

발간등록번호

11-1543000-002016-01

역유전학을 이용한 돼지 유행성 설사병 백신 개발
(Development of PED vaccine using reverse
genetics)

녹십자수의약품 주식회사

농림축산식품부

< Contents >

1. The outline of research and development task.....	5
2. Situations of the related research.....	15
3. Contents and results of the research.....	18
4. Achievements and contributions of the research.....	124
5. Application plans of research results.....	125
6. Collected international scientific and technical intelligenceduring research and development task.....	126
7. A security rating of research and development results.....	127
8. Research facilities and equipments registered in the National Science and Technology Comprehensive Information System.....	127
9. A implementation of safety measures in laboratory during research and deveopment task.....	127
10. Representative achievements of research and development task.....	128
11. Others.....	128
12. References.....	129

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요.....	5
2. 국내외 기술개발 상황.....	15
3. 연구수행 내용 및 결과.....	18
4. 목표달성도 및 관련분야 기여도.....	124
5. 연구결과의 활용계획.....	125
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	126
7. 연구개발결과의 보안등급.....	127
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황.....	127
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적.....	127
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적.....	128
11. 기타사항.....	128
12. 참고문헌.....	129

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “역유전학을 이용한 돼지 유행성 설사병 백신 개발”(개발기간 : 2014.09.25 ~ 2017.09.24.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 12. 26.

주관연구기관명 : 녹십자수의약품주식회사 김승목
협동연구기관명 : (주)바이오포아 조선희
협동연구기관명 : 서울대학교 산학협력단 김성철



주관연구책임자 : 녹십자수의약품 주식회사 문형준
협동연구책임자 : (주) 바이오포아 조선희
협동연구책임자 : 서울대학교 수의과대학 박건택

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	114055-3	해당 단계 연구 기간	2014.09.25.~ 2017.09.24.(3년)	단계 구분	없음
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대과제명	역유전학을 이용한 돼지 유행성 설사병 백신 개발			
	세부 과제명	역유전학을 이용한 PED백신의 생산 체계 확립 역유전학을 이용한 PED 백신주 작출 역유전학을 이용한 PED백신의 전임상 평가			
연구책임자	문형준	해당단계 참여 연구원 수	총: 63명 내부: 63명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부: 870,000 천원 민간: 291,000 천원 계: 1,161,000 천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 63명 내부: 63명 외부: 0명	총 연구개발비	정부: 870,000 천원 민간: 291,000 천원 계: 1,161,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	녹십자수의약품주식회사			참여기업명	녹십자수의약품 바이오포아
위탁연구	해당없음			해당없음	
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)				보고서 면수	132

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	최근 국내외 양돈 산업에서 가장 문제시 되는 바이러스성 설사질환인 돼지유행성설사를 방제하기 위한 역유전학을 이용한 백신 개발					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> - PED바이러스 역유전학 시스템 확립: 다양한 PEDV 바이러스 역유전학 시스템을 확립하였음. Target RNA recombination, BACs system - 역유전학을 이용한 PED바이러스 작출: 세포적응이 완료된 PEDV의 역유전학을 이용한 작출뿐 아니라 세포적응과정을 거치지 않은 최근 야외주 PEDV의 S1 gene을 그대로 갖는 PEDV의 작출에 성공함. - 야외 가검물의 수집 및 유전자 분석: 다년간 의뢰된 PED 가검물을 이용한 PEDV의 분자역학 자료 확립 완료 - 분리된 야외주 PED바이러스 배양: PED 분리중 다른 바이러스 혼입으로 인한 순수 분리 실패, 유전학적 특징 확보 완료 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> - 본 과제를 통하여 부유세포 배양으로의 전환을 시도하게 되었음. 비록 완전한 형태의 부유세포 배양 기술은 아니지만 microcarrier를 통해 배양할 수 있는 기반이 조성되어 차후 개선 발전 방향에 대한 연구가 가능하게 되었음. - 본 과제를 통해 개발된 감별진단 프라이머 세트의 경우 현재 백신제조사에서 다루는 크게 두가지 종류의 PED바이러스를 효과적으로 감별할 수 있는 기술로 백신의 품질관리에 크게 기여할 것으로 보임, 좀 더 편리한 방법으로 감별할 수 있는 방법도 개발할 수 있을 것으로 판단됨. - BACs system을 이용한 PEDV full length cDNA작출, 이를 이용하여 역유전학 PED바이러스의 back bone바이러스인 PEDV DR13바이러스를 작출해 냄. 본 시스템을 이용하여 다양한 PED바이러스를 작출해 낼 수 있는 기반 시스템 확립 - 야외주에서 모니터링을 통하여 얻은 유전적 정보는 현재 PEDV의 발생패턴을 확인 할 수 있는 농가 정책자료로 사용될 수 있고 향후 돼지 사육농가에서의 경제적 안전성을 확보할 수 있음. 					
중심어 (5개 이내)	돼지유행성설사	동물용 백신	역유전학	아주반트		

< SUMMARY >

		코드번호	D-02		
Purpose& Contents	Recently developed vaccine using reverse genetics to control swine diarrhea, the most problematic viral diarrheal disease in the domestic and overseas swine industry				
Results	<p>-Establishment of PED virus reverse genetics system: Established various PEDV virus reverse genetics system.</p> <p>-Generation of PED virus using reverse genetics: Successful generation of PEDV with the S1 gene of field PEDV strains, which has not yet undergone cell adaptation process, as well as using reverse genetics of PEDV that has completed cell adaptation.</p> <p>-PED receptor screening: PEDV S gene expression and purification tests were carried out in the domestic field, and cDNA library of pig small intestine epithelium was prepared. However, sufficient expression and purification of S protein to be used in the bioassay system could not be achieved.</p> <p>-Collection and Genetic Analysis of field Samples: Establishment of molecular epidemiology data of PEDV using PED samples submitted for many years</p> <p>- Isolation of PED virus culture: Failure of pure isolation due to mixing of other viruses during PED isolation, and ensuring genetic characteristics</p>				
Expected Contribution	<p>- Through this project, we have attempted to switch to floating cell culture. Although it is not a full-fledged cell culture technology, it is possible to cultivate a microcarrier culture, and it is possible to study the future improvement direction.</p> <p>- The differential diagnosis primer set developed through this project will greatly contribute to the quality control of the vaccine by effectively distinguishing two types of PED viruses currently handled by the vaccine manufacturer. It can be distinguished by a more convenient method.</p> <p>- Rescue the full length cDNA of PEDV from the BACs system. PEDV DR13 strain which is the back bone of the reverse genetics virus of PEDV was successfully rescued by this system. This BACs system can be a fundamental flat form of the manufacture of the various PED virus.</p> <p>-Genetic information obtained through monitoring in field, it's can be used as farming policy data to confirm the present pattern of PEDV, and it can establish secure economic stability in future pig farming farms.</p>				
Keywords	Porcine epidemic diarrhea	animal vaccine	Reverse genetics	adjuvant	

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

가. 연구개발의 목적

(1) 돼지 유행성 설사(Porcine epidemic diarrhea, PED) 발생역학

PED바이러스는 *Coronaviridae*에 속하는 RNA바이러스로 코로나바이러스(Coronavirus)는 RNA바이러스 중 가장 큰 genome을 가지고 있는 바이러스로 사람을 비롯한 포유류, 조류등의 호흡기 및 소화기에 감염증을 일으키며 사람 감기의 10~20%의 원인균이기도 한다. 코로나바이러스 중 사스-코로나(SARS-CoV) 바이러스는 2002년 중국에서 처음 발생하여 전 세계적으로 전파된 예가 있으며, 치사율이 높은 바이러스로 전 세계를 공포에 떨게 했으며 바이러스 유행에 대한 경각심을 갖게 하였다. 중동에서 나타난 메르스 바이러스 (MERS virus) 역시 코로나 바이러스의 일종으로 사스에 이은 코로나 바이러스의 새로운 대유행(pandemic) 질병으로 발전될 가능성이 높아 전 세계의 바이러스 학자들과 보건당국에서 매우 관심있게 지켜보고 있다.

동물의 코로나 바이러스도 많은 종류들이 보고되었고 질병을 일으키고 있지만, 특히 돼지에서의 코로나 바이러스는 설사를 주증상으로 하는 전염성위장염 바이러스(Transmissible Gastroenteritis virus, TGEV)와 돼지 유행성 설사병 (Porcine epidemic diarrhea, PED) 바이러스가 있다. 이중 PED바이러스는 1970년대 유럽에서 시작하여 아메리카, 호주 대륙을 제외한 전세계 양돈산업에 경제적 피해를 주는 질병의 원인체이다. 하지만 미국에서 2013년 봄 PED가 발생함에 따라 현재 북중미 대륙 전체와 남미대륙 일부까지 PED바이러스가 전파되어 피해를 주고 있다..

(가) PED의 원인 및 증상

돼지 유행성 설사(Porcine epidemic diarrhea, PED)는 PED바이러스에 의해 발생하는 돼지의 대표적인 소화기 질환으로 전일령의 돼지에 감수성이 있다. 대부분의 소화기 질병, 다시 말해 설사병과 같이 PED도 어린일령의 포유자돈에 감수성이 크며 질병에 의한 피해도 많이 발생한다. 이는 PED바이러스가 소장의 용모에 있는 장세포에서 증식을 하는데 신생 포유자돈의 경우 장세포의 분화가 빠르게 일어나기 때문에 PED바이러스에 대한 감수성이 높게 나타난다. PED에 감염된 신생자돈은 심한 수양성 설사를 나타내며 다른 어린동물에서와 마찬가지로 흡수부전으로 인한 심각한 탈수로 인해 폐사에 이른다. PED바이러스에 감염된 자돈을 부검하여 장의 육안병변을 살펴보면 그림과 같이 용모의 탈락으로 인한 장벽의 비박화가 뚜렷하게 나타난다.



그림. PED바이러스를 접종한 7일령 자돈의 돼지의 소장

(나) 국내외 PED발생 현황

PED는 1970년대 중반 벨기에와 영국에서 첫 발생보고이후 국내 양돈산업에 막대한 경제적 피해를 유발하였던 대표적인 질병 중 하나로 1990년대 이후로 양돈산업을 하는 국가 중 중국과 일본 등 특히 아시아권 국가에서 발생하였으며, 유럽에서는 1990년대 이전까지는 발생보고가 있었으나 그 이후로는 크게 감소하여 현재는 포유자돈에서 발생이 거의 없거나 경미하게 경과하는 양상이다. 아시아권에서는 일본의 경우 1981년 최초보고되었으며, 중국은 1991년에 한국은 1992년 최초 보고된 후로 지속적으로 발생하고 있으며, 2007년도 이후로는 태국, 베트남, 필리핀 등 동남아국가에서도 발생하여 매년 지속적으로 발생하여 양돈산업에 피해가 크다. 우리나라에서는 90년대에는 PED로 인하여 많은 양돈농가들이 경제적 피해를 받았다. 2000년대 들어서는 구제역 및 돼지열병의 발병 등으로 소독 등의 방역관리가 철저해 지면서 예전에 비해 발생건수가 많이 줄었지만 주기적인 발생을 해왔다.

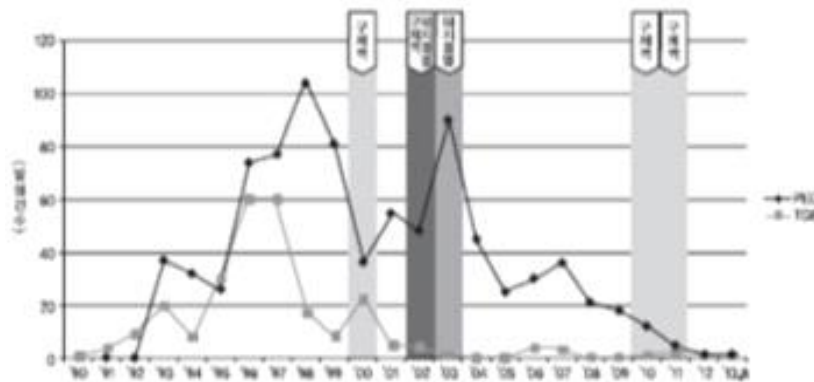


그림. 최근 24년간 연도별 PED, TGE발생 추이 (출처: 문운경, 농림축산검역정보지 아름드리8호, 2013)

2013년 이전까지 PED는 아시아 국가와 일부 유럽국가에서 발생했던 질병이었으나 2013년 5월 이후 미국에서 PED가 최초로 발생하여 미국 전역 (30여개주)으로 퍼졌으며 감염된 포유자돈의 높은 폐사율로 인하여 미국 양돈산업에 막대한 경제적 영향을 주고 있으며, 미국에서 이미 캐나다, 멕시코, 남미 일부 국가로까지 전파되고 있다.

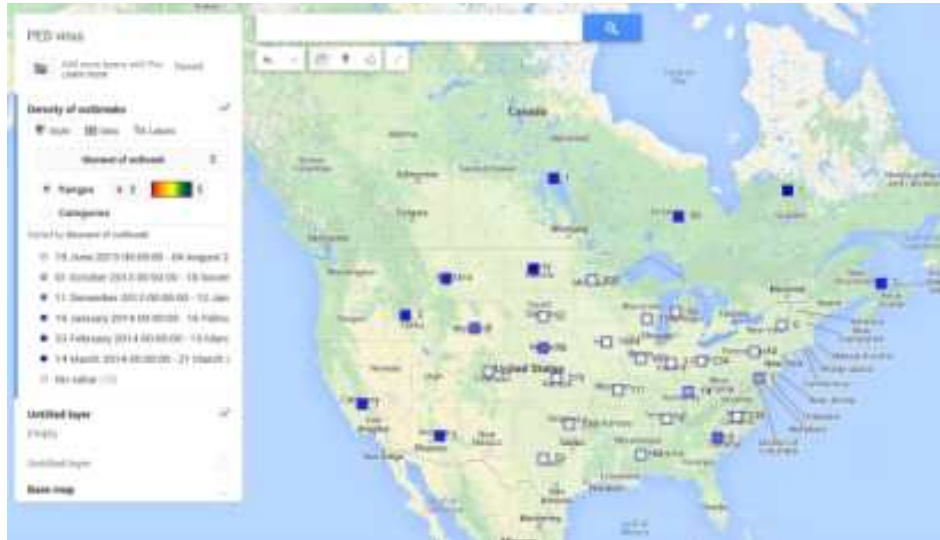


그림. 2013년 이후 미국 PED발생 현황. 최초 미국 중동부 지역에서 발생한 PED는 시간이 지나면서 2014년 현재 캘리포니아주까지 확산이 되어있는 상태이다.

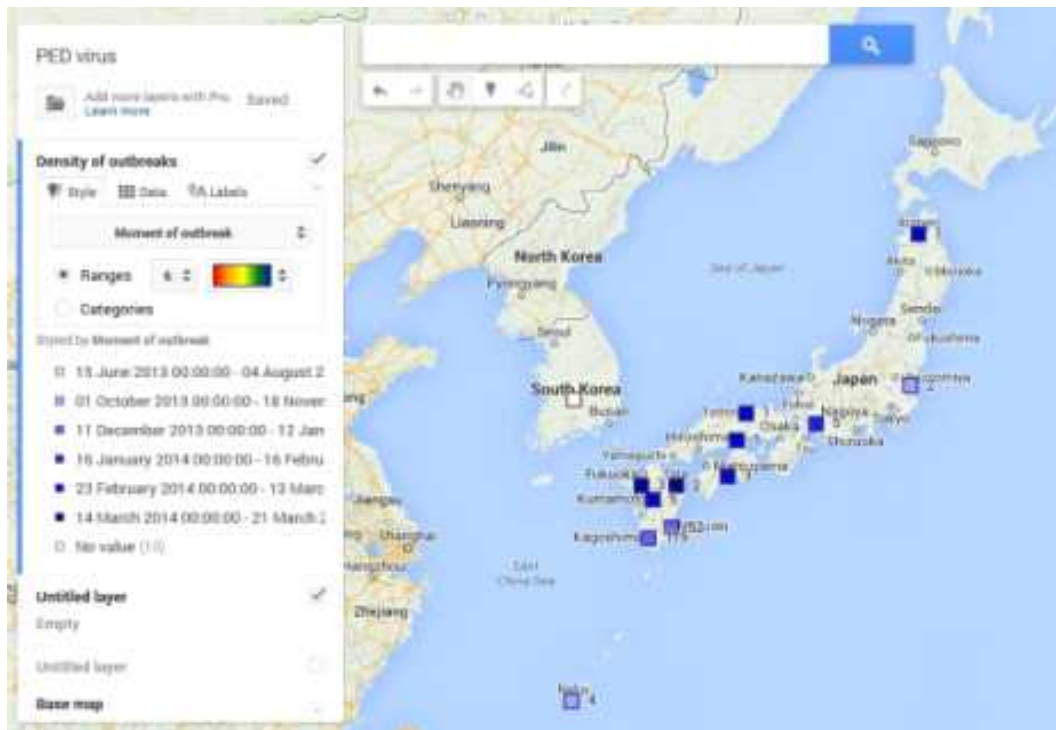


그림. 2013년 11월 한국 PED발생이후 일본 전지역에 PED가 확산되어 있으며 그림에는 도식되어있지 않지만 한국도 많은 농가에서 PED가 발병한 상황이다.

우리나라에서도 2013년 11월 이후 경남, 충남과 경기지역에서 PED가 다시 발생하기 시작했으며 이때 발생한 PED는 쉽게 진정되지 않고 현재 2014년 5월까지도 지속적으로 발생이 증가하고 있는 추세이다. 따라서 상기 그림에 도식된 2013년 8월까지의 자료와 별도로 2014년 5월까지의 발생신고를 도식하면 그림과 같이 PED발생이 급증하고 있다.

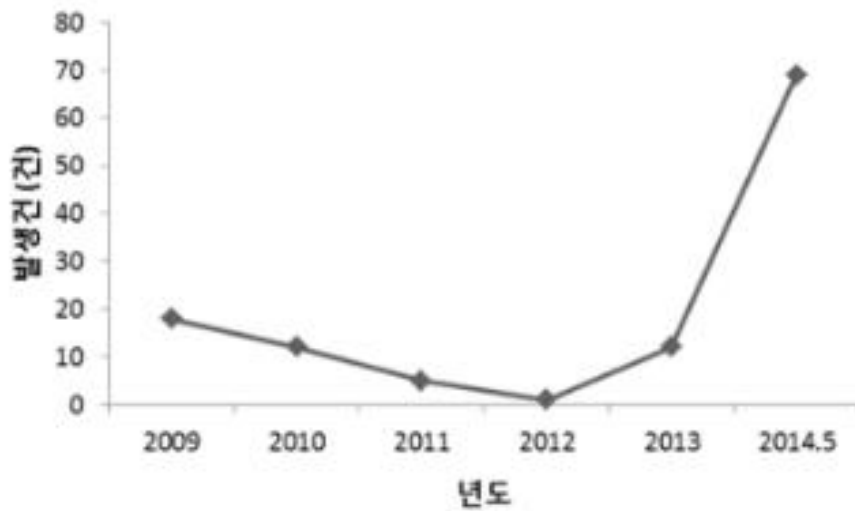


그림. 2013년 이후 우리나라 PED발생 신고 건수

현재까지도 PED발생은 지속적으로 신고되고 있으며 당분간 지속적으로 발생할 것으로 예측된다.

이렇듯 PED는 아시아 지역에서 주로 발생하여 양돈 산업에 영향을 미치는 질병으로만 알려져 있었으나 2013년 갑자기 미국에 출현한 돼지유행성 설사병(PED)은 북중미 대륙 뿐만 아니라 우리나라 일본에 발생하고 있어 감염된 자돈에서 높은 폐사율을 보이고 있다. 특히 PED발생에 전혀 대비를 하고 있지않던 북중미 대륙의 양돈농가는 면역이 없는 상태에서 PED가 발병하여 90~100%의 폐사율을 보였으며, 우리나라에서도 백신접종 군에서도 감염사례가 많이 보고 되고 있어 등 최근 양돈 산업에 있어 가장 심각한 질병이라 할 수 있다.

(2) PED 백신사용 현황

일본을 비롯한 우리나라에서는 1990년대부터 PED에 대한 예방 백신을 개발하여 사용하고 있으며 백신의 사용으로 인해 PED가 산발적으로 발생하는 상황이었었다. 국내 5개 백신 제조사에서 모두 주사용 생독백신과 사독백신을 농림축산검역본부로부터 기술이전 받아 생산 판매하고 있다. 특정 업체에서는 PED백신을 근육으로 주사하지 않고 경구로 접종하여 점막면역을 자극하여 PED바이러스에 대한 IgA를 많이 유도하여

분만시 포유자돈에게 지속적으로 전달할 수 있게 설계된 경구용 PED백신을 시판하고 있다. 뿐만아니라 백신생산 세포 표면에 항체의 Fc분자를 발현하여 면역세포에 의한 탐식이 잘 되도록 만든 PED사독 백신도 시판중이다.

(3) 현재 유행하는 PED바이러스의 문제점

(가) 백신주와 S gene 부위 유전학적 차이 발생

2014년 현재 유럽을 제외한 전세계적으로 유행하고 있는 PED바이러스의 유전형은 시판중인 상용화 백신과 특정 부위의 염기서열에서 차이를 나타내고 있다. 현재 세계적으로 시판되고 있는 상용화 백신은 대부분 1990년대에 유행하던 PED바이러스를 백신주로 사용한 생독백신이나 사독백신이다. 백신주로 사용된 바이러스는 PED바이러스의 프로토타입인 PEDV CV777주와 S gene부위가 98%이상의 상동성을 나타내는 바이러스 이다.

PED바이러스를 포함한 코로나 바이러스에 있어서 S (spike)단백질은 바이러스의 침입 등 바이러스의 생활사에서 중요한 역할을 하는 부분으로 면역원성과도 관련이 있는 것으로 알려진 부분이다.

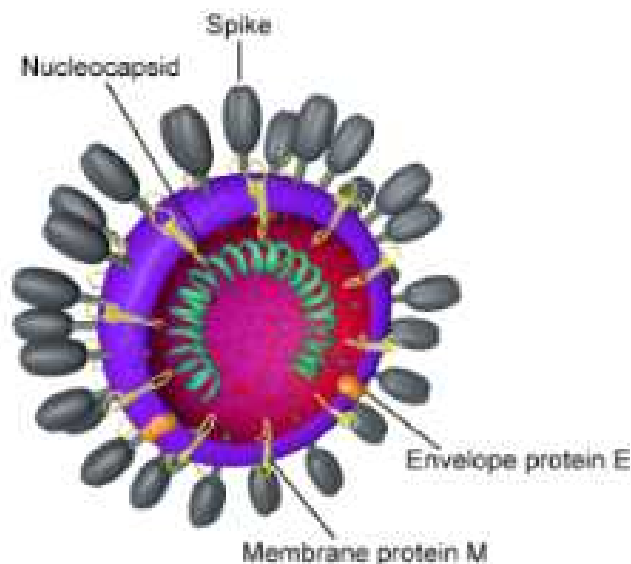


그림. PED바이러스의 구조

2014년까지 출현한 PED바이러스의 S gene의 염기서열을 분석해 본 결과 그림과 같이 검출된 년도와 바이러스의 클러스터가 어느 정도 일치하는 것을 볼 수 있다. 프로토타입인 PEDV CV777과 백신주들이 속해있는 2006년 이전의 클러스터에서 현재 유행하는 바이러스들이 속해있는 클러스터까지 거슬러 올라오면 염기서열과 아미노산 서열에서 각각 93%와 92%의 상동성을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

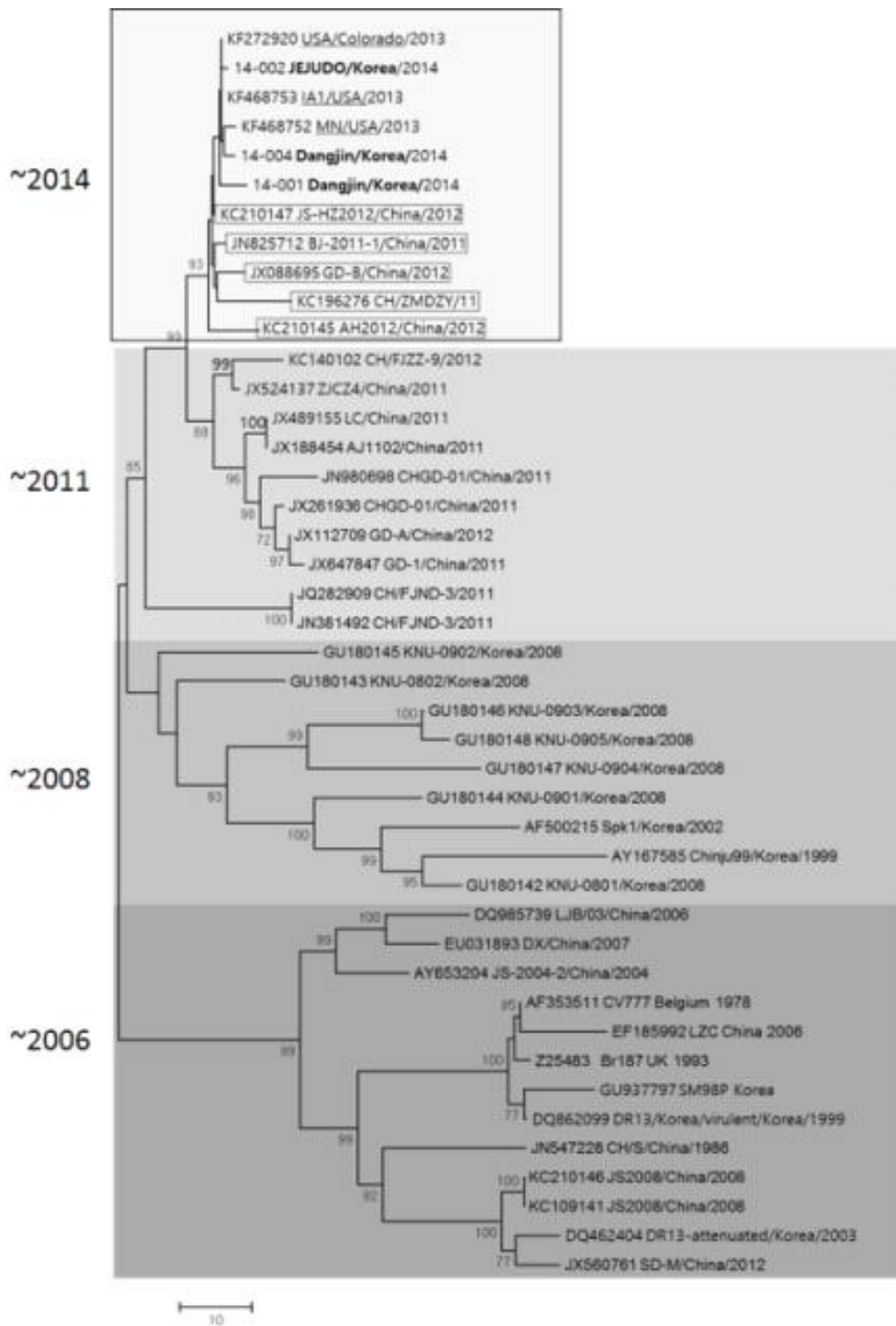


그림. PED바이러스의 S gene(전체)부위의 phylogenetic tree.

S gene 전체에서 8%정도의 아미노산 서열에서 차이를 나타낸다는 이야기인데, S gene 중에서도 앞부분에 해당하는 S1부위는 이러한 바이러스의 특징에 보다 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 즉, 염기서열상 S gene의 처음 30%정도를 차지하는 부분을 S1이라 별도로 구분하는 부위는 receptor binding과 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

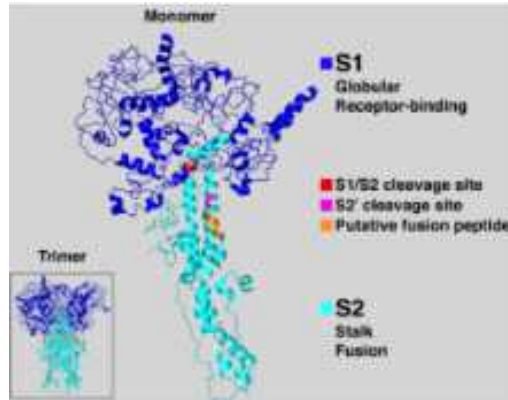


그림. 코로나 바이러스 S 단백질의 구조

현재 유행하는 PED바이러스의 S1부위는 PED백신주의 동일 부위와 염기서열상 약 81% (S1전체가 아닌 S gene 염기서열 1번부터 600번까지) 정도 밖에 일치 하지 않는 것으로 확인되었다.

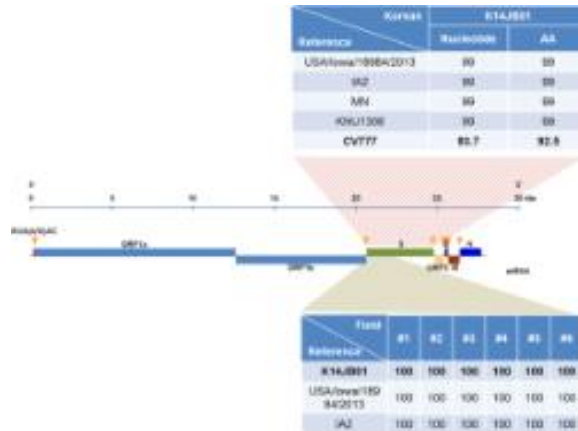


그림. 최근 발생 PED바이러스와 프로토타입 PEDV CV777주와의 S gene에서의 상동성 비교

(나) 백신을 사용함에도 불구하고 발생하는 PED

PED백신을 사용하지 않는 나라의 상황은 차치하더라도 현재 국내에서는 2013년 11월 PED발생 이후 거의 모든 농가들이 백신 접종을 실시하였다. 물론 기존에 PED의 발생이 드물어 PED백신 접종을 하지 않던 농가들도 다수 있으나 매년 백신을 꾸준히 실시했음에도 불구하고 PED발생을 호소하는 농가를 찾아 볼 수 있다. 모든군의 불완전한 면역유도등 Host factor들을 모두 감안한다 하더라도 지속적인 PED의 발생은 상기에서 언급한 현재 유행 PED바이러스와 백신주간의 상동성이 근 20여년의 시간이 지나면서 차이가 발생한 것도 하나의 원인일 것이라는 주장은 2010년이후 꾸준히 제기 되어 왔으며 현재 PED 국내 발생상황에서도 동일한 의문이 제기 되고 있는 실정이기 때문에 이 문제에 대한 해답을 찾아야 한다.

나. 본 연구개발의 필요성

이상에서 언급한 PED 발생의 국내외 상황을 종합해 볼 때 가장 큰 문제는 최근 유행하는 PED바이러스의 유전형이 90년대에 작출된 **1) 백신주와 매년 유전학적인 차이를 보이고 있으며, 2) 백신을 사용하고 있음에도 지속적으로 PED가 발생하고 있다는 점이다.** PED백신은 양돈 농가의 이유자돈 생산과 직접적인 관련이 있으며 모든의 생산성에도 직간접적으로 영향을 미치는 질병이기 때문에 효과적인 백신 개발로 연결된다면 양돈 농가의 생산성 향상과 직접적으로 연결된다. 현재 시판중인 백신으로도 일부 방어가 가능한 것으로 기대 되지만, **3) 국내 양돈산업 생산성 향상**을 위해서 현재 국내외 발생하는 PED바이러스의 특징을 반영하는 백신이 본 과제를 통하여 이루어져야 한다. 특히 국내 PED백신 시장은 연간 60억원이나, 지금과 같이 세계적으로 PED 발생이 줄어들지 않고 있는 상황에서 효과적인 백신이 개발 된다면 **4) 백신의 수출을 통한 외화 획득 및 국내 우수 기술에 대한 홍보**를 위해서도 반드시 필요하다.

(1) 역유전학을 이용한 PED 백신주 작출

(가) PED 백신 개발 관련 기술 현황

기술	내용	특징
생독 백신	약독화된 바이러스를 이용하여 면역부여	<ul style="list-style-type: none"> • 야외 바이러스의 감염기전과 유사하게 면역을 유도할 수 있다. • 병원성이 있는 바이러스의 병원성을 약독화 시키는 과정이 필요 <ul style="list-style-type: none"> -비교적 장기간의 연구기간 필요 - 약독화 과정중 불필요한 항원 변이 발생
사독 백신	야외 분리 바이러스를 불활화한 항원을 이용한 면역	<ul style="list-style-type: none"> • 바이러스 분리주만 있으면 백신 제조 가능 • 불완전한 불활화에 의한 안전성 문제 있음 • 아췌반트의 선정이 안전성과 직결됨 • 생독백신에 비해 낮은 면역원성
Subunit백신	면역원성 있는 주요항원 결정기가 포함된 단백질	<ul style="list-style-type: none"> • 특정 항원 결정기를 반영한 단백질 제조가 상대적으로 용이 <ul style="list-style-type: none"> - 바이러스 배양 필요없음 • 일부 항원만 발현되어 백신으로서의 효능에는 많은 연구가 필요함 • 원래 항원이 갖는 구조·생물학적 특징을 재현하기 어려움
RNA particle vaccine	주요 항원부위를 바이러스 벡터에 삽입하여 만든 재조합 바이러스	<ul style="list-style-type: none"> • 이론적으로 이상적인 백신 • 현재 개발중인 백신으로 효과 검증이 더 필요한 상황임 (PED백신) • 특정 항원 부위만 반영할 수 있음

(나) 역유전학의 특징

바이러스 작출을 위한 벡터 제작을 위한 연구가 어려운 단점이 있지만 벡터가 셋업이 되었을 경우 야외주와 동일한 항원성을 갖는 바이러스를 단기간 내에 만들어 낼수 있는 장점이 있으며, 동일종의 바이러스 벡터를 이용하기 때문에 이중바이러스 벡터를 이용하는 백신주와 달리 동종 바이러스의 항원성 전체를 반영할 수 있음.

(2) 바이러스 고역가 생산을 위한 세포주의 선발

(가) PED 리셉터 연구 및 세포주 탐색

PED바이러스의 리셉터는 현재 TGE바이러스와 동일한 Aminopeptidase N으로 알려져 있다. 하지만 현재 백신생산용으로 사용하고 있는 세포는 원숭이 신장세포 유래의 Vero세포이기 때문에 돼지의 Aminopeptidase N을 갖고 있지 않다. 따라서 세포에 고도로 순화되지 않은 바이러스의 경우에는 증식이 매우 어려워 야외바이러스 분리가 매우 어려워 백신 개발에 기술적 한계로 생각된다. PED바이러스는 돼지의 포유자돈의 소장 상피세포에 가장 감수성이 높아서 돼지 유래 다른 세포주나 다른 종 유래 세포주에서는 분리가 어렵다. 본 연구에서는 돼지 소장세포를 이용하여 PED증식에 필요한 receptor에 대한 연구를 동시에 진행하여 작출된 바이러스를 안정적으로 증식시키기 위한 조건을 확립하고 작출된 바이러스를 최적의 조건으로 증식시킬 수 있는 기존 세포주 및 배양조건을 탐색하고자 한다.

(나) 생산 기술 확립

바이러스가 백신으로서의 역할을 하기 위해서는 항원성이 있어야 하는데 이를 위해 최소면역원성 이상의 바이러스가 확보가 되어야 한다. 작출이 되었다고 하더라도 역원성과 방어 효능을 나타낼 수 없는 수준이라면 백신으로서 역할을 할 수 없다. 따라서 최적의 역가를 나타내기 위해서, 특히 실험실 수준이 아닌 생산 공장에서 바이러스를 안정적으로 배양해 내기 위해서는 이를 위한 생산 시스템 확립이 필요하다.

