드 초기화 - 터치 인터럽트 루틴 - 터치 좌표 변환 및 반환 - 터치 보정 데이터 저장 | tsc2046.h tsc2046.c |
| Heater/Cooler | <ul style="list-style-type: none"> - PWM 초기화 - Heater 온도 설정 및 동작 | pwm.h pwm.c |
| EditCtrl | <ul style="list-style-type: none"> - 입력 컨트롤 초기화 - 입력 문자열 반환 - 입력 문자열 길이 반환 - 입력 문자 숫자 변환 - 입력 컨트롤 화면 표시 | editControl.h editContrl.c |
| DropdownCtrl | <ul style="list-style-type: none"> - 드롭다운 컨트롤 초기화 - 드롭다운 컨트롤 항목 설정 및 추가 - 드롭다운 컨트롤 선택 항목 반환 - 드롭다운 컨트롤 화면 표시 | dropdownList.h dropdownList.c |
| GridCtrl | <ul style="list-style-type: none"> - 컨디션 표 상태 초기화 - 컨디션 표 상태 설정 및 항목 추가 - 컨디션 항목 값 반환 - 컨디션 표 화면 표시 | SetGrid.h SetGrid.c |

| 클래스 | 기능 | 파일 |
|------------------|---|---|
| USB | <ul style="list-style-type: none"> - USB Host 기능 초기화 및 통신 설정 - USB 읽기, 쓰기 | usb_bsp.h/usb_bsp.c usbh_usr.h/usb_usr.c USB_OTG_Driver 전체 USB_Host_Library 전체 |
| FAT32 | <ul style="list-style-type: none"> - 파일 시스템 초기화 - 부트 섹터 영역 읽기 및 분석 - 파일 시스템 분석 - 파일 읽기/쓰기 및 디렉터리 읽기/쓰기 - 파일 삭제 및 디렉터리 삭제 | ff.h/ff.c fattime.c ffconf.h diskio.h/diskio.c |
| UI – Calibration | <ul style="list-style-type: none"> - Calibration 화면 구성 - Calibration 좌표 입력 및 tsc2046 전달 | DlgCalibration.h/c |
| Sample | <ul style="list-style-type: none"> - Sample 화면 구성 - 측정 샘플 선택 기능 - 샘플 선택 조건 확인 팝업 | DlgSample.h/c |
| DataList | <ul style="list-style-type: none"> - DataList 화면 구성 - USB 측정 데이터 표시 - 선택된 측정 데이터 시험 조건 보기 - 새 조건 작성 혹은 기존 조건 불러오기 | DlgDataList.h/c |
| Setting | <ul style="list-style-type: none"> - GeneralSetting 화면 구성 - 날짜, 시간 설정 | DlgGeneralSetting.h/c |

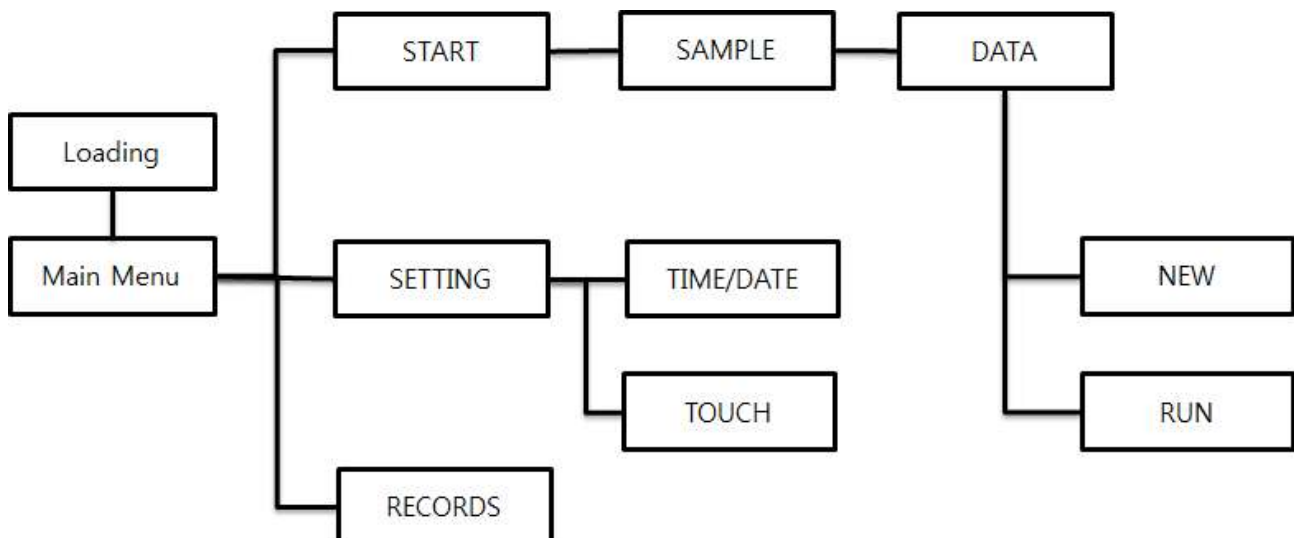
| 클래스 | 기능 | 파일 |
|-------------|---|-------------------|
| SettingMenu | <ul style="list-style-type: none"> - Setting 화면 구성 - 설정 메뉴 선택 | SettingMenu.h/c |
| Loading | <ul style="list-style-type: none"> - Loading 화면 구성 - Loading 상태 표시 | DlgLoading.h/c |
| MainMenu | <ul style="list-style-type: none"> - MainMenu 화면 구성 - 메뉴 선택 - 날짜, 시간 표시 | DlgMainMenu.h/c |
| NewSetting | <ul style="list-style-type: none"> - NewSetting 화면 구성 - 시험 환경 설정 항목 표시 - 시험 환경 설정 저장 - 저장 및 시험 시작 팝업 알림 | DlgNewSetting.h/c |
| Run | <ul style="list-style-type: none"> - Run 화면 구성 - 시험 동작 시간, 온도, 측정값 표시 - 결과 데이터 표시 (그래프) - 측정 샘플 및 시간 범위로 결과 그래프 표시 - 측정 종료 | DlgRun.h/c |
| Record | <ul style="list-style-type: none"> - RECORDS 화면 구성 - USB에 저장된 시험 조건과 측정값 목록을 조회 | DlgRecordList.h/c |

- Flow chart 구성 및 구축







(2) UI 개발 및 기능 부여 & Debugging
 - Menu Tree 구축 완료



- UI 메뉴 및 기능
 <시작 및 메인 메뉴>

| No. | UI | 설명 |
|-----|--|--|
| 1 |  | <ul style="list-style-type: none"> - <Boot Loading> - 전원 인가 후 초기화 작업이 진행되는 동안 작업 상태를 progress bar로 표시 |
| 2 |  | <ul style="list-style-type: none"> - <Main Menu> - 측정 대기 상태일 때의 Main Menu - 측정을 시작하거나, 설정, 기록보기로 이동이 가능 |

<설정화면>

| No. | UI | 설명 |
|-----|---|---|
| 1 |  | <ul style="list-style-type: none"> - <Setting Menu> - Main Menu에서 Setting 버튼을 통해 진입 - 날짜/시간 설정과 터치 보정으로 이동이 가능 |
| 2 |  | <ul style="list-style-type: none"> - <Time/Date Setting> - Setting Menu에서 Time/Date 버튼을 통해 진입 - 날짜와 시간의 설정이 가능 - 입력칸을 누르면 Edit창이 활성화 되며, 숫자 Pad를 이용해 입력이 가능 - 화살표 버튼을 누르면 Drop Down창이 활성화 되며, 원하는 값을 선택 가능 - 설정값을 저장, 현재시간으로 Refresh 가능 |

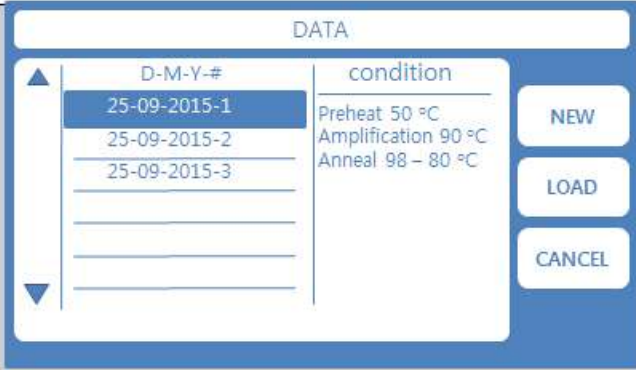

<터치조정 및 레코드>

| No. | UI | 설명 |
|-----|----|---|
| 1 | | <ul style="list-style-type: none"> - <Touch Stting> - Setting Menu의 Touch Screen 버튼을 통해 진입 - 모서리에 표시되는 붉은 버튼을 3초간 누름으로 터치 기능의 보정이 가능 |
| 2 | | <ul style="list-style-type: none"> - <Records> - Main Menu의 Records 버튼을 통해 진입 - 측정된 값과 설정되었던 값을 볼 수 있음 |


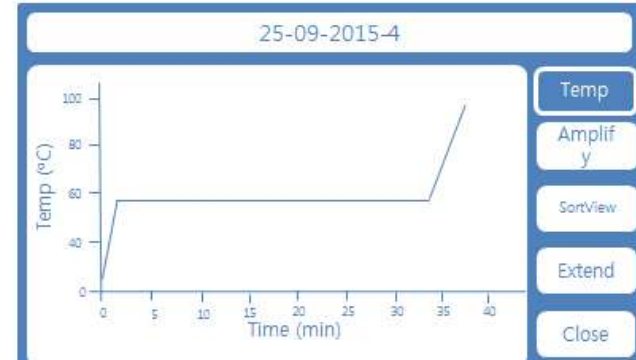
<테스터 샘플>

| No. | UI | 설명 |
|-----|----|---|
| 1 | | <ul style="list-style-type: none"> - <Sample> - Main Menu의 Start 버튼을 이용해 진입 가능 - 1~15번까지의 항목을 누름으로 Edit 창을 활성화 하여 영문 Pad와 숫자 Pad로 Sample의 입력이 가능 - 입력이 완료되면 Load 버튼으로 다음 단계로 진입 |
| 2 | | <ul style="list-style-type: none"> - <Sample PopUp> - Sample 화면에서 Load 버튼으로 진입 - 입력된 항목만 적용된다는 메시지와 함께 다음 단계로 진입할지, 입력창으로 돌아갈지 확인 |

<데이터 목록 및 새로운 시험 조건>

| No. | UI | 설명 |
|-----|--|---|
| 1 |  | <ul style="list-style-type: none"> - <Data List> - Sample PopUp의 OK 버튼을 누름으로 진입 - USB에서 측정 설정 파일을 Load하여 표시 - 설정 값이 있을 경우 List Up 함 - 리스트를 터치하면 Pocus가 활성화되며, 설정 내용을 간단히 표시 - New 버튼으로 새 설정을 작성 가능 - Load 버튼으로 측정 화면으로 이동(설정 리스트 존재할 경우) |
| 2 |  | <ul style="list-style-type: none"> - <New Setting> - Data List 에서 new 버튼을 이용해 진입 - Preheat, Amplification, Anneal 사용 여부 선택 - 각 항목의 온도와 시간 설정 가능 - Save & Run 버튼을 누름으로 저장 가능 |

<시험 조건 저장 및 온도 그래프>

| No. | UI | 설명 |
|-----|---|--|
| 1 |  | <ul style="list-style-type: none"> - <New Setting PopUp> - New Setting 에서 Save & Run 버튼을 눌러 진입 - 새 설정을 설정일자과 Index의 결합으로 List 에 저장함을 알림 - Run 버튼을 누름으로 설정을 USB에 저장 후 측정 화면으로 이동 |
| 2 |  | <ul style="list-style-type: none"> - <Measure - Temp> - New Setting Popup에서 Run 버튼을 누르거나 Data List에서 Load 버튼을 누름으로 진입 - 진입 후 빈 그래프 화면이 표시되며, ▶ 버튼을 누름으로 측정 시작 - 측정이 진행되면 측정부의 온도를 시간에 따라 표시 - 측정이 완료될 경우 각 버튼을 통해 결과값 확인 가능 |

<광학 측정값 그래프>

| No. | UI | 설명 |
|-----|----|---|
| 1 | | <p><Measure - Amplify></p> <ul style="list-style-type: none"> - 측정이 완료된 후 Amplify 버튼을 누름으로 표시 - 광학모듈에서 측정된 값을 그래프로 표시 - 측정된 Sample들을 전부 표시 |
| 2 | | <p><Measure - SortView></p> <ul style="list-style-type: none"> - 측정이 완료된 후 SortView 버튼을 누름으로 표시 - Amplify의 측정 값 중 원하는 항목을 선택 - 선택된 그래프만 표시 |

<측정값 범위 지정 및 측정 종료>

| No. | UI | 설명 |
|-----|----|---|
| 1 | | <p><Measure - Extend></p> <ul style="list-style-type: none"> - 측정 완료 후 Extend 버튼을 누름으로 표시 - 측정된 그래프의 범위를 선택함으로 그래프를 확대 또는 축소가 가능 |
| 2 | | <p><Finish PopUp></p> <ul style="list-style-type: none"> - 측정 중 정지버튼(■) 또는 측정 완료 후 Close 버튼을 누르면 PopUp 발생 - Lamp-PCR의 측정 과정이 끝났음을 알리는 PopUp - Close 버튼을 누를 경우 초기 화면으로 이동 |

라. 시스템 보완 및 제품화

- (1) 시스템 설계 변경 및 제작
 - HW 형상 및 규격

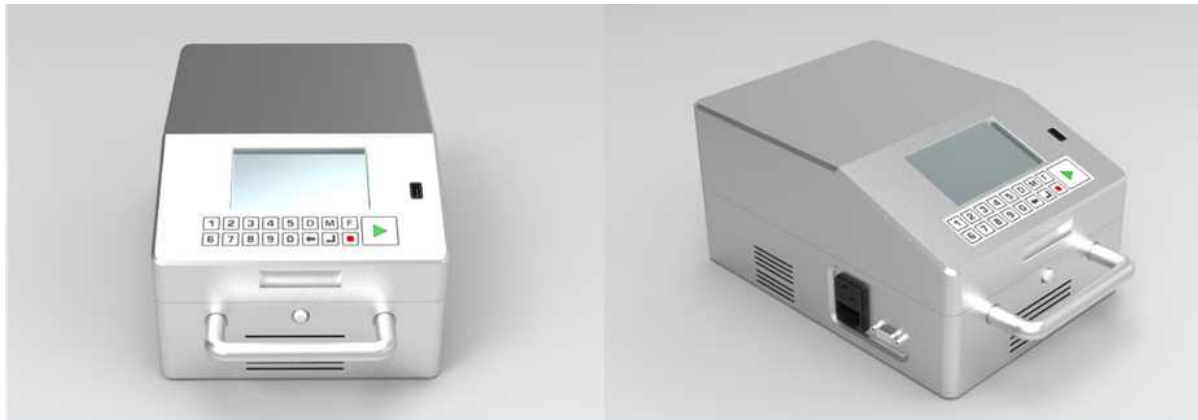
| 번호 | 항목 | 내용 |
|----|------------------|---|
| 1 | Power | SMPS (single) ON / OFF Switch |
| 2 | Display | 4.3" color (with Touch screen) |
| 3 | Port & Interface | Push key, Touch screen, USB, DSUB |
| 4 | CPU | STM32F |
| 5 | SW | UI / GUI (시나리오 제공 : <u>Mico</u>) |
| 6 | Optical Unit | <u>Bit_value</u> : 측정결과 → UART (19,200) |
| 7 | Heating Unit | Main control unit 제어 (25~65°C) |

(2) BOM

| | | | | |
|----|-----|------------------------|--|----|
| 1 | CAP | 0.1uF | C65,C77 | 2 |
| 2 | CAP | 100nF | C1,C2,C3,C4,C5,C6,C7,C15,C18,C21,C25,C29,C33,C37,C41,C62,C67 | 17 |
| 3 | CAP | 100uF/50V_6.3Pi_Dip | CT9 | 1 |
| 4 | CAP | 10nF | C40,C44,C45,C50,C51 | 5 |
| 5 | CAP | 10uF/3216 | C22,C34 | 2 |
| 6 | CAP | 1nF | C68,C69,C70,C71,C72,C73,C74,C75,C76 | 9 |
| 7 | CAP | 1uF | C10 | 1 |
| 8 | CAP | 2.2uF | C13,C14 | 2 |
| 9 | CAP | 20pF | C8,C9 | 2 |
| 10 | CAP | 33pF | C66 | 1 |
| 11 | CAP | 39pF | C78 | 1 |
| 12 | CAP | 4.7uF | C42,C43,C46,C47,C48,C49,C52,C53,C54,C55 | 10 |
| 13 | CAP | 47pF | C16,C17,C19,C20,C28,C30,C31,C32,C35,C36,C38,C39 | 12 |
| 14 | CAP | 47uF/10V_B | CT2,CT3,CT5,CT7,CT16,CT17 | 6 |
| 15 | CAP | 68uF/16V_6032 | CT8,CT10,CT11,CT12,CT13 | 5 |
| 16 | CAP | 9pF | C11,C12 | 2 |
| 17 | CAP | NC_51pF | C63,C64 | 2 |
| 18 | CON | 1*3PIN_2.54MM_HEADER/R | J2 | 1 |
| 19 | CON | 2.54_pin | J6,J9,J11,J15 | 4 |
| 20 | CON | 4PIN_2.54 | U19 | 1 |
| 21 | CON | BOX_2.54mm_2X10S | J1 | 1 |
| 22 | CON | CON32 | U7 | 1 |
| 23 | CON | YMW025-02R | J4,J5,J7,J8,J14 | 5 |
| 24 | CON | YMW025-03R | J10,J12,J13 | 3 |
| 25 | CON | YMW025-04R | U3,U8 | 2 |
| 26 | CON | YMW025-07R | U12 | 1 |
| 27 | CON | YMW025-09R | U20,U22 | 2 |
| 28 | DIO | 1N4148WS | D1 | 1 |
| 29 | DIO | B550C-13-F | D2,D3,D4,D5,D6 | 5 |
| 30 | DIO | LED_RED_1608 | LED2,LED3,LED5,LED6,LED8,LED9 | 6 |
| 31 | IC | ADS1247 | U9,U10 | 2 |
| 32 | IC | FDS8884 | U21,U23 | 2 |
| 33 | IC | MMBT3904 | Q2,Q3 | 2 |
| 34 | IC | RT7285C_GE_SOT23-6 | U6,U17 | 2 |

| | | | | |
|----|-----|--------------------|--|----|
| 35 | IC | RT8289GSP | U11,U13,U14,U15,U16 | 5 |
| 36 | IC | STM32F105VCT | U5 | 1 |
| 37 | IND | 10uH/2520/0.6A | L8,L9 | 2 |
| 38 | IND | HH-1T1608-800 | F81,F83,F85,F86 | 4 |
| 39 | IND | NR10050_10uH | L1,L2,L3,L4,L5 | 5 |
| 40 | RES | OR | R1,R6,R8,R9,R10,R11,R12,R14,R15,R16,R21,R30,R64,R65,R66,R67,R68,R69,R70,R71,R72,R77,R78,R85,R86,R88,R93,R96 R97,R98,R99,R100,R101,R103,R106,R114,R115,R117,R118,R119,R120,R122,R123,R128,R134,R152,R167 | 47 |
| 41 | RES | 1.5K | R141,R142,R148,R150 | 4 |
| 42 | RES | 1.8K | R133 | 1 |
| 43 | RES | 100K | R161 | 1 |
| 44 | RES | 100R | R13 | 1 |
| 45 | RES | 10K | R17,R18,R19,R20,R22,R24,R25,R26,R27,R28,R29,R73,R74,R75,R76,R92,R95,R111,R130,R131,R137,R139,R145,R147,R1 51,R153,R166,R171 | 28 |
| 46 | RES | 110K | R169 | 1 |
| 47 | RES | 110R | R90,R112,R127 | 3 |
| 48 | RES | 11K | R138,R140,R146,R149 | 4 |
| 49 | RES | 12R | R107,R126 | 2 |
| 50 | RES | 15K | R170 | 1 |
| 51 | RES | 15R | R89,R91,R94,R110,R113,R116,R124,R125,R129 | 9 |
| 52 | RES | 16K | R132 | 1 |
| 53 | RES | 1K | R135,R136,R143,R144 | 4 |
| 54 | RES | 22K | R162 | 1 |
| 55 | RES | 22R | R36,R37,R38,R39,R40,R41,R42,R43,R44,R45,R46,R47,R48,R49,R50,R51,R52,R53,R54,R55,R56,R57,R58,R59,R60,R61,R6 2,R63,R159,R160 | 30 |
| 56 | RES | 330R | R79,R80,R82,R83 | 4 |
| 57 | RES | 3K | R165 | 1 |
| 58 | RES | 47R | R2 | 1 |
| 59 | RES | 820R | R102,R121 | 2 |
| 60 | RES | NC | R23 | 1 |
| 61 | RES | NC_OR | R168 | 1 |
| 62 | RES | NC 10K | R163,R164 | 2 |
| 63 | SW | MT1102S | SW1,SW19,SW20,SW21,SW22,SW23,SW24,SW25,SW26,SW27,SW28,SW29,SW30,SW31,SW32,SW33,SW34,SW35 | 18 |
| 64 | XTL | 25MHz | X1 | 1 |
| 65 | XTL | MS3V-TIR_32.768KHz | X2 | 1 |

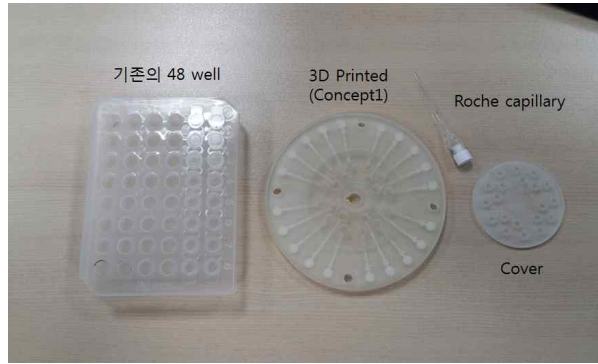
(3) 완제품



4. 1~2차년도 연구 실적

가. Realtime PCR 용 PCR Plate 제작.

- (1) PCR Plate 는 RT-PCR 제작에 있어 가장 중요한 요소로서, 제작되는 형태에 따라서 기기의 최종 형태가 완전히 바뀔 수 있음.
- (2) 일반적으로 PCR Plate는 다수의 8 tube 가 일렬로 배열된 형태의 것이 주로 적용되고 있으나, Microfluidics를 이용한 RT-PCR 기기도 개발이 시도되고 있음.
- (3) Microfluidics 기반 RT-PCR 기기는 상용화되지 않고 있음. 그 이유는 기존의 tube 시스템과 전혀 호환이 되지 않고, Microfluidics를 이용한 실험 결과가 실제 유저의 신뢰를 획득하지 못한 것으로 판단됨.
- (4) 다수의 Microfluidics 기반 PCR Chip의 Prototype을 3D printing 기술을 이용하여 제작하였음.

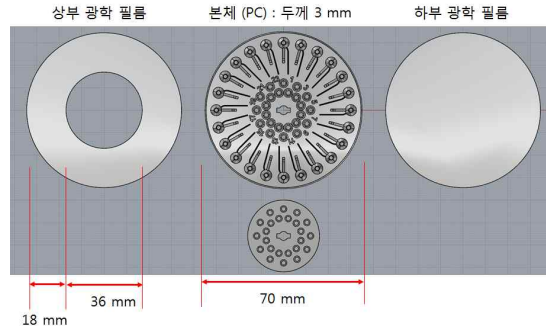


[1차 컨셉 모델과 기존 모델과의 비교]



| 1차 | 2차 | 3차 | 4차 |
|---|--------------------------------------|--|--|
| * 지나치게 큼 * 재료소비가 큼 * 무거움 * 양산이 어려움 | * 채널 길이가 달라서 부적합 * 가벼움 * 양산 가능 | * 제품화 가능 * 양산 가능 * 상부 히터 설계가 까다로움. | * 제품화 가능 * 양산 가능 * 상부 히터 문제 해결 * 공기벤트를 필요 |

[1차 ~ 4차 컨셉 모델 발전표 : 모두 3D Printer로 제작함]



[RT-PCR 전용 Chip의 구성 요소: 2층의 광학필름 + Microfluidics body]

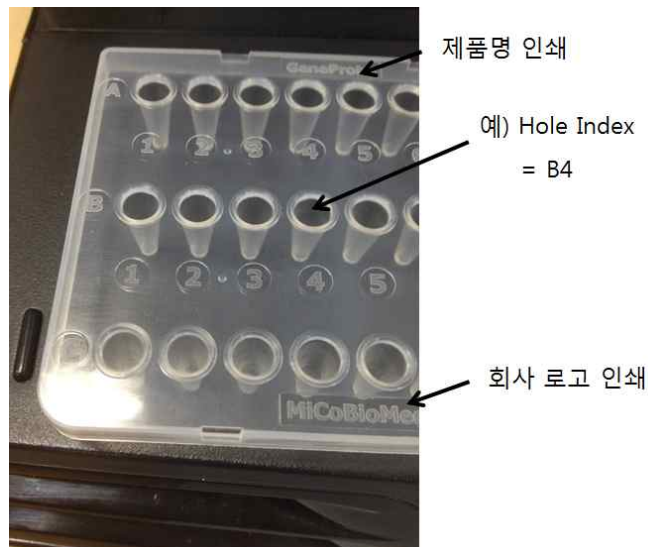
(5) Microfluidics 기반 RT-PCR 의 문제점

- 호환성 : 기존의 RT-PCR 기기와 전혀 호환이 되지 않으므로 기존 RT-PCR 보유자가 microfluidics 기반의 RT-PCR 기기를 구매할 가능성이 전혀 없음.
- 제작 단가 : 기존의 RT-PCR Plate는 제작 단가가 매우 저렴함. 사출 금형을 이용하여 단시간에 대량 생산이 가능하고, 생산된 제품별 품질 차이가 전혀 없음. 그러나 Microfluidics 기반 PCR-Plate 는 제작 단가가 매우 높고, 불량률 최소화를 위하여 많은 초기 자본과 수정이 요구됨. 경쟁력이 없음.
- 시료의 Evaporation을 고려한 Microfluidics Channel을 고려하면 제품의 최종 크기가 매우 커질 수 있음. 원가 상승 요인.
- 상기의 이유로 Microfluidics 기반 RT-PCR 은 경쟁력이 없기 때문에 상용화되기 어렵고 따라서 tube 형태의 RT-PCR 로 개발 방향을 결정함.

- (6) 기존의 PCR tube 와 호환되면서, 열효율을 향상시킨 Plate system을 개발함.
- 기존 시스템이 8개의 tube 가 6열 혹은 12열로 정렬되어 열 제어가 매우 까다로운 형태임에 반해, tube 열간 간격을 2배로 늘려 가열, 냉각 속도 시간의 단축을 꾀한 PCR Plate를 개발함.

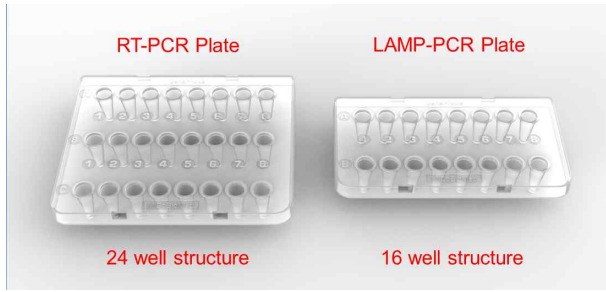


[3가지 색상으로 제작된 3열 24 well PCR-Plate : 3D Printer로 제작]



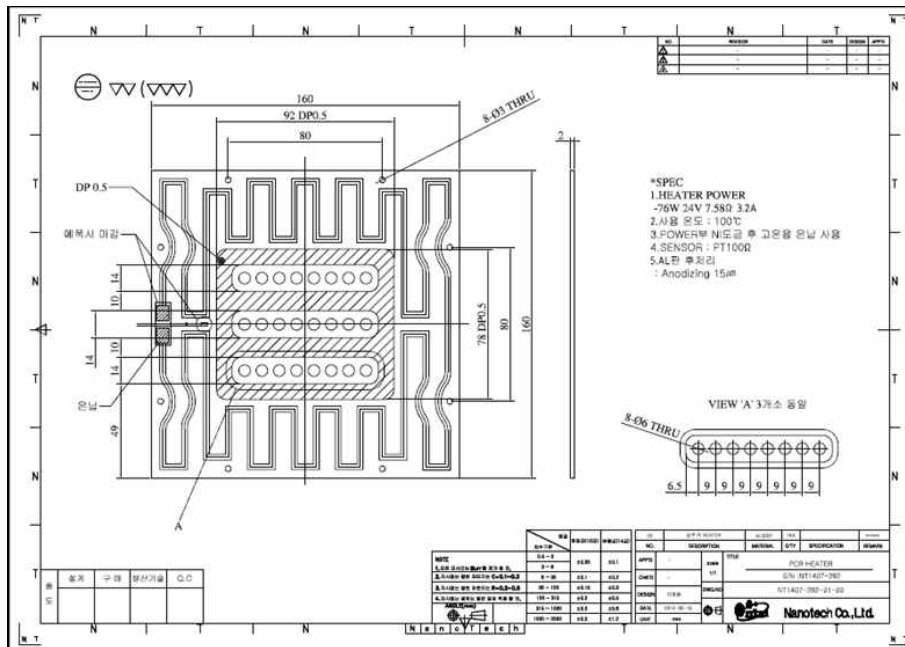
[Indexing 완료후 시사출 방식으로 사출된 RT-PCR Plate 최종 프로토타입]

- 기존 시스템이 8개의 tube 가 6열 혹은 12열로 정렬되어 열 제어가 매우 까다로운 형태임에 반해, tube 열간 간격을 2배로 늘려 가열, 냉각 속도 시간의 단축을 꾀한 RT-PCR용 Plate를 개발하였고, 3줄을 2줄로 조정하여 LAMP-PCR 용 PCR Plate도 개발하였음. 아래 그림은 RT-PCR 용 PCR Plate 와 LAMP-PCR 용 PCR Plate 비교 및 실제로 3D 프린터로 제작된 프로토타입임.



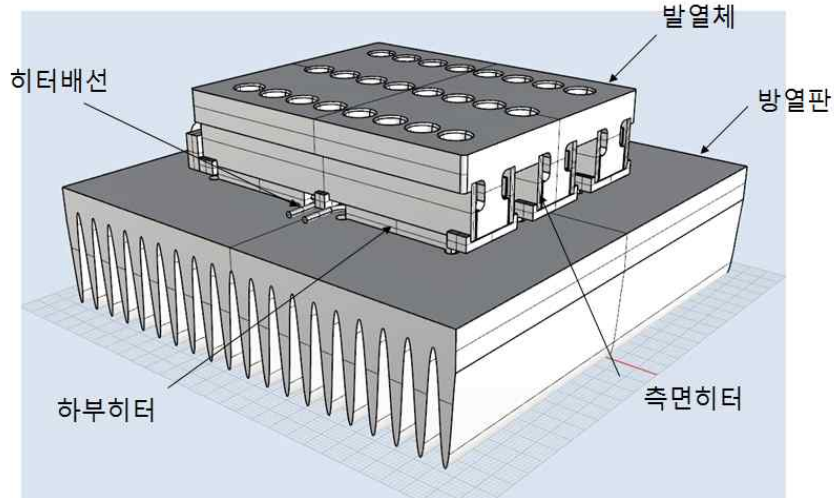
나. 휴대용 realtime PCR용 히터 설계.

- (1) PCR 히터는 PCR Plate가 장착되어 가열되는 시스템이므로 PCR Plate와 동시에 개발 됨.
- (2) 일반적으로 PCR 히터는 상부히터와 하부히터로 구성되어있음.
 - 상부히터는 시료의 증발을 막기 위하여 Plate 전체를 일정한 온도로 유지하는데 필요한 히터임. 따라서 시료를 이용한 PCR 실험과는 직접적인 연관은 없다고 할 수 있음.
 - 일반적으로 상부히터는 판 형태로 PCR Plate 전체를 덮는 형태로 개발이 됨. 따라서 PCR Plate 상부의 돌출부로 인하여 자국이 남게됨.
 - 본 개발에서는 광학모듈이 상부에 놓이므로 하부의 Plate에 직접적으로 가열을 할 수 없는 형태임. 따라서 Plate 주변에 열선이 놓이는 형태를 가지게 됨.



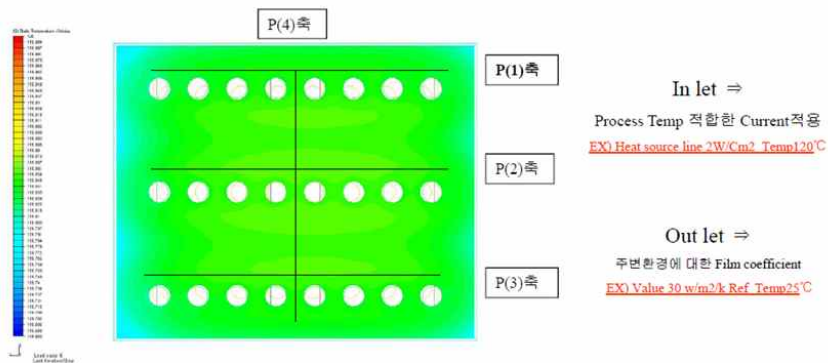
[상부 히터 도면 : PCR Plate 주위로 일정한 간격의 열선을 배치함.]

- 하부히터는 PCR Plate의 직접적인 가열을 담당하며, 따라서 PCR Plate와 동일한 형태를 가지고 있음. 본 개발의 PCR Plate가 8 well x 3열 구성이므로 하부 히터 역시 동일한 형태를 가지고 있음.
- 하부히터의 온도 정확도는 장비 전체의 성능에 직접적인 영향을 미침.



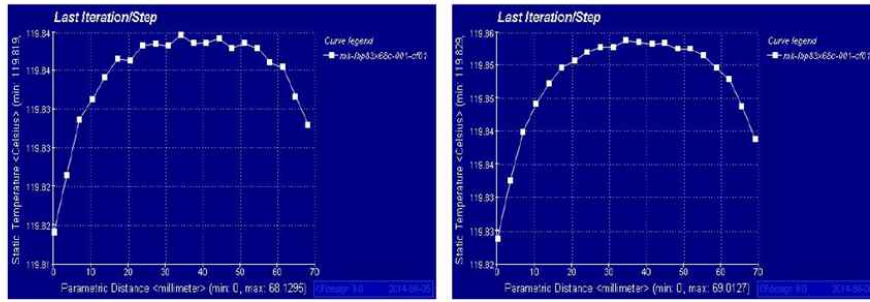
- 따라서 온도제어가 가장 중요함. 본 개발에서는 상기의 그림에서와 같이 8 tube 사이에도 측면히터를 배치하여 가열/냉각 시간을 단축하는 효과를 보았음.
- 특면 히터는 모두 열선 히터로 개발되었고, 하부의 냉각은 펠티어 소자를 이용하였음. 이를 이용하여 열특성이 매우 우수한 하부 히터를 획득하게 되었음.
- (3) 가열 온도의 정확성을 위하여 Ansys 프로그램을 이용하여 온도 분포를 시뮬레이션 하였고 아래에 그 결과를 나타내었음.

Heater Simulation Results



- 현재의 히터구조로 균일한 온도분포 구현 가능.
- 온도변이 +- 0.2도 구현 가능

Heater Simulation Results



P(1)측

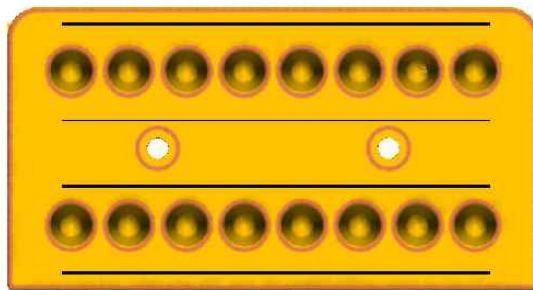
P(2)측

| 구분 | Max | Min | Ran |
|-----|----------|----------|--------|
| P1측 | 119.84°C | 119.82°C | 0.02°C |
| P2측 | 119.86°C | 119.83°C | 0.03°C |

- P(1)측, P(2)측 온도 분포 : +/- 0.2도 이내의 범위에서 양호

[온도 분포 시뮬레이션 결과]

- 상기 그림에서 세로축의 값은 맨 아래가 119.81 oC, 맨 위가 119.84 oC 로서 온도구배가 겨우 0.03 oC 밖에 안되는 결과를 획득하였음.



P(1)측

P(2)측

P(3)측

P(4)측

In let ⇒

Process Temp 적합한 Current 적용

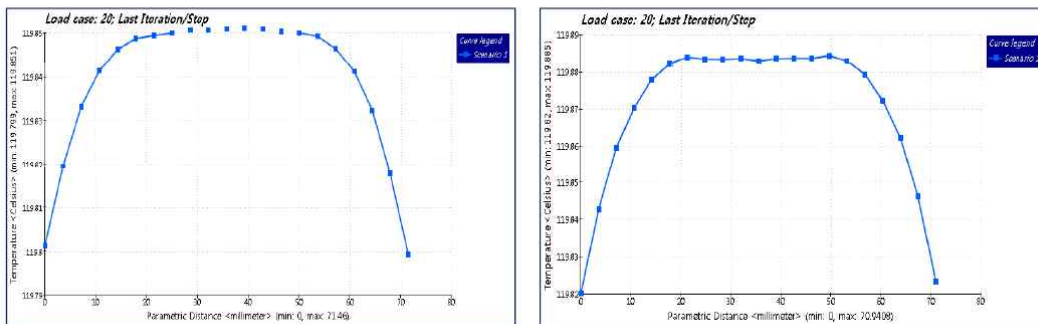
EX) Heat source line 2W/Cm2 Temp120°C

Out let ⇒

주변환경에 대한 Film coefficient

EX) Value 30 w/m2/k Ref Temp25°C

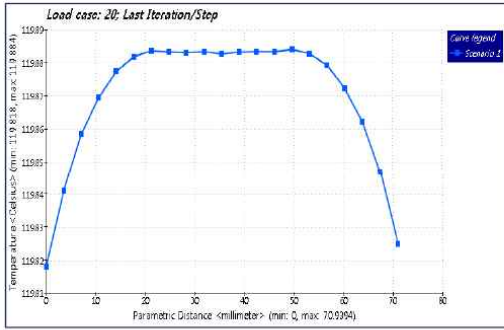
Heater Simulation Results



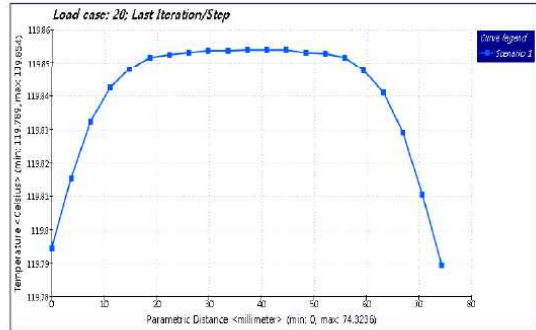
P(1)측

P(2)측

| 구분 | Max | Min | Ran |
|-----|----------|----------|--------|
| P1측 | 119.85°C | 119.8°C | 0.05°C |
| P2측 | 119.86°C | 119.82°C | 0.04°C |



P(3)측



P(4)측

| 구분 | Max | Min | Ran |
|-----|---------|---------|-------|
| P3측 | 119.85℃ | 119.82℃ | 0.03℃ |
| P4측 | 119.85℃ | 119.79℃ | 0.06℃ |

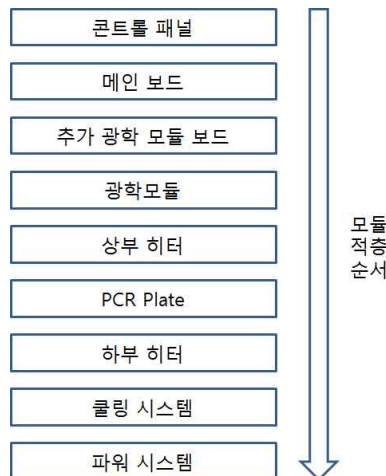
[온도 분포 시뮬레이션 결과]

- 상기 그림에서 세로축의 값은 맨 아래가 119.85 °C, 맨 위가 119. 82 °C 로서 온도구배가 겨우 0.03 °C 밖에 안되는 결과를 획득하였음.

다. 동물 인플루엔자 바이러스 현장 진단을 위한 realtime PCR 기본 설계.

- (1) RT-PCR에 포함되는 구성 요소 : 콘트롤 하드웨어/소프트웨어, 콘트롤 PCB 및 기타 구성 모듈 제어용 PCB, 히터 (상부 및 하부 히터), 전용 PCR-Plate (기존의 PCR 실험용 Tube와 100 % 호환 가능), 전체 시스템 온도제어용 쿨링 시스템, 안정된 전원을 공급할 수 있는 파워시스템.
- (2) 광학 모듈과 히터 시스템과의 배치 문제 : 기존의 Thermal Cycler 및 Realtime PCR 은 히터가 하부에 배치되어 있고, 광학모듈과는 독립되어 있음. 이 경우 PCR Plate를 이동시키는 이송장치모듈이 포함되어야 하고, 이 과정으로 인하여 전체 PCR 공정시간이 연장이 됨. 따라서 광학모듈과 히터 시스템을 일체형으로 상하배열하고, 그 사이에 PCR Plate를 배열하게 되면 전체 공정시간을 대폭 단축시킬 수 있음.

따라서 다음과 같이 각각의 모듈을 배치하였고 RT-PCR 설계를 진행하였음.



- 상기의 흐름도에서 PCR Plate는 상부히터와 하부히터 사이에 놓임. 그리고 콘트롤 패널 부터 상부히터까지, 하부히터에서 파워시스템까지는 일체형으로 구성이 가능함. 따라서 상부히터와 하부히터 사이에 PCR Plate를 삽입할 수 있도록 2개의 블록으로 구성된 RT-PCR 기기의 개발이 가능함.

라. 휴대용 realtime PCR 디자인 모형 제작.

(1) RT-PCR 디자인 모형 제작의 필요성 : 각각의 모듈의 크기(가로 x 세로 x 높이)를 사전에 규정하여 최종 완제품의 크기를 추측할 수 있고, 모듈간의 크기를 상호 조정하여, 모듈 전체의 집적도의 균일성을 꾀할 수 있음. 또한 모듈 배치시의 문제점을 사전에 예측할 수 있고, 히터의 가열로 인하여 발생하는 고열의 내부 분산 및 외부 배출등을 예측할 수 있으므로 반드시 필요한 과정임.

(2) Control Panel 제작 : 시스템 전반을 제어할 수 있는 S/W 가 내장된 Control Panel을 개발

- 일반적 구성 : 터치패널 액정, 숫자판, Play 버튼, Emergency Stop 버튼
- 특별 구성 : Quick 버튼을 적용. 현장에서 추가 Setup 없이 바로 시료 분석에 들어갈 수 있도록 Quick 버튼을 적용함.



[왼쪽, 실제 제작된 1차 디자인 모형, 오른쪽, 2차 렌더링 이미지]

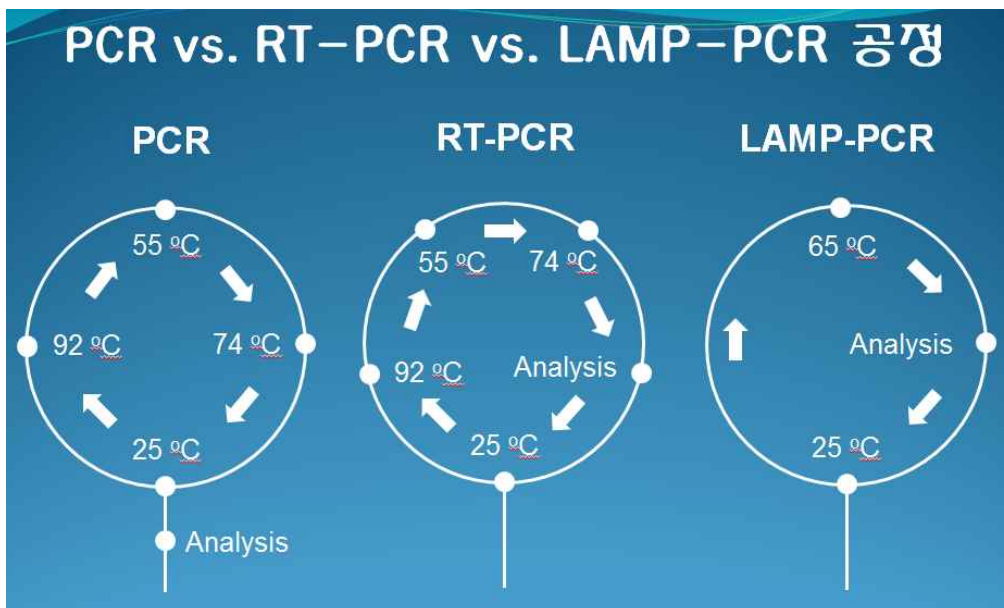
- 1차 모형에서는 Quick 버튼을 고려하지 않았으나, 2차 디자인에서 3개의 Quick 버튼이 포함됨.
- 1차 모형에서는 Screen에 Touch 기능을 넣지 않고, 방향키를 이용하여 메뉴간 이동을 고려하였으나, 현장의 상황에서 불편함이 발생할 수 있어, Touch 기능이 최종적으로

포함됨.

- 1차 모형에서는 Emergency Stop을 넣지 않았으나, PCR 공정에서 최종 Cycle 까지 도달하지 않아도, “판정”을 내릴 수 있으므로 2차 모형에는 Emergency Stop 버튼을 추가함.
- 1차 모형에서는 방수를 고려하지 않은 Button형의 입력장치였으나, 2차 모형에서는 현장이 농장이나, 습기가 많은 곳일 가능성이 높으므로 압전식 입력장치로 교체함.
- 1차 모형에서는 2곳의 입구를 마련하여 하부 입구는 PCR Plate 삽입용, 상부 입구는 광학부와 제어부의 경계로 차후의 수리등을 고려하여 마련하였으나, 공정 단순화 및 제품의 내구성 향상을 위하여 2차 모형에서는 1개의 입구만을 추가함.

마. PCR 기술의 비교

- PCR(Polymerase Chain Reaction) 기술이 발표된 이후로 유전자 시료 분석을 간편하게 일괄적으로 처리하기 위하여 많은 PCR 기기가 제시되었고, 특히 시료 증폭부터 분석까지 한번에 처리하는 Realtime PCR 기기가 많이 도입되었음.

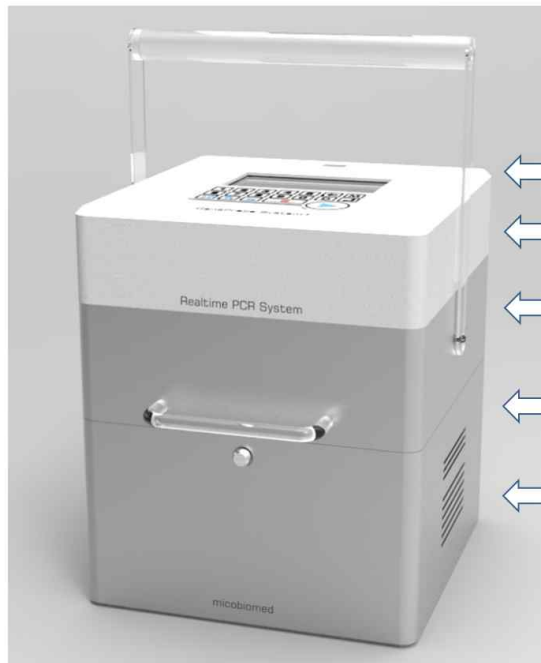


- 상기의 그림에서와 같이 LAMP-PCR은 RT-PCR 기기에 비하여 상대적으로 덜 복잡
- 또한 LAMP-PCR 기능을 RT-PCR 기기에 포함시켜 복합 PCR 기기로 개발이 가능함.

바. 동물 인플루엔자 바이러스 현장 진단을 위한 휴대용 LAMP-PCR 기본 설계.

- LAMP-PCR에 포함되는 구성 요소 : 콘트롤 하드웨어/소프트웨어, 콘트롤 PCB 및 기타 구성 모듈 제어용 PCB, 히터 (상부 및 하부 히터), 전용 PCR-Plate (기존의 PCR 실험용 Tube와 100 % 호환 가능), 전체 시스템 온도제어용 쿨링 시스템, 안정된 전원을 공급할 수 있는 파워시스템.
- 1차년도에 개발한 RT-PCR 과의 시스템 관계 및하우징 디자인

(1) RT-PCR 시스템 (2014 MEDICA 전시회에 전시되어 호평을 받음. 독일, 뒤셀도르프)



← 디스플레이 / 터치 패널

← 컨트롤 박스

← 광학 시스템 / 상부 히터

← 하부 히터 / 쿨링 시스템

← 전력 시스템

- 상기 RT-PCR 시스템은 24개의 샘플을 분석하기 위하여 설계되었고, Sample-Hole의 배치도 상용 PCR-Plate 나 PCR-Tube 와 100 % 호환되도록 설계되었음.
- 전력 시스템은 하부의 24개의 Hole에 대응하는 하부히터와 상부 전체를 예열하는 상부히터를 위하여 설계된 것으로서 대용량의 SMPS가 장착되었음.
- 또한 광학 시스템은 3개의 광학 모듈로 구성되어 있어 빠른 시간안에 24개의 Hole전체를 Scan할 수 있도록 설계되었음.
- 컨트롤 박스의 디스플레이는 감압식 터치패널을 장착하여 키 버튼외에도 모든 기능을 직접 제어할 수 있도록 되어 있고, 키 버튼에는 가장 많이 사용되는 실험 프로토콜을 빠르게 로딩할 수 있는 Quick Menu가 설정되어 있음.

(2) LAMP-PCR 시스템

- LAMP-PCR 실험은 보통 16개 이내로 샘플링을 하므로 본 개발의 경우에도 2 x 8, 즉, 8 Hole이 2줄로 배열된 형태의 히팅블록을 개발하였음.
- 하부 히터는 히팅블록과 같이 장착되고, 상부히터 및 광학시스템은 RT-PCR 과 동일한 구조, 즉 수직으로 일직선 형태로 배열하였음.
- 전원 시스템은 RT-PCR 대비 Hole의 갯수가 2/3 으로 감소하였으므로 저용량의 SMPS로도 히터에 충분한 발열을 유도할 수 있기 때문에 RT-PCR 과는 달리 하부히터의 측면에 배치하였음.
- 디스플레이 및 컨트롤 박스는 전원 시스템의 상부에 배치하여, 전체적으로 직육면체의 공간에 모든 부품이 수납되도록 배치하였음.
- RT-PCR 에서 상부히터와 하부히터를 힌지로 연결하여 PCR Plate 장착시에 열고 닫을 수 있도록 한 것과 동일하게 PCR Plate를 장착할 수 있게 설계하여 사용상의 편의를 도모하였음.
- 아래의 그림은 상기와 같은 내용에 기반하여 설계된 LAMP-PCR의 렌더링 이미지로서 1차년도 RT-PCR 과 Family-look 차원에 잘 어울림을 알 수 있음.

LAMP-PCR Rendered Images

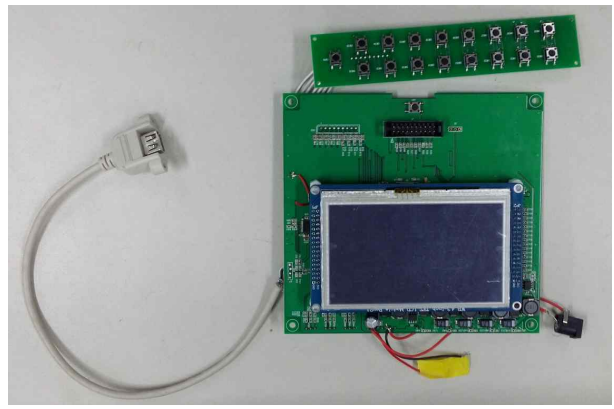


- 휴대용 LAMP-PCR 프로토타입 제작.

프로토타입 제작 순서 : 하우징 디자인 -> 부품 배치도 작성 -> 히터 설계 -> 메인보드 설계 -> 광학계 설계 -> 전원 시스템 및 냉각 시스템 설계 -> 부품 배치 및 간격 조정 -> 기계적 동작 확인 -> 전기적 특성 확인 -> 발열 분석 -> 최종 프로토타입 확정



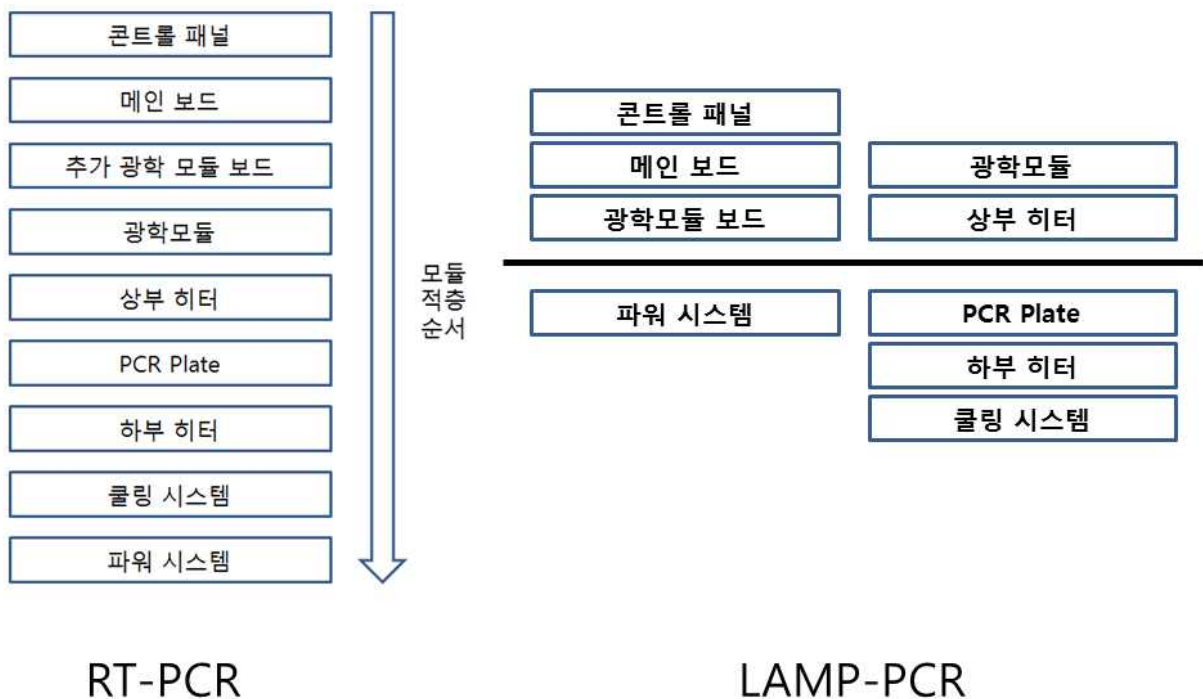
[LAMP-PCR의 최초 설계 디자인]



[LAMP-PCR 제작현황 및 이미지]

(3) RT-PCR 과 LAMP-PCR 모듈 적층 순서 비교

- 왼쪽은 수직 배열 형태의 RT-PCR 이고, 오른쪽은 상하-좌우 배열 형태의 LAMP-PCR.



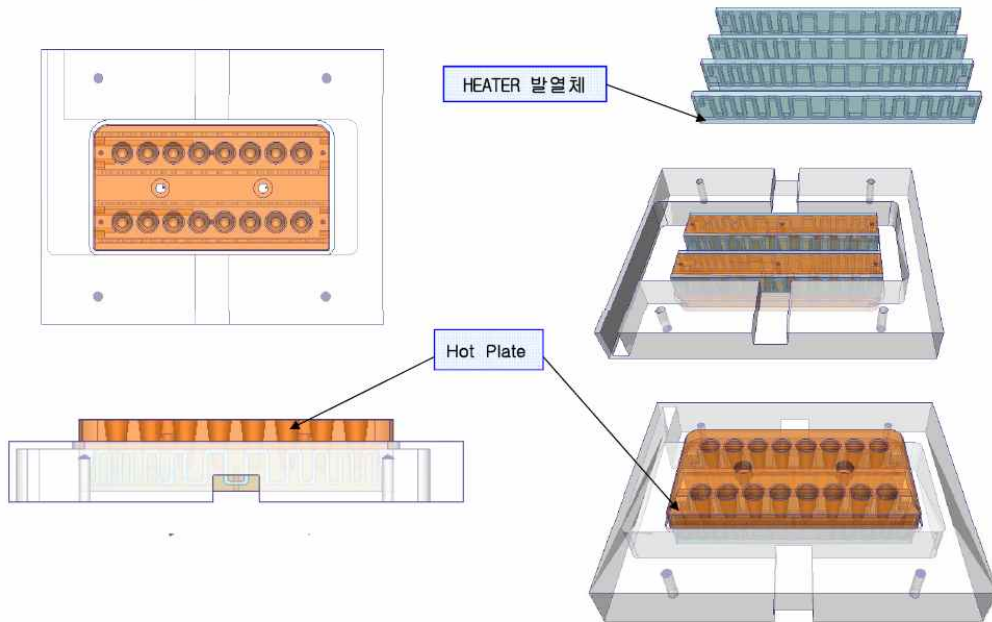
사. 휴대용 LAMP-PCR용 히터 설계.

(1) PCR 히터는 PCR Plate가 장착되어 가열되는 시스템이므로 PCR Plate와 동시에 개발됨.

(2) 일반적으로 PCR 히터는 상부히터와 하부히터로 구성되어있음.

- 상부히터는 시료의 증발을 막기 위하여 Plate 전체를 일정한 온도로 유지하는데 필요한 히터임. 따라서 시료를 이용한 PCR 실험과는 직접적인 연관은 없다고 할 수 있음.
- 일반적으로 상부히터는 판 형태로 PCR Plate 전체를 덮는 형태로 개발이 됨.
- RT-PCR과 마찬가지로 LAMP-PCR 에서도 광학모듈이 상부에 놓이므로 하부의 Plate에 직접적으로 가열을 할수없는 형태임. 따라서 Plate 주변에 열선이 놓이는 형태를 가지게 됨.

Heater Design



[하부 히터 디자인 : 8개의 Hole이 2열로 배치되어 있음.]

- 하부히터는 PCR Plate의 직접적인 가열을 담당하며, 8 Hole, 2열 구성으로서 히터 하부에 냉각용 방열판이 배치되어 있음. RT-PCR 과의 비교를 위하여 같이 나타내었음.



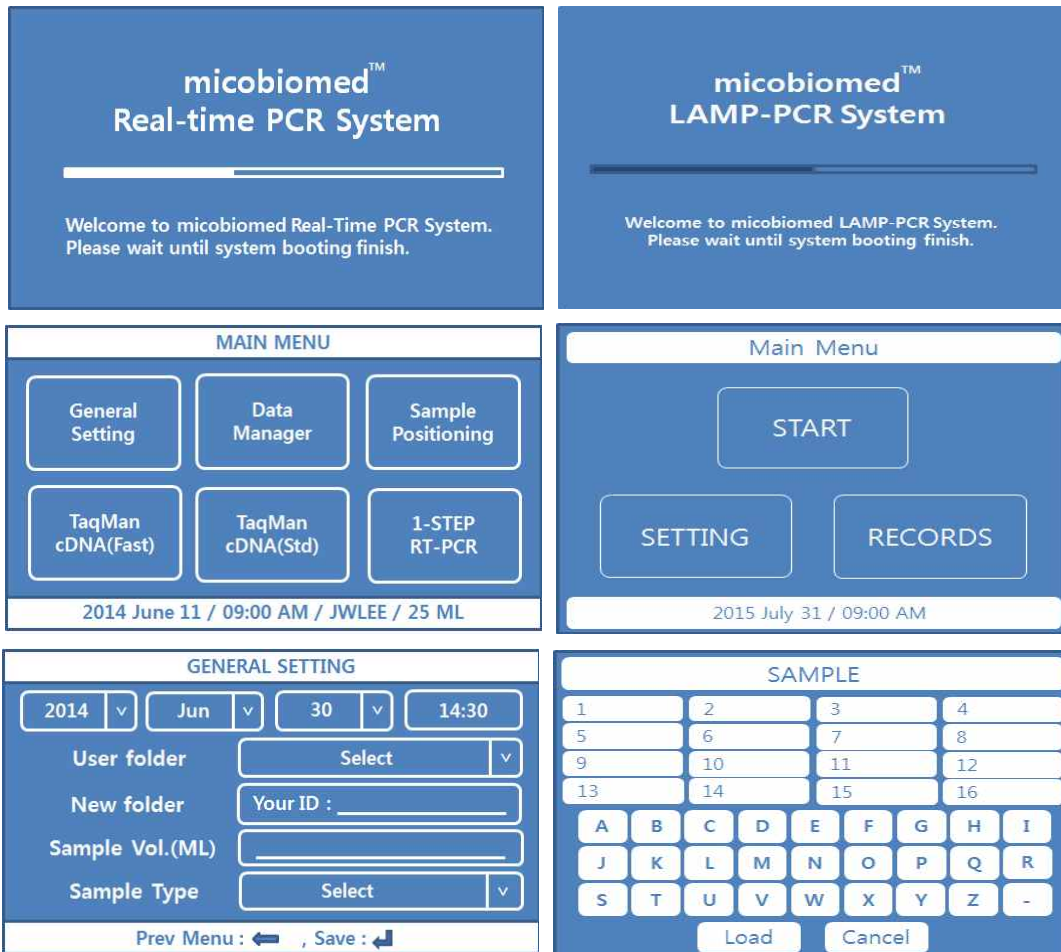
- 본 개발에서는 상기의 그림에서와 같이 열 사이에도 측면히터를 배치하여 가열/냉각

시간을 단축하는 효과를 보았음.

- 측면 히터는 모두 열선 히터로 개발되었고, 하부의 냉각은 펠티어 소자를 이용하였음.
- 이를 이용하여 열특성이 매우 우수한 하부 히터를 획득하게 되었음.

아. LAMP-PCR용 User Interface (UI) 개발

- (1) 시스템이 완성되면, 시스템을 구동하여 실험을 수행할 소프트웨어와 인터페이스가 필요.
 - 기존의 RT-PCR 기기를 분석하여 본 개발 고유의 사용자 인터페이스를 개발함.
- (2) 인터페이스의 조건을 수립
 - 외부의 컴퓨터 없이 자체적으로 데이터 처리 가능 할 것.
 - 현장에 적합하게 최대한 단순화 시킬 것.
 - 불필요한 기능을 최대한 억제하고, 필요한 기능에 쉽게 접근하도록 할 것.
 - 직관적인 인터페이스를 구현하여, 특별한 사전 교육 없이 바로 사용 가능하도록 할 것.
- (3) 상기의 조건을 기반으로 하여 다음과 같은 LAMP-PCR용 사용자 인터페이스를 개발함.
 - RT-PCR 용 UI와 Family-look을 구현하여 차후 두 시스템을 통합할 때, 사용자 편의성을 극대화함. 또한 동일한 UI는 제품에 대한 고객의 Royalty를 향상시킬 수 있음.





[개발된 RT-PCR 의 사용자 인터페이스의 일부분]

자. RT-PCR 열처리 보강

- (1) 금속소재 지지대 및 브릿지로 인하여 히터의 발열이 하우징으로 전달되는 현상 발생.
- 지지대 및 브릿지를 내열성 플라스틱으로 제작하여 해결함.
 - 제작 방법 : 3D 프린터와 내열 PLA 소재를 사용.

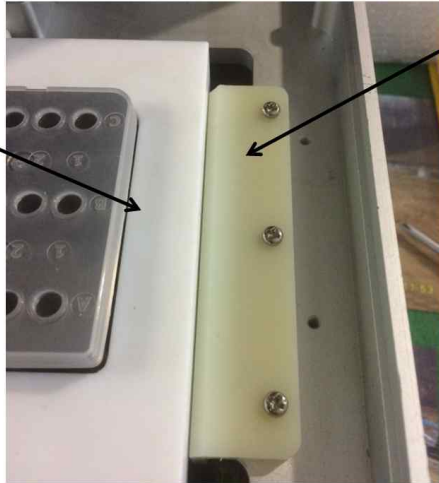


기존의 철판 덮개

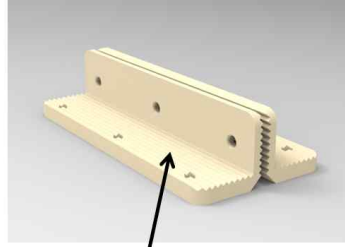


내열 플라스틱 덮개

히터



이 부분이 알루미늄으로 되어
있어 히터의 발열이 시스템
및 하우징으로 전달됨.
-> 내열 플라스틱으로 교체
하여 열전달을 억제함.



빗살무늬 구조로
접촉면적 최소화

(2) 상부 제어박스의 강도를 높이기 위하여 기존의 플라스틱에서 알루미늄으로 교체



제 2절. 동물 인플루엔자 바이러스 현장감별용 Pan-side RT-PCR 및 real time RT-PCR 키트 개발

A형 인플루엔자 바이러스(influenza A virus; IAV)는 사람과 다양한 동물에 감염되면서 유전적 변이를 지속하고 있으며, 2009년 pH1N1의 대유행과 같이 인류의 보건을 위협하는 새로운 변이주가 출현할 가능성이 상존하고 있다(Peiris 등, 1992; Vijaykrishna 등, 2010). 이러한 위협요인에 효율적으로 대응하기 위하여 사람 및 동물 집단에 감염되는 IAV에 대한 지속적인 감시활동이 필요하다.

IAV에 대한 효율적인 감시활동을 위해서는 신속, 정확한 진단법의 활용이 필수적이며, RT-PCR이나 real-time RT-PCR과 같은 유전자진단법은 IAV에 대한 감시활동과 동시에 바이러스의 유전적 특성 분석이 가능하기 때문에 여러 가축질병 진단기관에서 보편적으로 사용되고 있다(Wang와 Taubenberger, 2010). 그러나 PCR 기반 진단법은 목표유전자를 고도로 증폭시킴으로써 높은 민감도와 특이도를 갖는 반면에 오히려 고도의 민감도로 인하여 실험과정 중 극소량의 핵산 오염만으로도 오증폭을 유발하는 결정적인 단점을 가지고 있다(Li 등, 2012; Tetzner, 2009). 따라서 기존 PCR 진단법의 장점을 유지하면서 오염 가능성을 감소시키기 위하여, PCR 과정의 단순화와 함께 기증폭된 DNA의 오염에 의한 오진을 방지할 수 있는 새로운 방식의 PCR 진단법 개발이 시급한 실정이다. 이 연구에서는 이러한 요구에 부응하여, 기존의 2단계 (RT 및 PCR) RT-PCR 또는 real time RT-PCR을 1단계에서 검사를 완료할 수 있는 one-step RT-PCR 또는 one-step real time RT-PCR를 개발하여 실험과정을 단순화하고, 또한 기증폭된 핵산의 교차오염을 방지할 수 있는 uracil DNA glycosylase (UNG) 시스템을 적용하여 기증폭된 DNA의 오염에 의한 오진을 차단하여 진단의 신뢰도를 높이고자 하였다.

PCR 진단법에서의 오염문제는 검사시료를 처리하는 과정에서부터 PCR 전 과정에서 발생할 수 있으며, 특히 이전의 PCR을 통하여 증폭된 DNA의 오염 문제가 가장 심각한 것으로 보고되고 있다(Aslanzadeh, 2004; Kwok과 Higuchi, 1989; Persing, 1990). 따라서 이 연구에서는 이전의 PCR에서 기증폭된 DNA의 오염과 이로 인한 오증폭을 방지하기 위하여 UNG 시스템을 도입하였다. UNG는 DNA 염기서열로부터 uracil 염기를 절단하는 기능을 가지고 있으며, RNA나 유리된 nucleotide 상태의 uracil 염기를 절단하지는 않는다(Duncan, 1981). 따라서 PCR 진단시약에 포함되는 dTTP 대신에 dUTP를 첨가하여 PCR을 실시하게 되면 증폭된 DNA 단편의 유전자염기서열에는 dTTP 대신에 dUTP가 자리하게 되며, 이러한 DNA 단편에 UNG를 반응시키면 DNA 염기서열이 절단되기 때문에 다음 PCR 과정에 기증폭된 DNA가 오염되더라도 오증폭을 유발하지 않게 된다(Aslanzadeh, 2004; Longo 등, 1990). 이 연구에서 개발된 진단법은 이러한 원리를 이용하여 제조된 Premix를 이용함으로써 기증폭된 DNA에 교차오염에 의한 오증폭을 방지하고자 하였으며, 이를 돼지인플루엔자 (swine influenza virus, SIV) 진단법 개발 등에 적용하였다.

한편 본 연구과제에서 요구하는 현장진단용 진단키트를 개발하기 위해서는 진단의 과정을 단순화하는 작업과 함께 유전자진단법에서 필수적인 과정인 핵산 추출과정을 단순화할 필요가 있다. 기존의 핵산추출키트를 이용할 경우에는 고가의 키트와 함께 다양한 실험실 장비가 필요하게 되므로 현장 진단용으로 적용하기에는 한계가 있기 때문이다. 최근 핵산 추출과정을 최대한 단순화한 다양한 direct PCR (dPCR)용 premix들이 시판되고 있으며, 이들 키트들은 동물의 혈액이나 식물 및 동물의 조직을 직접 시료 처리액에 처리한 다음, 바로 PCR에 제공할 수

있도록 구성되어 있다. 이러한 dPCR 기법들은 동시에 많은 시료를 처리해야 하는 식물 병원체 진단분야에서 활발하게 적용되어 왔으나(Bellstedt 등, 2010; Biswas 등, 2014), 살모넬라(Li와 Mustapha, 2002), B형 간염 바이러스(Cheng 등, 2007), 인플루엔자 바이러스(Song 등, 2009) 등 사람과 동물의 병원체에도 성공적으로 적용된 바 있다. 시판되는 dPCR용 키트를 이용하여 진단법을 개발할 경우에는 시료의 종류에 따라 시료처리액을 적정비율로 사용하여 최대의 증폭효율을 확보하는 것이 중요하다. 또한 키트에 포함되어 있는 증폭효소가 실험 목적에 적합한지를 사전에 검토해야 한다. 이 연구에서는 국내·외 여러 회사의 시판 키트를 사전 검토한 결과, 본 과제 협력사에서 판매하는 시판 키트(NanoHelix, Korea가 가장 적합한 것으로 판단되었다. 따라서 본 과제에서 개발된 동물인플루엔자 바이러스 공통 진단용 RT-PCR 및 RRT-PCR 진단법에 이를 접목하여 dRT-PCR 및 dRRT-PCR 키트를 개발하고자 하였다.

이와 더불어 본 과제에서 요구하는 현장 진단용 진단키트의 요건을 추가로 충족하기 위하여 본 과제에서 주 개발목적으로 하고 있는 RT-PCR과 real time RT-PCR 진단법 이외 최근 현장진단용으로 다양한 질병 진단에 응용되고 있는 등온증폭진단법인 loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 기법을 이용한 SIV 및 조류 인플루엔자 바이러스 (avian influenza virus, AIV) 진단법 개발을 시도하였다. 현재 SIV와 AIV를 포함한 IAV에 대한 감시 활동에는 RT-PCR이나 rRT-PCR과 같은 PCR 기반 진단법이 보편적으로 사용되고 있다(OIE, 2012; WHO, 2010). 그러나 PCR 기반 진단법은 고가의 전용 장비와 시약을 필요로 하며, 숙련된 인력이 갖추어진 전문 실험실에서만 활용이 가능하므로 일선 임상실험실이나 현장 진단용으로 사용하기에는 제한이 있어 왔다. 이러한 PCR 기반 진단법의 단점을 극복할 수 있는 방법 중의 하나로 Notomi 등(2000)은 높은 특이도와 민감도를 가지면서도 등온조건 하에서 신속하게 목표 유전자를 증폭할 수 있는 LAMP 기법을 개발하였다. 이 LAMP 기법은 기존의 PCR 기반 진단법에서 사용되는 Taq DNA polymerase와 달리 목표유전자를 strand displacement 방식에 의해 대량 증폭할 수 있는 Bst DNA polymerase를 이용함으로써 유전자 증폭효율이 월등하게 높다. 또한 기존의 PCR 기반 진단법과는 달리 온도 변화가 없는 등온 조건에서 유전자 증폭이 이루어지기 때문에 검사시간이 단축될 뿐만 아니라 항온수조와 같은 저가의 장비로도 반응이 가능하다. 따라서 전문 진단실은 물론 고가의 장비와 시약 및 전문인력이 확보되지 않은 소규모의 진단실이나 현장 진단용 등으로 그 응용범위는 더욱 확대될 것으로 예측된다(Dhama 등, 2014). 이러한 LAMP의 장점에 따라 현재 LAMP는 세계적으로 다양한 세균, 기생충 및 바이러스의 진단에 널리 이용되고 있으며, 역전사반응을 결합시킨 RT-LAMP가 개발되면서 IAV 등 다양한 RNA 바이러스의 진단에도 응용되고 있다(Dhama 등, 2014). 한국에서도 최근 수의학 분야의 여러 연구자들이 LAMP 기법을 병원체 진단에 응용한 보고가 있으나 주로 세균성 질병인 결핵(Hwang 등, 2011; Koh 등, 2013), 살모넬라(Cho 등, 2013), 대장균(Dong 등, 2014)에 대하여 적용되어 왔다. 바이러스성 질병에 대해서는 개 홍역(Cho 등, 2005), 낭충봉아부패병(Yoo 등, 2012)에 적용된 바가 있으나 아직 IAV 진단에는 적용된 바가 거의 없는 것으로 파악되며, 이 연구에서 SIV의 진단에 RT-LAMP를 적용한 예를 통하여 향후 LAMP가 국내 수의학 분야에서도 다양한 바이러스성 질병의 진단에 응용되는 계기가 될 것이다.

따라서 본 연구과제에서는 기존의 동물 인플루엔자 바이러스 진단법으로 널리 활용되는 RT-PCR 및 real time RT-PCR 기법을 개선하고, 이를 현장진단용으로 활용할 수 있도록 direct화 하였으며, 최근 현장진단용으로 널리 활용되는 RT-LAMP 기법을 개발하는 등 동물 인플루엔자 바이러스 진단법 전반에 걸친 개발을 진행하였으며, 본 과제를 통하여 도출된 성과

는 논문 및 진단키트 개발에 활용하였다. 본 과제를 통하여 도출된 연구성과는 국내 동물 인플루엔자 바이러스의 효율적인 진단 및 방역에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

1. 동물 인플루엔자 바이러스 현장 감별용 pan-side RT-PCR 키트 개발

가. 돼지의 현장진단용 인플루엔자 및 신종인플루엔자 감별진단키트

- (1) 목적동물 : 돼지
- (2) 공시 바이러스 : Swine influenza virus subtype H1, H3 및 pandemic 2009 H1N1
 - 공시 바이러스를 국제수역사무국(OIE)의 표준 방법에 준하여 발육란에 접종하여 배양한 다음, 혈구응집반응을 실시하여 역가를 측정 한 다음, 시험에 제공하였다.
- (3) 개발 목표 : 모든 SIV를 검출하는 공통 primer set와 H1, H3 및 pandemic 2009 H1N1 아형 검출용 primer set를 동일 RT-PCR 조건에서 동시 검출할 수 있는 multi-tube RT-PCR 키트 개발.
- (4) RT-PCR 조건 확립
 - (가) RNA 추출 : 시판 RNA 추출키트
 - (나) Primer 설계 및 제작 : 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set를 선별하기 위하여 2009~2012년 사이에 Genbank에 등록된 정보를 활용하여 모든 SIV 아형을 증폭할 수 있는 공통 primer set(ComF-ComR), pH1N1 바이러스를 증폭할 수 있는 primer set(NFF-NFR), H1 아형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set(SH1F-SH1R) 및 H3 아형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set(SH3F-SH3R)을 설계함 (Table 1).
 - 설계 primer set의 효용성을 검증하기 위하여 NCBI에 등록된 염기서열 정보를 확보한 다음, *in silico* PCR 프로그램을 이용하여 확보된 해당 염기서열 대비 증폭 성공률 (PSR)을 조사하였음. 그 결과, 개발된 primer set의 PSR은 99.7-100%로 우수한 것으로 확인됨.

Table 1. Primer sets used in the RT-PCR for the detection of SIV

| Target | Name | Oligonucleotide sequence | Size(bp) | Reference | PSR (No. of succeed/ tested sequence) ^a |
|--------|------|-----------------------------------|----------|-----------------------|--|
| Matrix | ComF | 5'-ATGAGYCTTYTAACCGAGGTCGAAACG-3' | 242 | Shin et al. (2011) | 100% (6871/6871) |
| | ComR | 5'-TGGACAAANCGTCTACGCTGCAG-3' | | | |
| Matrix | NFF | 5'-GGAGGTGTCCTAAGCTATTCA-3' | 452 | Shin et al. (2011) | 100% (4674/4674) |
| | NFR | 5'-CCCAATGATATTTGCTGCAATG-3' | | | |
| HA | SH1F | 5'-CAGTRTCATCATTTGARAGRTT-3' | 375 | this study | 99.7% (5341/5359) |
| | SH1R | 5'-GTCCAGTARTAGTTSATTCT-3' | | | |
| HA | SH3F | 5'-CCTCGRGGTTACTTCAAAT-3' | 608 | this study | 100% (2145/2145) |
| | SH3R | 5'-CCATRTCCTCAGCATTTC-3' | | | |

^a The predictive success rates (PSRs) of the RT-PCR primers sets were calculated by a web-based *in silico* PCR program based in the Influenza Sequence Database between 2011 and 2016

(다) RT-PCR 반응액 조성 : 시판키트(inclone사, one-step RT-PCR 키트) 사용

| 시약 | 조성 | <각 primer 농도> |
|--------------------|----------|---|
| template | 5 ul | - SIV공통(Com): 2.5p, NF: 4.7p, H1아형(SH1): 34p, H3아형(SH3): 34p |
| 2x reaction buffer | 12.5 ul | |
| enzyme | 1 ul | |
| primer(F/R) | 각 x ul | |
| D·W to | to 25 ul | |

(라) RT-PCR 반응조건

| Step | RT-PCR Cycle | | |
|----------------------|--------------|--------|---------|
| | Temp | Time | Cycle |
| cDNA synthesis | 50℃ | 30 min | 1 cycle |
| Initial inactivation | 95℃ | 15 min | 1 cycle |
| Denaturation | 94℃ | 30 sec | 35cycle |
| Annealing | 55℃ | 60 sec | |
| Extension | 72℃ | 90 sec | |
| Final Extension | 72℃ | 5 min | 1 cycle |

(마) RT-PCR의 특이도 및 민감도 검정

- ① 특이도 검증 :SIV H1N1, H1N2, H3N2 및 pandemic 2009 H1N1의 바이러스 배양액에서 RNA를 추출한 다음, RT-PCR을 실시한 결과, 각 primer set가 해당 바이러스에만 특이적으로 반응함을 확인하였음(Fig. 1).

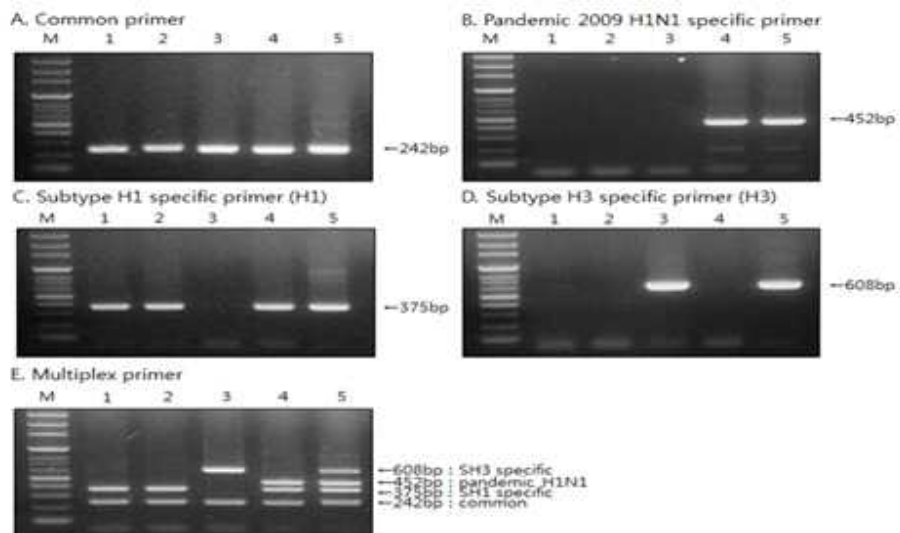


Fig. 1. Specificity of the RT-PCR for the detection of swine influenza virus (SIV) subtype H1, H3 and pandemic 2009 H1N1 (pH1N1) by single (A-D) or multiplex RT-PCR (E). Lane M; 100bp DNA ladder, Lane 1; SIV H1N1, Lane 2; SIV H1N2, Lane 3; SIV H3N2, Lane 4; pH1N1, Lane 5; mixed viruses.

- ② 민감도 검증: 각 바이러스 배양액에 대하여 HA를 실시하여 바이러스 역가를 8배로 조정하였고, 이를 4배수 단계희석한 다음, 각 희석액에서 추출된 RNA에 대하여 RT-PCR을 실시하여 검출한계를 확인한 결과, 각 바이러스별로 H1N1 아형은 2^{-7} HA,

H1N2 아형은 2^{-6} HA, H3N2 아형은 2^{-6} HA, 그리고 pH1N1 아형은 2^{-7} HA 까지 명확하게 관찰이 가능하였으며, 5종의 공시 바이러스 혼합시료인 경우에도 개별 바이러스에 대한 RT-PCR 결과와 별 차이 없이 2^{-6} HA까지 특이밴드가 확인되었음(Fig. 2).

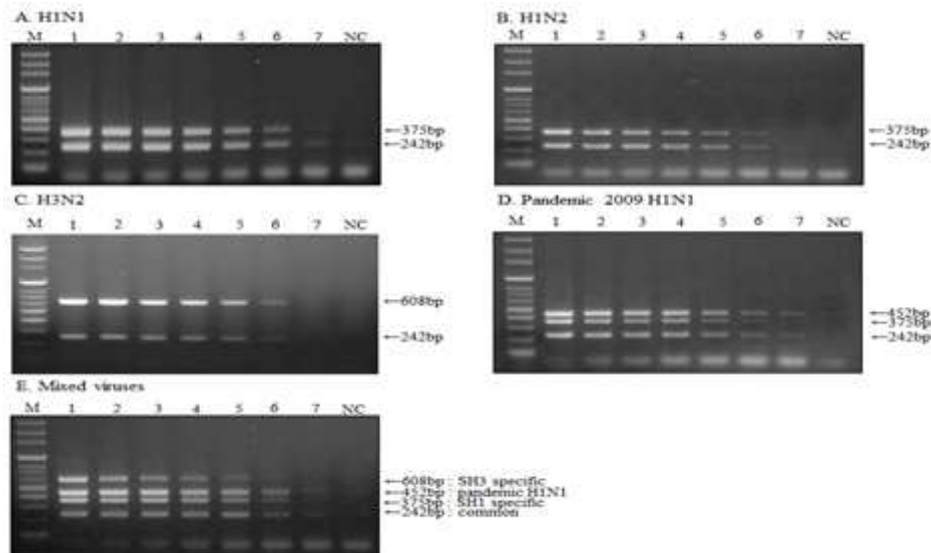


Fig. 2. Sensitivity of the one-step multiplex RT-PCR for the detection of swine influenza virus (SIV). A to E correspond to SIV subtype H1N1, H1N2, H3N2, pandemic 2009 H1N1 and mixed virus samples, respectively. Lane M; 100 bp ladder, Lane 1-7: serial dilutions (2^3 , 2^1 , 2^{-1} , 2^{-3} , 2^{-5} , 2^{-7} and 2^{-9} HA/25ul) of cultured influenza viruses, respectively. Lane NC; negative control.

(바) UNG (uracyl DNA glycosylase) 시스템 조건 확립

- ① dUTP의 최적 첨가농도 설정 : premix에 dATP, dCTT 및 dGTT의 농도는 2.5mM로 고정하였고, dTTP와 dUTP의 최종 농도는 2.5mM로 하되 dTTP와 dUTP의 비율을 2.5/0mM(5:0), 2.0/0.5mM(4:1), 1.5/1.0mM(3:2), 1.0/1.5mM(2:3), 2.0/0.5mM(1:4) 및 2.5/0mM(5:0) 비율로 조정하여 첨가한 다음, RT-PCR을 실시하여 증폭효율에 영향을 주지 않는 최적의 비율을 확인한 결과, dTTP와 dUTP의 비율이 1.5/1.0mM(3:2) 일 때 최적의 반응을 나타냄을 확인하였음.
- ② UNG의 최적 농도 설정 : dPCR premix에 UNG를 5unit, 2.5unit, 1unit, 0.5unit, 0.1unit로 조정하여 RT-PCR을 실시하여 PCR 반응에 영향을 주지 않으면서도 오염시킨 기증폭 DNA에 대해 반응을 일으키지 않는 적정 UNG 농도를 교차탐색한 결과, UDG를 1unit 첨가하였을 때 민감도에 영향을 미치지 않으면서 기증폭 DNA에 의한 오증폭이 일어나지 않았음.
- ③ UNG 시스템의 핵산오염 방지 효과 확인 : uPCR을 통하여 기 증폭된 DNA를 Nanodrop lite(Thermo Scientific, USA)로 정량한 다음, 20ng/ul에서 10pg/ul 농도로 희석하였고, 이 희석액을 UNG를 적용한 premix와 UDG를 적용하지 않은 premix에 각각 첨가한 다음 동일한 조건으로 PCR을 실시하여 특이 밴드 증폭 여부를 확인한 결과, 결과, UNG 시스템 비적용 premix로 RT-PCR을 실시한 경우에는 오염된 DNA에 의한 증폭이 일어났지만 UNG 시스템 적용 uPremix으로 RT-PCR을 실시한 경우에는 오염시킨 DNA의 양에 상관없이 오증폭이 일어나지 않음이 확인되었음(Fig. 3).

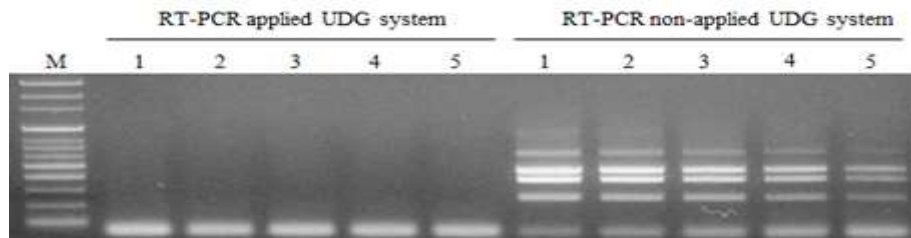


Fig. 3 Prevention effect of the DNA carryover contamination in the developed one-step multiplex RT-PCR without UNG system (A) and with UNG system (B). Lane M; 100bp ladder, Lane 1-5; RT-PCR results with each premix incorporated with pre-amplified SIV DNAs by the developed RT-PCR as a different concentration of 20ng, 10ng, 1ng, 100pg and 10pg/ul, respectively.

(사) Direct RT-PCR의 민감도 비교 : 각 바이러스 배양액에 대하여 HA를 실시하여 바이러스 역가를 2^6 배로 조정하였고, 이를 8배수 단계희석한 다음, 각 희석액에서 추출된 RNA에 대하여 RT-PCR을 실시하여 검출한계를 확인한 결과, common에서는 2^{-6} HA, Subtype H1에서는 2^{-6} HA, Subtype H3에서는 2^{-0} HA, Pandemic 2009 H1N1에서는 2^{-3} HA까지 특이밴드가 확인되었음(Fig. 4).



Fig. 4. Sensitivity of the one-step multi-tube direct RT-PCR for the detection of swine influenza virus (SIV). Lane M; 100 bp ladder, Lane 1-5; serial dilutions (2^6 , 2^3 , 2^0 , 2^{-3} , 2^{-6} HA titer) of cultured influenza viruses, respectively. Lane 6; negative control.

나. 닭의 현장진단용 인플루엔자 및 유사질병(뉴캐슬병) 감별진단키트

- (1) 목적동물 : 조류 (닭)
- (2) 공시 바이러스 : Avian influenza virus subtype H5, H7, H9 및 NDV
 - 공시 바이러스를 국제수역사무국(OIE)의 표준 방법에 준하여 발육란에 접종, 배양한 다음, 혈구응집반응을 실시하여 역가를 측정 한 후 시험에 제공하였음.
- (3) 개발 목표 : 모든 AIV를 검출하는 공통 primer set와 H5, H7 및 H9 아형 검출용 primer set 그리고 NDV 검출용 primer set를 동일 RT-PCR 조건에서 동시 검출할 수 있는 multi-tube RT-PCR 키트 개발.
- (4) RT-PCR 조건 확립
 - (가) RNA 추출 : 시판 RNA 추출키트
 - (나) Primer 설계 및 제작 : 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set를 선별하기 위하여 2009~2012년 사이에 Genbank에 등록된 정보를 활용하여 모든 AIV 아형을 증폭할 수 있는 공통 primer set(ComF-ComR), H5아형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer

set(AH5F-AH5R), H7아형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set(AH7F-AH7R), H9아형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set(AH9F-AH9R)을 설계함 (Table 2).

- 설계 primer set의 효용성을 검증하기 위하여 NCBI에 등록된 염기서열 정보를 확보한 다음, *in silico* PCR 프로그램을 이용하여 확보된 해당 염기서열 대비 증폭 성공률 (PSR)을 조사하였음. 그 결과, 개발된 primer set의 PSR은 99.6-100%로 우수한 것으로 확인됨.

Table 2. Primer sets used in the RT-PCR for the detection of AIV and NDV

| Target | Name | Oligonucleotide sequence | Size(bp) | Reference | PSR (No. of succeed/ tested sequence) ^a |
|--------|----------|------------------------------|----------|------------|--|
| Matrix | ComF | 5'-CTAACCGAGGTCGAAACGTA-3' | 214 | this study | 100% (12572/12576) |
| | ComR | 5'-TGGACAAAKCGTCTACGCT-3' | | | |
| H5 | AH5F | 5'-CGCTCCWGAATATGCRTACAA-3' | 831 | this study | 99.9% (3992/3997) |
| | AH5R | 5'-AGACCAGCYAYCATGATTGCC-3' | | | |
| H7 | AH7F | 5'-CAGCTCTGATAATHTGGGG-3' | 561 | this study | 99.6% (1721/1729) |
| | AH7R | 5'-TCYCCTTGTGCATTTTGATG-3' | | | |
| H9 | AH9F | 5'-AAAGAATTGCTCCACACAGAGC-3' | 301 | this study | 99.9% (3258/3261) |
| | AH9R | 5'-AATGAATCTGAACATGCTTTGC-3' | | | |
| F | NDV ComF | 5'-AGCTGCAGGGATTGTGGT-3' | 443 | this study | - |
| | NDV ComR | 5'-ACAAAYTGYTGCATCTTCCC-3' | | | |
| F | NDV NPF | 5'-AAGGAGACRRAAACGCTTC-3' | 224 | this study | - |
| | NDV NPR | 5'-ACAAAYTGYTGCATCTTCCC-3' | | | |

^a The predictive success rates (PSRs) of the RT-PCR primers sets were calculated by a web-based *in silico* PCR program based in the Influenza Sequence Database between 2011 and 2016

(다) RT-PCR 반응액 조성 : 시판키트(inclone사, one-step RT-PCR 키트) 사용

| 시약 | 조성 | <각 primer 농도> |
|--------------------|----------|---|
| template | 5 ul | - AIV 공통(Com): 3p, H5아형(AH5): 3p, H7아형(AH7): 9p, H9아형(AH9): 20p - NDV 공통(Ncom): 5p, 병원성 NDV(NP): 10p |
| 2x reaction buffer | 12.5 ul | |
| enzyme | 1 ul | |
| primer(F/R) | 각 x ul | |
| D·W to | to 25 ul | |

(라) RT-PCR 반응조건

| Step | RT-PCR Cycle | | |
|----------------------|--------------|--------|---------|
| | Temp | Time | Cycle |
| cDNA synthesis | 50°C | 30 min | 1 cycle |
| Initial inactivation | 95°C | 15 min | 1 cycle |
| Denaturation | 94°C | 30 sec | 35cycle |
| Annealing | 55°C | 60 sec | |
| Extension | 72°C | 90 sec | |
| Final Extension | 72°C | 5 min | 1 cycle |

(마) RT-PCR의 특이도 및 민감도 검정

- ① 특이도 검증 : AIV H1~H12 아형 및 NDV 바이러스 배양액에서 RNA를 추출한 다음, RT-PCR을 실시하여 각 primer가 해당 바이러스에 대해 특이적으로 반응하는지 확인한 결과, 각 primer set가 해당 바이러스에만 특이적으로 반응함을 확인하였음(Fig. 5와 6).

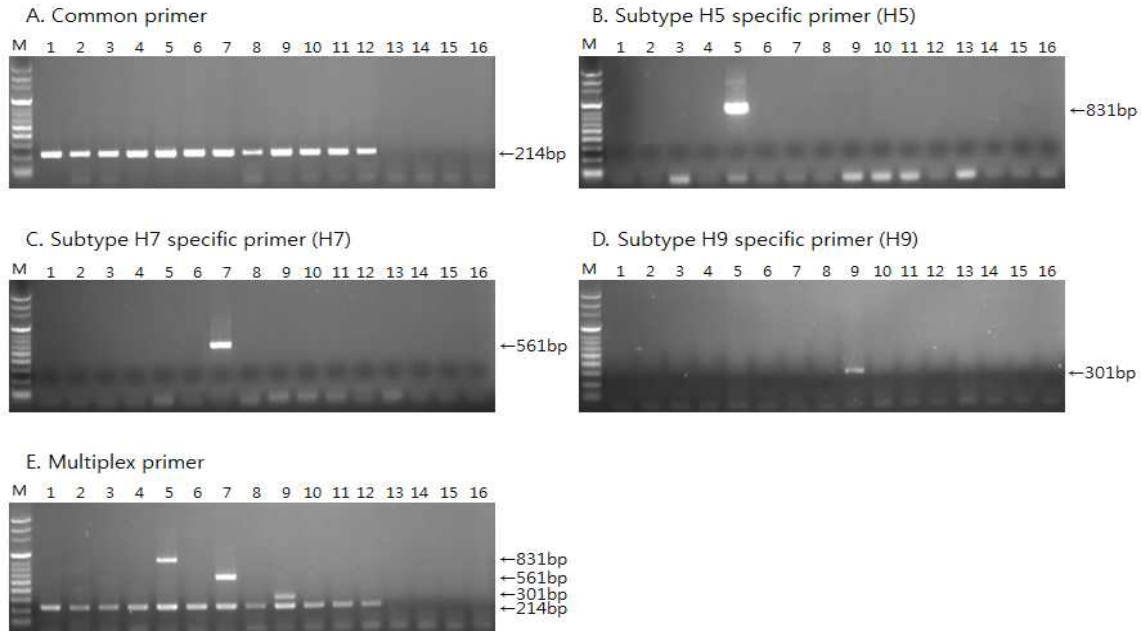


Fig. 5. Specificity of the RT-PCR for the detection of avian influenza virus (AIV) subtype H5, H7 and H9 by single (A-D) or multiplex RT-PCR (E). Lane M; 100bp DNA ladder, Lane 1; AIV H1N1, Lane 2; AIV H2N2, Lane 3; AIV H3N8, Lane 4; AIV H4N6, Lane 5; AIV H5N3, Lane 6; AIV H6N5, Lane 7; AIV H7N1, Lane 8; AIV H8N4, Lane 9; AIV H9N2, Lane 10; AIV H10N7, Lane 11; AIV H11N6, Lane 12; AIV H12N5, Lane 13; RA, Lane 14; DHV, Lane 15; NDV(lasota), Lane 16;NDV(Kyojungwon).

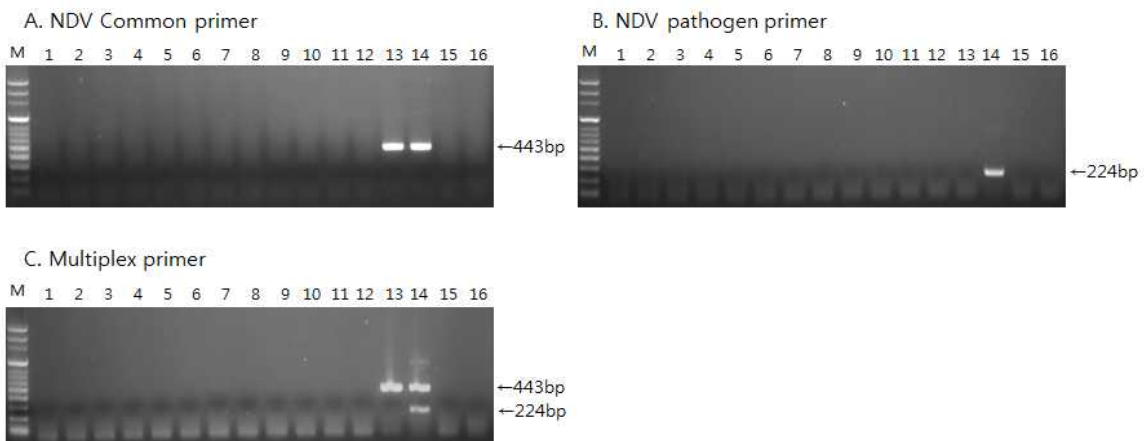


Fig. 6. Specificity of the RT-PCR for the detection of Newcastle disease virus (NDV) by single (A, B) or multiplex RT-PCR (C). Lane M; 100bp DNA ladder, Lane 1; AIV H1N1, Lane 2; AIV H2N2, Lane 3; AIV H3N8, Lane 4; AIV H4N6,

Lane 5; AIV H5N3, Lane 6; AIV H6N5, Lane 7; AIV H7N1, Lane 8; AIV H8N4, Lane 9; AIV H9N2, Lane 10; AIV H10N7, Lane 11; AIV H11N6, Lane 12; AIV H12N5, Lane 13; RA, Lane 14; DHV, Lane 15; NDV(lasota), Lane 16; NDV((Kyojungwon)).

② 민감도 검증 : 각 바이러스 배양액에 대하여 HA를 실시하여 바이러스 역가를 8배로 조정하였고, 이를 4배수 단계희석한 다음, 각 희석액에서 추출된 RNA에 대하여 RT-PCR을 실시하여 검출한계를 확인한 결과, 각 바이러스별로는 H5 아형은 2^{-6} HA, H7 아형은 2^{-4} HA, H9 아형은 2^0 HA까지 명확하게 특이밴드를 확인하였음 (Fig. 7).

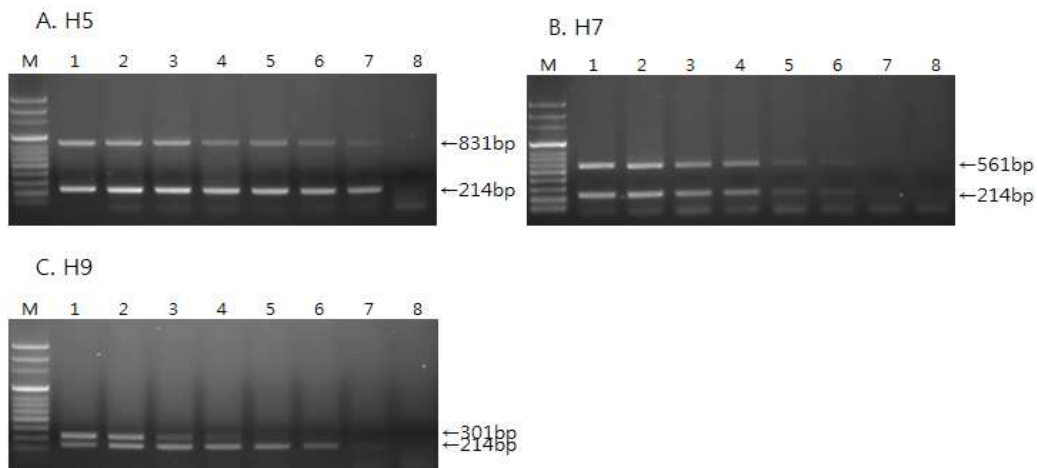


Fig. 7. Sensitivity of the one-step multiplex RT-PCR for the detection of avian influenza virus (AIV). A to C correspond to AIV subtype H5, H7 and H9 samples, respectively. Lane M; 100 bp ladder, Lane 1-7: serial dilutions (2^6 , 2^4 , 2^2 , 2^0 , 2^{-2} , 2^{-4} and 2^{-6} HA titer) of cultured influenza viruses, respectively. Lane 8; negative control.

다. 오리용 인플루엔자 및 유사질병(바이러스성 간염, 리메렐라) 감별진단용 키트

- (1) 목적동물 : 조류 (오리)
- (2) 공시 바이러스 : Avian influenza virus subtype H5, H7, H9 및 오리 바이러스성 간염 (DHV). 리메렐라균(RA)
 - 공시 바이러스를 국제수역사무국(OIE)의 표준 방법에 준하여 발육란에 접종하여 배양한 다음, 혈구응집반응을 실시하여 역가를 측정한 다음, 시험에 제공하였음.
- (3) 개발 목표 : 모든 AIV를 검출하는 공통 primer set와 H5, H7 및 H9 아형 검출용 primer set, 그리고 DHV 및 RA 용 primer set를 이용하여 동일 RT-PCR 조건에서 해당 병원체를 동시에 검출할 수 있는 multi-tube RT-PCR 진단법 개발.
- (4) RT-PCR 조건 확립
 - (가) RNA 추출 : 시판 RNA 추출키트
 - (나) Primer 설계 및 제작 : 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set를 선별하기 위하여 2009~2012년 사이에 Genbank에 등록된 정보를 활용하여 모든 AIV 아형을 증폭할 수 있는 공통 primer set(ComF-ComR), H5아형을 특이적으로 증폭할 수 있는

primer set(AH5F-AH5R), H7아형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set(AH7F-AH7R), H9아형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set(AH9F-AH9R)을 설계함(Table 3).

- 설계 primer set의 효용성을 검증하기 위하여 NCBI에 등록된 염기서열 정보를 확보한 다음, *in silico* PCR 프로그램을 이용하여 확보된 해당 염기서열 대비 증폭 성공률(PSR)을 조사하였음. 그 결과, 개발된 primer set의 PSR은 99.6-100%로 우수한 것으로 확인됨.

Table 3. Primer sets used in the one-step multiplex RT-PCR primers for the detection of AIV, DHV and RA

| Target | Name | Oligonucleotide sequence | Size(bp) | Reference | PSR (No. of succeed/ tested sequence) ^a |
|------------------------------|------|---------------------------------|----------|----------------------------------|--|
| Matrix | ComF | 5'-CTAACCGAGGTCGAAACGTA-3' | 214 | this study | 100% (12572/12576) |
| | ComR | 5'-TGGACAAAKCGTCTACGCT-3' | | | |
| HA | AH5F | 5'-CGCTCCWGAATATGCRTACAA-3' | 831 | this study | 99.9% (3992/3997) |
| | AH5R | 5'-AGACCAGCYAYCATGATTGCC-3' | | | |
| HA | AH7F | 5'-GARAATGCTGAAGAAGATGG-3' | 278 | this study | 99.6% (1721/1729) |
| | AH7R | 5'-CAAATRGTGCACTGCATGTT-3' | | | |
| HA | AH9F | 5'-AAAGAATTGCTCCACACAGAGC-3' | 437 | this study | 99.9% (3258/3261) |
| | AH9R | 5'-AATGAATCTGAACATGCTTTGC-3' | | | |
| polyprotein | DHVF | 5'-GAAAGAAGGAGAAAATYAAGGAAGG-3' | 470 | Kim et al. (2008) modified | - |
| | DHVR | 5'-GGTTGATGTCATATCCCAAGACAGC-3' | | | |
| triphosphate pyrophosphatase | RAF | 5'-ATTCCCTTCGGACCATAGAT-3' | 294 | this study | - |
| | RAR | 5'-TCATCTAGCAGTGAGTGACAT-3' | | | |

^a The predictive success rates (PSRs) of the RT-PCR primers sets were calculated by a web-based *in silico* PCR program based in the Influenza Sequence Database between 2011 and 2016

(다) RT-PCR 반응액 조성 : 시판키트(optigen사, Isothermal Master Mix 키트) 사용

| 시약 | 조성 | <각 primer 농도> |
|--------------------|----------|---|
| template | 5 ul | - AIV 공통(Com): 3p, H5아형(AH5): 3p, H7아형(AH7): 9p, H9아형(AH9): 20p - DHV: 10p, RA: 10p |
| 2x reaction buffer | 12.5 ul | |
| enzyme | 1 ul | |
| primer(F/R) | 각 x ul | |
| D·W to | to 25 ul | |

(라) RT-PCR 반응조건

| Step | RT-PCR Cycle | | |
|----------------------|--------------|--------|---------|
| | Temp | Time | Cycle |
| cDNA synthesis | 50°C | 30 min | 1 cycle |
| Initial inactivation | 95°C | 15 min | 1 cycle |
| Denaturation | 94°C | 30 sec | 35cycle |
| Annealing | 55°C | 60 sec | |
| Extension | 72°C | 90 sec | |
| Final Extension | 72°C | 5 min | 1 cycle |

(마) RT-PCR의 특이도 및 민감도 검정

- AIV H1~H12 아형의 경우 닭 AIV와 동일하기 때문에 특이도 및 민감도 검증을 생략하였고, 오리용에 추가되는 오리바이러스성간염(DHV) 및 리메렐라(RA)에 대한 특이도 검증을 실시함.

① 특이도 검증 : DHV 배양액 및 RA 배양균으로부터 RNA 및 DNA를 추출한 다음, AIV와 동일한 조건으로 RT-PCR을 실시하여 특이도를 확인한 결과, 각 primer set가 해당 바이러스에만 특이적으로 반응함을 확인하였음(Fig. 8).