다. 본 연구개발의 범위

(1) 역유전학을 이용한 PED백신주의 작출

- 백터의 제작
- 안정적으로 생산할 수 있는 세포주 확립
- 작출된 바이러스의 안전성 확인

(2) 작출된 백신주를 이용한 백신 생산기법 확립

- 백신주의 증식성을 높일 수 있는 세포주 및 배양조건 확립
- 백신의 면역원성을 증가 시킬 수 있는 아쥬반트의 선발
- 백신의 대량 생산 시스템 확립 및 시험백신의 생산

(3) 개발된 백신의 전임상 평가 및 PED바이러스의 역학 추적

- 국내 발생 PED의 분자유전학적 역학조사
- 작출된 바이러스 및 세포의 연속 계대를 통한 바이러스의 특성 분석
- 생산된 백신의 전임상 평가 (임신모돈)

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

가. 국내

- 1) 2015년 이후에 한국에서는 미국에서 유래된 strain 뿐만 아니라 중국에서 유래된 strain이 계속 나타나는 현상을 보이고 있었다 (Chung et al, 2016, Virus Research). 중국과 미국의 유래되는 스트레인과 2~3%의 S gene에서 차이를 보이기 때문에 향후 지속적인 모니터링이 필요할 것으로 사료된다.
- 2) 최근 2017년에 한국에서 주로 발생되고 있는 PEDV 바이러스를 높은 역가로 순수 분리하였다 (An et al, 2017, Journal of Veterinary Science).
- 3) S gene 분석의 변이뿐만 아니라 N gene epitope 역할을 하기 때문에 한국 분리주들과의 strain 분석을 통하여 PEDV의 특성을 밝히고 DR13의 백신주와 95~96% 정도의 상동성을 가지는 것을 밝혔다 (Kim et al, 2016, Korean J Vet).
- 4) Spike gene의 앞부분인 S1 gene 부위에서의 심한 variant와 delete, insert 의 strain 들이 보고되고 있다 (Park et al, 2015, Emerging Infectious Diseases, 2017 Lee et al, 2017, Arch Virology). 각종 변이주의 출현으로 인하여 백신 개발의 어려움을 내포한다.
- 5) 국내의 발견된 PEDV의 S gene과 ORF3의 유전자 비교결과 epitope의 변화와 유전적 변이가 발견되었다 (Kim et al, 2016, Arch Virol,2017).
- 6) Rapid immunochromatographic strip test의 방법으로 PEDV 신속한 진단법이 개발되었다 (Lyo et al, 2017, Vet record).
- 7) Genotype 2b에 속하는 cell attanuated 되어진 스트레인들이 새로운 백신 후보주로 선정되었다 (Lee et al, 2017 ,Vet Microbio).
- 8) 현재 PED백신 국내 개발 현황은 2014년 발생 이후 새로운 PED strain (G2)을 이용한 백신이 개발 되었다. 현재의 기술은 분리된 바이러스를 불활화한 백신이 개발되어 주요 동물 백신 제조사에서 판매가 되고 있으나, 각 회사 및 정부 연구기관의 약독화 백신에 대한 지속된 연구를 통해 생독 백신 개발을 시도하고 있어 2년내에 생독백신에 대한 기술이 완성되어 시장에 출시될 것으로 전망됨.
- 9) 역유전학 기술을 이용한 PED백신은 아직 국내에 적용되고 있지 않으며 본 연구팀의 연구 결과가 성과로 이어질 경우 주기적으로 지속되는 변이에 대응 할 수 있는 백신 개발 플랫폼이 완성될 것으로 기대함.

나. 국외

- 1) 계속적으로 PEDV의 S gene의 insertion, deletion이 관찰되고 있다 (Annamalai et al, 2017, Vet Res).
- 2) 중국에서의 새로운 insertion의 변이주와 함께 분리되었다 (Zhang et al, 2017, Arch Virology).
- 3) 백신주와 비슷한 두 개의 변이주들이, 자연적인 recombination이 일어난 strains임을 증명하였다 (Chen et al, 2017, Virus Reserch).
- 4) 중국에서 insertion deletion (INDEL) clade에 속하는 변이 주 들이 다수 발견되었고 유전적 특성을 밝혔다 (Horie et al, 2017, Arch Virology).
- 5) 현재 PEDV 포함, TGEV, SARS-CoV, HCoV-OC43, FIPV 및 MERS-CoV 등의 coronavirus 백신개발에 다양한 역유전학방법들이 사용되어지고 있음. 1) 주로 숙주세포 특이성을 이용한 targeted RNA recombination 방법을 적용하거나 2) BAC system 또는 3) *in vitro* ligation등 3가지 방법으로 감염성 cDNA clone을 제작하고 이로부터 신규 바이러스를 추출하는 연구가 진행되고 있음.
- 6) 첫 번째로 개발된 PEDV바이러스 역유전학 기술은 목표 RNA 재조합(targeted RNA recombination)방법임(Li 등, 2013). 그러나, Li 등이 추출한 바이러스는 녹십자 수의약품에서 판매중인 DR13백신 주를 그대로 역유전학으로 만들어 냈을 뿐 최근 유행하는 야외주에 대한 추출은 시도 되지 않았음. 두 번째는 BAC system을 이용하는 방법으로써, Jengarn 등에 의해서 최근 유행하는 고병원성 PEDV의 인공 추출을 2015년 최초로 성공하였음. 이들은 2013년에 분리된 PEDV중에서 세포에 적응되어 합포체 형성능이 우수한 PEDV_{AVCT12}주의 유전자를 추출하여 박테리아의 인공 염색체(BAC)에 클로닝하여 감염성 있는 PEDV의 게놈 cDNA를 제작하였음(Jengarn 등, 2015).
- 7) 이들이 만든 PEDV_{AVCT12}주는 S단백 말단 일부 및 ORF3가 소실되어 이미 세포배양에 적용되었던 바이러스로 최근 야외 강병원성 PEDV의 S단백과는 상이한 바이러스임. 또한 이러한 방법은 PEDV의 게놈 유전자는 크기도 28kb이상으로 매우 큰 편일뿐 아니라 NSP1등이 불안정하며 대장균등 숙주세포 내에서 매우 독성이 강해 감염성 있는 cDNA클론을 쉽게 얻을 수 없는 단점이 있음. 마지막으로 세 번째 방법은 in vitro ligation에 의해 감염성 cDNA를 만드는 방식임. 이는 유전자의 instability와 toxicity를 최소화하는 또 다른 대안으로, 전체 viral genome에 대한 여러 개의 viral cDNA fragments들이 *in vitro* 상에서 순차적으로 연결되어 T7 RNA polymerase에 의해 full-length infectious RNA로 transcription한 후 세포 내로 electroporation하여 virus를 만들어 내는 방법 임.
- 8) *In vitro* ligation 방법은 ① 전체 PEDV genome을 modify하거나 ORF3 발현 cassette내 alternative genes을 도입할 수 있는 등 BAC system과 많은 장점을 공유 하며 ② virus에 대한 전체 cDNA를 각각의 작은 subcloning vector 단위로 분리하여 보유할 수 있으므로 replicase gene fragments에 의해 발생하는 cell toxicity 문제를 관련된 특정 부위 유전자들을 서로 다른 fragment로 나누어 cloning을 진행하는 방법으로 해결할 수 있음.

- 9) ① 잠재적인 transcription termination site에 주의해야 하며 ② T7 RNA polymerase가 error rate이 낮기는 하더라도 enzyme과 관련된 특정 error를 발생시킬 수 있는 위험이 있고, 이는 결국 virus를 만들어내는 full-length RNA의 완전성에 영향을 미칠 수 있을 뿐 아니라 매 실험에서 다르게 나타나기 때문에 실험 전 미리 예측할 수 없는 어려움이 있음. Beall등은 *In vitro* ligation 방법을 적용해 게놈 cDNA를 여러 조각으로 나누어 클로닝 한 후 시험관 내에서 접합하고 전사하는 방식으로 최근 야외주의 S단백이 거의 보존된 형태를 갖는 PEDV의 인공 작출은 2016년 Beall등이 최초로 성공하였음(Beall 등, 2016). 그러나 Beall등이 작출한 PEDV도 가검물에서 직접 얻은 유자가 아님. 많은 가검물 중에서 세포주를 통해 분리 및 배양이 성공한 소수의 PEDV중 다시 4회 추가 계대된 PC22A주를 사용하였음. 그러므로 세포배양에 적응되지 않은 야외 강병원성 PEDV의 S단백의 원형을 그대로 갖는 바이러스에 대한 역유전학 기법으로도 아직은 개발되지 않고 있음.
- 10) 본 연구 과제를 통해 본연구팀은 PEDV바이러스의 역유전학 시스템 중 앞서 언급된 첫 번째와 두 번째 방법을 모두 확립하였음. 첫 번째 방법인 목표 RNA 재조합 방법을 통해서는 약독화된 DR13백신주의 역유전학기법을 확립하였고, 두 번째 BAC system 방법을 통해서 약독화된 DR13바이러스를 골격으로 하고 PEDV S1 gene은 최근 유행하는 강병원성을 원형 그대로 갖는 키메라 바이러스를 작출 하였음.
- 11) 본 연구팀이 개발한 PEDV 역유전학 플랫폼의 가장 중요한 의의는 세포배양에 적응된 적이 없는 최근 강병원성 PEDV의 S1 유전자의 원형 그대로를 갖는 PEDV를 최초로 작출한 점임. 이는 미래에 새로운 항원형의 PEDV가 출현할 때 세포 배양에 의한 바이러스 분리 및 적응과정을 거치지 않고 유전자만으로 PEDV를 만들어 낼 수 있음을 의미 함. 이에 반해 현재 까지 본 연구팀을 제외한 모든 PEDV역유전학 시스템은 이미 세포배양에 적응된 PEDV들만 작출에 성공하였음. 본 과제를 통해 개발된 PEDV 역유전학 플랫폼의 또 다른 의의는 생 백신 개발의 유용성임. 즉, 이미 약독화 되어 안전하게 생 백신으로 사용 중인 DR13백신주의 골격으로 하고 항원성에 중요한 S1만 야외주로 교체하였으므로 작출된 키메라 PEDV는 그 자체로 약독화 되거나 빠르게 약독화 되어 생 백신으로 개발하기 용이한 장점이 있음.

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

제 1 세부과제(녹십자수의약품): 역유전학을 이용한 PED백신의 생산체계 확립

□ 돼지 유래 세포주를 이용한 PED바이러스 배양

현재 백신주로 사용하고 있는 PEDV SM98P주를 이용하여 PK15 cell, ST cell을 이용하여 PEDV배양을 시도하였다. 바이러스 배양전 각 세포의 트립신 최적 농도를 설정하였으며 해당 트립신 농도에서 PEDV를 배양하였다. 그 결과 시험에 공시한 세포주에서는 Vero cell에서 계대된 PEDV SM98P주의 역가는 크게 증가하지 않는 것이 확인되었다. 따라서 이번에 사용된 돼지유래 세포주를 이용한 PEDV 증식시험 결과 Vero cell이 세포 순화된 PEDV배양에 가장 유리할 것으로 확인되었다.

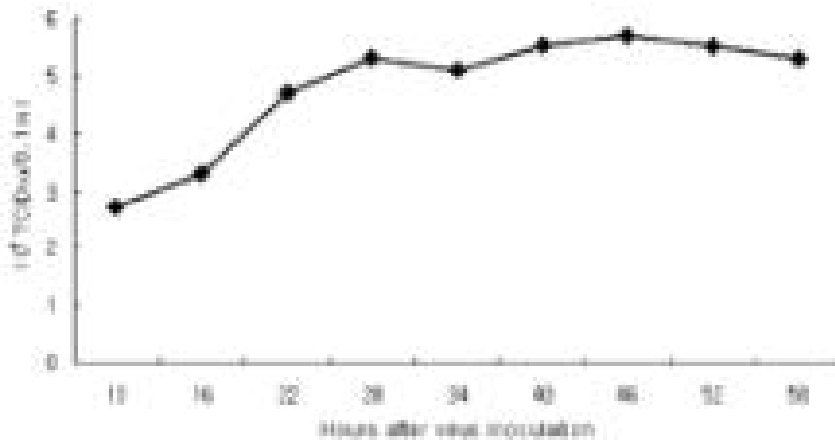


그림1. Vero cell에서 PEDV SM98P 주의 증식 곡선

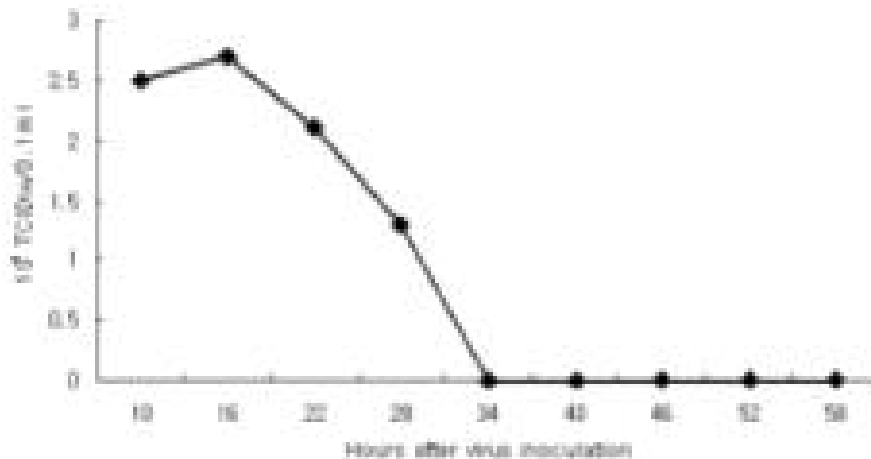


그림2. PK-15 cell에서 PEDV SM98P 주의 증식 곡선

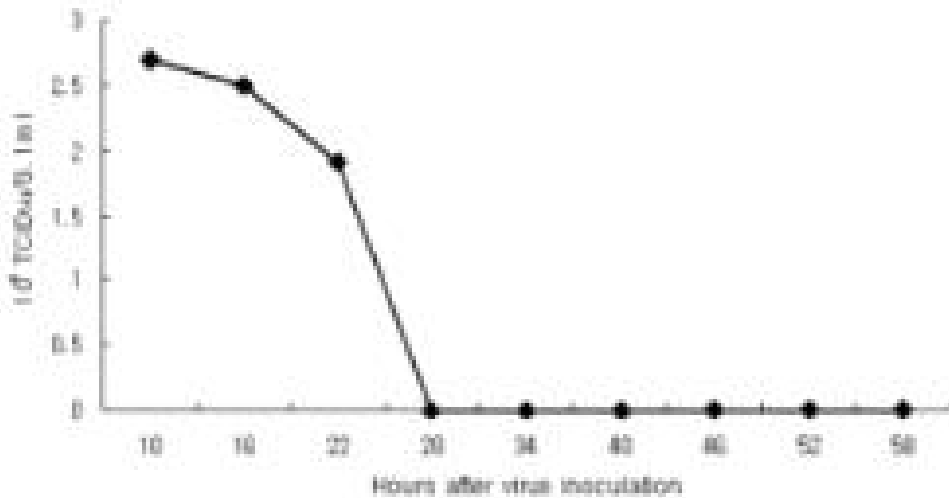


그림3. ST cell에서 PEDV SM98P 주의 증식 곡선

□ Vero cell을 이용한 바이러스 배양 최적조건 탐색

◎ 세포 배양 배지 조성 선발

PED바이러스를 분리 배양하는데 기본적으로 사용되는 Vero cell을 이용하여 PED바이러스의 증식 역가를 극대화하기 위한 시험을 진행하고 있다. 바이러스 배양 배지에 첨가되는 트립신의 농도는 2 μ g/ml로 조정하여 D-MEM배지에 각종 영양성분을 첨가하거나 무혈청배지를 이용하여 세포의 증식능을 확인하여 바이러스 배양에 대한 기본 조건을 확립하였으며 이들 배지에 바이러스를 접종하여 증식능을 확인하는 연구를 진행중이다.

이를 위해 Vero cell을 이용하여 각 배지 조성별 세포 배양능의 차이를 확인하여 바이러스 증식을 위한 조건 확립 여부를 확인하였다.

표1. 세포 배양을 위한 세포 배양 배지 조성

배지	조성
SFM	Vero cell 용 무혈청배지
배지1 (M1)	D-MEM+BSA 2%
배지2 (M2)	D-MEM+BSA 5%
배지3 (M3)	D-MEM+Serum replacer 5%
배지4 (M4)	D-MEM+Serum replacer 10%
배지5 (M5)	D-MEM+FBS 5%

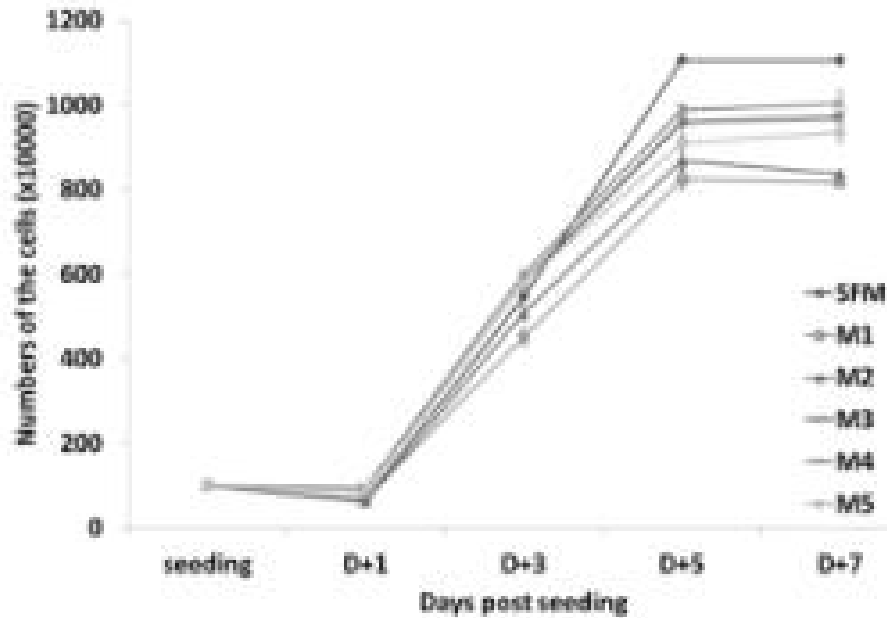


그림4. 각 배지 조성별 세포증식 곡선

세포 성장을 위해서는 일반 FBS5% 함유배지와 Serum replacer를 첨가한 배지의 세포 성장이 가장 우수한 것을 확인 할 수 있었다.

◎ 세포 배양 배지 조성과 트립신 활성 억제 확인

이후 PED바이러스 배양시 트립신을 첨가해서 배양해야 하기 때문에 각 배지와 트립신의 간섭현상을 확인하였다. 각 배지에 배양한 세포가 단층세포를 형성한 이후 (계대 후 24 시간 경과) 에 트립신을 농도별로 첨가한 바이러스 배양배지를 만들어 세포에 첨가하였다. 배지교환 48시간까지 관찰하며 세포에 미치는 영향을 평가하여 배지 조성의 트립신 억제인자 유무를 평가하여 최종적으로 배지 조성을 선별하여 바이러스 배양을 위한 기초 실험을 마무리 하였다.

표2. 트립신 농도에 따른 세포 영향

배지	트립신 농도($\mu\text{g/ml}$) 에 따른 세포 영향															
	4시간후				8시간후				24시간후				48시간후			
	10	5	2	1	10	5	2	1	10	5	2	1	10	5	2	1
SFM	0	0	0	0	X	X	0	0	X	X	0	0	X	X	0	0
배지1 (M1)	0	0	0	0	X	X	0	0	X	X	0	0	X	X	0	0
배지2 (M2)	0	0	0	0	X	X	0	0	X	X	0	0	X	X	0	0
배지3 (M3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
배지4 (M4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
배지5 (M5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
대조 배지 D-MEM	0	0	0	0	X	X	0	0	X	X	0	0	X	X	0	0

X: 세포 탈락, O: 영향 없음

트립신 5 μ g/ml 이상 함유된 대조 배지 (D-MEM) 배지에서 8시간 경과후부터 세포가 탈락하는 것이 확인되었다. SFM과 BSA가 함유된 배지에서는 대조 배지와 같이 세포탈락이 관찰되었으나 Serum replacer가 함유된 배지에서는 FBS 5%함유 배지와 같이 5 μ g/ml 이상의 트립신이 함유된 배지에서 세포가 탈락하는 것이 관찰되지 않았다.

이는 Serum replacer의 성분이 FBS의 성분과 같이 트립신의 활성을 억제하는 능력이 있기 때문이라 판단되어 PEDV를 배양하는 바이러스 배양배지의 조성으로는 적합하지 않은 것을 확인하였다.

◎ 1차 선발 조성을 이용한 바이러스 배양능 평가

상기 연구에서 평가된 조건을 이용하여 PEDV를 배양하여 바이러스 함량을 평가하여 각 조성의 바이러스 배양 능을 평가하였다. Vero cell을 이용하였으며 배지는 무혈청배지와 일반 배지 간의 바이러스 배양능을 평가 하였다. 시험에 사용한 배지의 조성은 아래 표와 같다.

표3. 바이러스 배양능을 비교하기 위한 배지 조성

구 분	배지 조성
일반배지	D-MEM, Trypsin 0.5 μ g/ml
무혈청배지	무혈청 배지, Trypsin 0.5 μ g/ml

상기의 조건에서 PEDV QIAP1404주를 접종하여 72시간 동안 배양후 바이러스의 함량을 측정한 결과 무혈청배지를 사용한 경우 바이러스의 함량이 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었으나 바이러스의 역가가 10배 이상 증가하는 것은 관찰되지 않았다. 트립신의 함량과 바이러스 배양방법을 변화시켜 바이러스 역가 향상을 위한 조건 확립이 추가적으로 필요하다고 판단되다.

표4. 일반배지와 무혈청배지에서의 PEDV 증식능 비교

구 분	바이러스 역가
일반배지	10 ^{5.7} TCID ₅₀ /mL
	10 ^{5.8} TCID ₅₀ /mL
무혈청배지	10 ^{6.1} TCID ₅₀ /mL
	10 ^{6.3} TCID ₅₀ /mL

□ 경구 백신용 아주반트 발굴

경구용 백신의 면역원성을 높이기 위해 기존의 경구용 PED백신 (PEDV DR13주)에 각종 아주반트를 적용하여 돼지에서 면역원성을 확인하였다. PED항체 음성인 이유자돈을 이용하여 다음과 같이 시험백신을 제조하여 백신의 기본 프로그램에 근거하여 적용하였다.

표5. 경구용 아주반트 시험을 위한 시험군 구성

시험군	백신	아주반트	접종	공시두수
G1	경구용 PED백신	IMS1313 10%	2주 간격 2회	2
G2		Montanide Gel 01 10%		2
G3		-		2
G4	인공감염	-		2
G5	인공감염재료 근육	Montanide Gel 01 10%		2

표5와 같이 시험백신을 접종한 결과 혈청중화시험으로 PEDV DR13주에 대한 항체가를 측정할 결과 면역원성에 있어서 큰 개선점이 보이지 않았으나 본 연구를 통해 아주반트 사용 시 면역원성이 확인되었기 때문에 다양한 종류의 아주반트를 이용한 이유자돈 면역원성 시험 진행과 더불어 목적동물인 모돈에 위의 시험을 실시하여 혈중 중화항체가 뿐만 아니라 분만후 초유내 IgA농도를 측정하여 점막면역유도에 상승 효과를 유발 할 수 있는 아주반트를 선발하는 시험을 진행할 계획이다.

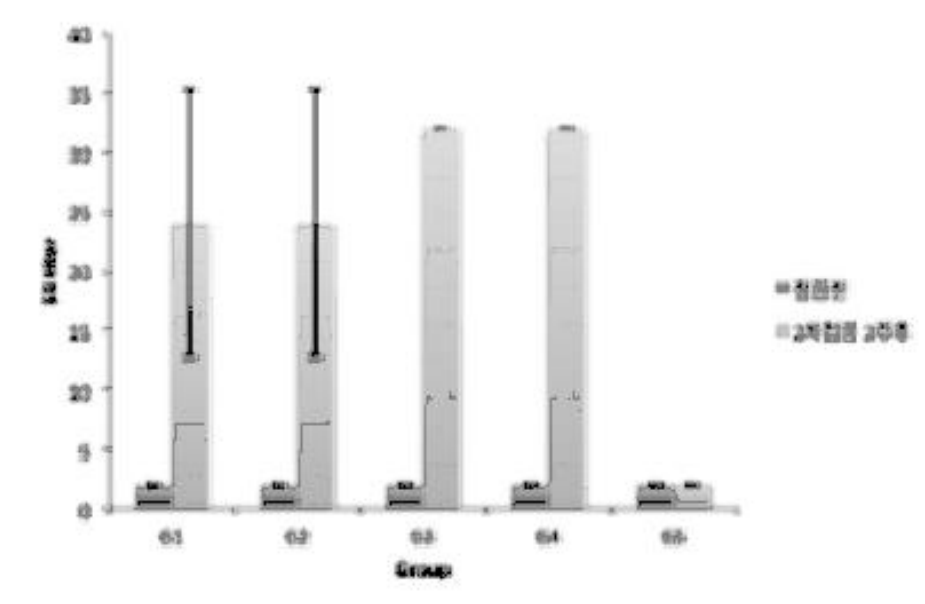


그림5. 아주반트를 이용한 경구용 PED백신 접종후 면역원성 시험

2차년도

□ Vero cell 이외의 세포를 이용한 PEDV 배양법 확립

기존의 Vero cell에 비해 PEDV의 증식성이 높은 세포 선발 및 부유배양 가능한 세포주로의 전환 두 가지를 목표로 연구 진행 하였음.

현재 PEDV생산은 Vero cell을 이용하여 제조 되고 있음. 따라서 기존의 제조방법을 변경하지 않고 현재 제조 공정에 사용중인 Vero cell 중 PEDV 증식에 감수성이 있는 세포를 선발하여 생산성을 높이고자 함.

부유 배양을 통한 대량 배양이 가능할 경우 비용은 증가하지만 생산성으로 보완할 수 있으며 생산공정을 단순화 할 수 있는 장점이 있음. 따라서 부유배양 공정이 확립된 세포주에 순화된 PEDV를 얻을 경우 생산성과 경제성을 확보할 수 있을 것으로 판단됨.

본 시험은 1차년도 실험 결과에서 선발된 바이러스 배양용 배지 조성을 이용하여 진행하였다.

● 연구 방법

■ 재료

- 세포주: Vero cell, Cell line A, Cell line B
- 배지
 - 세포 배양 배지: D-MEM with antibiotics and antimycotics
 - 바이러스 배양 배지: SFM (Serum free media) +트립신 (0.5 μ g/ml)
- 바이러스: PEDV DR13, PEDV QIAP1401

■ 시험 방법

- Vero cell 클로닝
 - PEDV 배양용 Vero cell (CCL-81)을 세포수 2x10⁵개/ml로 조정
 - 4단계 10진희석 하여 산술적으로 2x10²개/ml의 세포를 준비
 - 이중 2x10³개/ml, 2x10²개/ml의 세포를 다시 각각 4단계 2진 희석 실시하여 다음과 같은 seeding용 세포 준비

표. clonning을 위한 세포준비

2진희석 10진희석	1	2	3	4	5
1	2x10⁵개/ml				
2	2x10⁴개/ml				
3	2x10 ³ 개/ml	1x10³개/ml	5x10²개/ml	2.5x10²개/ml	1.25x10²개/ml
4	2x10 ² 개/ml	1x10²개/ml	5x10¹개/ml	2.5x10¹개/ml	1.25x10¹개/ml
5	2x10¹개/ml				

- 이중 5x10²개/ml, 2.5x10²개/ml, 1x10²개/ml, 5x10¹개/ml의 희석된 세포를 10ml의 세포 배양 배지에 넣는다.
- 준비된 4개의 세포 개수별 조합을 96 well micropalte에 100 μ l씩 분주한다.
- 5% CO₂ 함유 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 배양하며 매일 관찰한다.
- 관찰시 각 well에서 1개의 세포만 자라는 well을 표시한다.
- 5~7일간 배양하여 1개의 세포가 일정한 콜로니를 형성하게 되면 다시 96 well micropalte에 옮겨 계대 배양 한다.
- 동일한 조건으로 5일간 배양하여 전체 well에 세포가 100% 채워지게 되면 다시 계대 배양하여 1well에서 유래한 세포를 3개의 96 well microplate로 옮긴다.
 - * 1번 플레이트: PEDV접종-CPE관찰
 - 2번 플레이트: PEDV접종-면역염색
 - 3번 플레이트: 선발 및 계대용
- 10²TCID₅₀/100 μ l로 조정된 PEDV QIA1401주를 2개의 플레이트에 동일하게 접종한다.
- 접종 1시간 후 바이러스를 제거하고 PBS로 2회 washing후 바이러스 배양 배지를 넣고 배양한다.
- 1번 플레이트에서 CPE가 나오기 시작하는 well이 발견되면 바로 2번 플레이트를 Aceton:Methanol 50:50 고정액으로 고정하여 PEDV 단클론 항체와 반응 후 ABC 키트를 이용하여 바이러스 감염 여부를 확인한다.
- 육안으로 바이러스에 감염된 세포가 상대적으로 많은 클론을 선발하여 바이러스 배양능을 확인하여 최종 선발한다.

- PEDV 감수성 세포주 확인
 - 세포주 A, B와 상기 조성의 배지를 이용하여 PEDV DR13주와 PEDV QIAP1401주를 계대 배양하여 바이러스 증식여부 확인

● 연구 결과

- Vero cell 클로닝
 - 위의 방법과 같이 end-point delution법을 이용한 클로닝 결과 총 30개의 양호한 단일 콜로니를 형성하는 클론을 선발하였다.
 - 선발된 클론에 대하여 우선적으로 동량의 PEDV QIAP1401주 ($10^{3.5}$ TCID₅₀/ml)를 접종하여 무혈청배지에 트립신을 첨가한 조성으로 바이러스를 배양하여 CPE가 가장 빨리 관찰되는 클론 3개를 선발하였다.
 - 선발된 Vero cell클론을 이용하여 PEDV DR13주와 PEDV QIAP1401주를 배양하여 두종류의 PED바이러스에 대한 배양 시험 결과 1511-4 클론에서 가장 좋은 바이러스 역가를 확인할 수 있었다.

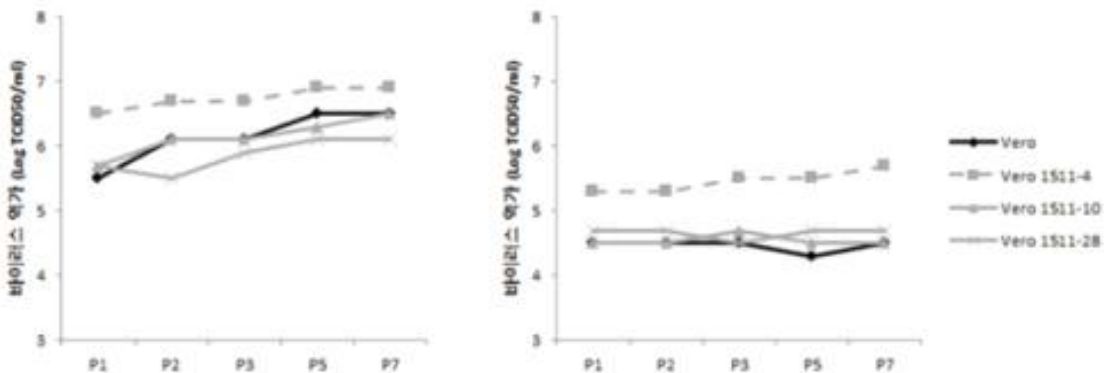


그림. Vero cell과 선발된 클론에서의 PEDV DR13 (좌), PEDV QIAP1401(우)의 증식곡선

- 세포주 A, B를 이용한 PED바이러스 감수성 확인 시험

부유배양 세포주 작출이 가능한 것으로 알려진 세포주 A, B의 부착세포주를 이용하여 PED바이러스를 감염시킨 결과 두 세포주 모두에서 PED바이러스가 증식되지 않는 것을 확인하였다. 따라서 기존에 알려진 Vero cell에서 PED바이러스가 가장 증식이 잘

되는 것으로 결론 짓고 상기 연구에서 확보한 Vero cell클론을 이용하여 백신 생산에 사용하기로 하였다.

표. 세포주 A,B를 이용한 PEDV바이러스 (PEDV DR13주)배양결과

세포주	CPE관찰 여부 (PEDV DR13주 접종)			
	P1	P2	P3	P5
A	x	x	x	x
B	x	x	x	x
Vero 1511-4	o	o	o	o

표. 세포주 A,B를 이용한 PEDV바이러스 (PEDV QIAP1401주)배양결과

세포주	CPE관찰 여부 (PEDV QIAP1401주 접종)			
	P1	P2	P3	P5
A	x	x	x	x
B	x	x	x	x
Vero 1511-4	o	o	o	o

□ Vero cell 부유배양을 이용한 PEDV 대량 (고역가) 배양법 확립

Vero cell 부유 배양을 통해 적은 부피에서 더 많은 양의 세포를 배양하여 바이러스 고역가 증식을 목표로 한다.

현재 까지 알려진 Vero cell부유 배양법은 존재하지 않아 본 연구에서는 그 대안으로 마이크로 캐리어를 이용한 간접적인 부유배양을 통해 최적의 백신 생산 조건 확립 연구를 진행하였다.

● 연구 방법

• 재료

- 세포: Vero 1511-4 clone
- 배지

조건	배지	첨가물
C1	D-MEM	FBS 5%
C2	D-MEM	Serum replacer 10%
C3	ProVero1 (Serum free)	-

- 배양용기: spinner flask 500ml
- 접종 바이러스: PEDV DR13, PEDV QIAP1401
- 세포 및 마이크로 캐리어 조합

- 시험 방법

- 각각의 배지를 이용하여 세포와 마이크로 캐리어 조합을 이용하여 세포 배양을 우선 실시하였다.



Cells (x10 ⁶ /ml) \ Beads (mg)	5	10	50
100	1	11	21
200	2	12	22
300	3	13	23
400	4	14	24
500	5	15	25
600	6	16	26
700	7	17	27
800	8	18	28
900	9	19	29
1000	10	20	30

- 세포 배양시 세포상태는 현미경으로 마이크로 캐리어에 부착한 세포의 상태를 확인하였음
- 또한 spinner flask 정지 후 마이크로캐리어 가라앉은 후 상층액에 남아있는 세포의 유무를 육안으로 관찰하여 세포와 마이크로캐리어의 비율을 조정하였다.
- 바이러스 배양 접종시 바이러스의 역가와 5일 배양 후 바이러스 역가를 비교하여 바이러스 증식을 확인하였다.

● 연구 결과

- 배지 및 세포-마이크로 캐리어 조합에 따른 세포 배양

- 세포가 마이크로 캐리어에 완전히 부착되는 시간

각각의 배지에 세포를 배양하여 50%이상의 마이크로캐리어가 완전히 Vero cell로 덮이는 시간을 계산한 결과는 표와 같았다.

그 결과 SFM을 이용한 부유 배양은 시험한 조합에 걸쳐 세포의 상태가 불량한 것이 확인되었다. 마이크로 캐리어를 완전히 덮지 못했으며 마이크로 캐리어에 붙어있는 세포의 상태도 round up형태를 보이며 완전히 붙어있지 못했다. 따라서 1, 11, 21, 2, 12, 22번 조합까지만 시험하고 더 이상 진행하지 않았다. 반면 D-MEM배지를 이용한 부유 배양의 경우 SFM을 사용했을 때와는 달리 세포가 마이크로 캐리어 표면에 고르게 부착되는 것을 확인할 수 있었다. .

표. 무혈청배지 (조건 C3)를 이용한 부유 배양 결과 (세포가 현미경 시야에 존재하는 50%이상의 마이크로 캐리어에 완전히 부착되는데 까지 걸리는 시간, 일)

세포수 (x10 ⁶ /ml) / 캐리어 (mg)	5	10	50
100	-	5	5
200	-	5	5
300	-	-	5

* -: 5일동안 세포가 완전히 부착되지 않음

표. D-MEM(FBS 5%) (조건 C1)를 이용한 부유 배양 결과 (세포가 현미경 시야에 존재하는 50%이상의 마이크로 캐리어에 완전히 부착되는데 까지 걸리는 시간, 일)

세포수 (x10 ⁶ /ml) / 캐리어 (mg)	5	10	50
100	2	1	1
200	2	1	1
300	2	2	1
400	3	2	1
500	5	2	2
600	5	2	2
700	5	2	2
800	5	2	2
900	-	2	3
1000	-	2	3

표. D-MEM(SR 10%) (조건 C2)를 이용한 부유 배양 결과 (세포가 현미경 시야에 존재하는 50%이상의 마이크로 캐리어에 완전히 부착되는데 까지 걸리는 시간, 일)

캐리어 (mg) \ 세포수 (x10 ⁶ /ml)	5	10	50
100	2	1	1
200	2	1	1
300	3	2	1
400	3	2	2
500	5	2	2
600	5	2	2
700	5	2	3
800	5	3	3
900	-	3	3
1000	-	3	3

- 부착되지 않고 남은 세포 확인

마이크로 캐리어와 세포 수의 적정 비율을 찾기 위해 C1, C2 조건에서 배양 3일후 마이크로 캐리어가 가라 앉은 후 상층액에 존재하는 세포의 유무를 육안으로 관찰하여 잉여 세포 여부를 결정하였다. 그 결과 5x10⁶/ml 정도의 세포수가 적정한 것으로 확인되었으며 본 시험에서 사용한 300ml 조건에서는 마이크로 캐리어의 수는 700~1000 mg이 적절한 것으로 확인되었다.