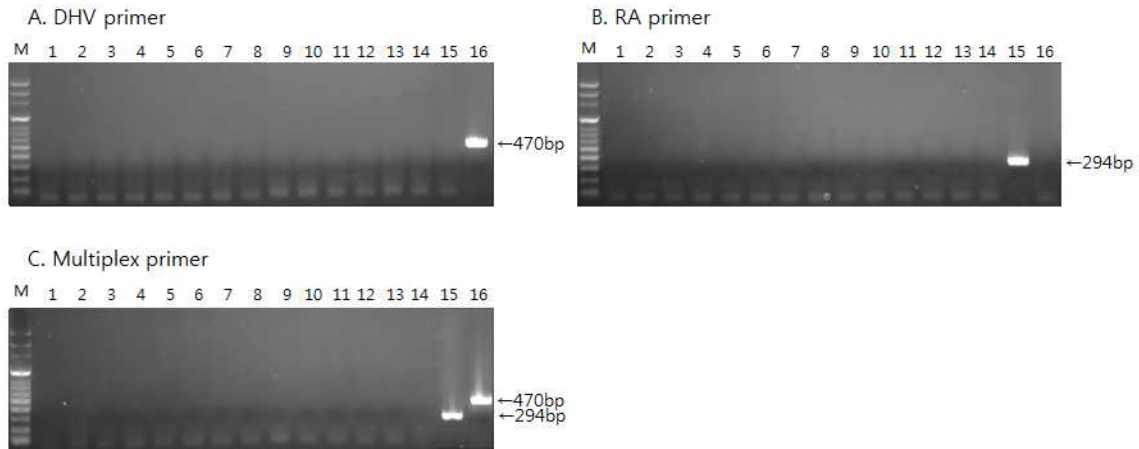


Fig. 8. Specificity of the RT-PCR for the detection of Duck hepatitis virus (DHV) and Riemerella (RA) by single (A, B) or multiplex RT-PCR (C). Lane M; 100bp DNA ladder, Lane 1; AIV H1N1, Lane 2; AIV H2N2, Lane 3; AIV H3N8, Lane 4; AIV H4N6, Lane 5; AIV H5N3, Lane 6; AIV H6N5, Lane 7; AIV H7N1, Lane 8; AIV H8N4, Lane 9; AIV H9N2, Lane 10; AIV H10N7, Lane 11; AIV H11N6, Lane 12; AIV H12N5, Lane 13; RA, Lane 14; DHV, Lane 15; NDV(lasota), Lane 16; NDV(Kyojungwon).

라. 말 인플루엔자 및 신종인플루엔자 감별진단용 키트

(1) 목적동물 : 말

(2) 공시 바이러스 : Equine influenza virus subtype H3, H7

- 공시 바이러스를 국제수역사무국(OIE)의 표준 방법에 준하여 발육란에 접종하여 배양한 다음, 혈구응집반응을 실시하여 역가를 측정한 다음, 시험에 제공하였음.

(3) 개발 목표 : 모든 EIV를 검출하는 공통 primer set와 H3, H7 아형 검출용 primer set를 이용하여 대상 병원체를 동일 RT-PCR 조건에서 동시 검출할 수 있는 multi-tube RT-PCR 키트 개발.

(4) RT-PCR 조건 확립

(가) RNA 추출 : 시판 RNA 추출키트

(나) Primer 설계 및 제작 : 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set를 선별하기 위하여 2009~2012년 사이에 Genbank에 등록된 정보를 활용하여 모든 EIV 아형을 증폭할 수 있는 공통 primer set(ComF-ComR), H3형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set(EH3F-EH3R), H7아형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set(EH7F-EH7R)을 설계함 (Table 5).

- 설계 primer set의 효용성을 검증하기 위하여 NCBI에 등록된 염기서열 정보를 확보한 다음, *in silico* PCR 프로그램을 이용하여 확보된 해당 염기서열 대비 증폭 성공률 (PSR)을 조사하였음. 그 결과, 개발된 primer set의 PSR은 98.6-100%로 우수한 것으로 확인됨.

Table 5. Primer sets used in the RT-PCR for the detection of EIV

| Target | Name | Oligonucleotide sequence | Size(bp) | Reference | PSR (No. of succeed/ tested sequence) ^a |
|--------|------|----------------------------|----------|------------|--|
| Matrix | ComF | 5'-CTAACCGAGGTCGAAACGTA-3' | 214 | this study | 100% (155/155) |
| | ComR | 5'-TGGACAAAKCGTCTACGCT-3' | | | |
| HA | EH3F | 5'-TATGAGAATTGGGACCTCTT-3' | 447 | this study | 98.6% (73/74) |
| | EH3R | 5'-ATGCTTATCCTGCCTGATTG-3' | | | |
| HA | EH7F | 5'-TGACATTTGCTATCCAGGC-3' | 378 | this study | 100% (22/22) |
| | EH7R | 5'-GCCATTTATTTGCGGCCTTG-3' | | | |

^a The predictive success rates (PSRs) of the RT-PCR primers sets were calculated by a web-based *in silico* PCR program based in the Influenza Sequence Database between 2011 and 2016

(다) RT-PCR 반응액 조성 : 시판키트(inclone사, one-step RT-PCR 키트) 사용

| 시약 | 조성 | <각 primer 농도> |
|--------------------|----------|---|
| template | 5 ul | - EIV 공통(Com): 5p, H3아형(EH3): 20p, H7아형(EH7): 10p |
| 2x reaction buffer | 12.5 ul | |
| enzyme | 1 ul | |
| primer(F/R) | 각 x ul | |
| D·W to | to 25 ul | |

(라) RT-PCR 반응조건

| Step | RT-PCR Cycle | | |
|----------------------|--------------|--------|---------|
| | Temp | Time | Cycle |
| cDNA synthesis | 50°C | 30 min | 1 cycle |
| Initial inactivation | 95°C | 15 min | 1 cycle |
| Denaturation | 94°C | 30 sec | 35cycle |
| Annealing | 55°C | 60 sec | |
| Extension | 72°C | 90 sec | |
| Final Extension | 72°C | 5 min | 1 cycle |

(마) RT-PCR의 특이도 및 민감도 검정

① 특이도 검증 : EIV H3N8, H7H7의 바이러스 배양액에서 RNA를 추출한 다음, RT-PCR을 실시한 결과, 각 바이러스에 대해 특이적으로 반응함을 확인함(Fig. 9).

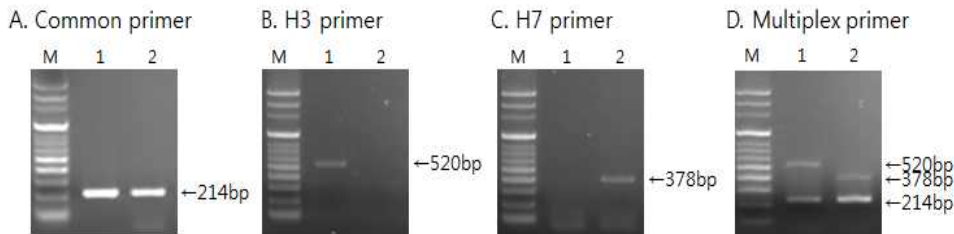


Fig. 9. Specificity of the RT-PCR for the detection of equine influenza viruses (EIV) subtype H3 and H7 by single (A-C) or multiplex RT-PCR (D). Lane M; 100bp DNA ladder, Lane 1; EIV H3N8, Lane 2; EIV H7N7.

② 민감도 검증 : 각 바이러스 배양액에 대하여 HA를 실시하여 바이러스 역가를 8배로 조정하였고, 이를 4배수 단계희석한 다음, 각 희석액에서 추출된 RNA에 대하여 RT-PCR을 실시하여 검출한계를 확인한 결과, H3N8와 H7N7 공히 2^{-2} HA까지 증폭됨을 확인(Fig. 10).

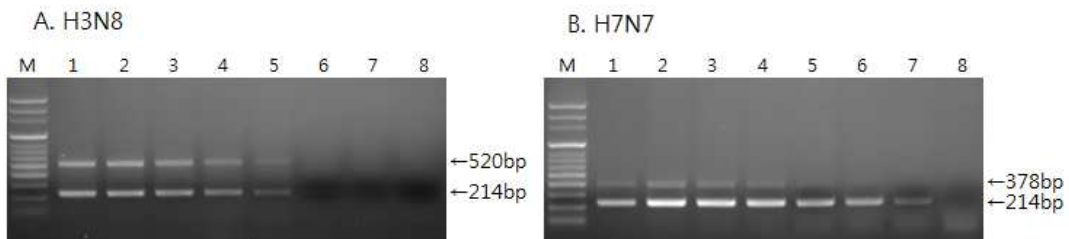


Fig. 10. Sensitivity of the one-step multiplex RT-PCR for the detection of equine influenza viruses (EIV) subtype H3, H7. A and B correspond to EIV subtype H3, H7 samples, respectively. Lane M; 100 bp ladder, Lane 1-7: serial dilutions (2^6 , 2^4 , 2^2 , 2^0 , 2^{-2} , 2^{-4} and 2^{-6} HA titer) of cultured influenza viruses, respectively. Lane 8; negative control.

마. 반려동물(개, 고양이)의 현장진단용 인플루엔자 및 신종 인플루엔자 감별진단키트

- (1) 목적동물 : 개, 고양이
- (2) 공시 바이러스 : Canine influenza virus subtype H3N8, H3N2
 - 공시 바이러스를 국제수역사무국(OIE)의 표준 방법에 준하여 발육란에 접종하여 배양한 다음, 혈구응집반응을 실시하여 역가를 측정한 다음, 시험에 제공하였음.
- (3) 개발 목표 : 모든 CIV, FIV를 검출하는 공통 primer set와 H3, N2 및 H8 아형 검출용 primer set를 동일 RT-PCR 조건에서 동시 검출할 수 있는 multi-tube RT-PCR 키트 개발.
- (4) RT-PCR 조건 확립
 - (가) RNA 추출 : 시판 RNA 추출키트

- (나) Primer 설계 및 제작 : 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set를 선별하기 위하여 2009~2012년 사이에 Genbank에 등록된 정보를 활용하여 모든 CIV 아형을 증폭할 수 있는 공통 primer set(ComF-ComR), H3형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set(CH3F-CH3R), N2아형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set(CN2F-CN2R), N8아형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set(CN8F-CN8R)을 설계함 (Table 6).
- 설계 primer set의 효용성을 검증하기 위하여 NCBI에 등록된 염기서열 정보를 확보한 다음, *in silico* PCR 프로그램을 이용하여 확보된 해당 염기서열 대비 증폭 성공률 (PSR)을 조사하였음. 그 결과, 개발된 primer set의 PSR은 100%로 우수한 것으로 확인됨.

Table 6. Primer sets used in the RT-PCR for the detection of CIV and FIV

| Target | Name | Oligonucleotide sequence | Size(bp) | Reference | PSR (No. of succeed/ tested sequence) ^a |
|--------|------|-----------------------------|----------|------------|--|
| Matrix | ComF | 5'-CTAACCGAGGTTCGAAACGTA-3' | 214 | this study | 100% (119/119) |
| | ComR | 5'-TGGACAAAKCGTCTACGCT-3' | | | |
| HA | CH3F | 5'-ATCAAATTGAGGTGACCAAC-3' | 458 | this study | 100% (84/84) |
| | CH3R | 5'-GGTGATGAACTCCCCAAATG-3' | | | |
| NA | CN2F | 5'-TCCGTTTCATTTGGGAACC-3' | 314 | this study | 100% (61/61) |
| | CN2R | 5'-CTCCCTGACAATGGGCTAA-3' | | | |
| NA | CN8F | 5'-AGGATCGAAGTCCGTATAGG-3' | 141 | this study | 100% (74/74) |
| | CN8R | 5'-CCTGTGACTCCAACGTGCAT-3' | | | |

^a The predictive success rates (PSRs) of the RT-PCR primers sets were calculated by a web-based *in silico* PCR program based in the Influenza Sequence Database between 2011 and 2016

- (다) RT-PCR 반응액 조성 : 시판키트(inclone사, one-step RT-PCR 키트) 사용

| 시약 | 조성 | <각 primer 농도> |
|--------------------|----------|---|
| template | 5 ul | - CIV 공통(Com): 5p, H3아형(CH3): 5p, N2아형(CN2): 5p, N8아형(CN8): 10p, |
| 2x reaction buffer | 12.5 ul | |
| enzyme | 1 ul | |
| primer(F/R) | 각 x ul | |
| D·W to | to 25 ul | |

- (라) RT-PCR 반응조건

| Step | RT-PCR Cycle | | |
|----------------------|--------------|--------|---------|
| | Temp | Time | Cycle |
| cDNA synthesis | 50°C | 30 min | 1 cycle |
| Initial inactivation | 95°C | 15 min | 1 cycle |
| Denaturation | 94°C | 30 sec | 35cycle |
| Annealing | 55°C | 60 sec | |
| Extension | 72°C | 90 sec | |
| Final Extension | 72°C | 5 min | 1 cycle |

- (마) RT-PCR의 특이도 및 민감도 검정

- ① 특이도 검증 : CIV H3N8, H3N2의 바이러스 배양액에서 RNA를 추출한 다음, RT-PCR을 실시하여 각 바이러스에 대해 특이적으로 반응하는지 확인한 결과, 각 primer set가 해당 바이러스에만 특이적으로 반응함을 확인하였음 (Fig. 11).

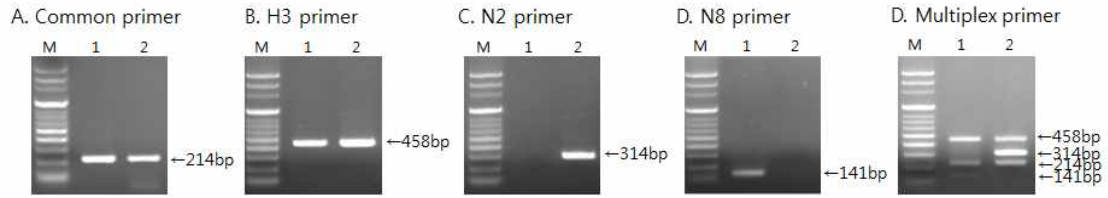


Fig. 11. Specificity of the RT-PCR for the detection of canine influenza viruses (CIV) subtypes by single (A-C) or multiplex RT-PCR (D). Lane M; 100bp DNA ladder, Lane 1; CIV H3N8, Lane 2; CIV H3N2.

- ② 민감도 검증 : 각 바이러스 배양액에 대하여 HA를 실시하여 바이러스 역가를 8배로 조정하였고, 이를 4배수 단계희석한 다음, 각 희석액에서 추출된 RNA에 대하여 RT-PCR을 실시하여 검출한계를 확인한 결과, 각 바이러스별로는 H3N8은 2^{-2} HA, H3N2 아형은 2^0 HA까지 검출됨을 확인함 (Fig. 12).

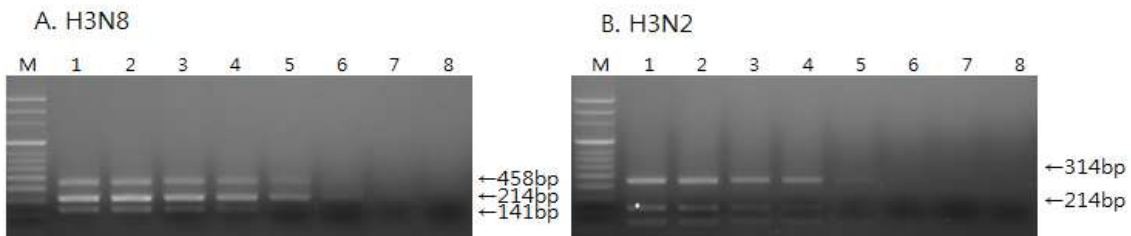


Fig. 12. Sensitivity of the one-step multiplex RT-PCR for the detection of canine influenza viruses (CIV). A and B correspond to CIV subtype H3N8, H3N2 samples, respectively. Lane M; 100 bp ladder, Lane 1-7: serial dilutions (2^6 , 2^4 , 2^2 , 2^0 , 2^{-2} , 2^{-4} and 2^{-6} HA titer) of cultured influenza viruses, respectively. Lane 8; negative control.

바. 인플루엔자 바이러스 HA 아형 분석용 RT-PCR 진단법 개발

- 인플루엔자 바이러스의 HA 아형 16종에 대한 감별 진단법 개발

(1) RNA 추출 : 시판 추출키트 이용

(2) Primer 설계 및 제작 : 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set를 선별하기 위하여 2009~2015년 사이에 Genbank에 등록된 정보를 활용하여 HA 아형 16종을 특이적으로 증폭할 수 있는 각각의 primer set 설계함 (Table 7).

- 설계 primer set의 효용성을 검증하기 위하여 NCBI에 등록된 염기서열 정보를 확보한 다음, *in silico* PCR 프로그램을 이용하여 확보된 해당 염기서열 대비 증폭 성공률 (PSR)을 조사하였음. 그 결과, 개발된 primer set의 PSR은 99.6-100%로 우수한 것으로 확인됨.

Table 7. Primer sets used in the one-step multi-tube RT-PCR for HA subtyping

| Name | Oligonucleotide sequence | Size(bp) | Reference | PSR (No. of succeed/ tested sequence) ^a |
|------|---------------------------------|----------|------------------------|--|
| H1F | 5'-CAGTRTCATCATTTGARAGRTT-3' | 375 | this study | 100% |
| H1R | 5'-GTCCAGTARTAGTTSATTCT-3' | | | (9993/9995) |
| H2F | 5'-CCAGGCAGTTTCAATGATTATG-3' | 181 | this study | 100% |
| H2R | 5'-TCTTTGTMARCCAGACCATGT-3' | | | (133/133) |
| H3F | 5'-GACTGCACACTRATAGATGCCC-3' | 215 | this study | 99.6% |
| H3R | 5'-CCCATTYTGAGTGACTCCTGTCC-3' | | | (11081/11122) |
| H4F | 5'-TAYCCATTTGATGTGCCAGAT-3' | 261 | this study | 100% |
| H4R | 5'-GATGAACTCCCCAKATGTAAAGC-3' | | | (455/455) |
| H5F | 5'-CCGCAGTATTCAGAAGARGCAG-3' | 139 | Tseng et al. (2014) | 99.9% |
| H5R | 5'-AGACCAGCYAYCATGATTGC-3' | | | (1861/1862) |
| H6F | 5'-AGAATTGATTATTACTGGTCTGT-3' | 247 | this study | 99.6% |
| H6R | 5'-ACATATTTGGGGCATTCTCC-3' | | | (254/255) |
| H7F | 5'-GGCAACAGGRATGAAGAAYGTTCC-3' | 97 | Tseng et al. (2014) | 100% |
| H7R | 5'-CAATCAGACCTTCCCATCCATTTTC-3' | | | (1005/1005) |
| H8F | 5'-ATTGGAAGTCCGAGACTGCA-3' | 236 | this study | 100% |
| H8R | 5'-CAGAGCTAGTCACATTCCA-3' | | | (4/4) |
| H9F | 5'-CACATGCCAAAGAATTRCTCCC-3' | 165 | this study | 99.9% |
| H9R | 5'-CTTTCRACRATGTAGGACCATT-3' | | | (2473/2476) |
| H10F | 5'-ATAGAAAAYGGATGGGAAGG-3' | 300 | this study | 100% |
| H10R | 5'-GTCAATTGTRTGCTGATTTTCC-3' | | | (334/334) |
| H11F | 5'-GGAAATGGGAAAYTGTTTCAG-3' | 410 | Kenji et al. (2011) | 100% |
| H11R | 5'-AATTCRTGTTGHAYAGACTC-3' | | | (123/123) |
| H12F | 5'-CTAGTGCTCGATGACTGTTC-3' | 205 | this study | 100% |
| H12R | 5'-TCAAACATCTTCACTCTTCA-3' | | | (17/17) |
| H13F | 5'-AACCACACAGGAACATATTG-3' | 225 | this study | 100% |
| H13R | 5'-AGATYTGATTCCACTGAACA-3' | | | (83/83) |
| H14F | 5'-AATGGTTGGCAAGGCCTGA-3' | 308 | this study | 100% |
| H14R | 5'-TCGGAGTCTGTAACATCTAT-3' | | | (8/8) |
| H15F | 5'-AACCAGGTGTTCCACAACACT-3' | 267 | this study | 100% |
| H15R | 5'-ATGAATGCACCATTGAAGGTAA-3' | | | (1/1) |
| H16F | 5'-GCAGACAAAATATGCATAGGR-3' | 220 | this study | 100% |
| H16R | 5'-TGTTGATGTTGGTGGCACAG-3' | | | (82/82) |

^a The predictive success rates (PSRs) of the RT-PCR primers sets were calculated by a web-based *in silico* PCR program based in the Influenza Sequence Database between 2011 and 2016

(3) RT-PCR 반응액 조성 : 시판키트(inclone사, one-step RT-PCR 키트) 사용

| 시약 | 조성 |
|--------------------|----------|
| template | 5 ul |
| 2x reaction buffer | 12.5 ul |
| enzyme | 1 ul |
| primer(F/R)(10p) | 각 1 ul |
| D·W to | to 25 ul |

(4) RT-PCR 반응조건

| Step | RT-PCR Cycle | | |
|----------------------|--------------|--------|---------|
| | Temp | Time | Cycle |
| cDNA synthesis | 50°C | 30 min | 1 cycle |
| Initial inactivation | 95°C | 15 min | 1 cycle |
| Denaturation | 94°C | 20 sec | 35cycle |
| Annealing | 55°C | 20 sec | |
| Extension | 72°C | 30 sec | |
| Final Extension | 72°C | 5 min | 1 cycle |

(5) RT-PCR의 특이도 및 민감도 검정

(가) 특이도 검증 : AIV H1~H12 type의 바이러스 배양액에서 RNA를 추출한 다음, RT-PCR을 실시하여 각 바이러스에 대해 특이적으로 반응하는지 확인한 결과, 각 primer set별로 각 아형에 특이적으로 반응함을 확인함 (Fig. 13).

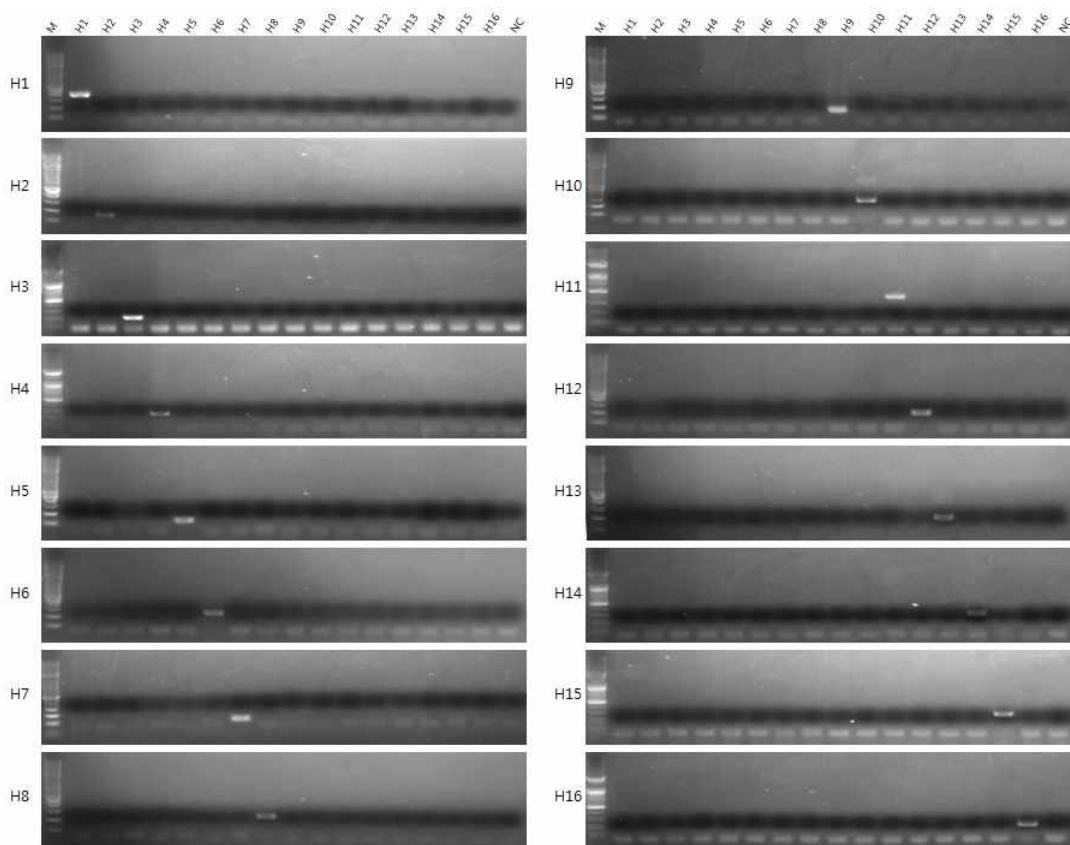


Fig. 13. Specificity of the RT-PCR for HA subtyping of avian influenza viruses (AIV). Lane M; 100bp DNA ladder, Lane 1; AIV H1, Lane 2; AIV H2, Lane 3; AIV H3, Lane 4; AIV H4, Lane 5; AIV H5, Lane 6; AIV H6, Lane 7; AIV H7, Lane 8; AIV H8, Lane 9; AIV H9, Lane 10; AIV H10, Lane 11; AIV H11, Lane 12; AIV H12.

사. 인플루엔자 바이러스 NA 아형 분석용 RT-PCR 진단법 개발

- 인플루엔자 바이러스의 NA 아형 9종 감별

(1) RNA 추출 : 시판 추출키트 이용

(2) Primer 설계 및 제작 : 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set를 선별하기 위하여 2009 ~ 2015년 사이에 Genbank에 등록된 정보를 활용하여 HA 아형 16종을 특이적으로 증폭할 수 있는 각각의 primer set 설계함 (Table 8).

- 설계 primer set의 효용성을 검증하기 위하여 NCBI에 등록된 염기서열 정보를 확보한 다음, *in silico* PCR 프로그램을 이용하여 확보된 해당 염기서열 대비 증폭 성공률 (PSR)을 조사하였음. 그 결과, 개발된 primer set의 PSR은 99.9-100%로 우수한 것으로 확인됨.

(3) RT-PCR 반응액 조성 : 시판키트(inclone사, one-step RT-PCR 키트) 사용

| 시약 | 조성 |
|--------------------|----------|
| template | 5 ul |
| 2x reaction buffer | 12.5 ul |
| enzyme | 1 ul |
| primer(F/R)(10p) | 각 1 ul |
| D·W to | to 25 ul |

Table 8. Primer sets used in the one-step multi-tube RT-PCR for NA subtyping

| Name | Oligonucleotide sequence | Size(bp) | Reference | PSR (No. of succeed/ tested sequence) ^a |
|------|---------------------------------|----------|---------------------|--|
| N1F | 5'-TAGACTGCATGAGGCCTTGCTTCTG-3' | 137 | Huang et al. (2013) | 100% (7519/7521) |
| N1R | 5'-CACCGTCTGGCCAAGACCAACCTAC-3' | | | |
| N2F | 5'-CAAACAAGTGTGCATAGCAT-3' | 222 | this study | 100% (12173/12175) |
| N2R | 5'-CTTCCATCAGTCATTACTAC-3' | | | |
| N3F | 5'-ATGACAGACTCCATTAAATCATG-3' | 256 | Tseng et al. (2014) | 100% (420/420) |
| N3R | 5'-TCCAATTGTCCCTACATATRCAGT-3' | | | |
| N4F | 5'-ATTATGCGAACACAAGAGTC-3' | 271 | this study | 100% (40/40) |
| N4R | 5'-GGTAATCAAGATCACTGTTGAA-3' | | | |
| N5F | 5'-CAATGAAACTGTRAGGCTGGA-3' | 160 | this study | 100% (78/78) |
| N5R | 5'-ATTCTGATTCCATTGTCCTTG-3' | | | |
| N6F | 5'-TGTGAAGTAAACTCATGGCA-3' | 179 | this study | 100% (723/723) |
| N6R | 5'-GTCATGTATAGTCCCATTTGC-3' | | | |
| N7F | 5'-AGCCAAGTATGTTTGGTGGA-3' | 108 | this study | 100% (194/194) |
| N7R | 5'-GAAAAGTATTGGATTTGTGCC-3' | | | |
| N8F | 5'-AGGGAATACAATGAAACAGT-3' | 244 | this study | 99.9% (725/726) |
| N8R | 5'-GGAAGAACGTCCTGCACTC-3' | | | |
| N9F | 5'-ATCGTATTAAACACTGACTGGAGTG-3' | 171 | Huang et al. (2013) | 99.9% (774/775) |
| N9R | 5'-ATTCTGTGCTGGAACACATTGATAC-3' | | | |

^a The predictive success rates (PSRs) of the RT-PCR primers sets were calculated by a web-based *in silico* PCR program based in the Influenza Sequence Database between 2011 and 2016

(4) RT-PCR 반응조건

| Step | RT-PCR Cycle | | |
|----------------------|--------------|--------|---------|
| | Temp | Time | Cycle |
| cDNA synthesis | 50°C | 30 min | 1 cycle |
| Initial inactivation | 95°C | 15 min | 1 cycle |
| Denaturation | 94°C | 20 sec | 35cycle |
| Annealing | 50°C | 20 sec | |
| Extension | 72°C | 30 sec | |
| Final Extension | 72°C | 5 min | 1 cycle |

(5) RT-PCR의 특이도 및 민감도 검정

가) 특이도 검증 : AIV N1~N9 type의 바이러스 배양액에서 RNA를 추출한 다음, RT-PCR을 실시하여 각 바이러스에 대해 특이적으로 반응하는지 확인한 결과, 각 primer set별로 각 아형에 특이적으로 반응함을 확인하였음(Fig. 14).

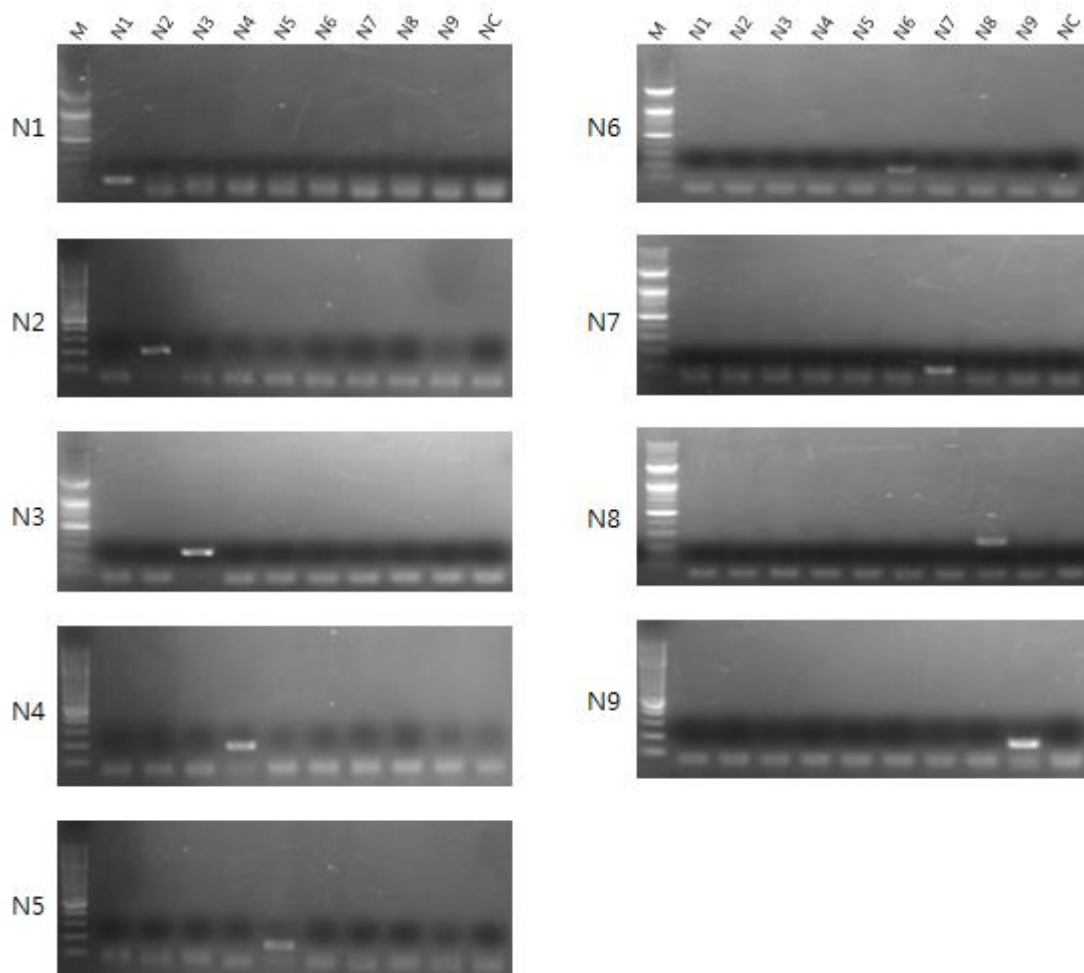


Fig. 14. Specificity of the RT-PCR for NA subtyping of avian influenza viruses (AIV). Lane M; 100bp DNA ladder, Lane 1; AIV N1, Lane 2; AIV N2, Lane 3; AIV N3, Lane 4; AIV N4, Lane 5; AIV N5, Lane 6; AIV N6, Lane 7; AIV N7, Lane 8; AIV N8, Lane 9; AIV N9.

2. 동물 인플루엔자 바이러스 현장 감별용 pan-side real time RT-PCR 키트 개발

가. 돼지 인플루엔자 (SIV) 진단용 real time RT-PCR 키트 개발

- (1) 목적동물 : 돼지
- (2) RRT-PCR 조건 확립
- (가) RNA 추출 : 시판 RNA 추출키트
- (나) Primer, probe 설계 및 제작 : 특이적으로 증폭할 수 있는 primer, probe set를 선발하기 위하여 2009~2013년 사이에 Genbank에 등록된 정보를 활용하여 모든 SIV 아형을 증폭할 수 있는 공통 primer, probe set(RComF-RComR-RComP), pH1N1 바이러스를 증폭할 수 있는 primer, probe set(RNFF-RNFR-RNFP), H1아형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer, probe set(RSH1F-RSH1R-RSH1P) 및 H3아형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer, probe set(RSH3F-RSH3R-RSH3P)을 설계하였음 (Table 9).

Table 9. Primer sets used in the one-step multi-tube real time RT-PCR for the detection of swine influenza viruses

| Target | Name | Oligonucleotide sequence | Size(bp) | Reference |
|--------|-------|-------------------------------|----------|--------------------------------|
| Matrix | RComF | 5'-AAGACCAATCCTGTCACCTCTGA-3' | 104 | Shin et al. (2011) |
| | RComR | 5'-CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC-3' | | |
| | RComP | 5'-TTTGTNTTYACGCTCACCGTGCC-3' | | |
| HA | RSH1F | 5'-CAGGGATCAGGMTATGCWGC-3' | 129 | Malliga et al. (2010) modified |
| | RSH1R | 5'-GTGGYTGAATTCTTTRCCYACT-3' | | |
| | RSH1P | 5'-ACACAGAATGCCATTGACG-3' | | |
| HA | RSH3F | 5'-TGCTCCTCGRGGTACTTCA-3' | 211 | this study |
| | RSH3R | 5'-ATTCCGCATCCCTGTTGCCA-3' | | |
| | RSH3P | 5'-AATGAGATCAGATGCACAC-3' | | |
| Matrix | RNFF | 5'-AGGAGGTGTCACCTAAGCTAT-3' | 165 | this study |
| | RNFR | 5'-GTAGTAGCCATTTGTCTGTGAG-3' | | |
| | RNFP | 5'-ACTGGTGCACCTTGCCAGTTG-3' | | |

(다) real time RT-PCR용 반응액 조성(takara, One Step PrimeScript RT-PCR Kit 사용)

| | |
|--------------------|----------|
| template | 5 ul |
| 2x reaction buffer | 12.5 ul |
| Ex Taq | 0.5 ul |
| enzyme Mix | 0.5 ul |
| primer(F/R) | 각 1 ul |
| probe | 1 ul |
| D·W to | to 25 ul |

(라) real time RT-PCR 반응조건

| Step | RT-PCR Cycle | | |
|----------------------|--------------|--------|---------|
| | Temp | Time | Cycle |
| cDNA synthesis | 42°C | 10 min | 1 cycle |
| Initial inactivation | 95°C | 30 sec | 1 cycle |
| Denaturation | 94°C | 10 sec | 35cycle |
| Annealing | 55°C | 30 sec | |
| Extension | 72°C | 10 sec | |

(마) 특이도 및 민감도 검정

- ① 특이도 검증 :SIV H1N1, H1N2, H3N2, pandemic 2009 H1N1의 바이러스 배양액에

서 RNA를 추출한 다음, RT-PCR을 실시한 결과, 각 primer set가 해당 바이러스에만 특이적으로 반응함을 확인하였음 (Table 10).

Table 10. Specificity of the real time RT-PCR for the detection of swine influenza viruses

| | H1N1 | H1N2 | H3N2 | pH1N1 |
|--------|------|------|------|-------|
| SIV M | + | + | + | + |
| SIV H1 | + | + | - | + |
| SIV H3 | - | - | + | - |
| pH1N1 | - | - | - | + |

② 민감도 검증 : 각 바이러스 배양액에 대하여 HA를 실시하여 바이러스 역가를 8배로 조정하였고, 이를 4배수 단계희석하였다. 각 희석액에서 추출된 RNA를 이용하여 RT-PCR을 실시한 후 검출한계를 확인한 결과, 각각의 primer에서 모두 2^{-6} 이상의 민감도를 확인하였음(Table 11).

Table 11. Sensitivity of the real time RT-PCR for the detection of swine influenza viruses

| Target | H1N1 | H1N2 | H3N2 | pH1N1 |
|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| SIV M | 2^{-6} 이상 | 2^{-6} 이상 | 2^{-6} 이상 | 2^{-6} 이상 |
| SIV H1 | 2^{-6} 이상 | 2^{-6} 이상 | - | 2^{-6} 이상 |
| SIV H3 | - | - | 2^{-6} 이상 | - |
| pH1N1 | - | - | - | 2^{-6} |

나. 닭용 AIV 및 NDV 진단용 real time RT-PCR 키트 개발 (1-2년차)

(1) 목적동물 : 닭

(2) RRT-PCR 조건 확립

(가) RNA 추출 : 시판 RNA 추출키트

(나) Primer 설계 및 제작 : 특이적으로 증폭할 수 있는 primer, probe set를 선별하기 위하여 2009~2013년 사이에 Genbank에 등록된 정보를 활용하여 모든 AIV 아형을 증폭할 수 있는 공통 primer, probe set(RComF-RComR-RComP), H5아형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer, probe set(RAH5F-RAH5R-RAH5P), H7아형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer, probe set(RAH7F-RAH7R-RAH7P), H9아형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer, probe set(RAH9F-RAH9R-RAH9P)을 설계함 (Table 12).

Table 12. Primer sets used in the one-step multi-tube real time RT-PCR for the detection of AIV and NDV

| Target | name | Oligonucleotide sequence | Size(bp) | Reference |
|--------|-------|--------------------------------|----------|------------------------|
| Matrix | RComF | 5'-AAGACCAATCCTGTACCTCTGA-3' | 104 | Kim et al. (2013) |
| | RComR | 5'-CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC-3' | | |
| | RComP | 5'-TTTGTNTTYACGCTCACCGTGCC-3' | | |
| HA | RAH5F | 5'-TGACTACCCGCAGTATTCAG-3' | 145 | Kim et al. (2013) |
| | RAH5R | 5'-AGACCAGCTAYCATGATTGC-3' | | |
| | RAH5P | 5'-TCAACAGTGGCRAGTTCCYTAGCA-3' | | |
| HA | RAH7F | 5'-ATAGCRGGTTTTYATTGAAAA-3' | 134 | Kim et al. (2013) |
| | RAH7R | 5'-CCTGTTATTTGATCAATTGC-3' | | |
| | RAH7P | 5'-TGGGAAGGTCTVVRTTGAYGG-3' | | |
| HA | RAH9F | 5'-CAATGGGGTTTGTCTGCCTT-3' | 63 | this study |
| | RAH9R | 5'-CAAATGTTGCATCTGCAAG-3' | | |
| | RAH9P | 5'-GTTCTGGGCCATGTCCAAT-3' | | |
| F | RNDVF | 5'-TCTCTTATGCTCCCCTCTCAAGT-3' | 88 | Gopinath et al. (2011) |
| | RNDVR | 5'-CGATCTCAAGAACAGCCAGTGT-3' | | |
| | RNDVP | 5'-CCTTGCAGGGAAACAG-3' | | |

(다) real time RT-PCR용 반응액 조성(takara, One Step PrimeScript RT-PCR Kit 사용)

| | |
|--------------------|----------|
| template | 5 ul |
| 2x reaction buffer | 12.5 ul |
| Ex Taq | 0.5 ul |
| enzyme Mix | 0.5 ul |
| primer(F/R) | 각 1 ul |
| probe | 1 ul |
| D·W to | to 25 ul |

(라) real time RT-PCR 반응조건

| Step | RT-PCR Cycle | | |
|----------------------|--------------|--------|---------|
| | Temp | Time | Cycle |
| cDNA synthesis | 42℃ | 10 min | 1 cycle |
| Initial inactivation | 95℃ | 30 sec | 1 cycle |
| Denaturation | 94℃ | 10 sec | 35cycle |
| Annealing | 55℃ | 30 sec | |
| Extension | 72℃ | 20 sec | |

(마) 특이도 및 민감 검정

- ① 특이도 검증 : AIV H1~H12 type, NDV의 바이러스 배양액에서 RNA를 추출한 다음, RT-PCR을 실시한 결과, 개발 primer set가 각 해당 바이러스에 특이적으로 반응함을 확인하였음 (Table 13).

Table 13. Specificity of the real time RT-PCR for the detection of AIV and NDV

| Primer | H1 | H2 | H3 | H4 | H5 | H6 | H7 | H8 | H9 | H10 | H11 | H12 | NDV |
|--------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|
| M | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| H5 | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| H7 | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| H9 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| NDV | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |

② 민감도 검증 : 각 바이러스 배양액에 대하여 HA를 실시하여 바이러스 역가를 8배로 조정하였고, 이를 4배수 단계희석한 다음, 각 희석액에서 추출된 RNA에 대하여 RT-PCR을 실시하여 검출한계를 확인한 결과, 각 바이러스별로는 H5아형은 2^{-6} HA 이상, H7아형은 2^{-6} HA, H9아형은 2^{-2} HA의 민감도를 확인하였음 (Table 14).

Table 14. Sensitivity of the real time RT-PCR for the detection of avian influenza virus (AIV)

| | H5 | H7 | H9 |
|----|-------------|-------------|-------------|
| M | 2^{-6} 이상 | 2^{-6} 이상 | 2^{-6} 이상 |
| H5 | 2^{-6} 이상 | - | - |
| H7 | - | 2^{-6} | - |
| H9 | - | - | 2^{-2} |

다. 오리용 AIV 및 유사질병 진단용 real time RT-PCR 키트 개발 (1-2년차)

(1) 목적동물 : 오리

(2) RRT-PCR 조건 확립

(가) RNA 추출 : 시판 RNA 추출키트

(나) Primer 설계 및 제작 : 특이적으로 증폭할 수 있는 primer, probe set를 선별하기 위하여 2009~2013년 사이에 Genbank에 등록된 정보를 활용하여 모든 AIV 아형을 증폭할 수 있는 공통 primer, probe set(RComF-RComR-RComP), H5아형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer, probe set(RAH5F-RAH5R-RAH5P), H7아형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer, probe set(RAH7F-RAH7R-RAH7P), H9아형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer, probe set(RAH9F-RAH9R-RAH9P)을 설계함 (Table 15).

Table 15. Primer set for one-step multi-tube real time RT-PCR to detect AIV, DHV and RA

| Target | Primer | Oligonucleotide sequence | Size(bp) | Reference |
|------------------------------|--------|--------------------------------------|----------|--------------------|
| Matrix | RComF | 5'-AAGACCAATCCTGTACCTCTGA-3' | 104 | Kim et al. (2013) |
| | RComR | 5'-CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC-3' | | |
| | RComP | 5'-TTTGTNTTYACGCTCACCGTGCC-3' | | |
| HA | RAH5F | 5'-TGACTACCCGCAGTATTCAG-3' | 145 | Kim et al. (2013) |
| | RAH5R | 5'-AGACCAGCTAYCATGATTGC-3' | | |
| | RAH5P | 5'-TCAACAGTGGCRAGTTCCYTAGCA-3' | | |
| HA | RAH7F | 5'-ATAGCRGGTTTTYATTGAAAA-3' | 134 | Kim et al. (2013) |
| | RAH7R | 5'-CCTGTTATTTGATCAATTGC-3' | | |
| | RAH7P | 5'-TGGGAAGGTCTVVRTTGAYGG-3' | | |
| HA | RAH9F | 5'-ATGTCCTGTGACACATGCCAA-3' | 110 | this study |
| | RAH9R | 5'-GTCCTTCAATGGTACAGGTG-3' | | |
| | RAH9P | 5'-CTGCTTACACAGAGCACAATG-3' | | |
| polyprotein | RDHVF | 5'-TGATGAGATATGGCAGGTAGAAGGA-3' | 87 | Yang et al. (2008) |
| | RDHVR | 5'-CACGCAAGCTGATTCACAATAGA-3' | | |
| | RDHVP | 5'-TGTGTTTCAGGATCCCCATGTACTACCGTG-3' | | |
| triphosphate pyrophosphatase | RRAF | 5'-ATTCCCTTCGGACCATAGAT-3' | 90 | this study |
| | RRAR | 5'-CGACCATTGTTTTGGCTTAC-3' | | |
| | RRAP | 5'-GTTTCTCTCCCTAGCAAACG-3' | | |

(다) real time RT-PCR용 반응액 조성(takara, One Step PrimeScript RT-PCR Kit 사용)

| | |
|--------------------|----------|
| template | 5 ul |
| 2x reaction buffer | 12.5 ul |
| Ex Taq | 0.5 ul |
| enzyme Mix | 0.5 ul |
| primer(F/R) | 각 1 ul |
| probe | 1 ul |
| D·W to | to 25 ul |

(라) real time RT-PCR 반응조건

| Step | RT-PCR Cycle | | |
|----------------------|--------------|--------|---------|
| | Temp | Time | Cycle |
| cDNA synthesis | 42°C | 10 min | 1 cycle |
| Initial inactivation | 95°C | 30 sec | 1 cycle |
| Denaturation | 94°C | 5 sec | 35cycle |
| Annealing | 55°C | 20 sec | |
| Extension | 72°C | 10 sec | |

(마) 특이도 및 민감도 검정 : AIV H1~H12 아형의 경우 닭 AIV와 동일하기 때문에 특이도 및 민감도 검증을 생략하였고, 오리용에 추가되는 오리바이러스성간염(DHV) 및 리메렐라(RA)에 대한 특이도 검증을 실시함.

- ① 특이도 검증 : AIV H1~H12 type, DHV, RA의 바이러스 배양액에서 RNA를 추출한 다음, RT-PCR을 실시하여 각 바이러스에 대해 특이적으로 반응하는지 확인한 결과, 개발 primer set가 각 해당 바이러스에 특이적으로 반응함을 확인하였음(Table 16).

Table 16. Specificity of the real time RT-PCR for the detection of avian influenza virus, duck

hepatitis and Rimerella anstifestifur

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|----|
| | H1 | H2 | H3 | H4 | H5 | H6 | H7 | H8 | H9 | H10 | H11 | H12 | DHV | RA |
| DHV | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| RA | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |

라. 말 EIV 진단용 real time RT-PCR 키트 개발 (1-2년차)

(1) 목적동물 : 말

(2) RRT-PCR 조건 확립

(가) RNA 추출 : 시판 RNA 추출키트

(나) Primer 설계 및 제작 : 특이적으로 증폭할 수 있는 primer, probe set를 선별하기 위하여 2009~2013 사이에 Genbank에 등록된 정보를 활용하여 모든 EIV 아형을 증폭할 수 있는 공통 primer, probe set(RComF-RComR-RComP), H3형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer, probe set(REH3F-REH3R-REH3P), H7아형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer, probe set(REH7F-REH7R-REH7P)을 설계함 (Table 17).

Table 17. Primer sets used in the one-step multi-tube real time RT-PCR for the detection of EIV

| Name | Target | Oligonucleotide sequence | Size(bp) | Reference |
|-------|--------|-------------------------------|----------|-------------------------------------|
| RComF | M | 5'-AAGACCAATCCTGTACCTCTGA-3' | 104 | Shin et al. (2011) |
| RComR | | 5'-CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC-3' | | |
| RComP | | 5'-TTTGTNTTYACGCTCACCGTGCC-3' | | |
| REH3F | HA | 5'-TATGAGAATTGGGACCTCTT-3' | 103 | this study |
| REH3R | | 5'-TGTCCTGAGGATGCTACAA-3' | | |
| REH3P | | 5'-CAATTGCTACCCATATGAC-3' | | |
| REH7F | HA | 5'-TCCTCTGTGTACGTGCAGAT-3' | 71 | Zhengchun et al. (2009) modified |
| REH7R | | 5'-GGGTGTCTACTTTGGTTCCA-3' | | |
| REH7P | | 5'-GCCTAGGACATCATGCTG-3' | | |

(다) real time RT-PCR용 반응액 조성(takara, One Step PrimeScript RT-PCR Kit 사용)

| | |
|--------------------|----------|
| template | 5 ul |
| 2x reaction buffer | 12.5 ul |
| Ex Taq | 0.5 ul |
| enzyme Mix | 0.5 ul |
| primer(F/R) | 각 1 ul |
| probe | 1 ul |
| D·W to | to 25 ul |

(라) real time RT-PCR 반응조건

| Step | RT-PCR Cycle | | |
|----------------------|--------------|--------|---------|
| | Temp | Time | Cycle |
| cDNA synthesis | 42℃ | 10 min | 1 cycle |
| Initial inactivation | 95℃ | 30 sec | 1 cycle |
| Denaturation | 94℃ | 10 sec | 35cycle |
| Annealing | 55℃ | 30 sec | |
| Extension | 72℃ | 10 sec | |

(마) 특이도 및 민감도 검정

- ① 특이도 검증 : EIV H3N8, H7H7의 바이러스 배양액에서 RNA를 추출한 다음, RT-PCR을 실시하여 각 바이러스에 대해 특이적으로 반응하는지 확인한 결과, 개발 primer set가 각 해당 바이러스에 특이적으로 반응함을 확인하였음 (Table 18).

Table 18. Specificity of the real time RT-PCR for the detection of equine influenza virus

| | H3N8 | H7N7 |
|----|------|------|
| M | + | + |
| H3 | + | - |
| H7 | - | + |

마. 반려동물 CIV, FIV 진단용 real time RT-PCR 키트 개발 (1-2년차)

(1) 목적동물 : 반려동물

(2) RRT-PCR 조건 확립

(가) RNA 추출 : 시판 RNA 추출키트

(나) Primer 설계 및 제작 : 특이적으로 증폭할 수 있는 primer, probe set를 선별하기 위하여 2009~2013년 사이에 Genbank에 등록된 정보를 활용하여 모든 CIV 아형을 증폭할 수 있는 공통 primer, probe set(RComF-RComR-RComP), H3형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer, probe set(RCH3F1-RCH3R1-RCH3P1, RCH3F2-RCH3R2-RCH3P2), N2아형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer, probe set(RCN2F-RCN2R-RCN2P), N8아형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer, probe set(RCN8F-RCN8R-RCN8P)을 설계함(Table 19).

Table 19. Primer set for one-step multi-tube real time RT-PCR to detect CIV, FIV

| Target | Name | Oligonucleotide sequence | Size(bp) | Reference |
|--------|--------|-------------------------------|----------|--------------------|
| M | RComF | 5'-AAGACCAATCCTGTACCTCTGA-3' | 104 | Shin et al. (2011) |
| | RComR | 5'-CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC-3' | | |
| | RComP | 5'-TTTGTNTTYACGCTCACCGTGCC-3' | | |
| HA | RCH3F1 | 5'-ATCAAATTGAGGTGACCAAC-3' | 116 | this study |
| | RCH3R1 | 5'-GTAGGGCATCTATTAGTGTG-3' | | |
| | RCH3P1 | 5'-TATGCAACAATCCCCACAA-3' | | |
| HA | RCH3F2 | 5'-TATGAGAATTGGGACCTCTT-3' | 103 | this study |
| | RCH3R2 | 5'-TGTTTCCTGAGGATGCTACAA-3' | | |
| | RCH3P2 | 5'-CAATTGCTACCCATATGAC-3' | | |
| NA | RCN2F | 5'-TCCGTTTCATTTGGGAACC-3' | 110 | this study |
| | RCN2R | 5'-CGAAACTAGCAGTCGCATT-3' | | |
| | RCN2P | 5'-AGTGTGCATAGCATGGTC-3' | | |
| NA | RCN8F | 5'-AGGATCGAAGTCCGTATAGG-3' | 141 | this study |
| | RCN8R | 5'-CCTGTGACTCCAAGTGCAT-3' | | |
| | RCN8P | 5'-CCTTGCAGGGAAACAG-3' | | |

(다) real time RT-PCR용 반응액 조성(takara, One Step PrimeScript RT-PCR Kit 사용)

| | |
|--------------------|----------|
| template | 5 ul |
| 2x reaction buffer | 12.5 ul |
| Ex Taq | 0.5 ul |
| enzyme Mix | 0.5 ul |
| primer(F/R) | 각 1 ul |
| probe | 1 ul |
| D·W to | to 25 ul |

(라) real time RT-PCR 반응조건

| Step | RT-PCR Cycle | | |
|----------------------|--------------|--------|---------|
| | Temp | Time | Cycle |
| cDNA synthesis | 42°C | 10 min | 1 cycle |
| Initial inactivation | 95°C | 30 sec | 1 cycle |
| Denaturation | 94°C | 10 sec | 35cycle |
| Annealing | 55°C | 30 sec | |
| Extension | 72°C | 10 sec | |

(마) 특이도 및 민감도 검정

- ① 특이도 검증 : CIV H3N8, H3N2의 바이러스 배양액에서 RNA를 추출한 다음, RT-PCR을 실시하여 각 바이러스에 대해 특이적으로 반응하는지 확인한 결과, 개발 primer set가 각 해당 바이러스에 특이적으로 반응함을 확인하였음 (Table 20).