표. D-MEM(FBS 5%) (조건 C1)를 이용한 부유 배양 결과 (배양 3일후 부착되지 않은 세포의 유무)

캐리어 (mg) \ 세포수 (x10 ⁶ /ml)	5	10	50
100	o	o	o
200	o	o	o
300	o	o	o
400	o	o	o
500	o	o	o
600	o	o	o
700	x	o	o
800	x	o	o
900	x	o	o
1000	x	x	o

표. D-MEM(SR 10%) (조건 C2)를 이용한 부유 배양 결과 (배양 3일후 부착되지 않은 세포의 유무)

캐리어 (mg) \ 세포수 (x10 ⁶ /ml)	5	10	50
100	o	o	o
200	o	o	o
300	o	o	o
400	o	o	o
500	o	o	o
600	o	o	o
700	x	o	o
800	x	o	o
900	x	o	o
1000	x	o	o

- 각 조합에 따른 바이러스 증식능 확인

각 배지별 조합에 따른 5일후 바이러스 역가는 다음 표와 같이 관찰되었다.

표. 무혈청배지 (조건 C3)를 이용한 부유 배양 결과 (PEDV QIAP1401, 바이러스 역가 log TCID₅₀/ml)

세포수 (x10 ⁶ /ml) 캐리어 (mg)	5	10	50
100	2.1	2.1	2.1
200	1.5	-	2.1
300	-	1.5	2.1

* -: 5일동안 세포가 완전히 부착되지 않음

표. D-MEM(FBS 5%) (조건 C1)를 이용한 부유 배양 결과 (PEDV DR13, 바이러스 역가 log TCID₅₀/ml)

세포수 (x10 ⁶ /ml) 캐리어 (mg)	5	10	50
100	2.5	2.5	2.5
200	2.5	2.5	2.5
300	4.5	4.5	4.5
400	4.5	4.5	4.5
500	4.5	4.5	4.7
600	4.5	4.3	4.3
700	5.3	5.5	5.3
800	5.5	5.3	5.1
900	5.5	5.1	5.1
1000	5.3	5.1	5.3

표. D-MEM(SR 10%) (조건 C2)를 이용한 부유 배양 결과 (PEDV DR13, 바이러스 역가 log TCID₅₀/ml)

세포수 (x10 ⁶ /ml) 캐리어 (mg)	5	10	50
100	2.5	2.5	2.5
200	2.5	2.5	2.5
300	4.5	4.3	4.5
400	4.5	4.3	4.5
500	4.5	4.7	4.7
600	4.5	4.3	4.3
700	5.3	5.3	5.1
800	5.1	5.3	5.1
900	5.3	5.3	5.1
1000	5.1	5.1	5.3

바이오리액터에서 시험을 하기에 앞서 부유배양병을 이용하여 마이크로캐리어 부유배양 시험을 진행하였다.

최종적으로 무혈청 배지 (SFM)를 사용하고자 하였으나 아직 무혈청배지를 이용한 시험에서는 세포의 성장이 양호하지 않았다. 이러한 이유로 무혈청배지를 이용한 PEDV증식 시험결과 바이러스가 증식되지 않은 것으로 판단된다.

□ 역유전학 시스템을 통해 추출된 중간단계 mPEDV를 이용한 PED의 중화능 확인

1협동과제에서 역유전학 PED바이러스를 추출하는 과정중 중간단계 산물인 mPEDV (PEDV DR13 back bone에 MHV의 S gene을 치환시킨 재조합 바이러스)가 갖고 있는 PED바이러스의 단백질이 바이러스의 중화와 관계있는지 확인하기 위하여 다음과 같이 중화 시험 실시.

● 연구 방법

1. PEDV QIAP1401주에 대하여 항체 양성인 기니픽 혈청 준비.
2. PEDV DR13주, QIAP1401주, mPEDV를 이용하여 중화시험 실시 (단, mPEDV를 이용한 중화시험시 Vero cell이 아닌 L cell을 이용)

● 연구 결과

중화시험을 실시한 결과 Heterologous한 PEDV QIAP1401주에 대하여 4배에서 16배 사이의 중화항체가 보였음. 일부 혈청에 대해서만 PEDV DR13주에 대한 중화항체가 검사를 진행하였을 때 역시 4배에서 8배의 중화항체를 보였음. 그러나 mPEDV바이러스는 중화시키지 못함.

따라서 본 시험에서 PED바이러스에 대한 양성 혈청은 mPED바이러스를 중화시키지 못하는 것으로 확인되었음. 차후 연구를 통해 mPED바이러스에 대한 양성혈청을 이용하여 반대의 상황에 대한 중화항체 검사를 진행해 볼 필요가 있음.

표. PEDV QIAP1401주 양성혈청을 이용한 PEDV DR13, QIAP1401, mPEDV에 대한 중화 시험 검사 결과

가검혈청	중화항원에 따른 평균 중화항체가		
	DR13	PEDQ	mPEDV
1	8	4	<2
2	8	4	<2
3	4	8	<2
4	4	8	2
5	NT	4	<2
6	NT	8	<2
7	NT	8	<2
8	NT	8	2
9	NT	16	<2
10	NT	16	<2
11	NT	16	2
12	NT	<2	<2

□ 역유전학 시스템을 통해 작출된 PED바이러스의 증식능 평가 (T7 promotor 이용 target RNA recombination)

MHV를 이용한 역유전학 PEDV작출 시스템을 이용하여 작출된 3개의 역유전학 PED바이러스를 1협동과제로부터 받아서 아래와 같이 Vero cell에서 연속 계대를 반복 실시 하였음.

● 연구 방법

1. 1협동과제로부터 작출된 역유전학 PED바이러스 3개 주 (V11-49, V11-51, V11-54)를 Vero cell에 연속 계대하였음.
2. 매 계대시 바이러스가 형성하는 CPE를 관찰하였으며 계대시 rapid kit를 이용하여 PED바이러스의 유무를 확인하였음.



그림. 제1협동과제를 통해 작출된 역유전학 PED바이러스. V11-54는 back bone이 되는 PEDV DR13바이러스를 이용하여 바이러스 작출 시스템의 양성 컨트롤로 사용.

● 연구 결과

Vero cell에서 트립신을 처리하여 작출된 PED바이러스를 계대 하였으나 양성 대조인 V11-54 바이러스만 Vero cell에서 증식되는 것이 확인되었으며 나머지 V11-49, 51바이러스는 증식되지 않았음. 양성 대조 바이러스 (V11-54)의 경우에는 역유전학으로 작출하지 않은 바이러스와 같이 증식이 잘 되는 것으로 확인 되었음. 최초 수령한 V11-54바이러스의 역가는 104.5 TCID50/ml로 확인되었음.

표. V11-49, V11-51, V11-54 바이러스의 계대

바이러스 \ 계대수	V11-49		V11-51		V11-54	
	CPE	Rapid kit	CPE	Rapid kit	CPE	Rapid kit
P1	x	x	x	x	o	o
P2	x	x	x	x	o	o
P3	x	x	x	x	o	o

□ 역유전학 시스템을 통해 작출된 PED바이러스의 자돈 감염시험 (T7 promotor 이용 target RNA recombination)

세포배양에서 증식되지 않은 V11-49주와 V11-51주의 증식을 위하여 PED항체 음성의 포유자돈을 경구투여와 근육 접종으로 바이러스를 증식시키고자 하였음. 바이러스 접종후 설사 여부 확인 및 바이러스 검출을 확인하여 바이러스 증식 여부를 확인하였음.

● 연구 방법

1. 바이러스 접종을 위하여 PED항체 음성인 농장에서 초유를 섭취한 3일령 자돈을 녹십자수의약품 주식회사 동물사에 입식하였음. (20두 입식)
2. 입식 24시간 후 계대수 1의 각 바이러스와 병원성이 있는 PED바이러스 (PEDV QIPA1401주)를 2ml 씩 각각 3두의 자돈에 경구 투여하였음.
3. 근육접종 군에는 동일한 방법으로 2ml씩 바이러스를 근육으로 접종하였다.
4. 양성대조 바이러스를 접종한 6 두 (경구 투여 3두, 근육접종 3두)는 교차 감염을 방지하기 위하여 별도의 건물에서 사육하였음.
5. 음성대조군 2두는 역유전학 바이러스 접종군과 합사하여 사육하며 관찰하였음.
6. 바이러스 접종 후 대용유를 급여하며 5일간 사육하며 관찰하였음.
7. 매일 설사 여부를 관찰하였으며, 분변을 채취하여 rapid kit를 이용하여 바이러스 배출 여부를 확인하였음.

● 연구 결과

양성대조 바이러스를 접종한 그룹에서만 설사가 관찰 되었음. PEDV QIAP1401주를 경구투여 및 근육 접종한 그룹 모두에서 설사가 관찰 되었으며 분변에서 바이러스가 검출되었음. 특히 경구투여 군에서는 투여 24시간 후 (D+1)부터 설사 및 바이러스 검출이 확인되었음.

역유전학으로 작출된 V11-49, 51주를 투여 및 접종한 그룹에서는 모두 설사가 관찰되지 않았으며 바이러스가 검출되지 않았음.

PED바이러스의 감수성 동물인 돼지, 포유자돈을 이용하여 바이러스를 증식시키고자 하였으나 바이러스가 증식하지 않았음. 따라서 1협동과제를 통하여 작출된 2개의 바이러스주는 더 이상 증식하지 않는 것으로 판단하였음.

표. V11-49, V11-51, 바이러스의 3일령 자돈에서 증식 결과 (바이러스 검출)

	V11-49		V11-51		양성대조 (PEDV Q)		음성 대조	
	경구	근육	경구	근육	경구	근육	경구	근육
D+1	-	-	-	-	+	-	-	-
D+2	-	-	-	-	+	-	-	-
D+3	-	-	-	-	+	-	-	-
D+4	-	-	-	-	+	+	-	-
D+5	-	-	-	-	+	+	-	-

표. V11-49, V11-51, 바이러스의 3일령 자돈에서 증식 결과 (설사 여부)

	V11-49		V11-51		양성대조 (PEDV Q)		음성 대조	
	경구	근육	경구	근육	경구	근육	경구	근육
D+1	-	-	-	-	+	-	-	-
D+2	-	-	-	-	+	-	-	-
D+3	-	-	-	-	+	+	-	-
D+4	-	-	-	-	+	+	-	-
D+5	-	-	-	-	+	+	-	-

□ 역유전학 시스템을 통해 작출된 PED바이러스의 증식능 평가 (CMV promotor 이용 target RNA recombination) - 결과는 3차년도 연구 내용에 취합하여 작성

1협동연구에서 T7프로모터를 이이용한 target RNA recombination 방법으로 역유전학 PED바이러스 작출에 한계가 있었음. 따라서 CMV 프로모터를 이용하여 다시 target RNA recombination을 실시하였음. CMV 프로모터를 이용하여 작출한 PED바이러스 4개주를 수령하여 아래와 같이 세포 증식을 실시하였음.

● 연구 방법

- 1협동연구에서 프로모터를 변경하여 작출한 바이러스 중 4개 주를 도입하여 세포 배양을 시도하였음.
 - V11-75, V11-76, V11-77, V11-78주
- 계대후 바이러스 검출은 rapid kit을 이용하여 검출하였으며 CPE를 확인하였음.

● 연구 결과

모든 그룹에서 1번 계대 했을 때 CPE가 확인되었으나 V11-77을 제외하고는 모두 바이러스가 검출되지 않음. 계대시 관찰된 CPE는 비특이로 판단할 수 있겠으나 지속적으로 계대 필요함.

3차년도

□ 역유전학 시스템을 통해 작출된 PED바이러스의 증식능 평가 (CMV promotor 이용 target RNA recombination) 계속

2차년도 배양하던 역유전학 바이러스를 계속 배양하여 작출된 역유전학 PED바이러스를 분리하고자 하였음. 2차년도에 사용한 방법으로 바이러스를 5대까지 계대하였으나 2계대에서 더 이상 CPE가 확인되지 않았으며 Rapid kit에서 양성으로 확인된 V11-77주도 2 계대부터 바이러스가 검출되지 않았음.

표. V11-75, V11-76, V11-77, V11-78 주의 세포 배양 결과

바이러스 계대수	V11-75		V11-76		V11-77		V11-78	
	CPE	Rapid kit	CPE	Rapid kit	CPE	Rapid kit	CPE	Rapid kit
P1	o	-	o	-	o	+	o	-
P2	-	-	o	-	-	+	-	-
P3	-	-	-	-	-	-	-	-
P4	-	-	-	-	-	-	-	-
P5	-	-	-	-	-	-	-	-

CMV프로모터를 이용하여 작출한 PED바이러스의 특이한 점은 최초 바이러스 계대시 CPE와 유사한 세포손상이 나타났음. 그러나 이러한 현상이 계대를 지속할수록 관찰되지 않아 비특이적인 세포 변화로 여겨짐.



그림. V11-77 바이러스의 ORF3(일부)의 염기서열비교. (2차년도 시험 결과)

Rapid kit 검사시 양성으로 검출된 V11-77주의 ORF3 유전자 (일부) 에 대한 염기 서열 분석을 실시하였다. 역유전학 바이러스의 back bone으로 사용한 약독화된 PEDV DR13바이러스는 ORF3 유전자의 일부가 결손되어 있기 때문에 야외주 PED 바이러스와 감별할 수 있는 유전적 마커로 사용할 수 있음. 염기서열 비교에 사용한 2014년 이후 미국에서 분리된 PC21A주와 ORF3 부위의 염기서열을 비교 분석한 결과 PC21A주와는 비교 대상 부위에서 90.1%가 일치했으나, back bone으로 사용한 PEDV DR13과는 100% 일치 하는 것이 확인되었음.

특히 빨간색 박스 부위의 DR13등 전형적인 약독화 바이러스에서 관찰되는 deletion이 확인되었음.

따라서 작출된 바이러스, 계대시 2계대까지 이어진 바이러스는 DR13을 Back bone으로 갖고 있는 역유전학 바이러스 일 가능성이 있으나 더 이상 계대 진행되지 않아 다른 부위에 대한 염기서열 분석은 진행하지 않았음.

해당 과정을 4번 반복하여 V11-77주를 분리하고자 하였으나 (결과 첨부 안함) 분리되지 않아 2차년도와 같이 포유자돈에 경구 투여하여 분리를 시도하였음.

□ 역유전학 시스템을 통해 작출된 PED바이러스의 돼지에서 증식 시험 (CMV promotor 이용 target RNA recombination)

상기와 같이 CMV프로모터 이용하여 역유전학 바이러스를 세포배양으로 분리를 시도하였으나 실패하였음. 이를 감수성 동물인 포유자돈에 경구 투여하여 바이러스를 분리하고자 시도하였으며 아래의 방법과 같이 수행하였음.

● 연구 방법

1. 바이러스 접종을 위하여 PED항체 음성인 농장에서 초유를 섭취한 3일령 자돈을 녹십자수의약품 주식회사 동물사에 입식하였음. (15두 입식)
2. 입식 24시간 후 계대수 1의 각 바이러스 (V11-75, V11-76, V11-77, V11-78 주)와 병원성이 있는 PED바이러스 (PEDV QIPA1401주)를 2ml 씩 각각 3두의 자돈에 경구 투여하였음.
4. 양성대조 바이러스를 접종한 3 두는 교차 감염을 방지하기 위하여 별도의 건물에서 사육하였음.
5. 바이러스 접종 후 대용유를 급여하며 10일간 사육하며 관찰하였음.

7. 매일 설사 여부를 관찰하였으며, 분변을 채취하여 rapid kit를 이용하여 바이러스 배출 여부를 확인하였음.

8. Rapid kit검사와 함께 real-time RT-PCR을 통해 바이러스를 검출하였음.

● 연구 결과

2차년도 V11-49, V11-51주의 포유자돈 접종 시험과 같이, 양성대조 바이러스를 접종한 그룹에서만 설사가 관찰되었음.

역유전학으로 작출된 V11-75, V11-76, V11-77, V11-78 주를 투여 및 접종한 그룹에서는 모두 설사가 관찰되지 않았으며 Rapid kit과 real-time RT-PCR에서 바이러스가 검출되지 않았음.

PED바이러스의 감수성 동물인 돼지, 포유자돈을 이용하여 바이러스를 증식시키고자 하였으나 바이러스가 증식하지 않았음. 따라서 1협동과제에서 CMV프로모터를 이용해 작출된 4개의 역유전학 바이러스주는 더 이상 증식하지 않는 것으로 판단하였음.

특히 세포배양시 2 계대에 걸쳐 바이러스가 검출되었던 V11-77주도 분리되지 않았음.

표. V11-75, V11-76, V11-77, V11-78 바이러스의 3일령 자돈에서 증식 결과 (설사여부)

경과일수	설사여부				
	V11-75	V11-76	V11-77	V11-78	PEDV QIAP
D+1	-	-	-	-	-
D+2	-	-	-	-	+
D+3	-	-	-	-	+
D+4	-	-	-	-	+
D+5	-	-	-	-	+
D+6	-	-	-	-	+
D+7	-	-	-	-	+
D+8	-	-	-	-	+
D+9	-	-	-	-	+
D+10	-	-	-	-	+

표. V11-75, V11-76, V11-77, V11-78 바이러스의 3일령 자돈에서 증식 결과 (바이러스 검출)

경과일수	바이러스 검출 (Rapid kit/real-time PCR)				
	V11-75	V11-76	V11-77	V11-78	PEDV QIAP
D+1	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
D+2	- / -	- / -	- / -	- / -	- / +
D+3	- / -	- / -	- / -	- / -	+ / +
D+4	- / -	- / -	- / -	- / -	+ / +
D+5	- / -	- / -	- / -	- / -	+ / +
D+6	- / -	- / -	- / -	- / -	+ / +
D+7	- / -	- / -	- / -	- / -	+ / +
D+8	- / -	- / -	- / -	- / -	+ / +
D+9	- / -	- / -	- / -	- / -	+ / +
D+10	- / -	- / -	- / -	- / -	+ / +

□ PEDV에 특이적인 프라이머 세트 및 이를 이용한 바이러스의 감별진단 방법 개발

본과제에서 작출하고자 하는 PEDV바이러스는 유전학적 분류상 최근 분리주인 G2그룹에 속하게 된다. 따라서 기존의 G1 백신주와 감별진단을 위하여 감별진단 프라이머 세트를 개발하였다.

● 연구 방법

PEDV G1에 속하는 바이러스와 G2에 속하는 바이러스의 spike 단백질 부위의 유전자는 아래 그림 검정색 박스 부분과 같이 특이적으로 차이가 나는 부분이 존재함. 따라서 해당 부위에 대한 프라이머를 여러개 디자인하여 각각에 대하여 RT-PCR을 진행하여 PED바이러스 G1, G2유전자형을 특이적으로 검출해 낼 수 있는 프라이머 세트를 디자인하였음.

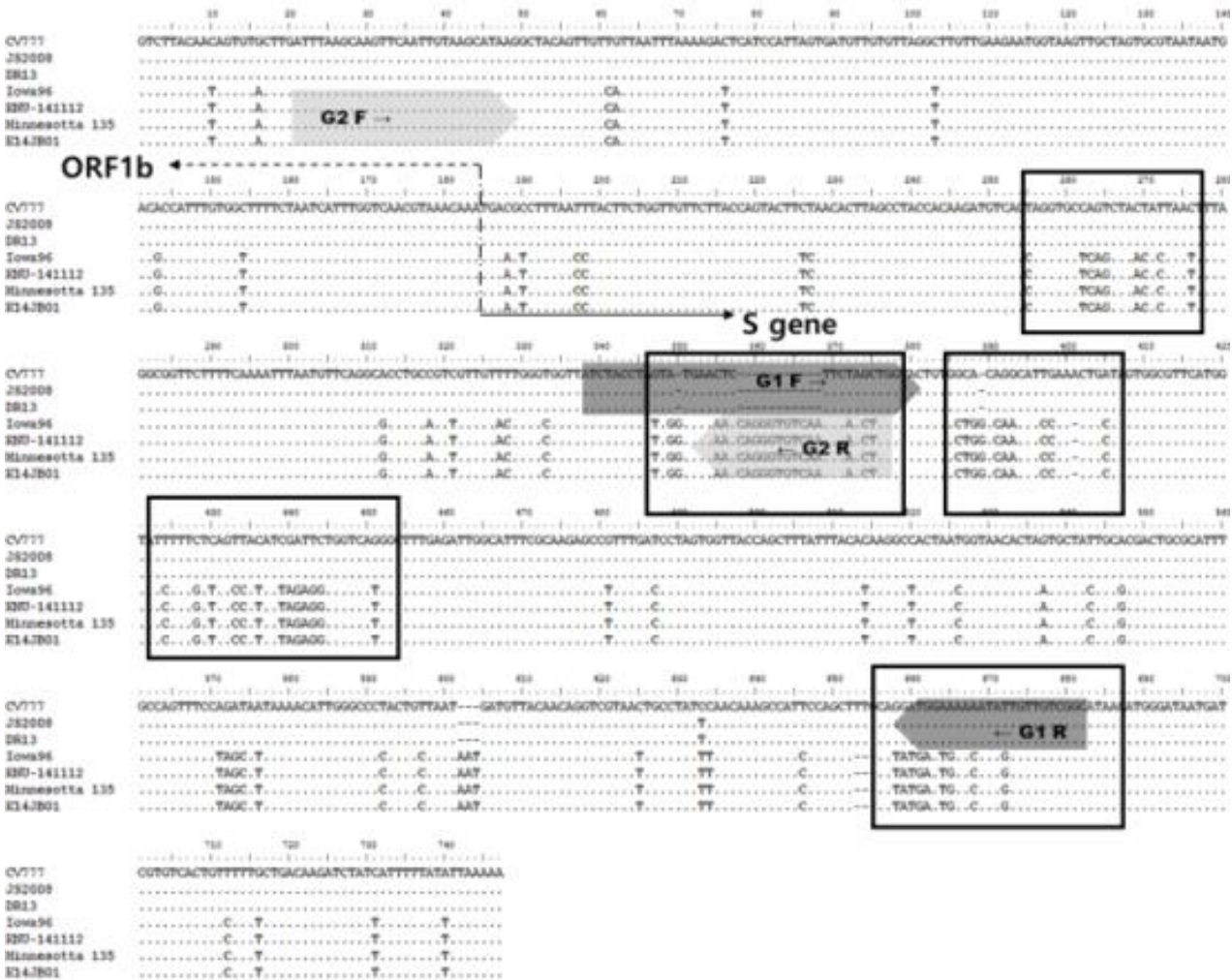


그림. 감별진단 프라이머 설계부위 및 선정된 프라이머 부위

아래의 표와 같이 각각의 프라이머 후보를 선정하여 G1 F/R후보, G2 F/R 후보 프라이머를 각각의 조합으로 모두 PCR을 진행하여 가장 정확하게 구분해 낼 수 있는 조합을 선정하였음. (Bold체)

표. 감별진단 프라이머 제작을 위한 프라이머 후보군

	G1 F	G1 R	G2 F	G2 R
1	TTCTAGCTGGTACTGTGG CA	CCGACAACAATATTTTTT CCA	TGGTGAAAACCAGGGTG T	GTTATGCCGACAACACT ATGTT
2	TATCTACCTAGTATGAAC TCTTCTAGCT	TTGCAGGATGGAAAAA TATTG	GATTTAAGCAAGTTCAAT TGTAAGC	AAAGCCATGACCACCTC TA
3	X			GGCCCAATGTTTTAATGC TA
4				GGTATCTTTGTTAGCCAT ATTAGAGG
5				AAGTTGAATTGACACCCT GGT
6				CAGTTGGATGTTGGCCA G
7				GTTGAATTGACACCCTG GTTT

최종적으로 선발된 프라이머의 염기서열은 다음 표와 같음.

표. PEDV G1, G2 감별진단 프라이머 염기서열

서열번호	이름	서열(5' → 3')	산물 크기
1	G1-F	TATCTACCTAGTATGAAC TCTTCTAGCT	340 bp
2	G1-R	CCGACAACAATATTTTTTCCA	
3	G2-F	GATTTAAGCAAGTTCAATTGTAAGC	380 bp
4	G2-R	AAGTTGAATTGACACCCTGGT	

감별 진단 PCR은 한 튜브 내에서 두가지 바이러스를 감별해 낼 수는 없음. 왜냐 하면 산물의 크기가 340 bp와 380 bp로 40 base pair밖에 차이가 나지 않기 때문에 one-tube 감별진단 보다는 separate-tube 감별진단 방식으로 설계하였음.

PCR방법은 94℃ 5분, (94℃ 30초, 58℃ 30초, 72℃ 30초) x 35 cycles, 72℃ 7분으로 수행하였음.

□ Vero cell을 이용한 PEDV 대량 (고역가) 배양법 확립

- 1 용기 용량에 따른 배양능 확인

2차년도까지 진행한 세포배양 관련 연구를 통해 PEDV가 잘 자라는 Vero cell clone을 확보 하였으며 Microcarrier를 이용한 Vero cell증식 조건을 확립하였음.

3차년도에는 이들 조건 (트립신 함유 SFM을 이용한 Microcarrier부유배양)을 이용한 Vero cell배양 및 PED바이러스 증식 조건 확립을 위한 시험을 진행하였음.

2차년도까지 진행시에는 트립신 없이 증식할 수 있는 PEDV DR13주를 이용하여 FBS또는 Serum replacer가 들어있는 D-MEM일반 배지를 이용하여 증식능을 확인하였음. 세포에 적응하지 않은 PED 바이러스는 트립신을 사용해야 하기 때문에 FBS를 사용하지 않는 SFM (serum free media)에 트립신을 첨가하여 조건을 확립하고자 함.

● 연구 방법

- 배지 조성

조건	배지	첨가물
C1	ProVerol (Serum free)	Trypsin 4 μ g/ml
C2	ProVerol (Serum free)	Trypsin 2 μ g/ml
C3	ProVerol (Serum free)	-

- 사용 용기

2차년도에 확립한 기준 700~1000 mg of microcarrier/300ml에 준하여 재료를 준비 하였으며 용기는 500ml, 250ml, 100ml spinner flask를 이용하였음.

500ml spinner flask

- 배지 양: 300ml
- 세포 개수: 10⁶ cells/ml
- 마이크로 캐리어수: 200mg/100ml

250ml spinner flask

- 배지 양: 150ml
- 세포 개수: 5 x 10⁵ cells/ml
- 마이크로 캐리어수: 200mg/100ml

100ml spinner flask

- 배지 양: 50ml
- 세포 개수: 2×10^5 cells/ml
- 마이크로 캐리어수: 100mg/50ml

- 바이러스 접종

500ml flask

- 500ml spinner flask에 microcarrier를 300ml 용량에 맞추어 적용: $3 * 200 = 600\text{mg/flask}$
- SFM으로 175cm^2 에 배양한 Vero cell 1511-4 clone을 트립신으로 소화하여 세포수를 3×10^8 개로 조정하여 플라스크에 넣음.
- SFM 150ml을 넣고 30분 간격으로 처음 3시간 동안 80rpm으로 30초간 교반후 정치를 반복.
- 3시간 이후 80 rpm의 속도로 교반을 지속함
- 24시간 경과 후 PEDV QIPA1401주 10ml 접종 ($10^{5.5}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$)
- 트립신 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가
- 교반을 3시간 동안 멈춤
- 3시간 이후 배지 150ml을 추가하여 교반 실시

250ml flask

- 250ml spinner flask에 microcarrier를 150ml 용량에 맞추어 적용: $1.5 * 200 = 300\text{mg/flask}$
- SFM으로 175cm^2 에 배양한 Vero cell 1511-4 clone을 트립신으로 소화하여 세포수를 10^8 개로 조정하여 플라스크에 넣음.
- SFM 80ml을 넣고 30분 간격으로 처음 3시간 동안 80rpm으로 30초간 교반후 정치를 반복.
- 3시간 이후 80 rpm의 속도로 교반을 지속함
- 24시간 경과 후 PEDV QIPA1401주 5ml 접종 ($10^{5.5}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$)
- 트립신 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가
- 교반을 3시간 동안 멈춤
- 3시간 이후 배지 70ml을 추가하여 교반 실시

100ml flask

- 100ml spinner flask에 microcarrier를 50ml 용량에 맞추어 적용: $0.5 * 200 = 100\text{mg/flask}$
- SFM으로 175cm^2 에 배양한 Vero cell 1511-4 clone을 트립신으로 소화하여 세포수를 10^7 개로 조정하여 플라스크에 넣음.
- SFM 20ml을 넣고 30분 간격으로 처음 3시간 동안 80rpm으로 30초간 교반 후 정치를 반복.
- 3시간 이후 80 rpm의 속도로 교반을 지속함
- 24시간 경과 후 PEDV QIPA1401주 3ml 접종 ($10^{5.5}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$)
- 트립신 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가
- 교반을 3시간 동안 멈춤
- 3시간 이후 배지 30ml을 추가하여 교반 실시

● 연구 결과

트립신을 함유한 SFM을 이용하여 부유 배양한 PEDV QIAP1401주의 증식성을 알아보기 위하여 모든 시험에서 바이러스 접종 3시간 이후 상층액 1ml을 채취하여 바이러스 채독시까지 냉동 보관하였음. 바이러스 채독 후 접종 직후 상층액의 바이러스 역가와 증식 후 바이러스 역가를 비교하였음.

표. 각 용기별 바이러스 부유배양에 대한 평균 바이러스 함량

용기	바이러스 평균 함량 ($\log\text{TCID}_{50}/\text{ml}$)	
	접종 전	채독 후 (5일후)
500ml	3.9	5.3
250ml	3.1	4.2
100ml	4.1	5.4

표와 같이 접종전과 접종 후 바이러스 역가에 크게 차이가 없었음.

바이러스 증식 최적 조건을 확립하기 위하여 세포수, microcarrier수, 바이러스 접종량을 조정하여 다양한 조건의 시험 수행하였음..

□ Vero cell을 이용한 PEDV 대량 (고역가) 배양법 확립- 2

100ml flask를 이용한 조건 탐색

바이러스 증식 최적의 조건을 확립하기 위하여 100ml flask를 이용하여 아래와 같은 방법으로 PEDV QIAP1401주를 배양하였음.

● 연구 방법

100ml flask

- 100ml spinner flask에 microcarrier를 50ml 용량에 맞추어 조정
- SFM으로 175cm² 에 배양한 Vero cell 1511-4 clone을 트립신으로 소화하여 세포수 조정

세포수	Microcarrier 용량		
	100mg	150mg	200mg
10 ⁶	조건1	조건2	조건3
10 ⁷	조건4	조건5	조건6
10 ⁸	조건7	조건8	조건9

- SFM 20ml을 넣고 30분 간격으로 처음 3시간 동안 80rpm으로 30초간 교반 후 정치를 반복.
- 3시간 이후 80 rpm의 속도로 교반을 지속함
- 24시간 경과 후 PEDV QIAP1401주 2 ml 접종
 - 접종량: 10^{3.5}TCID₅₀/ml / 10^{4.5}TCID₅₀/ml / 10^{5.5}TCID₅₀/ml
- 트립신 2µg/ml의 농도로 첨가
- 교반을 3시간 동안 멈춤
- 3시간 이후 배지 30ml을 추가하여 교반 실시

● 연구 결과

상기 시험과 같이 모든 시험에서 바이러스 접종 3시간 이후 상층액 1ml을 채취하여 바이러스 채득시까지 냉동 보관하였음. 각 조건별로 바이러스 채득 후 접종 직후 상층액의 바이러스 역가와 증식 후 바이러스 역가를 비교하였음

표. 각 배양 조건별 바이러스 역가, 바이러스 접종량 $10^{3.5}$ TCID₅₀/ml (평균, log TCID₅₀/ml)

세포수	Microcarrier 용량		
	100mg	150mg	200mg
10^6	1.9 / 4.4*	1.8 / 4.4	1.8 / 4.4
10^7	1.7 / 4.2	1.9 / 4.4	1.8 / 5.0
10^8	1.9 / 4.2	1.7 / 5.7	1.8 / 5.5

* 접종전 / 채독시 (5일 배양 후)

표. 각 배양 조건별 바이러스 역가, 바이러스 접종량 $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml (평균, log TCID₅₀/ml)

세포수	Microcarrier 용량		
	100mg	150mg	200mg
10^6	2.8 / 4.9	2.7 / 5.1	2.7 / 5.2
10^7	2.7 / 4.9	2.7 / 5.4	2.7 / 5.6
10^8	2.7 / 4.9	2.8 / 5.6	2.7 / 5.6

* 접종전 / 채독시 (5일 배양 후)

표. 각 배양 조건별 바이러스 역가, 바이러스 접종량 $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml (평균, log TCID₅₀/ml)

세포수	Microcarrier 용량		
	100mg	150mg	200mg
10^6	4.0 / 5.4	4.0 / 5.4	4.0 / 5.4
10^7	4.0 / 5.0	4.0 / 5.5	4.0 / 5.4
10^8	4.0 / 5.3	4.0 / 5.4	4.0 / 5.2

* 접종전 / 채독시 (5일 배양 후)

상기 시험에 따라 바이러스의 함량은 최대 $10^{5.7}$ TCID₅₀/ml 이상으로 증가하지는 않았음.
바이러스 증식 효율이 좋은 조건에 대해서는 아래와 같이 확립하였음

100ml spinner flask

바이러스 접종량: 희석후 바이러스 함량 $10^{2.0}$ TCID₅₀/ml 수준으로 조정

Microcarrier 양: 150mg

세포 접종량: 10^8 cell/50ml

배지 용량: 50 ml

제 1협동과제(바이오포아): 역유전학을 이용한 PED 백신주 작출(작출 과정 전체 요약)

□ 역유전학 이용 PEDV 신규 백신후보 작출

본 연구과제는 과제 계획 당시 RNA recombination 방법으로 약독화된 PEDV 백신주(DR13)의 감염성 클론(V11-54)을 제작하며, DR13 백신주에서 S gene 전체를 야외주로 교체한 감염성 클론(V11-49)와 DR13 백신주에서 S1 gene만 야외주로 교체한 감염성 클론(V11-51)등을 작출할 계획 이었음.

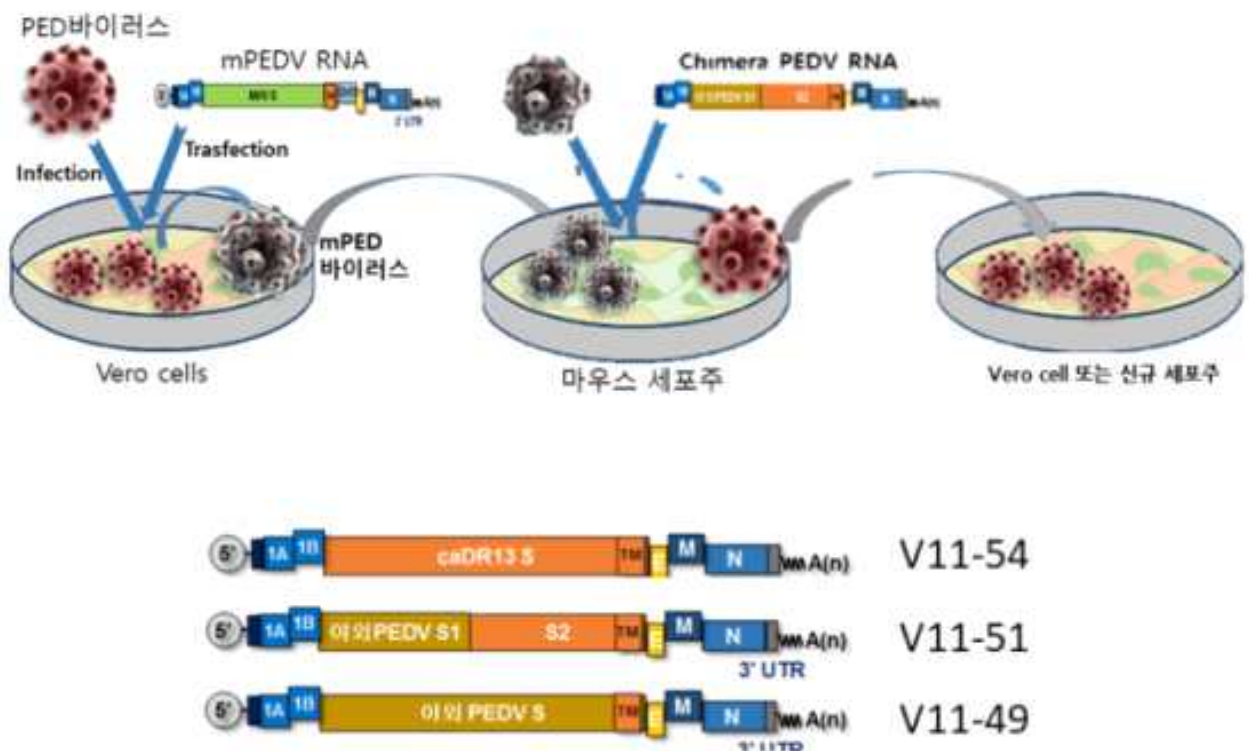
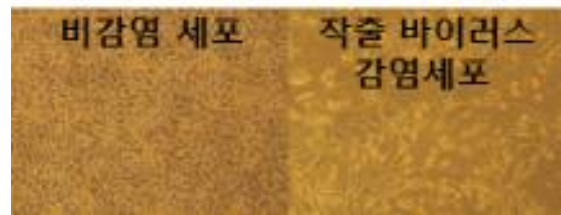
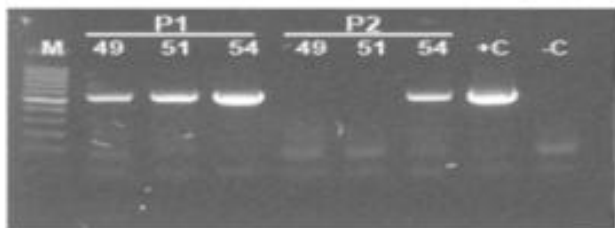


그림. Targeted RNA recombination 방법을 통한 PEDV의 작출 과정.

본 과제에서 RNA recombination법 및 코로나바이러스들 간의 숙주세포 특이성을 이용한 신규 PED 백신 후보주 작출 실험에서 숙주세포 receptor binding에 중요한 역할을 하는 S1 부분을 야외주 형태로 변형시킨 경우(V11-49, V11-51) cell culture adaptation 된 형태의 S1(V11-54)을 사용한 경우와 달리 신규바이러스 작출 효율이 매우 낮으며 작출 된

바이러스의 경우에도 계대배양이 되지 않거나 일부 유전자가 소실되는 문제가 계속 발생하였음. 즉, 작출 바이러스 중 세포배양에 이미 적응되었던 바이러스인 **DR13 백신주의 감염성 클론(V11-54)의 경우** 작출 되어 안전적으로 세포에서 계대되었으나, S gene의 일부(V11-51) 혹은 전체가 야외주 형태(V11-49)를 갖는 경우 계대배양이 진행될수록 바이러스가 소실되거나 일부 유전자의 소실을 확인(PCR 확인 시 amplicon size 감소로 확인됨). 이후 RNA recombination법으로 많은 시도가 했으나, V11-54클론 외 나머지 감염성 클론은 작성되지 못하였음.

작출 바이러스의 계대 배양 실험(P1, P2)



P1 : Transfection 3일 후 vero cell 감염 -> 6DPI 확인

P2 : P1 virus 감염 -> 3DPI 확인

M: 100bp marker(intron)

7ul/well loading 확인

+C : 1/10희석 attDR13(녹수백신)
TGE/PED kit : 45°C/30min-94°C/5min-(94°C/30sec-50°C/30sec-40sec)40cycles

V11-49(P2) 작출 바이러스의 계대 배양 중 유전자 소실 확인



1, 2: V11-49 I (1/6 I) P1 감염 후 6DPI

Targeted RNA recombination 방법은 세포를 감염시켜 만들어진 full-length viral RNA와 in vitro transcription으로 만든 viral RNA fragment와의 intracellular recombination에 의해 새로운 바이러스를 만들어 내는 방법으로, 신규 바이러스가 특이적인 phenotype을 나타내도록 관련 유전자를 조작하거나(temperature sensitivity 또는 plaque size를 변화시키는 등) host cell tropism에 영향을 미치는 S proteins를 단계적으로 이용하여 작출에 이용한 helper virus들로부터 신규바이러스를 쉽게 선별할 수 있게 함. 이 방법은 ① 전체 cDNA를 cloning 할 필요가 없어 특히 replicase gens에 의한 문제가 발생하지 않고 ②

3'end 쪽 약 8kb 정도의 structural gene만을 조작하게 되므로 염기서열의 검증이 용이하며
 ③ 안전하고 replication이 용이한 virus를 backbone으로 사용 시 신규 작출 바이러스 또한 그 특징을 갖게 되는 장점이 있으나 ① 목적하는 recombinant viruses를 만들어내기 위해 감염에 사용한 replicase genes에 의존하게 되므로 이 유전자 자체를 modification 하지 못하는 단점이 있으며 ② S gene의 cell tropism을 이용하여 recombinant virus를 selection하는 방법이므로 receptor binding 또는 fusion과 관련된 site에 mutation이 있는 recombinant virus는 만들어 지기 어려운 단점이 있는 방법으로 알려져 있음.

이러한 이유로 본 연구과제에서도 V11-54만 작출 되었을 수 있다고 판단되어 2차 년도 부터는 BACs system을 이용하여 V11-49와 V11-51 감염성 클론의 작출을 시도하였음.

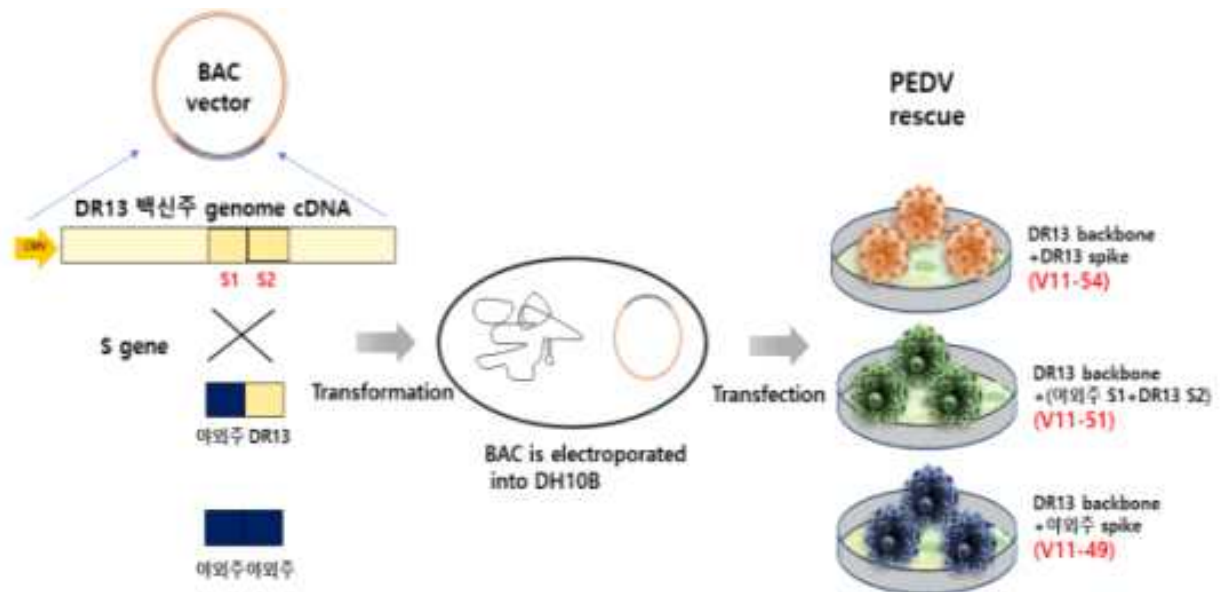
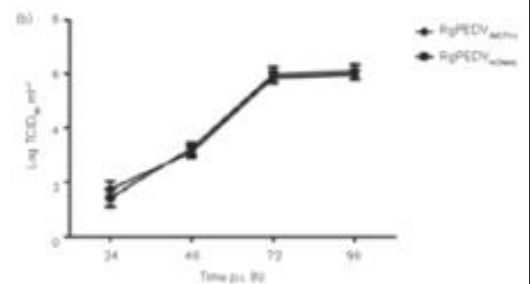
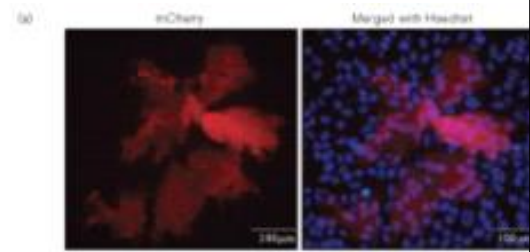
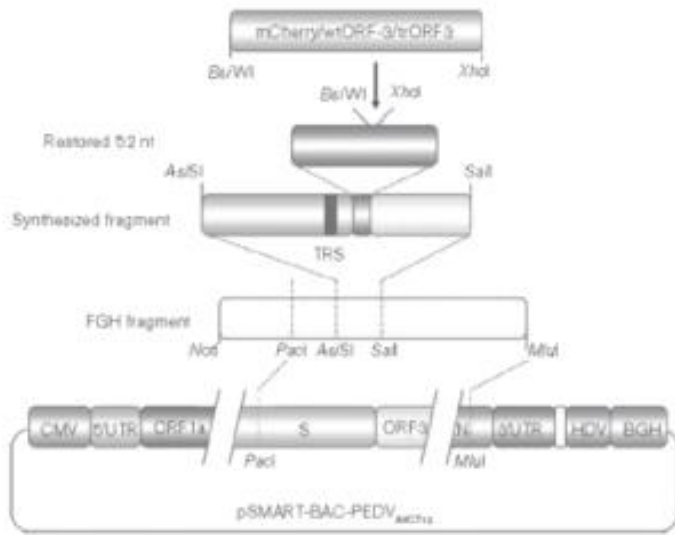


그림. BACs system 방법을 통한 PEDV의 작출 과정.

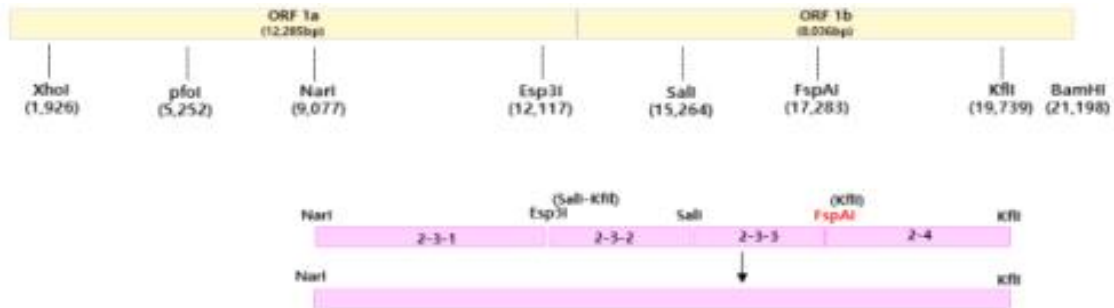
BACs system은 300kb 이상의 매우 큰 외래 유전자를 도입할 수 있고 세포 당 매우 낮은 plasmid copy 수를 유지하여 replicase gene과 같이 host cell에 toxic 하거나 불안정한 유전자의 cloning에 이용되어 왔음. 전체 cDNA를 cloning하게 되므로 각각의 유전자를 개별적으로 조작이 가능하다는 장점이 있음. ORF3 유전자의 발현이 소실된 바이러스의 경우 vero E6-APN 세포배양이 잘되는 특성을 이용하여 실제 다른 연구에서 8개의 fragment로 구성된 full length cDNA를 cloning하는 과정에서 ORF3 부분에 mCherry reporter gene을 삽입하여 virus replication과 spread를 관찰하는데 이용한 예가 있음. 해당 실험에서 ORF3 부분에 외래 유전자를 도입(RgPEDV_{mCherry}) 한 경우에도 원본

바이러스(RgPEDV_{AVCT12})와 비교 시 바이러스 증식활성(replication kinetics)에는 변화가 없음을 확인 함.

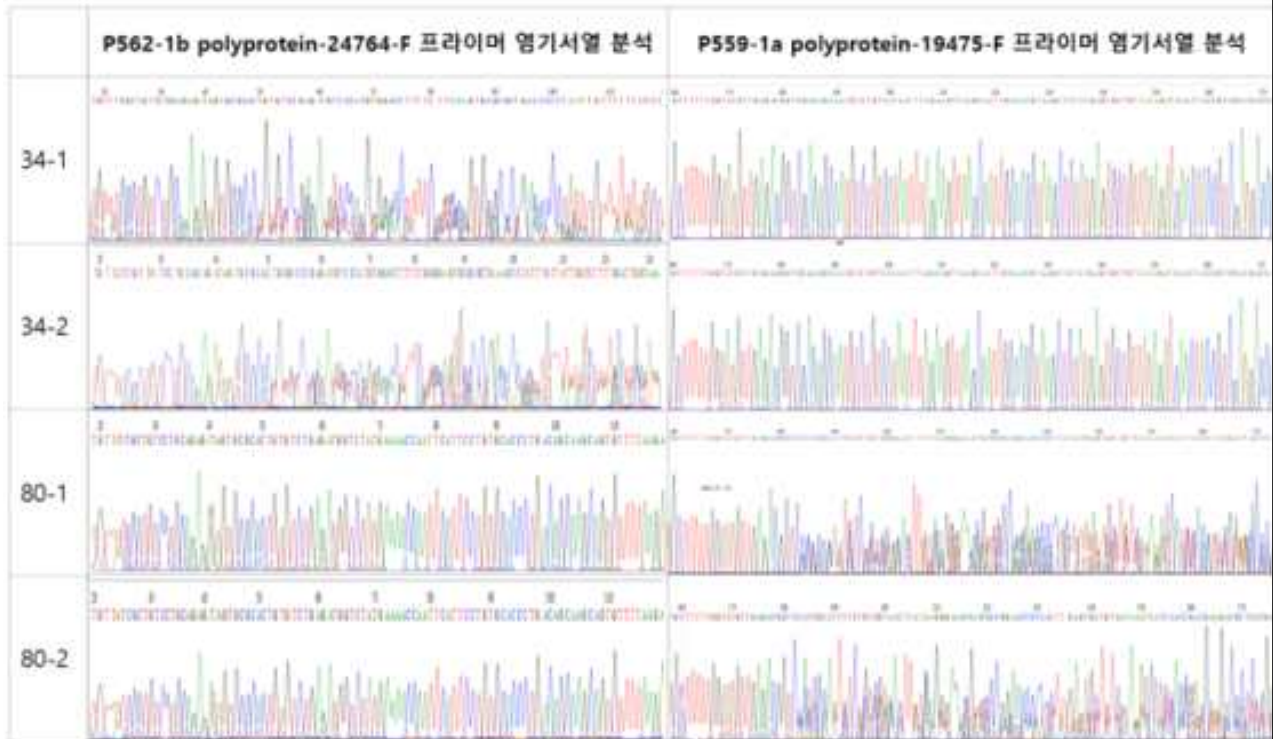


Journal of General Virology(2015), 96, 2206-2218

하지만 이 방법의 경우도 ① Cloning 과정이 끝난 후 bacterial transposon sequence(ATGGTACCG)가 바이러스의 genomic sequence 내에 끼어들 수 있으므로 이를 막기 위해 모든 cloning 및 subcloning vector 들은 DH10B competent cell을 사용해야 하며 모든 단계에서 염기서열 분석을 해야 하고 ② Fragment assembly를 위한 제한효소의 선별에 있어 자체의 enzyme site를 없애거나 새롭게 도입하는 경우 이러한 변화가 virus의 replication에 영향을 미치지 않도록 construction design 단계에서 충분한 고려가 필요 함. 본 과제에서도 매 단계마다 새롭게 만들어진 clone은 RFLP 및 염기서열 분석을 통해 확인하였고 실제 유전자 간 연결부위에서 예상치 못한 유전자의 혼입 및 이상 구조가 자주 발생하였을 뿐 아니라 BACs system의 매우 낮은 plasmid copy 수에 의해 충분한 양의 DNA를 수확하기 어려웠음. 본 연구에서도 많은 어려움을 겪었음. 그 예로 replicase 단백을 encoding하는 1a, 1b 유전자를 4개의 fragment(2-3-1, 2-3-2, 2-3-3, 2-4)로 나누어 cloning 단계에서 host cell에 대한 replicase gene의 toxicity를 낮추고자 2-3-1 fragment에 2-3-2 fragment를 연결하기 이전에 2-3-3, 2-4 fragment를 연결하는 과정에서 2개의 fragment를 연결 후 나머지 1개의 fragment를 연결한 경우(34-1, 34-2 clone) 및 3개의 fragment를 한 번에 연결한 경우(80-1, 80-2 clone) 모두에서 연결부위에 예상치 못한 유전자의 혼입이 발생함을 확인 함.



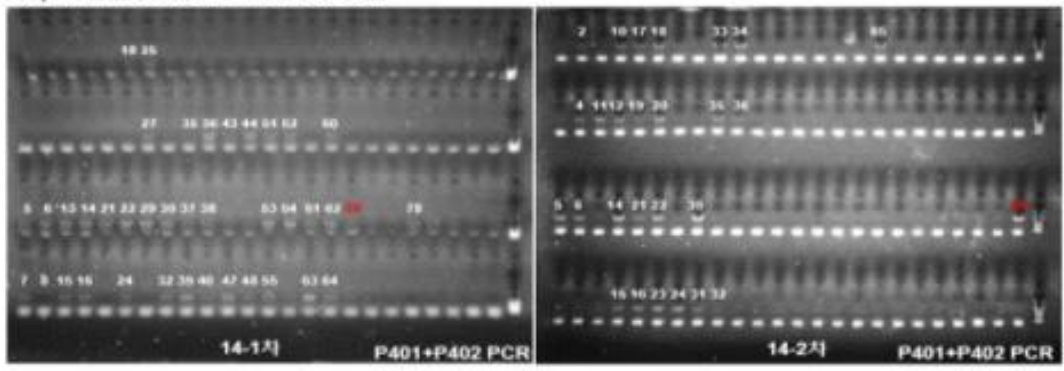
Primer	염기서열 의뢰 Clone No.				
	분석위치	34-1	34-2	80-1	80-2
P390-attDR13-9031-R	2-3-1	○	○	○	○
P391-attDR13-8834-F	2-3-1	○	○	○	○
P392-attDR13-10442-R	2-3-1	○	○	○	○
P393-attDR13-10231-F	2-3-1	○	○	○	○
P631-PEDV-2-3-1-EcoRI-R	2-3-1	○	○	○	○
P561-1b polyprotein-23105-R	(2-3-3)->(2-3-1) 연결부위	○	○	○	○
P559-1a polyprotein-19475-F	(2-3-1)->(2-3-3) 연결부위	○	○	mixed peak	mixed peak
P401-attDR13-15843-F	2-3-3	○	○	짧게읽힘	○
P641-PEDV-2-3-3-1b-16725R	2-3-3	○	○	○	X
P562-1b polyprotein-24764-F	(2-3-3)->(2-4) 연결부위	mixed peak	mixed peak	○	○
P402-attDR13-17443-R	2-4	○	○	X	○
P405-attDR13-18650-F	2-4	○	○	○	○



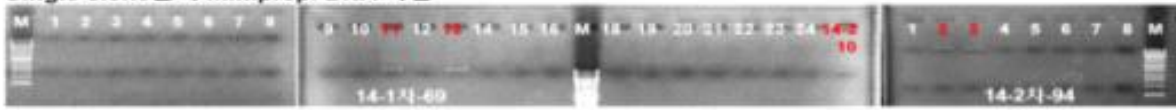
* 염기서열 분석결과에서 유전자간 연결부위에 유전자 혼입으로 인한 mixed peak의 양상이 확인 됨.

이와같은 유전자의 혼입 및 이상구조가 발생한 clone을 배제하기 위하여 1차 PCR 반응을 통해 제한효소로 연결된 fragment를 보유하는 clone을 확인 후 PCR 양성 clone을 갖는 대장균을 agar plate상에서 도말하여 다시 single clone들로 분리함. 분리된 single clone들의 plasmid DNA를 각각 추출하고 agarose gel 상에서 확인 후 양쪽 연결부위를 확인할 수 있는 PCR 반응을 통해 새롭게 연결된 유전자를 안정적으로 보유하면서 비교적 높은 DNA 수율을 나타내는 clone을 성공적으로 선별해 내었음. 즉, 클로닝 과정 중 유전적 불안정성에 의해 생기는 오류들은 다음 그림과 같이 각 클론을 고형 배지에 도말 후 다시 선별하는 과정을 반복함으로써 정상적인 클론을 확보하는 방법으로 문제점을 극복하였음.

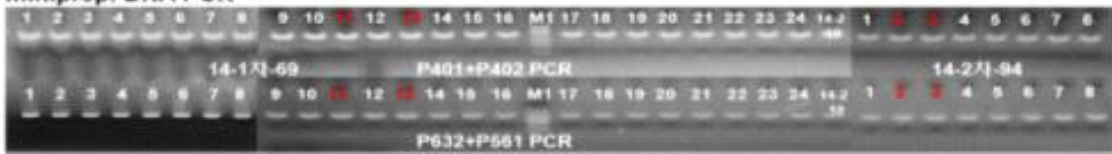
(1+3)+4 연결 clone의 1차 PCR 확인

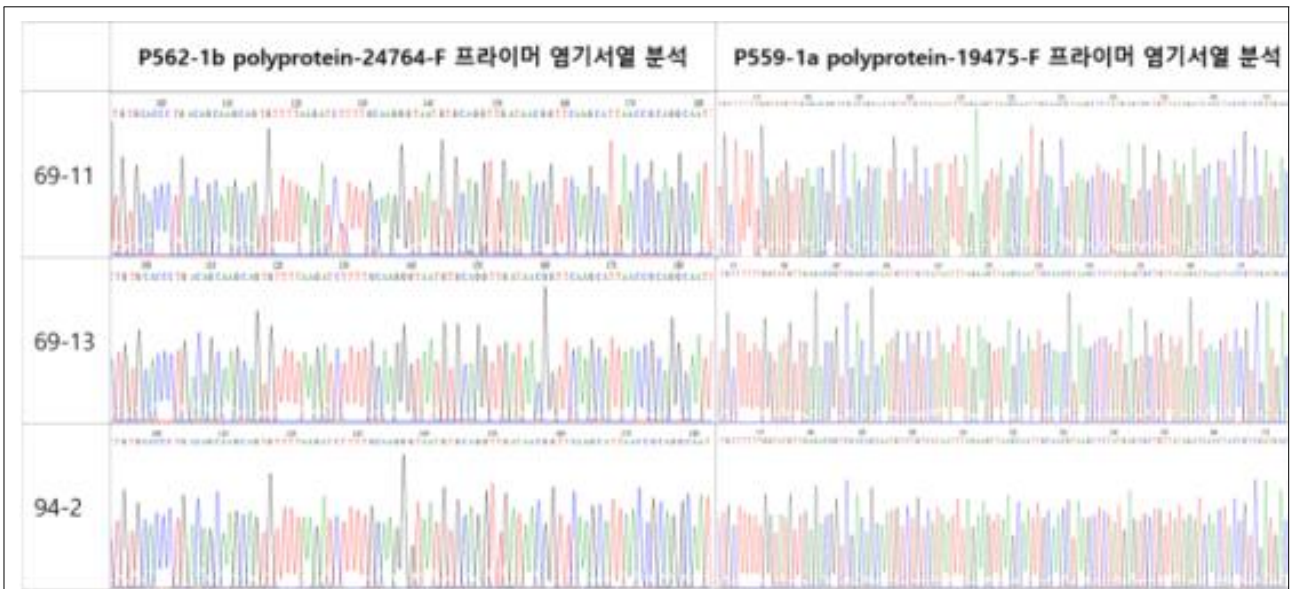


Single clone들의 miniprep. DNA 확인



miniprep. DNA PCR





* 염기서열 분석을 통해 유전자간 연결부위에 유전자 혼입으로 인한 mixed peak 양상이 없음을 확인.

- 유전적으로 안정한 3종의(V11-49, V11-51, V11-54) BACs 클론들을 확보하였으며, vero세포주에 도입과정을 거쳐 현재까지 2종(V11-49, V11-51)의 PEDV작출에 성공하였다. 작출된 PEDV중 V11-51은 2014년 당진에서 분리된 최근 야외주의 S1 gene을 원형 그대로를 갖는 PEDV며 나머지는 약독화 백신주인 DR13의 계놈과 동일함. 그러므로 최근 강병원성주의 항원성을 그대로 보유하나 약독화되어 있을 가능성이 높아 향후 생 백신 종독으로 개발완료 될 경우 활용가치가 크게 기대되는 종독 주입.

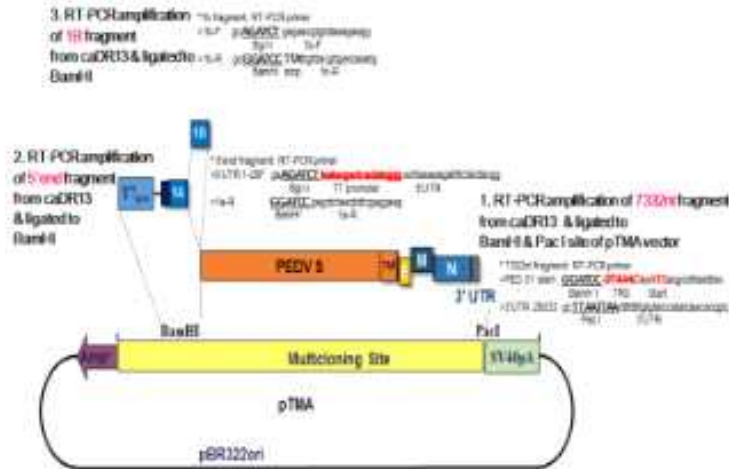
제 1협동과제 : 역유전학을 이용한 PED 백신주 추출(연차별 수행내용)

1차년도

역유전학용 PED바이러스 전달 벡터제작.

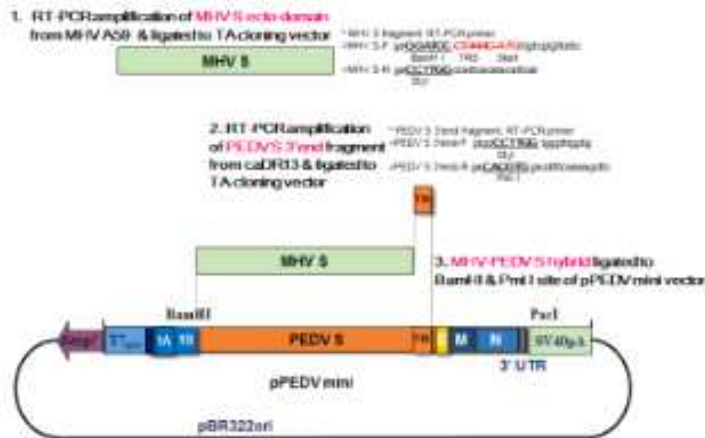
◎ PEDV mini gemone vector제작.

PEDV의 역유전학 시스템을 확립하기 위하여 PEDV의 5'과 3'말단의 promoter부위를 포함한 PEDV의 구조단백질을 만들어내되 전제 유전자의 3분의 2를 차지하는 비구조 단백질 발현 부위를 결손한 미니 genome-replicon벡터를 다음 그림과 같이 3단계를 거쳐 제작하였다.



◎ MHV-PEDV hybrid vector 제작.

Helper바이러스를 이용하여 완전한 PEDV를 RNA재조합으로 만들어내기 위해서는 새로 재조합된 바이러스를 helper바이러스와 분리하여 순수 배양하여 클로닝 할 수 있어야 한다. 새로 재조합된 바이러스만 선택적으로 배양 가능한 숙주세포 특이성을 이용한 선발 시스템을 이용하기 위해 마우스세포에서만 증식 가능한 MHV-PEDV hybrid mini-genome replicon 벡터를 아래 그림과 같이 3단계를 거쳐 제작함.



◎ 다양한 PEDV 신규 백신 후보 작출용 전달 벡터 제작.



그림. 다양한 신규 PEDV 백신주 작출용 전달 벡터들.

새로 개발될 PEDV는 아래의 특성을 갖도록 위 그림과 같은 다양한 전달 벡터를 개발하였다..

① 최근야외 분리주의 항원성을 갖는 PEDV

Splike유전자 중 세포감염시 리셉터와 결합하며 중화항체가 주로 만들어지는 것으로 알려진 S1 도메인 혹은 S gene전체를 기존 DR13대신 교체하거나 세포주 증식성을 고려하여 특정 항원결정부만을 치환한 PEDV.

② 세포내 증식성이 뛰어난 PEDV

백신 생산 원가를 낮추며 면역원성을 증가시키기 위하여 trypsin없이도 세포내에서 분절되어 세포융합이 가능하도록 S gene cleavage site의 변이를 유도한 PEDV.

◎ PED바이러스 역유전학을 위한 벡터종류 및 제작과정

1) 사용된 primer list

번호	primer 이름	primer 염기서열
310	MHV-S-F1(BamHI)	GAGGATCC-GTAAAC-AAATGCTGTTGCGTGTGTTATTCTATTTTTGC transcription regulatory sequences (XUA(A/G)AC
311	MHV-S-F2(BamHI)	GAGGATCCTCTAGAGTCTAAACATGCTGTTGCGTGTGTTATTC
312	MHV-S-R-NcoI	TACCATGGCCATTTACATACATTTTCAT
313	MHV-S1-R-KpnI	TAGGTACCACTATTAATGCCATTTAACAATATATTAGC
314	MHV-S2-F-KpnI	TAGGTACCACATGTTCCACAGATTTGC
315	DR13-TM-F-NcoI	GCCA-TGGTGGGTTTGGTTGATCAT
316	DR13-TM-R-NcoI	ACCAT-GGCCACTTGATATATGTCTCAACTCG
317	DR13-BstBI-R	CTTCGAAGTGGCCCTGGATT
318	DR13-AvrII-F	GCCTAGGTACTGTTGATGAAGACTATAAGC
319	DR13-AvrII-R	ACCTAGGCCATTAGTAACCACTTTATTA AAAAGC
320	PED-S1-Start-DR13(BamHI)	GGATCCGTAACA AATGAGGTCTTTAATTTACTTCTG
321	PED-S1-Start-DJ(BamHI)	GGATCCGTAACA AATGAAGTCTTTAACCTACTTCTG
322	pBHA-F	ATTGTCTCATGAGCGGATAC
323	pBHA-R	GCGTTATCCCCTGATTCTGT
324	atDR13 TM-F-NcoI	ccatggtggggttggtgattattttattggtc
325	atDR13 BstBI-R	CTTCGAAGTGGCCCTGGATTggtc
326	atPED S1 start-DR13	GGATCCGTAACA CaaATGacgcctttaatttact
327	atPED S1 start-DR13-a	GGATCCGTAACA CaaATGacgcctttaatttactctg
328	MHV-S2-673-F	ctgcatgcaggcagcagttg

329	attDR13DJ-S1-714-F	GCTGCCAATGTATTTGC
330	attDR-TMEMN-767-F	GACTCAATTCAACTAGACG
331	PED-5109-1B-20396-20416	GACGGCAACACCATGCATGCC
332	5'UTR1-25F	gaAGATCT taatagactcactataggg acttaaaaagattttctatctacgg
333	1a-R	GGATCC gagctctaactcttcgaggaag
334	1b-F	gcAGATCT gagaacgtgtctaagaagg
335	1b-R	gcGGATCC TtAtttgttctggtgaccaaag
336	PEDS1start	GGATCC GTAAAC aaATGacgcctttaatttac
337	3'UTR 28033	gcTTAATTAA tttttttgtgtatccatcaacaccgtc
338	MHV S-F	gaGGATCC CTAAAC- ATGctgttcgtgtttattc
339	MHV S-R	gaCCTTGGccatttcacatacatattcat
340	PEDV S 3'end-F	gtggCCTTGG tgggtttggtg
341	PEDV S 3'end-R	gaCACGTG gaccttttcaaagcttc
342	PED-4535-S-22164-22187-R	GCCGCAGAGACAGTAATATTAACA
343	PED-4538-S-23484-23507-F	GTATAGTGCCTCTCTCATCGGTGG
344	PED-4886-1B-20156-20176-F	GGATCCGAGAACGTGTCTAAAGAAGGC
345	PED-4921-T7/NA-F	GCAGATCTTAATACGACTCACTATAGGG
346	PED-4924-E-25655-25674-R	GCCGGCCGAGATCTTTATATGTCAATAACAGTAC
347	PED-4977-M-25942-25962-R	ATTATCCACAGCATAAGAGTG
348	PED-5300-E-25403-25446-F	GGTCCACGTGCAGTGATATCACTCAATTCAACTAGACGAGTATG
349	PED-5301-N-26458-26477-R	GCGAGTACCTTAGAAAGGGG
350	PED-S2-3305-F	CTGAGGTTTCAGGCTAGCAGG
351	MHV S-2985	aggtaagatccagtcctgtg
352	MHV S-3628	cagacgtctattgagcctg
353	PED-S1-406-R	TTACGACCTGTTGTAACATC
354	MHV-S1-336-R	CACCTGATGGCGTACTTGTC
355	MHV-S1-918-F	GTGATAAACTGCATGCAGG
356	TM-1067-F	catggaatatcactgacg
357	TM-1846-F	ttggatactggaatgagca
358	TM-3443-F	cactgcattctagttgtg
359	TM-4208-F	GAGTTGGTAGCTCTTGATC
360	TM-5030-F	CTGTGACTGGTGAGTACTCA
361	PEDV-S1-1596	cgactgagcattgaccag
362	PEDV-S1-2420	ggaaattgcatcaccaagt
363	PEDV-S1-3262	catctgattctggacagttg
364	PEDV-S2-4097	GTCTCTCATCGGTGGTATGG
365	PEDV-S2-4904	GAGTTGTGGTGCACCTATG
366	TM-5641	tgacacttattggcaggct

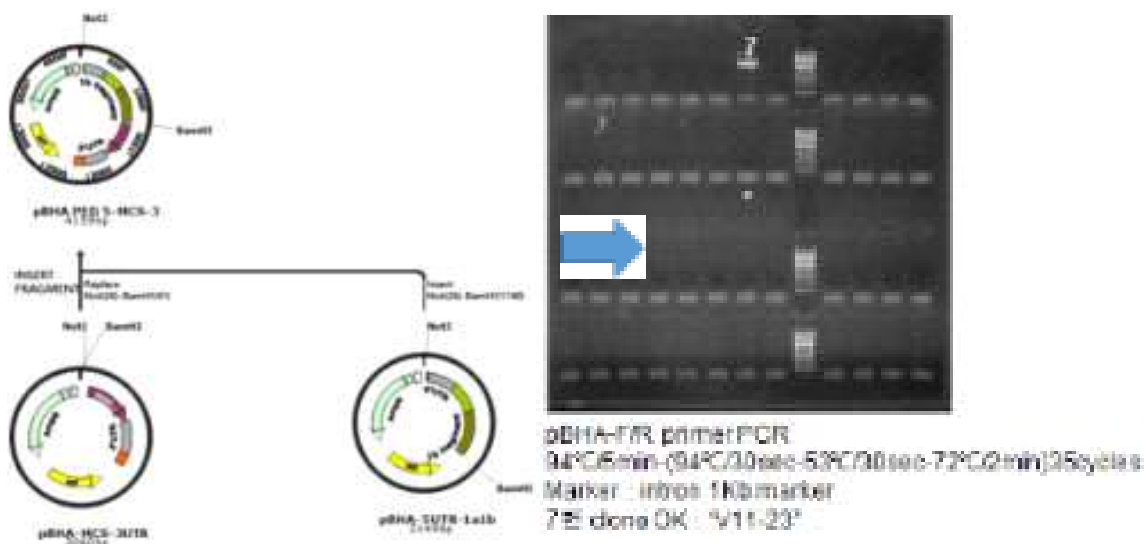
367	TM-7850	gatgcgtcaggctatgctca
368	MHV-S1-1570	AGAACCTTAAGACAAGTACGC
369	MHV-S1-2437	GTAGGCAAGTTGATTTACAGC
370	MHV-S2-3321	CACGGATGAGGCGCTTCC
371	P371-PEDV-all-recomb-R	CTACATTGAGCTCCAACCTCTG
372	P372-PEDV-all-recomb-F	GAGCAGCGTTCAGAGTCTCTC
373	P373-PEDV-all-recomb(1b)-F	GATTACGTTAGCGATGCTGA
374	P374-MHV-recomb(S1)-R	GTGCTAATGCTTGGAGCACT
375	P375-DJ-recomb(S1)-R	TAGTGTTAGCTGAGCACCTG
376	P376-attDR13-recomb(S1)-R	ACTGGCACCTAGTGACATCT
377	P377-MHV-preSgene-F	CATGATGCGCACCATGGTGA

2) 사용된 벡터 및 유전자 list

	Vector name	Gene name	description
인공합성	pBHA-5'UTR-1a1	5'UTR1a1b(pBHA)	인공합성 NotI -(5'UTR1a1b)- BamHI - PacI
	pBHA-MCS-3'UTR	3'UTR(pBHA)	인공합성 MCS(NotI - BamHI - AvrII (StyI)- NcoI - BstBI -(3'UTR)- PacI
	pBHA-attDR13TME MN	attDR13 TME MN	인공합성 NcoI -(attDR13 TME MN)- BstBI
	pBHA-attDR13S1	attDR13 S1	인공합성 BamHI -(attDR13 S1)- AvrII
	pBHA-DJS1	DJ S1	인공합성 BamHI -(DJ S1)- AvrII
TA-클로닝	pCRTopo-attDR13S2	attDR13S2	Amplify JQ023161 att-DR13(23,350-24,609) using DR13 AvrII -F+DR13 TM-R(NcoI) :1,246bp -> TA cloning (P318+P316)
	pCRTopo-DJS2	DJ S1	Amplify 14-001 DJ using PED-S1-Start-DJ(BamHI)+DR13 AvrII -R : 2,747bp -> TA cloning (P321+P319)
	pCRTopo-MHVS(1-1)	DJ S2	Amplify 14-001 DJ using DR13 AvrII -F+DR13 TM-R(NcoI) : 1,246bp -> TA cloning (P318+P316) : Transcription regulatory sequence 포함
	pCRTopo-MHVS(1-2)	MHV-S1	Amplify MHV using MHV-S-F(1or 2)(BamHI)+MHV-S1-R (KpnI) : 1,686bp -> TA cloning (P310+P313) / (P311+P313)
	pCRTopo-MHVS2	MHV-S2	Amplify MHV using MHV-S2-F(KpnI)+MHV-S-R (NcoI) : 2,119bp -> TA cloning (P314+P312)