Table 20. Specificity of the real time RT-PCR for the detection of canine influenza virus

| | H3N2 | H3N8 |
|----|------|------|
| M | + | + |
| H3 | + | + |
| N2 | + | - |
| N8 | - | + |

바. HPAIV H5N1 및 H5N8 감별진단을 위한 real time RT-PCR 진단법 개발

- (1) 시험목적 : 2003년 H5N1 아형의 HPAI 발생 이후 H5N8 아형의 HPAI가 발생함에 따라 두 HPAI 바이러스 아형을 동시 감별진단할 수 있는 real time RT-PCR 개발 필요성 대두
- (2) 공시 바이러스 : 표준바이러스는 농림축산검역본부에서 추출한 유전자를 분양받아 사용
- (3) 개발 목표 : HPAIV H5N1과 H5N8 아형 감별진단용 real time Rt-PCR 진단법 개발
- (4) real time RT-PCR 조건 확립
- ① RNA 추출 : 시판 추출키트 이용
- ② Primer 설계 및 제작: AIV matrix gene(common), HPAI의 H5, N1 및 N8 gene 검출용 primer set를 설계 (Table 21).

Table 21. Primer and probe sets for detecting the M, H5, N1, and N8 genes of avian influenza viruses

| Gene | Primer and probe | Sequence (5'-3') | Product size (bp) | Reference |
|--------|----------------------------|--|-------------------|-------------------|
| Matrix | MF (forward) | AAGACCAATCCTGTACCTCTGA | 104 | Kim et al. (2013) |
| | MR (reverse) | CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC | | |
| | MP (probe) | FAM-TTTGTNNTTYACGCTCACCGTGCC-TAMRA | | |
| H5 | H ₅ F (forward) | GCTCCDGAATATGCVTACAAAAATTGTC | 355 | This study |
| | H ₅ R (reverse) | TGTCTGCAGCGTAYCCAC | | |
| | H5P (probe) | FAM-ATAGCAGGNTTATAGARGGAGGDTGGCA-TAMRA | | |
| N1 | N ₁ F (forward) | GATTGGTCAGGATATAGCG | 97 | This study |
| | N ₁ R (reverse) | GAATGGCAACTCAGCACCG | | |
| | N1P (probe) | FAM-TTGTCCAGCATCCRGAAGT-TAMRA | | |
| N8 | N ₈ F (forward) | CCAGTGACACTCCAAGAGG | 253 | This study |
| | N ₈ R (reverse) | CCACTGTATCCCGACCAAT | | |
| | N8P (probe) | FAM-CCATGGGAAATCAGGGATATGG-TAMRA | | |

③ real time RT-PCR용 반응액 조성 (takara, One Step PrimeScript RT-PCR Kit 사용)

| | |
|--------------------|----------|
| template | 5 ul |
| 2x reaction buffer | 12.5 ul |
| Ex Taq | 0.5 ul |
| enzyme Mix | 0.5 ul |
| primer(F/R) | 각 1 ul |
| probe | 1 ul |
| D·W to | to 25 ul |

④ real time RT-PCR 반응조건

| Step | RT-PCR Cycle | | |
|----------------------|--------------|--------|---------|
| | Temp | Time | Cycle |
| cDNA synthesis | 42°C | 10 min | 1 cycle |
| Initial inactivation | 95°C | 30 sec | 1 cycle |
| Denaturation | 94°C | 10 sec | 35cycle |
| Annealing | 55°C | 30 sec | |

⑤ 특이도 검정

- HPAI H5N1과 H5N8 및 타 AIV 감별진단이 가능함이 확인됨 (Table 22).

Table 22. Specificity of the single-step real time reverse-transcription polymerase reaction (sRRT-PCR) assay for the detection of avian influenza viruses (AIV) with matrix, H5, N1 and N8 gene-specific primers and probe

| Virus | Subtype | Detection of AIV gene ^a | | | |
|--|---------|------------------------------------|----|----|----|
| | | Matrix | H5 | N1 | N8 |
| Reference strains of different subtypes | | | | | |
| A/PR/8/34 | H1N1 | + | - | - | - |
| A/Singapore/1/57 | H2N2 | + | - | - | - |
| A/duck/Ukraine/1/63 | H3N8 | + | - | - | - |
| A/duck/Czechoslovakia/56 | H4N6 | + | - | - | - |
| A/duck/Hong Kong/820/80 | H5N3 | + | + | - | - |
| A/shearwater/Australia/1/72 | H6N5 | + | - | - | - |
| A/wild duck/Kr/CSM42-34/11 | H7N9 | + | - | - | - |
| A/turkey/Ontario/6118/68 | H8N4 | + | - | - | - |
| A/turkey/Wisconsin/1/66 | H9N2 | + | - | - | - |
| A/wild duck/Kr/CSM42-9/11 | H10N7 | + | - | - | - |
| A/duck/Memphis/546/74 | H11N9 | + | - | - | - |
| A/duck/Alberta/60/76 | H12N5 | + | - | - | - |
| A/wild duck/Kr/SH38-45 | H13N2 | + | - | - | - |
| A/mallard/Gurjer/263/82 | H14N5 | + | - | - | - |
| A/shearwater/West Australia/2576/79 | H15N9 | + | - | - | - |
| A/gull/Denmark/68110 | H16N3 | + | - | - | - |
| HPAI isolate from HPAI epidemic | | | | | |
| A/chicken/Korea/Gimje/2008 | H5N1 | + | + | + | - |
| A/broiler duck/Korea/Buan2/2014 | H5N8 | + | + | - | + |
| Other avian pathogens | | | | | |
| Newcastle disease virus (vaccine strain) | | - | - | - | - |
| Infectious bronchitis virus (vaccine strain) | | - | - | - | - |
| Infectious bursal disease virus (vaccine strain) | | - | - | - | - |

^a Viral RNA amplification was evaluated by each sRRT-PCR using matrix-, H5-, N1-, or N8 gene-specific primer and probe sets (+: RRT-PCR-positive; -: RRT-PCR-negative).

⑥ 민감도 검정

- HPAI H5N1과 H5N8 표준주를 대상으로 개발진단법의 민감도를 평가한 결과, M, H5 and N1 gene 에 대해 0.6, 0.7 and 0.9 EID₅₀ 로 확인되었으며 H5N8 표준주를 대상으로 개발진단법의 민감도를 평가한 결과 M, H5 and N1 gene 에 대해 1.0, 0.8 and 1.3 EID₅₀ 로 확인되었음 (Fig. 15).

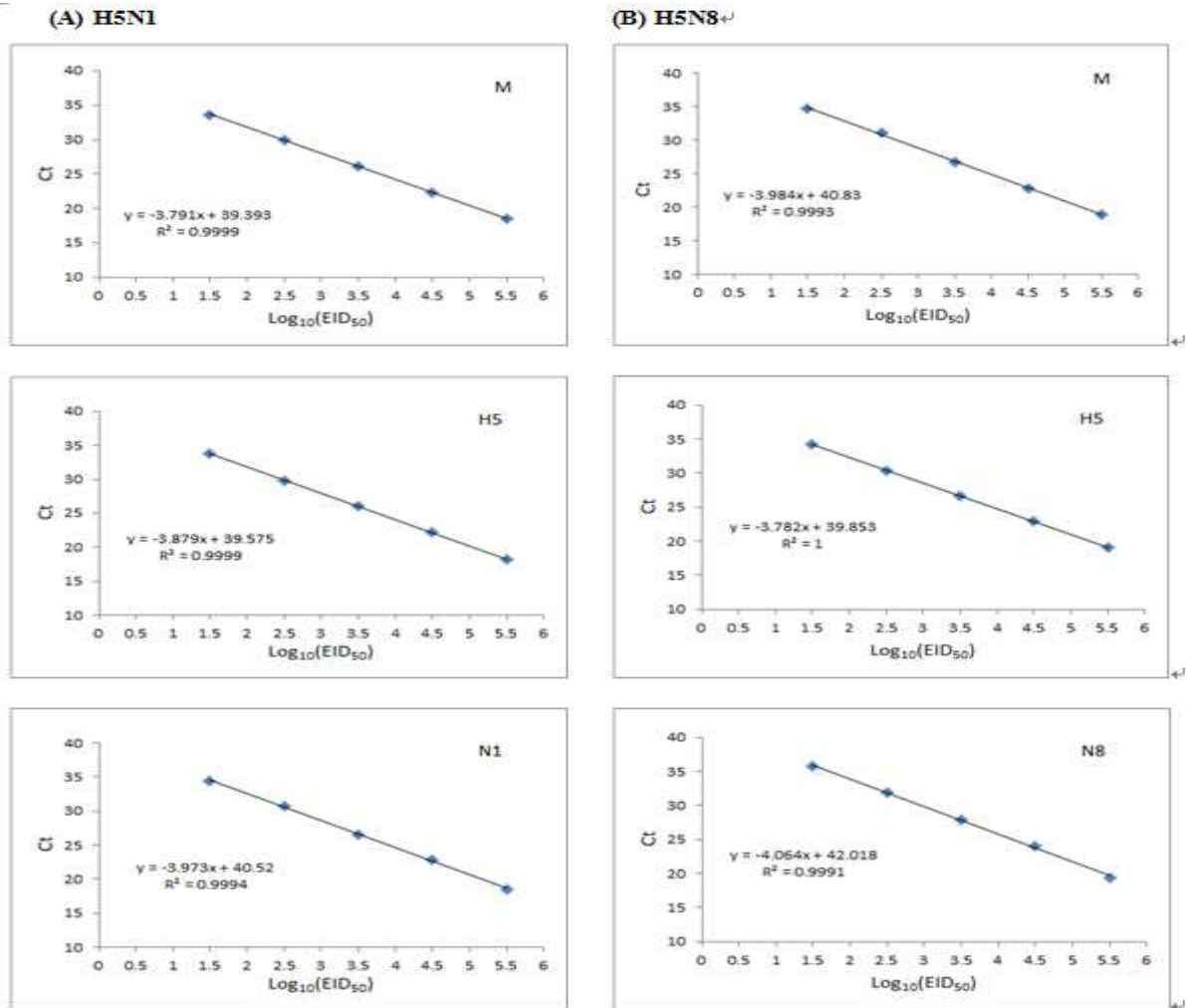


Fig. 15. Sensitivity and dynamic range of the single-step real-time RT-PCR assay for detection of H5N1 and H5N8 viral RNA. Serial 10-fold dilutions of viral RNA standard (from $10^{5.5}$ to $10^{0.5}$ EID₅₀/0.1mL) were plotted against the threshold cycle(Ct).(A)A minimum of 0.6, 0.7, and 0.9 EID₅₀ of H5N1 virus or (B) 1.0, 0.8, and 1.3 EID₅₀ of H5N8 virus per reaction could be detected using M, H5, N1, and N8-specific primer and probe sets, respectively. The coefficient of determination(R^2) and are gression curve (y) was calculated.

3. 동물 인플루엔자 바이러스 현장진단용 등온증폭법(RT-LAMP) 개발

가. 동물 인플루엔자 바이러스 공통 검출용 RT-LAMP 진단법 개발

- (1) 목적동물 : 돼지, 사람, 조류 (포유동물 및 모든 조류)
- (2) 공시 바이러스 : 사람, 돼지 및 조류 influenza virus
 - 공시 바이러스를 국제수역사무국(OIE)의 표준 방법에 준하여 발육란에 접종하여 배양한 다음, 혈구응집반응을 실시하여 역가를 측정한 다음, 시험에 제공함.
- (3) 개발 목표 : 모든 아형의 A형 인플루엔자바이러스를 공통 검출할 수 있는 primer set를 이용한 RT-LAMP 진단법 개발
- (4) RT-LAMP-PCR 조건
 - (가) RNA 추출 : 시판 추출키트 이용
 - (나) Primer 설계 및 제작 : 모든 아형의 인플루엔자 바이러스를 공통적으로 증폭할 수 있는 primer set를 선별하기 위하여 2009-2015년 사이에 Influenza Sequence Database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>)에 등록된 Matrix gene 유전자 염기서열 정보를 확보하여 primer을 설계함 (Table 23, Fig. 16)).

Table 23. Primer sets used in the RT-LAMP for the detection of M gene

| Target | Name | Oligonucleotide sequence | Reference |
|--------|-------|--|------------|
| M | M-F3 | 5'-AGTCTTCTAACCGAGGTCGA-3' | this study |
| | M-B3 | 5'-TGCAGTCCTCGCTCACTG-3' | |
| | M-FIP | 5'-ACATCTTCAAGTCTCTGCGGATCACGTTCTCTCTATCGTCCCG -3' | |
| | M-BIP | 5'-AGACAAGACCAATCCTGTCACTCTTGCAGTCCTCGCTCACTG-3' | |
| | M-LF | 5'-GCAAAGACATCTTCAAGTCTCTGC-3' | |
| | M-LB | 5'-GACTAAGGGGATTTTAGGGTTTGT-3' | |

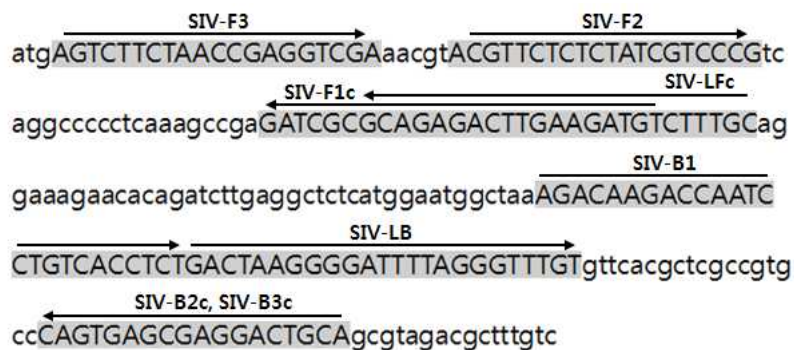


Fig. 16. Location of primers for reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Locations of primer-binding sequences are underlined on the sequence of the matrix gene of Korean reference swine influenza virus isolate

A/Korea/VD01/2009(H1N1)(GenBank accession number JN043432).

(다) RT-LAMP-PCR용 반응조건

| Step | RT-LAMP-PCR Cycle | | |
|---------------|-------------------|-------|---------|
| | Temp | Time | Cycle |
| Amplification | 63°C | 1 h | 1 cycle |
| Annealing | 85°C | 5 min | 1 cycle |

(라) 검출 특이도 검정

- SIV H1N1, H1N2, H3N2, pandemic 2009 H1N1의 바이러스 배양액에서 RNA를 추출한 다음, RT-LAMP-PCR을 실시한 결과, 각 바이러스에 대해 특이적으로 반응함을 확인함 (Fig 17).

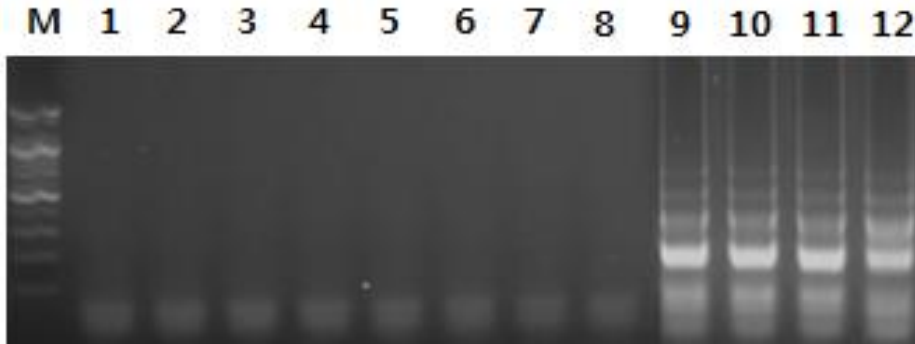


Fig. 17. Specificity of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for amplification of the matrix gene of swine influenza virus (SIV). Lane M; 100 bp DNA marker, Lane 1; genotype 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), Lane 2; genotype 2 PRRSV, Lane 3; classical swine fever virus, Lane 4; porcine circovirus type 2, Lane 5; *Mycoplasma hyopneumoniae*, Lane 6; *Pasteurella multocida*, Lane 7; *Haemophilus parasuis*, Lane 8; *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Lane 9; SIV subtype H1N1, Lane 10; pandemic 2009 influenza virus H1N1, Lane 11; SIV subtype H1N2, Lane 12; SIV subtype H3N2.

(마) 검출 민감도 검정

- RT-LAMP의 민감도는 1 copies/μL로 기존의 RT-PCR(10 copies/μL) 보다 10배 이

상 민감도가 높았고, real time RT-PCR(1 copies/ μ L)과 유사한 수준이었으며, 별도의 검출장비 없이도 육안으로 반응결과를 확인 가능하였음 (Fig. 18).

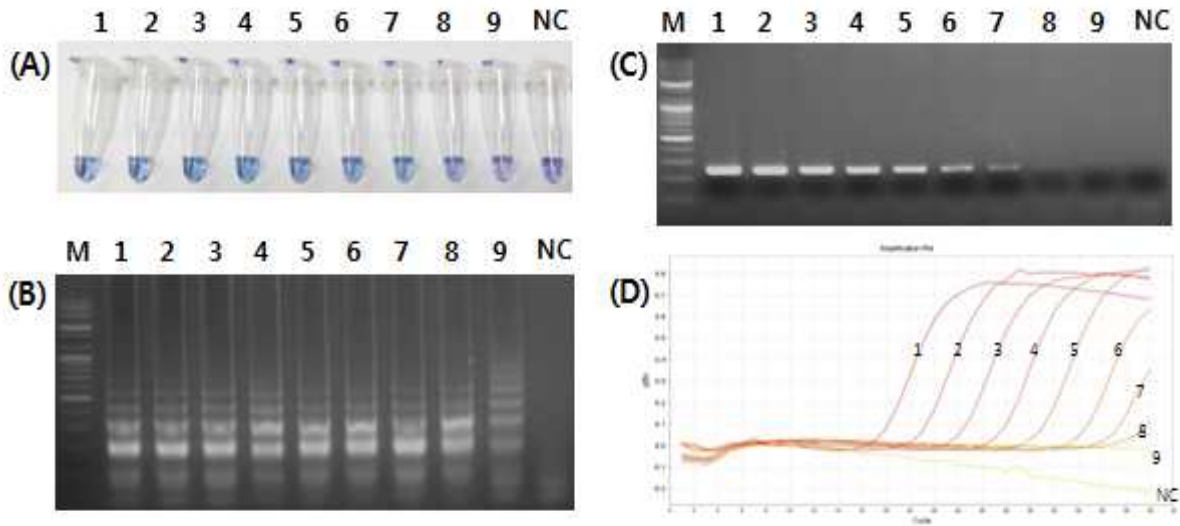


Fig. 18. Detection limit of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (A and B), reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) (C) and real time RT-PCR (D) for amplification of the matrix gene of swine influenza virus (SIV). Lane M; 100 bp DNA marker, Lane 1-9; 10⁸-10⁰ copies/ μ L of matrix gene of SIV.

나. 조류인플루엔자바이러스 공통 및 H5 아형 현장진단용 RT-LAMP 진단법 개발

- (1) 목적동물 : 조류 (닭, 오리 등)
- (2) 공시 바이러스 : Avian influenza virus subtype H5
 - 공시 바이러스를 국제수역사무국(OIE)의 표준 방법에 준하여 발육란에 접종하여 배양한 다음, 혈구응집반응을 실시하여 역가를 측정한 다음, 시험에 제공함.
- (3) 개발 목표 : 모든 AIV를 검출하는 공통 primer set와 H5 아형 검출용 primer set을 동일 RT-LAMP 조건에서 동시 검출할 수 있는 multi-tube RT-LAMP 진단법
- (4) RT-LAMP-PCR 조건
 - (가) RNA 추출 : 시판 추출키트 이용

(나) Primer 설계 및 제작 : 모든 아형의 인플루엔자 바이러스를 공통적으로 증폭할 수 있는 primer set를 선별하기 위하여 2009-2015년 사이에 Influenza Sequence Database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>)에 등록된 Matrix gene과 HA gene(H5) 유전자 염기서열 정보를 확보하여 primer을 설계함 (Table 24).

Table 24. Primer sets used in the RT-LAMP for the detection of AIV M and H5 gene

| Target | Name | Oligonucleotide sequence | Reference |
|--------|--------|---|------------|
| M | M-F3 | 5'-AGTCTTCTAACCGAGGTCGA-3' | this study |
| | M-B3 | 5'-TGCAGTCCTCGCTCACTG-3' | |
| | M-FIP | 5'-ACATCTTCAAGTCTCTGCGCATCACGTTCTCTCTATCGTCCCG-3' | |
| | M-BIP | 5'-GAGGCTCTCATGGAATGGCTAAAGACGGTGAGCGTGAACACAA-3' | |
| | M-LF | 5'-GCTTTGAGGGGGCCTGA-3' | |
| | M-LB | 5'-CAAGACCAATCCTGTCACCTCTG-3' | |
| HA | H5-F3 | 5'-TTATAGAGGGAGGATGGCAR-3' | this study |
| | H5-B3 | 5'-AAYCCGTCTTCCATCTTCTTR-3' | |
| | H5-FIP | 5'-TTGTCTGCAGCGTAYCCACAATGGTAGAYGGTTGGTATGG-3' | |
| | H5-BP | 5'-GGCAATAGAYGGAGTYACCAATGCCTCAAAYTGRGTGTTCA-3' | |
| | H5-LF | 5'-GCTCRTTGCTGTGGTGRTA-3' | |
| | H5-LB | 5'-AAGGTCAACTCRATCATTGACA-3' | |

(다) RT-LAMP-PCR용 반응조건

| Step | RT-LAMP-PCR Cycle | | |
|---------------|-------------------|--------|---------|
| | Temp | Time | Cycle |
| Amplification | 58°C | 40 min | 1 cycle |
| Annealing | 85°C | 5 min | 1 cycle |

(라) 민감도 검정: 각 바이러스 배양액에 대하여 EID 역가를 $10^{7.0}$ EID₅₀/0.1mL로 조정하였고, 이를 10배수 단계희석하였다. 각 희석액에서 추출된 RNA를 이용하여 RT-LAMP를 실시한 후 검출한계를 확인한 결과, 각각의 반응에서 모두 100 EID₅₀/0.1mL의 민감도를 확인하였음 (Fig. 19).

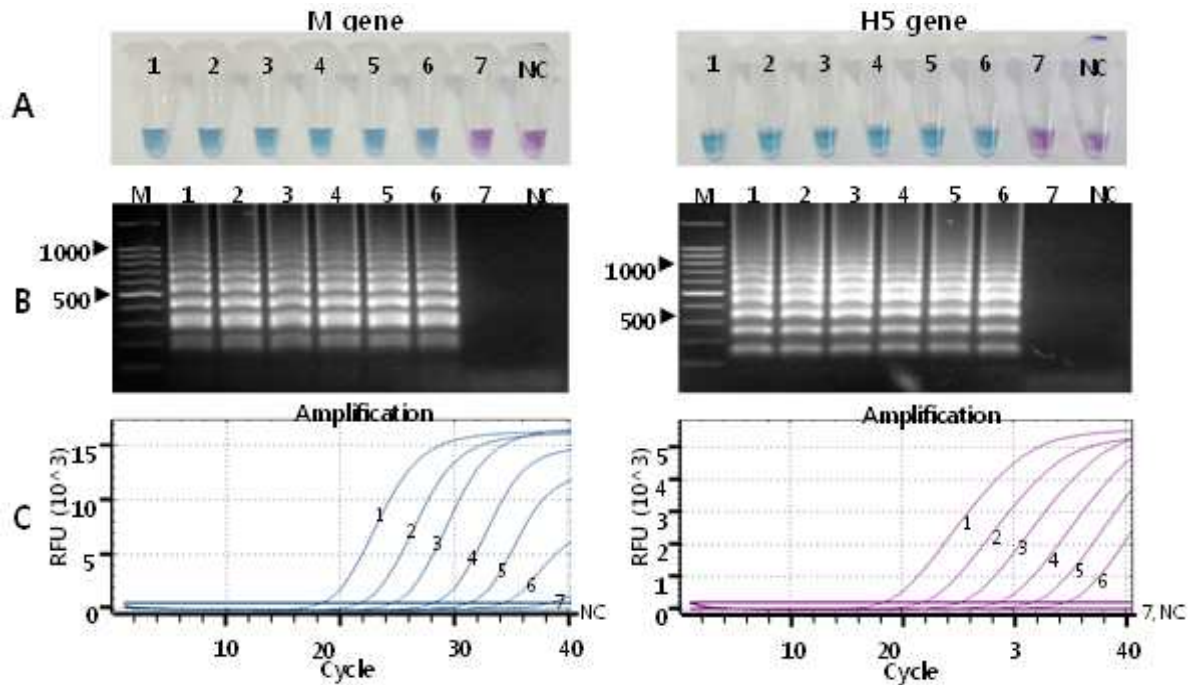


Fig. 19. Comparison of the sensitivity of the RT-LAMP and RRT-PCR assays with serially diluted RNAs of H5N1 HPAIV. (A) Detection of the RT-LAMP results by the hydroxynaphthol blue dye-mediated colorimetric method. Tubes 1-7, 10-fold dilutions of viral RNAs from $10^{7.0}$ to $10^{1.0}$ EID50/0.1mL ;tube NC, negative control.(B) Detection of the RT-LAMP results by agarose gel electrophoresis. Lane M, 100 bp DNA marker; lanes 1-7, 10-fold dilutions of viral RNAs from $10^{7.0}$ to $10^{1.0}$ EID50/0.1mL; lane NC, negative control.(C) Results of qRT-PCR.Lines 1-7, 10-fold dilutions of viral RNAs from $10^{7.0}$ to $10^{1.0}$ EID50/0.1mL;line NC, negative control.

(마) 특이도 검정: 다양한 AIV와 AIV H5의 바이러스 배양액에서 RNA를 추출한 다음, RT-LAMP-PCR을 실시한 결과, 각 바이러스에 대해 특이적으로 반응함을 확인함 (Table 25).

Table 25. Virus strains used for validation of the RT-LAMP assay and its specificity.

| Virus (clade) | Subtype | Detection of AIV gene ^a | |
|---|---------|------------------------------------|----|
| | | M | H5 |
| Reference strains with different subtypes | | | |
| A/PR/8/34 | H1N1 | + | - |
| A/Singapore/1/57 | H2N2 | + | - |
| A/duck/Ukraine/1/63 | H3N8 | + | - |
| A/duck/Czechoslovakia/56 | H4N6 | + | - |
| A/duck/Hong Kong/820/80 | H5N3 | + | + |
| A/shearwater/Australia/1/72 | H6N5 | + | - |
| A/wild duck/Kr/CSM42-34/11 | H7N9 | + | - |
| A/turkey/Ontario/6118/68 | H8N4 | + | - |
| A/turkey/Wisconsin/1/66 | H9N2 | + | - |
| A/wild duck/Kr/CSM42-9/11 | H10N7 | + | - |
| A/duck/Memphis/546/74 | H11N9 | + | - |
| A/duck/Alberta/60/76 | H12N5 | + | - |

| | | | |
|--|-------|---|---|
| A/wild duck/Kr/SH38-45 | H13N2 | + | - |
| A/mallard/Gurjer/263/82 | H14N5 | + | - |
| A/shearwater/West Australia/2576/79 | H15N9 | + | - |
| A/gull/Denmark/68110 | H16N3 | + | - |
| B/Wisconsin/1/2010 | | - | - |
| HPAIV isolates from Korean HPAI outbreaks | | | |
| A/chicken/Korea/ES/2003 (2.5) | H5N1 | + | + |
| A/chicken/Korea/IS/2006 (2.2) | H5N1 | + | + |
| A/chicken/Korea/Gimje/2008 (2.3.2.1) | H5N1 | + | + |
| A/duck/Korea/Cheonan/2010 (2.3.2.1) | H5N1 | + | + |
| A/breeder duck/Korea/Gochang1/2014 (2.3.4.4) ^b | H5N8 | + | + |
| A/broiler duck/Korea/Buan2/2014 (2.3.4.4) ^b | H5N8 | + | + |
| A/broiler duck/Korea/H1731/2014 (2.3.4.4) ^b | H5N8 | + | + |
| A/domestic mallard duck/Korea/H1924/201 (2.3.4.4) ^b | H5N8 | + | + |
| A/mallard duck/Korea/H2102/2015 (2.3.4.4) ^b | H5N8 | + | + |
| Other avian pathogens | | | |
| Newcastle disease virus (La Sota strain) | | - | - |
| Infectious bronchitis virus (AVR1 strain) | | - | - |
| Infectious bursal disease virus (W2512 strain) | | - | - |

(바) 야외시료에 대한 진단법 효율 검증

- 야외 시료에 대하여 개발 RT-LAMP과 RRT-PCR의 진단효율을 비교 평가한 결과, 동일한 검출효율을 나타내어 기존 RRT-PCR의 대체진단법으로 활용 가능할 것으로 판단됨 (Table 26).
- 개발 RT-LAMP의 경우 증폭결과를 별도의 처리과정 없이 육안으로 색깔 변화를 관찰하여 바로 판독이 가능하여 현장 진단법으로 활용 가능할 것으로 기대됨 (Fig. 19).

Table 26. Results of virus detection in clinical samples by the M or H5 gene-specific RT-LAMP and real time RT-PCR (RRT-PCR)

| Fecal samples | No of tested | No. of virus positive | | | | HA subtype (No. of virus) |
|------------------|--------------|-----------------------|----|---------|----|-----------------------------|
| | | RRT-PCR | | RT-LAMP | | |
| | | M | H5 | M | H5 | |
| Domestic chicken | 252 | 8 | 0 | 8 | 0 | H9(8) |
| Wild bird | 375 | 7 | 1 | 7 | 1 | H5(1), H6(3), H9(2), H11(1) |
| Total | 627 | 15 | | 15 | 1 | |

4. 동물 인플루엔자 현장진단용 direct RT-PCR 및 real time RT-PCR 진단법 개발

가. 동물 인플루엔자 바이러스 현장진단용 direct RT-PCR 진단법

- (1) 목적동물 : 모든 축종(조류, 돼지, 개, 고양이, 말)
- (2) 공시 바이러스 : 동물 및 조류 인플루엔자바이러스
 - 공시 바이러스를 국제수역사무국(OIE)의 표준 방법에 준하여 발육란에 접종하여 배양한 다음, 혈구응집반응을 실시하여 역가를 측정 한 다음, 시험에 제공

- (3) 개발 목표 : 모든 동물용 인플루엔자 바이러스를 검출하는 공통 primer set을 이용하여 유전자 추출없이 RT-PCR을 할 수 있는 direct RT-PCR (dRT-PCR) 방법 개발
- 기 개발된 RT-PCR 진단법을 활용하되, 유전자추출키트를 이용한 핵산 추출과정 없이 협력업체(나노헬릭스)에서 개발한 direct buffer를 이용하여 진단시간을 단축

(4) direct RT-PCR 조건

- (가) Direct 최적 조건 확립 : 양성시료 4종을 대상으로 dRT-PCR에 적합한 시료처리용 완충액 (sample dilution buffer, SAB)의 희석비율을 확인한 결과 희석비율이 1:1, 1:2인 경우 가장 증폭이 잘 일어난 것으로 보아 추후 실험에서는 시료와 SAB의 비율을 1:1로 적용함 (Fig. 20)

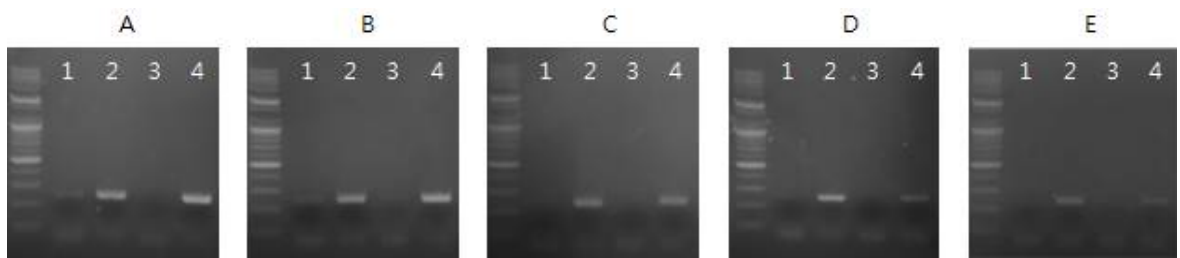


Fig. 20. Optimization of sample pre-treatment condition with sample dilution buffer(SAB) for direct RT-PCR (dRT-PCR). A-E, RT-PCR results for sample pre-treatment condition with different dilution ratio of sample to SAB 1:1, 1:2.5, 1:5, 1:10 and 1:20.

- (나) RNA 추출 : sample : 1X dilution buffer = 1 : 1 (50ul + 50ul)
- (다) 민감도 테스트 : 시료에서 시판키트를 이용해 유전자를 추출하여 RT-PCR (유전자 추출키트 사용)과 dRT-PCR (SAB 처리, 유전자추출 생략)을 실시하여 검출 민감도를 비교한 결과, dRT-PCR의 민감도가 약 4배 정도 낮은 것으로 나타남 (Fig. 21).
- (라) 이상의 평가결과, 민감도가 다소 낮아지기는 하였으나 유전자 추출 과정이 생략된 결과, 전체 진단 소요시간이 2시간 이내로 현장 진단용으로 활용 가능한 것으로 평가되었으며, 시제품을 제작하여 평가기관(검역본부)에 제공 완료함.

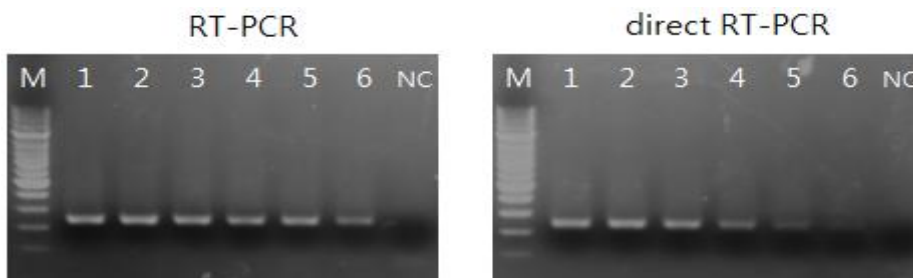


Fig. 21. Comparison of the sensitivity between commercial RT-PCR (RT-PCR) and direct RT-PCR (dRT-PCR) in detecting influenza virus. Lane M; 100 bp ladder, Lane 1-6: serial dilutions (2^2 , 2^0 , 2^{-2} , 2^{-4} , 2^{-6} and 2^{-8} HA titer) of cultured influenza viruses, respectively. Lane NC; negative control.

나. 동물 인플루엔자 바이러스 현장진단용 direct real time RT-PCR 진단법

- (1) 목적동물 : 모든 축종(조류, 돼지, 개, 고양이, 말)
- (2) 공시 바이러스 : 동물 및 조류 인플루엔자바이러스
 - 공시 바이러스를 국제수역사무국(OIE)의 표준 방법에 준하여 발육란에 접종하여 배양한 다음, 혈구응집반응을 실시하여 역가를 측정 한 다음, 시험에 제공
- (3) 개발 목표 : 모든 동물용 인플루엔자 바이러스를 검출하는 공통 primer/probe set을 이용하여 유전자 추출없이 real time RT-PCR을 할 수 있는 direct real time RT-PCR (dRRT-PCR) 진단법 개발.
 - 기 개발된 real time RT-PCR 진단법을 활용하되, 유전자추출키트를 이용한 핵산 추출 과정 없이 협력업체(나노헬릭스)에서 개발한 direct buffer를 이용하여 진단시간을 단축
- (4) dRRT-PCR 조건
 - (가) Direct 최적 조건 확립 : 양성시료 4종을 대상으로 dRRT-PCR에 적합한 시료처리용 완충액 (sample dilution buffer, SAB)의 희석비율을 확인한 결과 희석비율이 1:1, 1:2 인 경우 가장 증폭이 잘 일어난 것으로 보아 추후 실험에서는 시료와 SAB의 비율을 1:1로 적용함 (Fig 22).

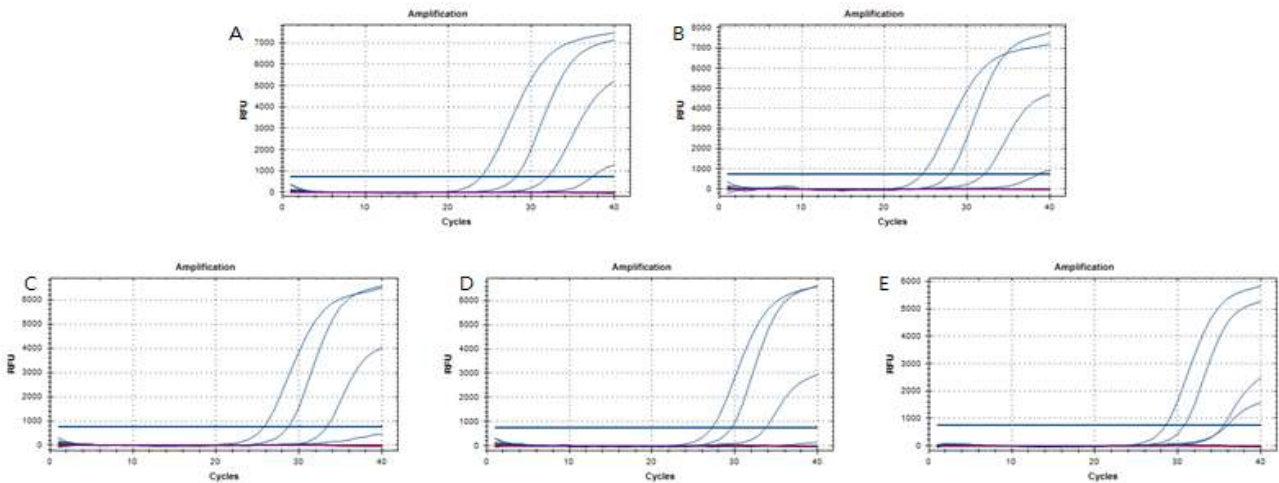


Fig. 22. Optimization of sample pre-treatment condition with sample dilution buffer(SAB) for direct realtime RT-PCR (dRRT-PCR). A-E, realtime RT-PCR results for sample pre-treatment condition with different dilution ratio of sample to SAB 1:1, 1:2.5, 1:5, 1:10 and 1:20.

- (나) RNA 추출 : sample : 1X dilution buffer = 1 : 1 (50ul + 50ul)
- (다) 민감도 테스트 : 시료에서 시판키트를 이용해 추출한 핵산을 4배수로 단계희석한 다음, RRT-PCR(시판키트 유전자 추출)과 dRRT-PCR (SAB 처리, 유전자 추출 생략)을 실시하여 비교한 결과, dRRT-PCR의 민감도가 약 4배 정도 낮게 나타남 (Fig. 23).

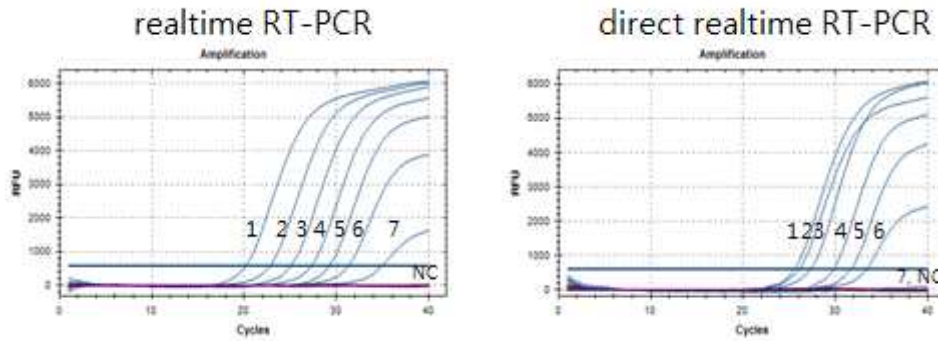


Fig. 23. Comparison of the sensitivity between commercial real-time RT-PCR (RRT-PCR) and direct real-time RT-PCR (dRRT-PCR) in detecting influenza virus. Lane 1-7: serial dilutions (2^2 , 2^0 , 2^{-2} , 2^{-4} , 2^{-6} , 2^{-8} and 2^{-10} HA titer) of cultured influenza viruses, respectively. Lane NC; negative control.

(라) 이상의 평가결과, 개발된 dRRT-PCR은 기존의 핵산추출 RRT-PCR에 비해 민감도는 한 단계 낮으나 유전자 추출 과정이 생략된 결과, 전체 진단 소요시간이 1시간 이내로 현장 진단용으로 활용 가능한 것으로 평가되었으며, 시제품을 제작하여 평가기관(검역본부)에 제공 완료함.

다. 시판 신속 real time PCR 장비를 이용한 개발 dRRT-PCR 키트의 효용성 검토

(1) 실험목적

- 개발된 dRRT-PCR 키트를 현장진단용으로 적용하기 위하여 반응시간이 빠른 시판 신속 real time PCR 장비를 이용하여 실험할 경우, 진단 소요시간이 최종목표인 30분 이내로 가능한지를 확인함

(가) 사용기기 정보 및 사양 :

- GENECHECKER ultra-fast PCR system (제조사 : (주)진시스템)
- 외형 (<http://www.genesystem.co.kr/kor/> 참고)



GENECHECKER™ 사양

| | |
|-------------|---|
| 구동방식 | 펠티어소자 정밀 제어 |
| 온도 정확성 | ± 0.5°C |
| 온도 균일도 | ± 0.5°C (well to well) |
| 온도 안정성 | ± 0.5°C |
| 온도 상승속도 | 8.0°C / second |
| 온도 하강속도 | 8.0°C / second |
| 온도설정 범위 | RT 사이클 35 ~ 65°C (1.0°C 단위 조절) PCR 사이클 20 ~ 99°C (1.0°C 단위 조절) |
| 샘플 매개체 | 폴리머 기반 3자원 마이크로플루이딕 칩 |
| 반응당 샘플 개수 | 8 |
| Well당 샘플 용량 | 10 µl |
| PCR 시간 | 30 사이클 12분 이내 (Conventional PCR) |
| 전기 영동 | 필요없음 (정성분석 결과 즉석 확인) |
| 디스플레이 | 4열 텍스트 LCD |
| 내장 메모리 | PCR 프로토콜 12개 저장 가능 |
| 전원 | 사용자 연결전원 : 110~230V/60Hz, 1.5A? 장비입력전원 : DC 12V, 10A |
| 전력 소모량 | 70W |
| 크기 / 무게 | 200(W) X 200(D) X 125(H) mm / 약 3.0Kg |

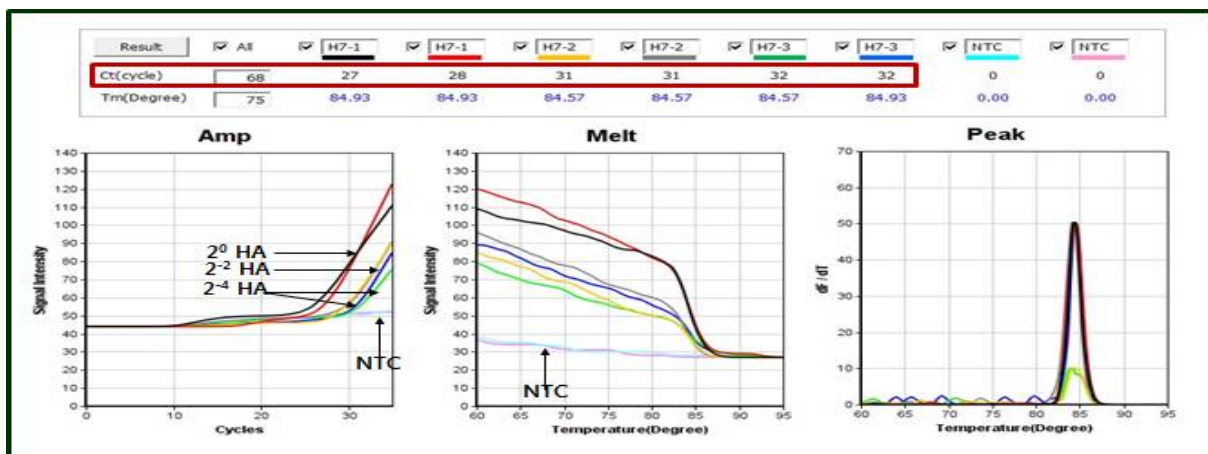


Fig. 24. Specifications of commercial ultra-fast PCR system applied with direct real time RT-PCR kit.

(나) real time direct RT-PCR 반응조건

| Step | RT-PCR Cycle | | |
|----------------------|--------------|--------|---------|
| | Temp | Time | Cycle |
| cDNA synthesis | 50°C | 5 min | 1 cycle |
| Initial inactivation | 95°C | 30 sec | 1 cycle |
| Denaturation | 95°C | 5 sec | 35cycle |
| Annealing | 50°C | 5 sec | |
| Extension | 72°C | 5 sec | |

(다) 민감도 테스트 : 공시 인플루엔자 바이러스 배양액을 이용하여 시판 핵산추출키트로 핵산을 추출하여 realtime RT-PCR을 실시한 결과와 시판 키트를 이용하지 않고 directly realtime RT-PCR을 실시한 결과와 검출 민감도를 비교한 결과, direct realtime RT-PCR의 민감도가 약 4배정도 낮게 나타나 기존 real time PCR 장비와 동일하게 나타났음 (Fig. 25).



A

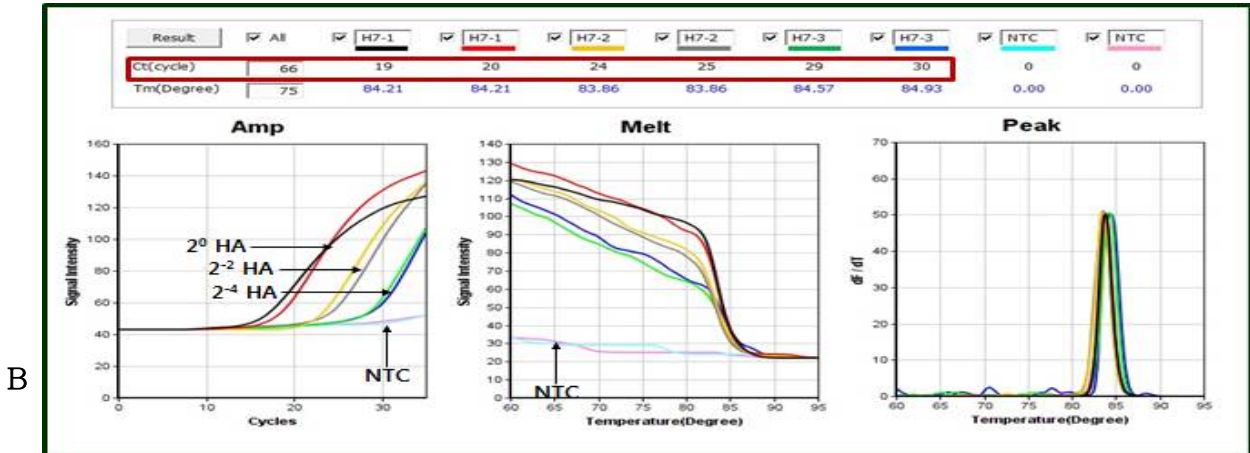


Fig. 25. Comparison of the sensitivity between realtime RT-PCR with extracted RNA by commercial kit and direct realtime RT-PCR without RNA extraction for the detection of avian influenza virus. Lane 1-6: serial dilutions (2^0 , 2^0 , 2^{-2} , 2^{-2} , 2^{-4} and 2^{-4} HA titer) of cultured influenza viruses, respectively. Lane NTC; negative control.

- (라) 이상의 시험결과, 개발된 direct real time RT-PCR 키트와 시판 신속 진단 장비를 접목할 경우, 전 진단 과정을 목표한 30-40분 이내에 완료할 수 있음을 확인하였음.
- 기존 유전자 추출 진단법에 비하여 검출민감도가 4배 정도 저하되기는 하지만 향후 적절한 장비와 개발 진단키트를 이용할 경우 동물 인플루엔자 바이러스의 현장 신속진단 용으로 충분히 활용 가능할 것으로 판단됨.

5. 인플루엔자 항바이러스 내성 유전자 검출용 유전자진단법 개발

- (1) 공시 바이러스 : 경북대학교 수의전염병제어센터에서 보관하고 있는 인플루엔자 바이러스 이외 검역본부로부터 분양 받은 불활화 표준바이러스 및 분리주를 시험에 제공함 (Table 27).

Table 27. Avian influenza viruses used in this study

| No. | Strain | No. | Strain |
|-----|---|-----|-----------------------------|
| 1 | A/PR/8/34 (H1N1) | 23 | A/WB/Korea/KPA09101(H9N2) |
| 2 | A/Singapore/1/57 (H2N2) | 24 | A/WB/Korea/KPA04111(H4N6) |
| 3 | A/duck/Ukraine/1/63 (H3N8) | 25 | A/WB/Korea/KPA01121(H1) |
| 4 | A/duck/Czechoslovakia/56 (H4N6) | 26 | A/WB/Korea/KPA01091(H1N1) |
| 5 | A/duck/Hong Kong/820/80 (H5N3) | 27 | A/WB/Korea/KPA01121(H1) |
| 6 | A/shear water/Australia/1/72 (H6N5) | 28 | A/WB/Korea/KPA110912(H11N9) |
| 7 | A/wild duck/Kr/CSM42-34/11 (H7N9) | 29 | A/WB/Korea/KPA03091(H3N8) |
| 8 | A/turkey/Ontario/6118/68 (H8N4) | 30 | A/WB/Korea/KPA04091(H4N6) |
| 9 | A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2) | 31 | A/WB/Korea/KPA04092(H4) |
| 10 | A/wild duck/Kr/CSM42-9/11 (H10N7) | 32 | A/WB/Korea/KPA06081(H6N2) |
| 11 | A/duck/Memphis/546/74 (H11N9) | 33 | A/WB/Korea/KPA06092(H6) |
| 12 | A/duck/Alberta/60/76 (H12N5) | 34 | A/WB/Korea/KPA09081(H9N2) |
| 13 | A/wild duck/Kr/SH38-45 (H13N2) | 35 | A/WB/Korea/KPA09091(H9N2) |
| 14 | A/mallard/Gurjer/263/82 (H14N5) | 36 | A/WB/Korea/KPA09092(H9N2) |
| 15 | A / S h e a r water/W.Austri/25761/79(H15N9) | 37 | A/WB/Korea/KPA09093(H9N2) |
| 16 | A/gull/Denmark/68110 (H16N3) | 38 | A/WB/Korea/KPA09094(H9N2) |
| 17 | A/WB/Korea/KPA03081(H3N2) | 39 | A/WB/Korea/KPA09095(H9N2) |
| 18 | A/WB/Korea/KPA05081(H5N1) | 40 | A/WB/Korea/KPA09096(H9N2) |
| 19 | A/WB/Korea/KPA10091(H10N1) | 41 | A/WB/Korea/KPA09097(H9N2) |
| 20 | A/WB/Korea/KPA06091(H6) | 42 | A/WB/Korea/KPA09098(H9N2) |
| 21 | A/WB/Korea/KPA07091(H7N7) | 43 | A/WB/Korea/KPA09099(H9N2) |
| 22 | A/WB/Korea/KPA11091(H11) | | |

(2) 개발 목표 : 동물 인플루엔자 바이러스 분리주의 항바이러스제 내성유전자 검출 기법 개발

(3) 검출 대상: Adamantane제(아만타딘), neuraminidase억제제(Oseltamivir, Zanamivir) 제제

※ 뉴라미니다제 억제 내성유전자는 PCR 검출기법이 다수 개발, 보고되어 있으므로 기보된 방법을 변용하여 적용하고, 아만타딘 내성 유전자는 검출기법이 보고된 바 없으므로 이 연구에서 신규 개발함으로써 2가지 내성유전자의 동시 검출기법으로 개발 진행

(4) 내성 유전자 특이 probe를 이용한 real time RT-PCR 개발

(가) Amantadin(아만타딘) 내성 유전자 검출 조건 확립

① 목표 : 아만타딘 내성은 M2 단백질의 여섯 위치에서의 염기 치환에 의해 발생함.

- 2015년까지 NCBI에 등재된 H9 아형 AIV의 M 유전자염기서열을 연도별로 분석한 결과, S31N 변이가 96.07%로 나타났으며, V27A 변이가 2.14%, 그리고 V27A/S31N 동시변이가 0.95%로 나타났음 (Table 28). 따라서 본 연구에서는 V27A와 S31N 두 종류의 변이 바이러스를 동시에 검출하는 방향으로 실험을 진행하였음.