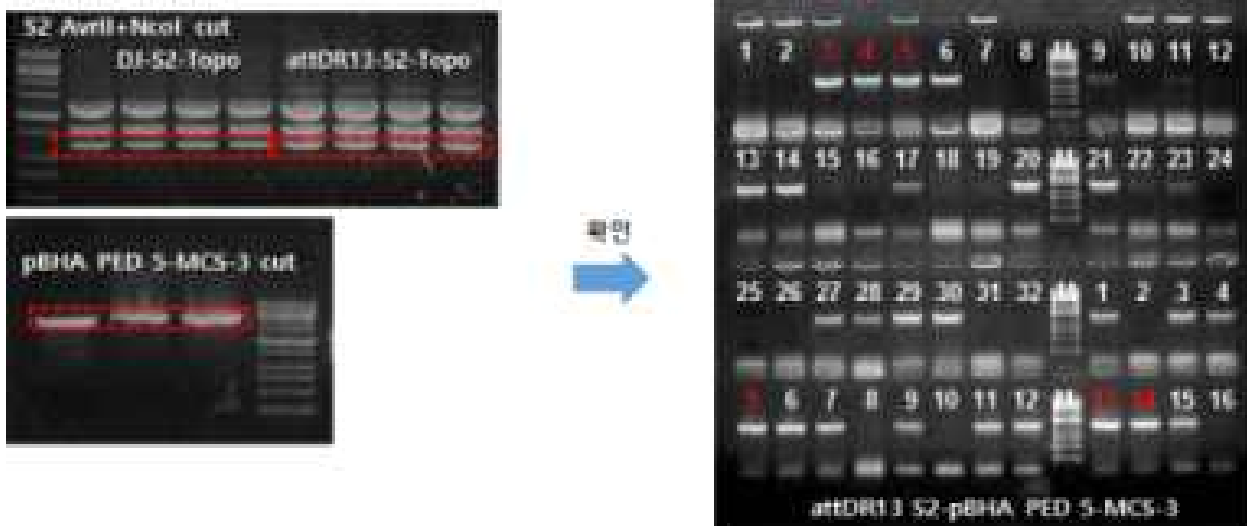
2) “5'UTR1a1b + 3'UTR” vector작성 : **NotI+BamHI**을 사용하여 3'UTR에 5'UTR1a1b를 넣음 ->

“NotI-5’UTR1a1b-BamHI-AvrII(StyI)-NcoI-BstBI-3’UTR-PacI” 됨



3) “pBHA PED 5’UTR-S2-3’UTR vector” 작성 :

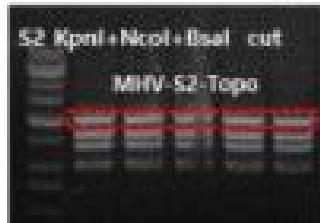
- ① **AvrII+NcoI**을 사용하여 pBHA PED 5’UTR-MCS-3’UTR에 DJ S2, attDR13 **S2**를 넣음



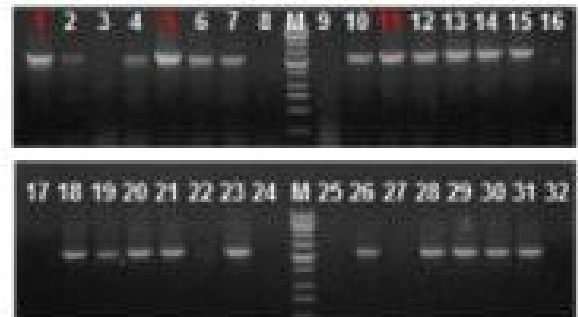
- ② **KpnI+NcoI+(BsaI)**를 사용하여 pBHA PED 5’UTR-MCS-3’UTR에 MHV S2를 넣음

4) “pBHA PED 5’UTR-S2-attDR13TMEMN-3’UTR” vector작성

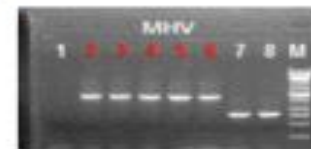
- ① **NcoI+BstBI**을 사용하여 pBHA PED 5’UTR-attDR13 S2-3’UTR에 attDR13 **TMEMN**을 넣음
- ② **NcoI+BstBI**을 사용하여 pBHA PED 5’UTR-DJ S2-3’UTR에 attDR13 **TMEMN**을



넣음

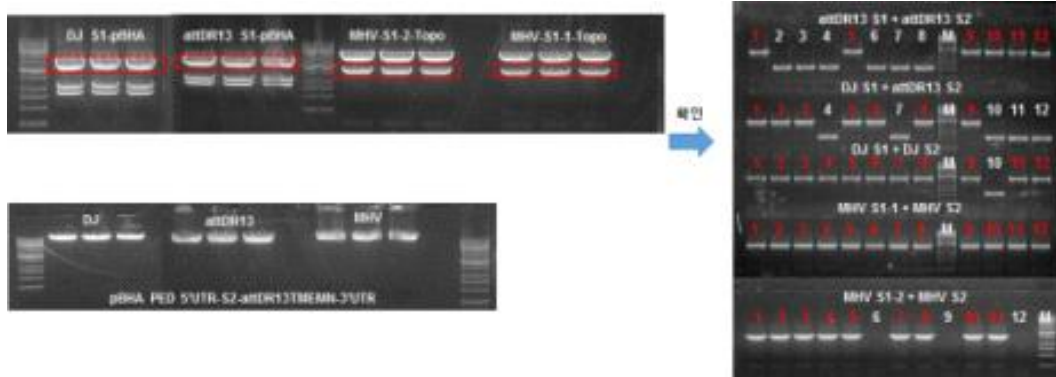


- ③ **NcoI+BstBI**을 사용하여 pBHA PED 5'UTR-MHV S2-3'UTR에 attDR13 **TMEMN**을 넣음



5) “pBHA PED 5-S1-S2-attDR13TMEMN-MCS-3” vector작성 :

- ① **BamHI+AvrII**를 사용하여 pBHA PED 5'UTR-attDR13 S2-attDR13 TMEMN-3'UTR에 attDR13 **S1**을 넣음
- ② **BamHI+AvrII**를 사용하여 pBHA PED 5'UTR-attDR13 S2-attDR13 TMEMN-3'UTR에 DJ **S1**을 넣음
- ③ **BamHI+AvrII**를 사용하여 pBHA PED 5'UTR-DJ S2-attDR13 TMEMN-3'UTR에 DJ **S1**을 넣음
- ④ **BamHI+KpnI**을 사용하여 pBHA PED 5'UTR-MHV S2-attDR13 TMEMN-3'UTR에 MHV **S1-1**을 넣음(transcription regulatory sequences 포함)
- ⑤ **BamHI+KpnI**을 사용하여 pBHA PED 5'UTR-MHV S2-attDR13 TMEMN-3'UTR에 MHV **S1-2**를 넣음

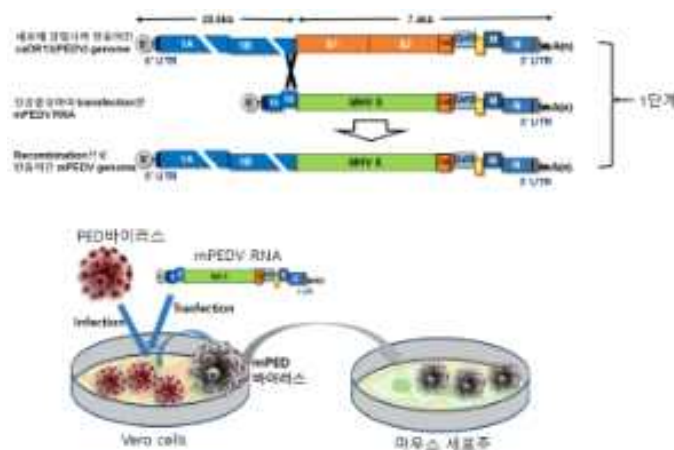


□ PED바이러스 작출법 개발

목표 RNA recombination법 및 코로나바이러스들 간의 숙주세포 특이성을 이용한 PEDV작출 시스템 개발 및 신규 PED백신 주 추출.

*PEDV역유전학 시스템은 최근 발표된 Berend Jan Bosch의 방법(PLOS one 2013, V8,N8)을 활용한다. 다음의 시스템은 비구조단백질 및 그 genome유전자를 Helper바이러스를 이용하므로 약 30kb에 이르는 코로나바이러스의 전체 genome을 모두 plasmid로 클로닝할 필요 없고 스파이크 유전자를 포함한 구조단백질에 대한 유전자가 있는 3'말단 약 7~8kb의 유전자만 plasmid로 클로닝하면 되므로 매우 효율적인 방법임.

1) PEDV역유전학 1단계: mPEDV(MHV-PED hybrid virus)의 추출



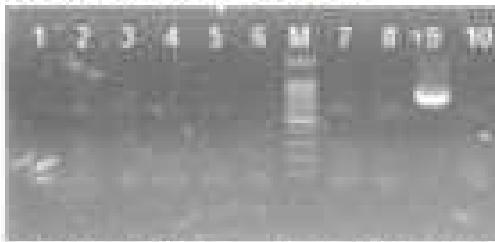
1단계: PED바이러스와 Vaccinia T7 virus를 vero세포주에 감염시키고 mPEDV백터를

lipofectamin 2000을 이용하여 세포내로 transfection 한다. mPED RNA를 도입한다. mPEDV vector는 T7 RNA Promoter에 PEDV의 5'말단 일부와 1b 유전자일부를 포함하며 PEDV 스파이크(spike)유전자의 ecto도메인 대신 MHV(mouse hepatitis virus)의 스파이크유전자의 ectodomain을 갖고 transmembrane 도메인 부터 3'말단까지는 모두 PEDV의 genome과 동일하게 작성되어 약 8.0kb정도의 전사 RNA가 vaccinia T7 virus가 만들어낸 T7 RNA polymerase에 의해 만들어진다. Vero세포내에 감염시켜 만들어진 PED 바이러스의 RNA genome과 세포내에서 도입하여 전사된 인공합성 RNA간에 crossover를 통한 RNA 재조합이 일어나면 MHV의 스파이크를 갖는 변이 PED(mPED)V가 만들어지게 된다. 이렇게 만들어진 mPEDV는 vero세포에서는 증식하지 못하나 마우스 세포주에서 증식가능하며, 반대로 helper로 사용한 PEDV는 vero세포에서만 증식하며 마우스 세포주에서는 증식이 불가능한 특성이 있다. 이를 이용하여 마우스 세포주(L-cell)에서 mPEDV만 선택적으로 배양하였다.

2) 작출된 mPEDV의 확인

① 작출된 mPEDV의 RT-PCR에 의한 확인

Recombinant virus 확인

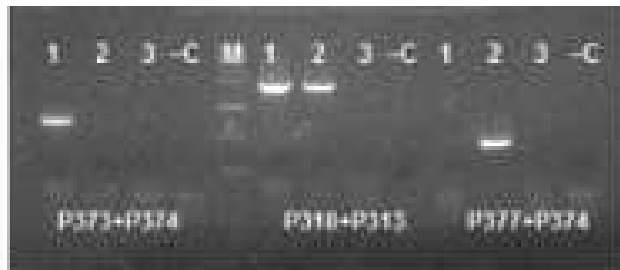


- | | |
|---|---|
| 1. 150626 DNA transfection(V11-57사용) | -> 150629 L-cell 감염(6-well, 1/10vaccina, 2ug)(3dpi) |
| 2. 150626 DNA transfection(V11-57사용) | -> 150629 L-cell 감염(6-well, 1/10vaccina, 4ug)(3dpi) |
| 3. 150626 DNA transfection(V11-57사용) | -> 150629 L-cell 감염(6-well, 1/10vaccina, 6ug)(3dpi) |
| 4. 150626 DNA transfection(V11-57사용) | -> 150629 L-cell 감염(6-well, 1/20vaccina, 2ug)(3dpi) |
| 5. 150626 DNA transfection(V11-57사용) | -> 150629 L-cell 감염(6-well, 1/20vaccina, 4ug)(3dpi) |
| 6. 150626 DNA transfection(V11-57사용) | -> 150629 L-cell 감염(6-well, 1/20vaccina, 6ug)(3dpi) |
| 7. 150625 RNA transfection(PEDV 원액감염) | -> 150628 L-cell 감염(4dpi) |
| 8. 150625 RNA transfection(PEDV 1/10감염) | -> 150628 L-cell 감염(4dpi) |
| 9. 150626 DNA transfection(V11-57사용) | -> 150629 L-cell 감염(T75)(3dpi) |
| 10. 150626 DNA transfection(V11-60사용) | -> 150629 L-cell 감염(T75)(3dpi) |

* V11-57 transcription regulatory sequences 포함

그림. 작출된 mPEDV바이러스의 RT-PCR에 의한 확인.

② 추출된 mPEDV내 MHV오염 여부확인 시험.



1: mPEDV (PEDV+MHV recombinant virus(L3))
 2: MHV
 3: L-cell(P10) culture supernatant
 M: 1Kb marker(intron)
 P373+P374 : recombination 확인용 primer
 P310+P313 : MHV S gene 확인용 primer
 P377+P374 : MHV virus 확인용 primer

Primer set	mPEDV recombinant virus	MHV
P373+P374	+	-
P310+P313	+	+
P377+P374	-	+

그림. 추출된 mPEDV(PEDV+MHV recombinant virus)의 MHV virus 오염여부 확인 실험

③ 추출된 mPEDV의 L-세포주에서의 세포변성효과 확인

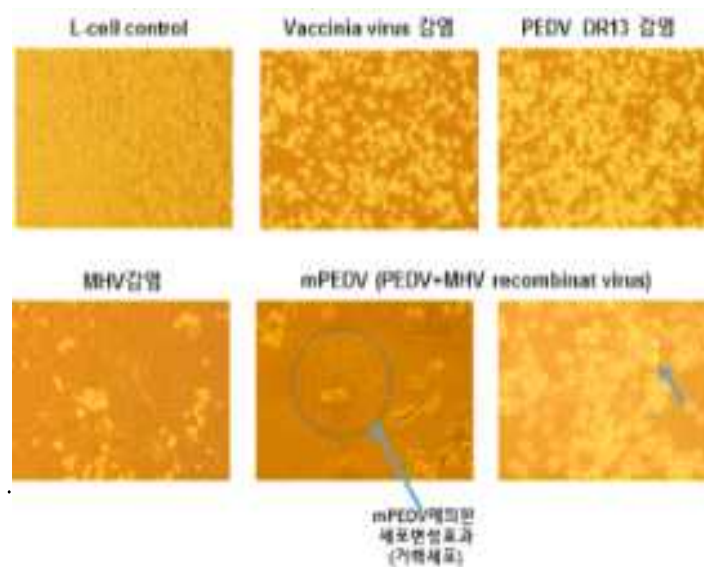


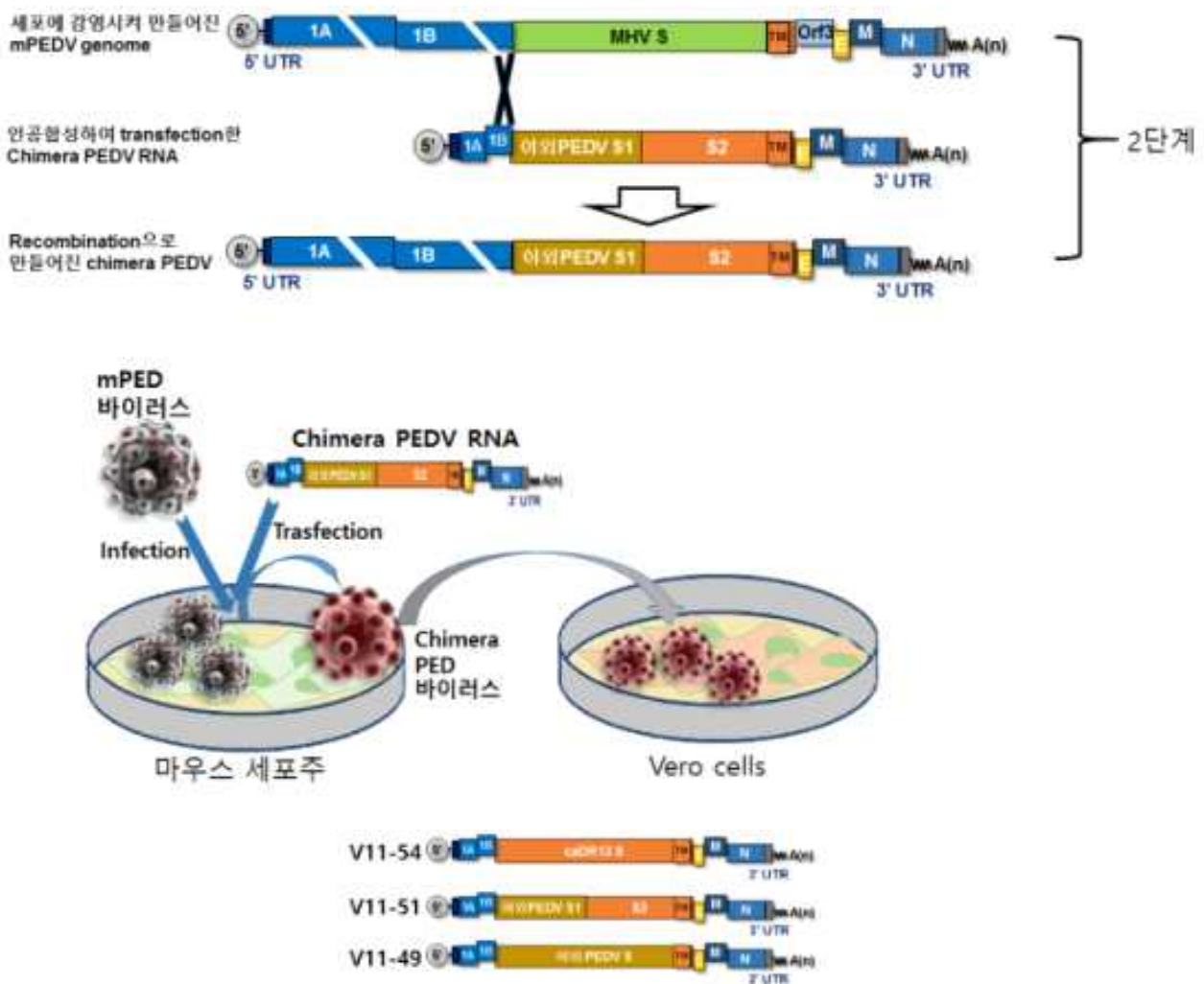
그림. 추출된 mPED 바이러스의 세포변성효과 관찰.

2차년도

□ 역유전학 이용 PEDV 신규 백신후보 작출

목표 : RNA recombination법 및 코로나바이러스들 간의 숙주세포 특이성을 이용한 신규 PED 백신 후보주 작출.

- Berend Jan Bosch의 PEDV 역유전학 시스템(PLOS one 2013, V8,N8)을 활용하여 과제 1차년도에 작출한 MHV-PEDV hybrid 바이러스(이후, mPEDV)를 이용, 신규 백신후보 작출 실험을 진행함. pPEDV-derived(이후, PEDv) RNAs를 donor RNAs로, mPEDV를 recipient virus로 사용함. mPEDV를 마우스 세포주에 감염시키고 새로 작출 하고자 하는 신규 PEDV의 전달 벡터에서 전사된 RNA mini-genome을 마우스 세포내로 transfection함.. 최종적으로 RNA재조합을 통해 만들어진 신규 PEDV는 vero세포주를 통해 순수 분리.



1. T7 vaccinia helper virus-T7 promoter-lipofectamine 사용 DNA transfection

1) DNA in-vitro transcription

2) DNA transfection

mPED바이러스를 L-cell(Mouse fibroblast cell)에 감염시키고 PEDv 전달벡터를 lipofectamine 3000 시약을 사용하여 세포내로 도입한다. 실험방법은 다음과 같음.

* pPEDV-DNAs를 donor DNAs로, mPEDV를 recipient virus로 사용함

① 세포준비 :L-cell을 6well plate에 배양

Lipofectamine 첨가량	V11-49			V11-51	
	1	2		1	2
3.75ul	3ul	2ul	+mPEDV 감염	3.75ul	2ul
7.5ul	3ul	2ul	Cell cont.	7.5ul	3ul

Lipofectamine 첨가량	V11-57			V11-57	
	1	2	3	4	5
3.75ul	3ul	3ul	2ul	3.75ul	3ul
7.5ul	3ul	3ul	2ul	7.5ul	6ul

② Lipofectamine 3000을 사용한 transfection

실험당일 오전에 배지를 제거 후 L cell에 mPEDV를 1MOI로 감염

: 배양배지 2ml 중 1ml 제거 후 바이러스 원액 0.1ml씩 감염

- mPEDV : mPEDV-3 (160219감염->160222H, 6.50TCID₅₀/ml)

* 6well L-cell confluent 예상 : 2.5X10⁵/well따라서 바이러스를 0.1ml/well 감염

-> 37°C/4hr incubation

-> 2회 washing wt 2ml/well OPTI-MEM broth

-> OPTI-MEM broth 각 2ml씩을 첨가해 놓음. (뚝 cell도 다시 넣어줌)

- 감염 4시간 후 Donor DNA를 lipofectamine을 사용하여 L cell에 도입

- Tube 2개에 각각 OPTI-MEM배지 125ul 씩 첨가한 후 lipofectamine을 3.75, 7.5ul 첨가

-> vortex 2-3 sec -> 10min/RT incubation

* 3.75ul, 7.5ul 각 9set 이므로 OPTI-MEM 1,125ul + lipofectamine 33.75ul(33ul)

1,125ul + lipofectamine 67.5ul(67ul) 준비

-> 1.5ml Tube 18개에 각 125ul 씩 분주(각 9개 tube)

- 각각의 RNA 2 vol. + OPTI-MEM 250ul 준비한 후 lipofectamine 들어있는 tube에

첨가 -> 5min incubation 후 mPEDV를 감염시켜놓았던 L-cell에 500ul씩 첨가

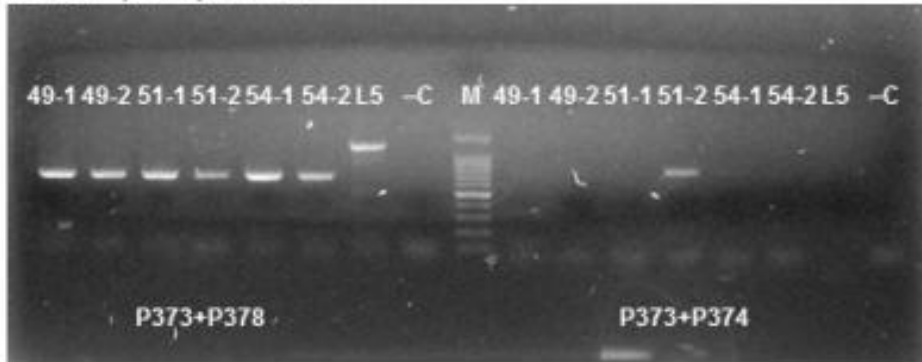
- Transfection 6시간 후 배지 change(OPTI-MEM->ProVero-1),

- > Vero cell overlay 배양 : well 당 5×10^5 cell첨가 : 총 10^7 cell필요(20 well)
- Transfection 24시간 후 trypsin adding : 1ug/well
- 4-5일 후 배양액을 harvest하여 freeze-thawing한 후 Vero cells에 2대 더 배양하여 purification 함. (end-point dilutions)

3) 바이러스 작출 확인

(1) 1차 확인 실험

PEDv 작출 확인 실험



P1 : 150714 transfection -> 150715 vero cell transfer -> 150720 확인

P2 : 150714 transfection -> 150715 vero cell transfer -> 150717 vero cell(T25) transfer -> 150720 확인

M: 100bp marker(intron)

P373+P378 : PEDv recombination 확인

P373+P374 : rPED 오염 확인

L5 : 150713 prep rPED RNA, 7ul/well loading 확인

45°C/30min-94°C/5min-(94°C/30sec-50°C/30sec-40sec)40cycles

* P373+P378 프라이머는 mini-genome vector에는 없고 PED virus에만 있는 부분으로 이 프라이머 셋트로 PCR 반응이 되면 PEDv가 작출된 것으로 볼 수 있음.

하지만 PCR 결과 Vero cell에 계대배양을 진행(P1->P2)함에 따라 오히려 바이러스 역가가 떨어지는 것처럼 확인되어 transfection 다시 진행하기로 결정 함.

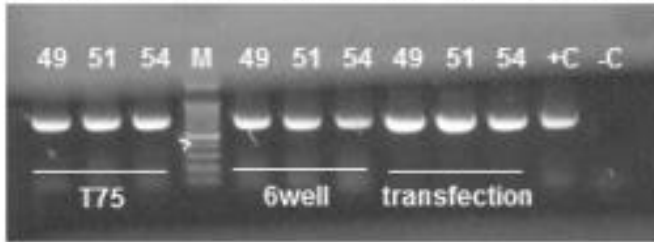
(2) 2차 확인 실험

1차와 동일한 조건으로 transfecton 하고 1일 후 T75 flask, 6-well plate에 배양한 vero cell에 passage 진행하고 3일 후 결과 확인. 확인 시 두 가지 키트(인트론, QIAGEN)로 PCR 진행

* Transfection 후 짧은 시간 내의 sample(1시간 30분후 확인)도 PCR 반응이 되는 것으로 보아 단순히 mPED와 in-vitro 전사한 PEDv RNA를 혼합하는 것으로 false positive 반응이 발생했을 가능성이 보임. 이에 대한 확인 실험을 진행하기로 함. 또한, PCR

반응물의 염기서열 분석진행.(마크로젠에 염기서열 분석 의뢰함)

PEDv recombinant virus 작출 확인 실험-intron ONE-STEP Kit 사용



49, 51, 54-T75, 6well : transfection 1일 후 vero cell transfer -> 3DPI 확인
transfection : transfection 후 1시간 30분 후 harvest sample
+C : attDR13(상용백신)
M: 100bp marker(intron)
P373+P378 : PEDV recombination 확인
7ul/well loading 확인
45°C/30min-94°C/5min-(94°C/30sec-50°C/30sec-40sec)40cycles

PEDv recombinant virus 작출 확인 실험-QIAGEN ONE-STEP Kit 사용



49, 51, 54-T75, 6well : transfection 1일 후 vero cell transfer -> 3DPI 확인
transfection : transfection 후 1시간 30분 후 harvest sample
+C : attDR13(상용백신)
M: 100bp marker(intron)
P373+P378 : PEDV recombination 확인
7ul/well loading 확인
50°C/30min-95°C/15min-(94°C/30sec-50°C/30sec-40sec)40cycles

PEDv recombinant virus 염기서열 분석을 위한 PCR

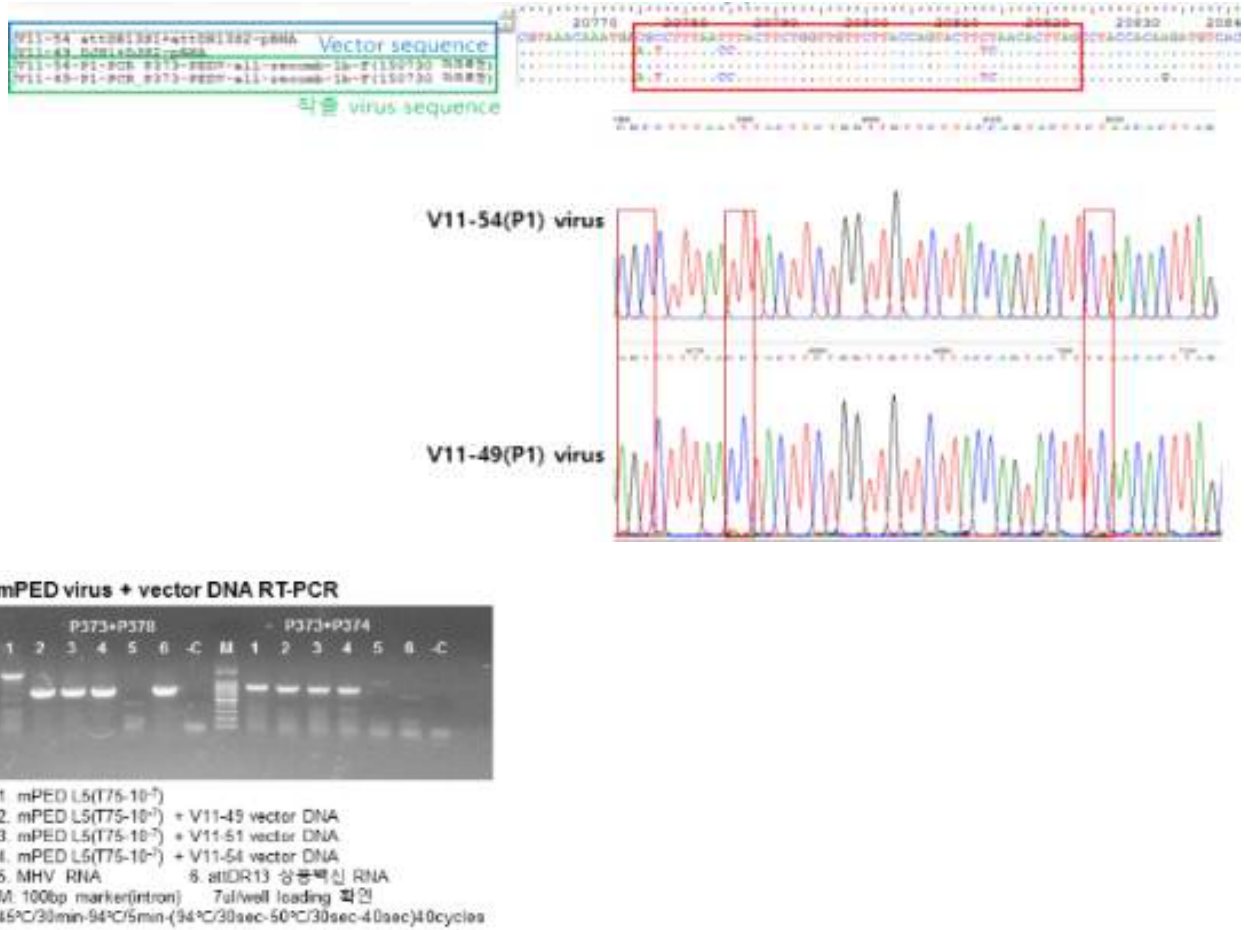


49, 51, 54 : transfection 1일 후 vero cell transfer -> 5DPI 확인
M: 100bp marker(intron)
주출한 RNA를 1/10희석하여 P373+P378 PCR(PEDV recombination 확인)
45°C/30min-94°C/5min-(94°C/30sec-50°C/30sec-40sec)40cycles

* V11-49, V11-54 P1 샘플의 PCR 반응물 염기서열분석결과 바이러스가 작출되었음을 확인.

(V11-51은 염기서열분석이 안됨)

* mPED와 in-vitro 전사에 사용하는 PEDv DNA를 혼합하는 것으로도 false positive 반응이 발생함을 확인 함. -> 앞으로 작출 확인 시 결과확인에 주의해야 함.



4) Vaccinia 바이러스 중화 시험

작출된 바이러스들(P1)에 대해 transfection 단계에서 사용한 vaccinia virus가 혼입되어 남아있는 것이 확인되어 vaccinia 바이러스를 중화시키는 실험을 진행함.

* Vaccinia T7 바이러스 제거를 위한 바이러스 혈청중화 실험

- Virus 중화 : virus 원액 및 10진 희석액 250ul + vaccinia 항혈청 250ul -> 37°C/1hr 중화
- Vaccinia 항혈청 : 기니픽에 vaccinia virus를 2회 접종한 면역 혈청
 - ① Vero cell을 24well plate에 80-90%가 되도록 배양(10% FBS-MEM)
 - ② 배양한 cell에서 배지를 모두 제거한 후 PBS로 2회 washing
 - ③ PEDV 배양배지(무혈청+TPB+yeast extract+trypsin)를 well 당 100ul씩 첨가
 - ④ Vaccinia virus 항혈청으로 중화시킨 virus 및 중화 전 virus를 well당 100ul씩 첨가

-> 7일간 세포를 배양하면서 결과를 관찰함.

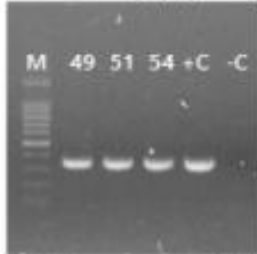
* Vaccinia virus 면역혈청으로 PEDv에 혼입되어있는 T7 vaccinia를 중화하려 했으나 오염 정도가 감소하기는 하였으나 완전히 중화되지 않는 것을 확인 함.

* PEDv의 계대배양을 진행할수록 바이러스의 역가가 감소함을 확인 함.

* 2차 실험 이후 같은 방법으로 다시 한번 transfection 후 계대배양을 진행해 보았으나 계대 배양에 따라 역가가 감소함을 재확인 함.

-> 이는 transfection efficiency가 낮은 결과로, 같은 방법으로는 실험을 진행하는 것이 적합하지 않음을 확인하고 lipofectamine이 아닌 Neon device를 사용하여 transfection을 결정함.

Vaccinia 바이러스 오염 확인

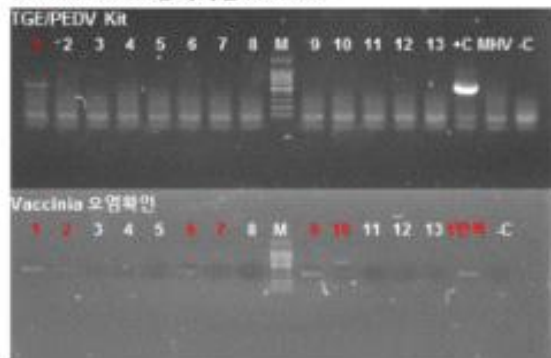


+C : T7 vaccinia virus RNA

M: 100bp marker(intron) 7ul/well loading 확인

94°C/5min-(94°C/20sec-55°C/30sec-72°C/50sec)40cycles

Vaccinia virus 중화확인 RT-PCR



11-49 : 1 (-1) pool , 2 (-2) 2+4 pool 3 (-2) 1+3 pool 4 (-3)pool

11-51 : 5 (-1) 1+2 pool 6 (-1) 3+4pool 7 (-2)pool 8 (-3)pool

11-54 : 9 (-1)pool, 10 (-2)1+3+4 pool, 11 (-2)2 12 (-3)1+3+4pool, 13 (-3)2

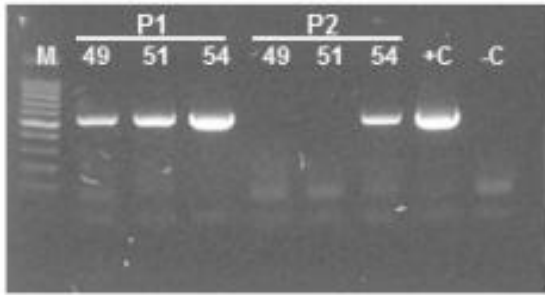
M: 100bp marker(intron) +C: 1/10희석 attDR13(복수백신)

7ul/well loading 확인

TGE/PED : 45°C/30min-94°C/5min-(94°C/30sec-60°C/30sec-40sec)40cycles

Vaccinia : 94°C/5min-(94°C/30sec-60°C/30sec-40sec)27cycles

3차 PEDv 바이러스 작출확인 PCR(P1, P2)



P1 : 150911 transfection -> 150914 harvest -> 150915 vero cell 감염 -> 150921 확인(6DPI)
 P2 : 150918 P1 sample 감염(filtration한 sample 2ml 흡작 후 제거) -> 150921 확인(3DPI)
 M: 100bp marker(intron) +C : 1/10회석 attDR13(녹수백신)
 7ul/well loading 확인
 TGE/PED : 45°C/30min-94°C/5min-(94°C/30sec-50°C/30sec-40sec)40cycles

2. T7 promoter-Neon[®] device 사용 RNA transfection

1) RNA in-vitro transcription

세포내로 PEDv RNA를 도입하기 위해 PEDv 벡터를 T7 RNA 중합효소 키트 (MEGAscript[®] RNAi kit(Ambion))를 이용하여 in-vitro에서 전사함. 실험방법은 다음과 같음.

① DNA template 준비 : 0.5ug/ul 농도로 TE buffer에 용해시켜 준비

② DNA linearization :

* 제한효소(PacI)을 사용하여 circular plasmid를 linear한 form으로 만듦(gel 확인!)

-> 1/20 Vol. 0.5M EDTA+1/10 Vol. 3M Na acetate+2 Vol. EtOH 첨가 ->

-20°C/15분 incubation

-> 14,000rpm/15min centrifuge -> 상층액 제거 -> 0.5-1ug/ul 농도가 되도록 TE buffer에 재부유.

③ Proteinase K 처리 : plasmid DNA 추출 및 제한효소처리 후 완전히 제거되지 못한 RNase A를 제거

* DNA template에 100-200ug/ml 농도의 proteinase K+0.5% SDS를 첨가 후 50°C/30분 처리

-> 동량의 phenol/chloroform을 첨가 -> EtOH precipitation 함.

④ Transcription reaction

- Kit 내의 시약들을 녹임: Ribonucleotides는 녹인 후 얼음 위에 정치, 10X reaction

buffer는 녹인 후 실온에 정치함

- 실온에서 반응액을 준비함

Nuclease-free water	To 20ul
ATP solution	2ul
CTP solution	2ul
GTP solution	2ul
UTP solution	2ul
10X reaction buffer	2ul
Linear template DNA	0.1-1ug
Enzyme Mix	2ul

* 얼음 위에서 반응을 진행 시 10X reaction buffer내의 spermidine이 template DNA와 함께 침전됨!

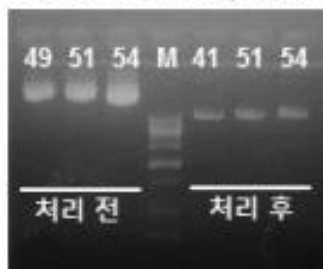
* D.W 및 ribonucleotides를 첨가 후 10X reaction buffer를 첨가 함.

- Tube를 툭툭치거나 pipetting을 천천히 하여 반응액을 섞음
- 37°C/2-4hr incubation
- TURBO DNase 1ul를 반응액에 첨가->37°C/15min incubation
- Lithium chloride precipitation 진행(반응에 사용되지 않은 nucleotides 및 proteins 제거가 목적)

* Nuclease-free water 30ul+LiCl precipitation solution을 첨가

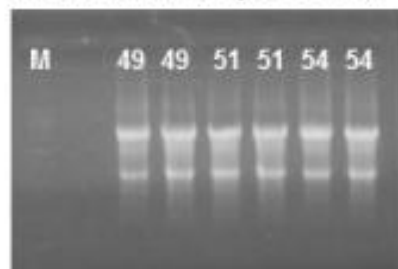
- > 잘 섞어준 후 -20°C/30분 이상 chilling
- > 4°C/15분/14,000rpm 원심분리
- > 상층액 제거 후 70% EtOH 1ml 첨가하여 washing
- > 상층액 제거 후 buffer에 용해함
- > RNA 정량 후 -20°C or -70°C에 보관

PEDv Pacl enzyme linearization



1ul loading

in vitro transcription 반응 후 확인



2) RNA transfection

mPED바이러스를 L-cell(Mouse fibroblast cell)에 감염시키고 T7 RNA중합효소 키트를 이용하여 in-vitro 전사한 PEDv를 Neon® transfection drive(electrophorator)를 이용하여 세포내로 도입한다. 실험방법은 다음과 같음.

① Nucleic acids 준비(DNA or siRNA)

- DNA를 1-5ug/ul 농도가 되도록 D.W 또는 TE buffer에 준비
 - * 사용하는 DNA volume이 총 반응 volume의 10%를 넘지 않도록 함.
 - * DNA의 purity가 A260/280ratio측정 시 1.8 이상이어야 함.
 - * DNA를 농축할 때 salt contamination에 의해 transfection efficiency 및 cell viability가 저하되므로 EtOH 침전 방법을 사용하지 않도록 함.
- * 사용하는 RNA volume이 총 반응 volume의 10%를 넘지 않도록 준비

② Prepare adherent cells

- 실험 1-2일 전 새로운 flask로 세포를 배양하여 실험 당일 사용하려는 세포가 70-90% confluent 상태가 되도록 준비. T75 flask에 배양해 놓은 L-cell로부터 배지를 제거한 후 rMHV를 1MOI로 감염
 - > 37°C/1hr incubation
 - > 무항생제, 무혈청 OPTI-MEM brothFH 1회 washing
- OPTI-MEM broth로 vaccinia virus(1/10, 1/20희석)를 희석한 후 위의 L-cell에 감염
 - > 37°C/1hr incubation
- 준비된 flask로부터 cell을 harvest하여 electoporation 준비
 - * 혈청 첨가 배지, PBS(without Ca₂⁺,Mg₂⁺),Trypsin/EDTA solution을 37°C로 heating
 - > 준비한 cell에서 배지를 제거한 후 PBS(without Ca₂⁺,Mg₂⁺)로 2회 washing
 - > Trypsin/EDTA처리하여 세포를 떼어 냄.
 - > 혈청 첨가 배지로 trypsin 중화 후 cell harvest
 - > Cell counting을 위해 세포를 조금 남긴 후 PBS washing(100-400g/5mins/RT)
 - > PBS 제거 후 1.0X10⁷cells/ml이 되도록 Resuspension Buffer R에 부유 후 single cell 부유액이 되도록 조심스럽게 pipetting함.
 - * Cell 부유액을 15-30분 이상 상온에 방치하지 않도록 함 - cell viability와 transfection efficiency를 떨어뜨림.
 - * L-cell은 약한 충격에도 배양기 바닥으로부터 분리되므로 매 단계 부유된 L-cell도 washing 하여 다시 넣어줌
- 24-well plate를 0.5ml 혈청첨가 배양배지로 채워 37°C/5% CO₂ incubator에 놓아 둠.

(항생제는 첨가하지 않음!)

③ Electroporation(Adherent cell type)

- Neon Tube에 3ml Electrolytic Buffer를 첨가함

(10ul Tips : Electrolytic Buffer E, 100ul Tips : Electrolytic Buffer E2 사용)

- 사용하려는 cell type에 따른 pulse condition을 장비에 설정함.

- 멸균된 1.5ml tube에 적정량의 RNA를 첨가함.

Format	DNA(ug)	SiRNA(nm)	Neon Tip	Vol. plating medium	Cell no.	Buffer R
24-well	0.5-2	10-200	10ul	500ul	$0.5-1 \times 10^5$	10ul/well

- RNA가 들어있는 tube에 cell을 첨가한 후 gently mix

- Pipette push-botton을 눌러 Neon Tip을 Neon Pipette에 장착함.

(push botton을 두 번째 stop까지 누름)

- Pipette으로 tip을 누르면서 Push-botton을 서서히 풀면서 pipette과 tip사이에 gap이 없는지 확인함.

- Pipette push-botton을 누르고 tip을 cell+DNA(or siRNA) mix에 담근 후 botton을 풀어 빨아올림.

* Pipetting 과정 중 air bubble이 생기지 않도록 주의!

- Neon Pipette를 Neon Pipette Station내의 Neon Tube에 장착함. 이때 딸깍 소리가 나는 것을 확인함.

- 적정 electroporation protocol을 선택한 후 touchscreen의 “Start” botton을 누름

- Neon device가 자동적으로 Neon Tube와 Neon Pipette이 적절하게 장착되었는지를 체크한후 electric pulse를 적용시킴.

* Bubble이 있었을 경우 화면에 arcing(sparks)가 표시됨.

- Electric pulse가 전달 된 후 touchscreen에 “Complete”가 표시됨.

- Neon Pipette Station으로부터 Neon Pipette을 제거한 후 미리 가온되어 있는 배양배지가 담긴 culture plate에 electroporated cells를 첨가함. (push botton을 첫번째 stop까지 누름)

* 이때 배양배지에는 항생제를 첨가하지 않음!

- 사용이 끝난 Neon Tip은 폐기 함.(push botton을 두번째 stop까지 누름)

- 위의 과정을 반복하여 모든 sample에 대해 실험을 진행함. 이때 Neon Tube는 10회이상, Neon Tip은 2회이상 사용하지 않도록 하며 새로운 plasmid DNA를 사용할 경우에는 Tip을 교환하도록 함.

- Electroporated cell을 첨가한 배양 plate는 조심스럽게 rocking한 후 37°C/CO₂ incubator에 배양함.

* 5×10^4 - 2×10^5 cells/10ul NeonTip, 5×10^5 - 2×10^6 cells/100ul NeonTip

< Electroporation 조건 optimization >

	1			2			3			4			5			6		
	Pulse voltage	Pulse width	Pulse No.	Pulse voltage	Pulse width	Pulse No.	Pulse voltage	Pulse width	Pulse No.	Pulse voltage	Pulse width	Pulse No.	Pulse voltage	Pulse width	Pulse No.	Pulse voltage	Pulse width	Pulse No.
A	1400	20	1	1500	20	1	1600	20	1	1700	20	1	1100	30	1	Without electropora		
B	1200	30	1	1300	30	1	1400	30	1	1000	40	1	1100	40	1	1200	40	
C	1100	20	2	1200	20	2	1300	20	2	1400	20	2	850	30	2	950	30	
D	1050	30	2	1150	30	2	1300	10	3	1400	10	3	1500	10	3	1600	10	

④ Vero cell 첨가 및 바이러스 배양

* 세포주 특이성을 통해 helper로 사용한 mPEDV를 제거하고 신규 PEDV만을 선택적으로 배양하기 해 transfection 6시간 후 vero cell을 위의 24well에 첨가하여 overlay 배양함.

- 배지 내 FBS를 제거하기 위해 washing 후 배지 change(OPTI-MEM->ProVero-1)

- Vero cell overlay 배양 : well 당 5×10^5 cell첨가

- Transfection 24시간 후 trypsin을 첨가하여(1ug/well) 작출된 PEDV가 vero 세포에 재감염되도록 함.

- 4-5일 후 배양액을 harvest하여 3회 freeze-thawing한 후 Vero cells에 2대 더 배양하여 purification 함. (end-point dilutions)

3) 작출 바이러스의 확인

작출된 바이러스는 Spike유전자 중 세포감염시 리셉터와 결합하며 중화항체가 주로 만들어 지는 것으로 알려진 S1 도메인(V11-51, DJ S1+DR13 S2) 혹은 S gene전체를 기존 DR13대신 교체(V11-49, DJ S1+DJ S2) 하거나 세포주 증식성을 고려하여 특정 항원결정부만을 치환한 PEDV(V11-54, DR13 S1+DR13 S2)

① Transfection 5일 후 24well plate로부터 상층액을 harvest 한 후 sample을 3-5개씩 pooling하여 1차 PCR 확인

* Pooling group 정보

1: 9+15+16+24

2: 7+13+19

3: 2+8+14+20

4: 3+21+4+10+22

5: 5+11+17+23

6: 6+12+18

* 양성 예상 group

V11-49 pooling group 2, 6

V11-51 pooling group 1, 2, 3, 7

V11-54 pooling group 1, 4, 5

② 1차 pooling하여 확인 후 양성으로 보이는 group sample에 대해 개별 PCR 진행

* 개별 PCR 결과 최종 확인된 sample은 V11-54-3, 5임.

PEDv 작출 확인



1: 9+15+16+24 2: 7+13+19
3: 2+8+14+20 4: 3+21+4+10+22
5: 5+11+17+23 6: 6+12+18
7: T75 culture(1+...+24)
M: 100bp marker(intron) +C: 1/100희석 attDR13(상용 PEDV 백신)
7ul/well loading 확인
수의과학 검역원 TGE/PED 진단 Kit를 사용하여 PCR
45°C/30min-94°C/5min-(94°C/30sec-50°C/30sec-40sec)40cycles

Pooling sample 재반응 건



24well 151217 electroporation -> 151223 harvest sample
M: 100bp marker(intron) +C: 54-3(P2)
7ul/well loading 확인
수의과학 검역원 TGE/PED 진단 Kit를 사용하여 PCR
45°C/30min-94°C/5min-(94°C/30sec-50°C/30sec-1min)40cycles

PEDv 작출 확인



* Transfection 후 6DPI sample
M: 100bp marker(intron) +C : 1/100희석 attDR13(상용백신)
5ul/well loading 확인
45°C/30min-94°C/5min-(94°C/30sec-50°C/30sec-1min 30sec)40cycles
P373+P374 : recombinant virus와 attDR13 sequence 구분 가능
P413+P414 : mPEDV 오염여부 확인용
P425+P426 : PEDV spike gene

③ 다양한 프라이머 셋트를 사용하여 작출 바이러스를 확인

* 사용된 primer list

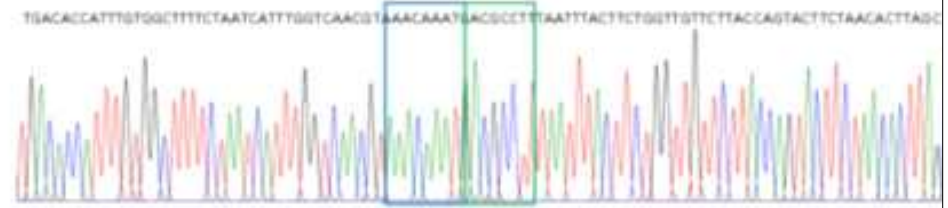
번호	프라이머 이름	프라이머 염기서열
373	P373-PEDV-all-recomb(1b)-F	GATTACGTTAGCGATGCTGA
374	P374-MHV-recomb(S1)-R	GTGCTAATGCTTGGAGCACT
413	P413-attDR13-24236-F	AGGAGGAGTTAGATAAATGG
414	P414-attDR13-25839-R	TCCAAGCACTGGAATGCAGA
425	P425-PEDV-all-23065-F	GTAATGGTAACTCTCGTTG
426	P426-PEDV-all-24294-R	GTGACCACACAACCTCTCAAT

* PCR 결과 V11-54-3 sample이 수의과학 검역원 TGE/PED 진단키트, 자체 제작 프라이머 세트(P373+P378, P425+P426, minigenome vector에는 없고 PED virus에만 있는 부분 확인 프라이머)로 양성이고 helper로 사용한 mPEDV 오염확인 PCR(P413+P414)은 음성으로 확인됨.

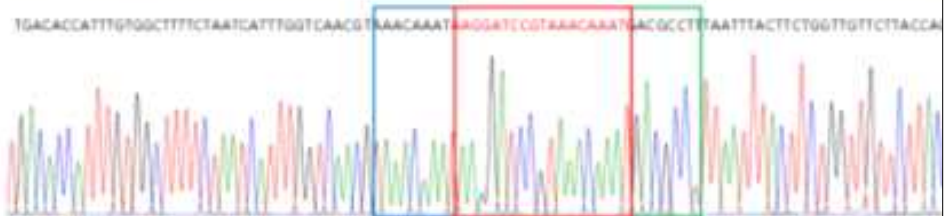
* 확인된 V11-54-3 바이러스는 vero 세포에 1회 더 계대배양한 염기서열 분석을 하여 기존 경구용 PED백신 DR13이 아니고 새로운 바이러스가 작출되었음을 확인함



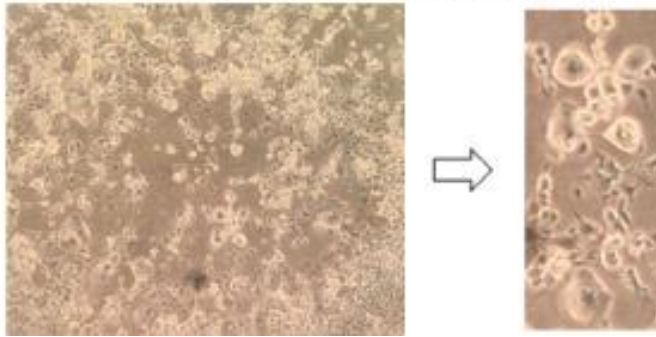
attDR13 virus sequence



attDR13 recombinant virus sequence



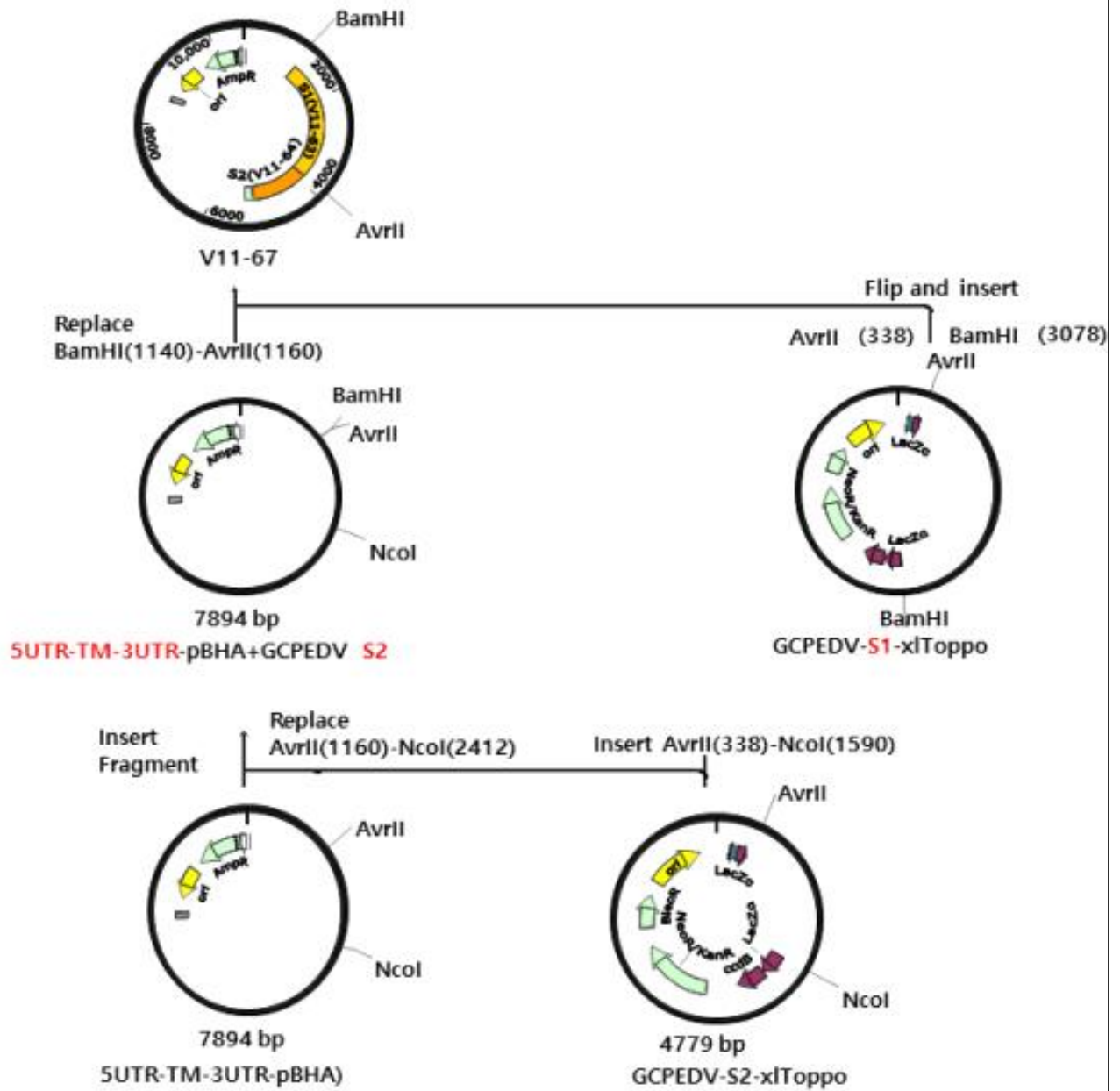
Vero cell 감염확인 (V11-54 P1, 3DPI)



3. T7 promoter-Neon[®] device 사용, spike 유전자 교체

초기 계획하였던 PEDV 야외분리주의 spike gene을 도입한 바이러스(V11-49 DJS1 + DJS2, V11-51 DJS1 + attDR13S2)의 경우 vero cell에서 계대배양이 잘 이루어지지 않음. 이를 해결하기 위해 숙주세포 감염 초기단계에 작용하는 spike 유전자를 최근 분리주 중 세포배양이 잘 되도록 적응된 야외분리주 “GCPEDV”의 spike 유전자로 교체하도록 함.

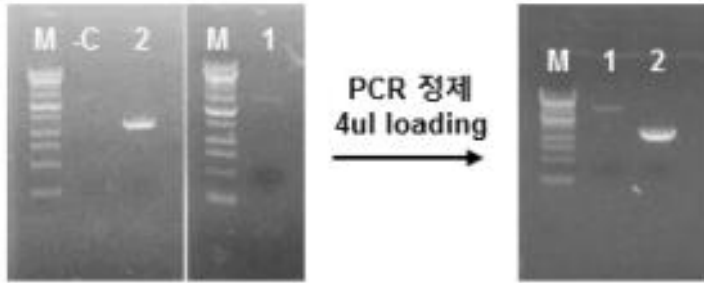
< 클로닝 계획 >



1) 전달백터 클로닝

① 증식성이 좋은 최근 유행 PEDV인 GCPEDV의 spike 유전자를 2개 fragment로 나누어 증폭하고 클로닝을 위해 xI-Topo 벡터에 서브클로닝 함.

증식성이 좋은 최근 유행 PEDV(GCPEDV) cDNA spike gene PCR



1: P321(PED-S1-Start-DJ-BamHI-F) + P319(DR13-AvrII-R) : 2,747bp
 2: P318(DR13-AvrII-F) + P316(DR13-NcoI-R) : 1,260bp
 M: 1000bp marker(intron) HiFi mix 사용 PCR
 5ul/well loading 확인
 94°C/30sec-(94°C/40sec-50°C/40sec-68°C/3min)27cycles

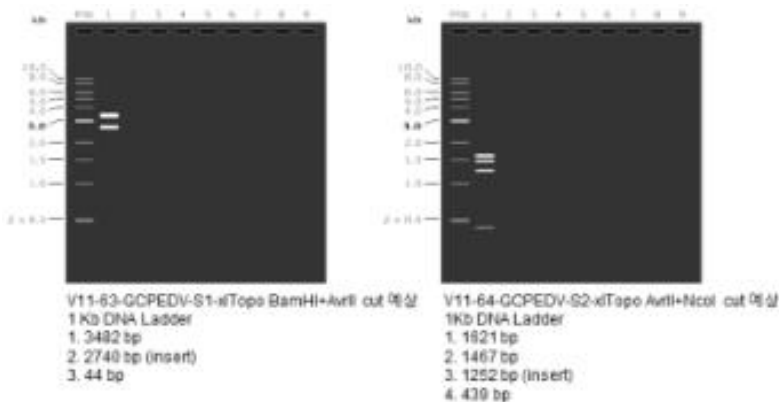
GCPEDV S1, S2-xITopo clone miniprep. DNA



녹수 PEDV cDNA spike gene PCR product -> xITopo cloning
 3ul/well loading 확인, 1/11 macrogen sequencing 의뢰

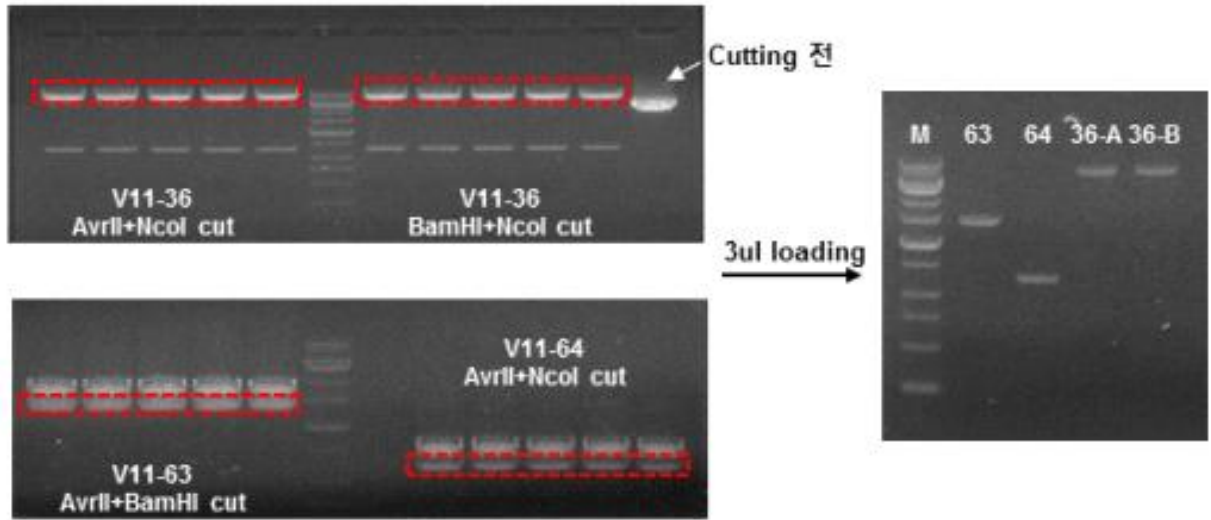
- ② attDR13의 5'과 3'말단의 promoter부위 및 transmembrane domain에 증식성이 좋은 최근 유행 PEDV(GCPEDV)의 spike 유전자를 넣기 위해 제한효소를 이용한 클로닝작업을 진행함.
- DJ S2만 들어가있는 전달벡터(V11-36)과 Insert로 사용되는 GCPEDV spike 유전자 S1(V11-63), S2(V11-64)를 제한효소 처리 함.

* Fragment size 예상



- GCPEDV spike 유전자가 도입된 전달벡터의 확인

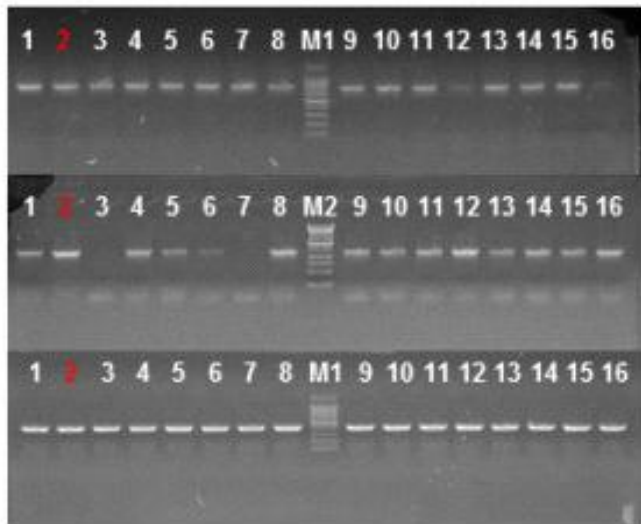
V11-36, V11-63, V11-64 enzyme cut



V11-36 : 5'UTR+(DJ S2)+TM-3'UTR-Pbha
 V11-63 : GCPEDV-S1-xITopo
 V11-64 : GCPEDV-S2-xITopo
 M : intron 1Kb marker

전달벡터의 여러 부분에 대한 확인 PCR을 진행 함. 최종 확인 된 클론 2번(V11-67)은 전체 염기서열분석을 진행하여 최종 확인하였음.

GCPEDV+PEDV full(V11-36+V11-63+V11-64) 연결확인



M1 : intron 100bp marker M2 : intron 1Kb marker
 P331+P353 700bp (1b+S1 연결 확인)
 P425+P426 1,249bp (S1+S2 연결 확인)
 P372+P371 408bp (S2+TM 연결 확인)

V11-36 : 5'UTR+(DJ S2)+TM-3'UTR-Pbha
 V11-63 : GCPEDV-S1-xITopo
 V11-64 : GCPEDV-S2-xITopo

V11-67 miniprep. DNA



V11-67(GCPEDV+PEDV full-2) miniprep.
 DNA 3ul loading
 -> 마크로젠 full length sequencing 의뢰

2) RNA in-vitro transcription 방법은 이전 실험과 같음

3) RNA transfection

Neon device를 이용하여 V11-67 in vitro 전사 RNA를 transfection 실험은 다음과 같이 진행함

“Generation of recombinant PEDVs”

* pPEDV-derived RNAs를 donor RNAs로, mPEDV를 recipient virus로 사용함

- ① L cell(2×10^7)에 mPEDV를 1MOI로 감염시킴.
- ② 감염 4시간 후 V11-67 donor RNA를 electroporation 하여 L cell에 도입
- ③ 24well plate에 vero cell을 배양해두고 여기에 위의 electroporated cells를 같이 배양함. -> 다음날 배지에 trypsin 첨가함

4) 1차 바이러스 작출 확인

* Transfection 4일 후 작출 확인 PCR 진행. 결과 fragment size가 예상보다 작게 검출됨.
세포내 recombination이 기대하지 않은 부위에서 일어난 것으로 예상되어 재실험 결정.

Virus 작출 확인, 4dpi



Transfection 4DPI sample

* Pooling sample

- 1 : 7+13+19 2 : 2+8+14+20 3 : 3+9+15+21
- 4 : 4+10+16+22 5 : 5+11+17+23 6 : 6+12+18+24
- T25-1 : 2+3+4+5+6 T25-2 : 7+8+9+10+11+12 T25-3 : 13-24

C1 : 6well-1(electroporation 하지 않고 RNA만 첨가) +C : 54-3(P2)
 M: 100bp marker(intron), 7ul/well loading 확인
 45°C/30min-94°C/5min-(94°C/30sec-50°C/30sec-1min)40cycles

5) 2차 바이러스 작출 확인

2차 virus 작출 확인 PCR



개별 PCR →



Electroporation 2일 후 배지 change, passage -> 6DPI chilling

* Pooling sample

- 1 : 7+13+19 2 : 2+8+14+20 3 : 3+9+15+21
- 4 : 4+10+16+22 5 : 5+11+17+23 6 : 6+12+18+24
- 7 : 1-C sample(electroporation 하지 않고 RNA만 첨가)

+C : V11-54-3(P2)151228 prep RNA

M: 100bp marker(intron), 7ul/well loading 확인
 45°C/30min-94°C/5min-(94°C/30sec-50°C/30sec-1min)40cycles

* P0 4pooling sample 개별 RT-PCR
 * 1 : 1-C sample(electroporation 하지 않고 RNA만 첨가)
 * 8 : P1-2 1-8 sample
 +C : V11-54-3(P2)151228 prep RNA
 M: 100bp marker(intron), 7ul/well loading 확인
 45°C/30min-94°C/5min-(94°C/30sec-50°C/30sec-1min)40cycles

① 4번 샘플이 PCR 양성으로 보여 염기서열분석확인 후 증균하였으나 증균이 되지 않음.

V11-67 작출 바이러스 P1(3DPI) 증균 확인

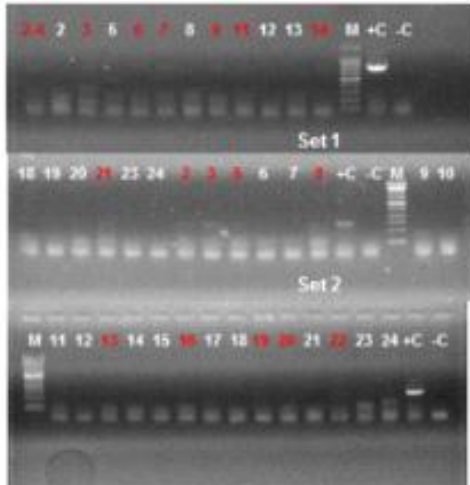


+C : V11-67 P0-4
 원액 : V11-67 P0-4 원액 400ul을 T25 flask에 adding passage
 1/10 : V11-67 P0-4 1/10희석액 400ul을 T25 flask에 adding passage
 M: 100bp marker(intron), 7ul/well loading 확인
 45°C/30min-94°C/5min-(94°C/30sec-50°C/30sec-1min 20sec)40cycles

② 4번 샘플이 증균이 되지 않아 다른 샘플들을 각각 확인 후 증균 계획

2회 더 계대배양하였으나 거의 증균이 되지 않음. 10, 11, 13번 샘플이 2대째까지 증균확인 되나 역가가 너무 낮아 보임

V11-67 P0 sample 확인 개별



+C : P0 1-4 160211 prep. RNA
 M: 100bp marker(intron), 10ul/well loading 확인
 45°C/30min-94°C/5min-(94°C/30sec-50°C/30sec-40sec)40cycles

P0 sample 감염 계획(6DPI harvest 계획)

: 감염 후 harvest한 sample은 "P1"으로 표기

Vero-new (1-6)	1-4	1-3	1-9
	2-4	2-3	-C

Vero-Q (7-12)	1-7	1-11	1-21
	2-2	2-8	2-19

Vero-Q (13-18)	2-5	2-20	2-22
	(1-6+1-14)	(2-13+2-18)	-C

PCR 양성	P0 sample 개별 RT-PCR 결과로 분류		
+++	1-4, 1-3, 1-9, 2-3, 2-4		
++	1-7, 1-11, 1-21, 2-2, 2-8, 2-19		
+	2-5, 2-20, 2-22		
±	1-6, 1-14, 2-13, 2-16		

V11-67 P2 sample 확인 개별(6DPI)



P1 sample 감염 계획

: 각각의 P1 sample을 Vero-Q(P12), Vero-New(P3) cell에 감염

Vero-new (1-6)	1-4	1-3	1-8
	2-4	2-3	-C

Vero-Q (7-12)	1-7	1-11	1-21
	2-2	2-8	2-19

Vero-Q (13-18)	2-5	2-20	2-22
	(1-6+1-14)	(2-13+2-18)	-C

* Sample history

- 1) P0 : electroporation -> 배지 2일 후 change, passage -> 6 DPI chilling
- 2) P1 : P0 sample Vero-new, Vero-Q cell infection -> 6DPI harvest
- 3) P2 : P1 sample Vero-new, Vero-Q cell에 감염



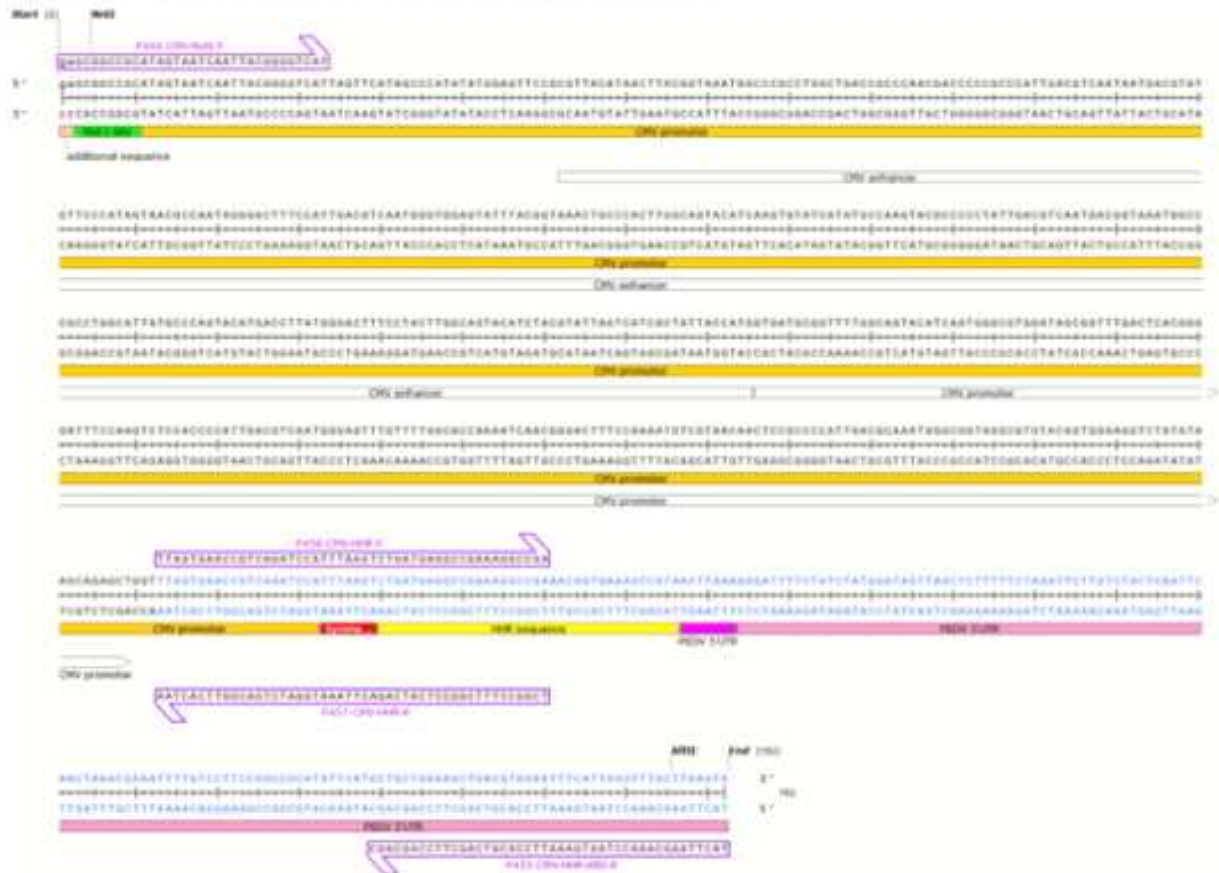
M: 100bp marker(intron), 10ul/well loading 확인, 10ul rxn
 45°C/30min-94°C/5min-(94°C/30sec-50°C/30sec-40sec)40cycles

4. CMV promoter - lipofectamine 사용, spike 유전자 교체

기존방법은 ① T7 helper vaccinia virus를 사용, 전사벡터 내 T7 promoter에 의해 세포 내로 도입된 DNA가 약 8.0kb 정도의 RNA로 전사되게 하거나 ② 전사벡터를 in-vitro transcription 반응을 하여 인공적으로 RNA genome을 제조하고 electroporation 혹은 chemical transfection방법을 통해 세포내로 도입하여 감염시켜 만들어진 mPEDV의 RNA genome과의 crossover를 통해 RNA 간 재조합을 일으켜 PEDv의 스파이크를 갖도록 하는 방법임.