Table 28. Distribution of Amantadin-resistant H9 subtype AIV from NCBI

| 연도 | 내성수 | 내성 현황 | | | | | | | | |
|-------|--------|-------|------|------|------|-------|------|------|-----------|-----------|
| | | L26F | V27A | A30T | A30V | S31N | G34E | L38F | L26F/S31N | V27A/S31N |
| 1999 | 5 | | | | | 5 | | | | |
| 2000 | 4 | | 1 | | | 3 | | | | |
| 2001 | 4 | | 3 | 1 | | | | | | |
| 2002 | 4 | | 2 | | | 2 | | | | |
| 2003 | 4 | | | | | 4 | | | | |
| 2004 | 0 | | | | | | | | | |
| 2005 | 8 | | 3 | 1 | | 4 | | | | |
| 2006 | 12 | | 1 | 3 | | 8 | | | | |
| 2007 | 12 | | 4 | | | 8 | | | | |
| 2008 | 17 | | 2 | | | 14 | | | | 1 |
| 2009 | 41 | | 1 | | | 39 | | | 1 | |
| 2010 | 44 | | 1 | | | 43 | | | | |
| 2011 | 54 | | | | | 53 | | | | 1 |
| 2012 | 80 | | | | | 79 | | | | 1 |
| 2013 | 388 | | | | | 382 | | | 1 | 5 |
| 2014 | 148 | | | | | 148 | | | | |
| 2015 | 13 | | | | | 13 | | | | |
| Total | 838 | 0 | 18 | 5 | 0 | 805 | 0 | 0 | 2 | 8 |
| (%) | 100.00 | 0.00 | 2.14 | 0.60 | 0.00 | 96.07 | 0.00 | 0.00 | 0.24 | 0.95 |

② RNA 추출 및 cDNA 합성: 시판 키트 이용

③ Primer/probe 설계 및 제작 : 인플루엔자 데이터베이스에 등록된 국내 1996년부터 2012년까지 발생한 H9 아형 인플루엔자 바이러스의 염기서열 정보 134개를 수집하여 DNASTAR®Lasergene (DNASTAR Inc., USA) 프로그램으로 비교 분석하여 가장 안정적인 부위를 선발한 다음, primer 설계 프로그램인 clone manager(Sci-Ed Software, USA)를 이용하여 설계함. 내성을 획득하는 27, 31 codon 부위에서 V27(allele T)과 S31(allele G)에는 VIC dye를, 27A(allele C)과 31N(allele A)에 대해 6-Carboxyfluorescein(6-FAM) dye를 붙여 내성 유무를 선별 가능한 probe를 설계함 (Table 22). 27번과 31 codon 사이에는 불과 9개의 nucleotide만이 존재하는 가까운 거리로 서로 영향을 받지 않게 하기 위해 짧은 길이의 probe 사용해야만 하며, 특이도 향상을 위하여 Minor Groove Binding probe(MGB probe)를 사용하여 Annealing 온도를 충분히 높이 설정함 (Table 29, Fig. 26).

Table 29. Primer and probe sets for the detection of the adamantane-resistant genes

| Target | Name | Oligonucleotide sequence | Size(bp) | |
|--------|------|--------------------------|----------|---------------------------|
| M | F | AATTTGCAGGCCTACCAGAA | 208 | |
| | R | TTCTTCCCTCATGGACTCAG | | |
| | V27A | | | FAM-CCTCTCGCCATTGC-MGB |
| | | | | FAM-CCTCTCGCTATTGC-MGB |
| | | | | VIC-CCTCTCGTCATTGC-MGB |
| | | | | VIC-CCTCTCGTTATTGC-MGB |
| | S31N | | | FAM-TGCAGCAAACATCATTG-MGB |
| | | | | FAM-TGCAGCAAATATCATTG-MGB |
| | | | | VIC-TGCAGCAAGCATCATTG-MGB |
| | | | | VIC-TGCAGCAAGTATCATTG-MGB |

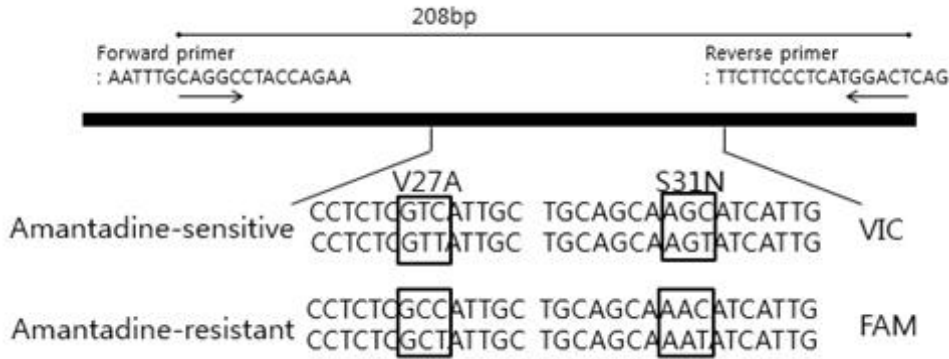


Fig. 26. Position of the primer and probe sets for the detection of the adamantane-resistant genes

③ PCR 반응액 조성 : 시판키트(TNT Research사, Anti HS Taq-High-) 사용

| 시약 | 조성 |
|------------------|----------|
| template | 5 ul |
| 10x buffer | 2 ul |
| dNTP mix | 1 ul |
| Anti HS Taq | 0.5 ul |
| primer(F/R)(10p) | 각 1 ul |
| probe(10p) | 각 0.5 ul |
| D·W to | to 25 ul |

④ PCR 반응조건 확립

| Step | RT-PCR Cycle | | |
|----------------------|--------------|--------|---------|
| | Temp | Time | Cycle |
| Initial inactivation | 95°C | 10 min | 1 cycle |
| Denaturation | 94°C | 15 sec | 40cycle |
| Annealing | 65°C | 30 sec | |

⑤ 효율성 검증: 총 43개의 조류 인플루엔자 바이러스에서 6개의 V27A 내성변이와 1개의 S31N 내성 변이주가 확인되었고, sequencing 결과와 95.3% (41/43)의 일치율을 나타냄(Table 27).

Table 28. Comparison of analytic efficiency between real-time PCR and sequencing

methods for the detection of the amantadine-resistant avian influenza viruses

| No. | subtype | 27 | | 31 | | No. | subtype | 27 | | 31 | |
|-----|---------|------|--------------|------|--------------|-----|---------|------|--------------|------|--------------|
| | | qPCR | Sequenc e | qPCR | Sequenc e | | | qPCR | Sequenc e | qPCR | Sequenc e |
| 1 | H1N1 | - | + | - | + | 23 | H9N2 | - | - | - | - |
| 2 | H2N2 | - | - | - | - | 24 | H4N6 | - | - | - | - |
| 3 | H3N8 | - | - | - | - | 25 | H1 | - | - | - | - |
| 4 | H4N6 | - | - | - | - | 26 | H1N1 | - | - | - | - |
| 5 | H5N3 | - | - | - | - | 27 | H1 | - | - | - | - |
| 6 | H6N5 | - | - | - | - | 28 | H11N9 | - | - | - | - |
| 7 | H7 | - | - | - | - | 29 | H3N8 | - | - | - | - |
| 8 | H8N4 | - | - | - | - | 30 | H4N6 | - | - | - | - |
| 9 | H9N2 | - | - | - | - | 31 | H4 | - | - | - | - |
| 10 | H10N7 | - | - | - | - | 32 | H6N2 | - | - | + | - |
| 11 | H11N6 | - | - | - | - | 33 | H6 | - | - | - | - |
| 12 | H12N5 | - | - | - | - | 34 | H9N2 | - | - | - | - |
| 13 | H13N6 | - | - | - | - | 35 | H9 | -/+ | - | - | - |
| 14 | H14 | - | - | - | - | 36 | H9 | - | - | - | - |
| 15 | H15 | - | - | - | - | 37 | H9 | + | + | - | - |
| 16 | H16 | - | - | - | - | 38 | H9 | + | + | - | - |
| 17 | H3N2 | - | - | - | - | 39 | H9 | + | + | - | - |
| 18 | H5N1 | - | - | - | - | 40 | H9 | - | - | - | - |
| 19 | H10N1 | - | - | - | - | 41 | H9 | + | + | - | - |
| 20 | H6 | - | - | - | - | 42 | H9 | + | + | - | - |
| 21 | H7 | - | - | - | - | 43 | H9 | - | - | - | - |
| 22 | H11 | - | - | - | - | | | | | | |

-;Amantadine-sensitive(wild type), +;Amantadine-resistant(mutant type), -/+;Mix of wild type and mutant type

⑥ 공시 바이러스의 M gene 염기서열 분석

- 내성유전자 검출결과의 정확도를 평가하기 공시바이러스의 M gene 염기서열을 분석하여 내성 유전자 변이 부위를 확인한 결과, 개발된 real time RT-PCR 결과와 일치함을 확인하였음 (Fig. 27)

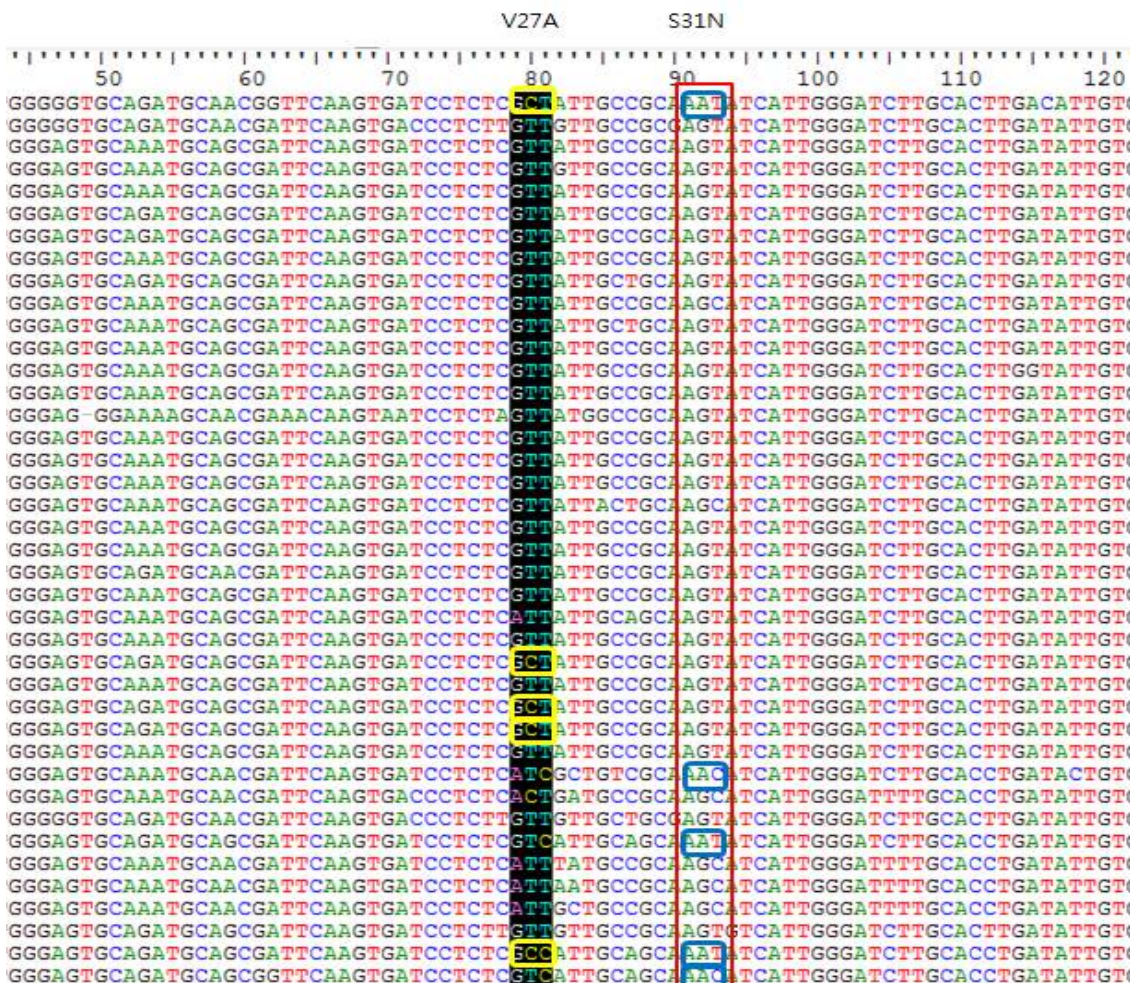


Fig. 27. Sequence analysis of the amantadine-resistant region of the M gene of the tested avian influenza viruses.

- (나) 항-뉴라미디다제 (Oseltamivir) 내성 유전자 검출기법 확립
- ① RNA 추출 및 cDNA 합성 : 시판 키트 이용
 - ② Primer 설계 및 제작
 - 기발 표된 논문에 근거하여 타미플루 내성 유전자 검출용 MGB probe 제작 (Table 29).

Table 29. Primer sets for the detection of the oseltamivir-resistant gene

| Target | Name | Oligonucleotide sequence | Size(bp) |
|--------|------|----------------------------|----------|
| NA | F | GGAAAGTAGTCAAATCAGTCGAAATG | 98 |
| | R | CTGCACACACATGTGATTTTCACTAG | |
| | 275H | FAM-CCTCATAGTGATAATTA-MGB | |
| | 275Y | VIC-CCTCATAGTAATAATTAG-MGB | |

- ③ PCR 반응액 조성 : 시판키트(TNT RESEARCH사, Anti HS Taq-High-) 사용

| | |
|------------------|----------|
| 시약 | 조성 |
| template | 5 ul |
| 10x buffer | 2 ul |
| dNTP mix | 1 ul |
| Anti HS Taq | 0.5 ul |
| primer(F/R)(10p) | 각 1 ul |
| probe(10p) | 각 1 ul |
| D·W to | to 25 ul |

④ RT-PCR 반응조건

| Step | RT-PCR Cycle | | |
|----------------------|--------------|--------|---------|
| | Temp | Time | Cycle |
| Initial inactivation | 95℃ | 10 min | 1 cycle |
| Denaturation | 94℃ | 15 sec | 45cycle |
| Annealing | 60℃ | 1 min | |

⑤ Oseltamivir (타미플루) 검출 현황

- 공시 바이러스 43주에 대한 타미플루 내성 유전자 검출결과, 공시 바이러스에서는 내성 유전자가 전혀 검출되지 않았음.

(다) 활용계획

- 현재까지 아만타딘-내성 유전자를 감별진단하는 real time RT-PCR, 기법은 개발된 바가 없으므로 본 연구에서 개발된 진단법dp 대한 야외 바이러스(시료)에 대한 검증을 확대하여 그 효율성을 확대 검증할 필요가 있음.
- 동물 인플루엔자 바이러스에 대한 항인플루엔자제제 내성 감시 및 모니터링에 활용 가능.

6. 동물 인플루엔자 바이러스 감별진단용 키트 시제품 제작 및 공급

가. RT-PCR 및 real time RT-PCR 키트 시제품 제작 및 공급(협력업체: 나노 헬릭스)

(1) RT-PCR 시제품을 위한 효소 정제 및 제조

(가) 역전사 효소의 클로닝 및 정제

- ① MMLV 역전사 효소 클로닝 : RT-PCR 시제품에 사용될 역전사 효소를 발현시키기 위한 벡터를 유전자 합성을 통해 클로닝하였다. RNase H 활성을 없애기 위해서 4개의 돌연변이를 그림 1와 같이 도입하였다. 효소 정제의 편의성을 위해서 His-tag이 도입된 pQE vector에 클로닝하였음(Fig. 28).

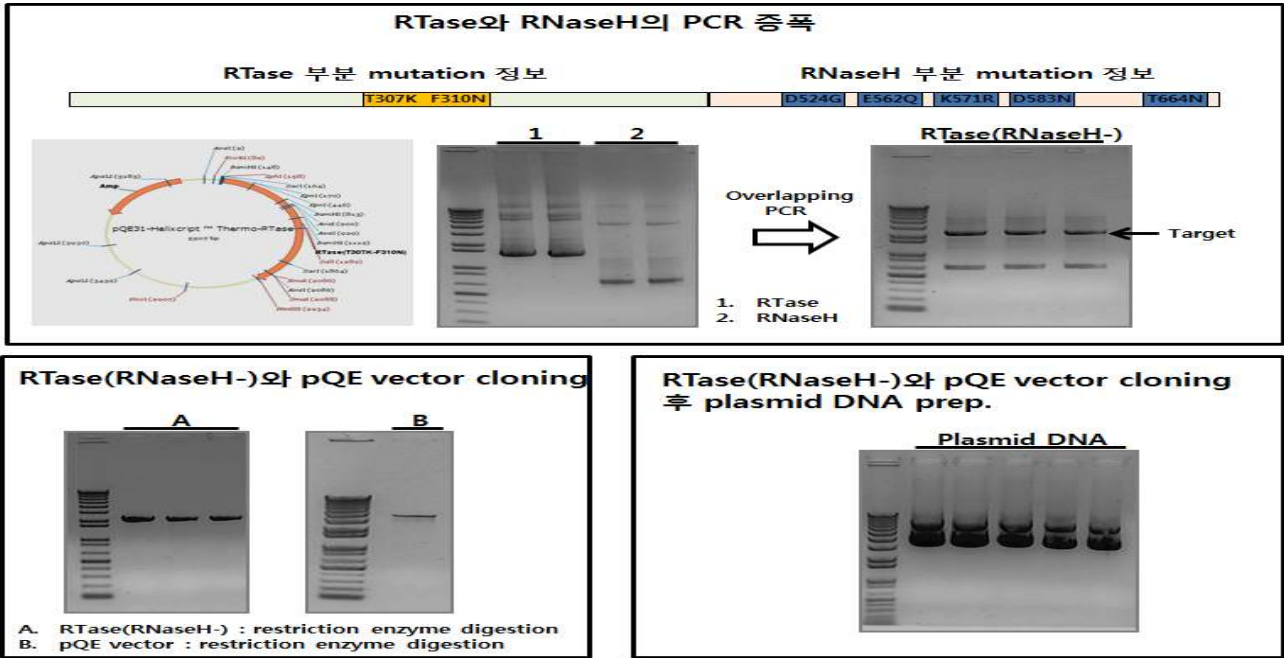


Fig. 28. Cloning of MMLV reverse transcriptase for direct RT-PCR.

② MMLV 역전사 효소의 정제 : MMLV 역전사 효소가 클로닝된 벡터가 형질전환된 DH10b cell을 배양하여 역전사 효소를 정제하였다. Ni NTA column을 이용한 affinity chromatography와 cellulose phosphate column 이용하여 단백질을 95% 이상의 순도로 정제하였음 (Fig. 29).

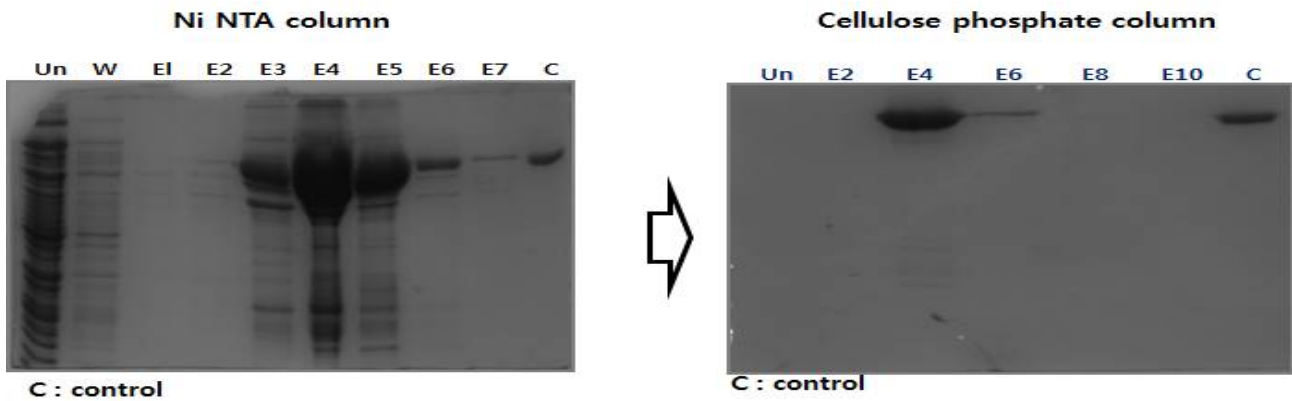


Fig. 29. Purification of MMLV reverse transcriptase for direct RT-PCR.

③ 역전사 효소의 활성 테스트 : 정제한 역전사효소를 human total RNA를 주형으로 하여 활성 테스트를 수행하였다. Dynein 유전자를 타겟으로 한 효소 활성 테스트 결과 12kb까지 역전사 반응이 문제없이 수행됨을 확인하였음 (Fig. 30)

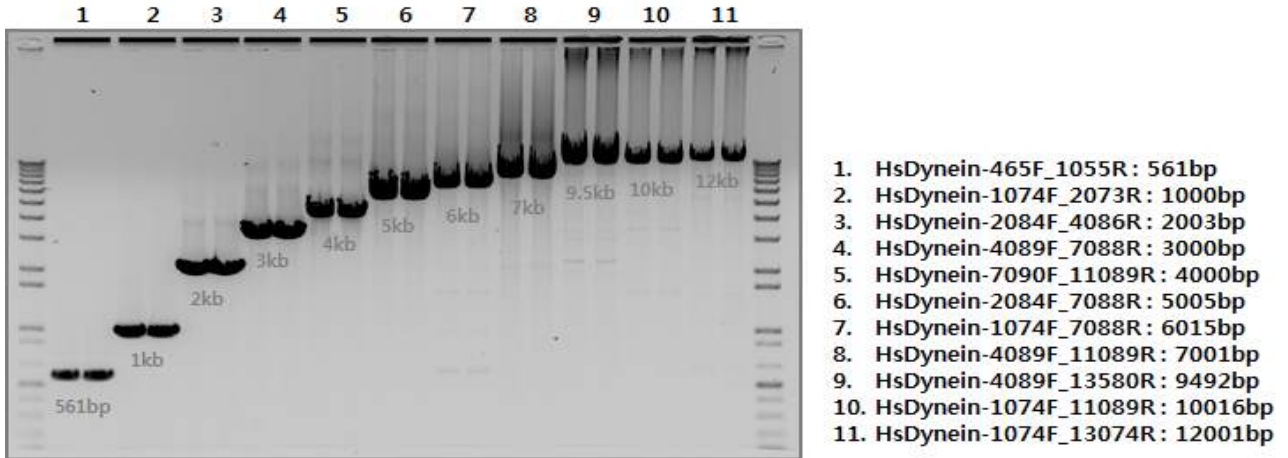


Fig. 30. Acitivity of MMLV reverse transcriptase for direct RT-PCR.

(나) Taq DNA 중합효소의 정제

① Taq DNA 중합효소의 발현 및 정제 : RT-PCR의 PCR 중합 효소에 해당되는 Taq DNA 중합효소를 정제하였다. 대량 발현형 균주를 LB에서 배양한 후 열처리와 PEI 침전을 통해 Taq DNA 중합효소를 농축한 후 두 번의 Q-sepharose chromatography 를 이용해서 순도 95% 이상의 효소를 정제하였음 (Fig. 31).

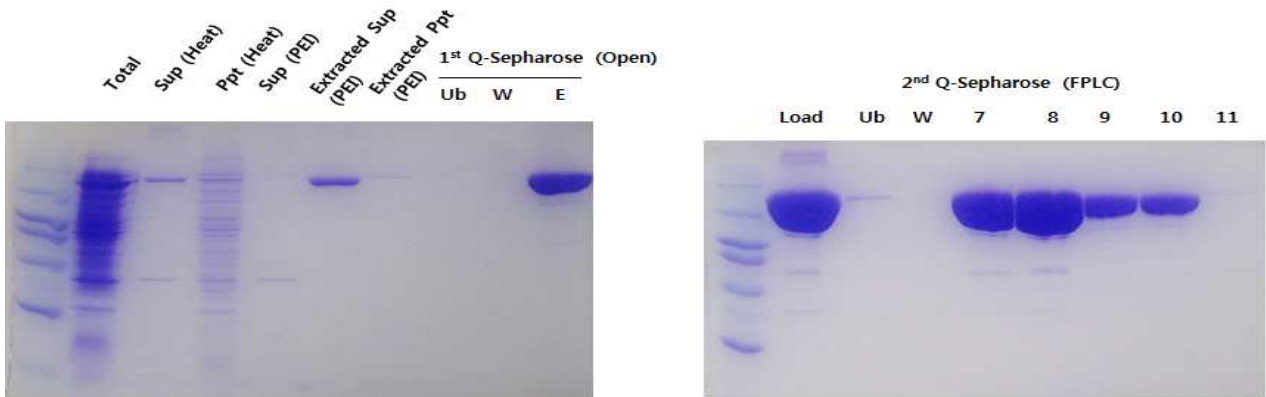


Fig. 31. Expression and purification of Taq DNA polymerase for direct RT-PCR.

(다) One-step RT-PCR 활성 테스트 : 정제된 역전사 효소와 Taq DNA 중합효소를 혼합하여 one-step RT-PCR 반응의 활성을 테스트 하였다. Human total RNA를 주형으로 하여 타겟의 증폭을 확인한 결과 0.001ng의 주형에서도 타겟이 문제없이 증폭됨을 확인하였음(Fig. 32).

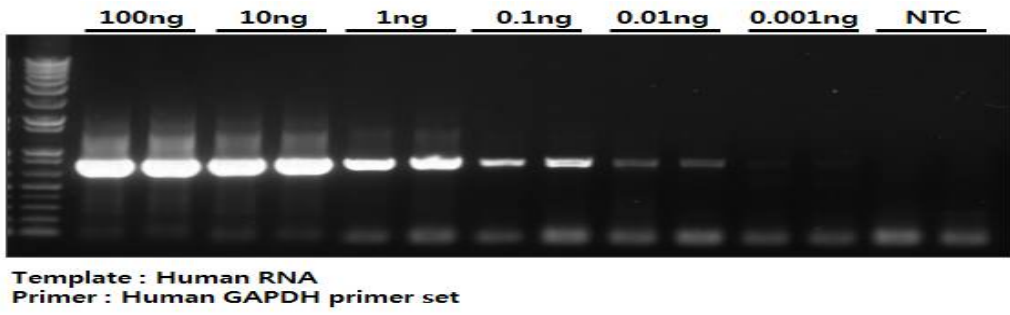


Fig. 32. Acitivity of One-step direct RT-PCR

(2) 교차오염 방지를 위한 UNG 시스템 확립

(가) 저온활성 고온 불활성 UNG의 적용 : UNG (Uracil DNA glycosylase) 시스템은 PCR 진단법에서 핵산의 교차오염 방지를 위해 널리 사용되는 방법임. 그러나 이 시스템을 RNA 병원체를 진단하는 방법에 사용하는 one-step RT-PCR system에는 적용할 수 없으며, 그 이유는 대장균 유래의 UNG를 이용하는 경우 역전사 반응이 일어나는 온도(50도)에서도 활성이 유지되어 역전사 반응결과 생성된 DNA가 분해되어 그 뒤에 일어나는 PCR 반응의 주형들이 사라지기 때문임.

(나) 따라서 one-step RT-PCR 기반의 진단법에는 역전사 반응 온도에서는 불활성화되는 특성을 갖는 새로운 UNG 효소가 필요하며, 본 연구과제에서는 이러한 특성을 만족하는 UNG를 저온성 심해 대구(Cod)에서 클로닝하여 시스템을 구성하였음.

(3) 축종별 인플루엔자 진단키트 시제품 생산 및 평가기관(검역본부) 제공

(가) 개발한 축종별 진단키트 18종에 대한 시제품을 협력업체(나노헬릭스)와 연계하여 시제품 생산을 완료하였음 (Table 30).

Table 30. List of diagnostic kits for the detection of animal influenza viruses

| Influenza test kit | Method | Host | Target |
|---|------------------|---------|---|
| Avian influenza virus differential RT-PCR kit for chicken | RT-PCR | chicken | AIV common, H5, H7, H9, and NDV |
| Avian influenza virus differential real time RT-PCR kit for chicken | real time RT-PCR | chicken | AIV common, H5, H7, H9, and NDV |
| Avian influenza virus differential RT-PCR kit for duck | RT-PCR | duck | AIV common, H5, H7, H9, Rimerella and DHV |
| Avian influenza virus differential real time RT-PCR kit for duck | real time RT-PCR | duck | AIV common, H5, H7, H9, Rimerella and DHV |
| Swine influenza virus RT-PCR kit | RT-PCR | pig | SIV common, H1, H3 and pH1N1 |
| Swine influenza virus real time RT-PCR kit for pigs | real time RT-PCR | pig | SIV common, H1, H3 and pH1N1 |
| Equine influenza virus RT-PCR kit | RT-PCR | horse | IAV common, H3 and H7 |
| Equine influenza virus real time RT-PCR kit for horse | real time RT-PCR | horse | IAV common, H3 and H7 |

| | | | |
|--|------------------|-------|-----------------------|
| Canine influenza virus RT-PCR kit | RT-PCR | dog | IAV common, H3 and H7 |
| Canine influenza virus real time RT-PCR kit for dogs | real time RT-PCR | dog | IAV common, H3 and H7 |
| Feline influenza virus RT-PCR kit | RT-PCR | cat | IAV common, H and H7 |
| Feline influenza virus real time RT-PCR kit for cats | real time RT-PCR | cat | IAV common, H3 and H7 |
| Direct RT-PCR kit - Avian | RT-PCR | avian | AIV common |
| Direct RT-PCR kit - Swine | RT-PCR | pig | SIV common |
| Direct RT-PCR kit - Equine | RT-PCR | horse | EIV common |
| Direct RT-PCR kit - Canine | RT-PCR | cat | CIV common |
| Influenza A virus HA typing kit | RT-PCR | - | IAV 15 HA subtyping |
| Influenza A virus NA typing kit | RT-PCR | - | IAV 9 NA subtyping |

(나) 효능 평가 결과에 따른 품질 보완 및 시제품 생산 및 제공

- 총 16종의 시제품을 생산하여 농림축산 검역본부에 평가용으로 제공 완료 (Fig. 33).



Fig. 33. Products of animal influenza virus detection kits

(5) 현장 상태를 고려한 냉장, 냉동에서의 키트 안정성시험 실시

(가) 보관온도별, 보관일자별 각 키트 시제품에 대한 작동여부를 확인한 결과, 1년까지 키트의 민감도 및 특이도에 변화가 없는 것으로 확인되었음(Fig. 34).

(나) 따라서 냉장, 냉동에서 1년까지 민감도가 하락하지 않고 유지됨을 고려하여 개발 키트의 보관온도별 유효기간은 다음과 같이 설정하였음.

- ① 4℃ 냉장 보관시 - 1년 이내
- ② -20℃ 냉동 보관시 - 1년 이내

| 보관일자 | 상온(25℃) | 냉장(4℃) | 냉동(-20℃) |
|------|---------|--------|----------|
| 0일차 | | | |
| 5일차 | | | |
| 7일차 | | | |
| 2주차 | | | |
| 4주차 | | | |
| 3개월 | | | |
| 6개월 | | | |
| 1년 | | | |

Fig. 34. Stability of the developed kits by chronological sensitivity test in different temperatures.

나. RT-LAMP 키트 시제품 제작 및 공급(협력업체: 엠모니터)

- (1) RT-LAMP 시제품을 생산을 위한 특허권 확보
 - RT-LAMP 시제품 생산 및 공급을 위하여 협력업체(엠모니터)에서 LAMP 시약의 원천 특허를 보유하고 있는 일본의 Eiken사로부터 특허기술에 대한 통상실시권을 허여 받아 안정적인 키트 생산 및 공급이 가능해짐.
- (2) RT-LAMP 키트 시제품 생산 및 공급
 - 1-3년차에 개발한 A형 인플루엔자바이러스(IAV) 공통 진단용 및 AIV H5 진단용 RT-LAMP 진단법dp 대하여 협력업체의 협조를 얻어 시제품을 제작하여 평가기관(검역본부)에 제공 완료(Table 31, Fig. 35).

Table 31. Product list of RT-LAMP kits for the rapid detection of influenza virus

| Kit | Method | Host | Target |
|----------------------------------|---------|--------|------------|
| Influenza virus common RT-LAMP | RT-LAMP | Animal | IAV common |
| Avian influenza virus H5 RT-LAMP | RT-LAMP | Avian | AIV H5 |



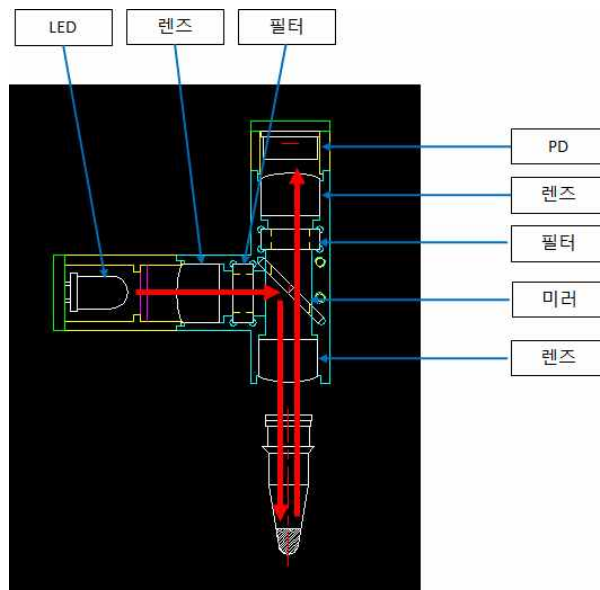
Fig. 35. Products of RT-LAMP kits for the rapid detection of influenza virus.

제 3절. 동물 인플루엔자 현장 진단을 위한 RT-PCR 분석 광학계 및 분석 SW개발

1. 광학계 설계 및 측정

가. 광학계 설계 방향

- 광학계 방식은 소형화 및 재현성 향상등을 위해 광원과 디텍터를 광학계 몸체에 부착하는 방식을 사용
- 광원으로는 LED, 디텍터로는 Photo diode(PD)를 사용함
- 광학계 몸체 내부에는 필터, 렌즈, 미러등이 포함되어 설계됨
- 광학계는 모터 및 벨트에 의해 well을 이동하면서 측정하는 방식
;동일한 광학계로 시료를 측정할 수 있어서 재현성이 좋으며, 광학계를 칼리브레이션 할 필요가 없음



< 광학계의 내부 구조, 명칭 및 측정과정 >

나. 광학계 측정 방법

- 광학계는 PCR튜브에 샘플을 넣고 PCR을 진행하면서 증폭되는 형광신호를 검출할 수 있도록 함.
- LED에서 나온 빛은 렌즈를 거쳐 집광되며, 필터를 거치며 필요한 파장만 필터링 하게 됨
- 필터를 지난 빛은 미러에 의해 반사되어 샘플에 조사
- 여기서 사용되는 미러는 dichroic mirror 로서 선택적으로 빛을 반사 혹은 투과 시키는 성질을 가지고 있음.
- 빛은 형광반응을 일으키게 되고, 형광에 의해 발생된 빛은 다시 미러와 필터를 거치고, 렌즈를 지나 PD에 도달하게 되며, 이것을 분석하여 결과를 분석 할 수 있음.



< 광학계 몸통 >

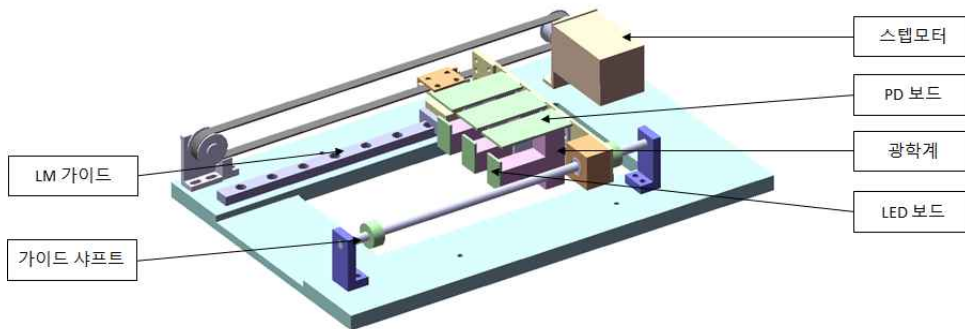


<광학계 몸통에 LED 보드와 PD 보드가 부착된 모습 >

2. PCR 광학 스테이지의 설계

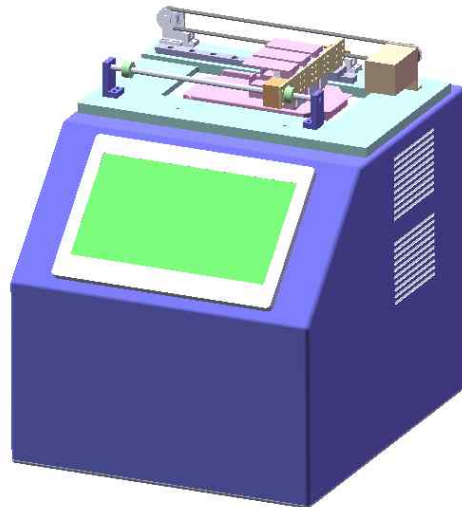
- 광학계 방식은 염가화 및 well 간의 재현성 향상등을 위해 광원과 디텍터를 광학계 몸체에 부착하는 방식을 적용
- 모든 검사 시료의 측정에 적용하기 위해서 광학계가 well 위치로 이동하여 측정할 수 있도록 스캔메카니즘을 적용함
- 모든 검사 시료를 동일한 광학계를 측정할 수 있기 때문에 well 간 편차를 줄이는 효과를 얻을 수 있음
- 광학계 및 스캔메카니즘의 기구부는 모듈식으로 제작되어 메인 바디에 결합할 수 있도록 함.

가. RT-PCR 용 광학 스테이지



< RT-PCR 광학 스테이지 모듈 및 명칭 >

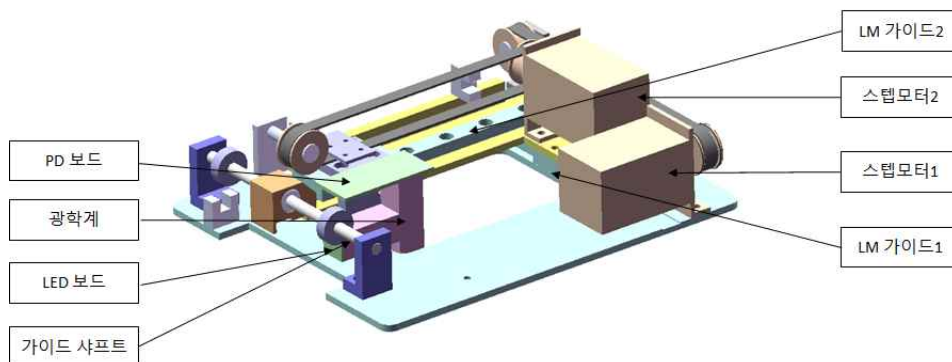
- RT-PCR 용 광학계 스테이지는 모듈은 3개의 광학계가 3열로 배열되어 3개 열의 well 을 동시에 측정할 수 있도록 함.
- 광학계는 3개가 하나의 브라켓에 조립되어 이동하면서 시료를 측정함.
- 광학계가 조립된 브라켓은 스텝모터에 연결된 벨트, 폴리에 의해서 LM 가이드를 따라 이동하는 방식
- LM 가이드의 반대편에는 가이드 샤프트를 적용하여 광학계 모듈이 수평으로 이동
- 양 쪽 끝에 스톱퍼를 설치하여 충격을 흡수하도록 함.
- 양쪽에 포토센서를 설치하여 광학계가 정확한 위치에서 시료를 측정 할 수 있도록 함



< RT-PCR 광학 스테이지 모듈이 메인 바디에 조립된 모습 >

- RT-PCR 광학 스테이지는 모듈형으로 제작되어 메인 바디에 조립
- 광학 스테이지는 측정하는 PCR 튜브의 상부에 위치
- PCR 튜브의 위쪽에서 광을 조사하여 시료의 형광을 측정
- PCR 튜브를 삽입 할 때는 광학계가 바깥쪽으로 이동하여 튜브의 삽입을 용이함

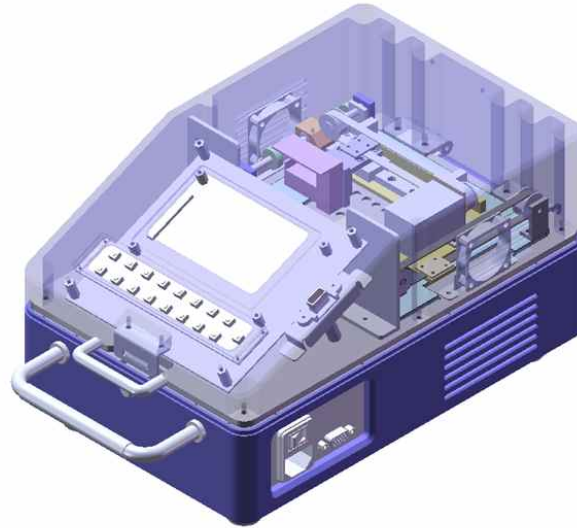
나. Lamp PCR 용 광학 스테이지



< Lamp PCR 광학 스테이지 모듈 및 명칭 >

- Lamp PCR 의 광학계 스테이지는 하나의 광학계를 이용하여 광학계를 X, Y 축으로 이동하며 2열의 시료를 측정할 수 있도록 설계
- 하나의 광학계는 2개의 스텝모터를 이용하여 X, Y 축으로 이동하며 시료를 측정
- 광학계는 스텝모터에 연결된 벨트, 풀리에 의해 LM 가이드를 따라 X축으로 이동
- 다른 스텝모터는 X축 이동 스테이지 전체와 벨트, 풀리로 연결되어 있으며 LM 가이드를 따라서 Y축으로 이동
- LM 가이드의 반대편에는 가이드 샤프트를 적용하여 광학계 모듈이 수평을 유지할 수 있도록 함
- 양 쪽 끝에 스톱퍼를 설치하여, 충격을 흡수 할 수 있도록 함
- X, Y 양축에 포토센서를 설치하여 광학계가 정확한 위치에서 시료를 측정
- 광학계는 X축을 따라서 이동하며 1열의 well 에 있는 시료를 측정하고, Y축으로 이동후

- 다시 X축을 따라서 이동하며 2열의 well 에 있는 시료를 측정하게 됨
- 2 x 8 개의 시료를 2차 형태로 이동하며 시료를 측정

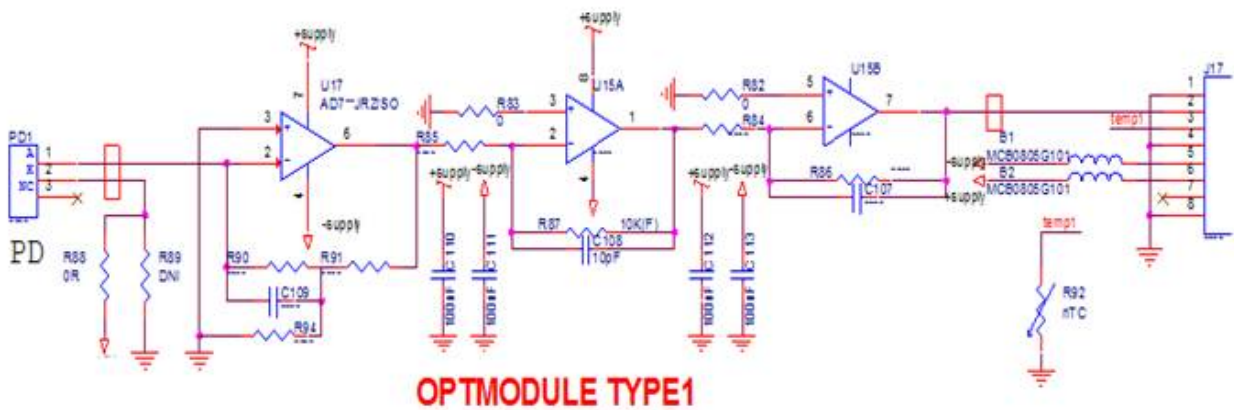


< Lamp PCR 광학 스테이지 모듈이 메인 바디에 조립된 모습 >

- RT-PCR 광학 스테이지는 모듈형으로 제작되어 메인 바디에 조립
- 광학 스테이지는 측정하는 PCR 튜브의 상부에 위치하며, PCR 튜브의 위쪽에서 광을 조사하여 시료의 형광을 측정함

3. 광학계 및 광학 스테이지 제어

가. 광 측정 및 증폭부



< 광 수신부(PD) 회로도 >

- 광모듈에서 조사된 LED 광에 반사된 시료의 형광량을 광학 필터를 통해 Photo Diode에서 수신
- 광신호는 매우 미약하기 때문에 광학 증폭부에서 OP AMP를 통해 신호를 증폭하고 증폭된 신호를 MCU에서 ADC를 통해 검출

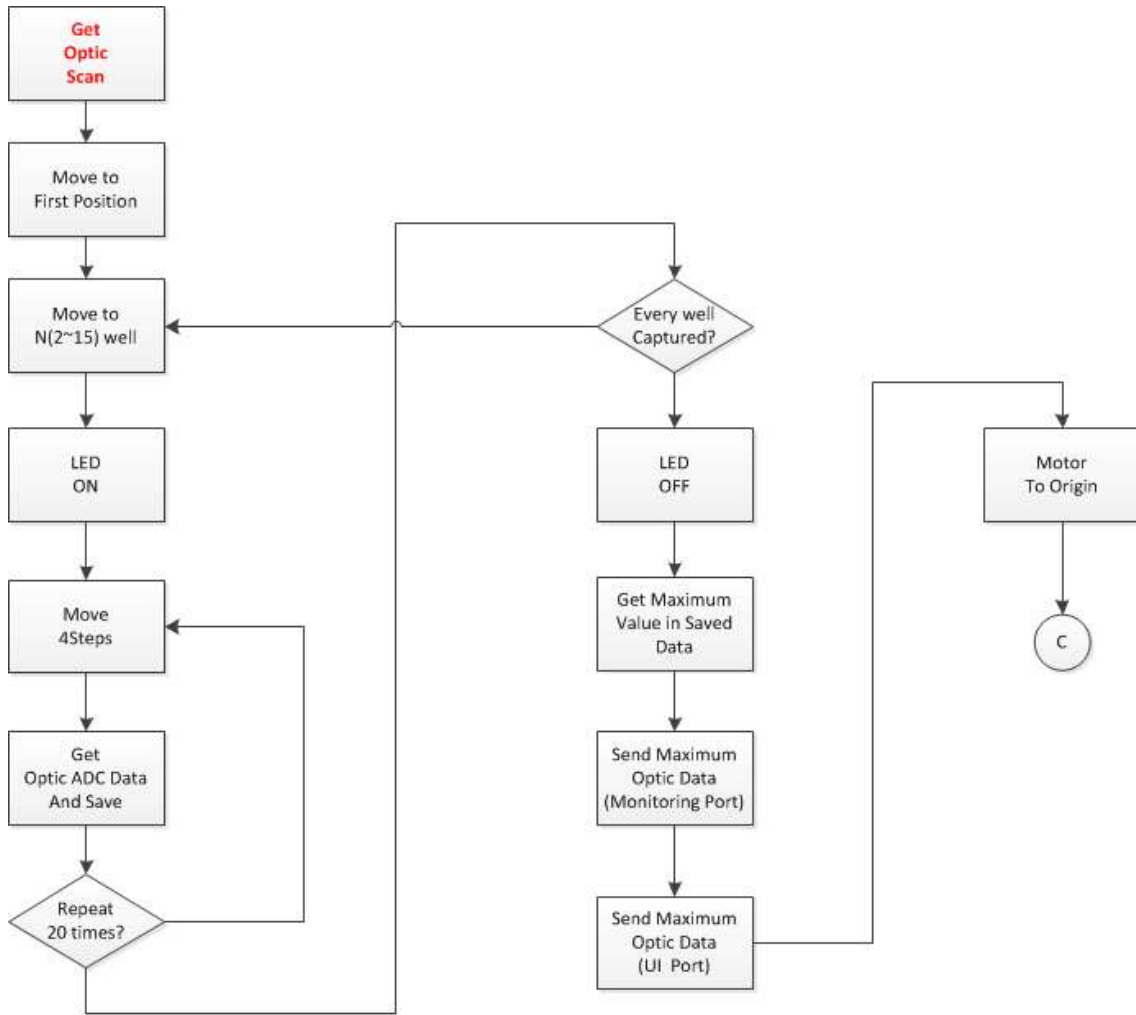
나. Motor Control

- 모터 구동 부는 고정되어 있는 시료에 모터가 이동하여 광학 신호를 검출하는 구조로 설계
- 1열 16개 Well의 중앙부에서 1개의 광학 부 모듈이 1개의 모터에 의해 좌우로 구동하며 시료의 형광을 측정하는 방식
- 모터는 정밀 제어에 적합한 스테핑 모터가 적용 되었으며 모터 컨트롤러는 TI에서 공급하는 DRV8825를 적용하여 32micro step으로 정밀하게 모터를 구동시킴
- 현재 적용된 제어 방법으로 1step당 0.0083mm 단위로 이동 거리를 제어함.
- 모터를 구동하는 기본 신호는 MCU에 내장된 PWM Controller를 사용하여 구현
- MCU 내부에서 PWM 주기를 조정하여 모터의 구동 속도를 제어
- PWM에서 Pulse 발생 시 인터럽트를 발생시켜 모터 구동을 위한 펄스 개수를 카운트하여 이동거리를 제한하는 방법으로 모터를 제어
- 모터의 정역 제어는 적용한 DRV8825에서 제공하는 신호 선을 제어함으로써 구현

다. 모터 구동 부 원점 검출

- 민감한 광학부의 정확한 제어를 위해 광학 부를 원점으로의 정확한 복귀력이 중요
- 장비 구동 시 매 사이클마다 광학 부를 원점으로 이동하여 측정의 기준 위치를 명확히 하였으며 이를 위해 전체 Well의 광학 스캔 후 원점 복귀 시 원점 Sensor 부근까지는 광학 부를 고속으로 이동 시킨 후 정확히 원점을 검출하기 위하여 광학 부 이동 속도를 저속으로 하여 광학 부를 모터 1스텝씩 이동하며 원점 위치로 이동되었는지 Sensor와 연동하여 체크하는 방법을 적용함
- 원점 Sensing을 고속으로 처리하기 위해서 MCU로 수신되는 Sensor 신호는 인터럽트로 처리하여 모터 이동 중에 Sensing이 되면 모터가 바로 멈추도록 함
- 모터 위치 검출 Sensor는 원점과 끝점 두 포인트를 검출 가능하도록 하드웨어가 설계 되어 있으며 매 사이클 마다 모터가 광학 스캔 후, 끝점까지 이동하고 그 때까지 모터를 구동하는데 입력된 모터 스텝 수를 구하고 다시 원점까지 이동 스텝 수를 검출하여 광학 부가 좌측으로 이동하고 다시 우측으로 이동 중에 발생하는 모터 스텝 오차를 판별 할 수 있도록 되어 있으며 실험 결과 전체 구역을 모두 스캔 하였을 때 최대 5스텝 미만의 오차 (약 0.04mm) 이내로 확인됨

라. 형광 데이터 취득 과정 flow-chart



< 형광 데이터 측정 Flow-chart >

마. 광량 측정 (ADC)

- 광학신호는 MCU 내부에 내장되어 있는 AD Converter를 통해 수치화
- 적용된 MCU는 Atmel社의 SAMA5 chip으로 내장 되어 있는 ADC는 12Bit (0~4095)분해능을 가지며 내장 ADC를 사용함.

<장점>

- * 형광을 검출하는데 12bit 분해능이면 무리가 없음.
- * MCU 외부에 별도의 ADC를 인터페이스 하여 사용하는 방법에 비하여 고속으로 신호 처리 가능.
- * 모터 이동 제어와 형광 신호 취득 과정에서 동기를 맞추는데 유리.
- * 별도 소자를 사용하지 않으므로 비용 절감

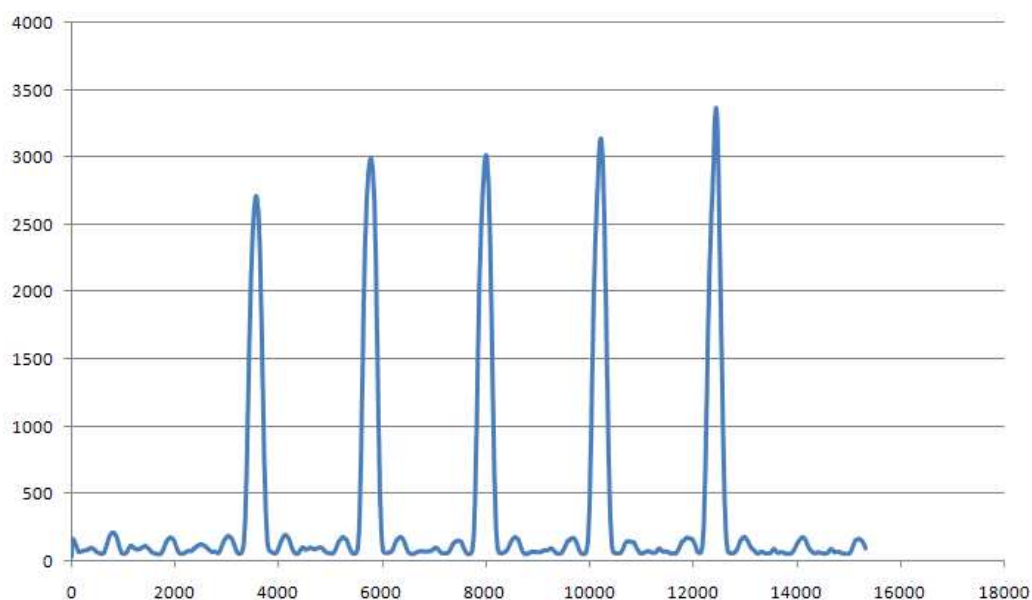
- 광 모듈은 하드웨어 파트에서의 노이즈 방지 대책 이외에 Firmware에서도 수신되는 광학신호에 대한 노이즈 대책으로 형광을 측정하는 때 point마다 32회 광학 값을 취득하여 그 평균값을 취하는 방법을 적용
- 신호 취득 과정에서 노이즈 성분이 혼입 될 수 있다는 가능성을 두고 취득된 32개의 광학 값에서 최대 수치와 최저 수치는 제외하고 나머지 30개의 측정값의 평균값을 해당 포인트의 형광 값으로 취함

- 실제 실험적으로 32회 정도의 샘플링 횟수가 속도나 측정 데이터의 안정성을 기준으로 선택함.
- 모터가 고속으로 이동하면서 형광 신호를 취득하고 처리해야 하므로 복잡하고 연산이 많이 필요한 알고리즘을 적용하는 것이 장비의 구동 속도에 영향을 주는 요인이 되므로 간단하면서도 일반적으로 많이 사용되고 있는 방법을 적용함
- 기구적인 오차에 의해 측정 포인트가 기기마다 약간씩 다를 수 있기 때문에 발생할 수 있는 광학 신호의 측정 편차를 보정하기 위하여 튜브의 중심 포인트에서 전후 40step씩 모두 80step의 사이에서 4step 단위로 광학 신호를 측정하여 저장하고 저장된 광학 신호의 배열에서 최대치를 취하는 방법을 적용



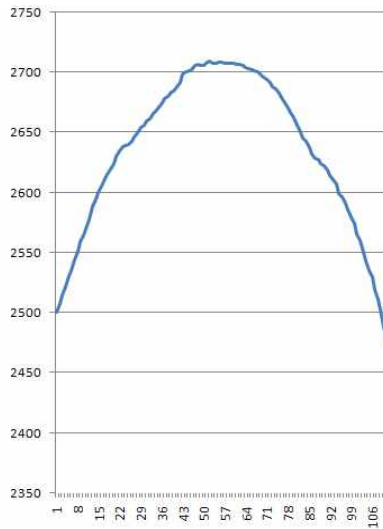
< 광학계의 튜브에 대한 측정 범위 >

- 형광 시료가 담긴 Well을 광학 모듈을 1step씩 이동 시키면서 취득한 광학 데이터를 확보
- 거의 등간격으로 Well center에서 최대 형광 값이 측정되었으며 이를 근거로 Well center 기준으로 좌우 80step 내에서 max값을 구해 측정값으로 함



< 시료의 광학 데이터 측정 그래프 >

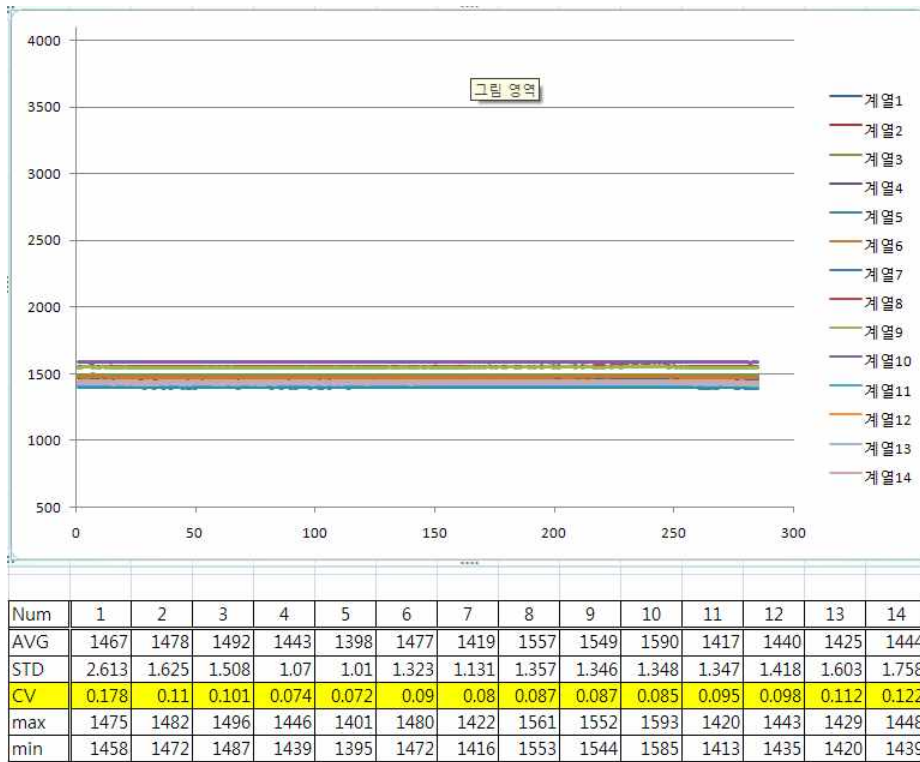
- 위의 그래프 최대 점을 확대한 것으로 형광 값의 max 값이 나타나는 지점에서 주변 포인트의 형광 취득 값의 분포를 확인



< 시료의 광학 데이터 측정 그래프(최대값 부근 확대) >

바. 모터 제어 및 광학부 안정성 검증

- 동일 형광 값을 가지는 시료가 담긴 14개 Well을 280회 반복하여 측정된 형광 값으로 확인함.
- ; 가로축은 측정 횟수를 나타내고 세로축은 측정된 형광 값을 나타냄
- 14개의 튜브에 담긴 시료의 형광 값이 1500 내외의 값으로 측정
- 반복 측정값이 반복적으로 측정 하여도 지속적으로 거의 일정한 값으로 측정됨
- 값의 편차는 형광 시료 자체의 편차, 형광 시료가 담긴 튜브가 가지는 두께 등에 의한 편차, 기구의 가공이나 조립 시 발생하는 오차에 의한 측정 위치 등에 의해서 발생할 수 있음
- 이 편차는 물리적으로 발생하는 편차로 소프트웨어적으로 후 보정후 취함
- 모터가 계속 이동하며 well의 center로 인식하여 취득한 광학 데이터의 나열이 지속적으로 일정한 값을 나타내는 것으로 볼 때 모터 제어와 광학 부 성능이 안정화됨



< 광학계의 동일 시료 측정 결과 >

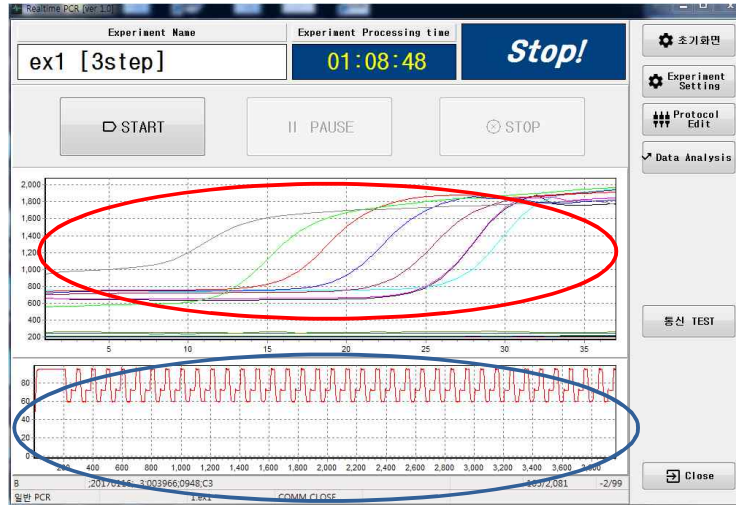
4. 광학부 테스트

가. 실험방법

- 시료는 한국 필코리아사의 SYBR Green buffer와 NEB사의 DNA는 E.coli 유래의 Lamda DNA-HindIII를 사용하였으며, Primer는 Forward : 5'-catccagcagttccagcacaatc -3' Reverse : 5'- agcggcagagcaggcaatg-3'를 10pmol/uL 용량으로 사용
- 형광 dye는 intercalating SYBR Green을 사용하였으며 DEPC DW로 20uL volume을 맞추어 200uL PCR 스트립 튜브에서 반응시켜 3step(95-72-60°C)방식으로 테스트함.
- Cycle은 Pre-heating 95°C(3분)-[Denature 95°C 20초-Anealing 60°C 20초 -Extension 72°C 30초], [] 의 cycle을 40 회 돌려서 반응시켰으며 온도상승 ramp rate는 3.4°C/sec, 온도하강 ramp rate는 4.0°C/sec 설정
- DNA는 2uL, Primer F/R 각 1uL, 2X SYBR Buffer 10uL, DW 6uL 이렇게 섞어서 working volume 20uL/well 로 반응
- 광학계 reading point는 Extension 구간 30초 후단 25초구간에서 scan하여 ADC 수치를 나타내었고 실시간으로 증폭 곡선과 온도 Profile을 모니터링 하도록 함.
- 실시간으로 증폭 그래프 곡선을 확인된 것을 아래와 같이 알 수 있으며, Ct와 Rn 값을 리포트 데이터에 나타냄

나. 증폭 테스트 결과

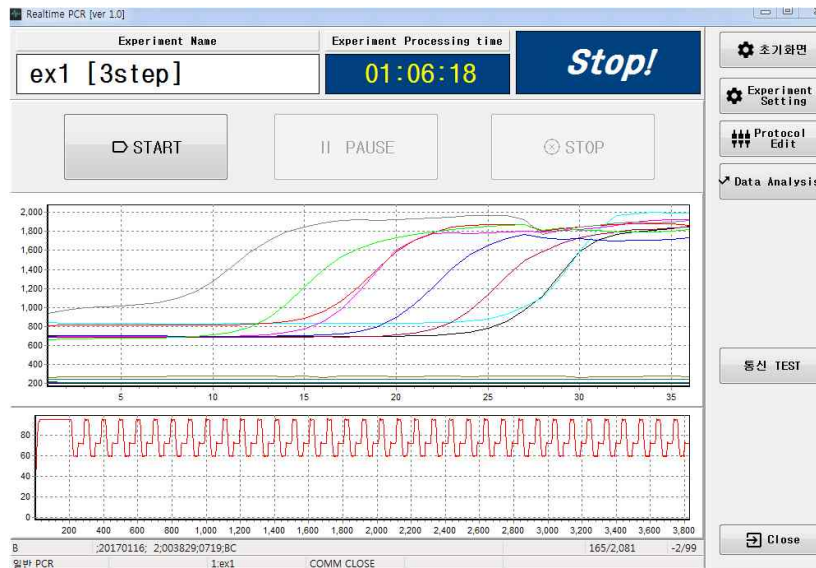
<테스트 I>



< 테스트 I; E.coli Lamda NDA-Hind III의 증폭결과 화면
(증폭 그래프-붉은색 원안, 온도 프로파일-푸른색 원안) >

- 위의 결과와 같이 Lamda DNA의 10^8 copy부터 10^1 copy까지 10fold 희석분의 serial dilution의 8개 샘플을 로딩하여 반응하였을 때, Ct value 7.4부터 약 3.0 cycle 간격으로 나타나짐을 볼 수 있는데 저농도에서는 농도별 증폭곡선의 간격이 조금 좁아지는 경향을 보임

<테스트 II>



< 테스트 II 증폭결과 화면>

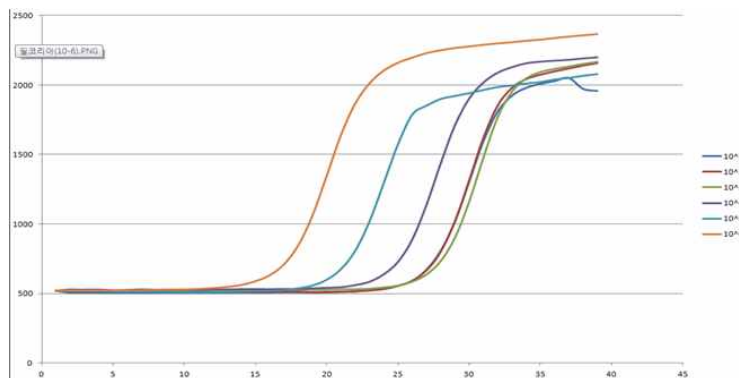
- 위의 결과는 A보다 증폭곡선이 중간 농도에서 겹치기도 하였는데 이는 실험자의 희석 오류라던가 개인오차에 의한 것으로 생각되며 광학계 성능에는 별 무리가 없는 것으로 판단, A, B 실험 모두 농도별 증폭곡선의 판별에 광학계는 전혀 무리가 없는 것으로 사료됨

- 실험실 온도 조건은 실험실(사무실)조건에서 Room temperature로 진행되었으며 온도 Profile은 유지구간 (Steady state) $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 로 진행함

다. 광학부 테스트 (타사시약 테스트)

(1) 필코리아시약

- 상기 조건과 같이 cycle은 Pre-heating 95도 3분, 60도 20초, 72도 30초 95도 20초이며 total cycle 횟수는 44 cycle이다. DNA는 Lamda-DNA Hind III 이며 primer는 Forward : 5'- catccagcagttccagcacaatc -3' Reverse : 5'- agcggcagagcaggcaatg-3' 를 10pmole/uL로 사용하였다.

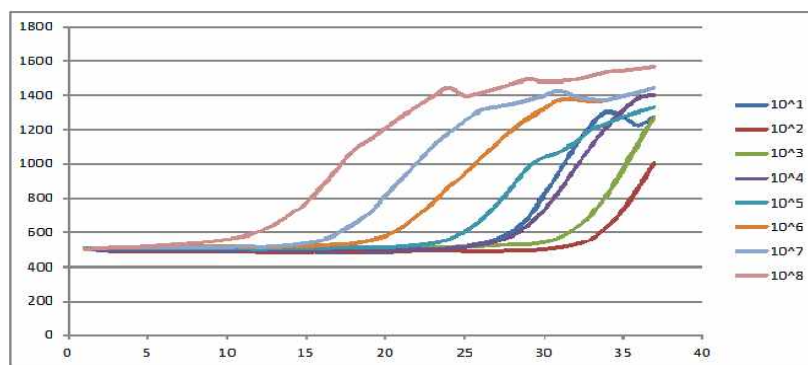


<필코리아시약 증폭 그래프>

- 결과 분석은 10^3 과 10^2 copy 농도의 DNA가 겹쳐졌으며 이는 HindIII로 잘린 단편 DNA가 잘 희석상태가 좋지 않은듯 하다. ADC 광학부 수치가 비교적 안정적으로 나옴.(Rn값)

(2) 필코리아 DNA, primer + solgent Dye bf.

- 위 1번의 DNA와 primer sequence는 동일하고 형광 Dye bf(Master Mix)를 Solgent 사의 SYBR Green dye를 사용하였다. 온도조건 및 cycle 시간은 1번고 동일하다.



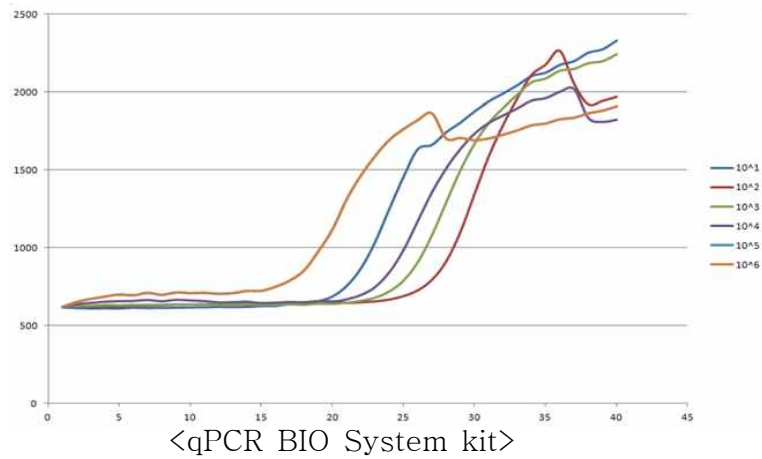
<Solgent 사의 SYBR Green mastermix>

- 결과는 Serial로 농도별 증폭이 나왔으며 10^2 copy까지 증폭이 확인되었고 10^1 은 조금 튀었다고 볼 수 있다. 형광세기 ADC 값은 필코리아시약보다 조금 낮다.

(3) qPCR BIO System

- 필코리아 사가 취급하는 Master mix standard kit로서 qPCR BIO System 사의 키트

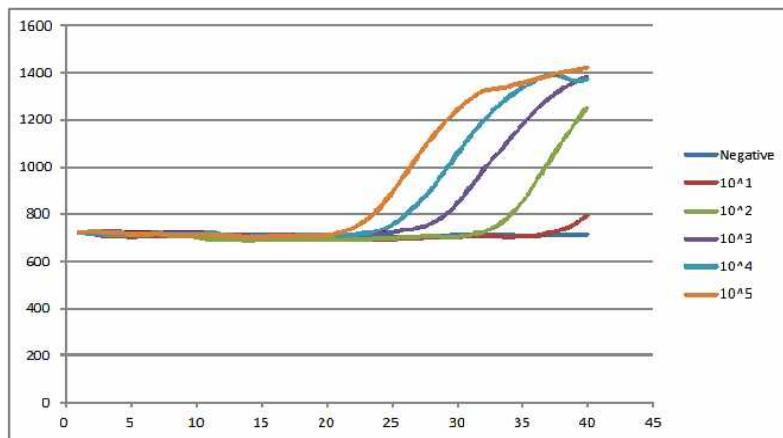
를 사용하였다. (사용 DNA 와 Primer는 confidential 이라고 함.) DNA농도는 10^6 copy부터 10^1 까지 희석이 되어있으며 일반 실험실 내부 QC 용으로 사용하는 pannel 이다. 온도조건은 Pre-heating 95도 2분, 60도, 95도 각 10초 - 40cycle 이다.



- 위의 결과로 10^6 에서 10^2 copy 까지 serial로 증폭그래프가 잘 나왔고 형광증폭 값도 양호한 편이다.

(4) O157 (코젠바이오텍)

- 식중독 균 검사 kit로 코젠바이오텍에서 출시한 제품이다. 검사 스텝은 Pre-heating 10분, 95도 15초 60도 1분의 40cycle이며 Primer는 코젠바이오텍 사의 kit 내부용을 사용하였다.



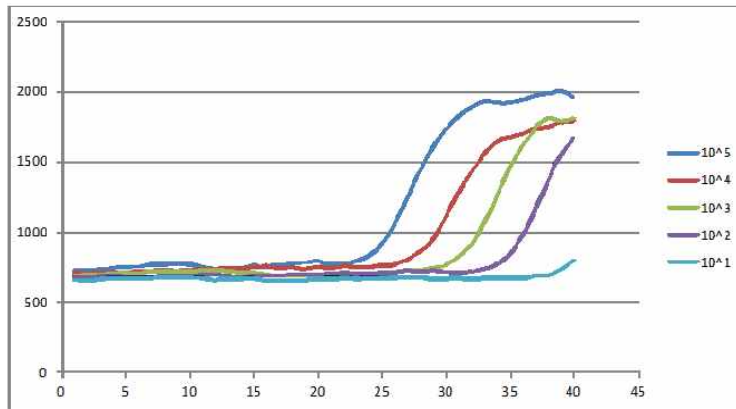
<코젠바이오텍 O157>

- kit 내부 매뉴얼상에 cycle 33 안에까지 증폭이 확인 된 것에대해 Positive 처리를 하는데 본 실험에서는 10^2 copy 양성까지가 33cycle 안에 들어왔다. 증폭 ADC 수치는 양호한편이고 positive 원액은 10^5 copy 의 농도로 맞추어져 있다.

(5) Listeria (코젠바이오텍)

- 식중독균 검사 키트의 또다른 하나로 코젠바이오텍의 제품을 사용하였다. 검사조건은 Pre-heating 95도 10분, 95도 15초, 60도 1분의 40cycle로 원액 DNA의 copy 농도는

10⁵이며 33cycle 안에서 나타나는 증폭 cycle ct 값으로 양성을 판별한다.

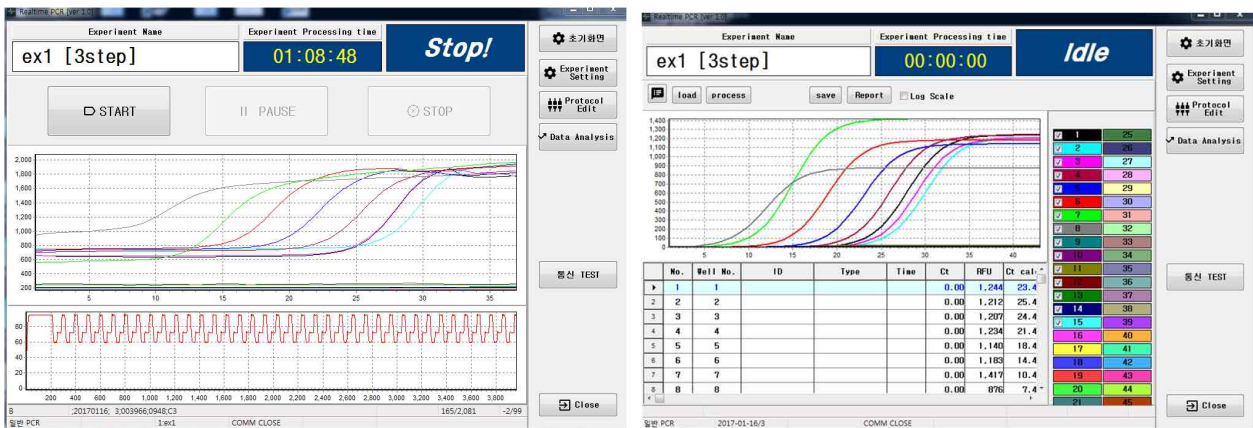


<Listeria 코젠바이오텍 >

- 위의 결과로 광학계 ADC 신호는 600에서 2,000 정도로 양호하게 나타났으며 증폭 cycle 이 serial dilution 되어진 DNA 샘플대로 대략 3.3 cycle 마다 타나남을 알 수 있다.

라. Ct, RFU report

- UI의 계산 프로그램으로 위의 테스트 결과 data를 loading 하여 Report 데이터를 process 하면 아래와 같은 실험 증폭 그래프를 통하여 Ct, RFU 수치가 계산할 수 있음
- 그림은 아래에 나타내었는데 Report 화면은 결과 그래프를 Loading 하여 Analysis process를 거쳐서 User가 직접 뽑아 낼 수 있도록 UI가 설계됨



< 증폭그래프(좌측) 및 이를 분석한 RFU(Rn), Ct value report(우측)

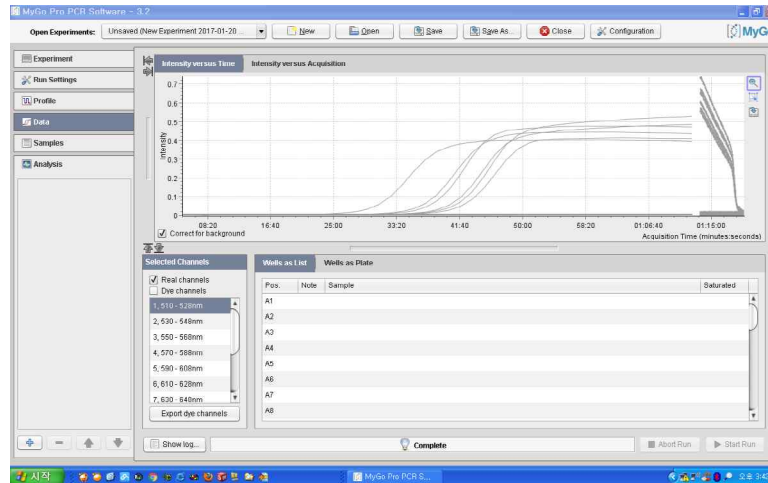
- 본과제 Peltier base의 Real time PCR 광학계 성능은 위에서 나온 결과와 같이 PCR 증폭 정도에 따라,(농도별 DNA 증폭곡선) UI program 을 통하여 Normalizing 되어 나온 RFU 수치(Rn)수치가 비교적 일정하고 재현성 및 안정성이 확보됨
- RFU는 기기 광학계 설정이 자체 광학계 12bit 를 사용하여 Range가 0~4095까지인데 위의 실험 데이터는 800~1250까지에 비교적 균일하게 분포됨

마. 비교장비 실험테스트

- 본 실험 장비와 견주어 Reference 장비로 Roche 사의 MyGo Pro를 사용하여 비교테스

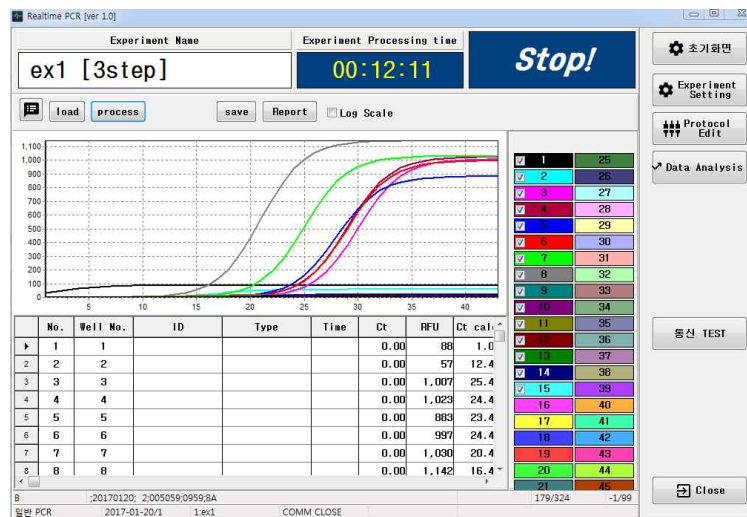
트를 실시함.

- 실험조건은 상기 테스트 A,B 와 같으며 샘플은 $10^6 \sim 10^1$ 을 사용



< MyGO Pro를 이용한 PCR 증폭 그래프 >

- 위와같이 MyGO Pro의 결과는 증폭 그래프 shape이 나왔고 10^6 DNA (Lamda DNA-Hind III)가 Ct값 16.2에서 Analysis분석을 통해서 나타났으며 아래의 개발한 S/W 및 시스템을 이용한 결과는 Ct 값 16.4에서 10^6 DNA가 얻어짐.



< 본 과제 개발기기를 이용한 PCR 증폭 그래프 >

- 그래프 패턴은 서로 크게 상이하지 않으며 증폭곡선이 불 균일성은 실험자의 오차로 판단됨

바. LOD

- 상기 (1)의 실험데이터 A,B에서 DNA의 희석전 원액 농도는 500ng/mL 이고(NEB사의 Lamda NDA-Hind III) copy수 10^8 희석분부터 10^1 희석분 까지 8개의 샘플을 Loading 하여 cycle 반응을 돌린 것을 광학계로 측정하였을 때 위와 같이 증폭그래프와 Ct value 를 볼때 1시간 10분 내에 반응 (40 cycle) 이내에 10^8 copy가 11.1ng

이며 10^1 copy는 1.11 fg(Femto) 까지가 Limit of detection 으로 나타남

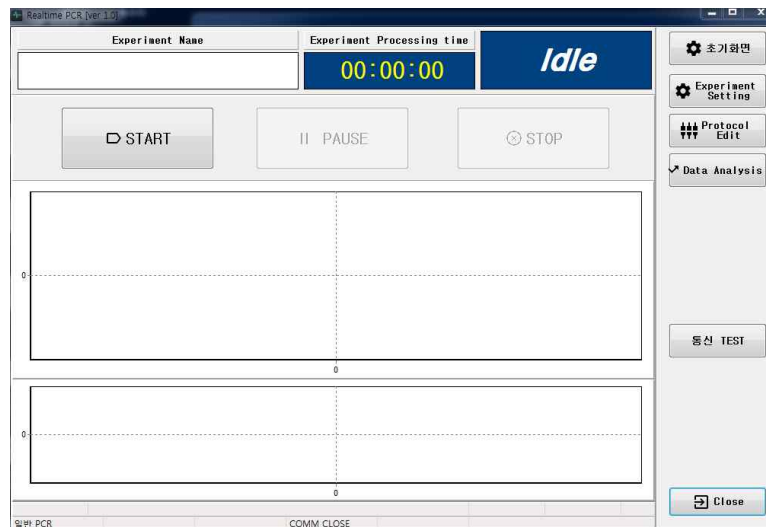
<희석방법 및 계산>

- ① DNA 원액 500ug/mL 을 89uL의 DW에 1uL를 넣어 희석하면 PhileKorea 사 추천 10^8 copy 임.
- ② 10^8 copy부터 10^1 copy 까지 8단계 희석 (DNA 샘플 8개)
- ③ 10^8 copy reaction DNA vol. (2uL)
- ④ 10^8 copy = 11.1 ng, 10^5 copy = 1.11 pg
- ⑤ 10^1 copy = 1.11 (fg/40cycle)

- 위의 테스트 결과 및 상기 계산 방법으로 볼때 결론적으로 본 광학기의 유전자 증폭 최소검출 감도는 Lamda DNA의 경우에 약 1.11 (fg/40cycle ; 10^{-15}) 이 됨

5. User Interface 개발

가. 초기화면

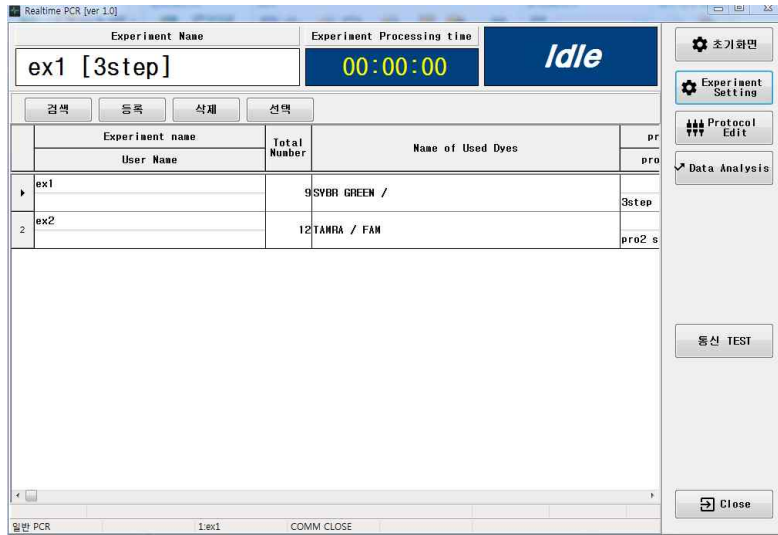


< 초기화면 >

- Real time PCR은 먼저 반응하고자하는 DNA + Enzyme buffer + Primer 의 mixture 를 제조 후 온도 설정과 Cycle 설정에 의해서 반응이 시작되는 실험 기법
- 위에 보는 바와 같이 초기 화면에 반응중 그래프의 증폭정도를 실시간으로 볼 수 있는 창과(상단), 온도 변화의 Profile을 확인할 수 있는 온도 Profile 창으로 구성
- 이는 실시간으로 반응이 되었을때 증폭곡선과 온도 프로파일을 실시간으로 확인할 수 있는 장점이 있음
- 우측편에 메뉴를 만들어서 실험 Setting 과 Protocol Edit 화면을 선택할 수 있는 탭이 있고, 반응 종료 후 Ct, Rn 값을 계산할 수 있는 DATA Analysis 탭이 구성됨
- 상단에는 Setting 되어진 실험명이 확인되는 Experiment Name 창이 있고 그 바로 우측에 실험시간을 실시간으로 누적하여 볼 수있는 Elaps time 창, 그리고 그 우측에 장비의 상태, 즉 실험중, 대기, 정지(Running, Idle, Stop)의 상태를 나타내는 창으로 구성

나. Experiment Setting 화면

(1) 초기 화면



< Experiment setting 초기 화면 >

- 위와 같이 Experiment 첫 화면에서는 실험의 이름과 사용 시약(형광 Dye)의 종류선택을 할 수 있게 되어 있고 목록 등록 및 검색, 삭제선택이 가능하게 되어져 있음.

(2) Experiment 설정 화면



< Experiment 설정 화면 >

- 위와 같이 Experiment 수정화면은 각 반응 well에 ID와 형광다이사용(2channel이상)을 표시하게 되며 실험명 및 Protocol, well 수등을 표시하게 되어져 있다.

다. Protocol Edit 화면

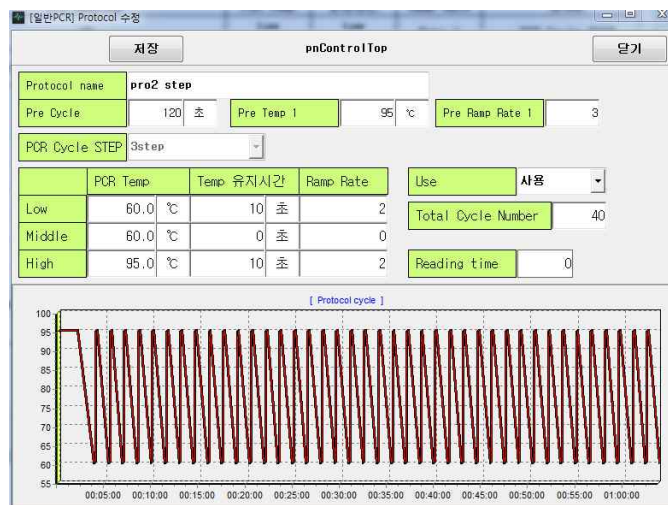
(1) 초기 화면



< Protocol Edit 초기 화면 >

- 위의 그림은 Protocol Edit의 첫 화면으로서 각각 누적 실험의 실험조건 Edit, 검색, 등록, 삭제가 가능하며 간단한 PCR 조건과 종류를 나타냄

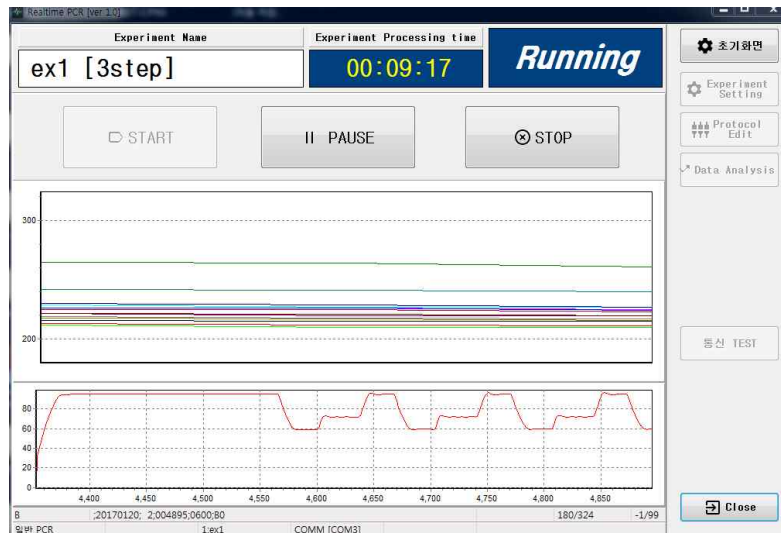
(2) Edit 화면



< Protocol Edit 화면 >

- 위와 같이 Protocol 즉, Real time PCR에서 온도조건 및 Cycle 조건, Pre heating조건 등을 입력하는 Edit창이 있어야 하는데 이는 사용자 편의로 최대한 간단하고 실용적으로 디자인 함.
- 각 탭의 창에 마우스 클릭을 하여 키보드 입력으로 입력 동작되며,(향후에는 Touch Screen으로 자사제품을 개발 완료할 계획임) 먼저 Protocol Name을 입력 정의 하며 그 이하로 Pre cycle(Pre-heating), Temp, Ramp rate 등을 설정
- cycle 반응의 종류를 선택하는데 (2step 인지, 3step인지구분) 자체 카테고리로 설정
- 마지막으로 온도조건과 유지시간 Ramp rate를 입력하는 창이 하단에 있고 그 바로 우측에 Total cycle 수치를 입력

라. Running 화면



< Running 화면 >

- 위와 같이 Running 화면에 실험명(Experiment Name)과 Elaps Time, 그리고 우측에 Running 이란 State를 확인할 수 있음
- 밑에 실험중 활성화 되어져있는 Start, Pause, Stop 아이콘이 있고 바로 밑에 증폭그래프 곡선이 생성됨(그림상에는 초기cycle곡선이라 반응높이변화가 없음).
- 마지막으로 우측에 설정탭 아이콘은 실험중에 비활성화가 되며 하단에 온도 Profile 곡선이 나타내어짐
- 각각 창은 RFU를 알 수 있는 수치와, 온도의 수치가 Y축에 나타남
- 창 맨 하단에 실시간 온도의 수치가 실시간 data로 뜨는데 이는 실시간 변화되는 온도 Profile임.

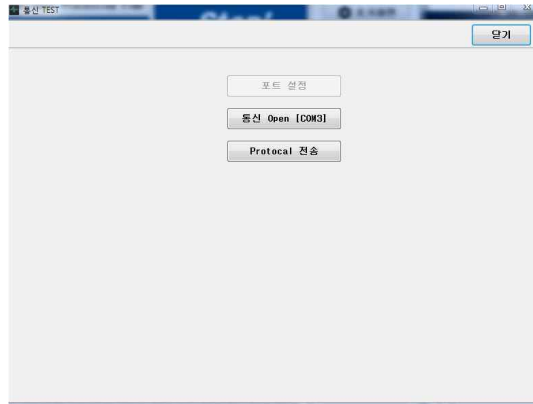
마. DATA Analysis 화면



< Data Analysis 화면 >

- 실험반응이 끝나면(Running이 끝나면) 위와같이 데이터를 볼 수 있는 창이 초기화면우측에 있는 Data Analysis 탭아이콘을 누르면 뜨게 되는데 날짜별 Record 되어져있는 화면에 실험 data를 찾아서 data를 loading 하여 위와 같은 결과 그래프와 수치를 얻을 수 있음
- 먼저 위에 있는 그래프는 실험이 끝난 그래프를 Normalizing 하여 Ct 와 Rn(RFU)를 볼 수 있게 그래프 형식으로 나타내어지는 창이며, 그 아래에 Sample Name과 농도 그리고 계산된 Ct값과 Rn(RFU) 값을 나타냄
- 마지막으로 우측측면에 Sample 색깔별 선택을 하여 보고싶은 Sample만을 볼 수 있음

바. 통신포트 설정화면

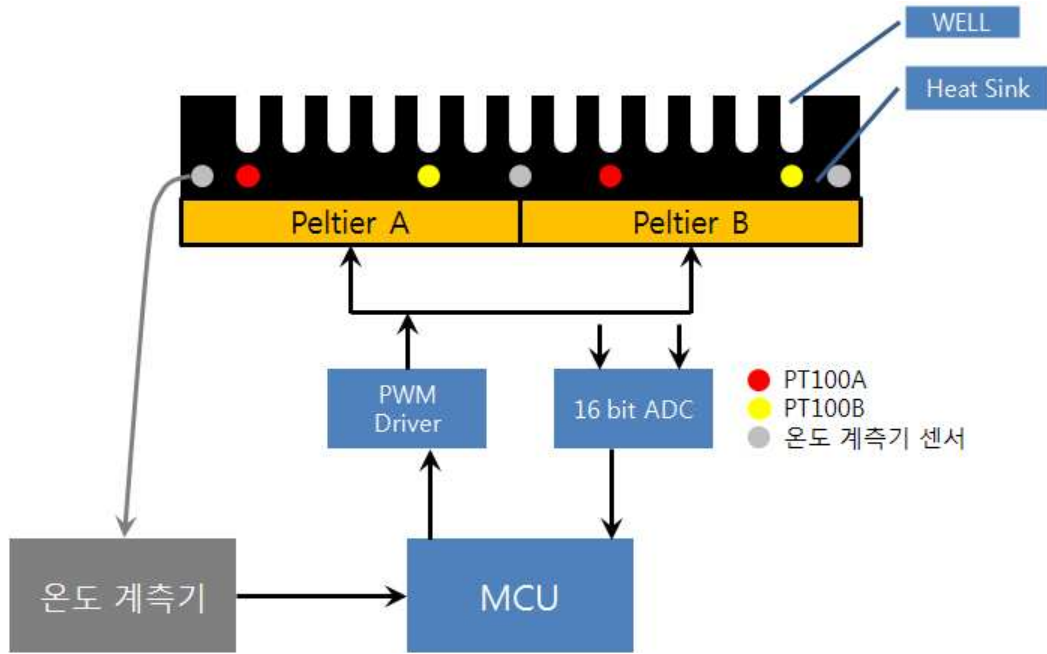


< 통신포트 설정화면 >

- 위와 같이 PCR 장비와 PC를 연결해주는 RS232 통신포트를 설정하여 주는 창으로 통신포트를 선택하여 확인을 누르면 포트가 설정됨

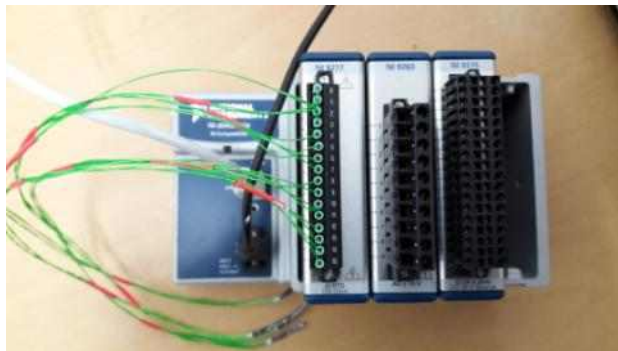
6. 온도 칼리브레이션

가. Heating부 구조 및 calibration



< 온도 칼리브레이션 모식도 >

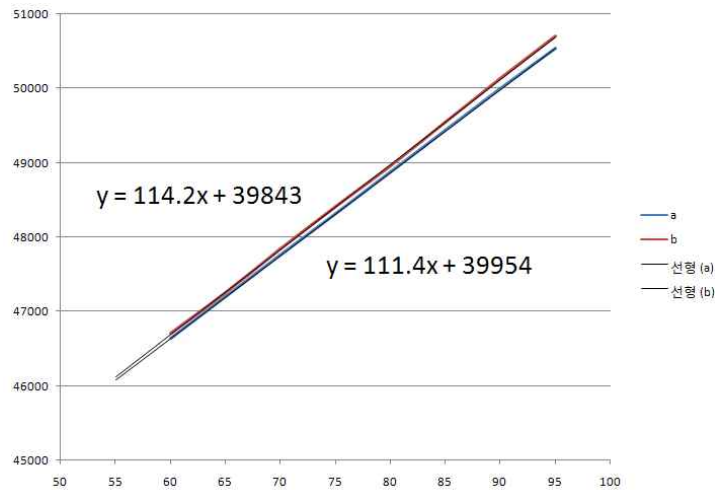
- 장비에 적용된 Peltier 소자 개수는 모두 4개로 2개씩 pair로 처리하여 중앙부와 가장자리에 2개씩 배치
- 구조상 중앙부와 가장자리의 온도 편차가 발생하므로 각각의 부분에 온도 제어량을 달리해야 시약에 전달되는 열이 전체적으로 균일하게 제어할 수 있음
- Peltier 소자 개별적으로 가지는 특성의 편차와 적용된 온도 센서(PT-100)가 가지는 개별 온도 특성편차는 제어되는 온도에 영향을 주는 원인
- Peltier 소자는 제어량을 달리 함으로써 특성 편차를 줄일 수 있으며 기본적으로 적용되는 온도 센서가 해당 온도에서 정확한 값을 취득할 수 있어야 함
- 이를 위하여 온도 센서의 calibration을 적용함



<온도 칼리브레이션시 사용한 계측기(좌:Fluke 열전상 온도계, 우:NI 9217 온도 측정 모듈)>

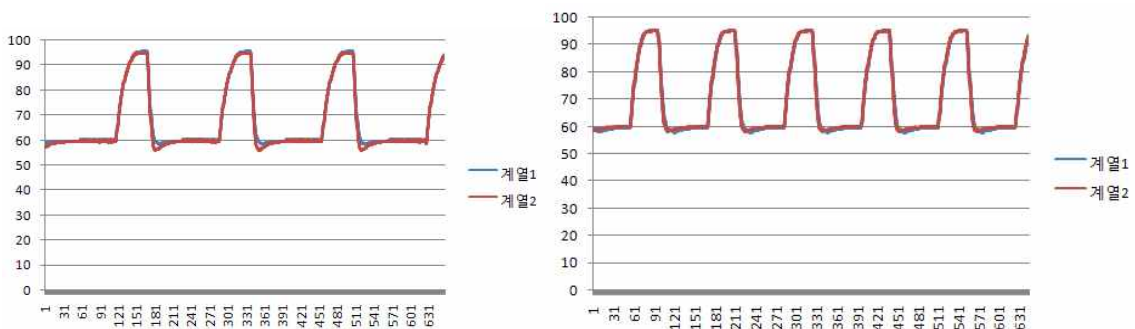
나. 온도 칼리브레이션

- 제어 온도와 실제 온도 및 PT100을 통해 입력받은 온도 값의 신뢰성을 확보하여 Peltier 제어 온도의 정확성과 균일성을 향상시킴
- PWM 값 설정 (실험에 의해 실측 온도를 기준으로 하여 PWM 상수 값 설정) 하고 온도를 실측 하여 이 때 PT-100의 온도 값을 MCU의 16 bit ADC를 통해 얻음
- 60도~95도의 범위를 5도 간격으로 측정하여 raw data 구축 하고 실험 진행 시 PWM 값 지정 후 온도 변화가 없이 일정한 온도를 유지할 때 PT100을 통한 ADC값을 구함
- 최소 10초 이상 PT100에서 값을 입력받고, 이들 값의 평균을 raw data에 기록 하고 이 절차를 수행하기 위한 기능은 별도의 F/W로 구현하였으며 이를 PC S/W에서 제어
- 입력받은 PT100 값의 실제 온도로의 치환은 1차 함수를 통하여 구함
- PT100 센서는 온도에 대한 저항 값이 선형성을 가지므로 별도의 변환 테이블은 필요없음



< 온도 칼리브레이션에 의한 온도 센서 보정곡선 >

- 위의 그래프는 상기에서 명시한 순서에 의하여 온도 calibration을 통해 얻어진 온도 센서 보정식으로, 온도 센서가 가지는 편차를 위의 수식을 통하여 감소시킴
- 온도 센서 보정을 통하여 아래와 같이 개선 효과를 얻음



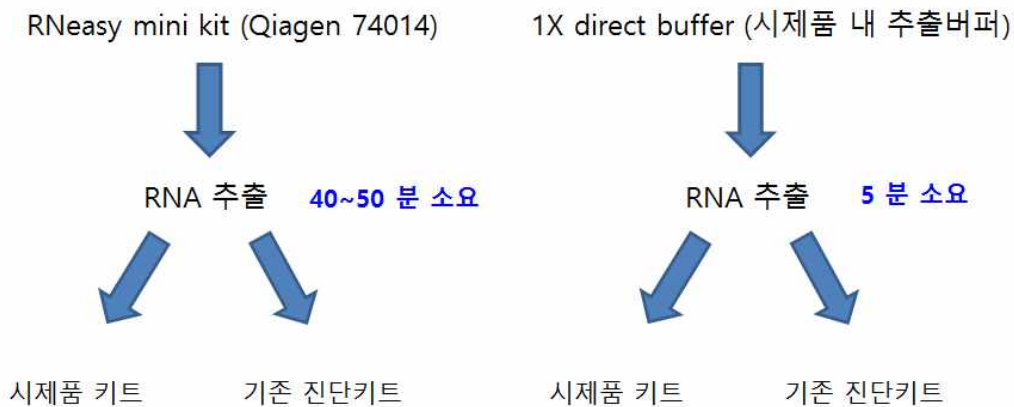
< 온도 칼리브레이션을 통한 개선 효과 (좌:온도보정 적용전. 우:온도보정 적용 후) >

제 4절. 현장에서 적용 가능한 인플루엔자 진단 키트 및 휴대용 기기의 유효성 평가

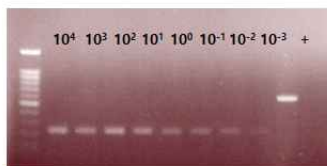
1. 개발된 Direct RT-PCR 및 real-time RT-PCR키트에 대한 비교 평가

가. Direct conventional RT-PCR키트에 대한 시험

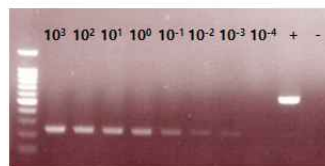
- 평가를 위해 기존의 시험법과 개발된 키트를 이용하여 동시에 평가 실시
- 표준주인 PR8 및 조류인플루엔자(IAV) 1종 선정
- 기존 시험법: RNA를 추출하는 키트를 이용하여 RNA 추출, 기존의 RT-PCR 실시
- direct conventional RT-PCR: 1x direct buffer와 섞은 후(상온) 5분 후 RT-PCR 실시
- Direct buffer를 이용하여 핵산을 추출하는 데 소요되는 시간이 기존에 비해 1/10로 단축
- 1x direct buffer로 추출한 핵산이 일반 RT-PCR system으로의 적용이 가능한지 확인을 위해 direct buffer를 섞어서 추출한 RNA를 이용하여 기존 진단키트에 적용
 - : 1x direct buffer를 이용하여 핵산을 추출한 그룹에서 타겟 유전자의 증폭이 잘 되는 것을 확인
- 또한 개발된 키트를 이용해본 결과, 표준주 및 조류인플루엔자 모두 적용 가능함을 확인



SIV M RT-PCR (M 유전자 타겟), RNA extraction using the QIAGEN RNeasy mini kit

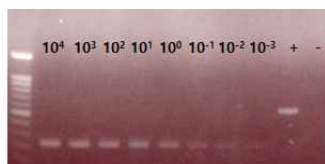


A/Puerto Rico/8/34 H1N1 (7×10^5 TCID₅₀)
Limit of detection : 10^{-3} TCID₅₀

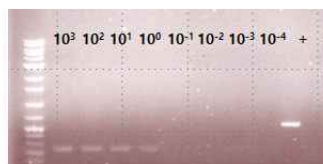


A/duck/KR/U11-1/2007 H1N2 (1×10^4 TCID₅₀)
Limit of detection : 10^{-3} TCID₅₀

SIV M RT-PCR (M 유전자 타겟), RNA extraction using the direct 1x buffer

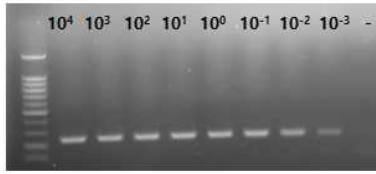


A/Puerto Rico/8/34 H1N1 (7×10^5 TCID₅₀)
Limit of detection : 10^{-3} TCID₅₀

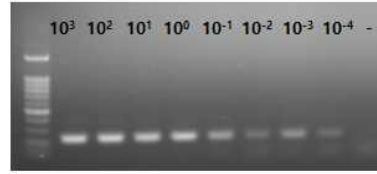


A/duck/KR/U11-1/2007 H1N2 (1×10^4 TCID₅₀)
Limit of detection : 10^0 TCID₅₀

NANO HELIX direct RT-PCR kit, RNA extraction using the QIAGEN RNeasy mini kit

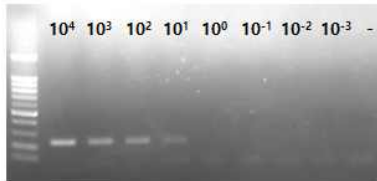


A/Puerto Rico/8/34 H1N1 (7×10^5 TCID₅₀)
Limit of detection : 10^{-3} TCID₅₀

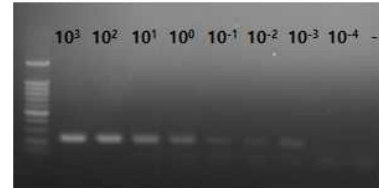


A/duck/KR/U11-1/2007 H1N2 (1×10^4 TCID₅₀)
Limit of detection : 10^{-4} TCID₅₀

NANO HELIX direct RT-PCR kit, RNA extraction using the direct 1x buffer



A/Puerto Rico/8/34 H1N1 (7×10^5 TCID₅₀)
Limit of detection : 10^{-1} TCID₅₀



A/duck/KR/U11-1/2007 H1N2 (1×10^4 TCID₅₀)
Limit of detection : 10^{-3} TCID₅₀

- 6회의 반복실험을 실시한 결과, 검출한계 및 반복시험 결과에 큰 차이 없이 증폭

| | RNA ext. kit | RT-PCR | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | AVR | SD | CV |
|---|---------------|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------|------|
| 표준주 (7×10^5 TCID ₅₀) | Rneasy | M common | 7.E-03 | 7.E-03 | 7.E-03 | 7.E-03 | 7.E-03 | 7.E-03 | 7.E-03 | 0.00 | 0.00 |
| | Rneasy | Nanohelix kit | 7.E-01 | 7.E-03 | 7.E-03 | 7.E-03 | 7.E-03 | 7.E-03 | 1.E-01 | 0.28 | 2.31 |
| | Direct buffer | M common | 7.E-03 | 7.E-01 | 7.E-01 | 7.E-01 | 7.E-02 | 7.E-02 | 4.E-01 | 0.36 | 0.95 |
| | Direct buffer | Nanohelix kit | 7.E-02 | 7.E-01 | 7.E-01 | 7.E-01 | 7.E-01 | 7.E-01 | 6.E-01 | 0.26 | 0.43 |
| AIV (1×10^4 TCID ₅₀) | Rneasy | M common | 1.E-03 | 1.E-03 | 1.E-03 | 1.E-04 | 1.E-04 | 1.E-04 | 6.E-04 | 0.00 | 0.90 |
| | Rneasy | Nanohelix kit | 1.E-01 | 1.E-04 | 1.E-04 | 1.E-03 | 1.E-04 | 1.E-04 | 2.E-02 | 0.04 | 2.41 |
| | Direct buffer | M common | 1.E+00 | 1.E+00 | 1.E-01 | 1.E+00 | 1.E-01 | 1.E-01 | 6.E-01 | 0.49 | 0.90 |
| | Direct buffer | Nanohelix kit | 1.E+00 | 1.E+00 | 1.E-03 | 1.E-02 | 1.E+00 | 1.E-01 | 5.E-01 | 0.53 | 1.02 |

SD; Standard deviation, CV: Coefficient of Variation

- 야외시료로의 적용 가능성을 확인하기 위해 IAV 음성 비증시료에 바이러스 희석 후 시험 :음성 비증시료에 적용해 본 결과 PBS 희석한 그룹의 결과와 큰 차이 없이 검출됨을 확인

표준주
(7×10^5 TCID₅₀)

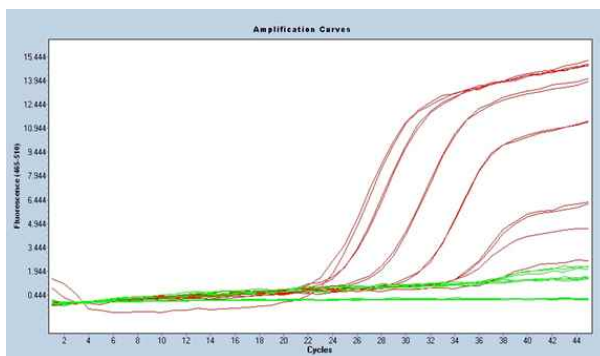
| RNA ext. kit | RT-PCR | Results |
|---------------|---------------|---------|
| Rneasy | M common | 7.E-03 |
| Direct buffer | Nanohelix kit | 7.E-01 |

조류인플루엔자
(1×10^4 TCID₅₀)

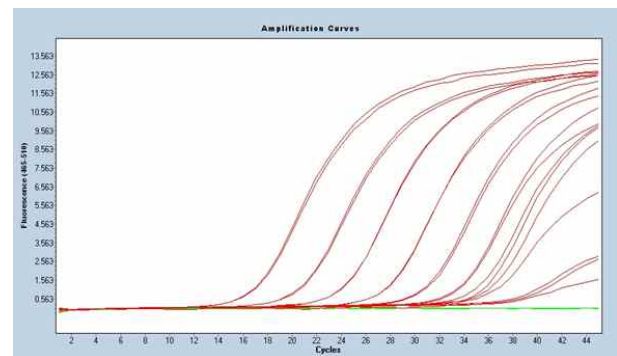
| RNA ext. kit | RT-PCR | Results |
|---------------|---------------|---------|
| Rneasy | M common | 1.E-03 |
| Direct buffer | Nanohelix kit | 1.E+01 |

나. Direct real-time RT-PCR 키트에 대한 시험

- 평가를 위해 기존의 시험법과 개발된 키트를 이용하여 동시에 평가 실시
- 표준주인 PR8 및 조류인플루엔자 1종 선정
- 기존 시험법: RNA를 추출하는 키트를 이용하여 RNA 추출, 기존의 real-time RT-PCR 실시
- direct real-time RT-PCR: 1x direct buffer와 섞은 후 상온에서 5분 후 RT-PCR 실시
- 1x direct buffer로 추출한 핵산이 일반 real-time RT-PCR system으로의 적용이 가능한지 확인을 위해 direct buffer를 섞어서 추출한 RNA를 이용하여 기존 진단키트에 적용 : 기존의 system에 적용하였을 때 Ct값이 오른쪽으로 shift되는 것을 확인(Ct값이 17에서 34로 증가)하였으며, 개발된 전체 system(1x direct buffer 및 PCR system)에 적용하여 시험해 본 결과 기존의 시험법에 비해 Ct값이 다소 적게 증가하는 것을 확인 함 (Ct값, 23)
- RNA 추출 키트를 이용하여 추출한 유전자를 개발된 키트에 적용해본 결과, Ct값이 18 정도로 기존의 시험법과 유사한 수준의 결과를 보이는 것을 확인하였음.
- 민감도 부분에서도 기존의 시험법에 비해 낮은 것을 확인
- 위의 실험 결과로 미루어 direct real-time RT-PCR 키트 내의 1x direct buffer를 이용하여 추출한 유전자는 새로 개발된 키트에 적합하도록 구성이 되어 있음



a) 표준주를 이용한 기존 시험법



b) 표준주를 이용한 direct real-time RT-PCR

다. Direct conventional RT-PCR 키트 평가

- 키트 평가를 위해 돼지인플루엔자 표준바이러스 선정
- PBS 희석한 시험군 및 IAV 음성 비증 시료에 바이러스를 희석한 시험군 2개 설정
- 2개의 시험군을 이용하여 기존 및 개발된 direct conventional RT-PCR 시험법 간의 키트 평가
- 실험결과 기존의 시험법에 비해 direct conventional RT-PCR법의 민감도가 100~1000 배 정도 차이가 있는 것을 확인하였으며, 이는 IAV 음성 비증시료에 적용한 경우에도 유사한 결과를 보였음.
- IAV 음성 비증시료에 적용해 본 결과, PBS에 적용한 군과 결과에 큰 차이가 없음을 확인

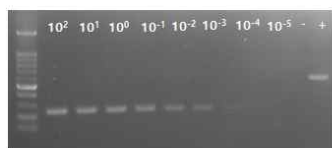
| | | RNA ext. kit | RT-PCR | 1차 | 2차 | 3차 | AVR | SD | CV |
|---|---------------|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|
| SIV REF (3×10^3 TCID ₅₀) PBS dilution | Rneasy | M common | 3.E-04 | 3.E-04 | 3.E-04 | 3.E-04 | 3.E-04 | 0.000 | 0.000 |
| | Direct buffer | Nanohelix kit | 3.E-04 | 3.E-02 | 3.E-01 | 3.E-01 | 1.E-01 | 0.165 | 1.500 |

| | | RNA ext. kit | RT-PCR | 1차 | 2차 | 3차 | AVR | SD | CV |
|--|---------------|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|
| SIV REF (3×10^3 TCID ₅₀) 음성 비증시료 | Rneasy | M common | 3.E-04 | 3.E-04 | 3.E-05 | 3.E-05 | 2.E-04 | 0.000 | 0.742 |
| | Direct buffer | Nanohelix kit | 3.E-02 | 3.E-01 | 3.E-01 | 3.E-01 | 2.E-01 | 0.156 | 0.742 |

- 본 실험 결과 민감도에 차이가 있기는 하지만 유전자 추출과정이 없이 전 처리가 매우 단순하며 실험기구의 요구가 적고, 적은 노동력으로도 유전자 추출이 가능하다는 등의 장점으로 미루어 본 키트를 이용하여 시료의 IAV 스크리닝에는 활용이 가능할 것으로 사료됨.