실험결과 ①의 경우 helper로 사용한 T7 vaccinia virus에 의해 세포가 손상되어 작출하고자 하는 PEDv의 배양에 최적 상태가 되기 어렵고 ②의 경우 도입유전체가 RNA이기 때문에 세포내로 도입하기 위해 조작 시 안정성이 떨어져 바이러스 작출 효율이 떨어지는 단점이 발견됨. 따라서, 작출 효율을 높이기 위해 전사벡터 내 포함시켰던 T7 promoter를 포유 동물 세포에서 별도의 helper virus의 도움 없이도 도입유전자를 발현될 수 있도록 해주는 cytomegalovirus 유래의 강력한 promoter인 CMV promoter로 교체하는 실험을 진행함.

T7 promoter -> CMV promoter 교체 계획 : CMV promoter를 포함, 5'UTR 부분을 인공합성 함.

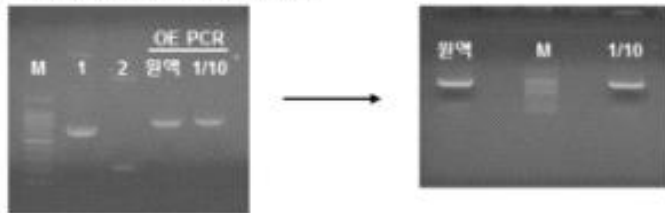


1) 유전자 클로닝

① 보유하고 있는 CMV promoter 5', 3' end 부분에 전사벡터 내 도입을 위해 필요한 NotI, AfiII enzyme site를 만들기 위해 CMV promoter를 두 부분으로 나누어 PCR 한 후 overlap extension PCR을 진행함.

* 염기서열 분석결과 원액 OE PCR-1-4, 5, 13, 1/10희석 OE PCR-10 맞는 것 확인

CMV promoter PCR OE PCR

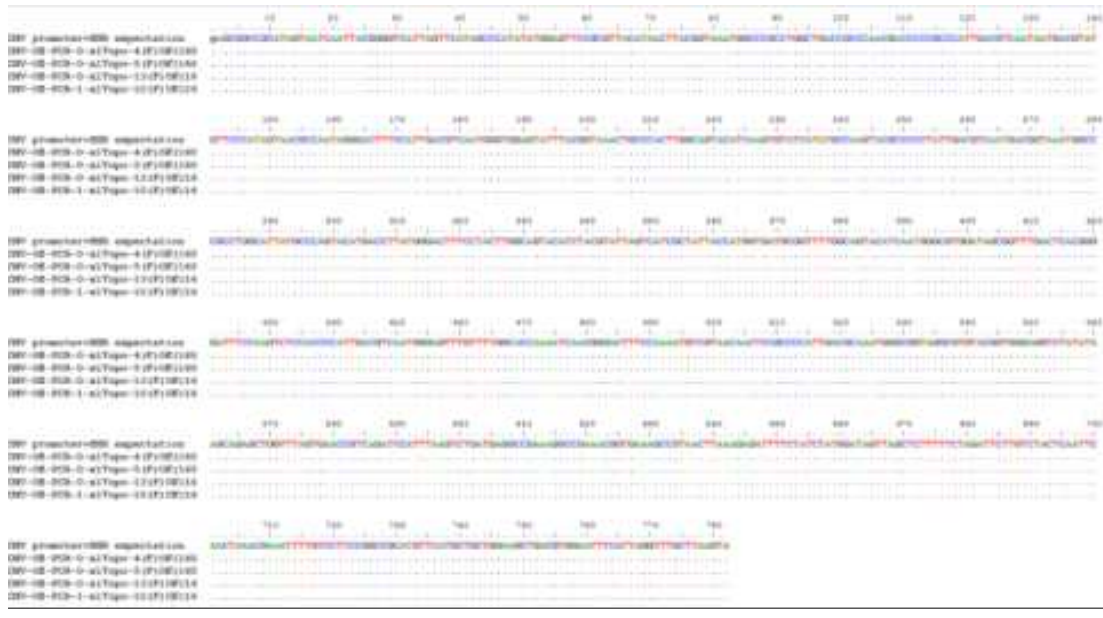


1 : CMV 인공합성 DNA : P456+P457 PCR
 2 : CMV HHR PEDV 인공합성 DNA : P458+P455 PCR
 Clontech Kit 사용
 94°C/2min-(94°C/20sec-50°C/15sec-72 °C /30sec)25cycles
 1+2 OE PCR : invitrogen HIFI mix 사용, PCR product를 원액 또는 1/10 희석하여 반응에 첨가
 94°C/2min-(94°C/20sec-50°C/15sec-72 °C /40sec)25cycles
 M : 100bp marker(intron)

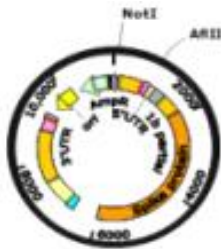
CMV promoter PCR product xITopo cloning 확인 M13 PCR



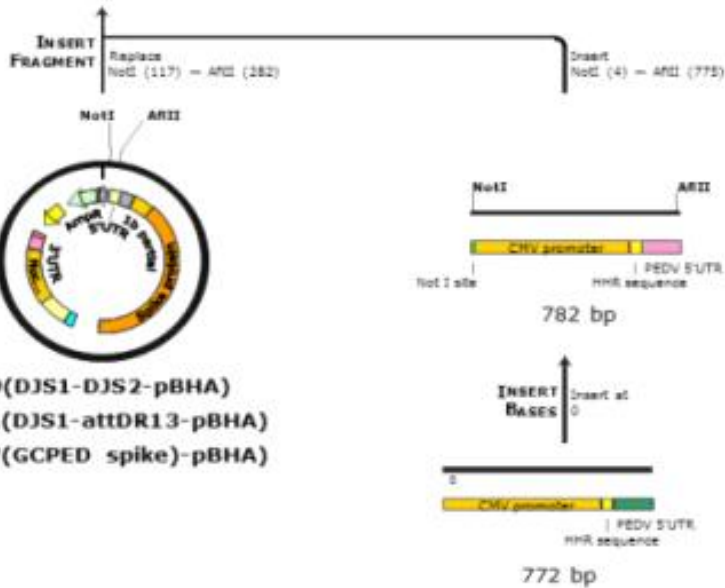
Colony 배양액 M13/R PCR
 54°C/5min-(94°C/20sec-48°C/20sec-72 °C /50sec)40cycles
 원액, 2, 4, 5, 13, 1/10, 1, 10 : 160523 마크로젠 sequencing 의뢰
 M : 100bp marker(intron)



② 기존 제작한 전사벡터 내 T7 promoter를 CMV promoter 교체를 위해 제한효소 처리

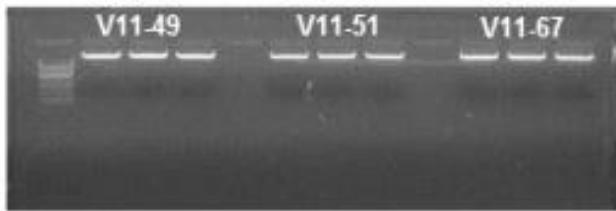


V11-49, V11-51, V11-67 + CMV promoter 교체

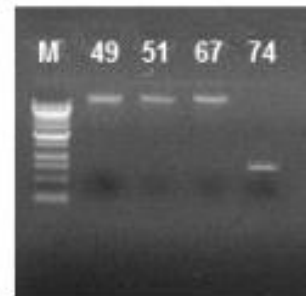


V11-49(DJS1-DJS2-pBHA)
 V11-51(DJS1-attDR13-pBHA)
 V11-67(GCPED spike)-pBHA)

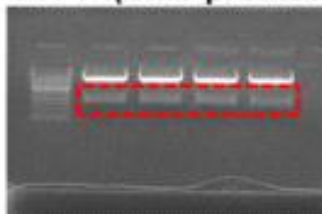
V11-49 51 67 vector Not1+AflII cut



Gel elution 후
 2ul loading



V11-74(CMV promoter) insert Not1+AflII cut

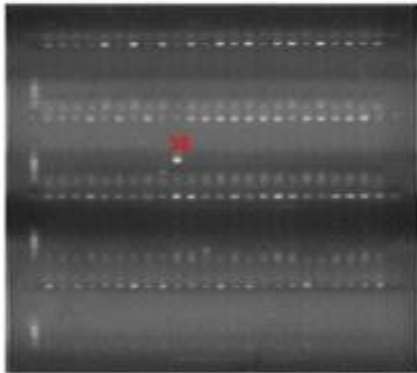


③ CMV promoter 도입 후 연결 확인

<확인 프라이머 셋트 >

322	pBHA-F	ATTGTCTCATGAGCGGATAC
455	P455-CMV-HHR-AflII-R	TACTTAAGCAAACCTAATGAAATTCCACGTCAGCTTCCAGCAGC

V11-51+CMV promoter(V11-67) 연결확인

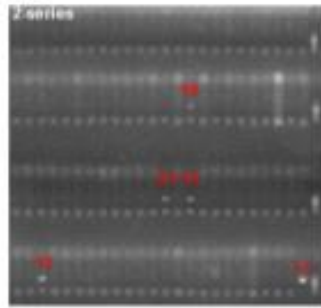
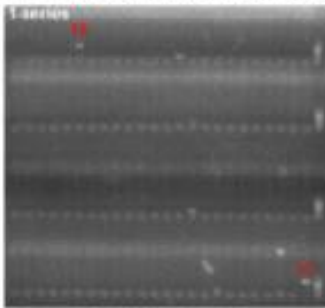


V11-75(V11-51+V11-67-36) midiprep.

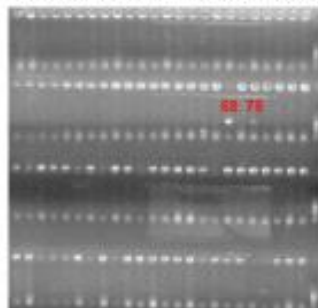


Colony 배양액 P322+P455 PCR
 94°C/5min-(94°C/20sec-50°C/20sec-72 °C /50sec)40cycles
 36번 clone 마크로젠 miniprep. DNA sequencing(P322, P458) 의뢰 OK
 -> V11-75로 보관함
 M: 100bp marker(intron)

V11-49+V11-74(CMV promoter) 연결확인



V11-67+V11-74(CMV promoter) 연결확인



Colony 배양액 P322+P455 PCR
 94°C/5min-(94°C/20sec-50°C/20sec-72 °C /50sec)40cycles
 +C V11-75 DNA 15번 clone 마크로젠 sequencing 결과 OK -> V11-77로 보관함
 M: 100bp marker(intron)

Colony 배양액 P322+P455 PCR
 94°C/5min-(94°C/20sec-50°C/20sec-72 °C /50sec)40cycles
 68번 clone 마크로젠 sequencing 결과 OK -> V11-76으로 보관함
 M: 100bp marker(intron)

2) 전사백터 세포 내 도입-1차

* pPEDV-derived DNAs(promoter를 CMV로 교체한 것)를 donor DNAs로, mPEDV를 recipient virus로 사용함

① 실험 전날 L-cell을 6well plate에 배양

Lipofectamine

첨가량

3.75ul

2ug	4ug	6ug
2ug	4ug	+mPEDV 감염

② 실험당일 오전에 배지를 제거 후 L cell에 mPEDV를 1MOI로 감염

: 배양배지 2ml 중 1ml 제거 후 바이러스 원액 0.1ml씩 감염

* mPEDV : mPEDV-3 (160219감염->160222H, 6.50TCID₅₀/ml)

* 6well L-cell confluent 예상 : 2.5X10⁵/well따라서 바이러스를 0.1ml/well 감염

(0.1 X 6well X 3plate= 1/10희석 바이러스 1.8ml->2ml)

준비)

- 37°C/4hr incubation
- 2회 washing wt 2ml/well OPTI-MEM broth
- OPTI-MEM broth 각 2ml씩을 첨가해 놓음. (뜬 cell도 다시 넣어줌)

③ 감염 4시간 후 Donor DNA를 lipofectamine을 사용하여 L cell에 도입

- Lipofectamine 3000 mixture 준비 :

Lipofectamine 3000 3.75ul X 20well = 75ul (총 18well이지만 20well 분량 준비)

OPTI-MEM배지 125ul X 20well = 2.5ml → **vortex 2-3**

- DNA mixture 준비(DNA 종류 당 3종류씩 총 9tube 준비)

DNA 2ug+P3000 reagent 4ul+OPTI-MEM 125ul **X2반복** DNA 4ug+P3000
8ul+OPTI-MEM 250ul

DNA 4ug+P3000 reagent 8ul+OPTI-MEM 125ul **X2반복** DNA 8ug+P3000
16ul+OPTI-MEM 250ul

DNA 6ug+P3000 reagent 12ul+OPTI-MEM 125ul **X2반복** DNA 12ug+P3000
24ul+OPTI-MEM 250ul

- DNA가 들어있는 tube에 lipofectamine 3000희석액을 250ul씩 첨가

→ **vortex 2-3** → **15min/RT incubation**

- mPEDV를 감염시켜놓았던 6-well plate L-cell에 250ul씩 첨가

④ Transfection 6시간 후 배지 change(OPTI-MEM→ProVero-1),

vero cell overlay 배양 : well 당 5×10^5 cell첨가 : 총 10^7 cell필요(20 well) : 40ml

ProVero-1에 부유

⑤ Trasfection 24시간 후 trypsin adding : 1ug/well

⑥ 4-5일 후 배양액을 harvest하여 freeze-thawing한 후 Vero cells에 2대 더 배양하여 purification 함. (end-point dilutions)

3) 전사백터 세포 내 도입확인-1차

① PEDV spike 유전자 확인 프라이머 사용

371	PEDV-all-recomb-R	CTACATTGAGCTCCAACCTCTTG
372	PEDV-all-recomb-F	GAGCAGCGTTCAGAGTCTCTC

PEDV 작출 확인- P0, transfection 4DPI sample



PEDV 작출 확인- P0, transfection 6DPI sample



6well 151160610 transfection -> 160616(6DPI) sample (cell+상층액 3회 F/T)
 주물 후 원액, 1/10희석액 RT-PCR, PCR

M: 100bp marker(intron) 7ul/well loading 확인

Primer P371(PEDV-all recomb-F) + P372(PEDV-all recomb-R) : PEDV spike 내부 유전자
 45°C/30min-94°C/5min-(94°C/30sec-50°C/30sec-40sec)40cycles

1: V11-76-2 μ g-1	2: V11-76-2 μ g-2	3: V11-76-4 μ g-1	4: V11-76-4 μ g-2	5: V11-76-6 μ g
6: V11-77-2 μ g-1	7: V11-77-2 μ g-2	8: V11-77-4 μ g-1	9: V11-77-4 μ g-2	10: V11-77-6 μ g
11: V11-75-2 μ g-1	12: V11-75-2 μ g-2	13: V11-75-4 μ g-1	14: V11-75-4 μ g-2	15: V11-75-6 μ g
16: V11-78-2 μ g-1	17: V11-78-2 μ g-2	18: V11-78-4 μ g-1	19: V11-78-6 μ g	

② PCR을 이용한 cloning 확인

Transfection 1일 후 vero 세포에서 CPE가 보여 이를 확인하기 위해 실험 진행함.

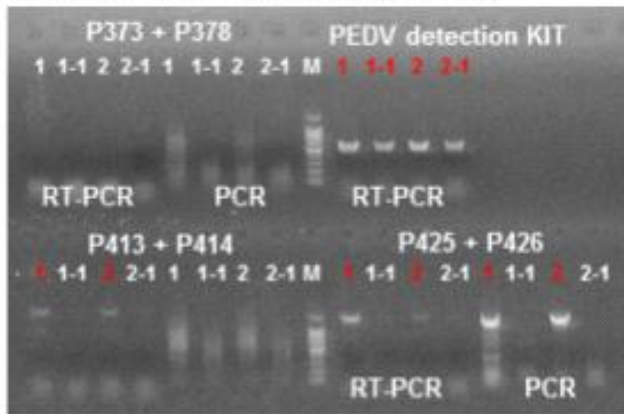
실험결과 recombination이 완벽하게 되었을 경우 반응이 되는 프라이머세트(P373+P378)에 대해서는 음성이었고 PEDV의 다른 구조단백질을 확인하는 프라이머세트(N protein, PEDV detection Kit), PEDV spike가 도입 시 반응이 되는 프라이머세트(P425+P426)는 반응이 되어 구조가 완벽하지 않은 형태로 바이러스가 작출된 것이라 예상됨. 또한 RNA 간 재

조합을 위해 첨가한 mPEDV가 아직 오염되어 있을 확인함.(P413+P414)

<반응에 사용된 프라이머 세트>

371	PEDV-all-recomb-R	CTACATTGAGCTCCAACCTCTTG
372	PEDV-all-recomb-F	GAGCAGCGTTCAGAGTCTCTC
373	PEDV-all-recomb(1b)-F	GATTACGTTAGCGATGCTGA
378	PEDV-all-recomb(S1)-R	GTGACATCTTGTGGTAGGCT
413	attDR13-24236-F	AGGAGGAGTTAGATAAATGG
414	attDR13-25839-R	TCCAAGCACTGGAATGCAGA

PEDV P1 1DPI(24well)sample 확인



6well transfection 6DPI sample(cell+상층액 3회 F/T)을 new 24well vero-Q cell에 각 4well씩 감염
-> 상층액 확인(1DPI, CPE 보이는 well)

Sample

- 1 : V11-76-2μg-1번 well
- 2 : V11-76-2μg-2번 well 추출 후 원액, 1/10희석액 RT-PCR, PCR
- M: 100bp marker(intron) 7ul/well loading 확인

P373-PEDV-all-recomb(1b)-F + P378-PEDV-all-recomb(S1)-R : recombination 확인(690bp)

PEDV 진단 Kit(수의과학검역원)

P413-attDR13-24236-F + P414-attDR13-25839-R : mPEDV 오염확인(mPEDV spike 1,789bp)

P425-PEDV-all-23065-F + P426-PEDV-all-24294-R : (PED spike 1,248bp)

45°C/30min-94°C/5min-(94°C/30sec-50°C/30sec-1min 30sec)40cycles

4) 전사백터 세포 내 도입-2차

현재까지 실험에서 작출된 바이러스는 vero-cell에서 계대배양이 잘 되지 않거나 단백질 구조가 완벽하지 않은 형태로 작출되는 양상을 보임. 바이러스의 작출 효율을 높이기 위해 코로나 바이러스의 assembly 과정에서 발현되는 단백질의 순서를 고려하여(The Journal of Cell Biology, Volume 131, Number 2, October 1995 339-349, Envelope Glycoprotein Interactions in Coronavirus Assembly) transfection 순서를 조정하는 실험을 진행 함. 참고한 문헌을 정리해보면 coronavirus의 일종인 MHV의 세포내 증식과정에서 구조단백질인 M, S 단백질 중 M 단백질은 세포내 감염 직후부터 발현되기 시작하고 S

단백질은 20분 이상 지나 발현되기 시작함. 기존 방법대로 mPEDV를 세포에 감염하고 1시간 혹은 그 이상 incubation 후 전사백터를 도입하게 되면 이미 세포내에서 만들어진 mPEDV의 M protein은 mPEDV의 S protein과 결합하여 crossover에 의해 만들어진 PEDv의 S protein과 assembly 될 확률이 저하될 것이라고 예상됨. 따라서 세포내 전사백터를 먼저 도입하여 PEDv의 S 단백을 충분히 발현시켜 놓은 상태에 mPEDV를 감염시켜 mPEDV로부터 만들어진 M protein이 PEDv의 S protein과 먼저 assembly되도록 실험을 디자인 함.

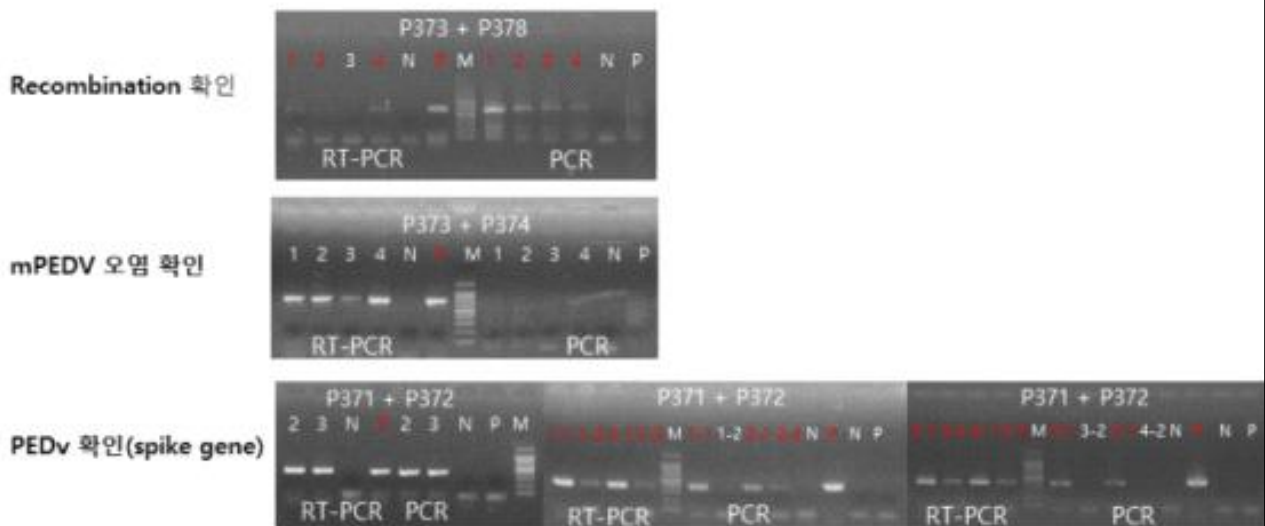
전체적인 실험방법은 1차 실험에서 “mPEDV 감염 -> 전사백터 도입“을 ”전사백터 도입 ->mPEDV 감염“으로 변경한 것을 제외하고 동일하게 진행 함.

5) 전사백터 세포 내 도입확인-2차

- 다양한 부분에 대한 PCR 확인을 진행. 사용한 프라이머세트는 1차 시험 때와 같음.

PCR 결과 recombination을 확인하는 프라이머세트를 사용한 PCR에서(P373+P375) 같은 전사백터에 대해 기존방법(1번 샘플)에 비해 변경한방법(4번 샘플)에서 작출 된 PEDv의 역가가 다소 높은 것처럼 관찰되었으나 이 경우 mPEDV의 오염도 또한 다소 높아 vero cell에 좀 더 계대하여 mPEDV의 증식을 억제하면서 PEDv의 증식을 높이는 실험 진행을 결정하였음..

PEDV P0 4DPI(T75 flask)sample 확인



RNA를 추출한 후 원액 또는 1/10 희석하여 PCR 확인
 RT-PCR : 45°C/30min-94°C/5min-(94°C/30sec-50°C/30sec-72°C/50sec)40cycles
 1: V11-77 CMV-(DJS1+DJS2) 기존 순서, 2: V11-75 CMV-(DJS1+attDR13S2)
 3: V11-76 CMV-GCPEDV 4: V11-77 CMV-(DJS1+DJS2)
 +C : V11-54(P3)

3차년도

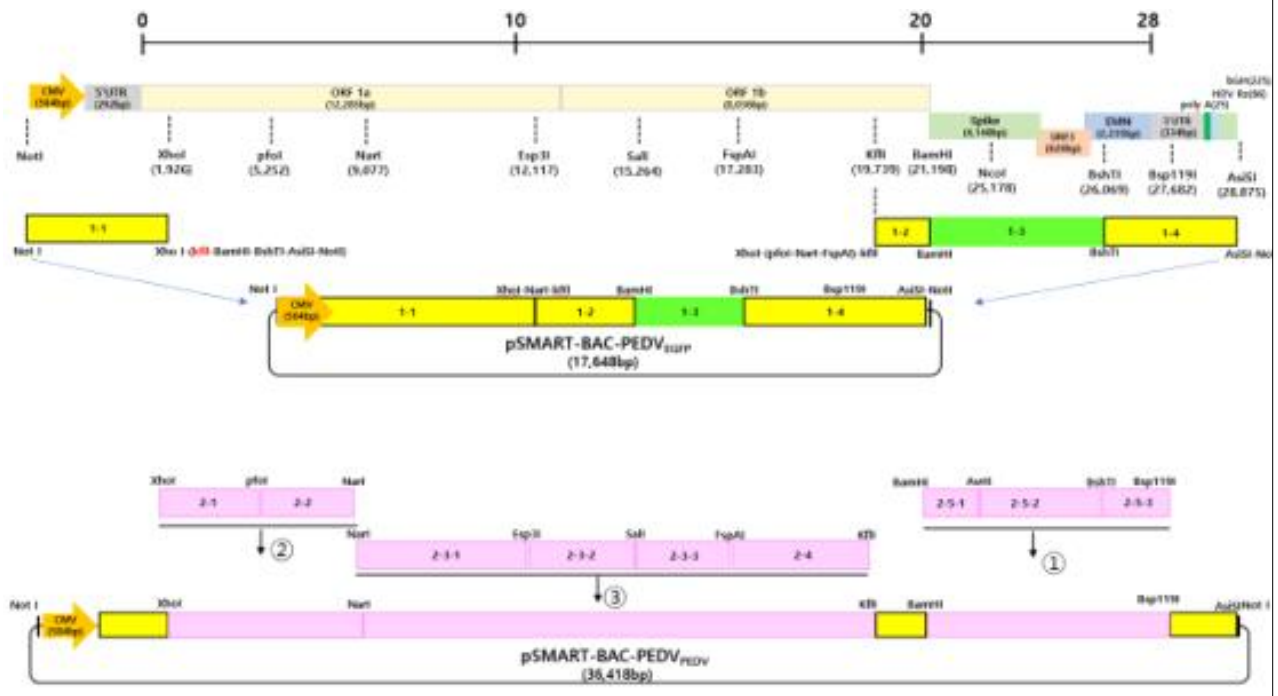
□ 역유전자 이용 PEDV 신규 백신후보 작출

목표 : 약독화 백신주(DR13주)를 backbone으로 하는 full length infectious cDNA로부터의 신규 PED 백신 후보주 작출.

기존 재조합 바이러스 작출방법(crossover에 의한 RNA recombination 및 코로나바이러스의 숙주특이성을 이용한 재조합 바이러스의 작출)을 다양한 조건(도입 세포간 비교, 세포내 도입방법 비교, transfection 후 passage 방법 비교 등)을 진행하였으나 반복적으로 DR13 backbone에 DR13 spike 유전자를 가진 재조합 바이러스만이 작출 됨을 확인. 다만 이전 실험에서 코로나 바이러스의 assembly 과정에서 발견되는 단백질의 순서를 고려하여 (The Journal of Cell Biology, Volume 131, Number 2, October 1995 339-349, Envelope Glycoprotein Interactions in Coronavirus Assembly) transfection 순서를 조정한 방법(세포내 전사백터를 먼저 도입하여 recombination에 의해 교체하고자 하는 spike 단백을 충분히 발현시켜 놓은 상태에 backbone으로 사용되는 바이러스를 감염시켜 재조합된 바이러스가 작출 되도록 함)은 모든 실험조건에서 해당 바이러스(D13 backbone vectpr+DR13 spike gene)를 효과적으로 작출할 수 있게 함을 확인.

3차년도에는 BACs system을 이용, PEDV full length infectious cDNA를 제작 후 세포에 도입하여 재조합바이러스를 작출하는 연구를 진행함.

< BACs system 기반 PEDV full length infectious cDNA 제작에 관한 모식도 >



DR13 백신주의 전체 유전자 염기서열(JQ023162, 28kb)을 전체 12개의 fragment로 나누어 각 fragment 유전자를 인공합성 하고 각각의 인공합성유전자 5', 3' 말단에는 발현백터 내 도입을 위한 enzyme site를 추가하였음. 이렇게 제작된 각 fragment들을 세균인공염색체 백터(bacterial artificial chromosome, BAC)에 해당 enzyme site를 이용하여 도입하여 최종 재조합 full-length infectious cDNA clone을 제작하도록 함.

1) DR13 백신주의 비구조, 구조 단백을 암호화하는 유전자 인공합성

< 합성유전자 리스트 >

Fragment	Position	Fragment size
1-1	Promoter-5'UTR-1a	1,981
1-2	1b	1,498
1-3	EGFP-ORF3-E	1,435
1-4	E-M-N-3'UTR	2,806
2-1	1a	3,326
2-2	1a	3,825
2-3-1	1a	3,040
2-3-2	1a-1b	3,147
2-3-3	1b	2,019
2-4	1b	2,456
2-5-1	Spike	2,728
2-5-2	Spike	2,143
2-5-3	Spike	1,613

< 합성유전자 제한효소 인식부위 정보 >

1-1 NotI-(CMV-1a1b)-XhoI-kfil-BamHI-BshTI-AsiSI-NotI

1-2 XhoI-(pfoI-NarI-Eco47III-FspAI-1b C terminal parital)-Kfil-BamHI pGH

1-3 Kfil-(1b C terminal partial-GFP-ORF3-E partial)-BshTI pGH

1-4 BshTI-(E partial-M-N-)-AsiSI pGH

2-1 xhoI-1a PED-pfoI-NarI-pGH

2-2 pfoI-1a PED-NarI-pGH

2-3-1 NarI-1a-1b PED-FspAI-kfil(NarI-Esp3I) pGH

2-3-2 NarI-1a-1b PED-FspAI-kfil(Esp3I-salI) pGH

2-3-3 NarI-1a-1b PED-FspAI-kfil(SalI-FspAI) pGH

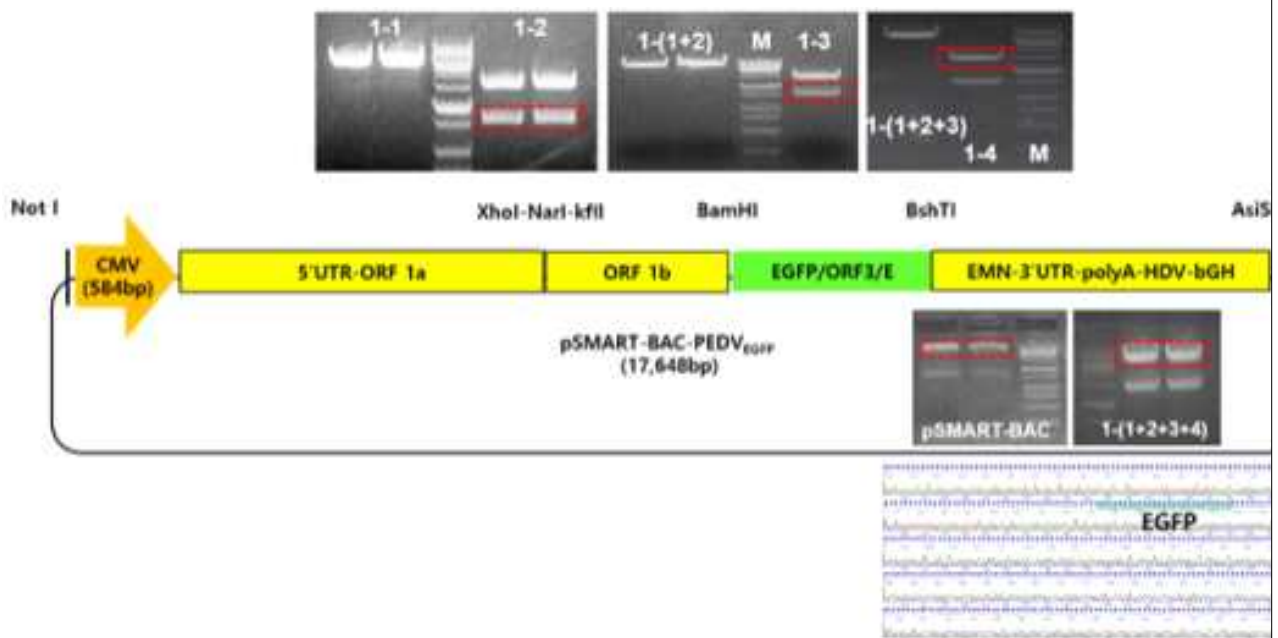
2-4 FspAI-1b PED-kfil pGH

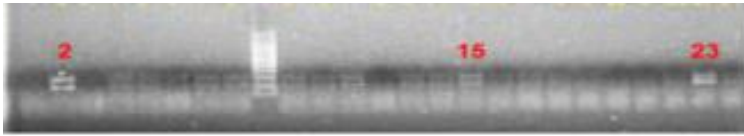
2) 각 fragment 연결작업

전체 과정에서 pSMART-BAC 벡터를 backbone으로 두 개의 벡터를 제작하는데, 하나는 T7 프로모터 및 CMV 프로모터 하에 DR13 백신주 비구조 단백질에 대한 유전자의 일부 및 모니터 유전자인 EGFP(enhanced green fluorescence protein) 유전자를 가지는 벡터 (pSMART-BAC-EGFP)로, vero cell에 transfection하여 세포내에서 EGFP를 발현하는지 확인하여 간접적으로 이 시스템이 재조합 PEDV 바이러스 작출에 적합한지를 확인할 수 있는 벡터임. 또 하나의 벡터는 EGFP 유전자 없이 전체 PEDV 유전자를 가지고 있어 실제로 재조합바이러스 작출에 사용하는 발현 벡터로, 전 단계에서 만들어진 pSMART-BAC-EGFP 벡터를 변형(EGFP 유전자 제거 및 PEDV 구조/비구조 단백을 코딩하는 유전자를 도입)하여 제작함. 특히, 작성한 바이러스 발현용 벡터는 전체 발현벡터 내의 PEDV spike 유전자만을 손쉽게 교체할 수 있도록 디자인 하여 이 후 다양한 야외 분리주들의 spike 유전자가 도입된 새로운 재조합 바이러스들의 작출에 사용이 용이하도록 함.

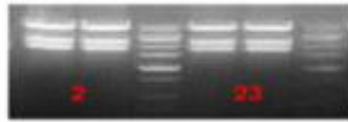
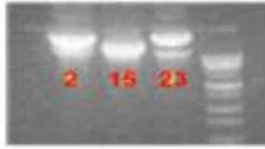
(1) Promoter(T7, CMV)+5'UTR+ORF1b+EMN-3'UTR-poly HDV-bGH 연결 fragment 작성 및 pSmartBac vector 내 도입

- 해당 제한효소를 사용하여 PEDV의 비구조 단백질 region 및 모니터링 유전자(EGFP)를 연결한 후 NotI 제한효소를 사용하여 pSmartBac vector에 도입 함. 최종 만들어진 fragment는 chloramphenicol(12.5ug/ml)을 첨가한 고체배지에서 단일집락을 선별하고 plasmid를 추출하여 BamHI과 NotI 제한효소에 의한 RFLP로 최종 확인 함.





↓ DNA miniprep., RFLP 확인



* 최종 선별 vector : pS-V11-112-4R-2

(2) PEDV spike+ORF3+EMN 연결 fragment 작성

도입을 위한 PEDV spike 부분은 V11-49(야외주 S1+야외주 S2), V11-51(야외주 S1+DR13 백신주 S2), V11-54(DR13백신주 S1+ DR13백신주 S2)의 3가지 형태에 대해 각각 작성함.