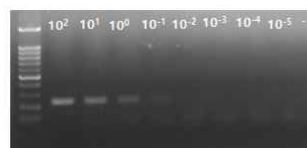
I. SIV를 이용한 기존 시험법 및 개발된 direct 키트 평가

SIV M RT-PCR (MEDIAN 진단액) RNA extraction using the QIAGEN RNeasy mini kit



A/swine/iowa/15/30 H1N1 (REF 21, 3×10^3 TCID₅₀) dilution using the 1x PBS
Limit of detection : 10^{-4} TCID₅₀

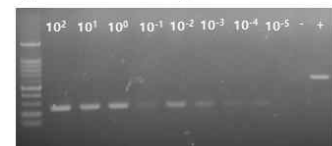
NANO HELIX direct RT-PCR kit RNA extraction using the direct 1x buffer



A/swine/iowa/15/30 H1N1 (REF 21, 3×10^3 TCID₅₀) dilution using the 1x PBS
Limit of detection : 10^{-1} TCID₅₀

II. IAV 음성 비증 시료를 이용한 기존 시험법 및 개발된 direct 키트 평가

SIV M RT-PCR (MEDIAN 진단액) RNA extraction using the QIAGEN RNeasy mini kit



A/swine/iowa/15/30 H1N1 (REF 21, 3×10^3 TCID₅₀) dilution using the S-20160927 음성 비증 시료
Limit of detection : 10^{-5} TCID₅₀

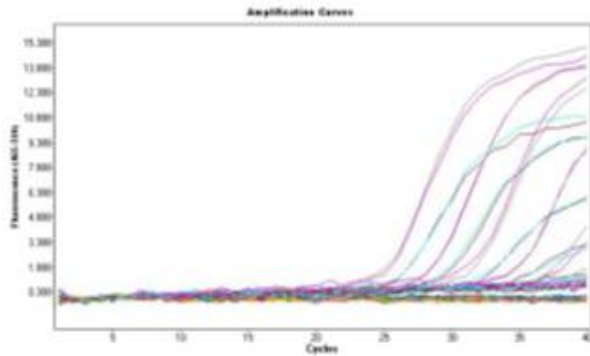
NANO HELIX direct RT-PCR kit RNA extraction using the direct 1x buffer



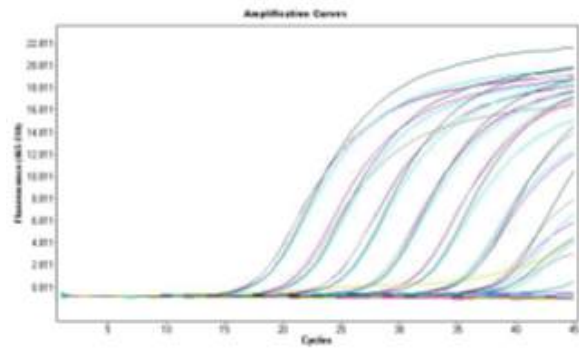
A/swine/iowa/15/30 H1N1 (REF 21, 3×10^3 TCID₅₀) dilution using the S-20160927 음성 비증 시료
Limit of detection : 10^{-1} TCID₅₀

라. Direct real-time RT-PCR 키트 평가

- 키트 평가를 위해 돼지인플루엔자 표준바이러스 선정
- PBS 희석한 시험군 및 IAV 음성 비증 시료에 바이러스를 희석한 시험군 2개 설정
- 2개의 시험군을 이용하여 기존 및 개발된 direct real-time RT-PCR 시험법 간의 키트 평가



a) 기존 시험법



b) direct real-time RT-PCR

- 실험결과 기존의 시험법에 비해 direct real-time RT-PCR을 이용한 결과의 Ct값이 오른 쪽으로 shift된 경향을 보이는 것을 확인
- 음성 비증시료에 적용해 본 결과 PBS에 적용한 군과 결과에 큰 차이가 없음
- direct 시험법은 유전자 추출과정이 없이 전 처리가 매우 단순하며 실험기구의 요구가 적고, 적은 노동력으로도 유전자 추출이 가능하다는 등의 장점을 가지고 있으나 real-time PCR, real-time qPCR의 목적인 정밀검사에 적용하기에는 민감도가 낮으므로 단시간에 많은 시료를 처리해야 하는 상황에 사용하는 것을 고려

2. 개발된 진단키트 야외적용 평가

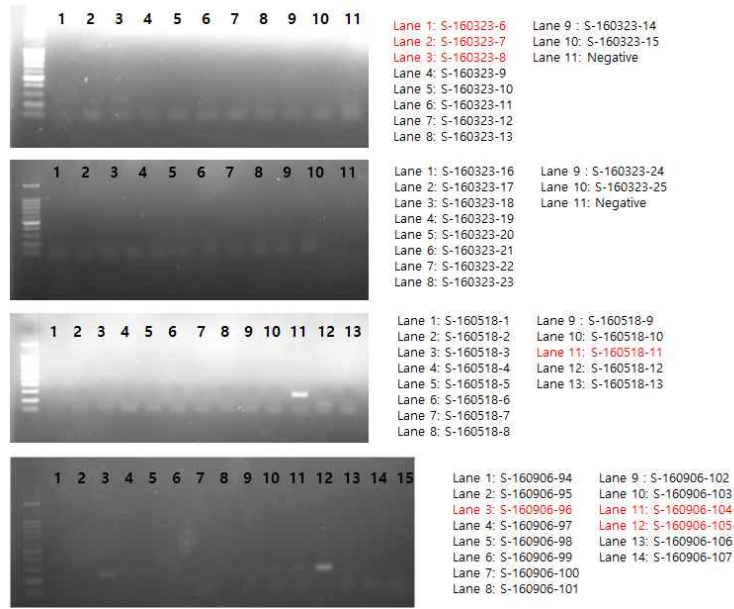
가. IAV 양성 및 음성 시료를 이용하여 개발된 direct 키트 적용 시험 실시

- 야외 시료 48점(비증 및 폐조직)을 이용한 기존 시험법 및 개발된 키트의 적용시험 실시

(1) Direct conventional RT-PCR 법 키트 적용 시험 결과

- Direct conventional RT-PCR의 경우 기존의 real-time RT-PCR 결과와 유사한 결과를 보임
- 특히 바이러스가 분리된 시료 5개 중 4개를 direct conventional RT-PCR(신규 시험법)로 검출
: 바이러스가 분리된 시료는 기존의 real-time RT-PCR에서 Ct값이 20 내외로 바이러스 양이 많은 것으로 추정되는 시료임
- 또한 신규 시험법은 비증, 폐조직 2 종류의 시료 모두 유전자 검출이 가능함을 확인

* Nanohelix kit를 이용한 야외시료 적용 시험 결과



(2) Direct real-time RT-PCR 법 키트 적용 시험 결과

- 바이러스가 분리된 시료 5개 중 2개에서 direct real-time RT-PCR(신규 시험법)로 검출

| 순서 | 번호 | 비중 | 제조직 | M52C/253R SYBR realtime RT-PCR | Virus isolation | Direct RT-PCR | Direct real-time RT-PCR |
|----|----------------|----|-----|--------------------------------------|--------------------|------------------|----------------------------|
| 1 | S-20160323-6 | ○ | - | 19.7 | ○ | + | 32.8 |
| 2 | S-20160323-7 | ○ | - | - | - | - | - |
| 3 | S-20160323-8 | ○ | - | 25.5 | - | + | - |
| 4 | S-20160323-9 | ○ | - | - | - | - | - |
| 5 | S-20160323-10 | ○ | - | - | - | - | - |
| 6 | S-20160323-11 | ○ | - | - | - | - | - |
| 7 | S-20160323-12 | ○ | - | - | - | - | - |
| 8 | S-20160323-13 | ○ | - | - | - | - | - |
| 9 | S-20160323-14 | ○ | - | - | - | - | - |
| 10 | S-20160323-15 | ○ | - | - | - | - | - |
| 11 | S-20160323-16 | - | ○ | 29.7 | - | - | - |
| 12 | S-20160323-17 | - | ○ | 22.7 | - | - | - |
| 13 | S-20160323-18 | - | ○ | - | - | - | - |
| 14 | S-20160323-19 | - | ○ | - | - | - | - |
| 15 | S-20160323-20 | - | ○ | - | - | - | - |
| 16 | S-20160323-21 | - | ○ | 25.8 | - | - | - |
| 17 | S-20160323-22 | - | ○ | - | - | - | - |
| 18 | S-20160323-23 | - | ○ | - | - | - | - |
| 19 | S-20160323-24 | - | ○ | - | - | - | - |
| 20 | S-20160323-25 | - | ○ | - | - | - | - |
| 21 | S-20160518-1 | ○ | - | - | - | - | - |
| 22 | S-20160518-2 | ○ | - | - | - | - | - |
| 23 | S-20160518-3 | ○ | - | - | - | - | - |
| 24 | S-20160518-4 | ○ | - | - | - | - | - |
| 25 | S-20160518-5 | ○ | - | - | - | - | - |
| 26 | S-20160518-6 | ○ | - | - | - | - | - |
| 27 | S-20160518-7 | ○ | - | - | - | - | - |
| 28 | S-20160518-8 | ○ | - | - | - | - | - |
| 29 | S-20160518-9 | ○ | - | - | - | - | - |
| 30 | S-20160518-10 | - | ○ | - | - | - | - |
| 31 | S-20160518-11 | - | ○ | 15.5 | ○ | + | 30.1 |
| 34 | S-20160518-14 | - | ○ | - | - | - | - |
| 35 | S-20160901-94 | ○ | - | - | - | - | 28.7 |
| 36 | S-20160901-95 | ○ | - | 27.5 | - | - | 30.0 |
| 37 | S-20160901-96 | ○ | - | 19.0 | ○ | + | - |
| 38 | S-20160901-97 | ○ | - | 18.4 | ○ | - | - |
| 39 | S-20160901-98 | ○ | - | - | - | - | - |
| 40 | S-20160901-99 | ○ | - | 31.3 | - | - | - |
| 41 | S-20160901-100 | ○ | - | - | - | - | - |
| 42 | S-20160901-101 | ○ | - | - | - | - | - |
| 43 | S-20160901-102 | ○ | - | 32.0 | - | - | - |
| 44 | S-20160901-103 | - | ○ | - | - | - | 24.3 |
| 45 | S-20160901-104 | - | ○ | 28.8 | - | + | - |
| 46 | S-20160901-105 | - | ○ | 14.6 | ○ | + | - |
| 47 | S-20160901-106 | - | ○ | 28.4 | - | - | - |
| 48 | S-20160901-107 | - | ○ | - | - | - | - |

3. 1~2차년도 실적 현황

가. 평가용 표준 바이러스 확보

(1) 인플루엔자 A 바이러스 HA subtype 별 표준 바이러스 확보

○ 조류, 돼지, 말, 개 인플루엔자 바이러스 주요 subtype 확보

- 조류 인플루엔자 바이러스의 경우 H1~H16 subtype 확보
- 돼지 인플루엔자 바이러스의 경우 현재 유행 중인 유전형을 분석 후 각 lineage를 대표 할 수 있는 strain 확보
- 말 역시 현재 유행하는 American lineage Florida sub lineage Clade II strain 확보
- 개 인플루엔자 바이러스의 경우 2013년도 분리주로 현재 유행 중인 바이러스를 대표 할 수 있음

표 1. 평가용 표준 바이러스 리스트

| Species | subtype | viruses |
|----------|---------|--------------------------------|
| Avian | H1N2 | A/duck/Korea/U11-1/2007 |
| | H2N8 | A/wild duck/Korea/SH38-51/2010 |
| | H3N8 | A/duck/Ukraine/1/63 |
| | H4N6 | A/duck/Czechoslovakia/56 |
| | H5N3 | A/duck/Hong Kong/820/80 |
| | H6N5 | A/seawater/Australia/1/72 |
| | H7N1 | A/duck/Hong Kong/301/78 |
| | H8N4 | A/turkey/Ontario/6118/68 |
| | H9N2 | A/turkey/Wisconsin/66 |
| | H10N7 | A/chicken/Germany/N/49 |
| | H11N6 | A/duck/England/56 |
| | H12N5 | A/duck/Alberta/60/76 |
| | H13N6 | A/gull/Maryland/704/77 |
| | H14N5 | A/Mallard/Gujev/263/82 |
| | H15N9 | A/Mallard/Australia/2576/79 |
| | H16 | A/BGH/Sweden/2/9 |
| Swine | H1N1 | A/swine/Korea/25-13 |
| | H1N2 | A/swine/Korea/E102 |
| | H3N2 | A/swine/Korea/CY10/2007 |
| Equine | H3N8 | A/equine/Wildeshausen/08 |
| | H7N7 | A/equine/Prague/56 |
| Canine | H3N2 | A/canine/Korea/BD-1/2013 |
| pandemic | pH1N1 | A/swine/Korea/GBCG01/2010 |

(2) 종란 접종을 이용한 바이러스 증식 및 수확

○ 9~10일 발육한 SPF 종란에 각 바이러스 접종 후 3일간 증식, chilling 후 allantoic fluid 수거

(그림 1 참고)

Egg inoculation in 9~10-days old fertilized SPF eggs



3 days after, eggs were chilled at 4°C overnight

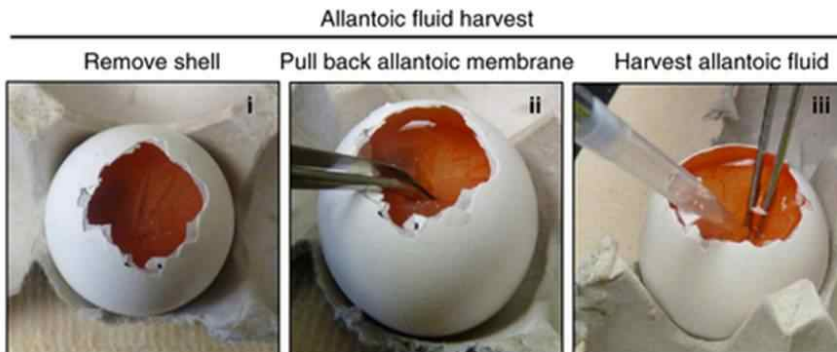


그림 1. 종란 접종 및 수확

(3) Hemmagglutination assay(HA)를 이용한 바이러스 역가 측정

- HA는 수확한 바이러스와 닭 혈구를 이용한 바이러스의 역가를 측정 방법
- 조류 및 개, 돼지 인플루엔자 바이러스의 경우 0.6% chicken red blood cell (RBC)를 이용하여 바이러스와 40분간 반응, 혈구가 응집되는 희석 배수까지 결과 판독
- 말 인플루엔자의 경우 0.5% chicken RBC를 이용하여 바이러스와 60분간 반응, 혈구 응집되는 희석 배수까지 결과 판독

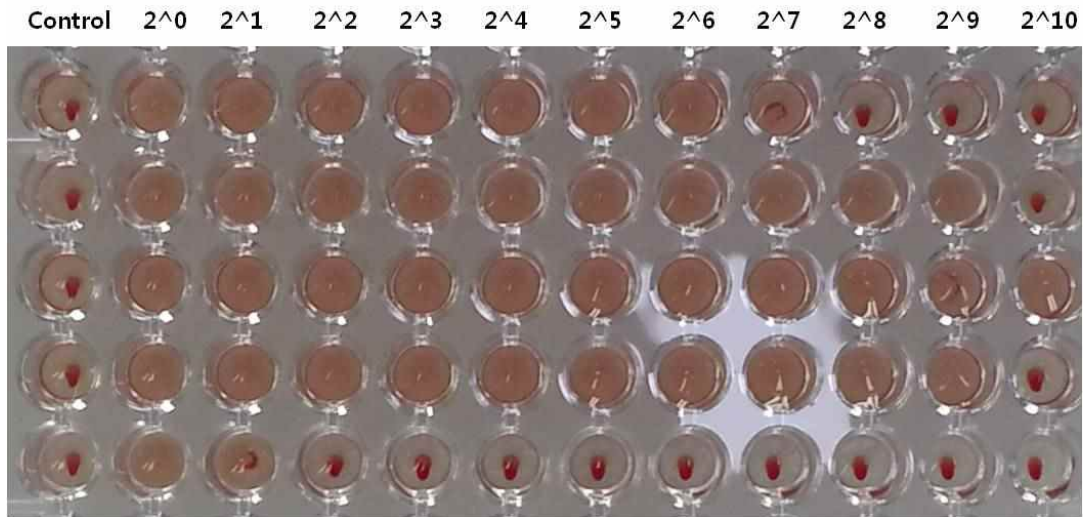


그림 2. Hemagglutination assay (HA) 실험 결과

(4) MDCK 세포를 이용한 TCID₅₀ 역가 측정

- 역가를 측정하고자 하는 바이러스를 10진 희석 후 8 well 접종, 3-4일간 배양
- 세포변성효과(CPE)가 보이는 well수 계산 후 Reed-Muench methods를 이용하여 결과 도출

나. 기존 개발 인플루엔자 검출법 비교 분석

(1) 인플루엔자 A 바이러스 공통 유전자 검출용 RT-PCR법 평가

가) OIE 매뉴얼 및 기존에 사용 중이던 M 유전자 검출용 RT-PCR법 평가

- 기존에 사용 중이던 M 유전자에 대한 검출용 RT-PCR primer set 및 OIE manual 내의 EIV 검출용 primer set에 대한 비교 시험 실시

| 구분 | | Primer sequence (5'-3') | size |
|---------------------------------------|----------|--------------------------|---------------------|
| 2009 수행연구결과 선정된 primer set | M-com-F1 | CTTYTAACCGAGGTCGAAACG | Influenza M (244bp) |
| | M-com-R1 | TTGGACAAANCGTCTACGCTGC | |
| OIE Manual (Equine Influenza 유전자 검출용) | M52C | CTTCTAACCGAGGTCGAAACG | Influenza M (210bp) |
| | M253R | AGGGCATT TGGACAAAGCGTCTA | |

- 두 가지 primer set 모두 다 축종에 대해서 10⁻¹ TCID₅₀ 수준에 까지 검출됨을 확인

나) 야외시료 적용 시 검출 한계를 평가하기 위해 인플루엔자 음성 비준 시료를 이용하여 유전자 검출 한계 비교 평가

- 축종별 인플루엔자 바이러스의 M RT-PCR swab sample spiking test
- 기존에 사용 중인 J1/J2 세트 및 OIE 매뉴얼 내의 M52C/253R 프라이머 세트 비교 ; 2개의 primer 모두 M 유전자를 기반으로 하는 공통 검출용 프라이머 세트임

| Viruses | TCID ₅₀ /ml | 2.5 | 1.5 | 0.5 | -0.5 | -1.5 | -2.5 | -3.5 | detection limit |
|---------------------------------|------------------------|-----|-----|-----|------|------|------|------|--------------------|
| A/swine/Korea/25-13 (H1N1) | J1/J2 | | | | | | | | 10 ^{-0.5} |
| | M52C/253R | | | | | | | | 10 ^{-3.5} |
| A/swine/Korea/E102 (H1N2) | J1/J2 | | | | | | | | 10 ^{-1.5} |
| | M52C/253R | | | | | | | | 10 ^{-3.5} |
| A/swine/Korea/CY10 (H3N2) | J1/J2 | | | | | | | | 10 ^{-0.5} |
| | M52C/253R | | | | | | | | 10 ^{-2.5} |
| A/canine/Korea/CY003 (H3N2) | J1/J2 | | | | | | | | 10 ^{-1.5} |
| | M52C/253R | | | | | | | | 10 ^{-2.5} |
| A/canine/Korea/CS036 (H3N2) | J1/J2 | | | | | | | | 10 ^{-1.5} |
| | M52C/253R | | | | | | | | 10 ^{-1.5} |
| A/equine/Miami/68 (H3N8) | J1/J2 | | | | | | | | 10 ^{-0.5} |
| | M52C/253R | | | | | | | | 10 ^{-3.5} |
| A/equine/Wildeshausen/08 (H3N8) | J1/J2 | | | | | | | | 10 ^{-1.5} |
| | M52C/253R | | | | | | | | 10 ^{-3.5} |

- 야외시료 spiking 검사 결과 기준과 유사하거나 일부에서 민감도가 한 단계정도 감소
- 전체 적으로 M52C/253R 프라이머 세트의 민감도가 더 좋은 것을 확인

(2) 인플루엔자 A 바이러스 HA 감별형 기준 RT-PCR법 평가

가) HA typing을 위한 RT-PCR법 검색 및 primer set 제작

- 기준에 보고된 HA subtyping용 RT-PCR 자료 검색

※ REF : Subtyping of Avian Influenza Viruses H1 to H15 on the Basis of Hemagglutinin Genes by PCR Assay and Molecular Determination of Pathogenic Potential., 2008., Kenji Tsukamoto, Hisayoshi Ashizawa, Koji Nakanishi, Noriyuki Kaji, Kotaro Suzuki, Masatoshi Okamatsu, Shigeo Yamaguchi and Masaji Mase., JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Sept. 2008, p. 3048-3055 Vol. 46, No. 9

TABLE 2. Primers used for subtyping of HA genes of AI viruses

| HA subtype | Primer identification no. | Sequence position | Standard HA gene | Product size (bp) | Primer sequence | No. of mixed nucleotides |
|------------|---------------------------|-------------------|------------------|-------------------|---------------------------|--------------------------|
| H1 | 535 | H1-883F | AF091309 | 391 | YDTGATGCTCCRGTYCAY | 5 |
| | 536 | H1-1273R | | | TGYTCYTTRCCYACYGCWGTG | 6 |
| H2 | 479 | H2-892F | L11127 | 343 | AAMMCTTGA AAAAYTG YGA | 4 |
| | 481 | H2-1234R | | | TTCAATCACAGACTTYACYTTG | 2 |
| H3 | 486 | H3-919F | CY006031 | 376 | GYATYACTCCWAATGGAAGC | 3 |
| | 488 | H3-1294R | | | ATTCYCTTCYACTTC DGA | 3 |
| H4 | 151 | H4-758F | M25283 | 421 | TGGACWATTGTRGADCCWGG A | 4 |
| | 294 | H4-1179R | | | GCTGCCITGRGTVGAYTTGAG | 3 |
| H5 | 491 | H5-918F | U69277 | 249 | CCARTRGGKGCAT AAAAYTC | 5 |
| | 571 | H5-1166R | | | KGTCCTGCWGCRTAYCCRCTY | 6 |
| H6 | 511 | H6-870F | CY005691 | 387 | TCARAYYTDCCAATHGAGAA | 5 |
| | 512 | H6-1256R | | | YTCRTGVTCKACWGCYTCRA | 7 |
| H7 | 495 | H7-937F | M31689 | 241 | ATYAA YMSYAGRRCWGT RRG | 9 |
| | 496 | H7-1177R | | | GATCWAITGCHGAYTGRGTG | 4 |
| H8 | 159 | H8-854F | CY005970 | 376 | GGCAGAATAATYCAA AATGA | 1 |
| | 298 | H8-1229R | | | TCATYITGICAACTATATTGTTGAC | 1 |
| H9 | 569 | H9-943F | CY005639 | 554 | CACAAITGMAGYAARTATGC | 3 |
| | 577 | H9-1496R | | | TCCAT GCAYTGRTYRTACA | 4 |
| H10 | 533 | H10-935F | CY014619 | 311 | AAYYTDTCCMCCDAGRACDGT | 7 |
| | 501 | H10-1245R | | | TCAGAYTCTATKGAYYCRAAC | 5 |
| H11 | 165 | H11-858F | AY684895 | 410 | GGAAATGGGAAAYTGTTCAG | 1 |
| | 514 | H11-1267R | | | AATTCRTGTTGHAYAGACTC | 3 |
| H12 | 543 | H12-776F | CY005925 | 368 | CARACWGTVAARATACARAC | 5 |
| | 544 | H12-1143R | | | CCYGTCCYTC HGMRTTYTG | 7 |
| H13 | 169 | H13-856F | AY684887 | 337 | AITGARGARTAGGAAAAGG | 2 |
| | 421 | H13-1192R | | | GTYGAYTCTTIRICTGCAGC | 3 |
| H14 | 171 | H14-863F | CY014604 | 282 | GAGCACAGTGCTTAAAAGTG | 0 |
| | 422 | H14-1144R | | | GCATTTTGRGCTTAAATCCATACC | 2 |
| H15 | 515 | H15-828F | L43916 | 273 | CCGCTCTAATGCCCCWTCRG | 2 |
| | 423 | H15-1100R | | | TCGATGAATCTGCAATTGC | 0 |

나) HA subtyping RT-PCR법 실험 수행

- HA1~HA15 바이러스를 이용한 실험 결과

; 2008년도에 보고된 RT-PCR용 프라이머 세트 (2008, Kenji et al.)를 제작하여 실험해 본 결과, 표준주로 보유하고 있는 모든 HA subtype에 대해 검출하지는 못했으며 이는 바이러스의 lineage나 subtype에 따라 상이한 결과를 보일 수 있는 것으로 사료됨.

※ REF : Subtyping of Avian Influenza Viruses H1 to H15 on the Basis of Hemagglutinin Genes by PCR Assay and Molecular Determination of Pathogenic Potential., 2008., Kenji Tsukamoto, Hisayoshi Ashizawa, Koji Nakanishi, Noriyuki Kaji, Kotaro Suzuki, Masatoshi Okamoto, Shigeo Yamaguchi and Masaji Mase., JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Sept. 2008, p. 3048-3055 Vol. 46, No. 9

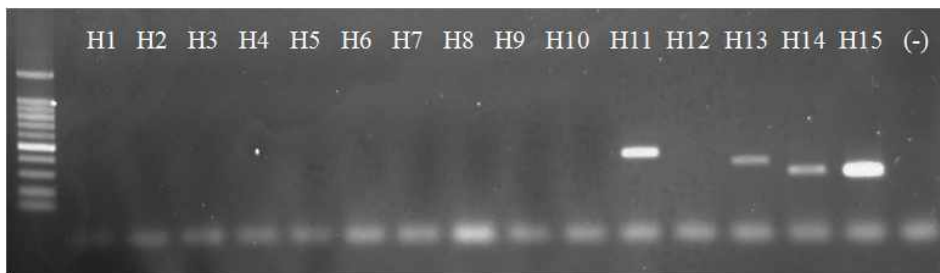


그림 3. HA subtyping용 프라이머 적용 시험

(3) 인플루엔자 A 바이러스 NA 감별형 기존 RT-PCR법 평가

가) NA typing을 위한 RT-PCR법 검색 및 primer set 제작

- 기존에 보고된 NA subtyping용 RT-PCR 자료 검색

※ REF : Rapid molecular subtyping by reverse transcription polymerase chain reaction of the neuraminidase gene of avian influenza A viruses., 2009., S.R. Fereidouni, E. Starick, C. Grund, A. Globig, T.C. Mettenleiter, M. Beer, T. Harder., Veterinary Microbiology 135 (2009) 253-260

Table 1
Primers used in this study for RT-PCR and sequencing of influenza A virus neuraminidase (N) gene fragments.

| Name | Orientation | Sequence (5' → 3') | Length (bp) | Position in reference sequence | Expected product size (bp) | Accession no. of reference sequence |
|------|-------------|-----------------------------------|-------------|--------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| N1-F | Forward | AGR ^a CCTGYYTCTGGGTTGA | 20 | 1209-1228 | 126 | AJ416625 |
| N1-R | Reverse | ACCGTCTGGCCAAGACCA | 18 | 1334-1317 | | |
| N2-F | Forward | GCATGGTCCAGYTCAAGYTG | 20 | 548-567 | 362 | AJ574906 |
| N2-R | Reverse | CCYTTCCAGTTGTCTCTGCA | 20 | 909-890 | | |
| N3-F | Forward | AGATCRGGCTTTGAARTCATCAAAGT | 26 | 1126-1151 | 247 | CY005741 |
| N3-R | Reverse | CATGTCTARTCCACAGAAAGTAACTATAC | 30 | 1372-1343 | | |
| N4-F | Forward | TGGATAAAGATTCAACAGTGA | 20 | 925-944 | 456 | CY004989 |
| N4-R | Reverse | GGTATCAGAATTAACACCA | 21 | 1380-1360 | | |
| N5-F | Forward | GTTATTGGGTAATGACRGAYGGTC | 24 | 724-747 | 193 | CY004374 |
| N5-R | Reverse | GGTCTATTCAATCCATCCAA | 21 | 916-896 | | |
| N6-F | Forward | GCIACAGGAATGACACTATC | 20 | 52-71 | 265 | CY004311 |
| N6-R | Reverse | GRATGTGCCATGARITTTAC | 19 | 316-298 | | |
| N7-F | Forward | GTYGACAAYAACAATGGTCAGG | 23 | 1211-1233 | 183 | AY340077 |
| N7-R | Reverse | CCCAACTGRGATGGGCT | 18 | 1393-1376 | | |
| N8-F | Forward | GGTCAGGATAYAGYGGTTCYTTAC | 25 | 1216-1240 | 145 | AX225077 |
| N8-R | Reverse | CCACACATCACAATGGAGCT | 20 | 1360-1341 | | |
| N9-F | Forward | AACACACTGGAGTGGYTAC | 21 | 1216-1236 | 166 | CY014689 |
| N9-R | Reverse | GGAATTCGTRCTGGAACAC | 20 | 1381-1362 | | |

^a Codes for ambiguous bases position and NTP analogues: R = A/G, Y = C/T, I = inosine.

나) NA subtyping RT-PCR법 실험 수행

- NA1~NA9 바이러스를 이용한 실험 결과

; 2009년도에 보고된 NA subtype용 RT-PCR용 프라이머 세트에 대해서 실험 해 본 결과 우리가 보유하고 있는 NA subtype 모두에 대해서 검출이 가능함을 확인

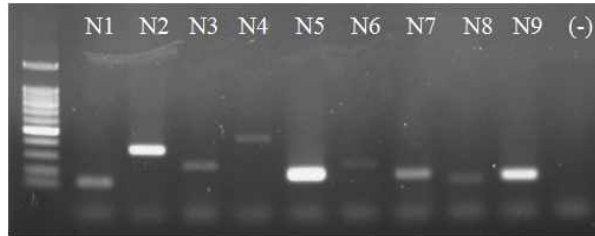


그림 4. NA subtyping용 프라이머 적용 시험

※ REF : Rapid molecular subtyping by reverse transcription polymerase chain reaction of the neuraminidase gene of avian influenza A viruses., 2009., S.R. Fereidouni , E. Starick , C. Grund , A. Globig , T.C. Mettenleiter , M. Beer , T. Harder., Veterinary Microbiology 135 (2009) 253-.260

(4) 인플루엔자 A 바이러스 공통 유전자 검출용 real time RT-PCR법 평가

가) 인플루엔자 A 공통 및 축종별 주요 subtype에 대한 real time RT-PCR법 검색

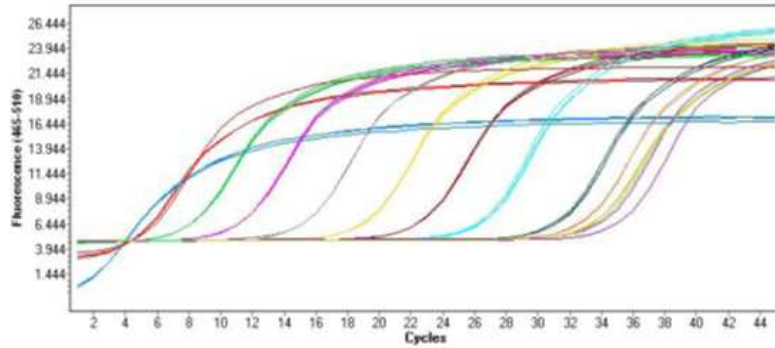
- 인플루엔자 A 검색: M 유전자
- 돼지: H1, H3, N1, N2
- 말 : H3, N8
- 개 : H3, N2

| Target | methods | Subtype | references | year | Journal | aim | Test |
|----------------|------------|----------------------------|---|------|--|----------------------------|-------------|
| Influenza A | Taqman | Inf A Sw flu A Sw H1 | CDC protocol of real time PCR for influenza A (H1N1) | 2009 | WHO | Inf A screening | |
| Equine | SYBR green | M/H3 | Real time RT-PCR for detection and Quantitative analysis of EIV, Cullinane A | 2005 | American society for microbiology | EIV screening (OIE manual) | M Detection |
| Equine /Canine | Taqman | H3 and H7 NP and M | Development and evaluation of one step Taqman real time RT PCR assay targeting Np, M and HA genes of EIV, Zhengchen Lu. | 2009 | Journal of clinical microbiology (JCM) | CIV and EIV H3 detection | |
| Equine | Taqman | H3N8 | Real time RT PCR for detection of EI and evaluation using samples from horses from infected with H3N8 | 2009 | Veterinary Microbiology | EIV H3 | |
| Equine /Canine | SYBR green | N2/N8 | NA subtyping of AIV with primerhunter designed primers and quadruplicate primer pools | 2013 | PLOS ONE | CIV N2 and EIV N8 typing | |
| Swine | Taqman | H1, H3, N1, N2 | Real time RT-PCR assays for the detection and differentiation of North American SIV | 2004 | J Vet Diagn Invest | SIV H/N typing | |

나) 인플루엔자 A 공통 검출용 real-time RT-PCR 법 평가

- 2005년 Michelle 등에 의해 보고된 논문에 제시된 M52C/253R 프라이머 세트를 이용하여 SYBR을 이용한 real-time PCR 평가 결과

; Invitro transcription(IVT)를 이용하여 RNA 제작, 3회 반복 실험 및 STD값 산출



| RNA conc. | Cp1 | Cp2 | Cp3 | Mean Cp | Std Cp |
|--------------------|-------|-------|-------|---------|--------|
| 7×10^6 | 12.36 | 12.11 | 12.19 | 12.22 | 0.13 |
| 7×10^5 | 16.41 | 15.91 | 15.89 | 15.90 | 0.01 |
| 7×10^4 | 19.64 | 19.53 | 19.53 | 19.57 | 0.06 |
| 7×10^3 | 23.60 | 23.64 | 23.47 | 23.57 | 0.09 |
| 7×10^2 | 26.66 | 26.47 | 26.89 | 26.67 | 0.21 |
| 7×10^1 | 31.29 | 29.79 | 30.92 | 30.36 | 0.80 |
| 7×10^0 | - | 33.25 | 32.84 | 33.05 | 0.29 |
| 7×10^{-1} | 39.90 | - | - | 39.90 | - |

- 실험 결과: 약 7 copies number의 RNA까지 안정적으로 검출하는 것을 확인

※ REF : Real-time RT-PCR for detection and quantitative analysis of equine influenza virus., Michelle Quinlivan, Eugene Dempsey, Fergus Ryan, Sean Arkins, and Ann Cullinane. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Oct. 2005, p. 5055-5057

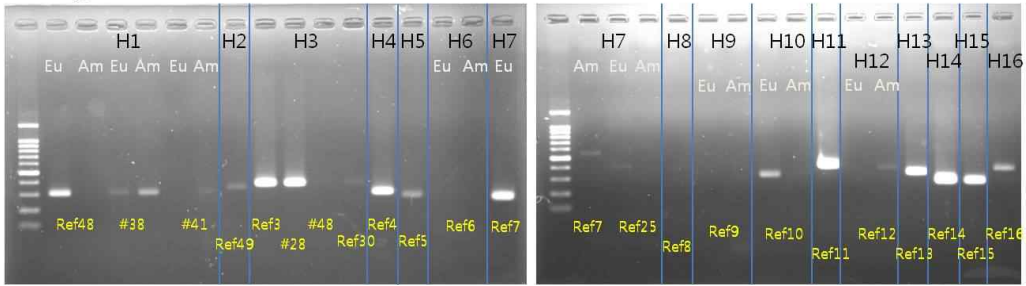
(5) 인플루엔자 A 바이러스 HA, NA subtyping 감별형 기존 realtime RT-PCR 평가

가) 조류 인플루엔자 HA, NA sub typing용 real time RT-PCR 검색

: H1~H16 및 N1~N9 subtype에 대한 SYBR green real time RT-PCR primer set 보고

※ REF : SYBR Green-Based Real-Time Reverse Transcription-PCR for Typing and Subtyping of All Hemagglutinin and Neuraminidase Genes of Avian Influenza Viruses and Comparison to Standard Serological Subtyping Tests., 2012., Kenji Tsukamoto, Panei Carlos Javier, Makiko Shishido, Daigo Noguchi, John Pearce, Hyun-Mi Kang, Ok Mi Jeong, Youn-Jeong Lee, Koji Nakanishi, and Takayoshi Ashizawae., Journal of Clinical Microbiology p. 37-45

HA gene_RT-PCR



- Real-time RT-PCR은 2개의 키트를 사용하여 실험을 진행하였으며 키트에 따라 실험결과가 일부 상이함을 확인 (3회 반복 실험 결과)

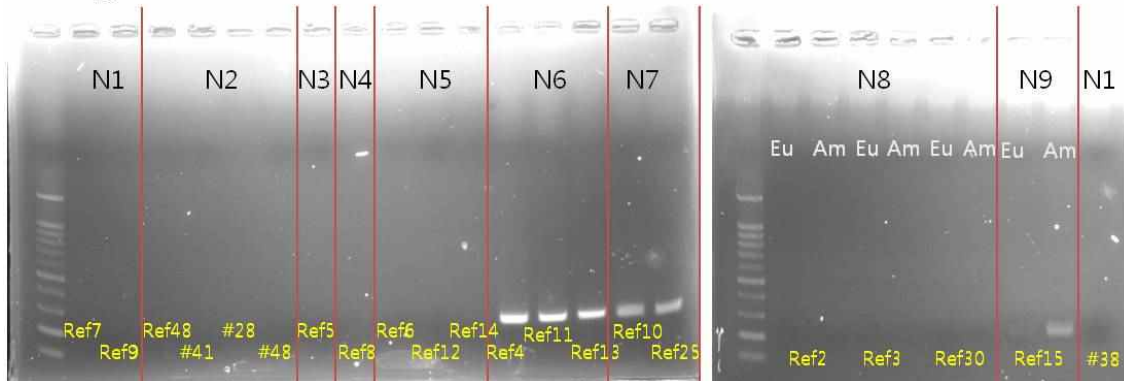
| Species | HA (lineage, size(bp)) | TaKaRa SYBR one step Real time PCR Kit (Cat. RR086A / Lot. AK2801 / Exp. Aug.2016) | | | | Qiagen SYBR one step Real time PCR Kit (Cat. 204243 / Lot. 151032157 / Exp. July 2016) | | | | |
|--------------------------|----------------------------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|-------|
| | | CP1 | CP2 | CP3 | CP AV | CP1 | CP2 | CP3 | CP AV | |
| Avian | H1 (Eu, 305) | 31.65 | 31.45 | 30.9 | 31.33 | 30.56 | 30.49 | 30.34 | 30.46 | |
| | H2 (Eu+Am, 343) | 35.88 | 35.59 | 36.55 | 36.01 | - | - | - | - | |
| | H3 (Eu+Am, 376) | 30.89 | 30.7 | 31.14 | 30.91 | 29.24 | 29.51 | 29.47 | 29.41 | |
| | H4 (Eu+Am, 284) | 8.48 | 19.92 | 23.67 | 17.36 | 28.66 | 28.66 | | 28.66 | |
| | H5 (Eu+Am, 261) | - | - | - | - | 33.91 | 33.56 | 33.68 | 33.72 | |
| | H7 (Eu, 241) | 22.94 | 22.84 | 22.93 | 22.90 | 26.2 | 26.21 | 26.29 | 26.23 | |
| | H10 (Eu, 311) | 33.3 | 33.44 | 33.35 | 33.36 | 35 | 35 | 35 | 35.00 | |
| | H11 (Eu+Am, 410) | 22.31 | 22.25 | 22.27 | 22.28 | 21.03 | 21.08 | | 21.06 | |
| | H12 (Am, 368) | 32.61 | 32.7 | 33.43 | 32.91 | - | - | - | - | |
| | H13 (Eu+Am, 337) | 26.5 | 26.3 | 26.43 | 26.41 | 27.83 | 27.83 | 27.86 | 27.84 | |
| | H14 (Eu+Am, 282) | 30.45 | 30.53 | | 30.49 | 17.16 | 17.17 | 17.17 | 17.17 | |
| | H15 (Eu+Am, 273) | 22.5 | 24.55 | | 23.53 | 15.87 | 15.9 | | 15.89 | |
| | H16 (Eu+Am, 371) | 33.39 | 33.53 | | 33.46 | - | - | - | - | |
| | Swine | H1 (#38) (Eu, 305) | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | H1 (#38) (Am, 305) | - | - | - | - | 35 | 35 | 35 | 35.00 |
| | | H1 (#41) (Am, 305) | 35 | 35 | 35 | 35.00 | - | - | - | - |
| H3 (#28) (Eu+Am, 376) | | 35 | 35 | 35 | 35.00 | 35 | 35 | 35 | 35.00 | |
| Equine | H3 (REF30) (Eu+Am, 376) | 35 | 35 | 35 | 35.00 | - | - | - | - | |

- RT-PCR에서 반응성을 보인 swine HA3에서 증폭이 일어나지 않음을 확인.

다) 인플루엔자 A 바이러스 NA subtyping 감별형 기준 realtime RT-PCR 평가

- 조류인플루엔자 subtyping NA1~9을 위한 real-time RT-PCR 프라이머 평가 실시
- NA1~9 프라이머 세트를 이용하여 바이러스와의 반응성 확인(conventional RT-PCR 결과) ; RT-PCR결과 NA1, 2, 3, 4, 5, 8과는 반응성이 없음을 확인

NA gene_RT-PCR



- Real-time PCR은 2개의 키트를 사용하여 실험을 진행하였으며 키트에 따라 실험결과가 일부 상이함을 확인

| Species | NA (lineage, size(bp)) | TaKaRa SYBR one step Real time PCR Kit (Cat. RR086A / Lot. AK2801 / Exp. Aug.2016) | | | | Qiagen SYBR one step Real time PCR Kit (Cat. 204243 / Lot. 151032157 / Exp. July 2016) | | | |
|---------|----------------------------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|
| | | CP1 | CP2 | CP3 | CP AV | CP1 | CP2 | CP3 | CP AV |
| Avian | N6 (REF4) (Eu+Am, 264) | 16.04 | 16.09 | 15.55 | 15.89 | 19.1 | 19.16 | 19.21 | 19.16 |
| | N6 (REF11) (Eu+Am, 264) | 19.43 | 18.58 | | 19.01 | 16.1 | 16.23 | | 16.17 |
| | N6 (REF13) (Eu+Am, 264) | 27.28 | 26.46 | 26.83 | 26.86 | 22.89 | | 23.15 | 23.02 |
| | N7 (REF10) (Eu+Am, 261) | 21.99 | 22.13 | 22.23 | 22.12 | 23.61 | 23.72 | 23.74 | 23.69 |
| | N9 (REF15) (Eu, 227) | 35 | 35 | 35 | 35.00 | 35 | 35 | 35 | 35.00 |
| | N9 (REF15) (Am, 227) | 28.92 | 29.09 | | 29.01 | 33.27 | 33.21 | 33.28 | 33.25 |
| Equine | N7 (REF25) (Eu+Am, 261) | 35 | 35 | 35 | 35.00 | 31.25 | 31.27 | 31.22 | 31.25 |

다. 새로 개발된 인플루엔자 검출법 키트 평가

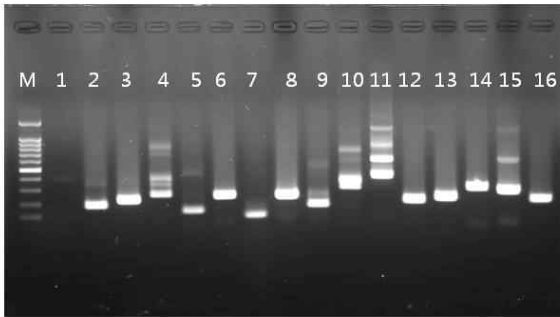
(1) 인플루엔자 바이러스 아형 (H 및 N) 감별진단용 RT-PCR 키트 평가

- 제작된 influenza A virus HA RT-PCR kit 검증 시험 실시

: 조류, 돼지, 말, 개 인플루엔자 바이러스에 대한 검출시험 수행 결과 조류 이외에 개, 돼지, 말에서도 안정적으로 subtyping이 되는 결과를 확인

Influenza A virus HA typing RT-PCR Kit (검증용)

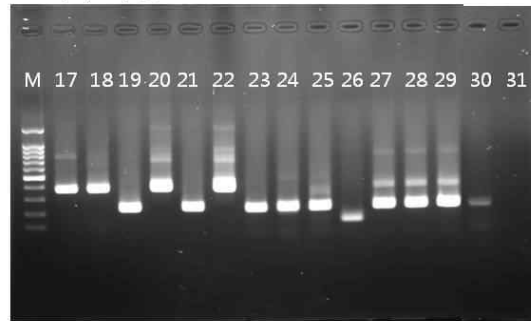
<Avian>



M : iNtRON 100bp
 1 : REF48, H1, 375bp
 2 : REF49, H2, 160bp
 3 : REF3, H3, 215bp
 4 : REF4, H4, 261bp
 5 : REF5, H5, 139bp
 6 : REF6, H6, 247bp
 7 : REF7, H7, 97bp
 8 : REF8, H8, 235bp
 9 : REF9, H9, 165bp
 10 : REF10, H10, 300bp
 11 : REF11, H11, 410bp
 12 : REF12, H12, 205bp
 13 : REF13, H13, 230bp
 14 : REF14, H14, 308bp
 15 : REF15, H15, 292bp
 16 : REF16, H16, 220bp

1.5% Agarose gel, 10ul loading

<기타 축종>



M : iNtRON 100bp
 17 : #38, Swine-H1, 375bp
 18 : #41, Swine-H1, 375bp
 19 : #28, Swine-H3, 215bp
 20 : #58, Swine-H1, 375bp
 21 : #55, Swine-H3, 215bp
 22 : #103, Swine-H1, 215bp
 23 : REF30, Equine-H3, 215bp
 24 : REF36, Equine-H3, 215bp
 25 : REF38, Equine-H3, 215bp
 26 : REF25, Equine-H7, 97bp
 27 : #48, Canine-H3, 215bp
 28 : #49, Canine-H3, 215bp
 29 : #50, Canine-H3, 215bp
 30 : REF31, Canine-H3, 215bp
 31 : Negative

1.5% Agarose gel, 10ul loading

- 기존의 HA subtyping RT-PCR 결과와의 비교

; 기존에 작성된 인플루엔자 HA subtype PCR (2008, Kenji)결과에 비해 개선된 결과를 보임

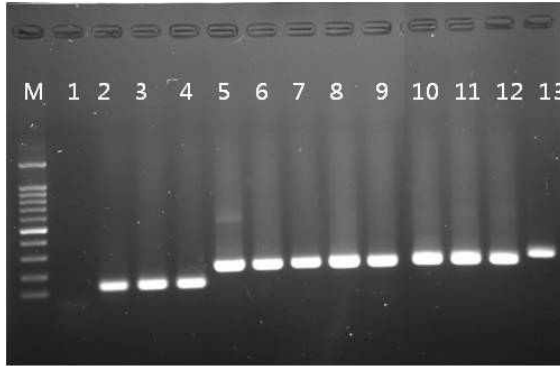
HA2,3,4,5,6,7,8,9,10,12에서 증폭이 안정적으로 됨을 확인하였음.

| primer set \ HA subtype | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|-------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|-----|
| Kenji primer (기존) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | o | - | o | o | o | N.T |
| NanoHelixkit (제작) | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o |

* N.T: Not tested

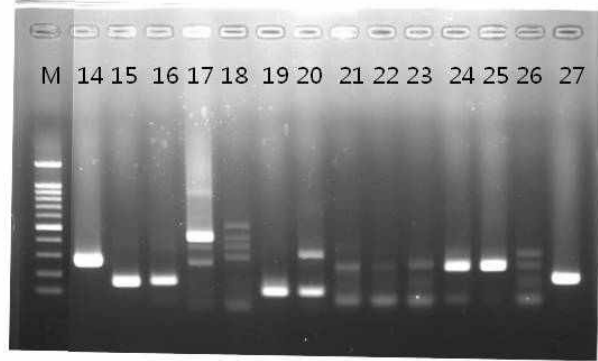
- 제작된 influenza A virus NA RT-PCR kit 검증 시험 실시

: 조류, 돼지, 말, 개 인플루엔자 바이러스에 대한 검출시험 수행 결과 조류 이외에 개, 돼지, 말에서도 안정적으로 subtyping이 되는 결과를 확인



M : iNtRON 100bp
 1 : REF7, Avian-N1, 137bp
 2 : #38, Swine-N1, 137bp
 3 : #58, Swine-N1, 137bp
 4 : #103, Swine-N1, 137bp
 5 : REF48, Avian-N2, 220bp
 6 : REF9, Avian-N2, 220bp
 7 : #41, Swine-N2, 220bp
 8 : #28, Swine-N2, 220bp
 9 : #55, Swine-N2, 220bp
 10 : #48, Canine-N2, 220bp
 11 : #49, Canine-N2, 220bp
 12 : #50, Canine-N2, 220bp
 13 : REF5, Avian-N3, 270bp

1.5% Agarose gel, 10ul loading



M : iNtRON 100bp
 14 : REF8, Avian-N4, 194bp
 15 : REF12, Avian-N5, 159bp
 16 : REF14, Avian-N5, 159bp
 17 : REF11, Avian-N6, 179bp
 18 : REF13, Avian-N6, 179bp
 19 : REF10, Avian-N7, 107bp
 20 : REF25, Equine-N7, 107bp
 21 : REF30, Equine-N8, 235bp
 22 : REF36, Equine-N8, 235bp
 23 : REF38, Equine-N8, 235bp
 24 : REF49, Avian-N8, 235bp
 25 : REF3, Avian-N8, 235bp
 26 : REF31, Canine-N8, 235bp
 27 : REF5, Avian-N9, 171bp

1.5% Agarose gel, 10ul loading

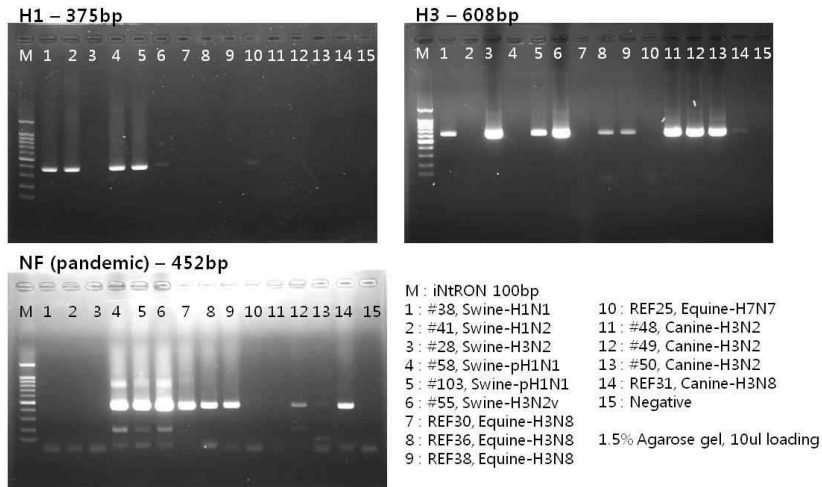
- 기존의 NA subtyping RT-PCR 결과와의 비교

: 기존(2009., Fereidouni 등)에 보고된 프라이머와 비교해 본 결과, NA 1,3,4,6,7에서 기존 증폭 보다 감도가 좋은 것으로 확인되었으며 안정적인 결과를 보이는 것을 확인.

(2) 돼지인플루엔자 바이러스 typing RT-PCR 검증시험

- Swine influenza virus differential typing RT-PCR 키트는 신종인플루엔자 검출용 프라이머, HA1, HA3 검출용 프라이머로 구성이 되어 있었음.
- 돼지인플루엔자 바이러스 검출용 키트를 이용한 검증시험 결과, HA1은 안정적으로 검출이 되는 것을 확인
- 하지만 HA3의 경우 일부 HA1의 바이러스에도 검출이 되었으며 다른 축종의 바이러스에서도 검출이 되는 것을 확인
- 신종인플루엔자를 검출하는 프라이머의 경우, 신종인플루엔자 이외에 말 및 개 인플루엔자 바이러스에서도 검출이 되는 것을 확인하였으며 이는 유전자 타겟에 대한 정보가 없어 향후 추가적으로 확인해볼 필요가 있음.

Swine Influenza Virus Differential typing RT-PCR Kit (검증용)



(3) 말 인플루엔자 바이러스 typing RT-PCR 검증시험

- 말 인플루엔자 HA3의 경우 말 인플루엔자 바이러스 HA3에서 증폭이 일어나는 것을 확인하였으며, 일부 유연관계가 확인된 개에서도 증폭이 됨을 확인
- HA7에서는 말 인플루엔자 바이러스만 증폭함을 확인

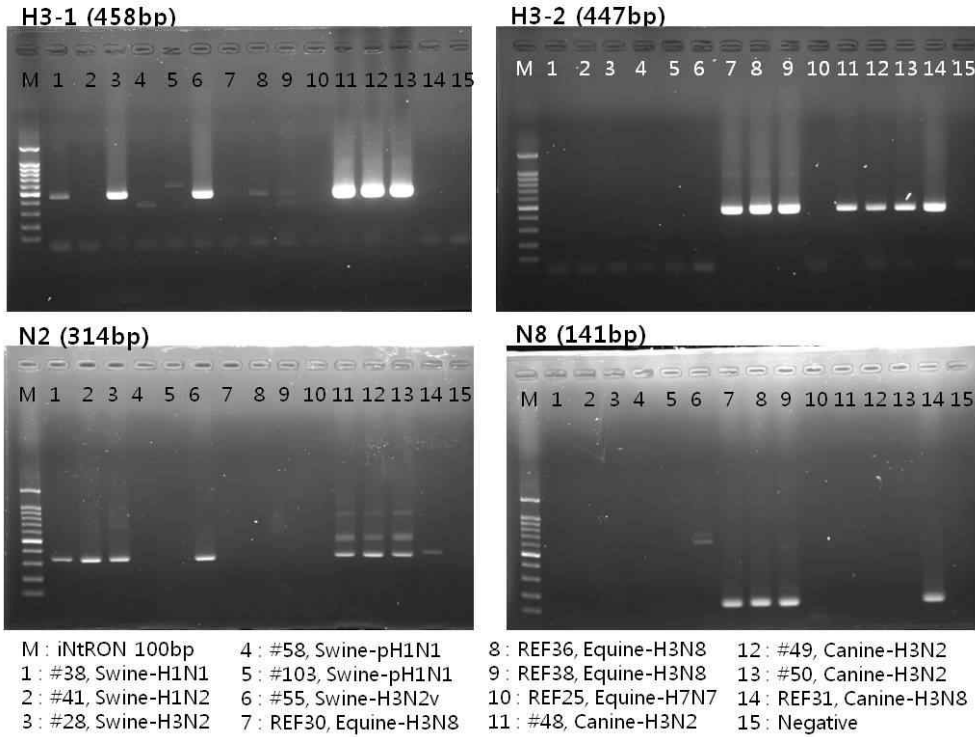
Equine Influenza Virus Differential typing RT-PCR Kit (검증용)



(4) 개/고양이 인플루엔자 바이러스 typing RT-PCR 검증시험

- 개/고양이 인플루엔자 바이러스 검출 키트는 HA3-1, HA3-2와 NA2, NA8 검출용 프라이머로 구성이 되어 있음.
- HA3-1에 비해 HA3-2의 프라이머가 반응성이 더 좋은 것으로 보이며 유연관계가 보고된 말 인플루엔자와도 교차반응이 있음을 확인
- NA2의 경우 개 인플루엔자 뿐 아니라 돼지의 NA2와도 반응성이 있음을 확인
- NA8은 개 인플루엔자에 대한 NA8과 반응성이 좋은 것을 확인함.

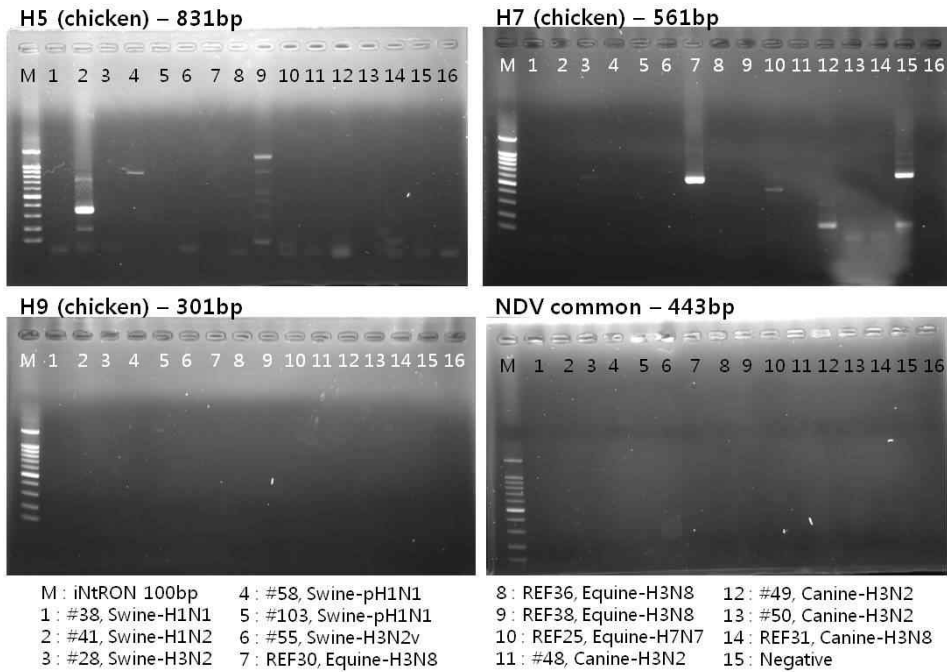
Canine/Feline Influenza Virus Differential typing RT-PCR Kit (검증용)



(5) 조류 인플루엔자 바이러스 typing RT-PCR for chicken 검증시험

- 현재 조류인플루엔자 바이러스 H5, H7, H9 및 NDV에 대한 검증 시험 진행
- 향후 닭 유래의 HA5, HA7, HA9을 추가 실험 필요

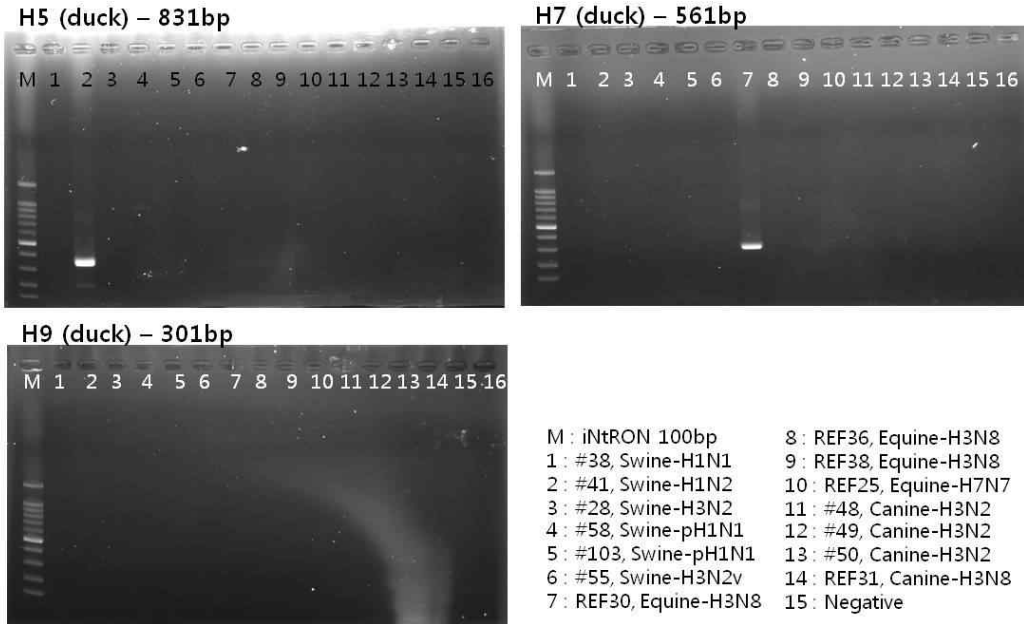
Avian Influenza Virus Differential typing RT-PCR Kit for chicken (검증용)



(6) 조류 인플루엔자 바이러스 typing RT-PCR for duck 검증시험

- 현재 조류인플루엔자 바이러스 H5, H7, H9 및 NDV에 대한 검증 시험 진행 중
- 향후 오리 유래의 HA5, HA7, HA9을 추가 실험 필요

Avian Influenza Virus Differential typing RT-PCR Kit for duck (검증용)



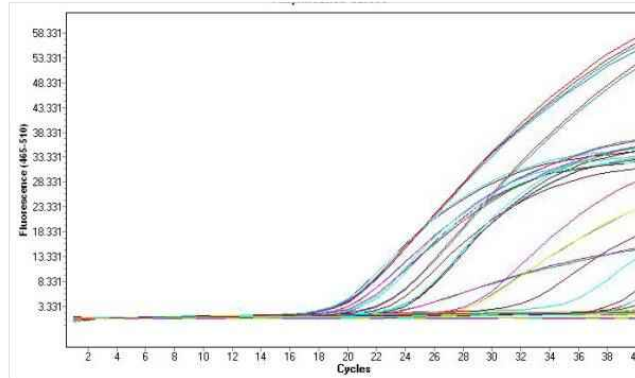
(7) 개 인플루엔자 바이러스 real-time RT-PCR 검증 시험

- 개 인플루엔자 바이러스 검증용 real time RT-PCR 키트는 HA3-1, HA3-2, NA2, NA8을 구분할 수 있는 프라이머 세트 구성
- 개 인플루엔자 H3N2 및 말 유래의 H3N8 바이러스를 이용하여 검증 시험을 수행한 결과 HA3-1은 개 유래의 HA3와 반응성이 있음을 확인, NA2 역시 검출이 되어 H3N2 subtype이 가능함을 확인하였으나 NA8과는 반응성이 없음을 확인하여 향후 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각됨.

(8) 돼지 인플루엔자 바이러스 real-time RT-PCR 검증 시험

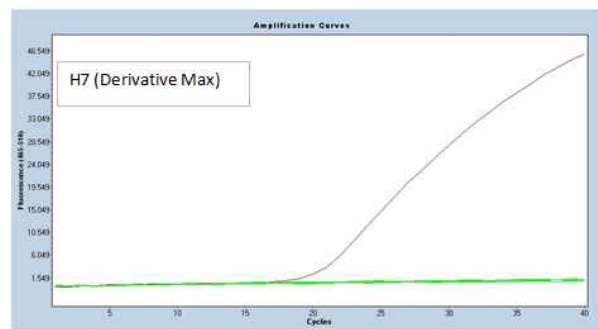
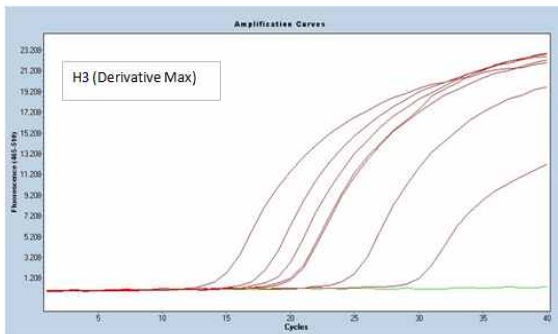
- 돼지 인플루엔자 바이러스 검증용 real time RT-PCR 키트는 신종인플루엔자, HA3, HA1을 구분할 수 있는 프라이머 세트 구성
- 돼지인플루엔자 바이러스는 NA typing이 가능한 프라이머 세트가 없고 HA typing만 가능하며, 신종인플루엔자 검출용 프라이머는 신종인플루엔자와 반응성이 좋은 것을 확인하였으나 HA1, HA3은 개선이 필요할 것으로 사료됨

| subtype | NF | | H1 | | H3 | | common | |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|
| | Cp1 | Cp2 | Cp1 | Cp2 | Cp1 | Cp2 | Cp1 | Cp2 |
| H3N2 | 16.68 | 32.36 | 31.81 | 18.21 | - | - | 16.98 | 16.56 |
| H1N1 | - | - | 17.93 | 17.75 | - | - | 20.53 | 16.88 |
| H1N2 | - | - | 21.93 | 22.34 | - | - | 21.93 | 20.97 |
| pH1N1 | 16.92 | 17.18 | - | - | 25.77 | 25.98 | 18.59 | 18.8 |
| vH3N2 | 19.62 | 19.7 | 29.24 | 24.97 | 33.37 | 20.72 | 21.61 | 20.59 |
| pH1N1 | 16.87 | 17.39 | 18.43 | 17.95 | - | - | 19.36 | 18.65 |



(9) 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 real-time PCR 검증 시험
- 검증시험 협조 필요

(10) 말 인플루엔자 바이러스 검출용 real-time PCR 검증 시험
- 말 인플루엔자 바이러스 검출용 real-time RT-PCR 키트는 common, HA3 및 HA7을 검출하는 primer set으로 구성되어 있음
- 말 인플루엔자 바이러스 H3N8 6종 및 H7N7 1종, 말에서 개로 직접전파 (direct transmission)된 것으로 보고된 H3N8 1종을 대상으로 real-time RT-PCR 실시
- 인플루엔자 common 유전자 및 H3, H7을 모두 검출하는 것을 확인



4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

4-1. 목표달성도

| 구분 | 연도 | 연구개발의 목표 | 연구개발의 내용 | 달성도 (%) |
|------------------|------------------|---|---|---------|
| 1 차 년 도 | 2 0 1 3 | <ul style="list-style-type: none"> ■ 기존 온도변환형 PCR 기기를 대체할 고속 항온도형 PCR 기기 개발 | <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 동물 인플루엔자 바이러스 현장 진단을 위한 휴대용 유전자 진단 장비 개발 <input type="checkbox"/> 진단의 민감도 97%, 특이도 100% 이상 목표 <input type="checkbox"/> 진단시간을 30분 이내로 단축 | 100 |
| | | <ul style="list-style-type: none"> ■ 동물 인플루엔자 바이러스 현장감별용 Pan-side RT-PCR 및 real time Pan-side RT-PCR 키트 개발 | <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 동물 인플루엔자 바이러스 현장 진단용 pan-side RT-PCR 및 real time RT-PCR 키트 <ul style="list-style-type: none"> - 조류(닭, 오리), 돼지, 말, 반려동물(개, 고양이)용 진단키트 6종 - direct RT-LAMP PCR기법의 적용(돼지) <input type="checkbox"/> 인플루엔자 바이러스 아형(H 및 N) 감별진단용 direct RT-PCR 키트 개발 <input type="checkbox"/> 동물별 진단키트 시제품 제작 및 표준 바이러스 시료를 이용한 효능 평가 | 100 |
| | | <ul style="list-style-type: none"> ■ 동물 인플루엔자 바이러스 현장감별용 RT-PCR Prototype 분석광학계 및 분석 SW개발 | <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 휴대용 RT-PCR Proto type 광학계 개발 <input type="checkbox"/> 광학계 성능 평가 <input type="checkbox"/> 광학계 신호처리 보드 및 SW 개발 <input type="checkbox"/> 히터부와 Integration 및 보완 | 100 |
| | | <ul style="list-style-type: none"> ■ 평가용 표준 바이러스 확보 ■ 기존 개발 인플루엔자 검출법 비교 분석 | <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 평가용 표준 바이러스 확보 <input type="checkbox"/> 기존 개발 인플루엔자 검출법 비교 분석 | 100 |

| 구분 | 연도 | 연구개발의 목표 | 연구개발의 내용 | 달성도 (%) |
|------------------|------------------|--|---|---------|
| 2 차 년 도 | 2 0 1 4 | <ul style="list-style-type: none"> ■ RT-PCR 기능과 LAMP-PCR 기능을 통합한 복합기능 PCR 기기 개발 및 PCR 칩 개발 | <ul style="list-style-type: none"> □ 항온블록 온도제어를 통한 pcr 방식 기능 전환 □ RT-PCR과 LAMP-PCR 진단 결과 비교를 통한 진단 평가 정확도 향상 □ uTAS 기술을 이용한 PCR 칩 개발 및 시스템 적용 | 100 |
| | | <ul style="list-style-type: none"> ■ 동물 인플루엔자 바이러스 항바이러스 내성 유전자 감별용 real time RT-PCR 키트 개발 및 현장 진단용 진단 키트 안정성 테스트 | <ul style="list-style-type: none"> □ 동물 인플루엔자 바이러스의 내성 유전자 검출용 real time RT-PCR 키트 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 인플루엔자 바이러스 내성 유전자 3종 동시 진단 real time RT-PCR 키트 개발 □ 동물 인플루엔자 현장 감별진단용 진단키트 제작 및 현장 진단 키트 안정성 테스트 <ul style="list-style-type: none"> - 현장 상태를 고려한 고온, 저온, 상온에서의 진단 키트 안정성 테스트 - 각 온도별 진단 키트와 primer 보존성테스트 | 100 |
| | | <ul style="list-style-type: none"> ■ 동물 인플루엔자 바이러스 현장감별용 RT-PCR Engineering Sample형분석광학계 및 분석 SW개발 | <ul style="list-style-type: none"> □ 휴대용 RT-PCR ES(상용화용)광학계 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 감도 및 재현성 향상 - 광학계 성능 평가 및 보완 □ PCR 전용 SW개발 (분석 SW, Calibration SW) <ul style="list-style-type: none"> - 개발된 시약을 실제 PCR을 통해 검증 - UI SW 개발 □ 임베디드 PCB 보드 개발 <ul style="list-style-type: none"> - Main 보드 설계, 제작 - Firmware 개발 | 100 |
| | | <ul style="list-style-type: none"> ■ 인플루엔자 바이러스 고병원성 여부 감별법 평가 ■ 개발 진단키트 평가 | <ul style="list-style-type: none"> □ 기존 개발 인플루엔자 바이러스 고병원성 여부 감별 법 비교 분석 및 평가 □ 개발 진단 키트 비교 분석 평가 | 100 |

| 구분 | 연도 | 연구개발의 목표 | 연구개발의 내용 | 달성도 (%) |
|------|------|--|--|---------|
| 3차년도 | 2015 | <ul style="list-style-type: none"> ■ 개발된 RT-PCR, LAMP-PCR 시스템 산업화 | <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> RT-PCR 성능 향상을 위한 설계 및 부품 개선 <input type="checkbox"/> LAMP-PCR 성능 향상을 위한 설계 및 부품 개선 <input type="checkbox"/> 동등성 평가 및 성능 검증 <input type="checkbox"/> 산업화를 위한 시제품 홍보 | 100 |
| | | <ul style="list-style-type: none"> ■ 동물 인플루엔자 바이러스 현장진단용 Pan-side RT-PCR 및 real time Pan-side RT-PCR 진단 키트의 효율성 테스트 및 개발 현장 진단 키트의 대량 생산 및 공급 체계 구축 | <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 개발 현장 진단 키트의 효율성 테스트 <ul style="list-style-type: none"> - 야외 시료 및 목적 동물(바이러스 혼입) 시료를 이용하여 기존 진단법과 비교 분석 - 개발 동물 인플루엔자 바이러스 현장 진단 키트와 휴대용 진단 장비의 적합성 테스트 - 직접적인 현장 진단 테스트(실험실내 및 실험실간 맹목시험을 통한 재현성 및 정확도 평가) <input type="checkbox"/> 개발 현장 진단 키트 대량생산 및 공급체계 구축 <ul style="list-style-type: none"> - 개발 진단키트의 국내 진단기관 보급 | 100 |
| | | <ul style="list-style-type: none"> ■ 동물 인플루엔자 바이러스 현장감별용 RT-PCR 양산시제품형 분석광학계 및 분석 SW개발 | <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> RT-PCR기술을 이용한 동물 인플루엔자 복합 진단 기술 개발 <input type="checkbox"/> 광학계 개발 및 양산화 준비 <ul style="list-style-type: none"> - 외부 협력기관 Field test <input type="checkbox"/> Calibration SW 보완 <input type="checkbox"/> UI SW 보완 : 다축종 질병 검사 대응 <ul style="list-style-type: none"> - Data 관리, management SW개발 | 100 |
| | | <ul style="list-style-type: none"> ■ 개발 진단키트 고병원성 감별 여부 평가 ■ 개발 진단키트 야외 적용 평가 ■ 개발 휴대용 기기 야외 적용 평가 | <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 개발 진단키트 고병원성 감별 여부 평가 <input type="checkbox"/> 개발 진단키트 야외 적용 평가 <input type="checkbox"/> 개발 휴대용 기기 야외 적용 평가 | 100 |

4-2. 관련 분야 기여도

- PCR 진단키트 개발 및 산업화로 국내 동물 인플루엔자 진단 키트 시장의 활성화 기여
- 기존진단법 대비 진단효능이 우수하면서도 진단비용 절감으로 인플루엔자 진단기관의 요구와 편의를 충족시키는데 기여
- 동물 인플루엔자바이러스의 신속 정확한 현장 진단을 통한 방역효율성 제고 및 질병 확산 방지 기여
- 인플루엔자 진단키트 및 진단장비의 패키지 판매 및 수출 가능성 확대에 기여
- 관련 기업의 매출확대에 기여

5. 연구결과의 활용계획

가. 추가 연구의 필요성

- (1) 제품 개발을 통한 사업화를 위해서는 시스템의 안정화 및 대량 생산을 위한 시스템을 구축해야함.
 - 양산 공정 Setting
 - 측정기 양산 금형 설계 및 사출 조건 확립
 - 가공 조건 확립
- (2) 사용자 편의성을 고려한 고급 디자인 설계
 - 사용자 및 사용자 기준에 맞는 디자인 설계 필요
 - 양산성을 고려한 디자인
- (3) 기구설계 및 양산 최적화
 - 제조원가 및 조립성 등 양산성을 고려한 기구설계 및 최적화 필요
- (4) 성능 검증 및 Field test 강화
 - 분석 시료를 바탕으로 Technical Performance를 다양한 기준으로 평가해야함
 - 성능 검증 및 유효성 평가를 강화하는 추가 연구개발 필요
- (5) 인허가 범위 확대
 - 맞춤형 진단 시스템으로의 활용을 위해서는 진단인자에 따른 인허가 획득 진행
 - 국가별 인허가 진행 컨설팅 및 추가 요구사항에 따른 연구 필요

나. 타 연구에의 응용

- (1) 맞춤형 진단 시스템 사업화
 - 측정 아이템의 구분 및 현장 진단성과 인간 적용성등을 고려한 POCT용 진단 기술에 응용 가능
- (2) 정밀온도 제어 기술의 응용
 - 정밀 분석 기술 및 정밀 온도 제어 기술을 바탕으로 한 휴대형 체외진단 시스템 응용 개발

다. 사업화 추진방안

- (1) 조류 독감 및 구제역 등 방역관련 진단 사업 확대
 - PCR을 기반으로 한 인수 공통 또는 동물성 감염 질환들에 대한 진단 사업 추진 예정(2017년)
 - 진단 키트의 원천 기술 내재화 추진
- (2) 분자 진단 사업 확대
 - 현재 자사는 임상화학을 기반으로 한 체외진단 스트립 및 측정기를 주요 제품군으로 구성하고 있음.
 - 본 사업 결과를 바탕으로 체외분자 진단 사업 분야로의 확대를 추진할 예정임(2019년)
 - 본 사업 결과의 확대를 통한 감염성 질환 진단 사업분야로의 확대 예정임(2018년)

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보(해당없음)

| | | |
|---|------|------|
| | 코드번호 | D-08 |
| ○ | | |

7. 연구개발결과의 보안등급

| | | |
|--|------|------|
| | 코드번호 | D-09 |
| ○ 일반과제로서 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음 | | |

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황(해당없음)

| | | | | | 코드번호 | D-10 | | |
|-------|----------------|-------------|----|--------|---------------|---------------|------------------|----------------|
| 구입 기관 | 연구시설/ 연구장비명 | 규격 (모델명) | 수량 | 구입 연월일 | 구입 가격 (천원) | 구입처 (전화번호) | 비고 (설치 장소) | NTIS장비 등록번호 |
| | | | | | | | | |

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

| | | |
|---|------|------|
| | 코드번호 | D-11 |
| <p>1. 일상점검</p> <ul style="list-style-type: none"> - 연구개발 활동에 사용되는 기계·기구·전기·가스 등의 실험기 자재와 약품·병원체 등 실험재료의 이상 유무와 보호장비의 관리실태 등을 점검하고 그 결과를 기록·유지하도록 한다. => 최종 퇴실자 및 점검 사항, 퇴실 시간을 기록 관리함 - 일상점검을 실시하는 자는 사고 및 위험 가능성이 있는 사항을 발견할 경우 즉시 당해 연구책임자에게 보고하고 안전에 관한 지시를 받아 필요한 조치를 취하도록 한다. => 안전사고가 발생하지 않았지만, 비상연락망을 바탕으로 조치를 취하고 있음 <p>2. 특별안전점검</p> <ul style="list-style-type: none"> - 폭발, 화재 등 연구활동 종사자에게 치명적인 위험을 야기할 사고발생 가능성이 있을 것으로 예상되는 장비, 시설의 사용을 위해 정기적으로 월 1회, 특별 안전점검을 실시한다. => 한국생명공학연구원 내 바이오벤처센터에 입주된 상태이며, 한국생명공학연구원에서 안전점검을 할 때 같이 관리받고 있음. <p>3. 특별교육훈련 및 건강검진 참여</p> <ul style="list-style-type: none"> - 매년 정기적으로 연구관련 안전교육 훈련 및 전문가 교육과정에 해당 연구원의 참여를 독 | | |

려하여 교육하도록 한다.

=>회사에서 전체적으로 안전교육 자료를 게시판을 통해 공유하고 교육을 이수하고 있음

- 매년 정기적으로 전염병 위해관리 건강검진 및 예방접종에 참여한다.

=>년 1회 건강검진을 받음

4. 농림수산물검역검사본부 실험실안전관리지침 (농림수산물검역검사본부 훈령 제57호, 2012.3.26) 에 의거하여 연구개발 사업 수행 시 필요한 연구실 안전관리를 실시하고 있음

=> 회사 입사시 안전교육을 받으며, 정기적으로 회사에서 실시하고 있음.

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

| 번호 | 구분 (논문/ 특허/ 기타) | 논문명/특허명/기타 | 소속 기관명 | 역할 | 논문게재지/ 특허등록국 가 | 코드번호 | | D-12 | |
|----|--------------------------|--|-----------|------|--------------------------------------|------------------|-----------------|------------------------------|----------------------------|
| | | | | | | Impact Factor | 논문게재일 /특허등록일 | 사사여부 (단독사사 또는 중복사사) | 특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등) |
| 1 | 논문 | Uracil-DNA glycosylase-treated reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of avian influenza virus preventing carry-over contamination | 경북대학교 | 교신저자 | Journal of veterinary science / 대한민국 | 1.076 | 2016.09.30 | 중복사사 | SCI |
| 2 | 특허 | DNA 분석 장비용 온도 조절 장치 | 미코바이오메드 | 특허 | 대한민국 | | 2017.1.17 | | |

11. 기타사항

| 코드번호 | D-13 |
|------|------|
| ○ 없음 | |

12. 참고문헌

Aslanzadeh J. 2004. Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory. Annals Clin Lab Sci 34: 389-396.

Bellstedt DU, Pirie MD, Visser JC, de Villiers MJ, Gehrke B. 2010. A rapid and inexpensive

- method for the direct PCR amplification of DNA from plants. *Am J Botany* e65-e68.
- Biswas C, Dey P, Satpathy S. 2014. A method of direct PCR without DNA extraction for rapid detection of begomoviruses infecting jute and mesta. *Lett Appl Microbiol* 58: 350-355.
- Cheng ZJ, Hu LH, Fu WR, Li YR. 2007. Rapid quantification of hepatitis B virus DNA by direct real-time PCR from serum without DNA extraction. *J Med Microbiol* 56: 766-771.
- Cho AR, Dong HJ, Cho SB. 2013. Rapid and Sensitive Detection of Salmonella spp. by Using a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay in Duck Carcass Sample. *Korean J. Food Sci. An* 33: 655-663.
- Cho HS and Park NY. 2005. Detection of canine distemper virus in blood samples by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J Vet Med B* 52: 410-413.
- Dhama K, Karthik K, Chakraborty S, Tiwari R, Kapoor S, Kumar A, Thomas P. 2014. Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review. *Pak J Biol Sci* 17: 151-166.
- Dong HJ, Cho AR, Hahn TW. 2014. Seongbeom Cho. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification assay to detect shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle. *J Vet Sci* 15: 317-325.
- Duncan BK. 1981. DNA glycosylases. pp. 565-586. In: Boyer P(ed). *The Enzymes*. 3rd ed. Academic Press, New York.
- Hwang ES, Lee TU, Jung EY, Cho HS. 2011. Development of loop-mediated isothermal amplification method for the rapid and sensitive detection of bovine tuberculosis in Korea native cattle. *Korean J Vet Serv* 34: 333-339.
- Kwok S and Higuchi R. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature (London)* 339: 237-238.
- Li Z, Li J, Zhang Y, Li L, Ma L, Li D, Gao F, Xia Z. 2012. Aerosolized avian influenza virus by laboratory manipulations. *Virology J* 9: 146(1-8).
- Li Y, Mustapha A. 2002. Evaluation of four template preparation methods for polymerase chain reaction-based detection of Salmonella in ground beef and chicken. *Lett Appl Microbiol* 35: 508-512.
- Longo MC, Beminger MS and Hartley JL. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93: 125-128.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino and N, Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28: 63-69.
- OIE. 2012. Manual of diagnostic test and Vaccines for terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf.
- Peiris JS, Poon LL, Guan Y. 2009. Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S-OIV) H1N1 virus in humans. *J Clin Virol* 45: 169-173.
- Persing DH. 1990. Polymerase chain reaction: trenches to benches. *J Clin Microbiol* 29: 1281-1285.
- Song MK, Chang J, Hong Y, Hong S, Kim SW. 2009. Direct multiplex reverse

transcription-nested PCR detection of influenza viruses without RNA purification. *J Microbiol Biotechnol* 19: 1470-1474.

Tetzner R. 2009. Prevention of PCR cross-contamination by UNG treatment of bisulfite-treated DNA. *Methods Mol Biol* 507: 357-370.

Vijaykrishna D, Poon LL, Zhu HC, Ma SK, Li OT, Cheung CL, Smith GJ, Peiris JS, Guan Y. 2010. Reassortment of pandemic H1N1/2009 influenza A virus in swine. *Science* 328: 1529.

Wang R, Taubenberger JK. 2010. Methods for molecular surveillance of influenza. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8: 517-527.

WHO. 2010. Pandemic(H1N1)2009-update100. http://www.who.int/csr/don/2010_05_14/en/index.html

Yoo MS, Noh JH, Yoon BS, Reddy KE, Kweon CH, Jung SC, Kang SW. 2012. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for sensitive and rapid detection of Korean sacbrood virus. *J Virol Methods* 186: 147-151.

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

| | | | | | |
|---------------------------------|--|-----------|-------------------|-----------------------------|----|
| 과 제 명 | (국문) 다축종 (산업동물 및 반려동물 포함) 적용 가능한 신속, 정확한 인플루엔자 검출 기법 개발 및 상용화 | | | | |
| | (영문) Development and commercialization of quick and accurate influenza detection technology adaptable for multiple livestock | | | | |
| 주관연구기관 | (주)미코바이오메드 | | 주 관 연 구 책 임 자 | (소속)미코바이오메드 기술연구소 | |
| 참 여 기 업 | 비아이티벨류, (주)나노헬릭스 | | | (성명) 박 현 규 | |
| 총연구개발비 (1,561,400천 원) | 계 | 1,561,400 | 총 연구 기간 | 2013.12.24 ~ 2016.12.23(3년) | |
| | 정부출연 연구개발비 | 1,200,000 | 총 참 연 구 원 수 | 총 인원 | 99 |
| | 기업부담금 | 361,400 | | 내부인원 | 99 |
| | 연구기관부담금 | 0 | | 외부인원 | 0 |

○ 연구개발 목표 및 성과

가. 현장적용 가능한 신속, 정확한 다축종 인플루엔자 진단 키트 개발을 통해 16종 키트 제품화 성공
 나. RT-PCR 및 LAMP-PCR 진단 기기 개발 및 제품화 완료
 다. 개발된 현장 적용 가능한 다축종용 인플루엔자 진단 키트의 유효성 평가 완료 및 기기 검증 완료

○ 연구내용 및 결과

가. 동물 인플루엔자 바이러스의 현장 진단을 위한 고효율, 비용절감형 Pan-side RT-PCR 및 real time RT-PCR 진단키트 개발 및 상용화

(1) 동물 및 조류 인플루엔자 바이러스 진단용 RT-PCR 및 real time RT-PCR 진단키트 개발을 완료하였으며, 해당 진단키트들에 대한 진단효율(민감도 및 특이성)을 검증 완료 및 시제품 생산

- 조류 인플루엔자 주요 아형 및 뉴캐슬병 바이러스 감별진단용 RT-PCR 및 real time RT-PCR 진단키트
- 돼지 인플루엔자 주요 아형 및 신종인플루엔자 바이러스 감별진단용 RT-PCR 및 real time RT-PCR 진단 키트
- 말 및 반려동물(개, 고양이) 인플루엔자바이러스 감별진단용 RT-PCR 및 real time RT-PCR 진단 키트
- 인플루엔자 바이러스 H 아형 (H1-H16) 분석용 RT-PCR 진단키트
- 인플루엔자 바이러스 N 아형 (N1-N9) 분석용 RT-PCR 진단 키트

(2) 현장진단용으로 활용하기 위하여 핵산추출과정을 단순화한 direct RT-PCR 및 real time RT-PCR 진단법을 개발하였고, 진단효율(민감도 및 특이도) 검증 및 시제품 생산 완료

(3) 현장진단용으로 활용 가능한 RT-LAMP 개발분야에 있어서는 모든 아형의 동물 인플루엔자 바이러스 검출이 가능한 RT-LAMP와 조류인플루엔자 H5아형 진단용 RT-LAMP를 개발하여 진단효율(민감도 및 특이성) 검증 및 시제품 제작 완료

(4) 동물 인플루엔자 바이러스의 항 바이러스제 내성 유전자 검출용 키트를 개발하여 진단효율 검

증을 완료

(5) 상시 연구결과들은 6편의 논문게재 및 2건의 기술이전을 통하여 정량적 연구 성과 목표를 달성하였음.

나. 개발된 현장적용 가능한 다축중용 인플루엔자 진단 키트 및 휴대용 기기의 유효성 평가

- (1) 인플루엔자 A 바이러스 HA subtype 별 (HA1 ~ HA16) 표준 바이러스 확보
- (2) 개발 진단 키트 비교 분석 평가 완료
- (3) 개발 진단키트 인플루엔자 바이러스 고병원성 감별 여부 평가 완료
- (4) 개발 진단키트 야외 적용 평가 완료

다. RT-PCR 진단 키트를 이용하여 현장에서 단시간내에 인플루엔자의 정확한 판정이 가능한 휴대용 고속 RT-PCR 진단기기, 기술 개발 및 상용화

- (1) 소형 광학계 개발을 통한 고속 스캔형의 모듈 개발 완료
- (2) RT-PCR용 및 LAMP-PCR용 광학 모듈 개발 완료 및 제품화(시스템 통합)
- (3) 24well에 대한 고속 스캔 방식과 측정 홀간 편차 최소화 알고리즘 구축 완료
- (4) 형광 Data 취득 알고리즘 구축 완료
- (5) RT-PCR, real time RT-PCR, RT-LAMP PCR의 상용화를 위한 시스템 기구설계 및 개발
 - 다중 분석을 위한 시스템 구축(16~24 sample 처리)
 - 다중 분석을 위한 Hole간의 균일한 온도 유지 기술 개발
 - 정밀 온도 컨트롤 모듈 개발
 - 2종의 시제품 개발 완료
- (6) 시스템 운영을 위한 Firmware 및 UI 개발
 - 온도 모듈 및 릴레이 등을 위한 정밀 온도 제어
 - UI 개발
 - 정밀 온도 제어를 위한 PID 제어 알고리즘 및 프로토콜 최적화
- (7) 시스템 운영 최적화
 - 광학모듈 및 온도제어를 위한 통한 보드 개발 및 알고리즘 최적화
 - Debugging을 통한 프로그램 최적화
- (8) 현장 적용 용이성을 위한 키트 개발
- (9) 5건의 국내 특허 출원, 2건의 PCT출원, 1건의 국내 특허 등록

○ 연구성과 활용실적 및 계획

가. 연구성과 활용실적

- (1) 기업체 기술이전 2건 실시 완료
- (2) RT-PCR 및 LAMP-PCR 2종 제품화
- (3) 감염성 질환 관련 16종의 진단 키트 제품화

나. 연구성과 활용계획

- (1) 진단법을 활용한 진단키트의 제품 다양화
- (2) 확보된 표준 바이러스를 이용한 유효성 검증 및 성능 평가 활용
- (3) 시스템의 안정화 및 대량 생산을 위한 시스템을 구축
 - 양산 공정 Setting
 - 측정기 양산 금형 설계 및 사출 조건 확립

- 가공 조건 확립
- (4) 사용자 편의성을 고려한 고급 디자인 설계
 - 사용자 및 사용자 기준에 맞는 디자인 설계 필요
 - 양산성을 고려한 디자인
- (5) 기구설계 및 양산 최적화
 - 제조원가 및 조립성 등 양산성을 고려한 기구설계 및 최적화 필요
- (6) 성능 검증 및 Field test 강화
 - 분석 시료를 바탕으로 Technical Performance를 다양한 기준으로 평가해야함
 - 성능 검증 및 유효성 평가를 강화하는 추가 연구개발 필요
- (7) 인허가 범위 확대
 - 맞춤형 진단 시스템으로의 활용을 위해서는 진단인자에 따른 인허가 획득 진행
 - 국가별 인허가 진행 컨설팅 및 추가 요구사항에 따른 연구 필요

자체평가의견서

1. 과제현황

| | | | | | |
|---------------------|--|---------------------------|-----------|---------|-----------|
| | | | 코드번호 | D-15 | |
| | | | 과제번호 | | |
| 사업구분 | 가축질병대응기술개발사업 | | | | |
| 연구분야 | | | | 과제구분 | 단위 |
| 사업명 | 가축질병대응기술개발사업 | | | | 주관 |
| 총괄과제 | 기재하지 않음 | | | 총괄책임자 | 기재하지 않음 |
| 과제명 | 다축종 (산업동물 및 반려동물 포함) 적용 가능한 신속, 정확한 인플루엔자 검출 기법 개발 및 상용화 | | | 과제유형 | (개발) |
| 연구기관 | (주)미코바이오메드 | | | 연구책임자 | 박현규 |
| 연구기간 연구비 (천원) | 연차 | 기간 | 정부 | 민간 | 계 |
| | 1차년도 | 2013.12.24~ 2014.12.23 | 396,000 | 122,200 | 518,200 |
| | 2차년도 | 2014.12.24~ 2015.12.23 | 403,000 | 127,000 | 530,000 |
| | 3차년도 | 2015.12.24~ 2016.12.23 | 401,000 | 112,000 | 513,000 |
| | 계 | 2013.12.24~ 2016.12.23 | 1,200,000 | 361,200 | 1,561,200 |
| 참여기업 | 경북대학교 산학협력단, 비아이티밸류, 농림축산검역본부 | | | | |
| 상대국 | | | | 상대국연구기관 | |

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2016.11.24

3. 평가자(연구책임자) :

| | | |
|------------|------|-----|
| 소속 | 직위 | 성명 |
| (주)미코바이오메드 | 연구소장 | 박현규 |

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

| | |
|----|--|
| 확약 | |
|----|--|

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

최근 다양한 PCR 제품의 상용화가 이루어지고 있는 상황에서 고정밀 온도제어 기술을 바탕으로한 RT-PCR 시스템 및 Real time Lamp-PCR의 제품화를 수행 완료함.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

5종의 동물(말, 돼지, 오리, 개, 고양이)에 대한 감염성 질환(인플루엔자 등)을 실시간으로 빠르게 진단할 수 있는 16종의 진단키트를 사업화 했으며, 검역본부에서 유효성 평가를 수행한 결과 현장 적용성이 높다고 판단되어 국가적 재난이 발생하기 전 빠르게 대처 및 대응이 가능할 것으로 기대됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

현장에서 진단하고 평가할 수 있는 키트를 비롯한 시스템의 활용성을 바탕으로 사업화를 통해 시장 공급이 가능할 것으로 보임.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

감염성 질환 진단을 위한 각종 진단 키트의 사업화를 위한 연구개발 노력과 정밀온도 제어 기술이 필요한 PCR 시스템을 2종을 제품화한 것을 높이 평가함.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 논문 실적은 당초 6건 (SCI3, 비SCI3) 대비 6건으로 실적을 완료하였으나 SCI 논문 실적이 2건 부족하나 개발 인플루엔자 진단법과 장비에 대한 효능평가가 3년차에 집중되어 진행되었고, 효능 평가 이후 관련 수준이 높은 논문 작성이 가능함을 고려할 때 연구기간 종료 이후 충분히 달성 가능하며, 현재 진단법 개발기관(경북대)과 효능평가기관(검역본부)에서 각각 1편의 SCI 논문을 작성 중에 있음.

- 지적재산권의 경우 당초 목표(출원3, 등록 2) 대비 출원 5 및 등록 1건으로 등록건수가 1건 부족하나 기 출원된 지적재산권의 무난한 등록이 예상되므로 향후 초과 달성이 예상됨

II. 연구목표 달성도

| 세부연구목표 (연구계획서상의 목표) | 비중 (%) | 달성도 (%) | 자체평가 |
|--|-----------|------------|--|
| 실제 적용 가능한 RT-PCR, LAMP-PCR 개발 및 PCR Plate 개발 | 25 | 100 | RT-PCR 및 LAMP-PCR 2종 제품화 성공 PCR 적용용 Plate 개발 완료(2종) |
| 동물 인플루엔자 바이러스 현장감별용 Pan-side RT-PCR 및 real time RT-PCR 키트 개발 | 25 | 100 | 당초 목표한 축종별 인플루엔자 진단을 위한 RT-PCR 및 real time RT-PCR, 키트 개발을 완료하였으며 현장진단용으로 활용가능한 direct real time RT-PCR 및 RT-LAMP 진단법을 개발하고, 시제품을 생산하여 평가기관(검역본부)에 제공 완료하였음 |
| PCR용 형광 광모듈 개발 | 25 | 100 | RT-PCR 및 LAMP-PCR 적용을 위한 고속 스캔 방식의 형광 측정용 광모듈 개발 완료 |
| 평가용 표준바이러스 확보 및 기존 개발 인플루엔자 검출법 비교 분석 | 25 | 100 | 표준 바이러스 확보 및 인플루엔자 검출법 검토 및 검증 완료 현장 적용 및 제품화 가능 |
| 합계 | 100점 | | |

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

Real time RT-PCR 및 Real time LAMP-PCR 시스템의 2종에 대한 제품화와 조류독감을 진단할 수 있는 16종의 키트 제품화를 높이 평가하며, 검역본부에서 유효성 평가를 수행하였기에 빠른 시일내에 시장 공급을 통해 관련 기업의 매출 확대가 기대됨.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

짧은 기간에 2종의 시스템과 16종의 진단 키트에 대한 제품화시킨 결과에 대한 긍정적인 검토가 필요함.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

연구결과물을 토대로 기업의 비즈니스를 창출하고 매출을 확대하기 위한 추가적 지원(조건부 구매 등)으로 시장 공급과 세계적으로 경쟁력있는 시스템으로 평가 받을 수 있도록 관리와 제품 안정화에 꾸준한 지원이 필요함. 세계적으로 인정을 받기 위해서는 품질이 제일이며, 이는 수많은 테스트와 검증을 통해 개선이 있어야 가능한 부분이기 때문임.

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

해당없음.

2. 연구기관 자체의 검토결과

해당없음.

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

| | | | | |
|---------------|--|---------|--------------|-----------|
| 사업추진형태 | <input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제 | 분 야 | 가축질병대응기술개발사업 | |
| 연구과제명 | 다축종 (산업동물 및 반려동물 포함) 적용 가능한 신속, 정확한 인플루엔자 검출 기법 개발 및 상용화 | | | |
| 주관연구기관 | (주)미코바이오메드 | 주관연구책임자 | 박현규 | |
| 연구개발비 (천원) | 정부출연 연구개발비 | 기업부담금 | 연구기관부담금 | 총연구개발비 |
| | 1,200,000 | 361,400 | 0 | 1,561,400 |
| 연구개발기간 | 2013.12.24 ~ 2016.12.23 | | | |
| 주요활용유형 | <input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타 (자체사업화) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:) | | | |

2. 연구목표 대비 결과

| 당초목표 | 당초연구목표 대비 연구결과 |
|--|--|
| 실제 적용 가능한 RT-PCR, LAMP-PCR 개발 및 PCR Plate 개발 | RT-PCR 및 LAMP-PCR 2종 제품화 성공 PCR 적용용 Plate 개발 완료(2종) |
| 동물 인플루엔자 바이러스 현장감별용 Pan-side RT-PCR 및 real time RT-PCR 키트 개발 | 당초 목표한 축종별 인플루엔자 진단을 위한 RT-PCR 및 real time RT-PCR, 키트 개발을 완료하였으며 현장진단용으로 활용가능한 direct real time RT-PCR 및 RT-LAMP 진단법을 개발하고, 시제품을 생산하여 평가기관(검역본부)에 제공 완료하였음 |
| PCR용 형광 광모듈 개발 | RT-PCR 및 LAMP-PCR 적용을 위한 고속 스캔 방식의 형광 측정용 광모듈 개발 완료 |
| 평가용 표준바이러스 확보 및 기존 개발 인플루엔자 검출법 비교 분석 | 표준 바이러스 확보 및 인플루엔자 검출법 검토 및 검증 완료 현장 적용 및 제품화 가능 |

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

| 성과목표 | 사업화지표 | | | | | | | | | | 연구기반지표 | | | | | | | |
|------|-----------|--------|--------|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------------|--------|--------|------------------|------------------|-------------|--------|-------------------------|
| | 지식 재산권 | | | 기술 실시 (이전) | | 사업화 | | | | | 기술 인 증 | 학술성과 | | 교 육 지 도 | 인 력 양 성 | 정책 활용·홍보 | | 기 타 (타 연 구) |
| | 특 허 | 특 허 | 품 종 | 건 수 | 기 술 | 제 품 | 매 출 | 수 출 | 고 용 | 투 자 | | 논 문 | 학 술 | | | 정 책 | 홍 보 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|---|---|---|-------------|---|--------------|--------------|---|---|---|---|---|
| 최종목표 | 5 | 3 | 2 | 2,000 천원 | 4 | 2,000 백만원 | 1,000 백만원 | 2 | 2 | 6 | 6 | 2 |
| 연구기간내 달성실적 | 5 | 1 | 2 | 2,000 천원 | 2 | | | | 1 | 5 | 6 | 2 |
| 연구종료 후 성과창출 계획 | | 2 | | | 2 | 2,000 백만원 | 1,000 백만원 | 2 | 1 | 1 | | |

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

| | | | |
|--------------------------|---|-----------------------|----------|
| 핵심기술명 ¹⁾ | 동물 바이러스 질병 진단용 RT-LAMP, RT-PCR 및 real time RT-PCR 개발 및 평가 | | |
| 이전형태 | <input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상 | 기술료 예정액 | 1,000 천원 |
| 이전방식 ²⁾ | <input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타() | | |
| 이전소요기간 | 3개월 이내 | 실용화예상시기 ³⁾ | 2017 |
| 기술이전시 선행조건 ⁴⁾ | 특이사항 없음 | | |

| | | | |
|--------------------------|---|-----------------------|----------|
| 핵심기술명 ¹⁾ | 동물 인플루엔자 바이러스 진단용 RT-PCR/real time RT-PCR 개발 및 평가 기술 노하우 | | |
| 이전형태 | <input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상 | 기술료 예정액 | 1,000 천원 |
| 이전방식 ²⁾ | <input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타() | | |
| 이전소요기간 | 3개월 이내 | 실용화예상시기 ³⁾ | 2017 |
| 기술이전시 선행조건 ⁴⁾ | 특이사항 없음 | | |

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)