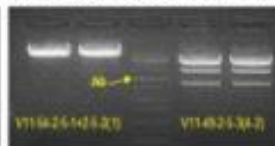
* 최종 사용한 clone 번호

	2-5-1	2-5-2	2-5-3
V11-49	1-11	9	49-2-5-3(4-2)
V11-51	3-13	14	
V11-54	1-8		

2-5-1+2-5-2 연결을 위한 제한효소처리(AvrII+BshTI)



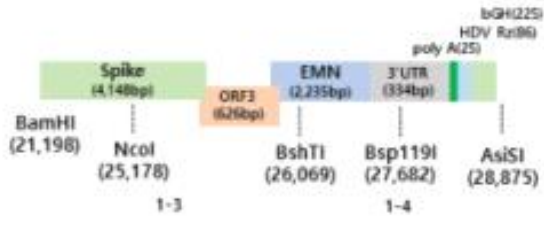
(2-5-1+2-5-2)+2-5-3 연결을 위한 제한효소처리(BshTI+Bsp119I)



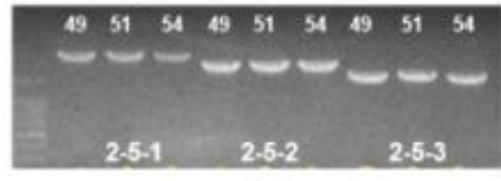
* 연결된 clone은 P542-PEDV-TM-33476-F, P116-M13F(-20) 프라이머를 사용하여 PCR하여 확인 함.

542-PEDV-TM-33476-F : GTTGGCATTACTAATGCTGC

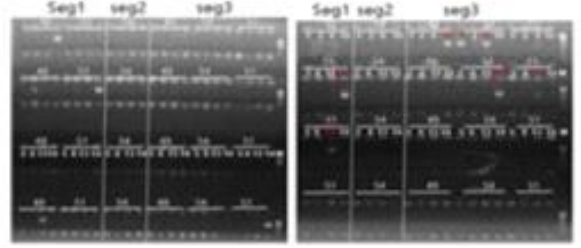
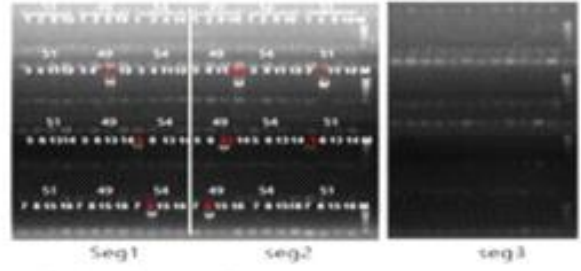
P116-M13F(-20) : GTAAAACGACGGCCAGT (1,841bp)



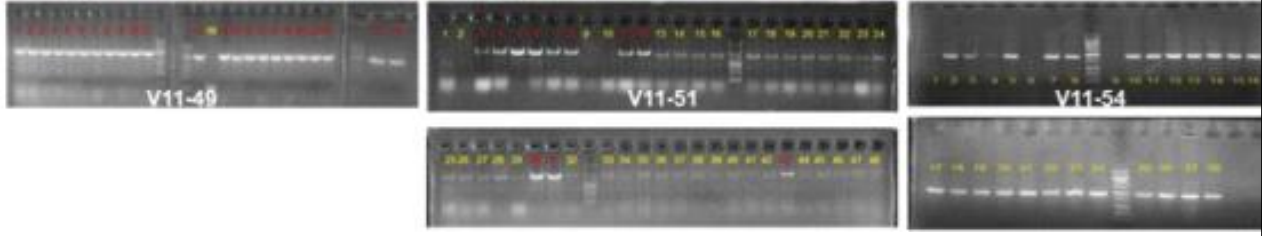
각각의 fragment PCR



TA cloning 후 확인



2-5-1+2-5-2+2-5-3 연결된 clone 확인을 위한 PCR



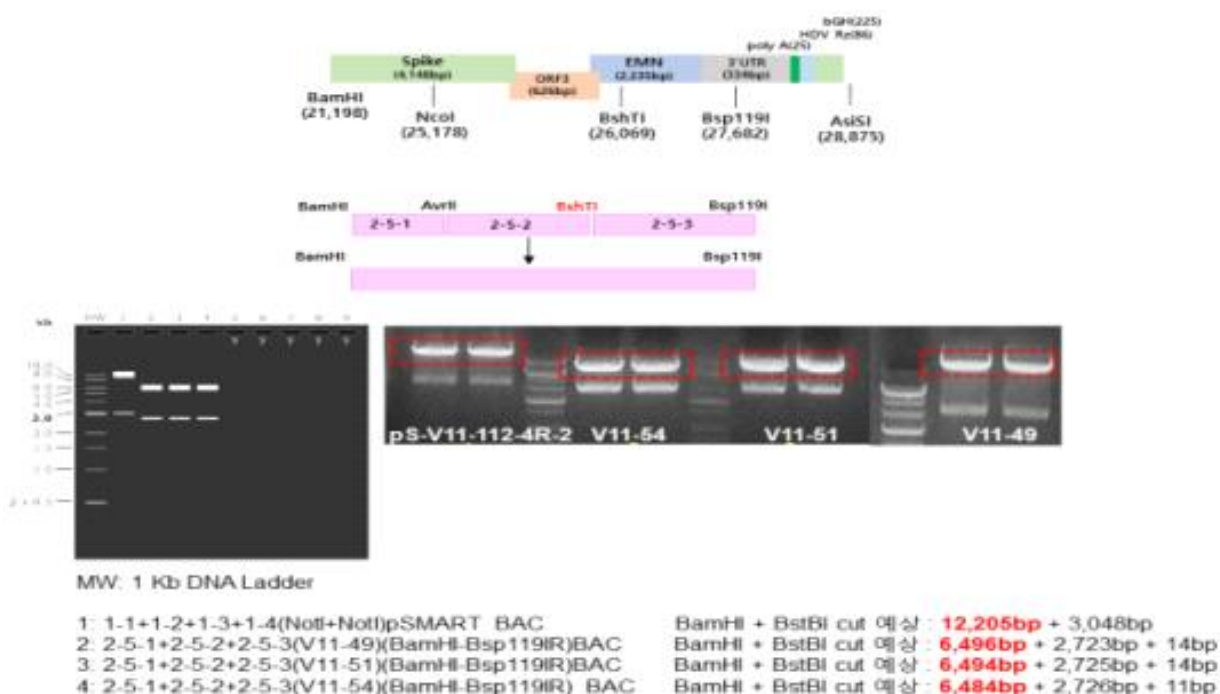
PCR 양성 clone들은 다음 프라이머 셋트를 사용한 염기서열을 분석하여 최종 확인함.

No.	Primer	Sequence
P116	M13F(-40)	GTAAAACGACGGCCAGT
P361	P361-PEDV-S1-1596	CGACTGCGCATTGTCAG
P362	P362-PEDV-S1-2420	GGAAATTGTCATCACCAAGT
P363	P363-PEDV-S1-3262	CATCTGATTCTGGACAGTTG
P364	P364-PEDV-S2-4097	GTCTCTCATCGGTGGTATGG
P365	P365-PEDV-S2-4904	GAGTTGTGTGGTCACCTATG
P366	P366-TM-5641	TGCACACTTATTGGCAGGCT
P524	P524-PEDV-E(5-3)-BshTI-F	TCACCGGTTGTGTAATAGCGCAGTTTACACACCT
P117	M13R(-40)	CAGGAAACAGCTATGAC

* V11-49는 8번, V11-51은 30번, 그리고 V11-54는 8번 clone이 최종확인 됨.

(3) pSmartBac vector 내 PEDV "spike+ORF3+EMN" 유전자 도입

- BamHI과 BstBI(BSP119I) 제한효소를 사용하여 이전 단계에서 만들어진 PEDV 비구조 단백질 코딩 유전자 일부를 포함하는 pS-V11-112-4R-2 (Promoter(T7, CMV)+5'UTR+ORF1b+EMN- 3'UTR-poly HDV-bGH fragment가 도입된 pSmartBac vector)에 연결된 "PEDV spike+ORF3 +EMN"fragment를 도입 함.



(4) PEDV ORF 1a cloning

두 개의 부분으로 나누어 유전자 합성을 하였고 NarI, PfoI 제한효소 처리 후 연결하는 작업을 진행하였음. PCR을 통해 1차 연결을 확인하였으며 확인된 clone은 최종 염기서열 분석

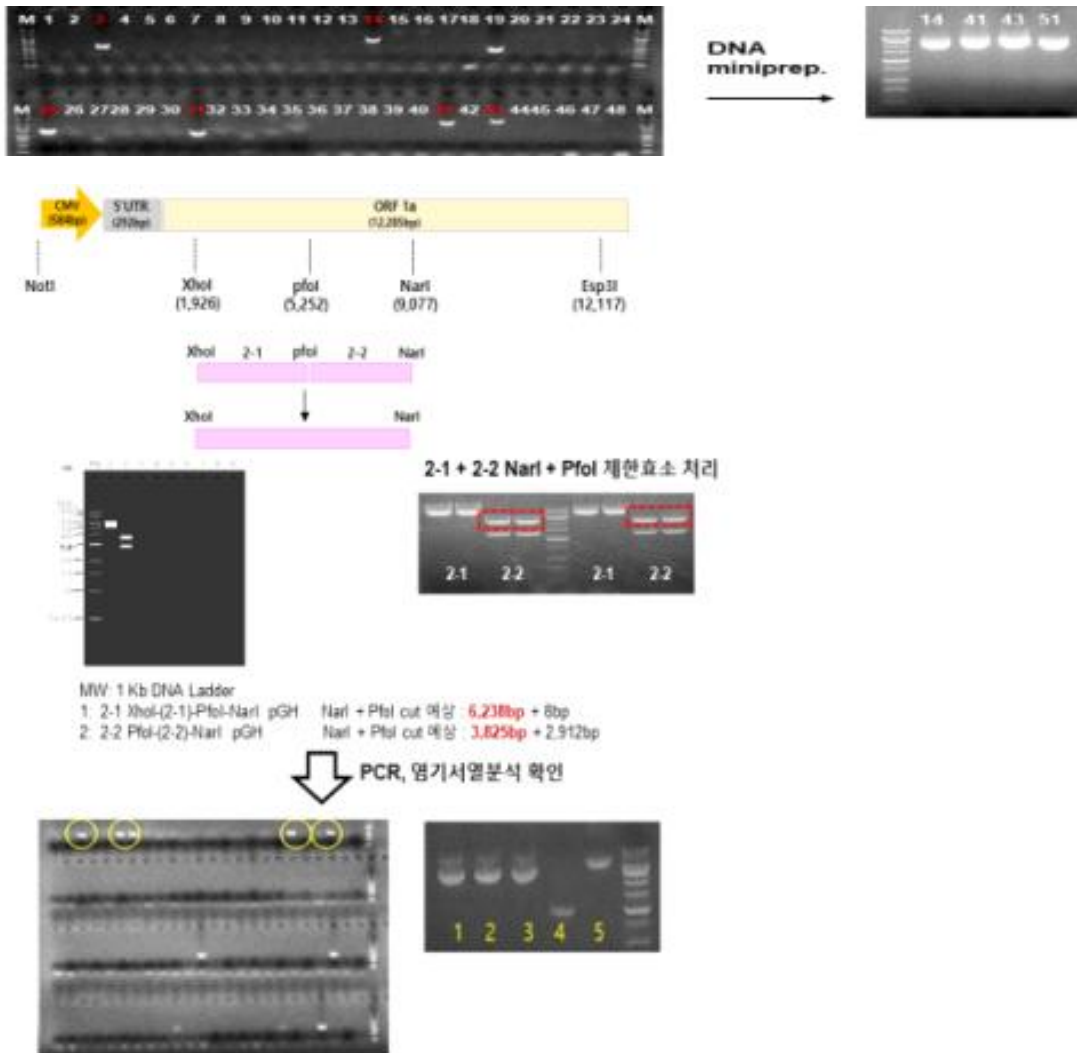
을 통해 최종 확인 함.

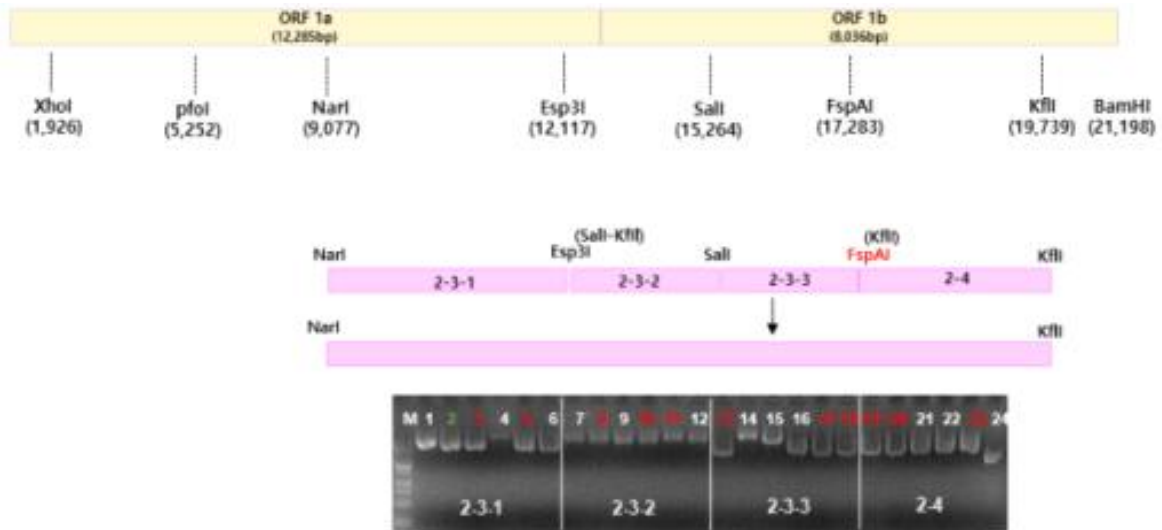
(5) PEDV ORF 1a+ORF 1b 연결 fragment 작성

PEDV의 1a, 1b 유전자는 replicase 단백을 encoding하고 바이러스의 복제에 관여함.

ORF 1a, ORF 1b에 해당하는 부분을 4개로 나누어 각각을 인공합성한 후 competent cell에 transformation하여 각각의 clone을 확보 함. 확보된 clone들은 DNA를 추출하여 염기서열 분석 함.

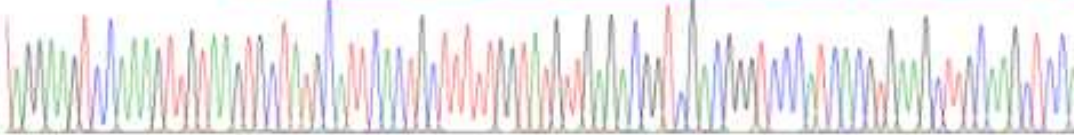
2-3-1 인공합성 유전자의 경우 competent cell에 transformation했을 때 host cell 자체가 자라지 않거나 얻어진 clone들의 유전자에 변이가 발생하거나 일부분이 deletion이 되는 현상에 반복 됨. 또한 최종 확인된 clone의 경우에도 배양 중 유전자가 소실되거나 변이가 생기는 현상이 지속적으로 발생함.





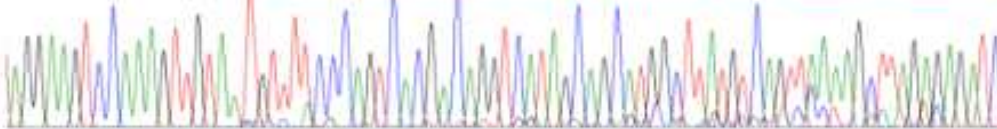
기존 sequence

AGGAAGTCCAAGTTGTAAAGTGCTATGCATTCACTGCTTTTTGGSTATGTTGAGACGGTTCGACGGTCCCATCACGTTGAAGCTTGCAAGCTCCAT



Deletion clone sequence

AGGAAGTCCAAGTTGTAAAGTTTCCAGTCCAGACAGGTCATAGCAGCATGGCTTATGTCAGTTAAAAGCTTAGAGAGATC

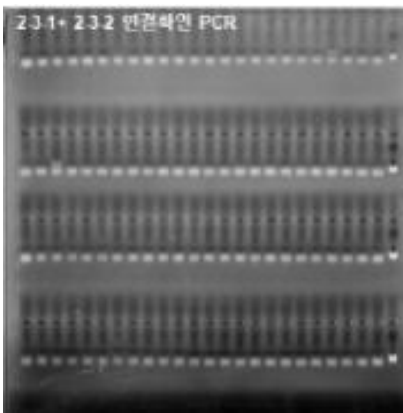


2-3-1 유전자에 의한 이러한 현상은 이후 2-3-2, 2-3-3, 2-3-4 부분을 연결하는 과정에서 지속적으로 발생하였고 agar plate 상에서 37도 배양기에서 20시간 이상 배양한 후의 관찰에서도 transformed clone의 size가 매우 작아지고 plasmid copy 수를 현저히 낮추는 영향을 미침.



2-3-1 유전자가 host 대장균에 대해 독성이 있어 발생하는 현상이라 예측되어 이러한 toxic gene 발현에 사용하는 NEB 5-alpha F'Iq Competent *E. coli*를 host cell로 사용하였으나 개선되지 않음. 실험에 사용한 5-alpha F'Iq Competent *E. coli*의 genotype은 [F' proA+B+lacIq Δ(lacZ)M15 zsf::Tn10 (TetR) / fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17]인데 tetracycline promoter에 LacIq가 연결되어 있어 LacI 단백질을 발현함으로써 Lac promoter에 의한 basa expression을 조절하여 대장균에 대해 독성을 지닌 유전자의 발현에 주로 사용하는 대장균임.

실험계획단계에서 각 유전자부분의 연결순서는 2-3-1에 순차적으로 이 후 유전자들을 연결하는 것이었으나 수차례 실험결과 2-3-1에 특이 2-3-2 부분을 연결하는 실험이 진행되지 않아 2-3-1에 2-3-3, 2-3-4를 연결 후 최종 2-3-2를 연결하는 실험으로 진행 됨.



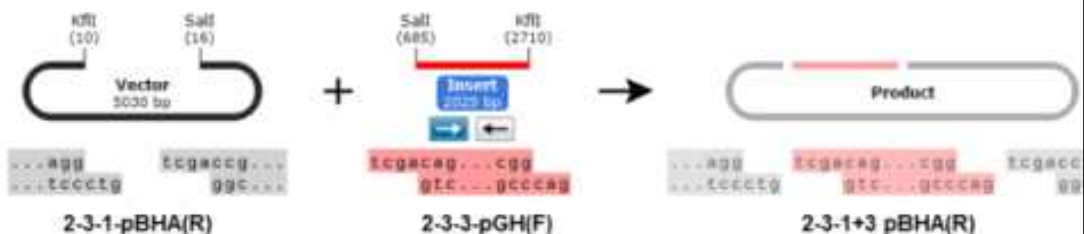
P559-1a polyprotein-19475-F

TAATGGTTCTCCACCTCAGT

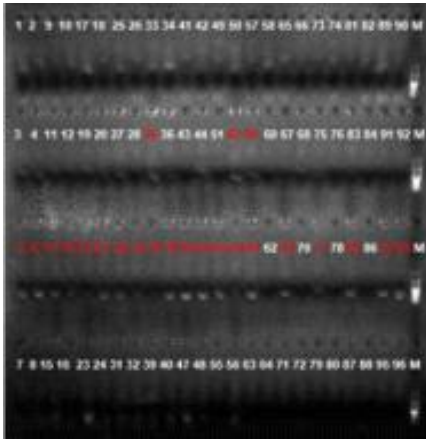
P394-attDR13-11834-R

GCTTAACAATACGCTCACAC (500bp 예상)

PEDV(2-3-1)+(2-3-3)을 연결하기 위한 작업(2를 마지막에 넣는 방법)



2-3-1에 2-3-3을 연결한 clone의 확인 PCR



재 확인
→

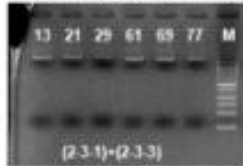


P559-1a polyprotein-19475-F TAATGGTTCTCCACCTCAGT

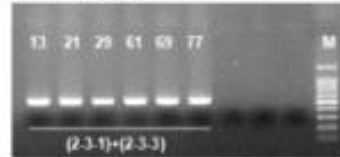
P561-1b polyprotein-23105-R TGTCAGGCTCAATCCAACAT (491bp 예상)

PCR로 1차로 연결이 확인된 clone은 DNA를 추출하여 각 유전자간 연결부위를 확인하는 실험을 진행하였으며 RFLP 및 염기서열 분석을 통해 최종 확인 함.

(2-3-1)+(2-3-3), (2-3-1)+(2-3-3)+(2-4) 연결 clone DNA miniprep.



각 유전자 연결부위
PCR 확인
↓
Taliwell loading



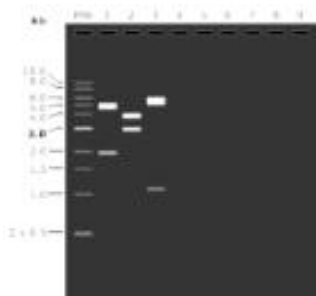
P559-1a polyprotein-19475-F + P561-1b polyprotein-23105-R 496bp 예상



P323-pBHA-R + P390-attDR13-9631-R : 666bp 예상

P322-pBHA-F + P562-1b polyprotein-24764-F : 186bp 예상

13, 21, 29, 61, 69, 77 clone 코스모진핵 염기서열 분석 피뢰결과 13, 21, 29 OK



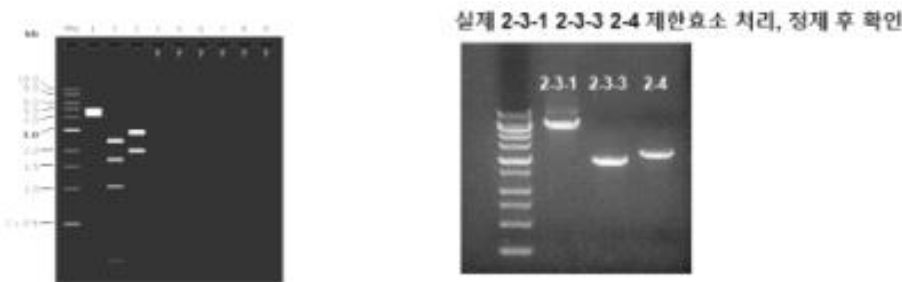
1: 1-1 2-3-1(R)+2-3-3 EcoRI cut 예상 : 5,094bp + 1,960bp
2: 1-1 2-3-1(R)+2-3-3 SpeI cut 예상 : 4,024bp + 3,030bp
3: 1-1 2-3-1(R)+2-3-3 BsaI cut 예상 : 5,964bp + 1,090bp

* RFLP 확인이 끝난 clone은 염기서열 분석을 진행함.

No.	Primer	확인위치 및 방향	13	21	29
323	P323-pBHA-R	Vector->2-3-1	OK	OK	OK
390	P390-attDR13-9031-R	2-3-1->vector	OK	OK	OK
391	P391-attDR13-8834-F	2-3-1	OK	OK	OK
392	P392-attDR13-10442-R	2-3-1	OK	OK	OK
393	P393-attDR13-10231-F	2-3-1	OK	OK	OK
631	P631-PEDV-2-3-1-EcoRI-R	2-3-1	OK	OK	OK
561	P561-1b polyprotein-23105-R	(2-3-1)<-(2-3-3)	OK	OK	OK
559	P559-1a polyprotein-19475-F	(2-3-1)->(2-3-3)	OK	OK	OK
401	P401-attDR13-15843-F	2-3-3 -> vector	OK	OK	OK
562	P562-1b polyprotein-24764-F	2-3-3 -> vector	OK	OK	OK
322	P322-pBHA-F	Vector->2-3-3	OK	OK	OK

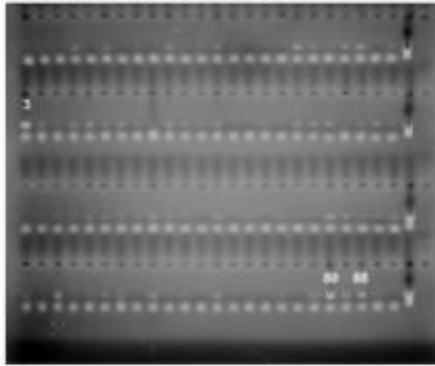
2-3-1과 2-3-3를 연결하는 실험과 동시에 2-3-1과 2-3-3, 2-3-4를 동시에 연결하는 실험을 병행하였고 PCR 상으로 양성으로 판단되는 clone을 확보하였으나 RFLP 확인 및 염기서열 분석결과 유전자 간 연결부위에서 예상치 못한 유전자의 혼입 및 구조를 지닌 것으로 판단되어 이 후 실험을 중단하였음.

PEDV (2-3-1)+(2-3-3)+(2-3-4)를 연결하기 위한 작업(2를 나중에 넣는 방법) : 2-3-1 + 2-3-3 + 2-4 한번에 연결



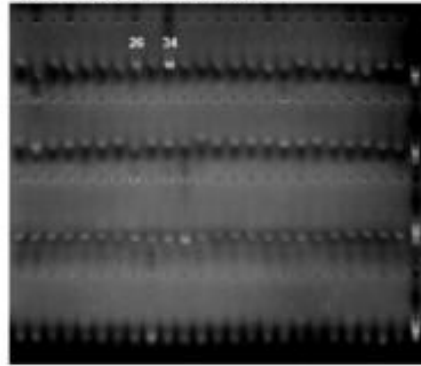
1. 2-3-1 pBHA(R)(V12-7 A-G vector) Sall + KflI cut 예상 : 5,030bp + 60p
 2. 2-4 pGH FspAI + KflI + PvuII cut 예상 : 2,456bp + 1,703bp + 1,053bp + 183bp
 3. 3. 2-3-3 pGH FspAI + Sall cut 예상 : 2,942bp + 2,019bp
- * 단계적으로 넣는 방법에서 2-3-3만 FspAI + Sall cut 하여 사용하면 됨

(2-3-1+3+4) 연결확인 PCR-1차



P559-1a polyprotein-19475-F + P561-1b polyprotein-23105-R : 496bp 예상
94°C/5min-(94°C/20sec-50°C/20sec-72°C/40sec)40cycles
: 3, 80, 88 clone miniprep 준비

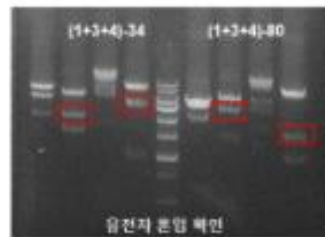
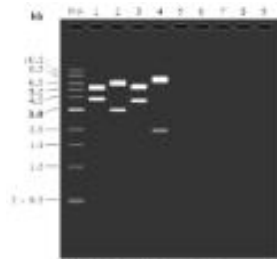
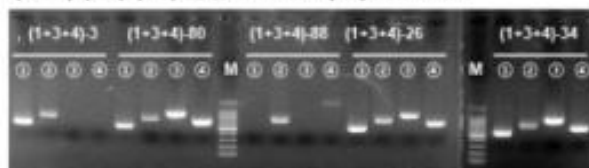
(2-3-1+3+4) 연결확인 PCR-2차



P559-1a polyprotein-19475-F + P561-1b polyprotein-23105-R : 496bp 예상
94°C/5min-(94°C/20sec-50°C/20sec-72°C/40sec)40cycles
: 26, 34 clone miniprep 준비

↓ 추가 PCR 확인

(2-3-1)+(2-3)+(2-4) 연결 clone miniprep. DNA PCR

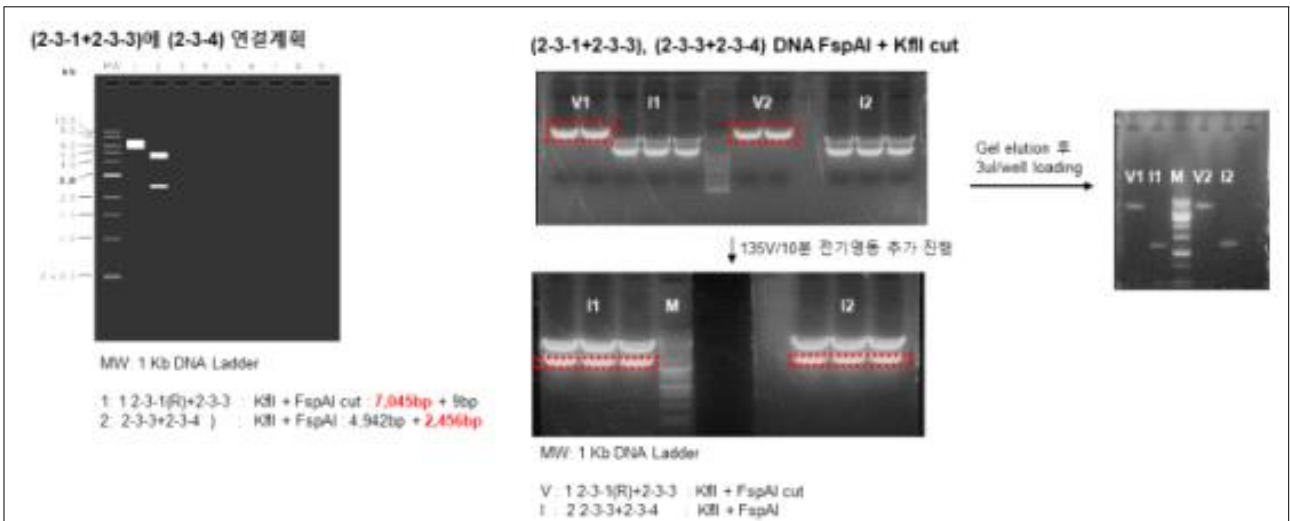


음전지 분할 확인

MW 1 Kb DNA Ladder
1. Cloned NcoI cut 예상 : 5,588bp + 3,916bp
2. Cloned SpeI cut 예상 : 6,474bp + 3,030bp
3. Cloned BsaI cut 예상 : 5,722bp + 3,782bp
4. Cloned EcoRI cut 예상 : 7,544 bp + 1,960bp

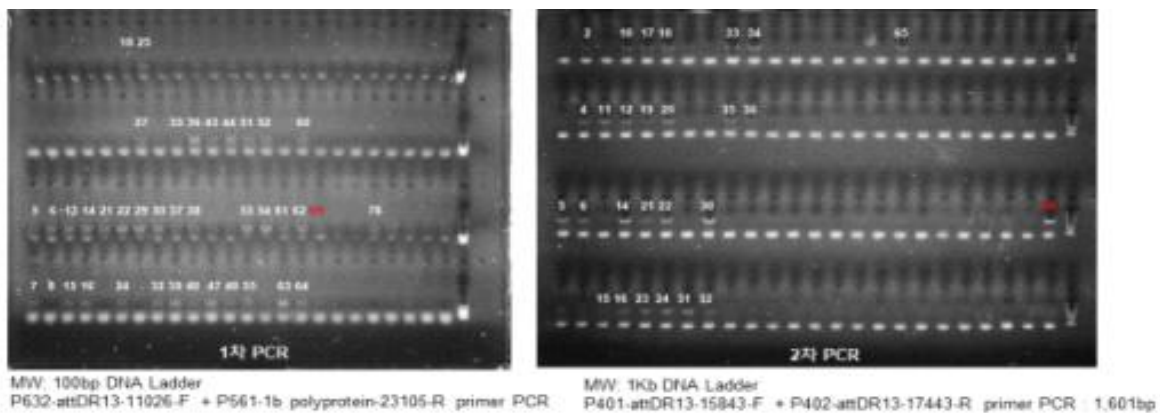
No.	Primer	염기서열 의뢰 Clone No.				
		확인 위치/방향	((1+3)-13+4)-34-1	((1+3)-13+4)-34-2	(1+3+4)-80-1	(1+3+4)-80-2
390	P390-attDR13-9031-R	2-3-1	○	○	○	○
391	P391-attDR13-8834-F	2-3-1	○	○	○	○
392	P392-attDR13-10442-R	2-3-1	○	○	○	○
393	P393-attDR13-10231-F	2-3-1	○	○	○	○
631	P631-PEDV-2-3-1-EcoRI-R	2-3-1	○	○	○	○
561	P561-1b polyprotein-23105-R	(2-3-1)-(2-3-3) (3->1)	○	○	○	○
559	P559-1a polyprotein-19475-F	(2-3-1)-(2-3-3) (1->3)	○	○	mixed peak	mixed peak
401	P401-attDR13-15843-F	2-3-3	○	○	○	○
641	P641-PEDV-2-3-3-1b-16725R	2-3-3	○	○	○	○
562	P562-1b polyprotein-24764-F	(2-3-3)-(2-4) (3->4)	mixed peak	mixed peak	○	○
402	P402-attDR13-17443-R	2-4 (4->3)	○	○	○	○
405	P405-attDR13-18650-F	2-4	○	○	○	○

2-3-1과 2-3-3이 연결된 clone에 2-3-4를 연결하는 실험을 진행함. KflI 및 FspAI 제한효소 처리 후 ligation하고 대장균 competent cell에 transformation 하였음.



Transformation 다음 날 plate 상의 clone들을 앞의 실험에서와 같이 size가 작은 colony 위주로 선정하여액 체배지에 접종하고 3시간 배양 후 PCR 진행하여 확인 함. 선별된 clone은 염기서열 분석 및 추가 PCR 진행을 위해 액체배지에 배양 함.

하룻밤 배양한 clone들의 plasmid DNA 추출 결과 agarose gel 전기영동 상에서 거의 DNA를 확인 할 수 없을 정도로 yield가 낮음을 확인. 각 clone 들을 agar plate에 streaking 하여 단일 clone으로 분리하는 실험을 진행하였고 각각의 단일 clone을 배양하여 가장 DNA yield가 높은 clone을 선별하는 실험을 진행함. 14-1-69 clone은 24개 colony를, 14-2-94 clone은 8개 colony를 분리하여 배양하고 plasmid DNA를 추출하였음. 추출한 DNA를 PCR 반응하여 확인 함. 모든 clone에서 PCR 양성반응이 확인되었으나, 단일 colony간 현저한 DNA 수율을 확인하였음. 높은 수율을 보이는 단일 집락을 골라 두 가지 액체배지에서(LB, TB) 같은 조건에서 배양 시 cell mass 대비 DNA 수율을 확인 한 결과 LB 액체배지에서의 배양이 적절함을 확인함.



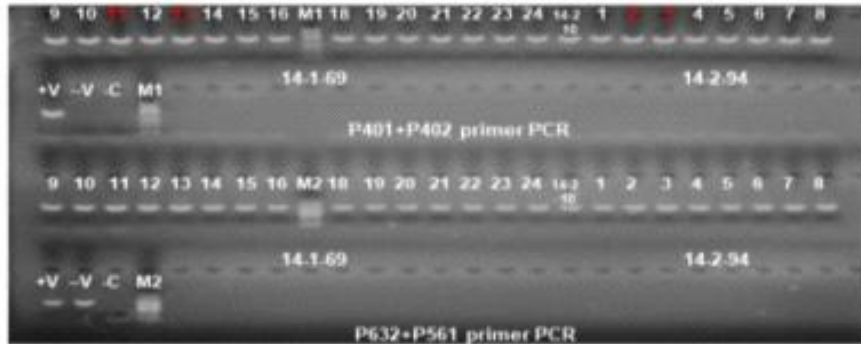
(1+3)+4 clone DNA miniprep.



M : 1Kb DNA Ladder

* 해당 clone을 agar plate(+Amp)에 streaking 후 얻은 single colon을 LB(+Amp) broth 4ml 배양
-> 3ml harvest 하여 DNA miniprep. 후 50ul TE elution -> 5ul/well loading 하여 확인함
* 단, 14-2-10은 TB(+Amp) 200ml 배양액 3ml에서 prep. 진행

1ul DNA
PCR 확인



M1 : 1Kb marker M2: 100bp marker
P401-attDR13-15843-F + P402-attDR13-17443-R primer PCR : 1,601bp
P632-attDR13-11026-F + P561-1b polyprotein-23105-R PCR : 805bp

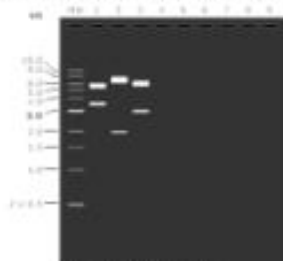
+V : 14-1-69-1 miniprep. DNA(170822 prep. (1+3)+4 연결확인 PCR 양성 sample
-V : 16-2-5 miniprep. DNA(170822 prep. (1+3)+4 연결확인 PCR 음성 sample
-C : D.W 첨가 반응
94°C/5min-(94°C/30sec-48°C/30sec-72°C/1min)30cycles

* 14-1-69 : 11, 13 14-2-94 : 2, 3

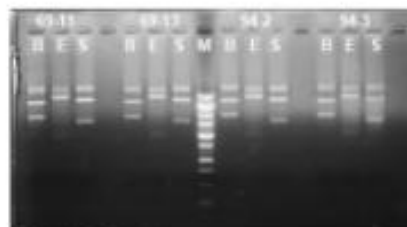


최종 선별한 clone은 BsaI, EcoRI, SpeI 제한효소를 사용한 RFLP를 확인 후 염기서열 분석을 진행함. 최종 연결된 clone 4개를 확보 함.

(1+3)+4 clone DNA RFLP 확인



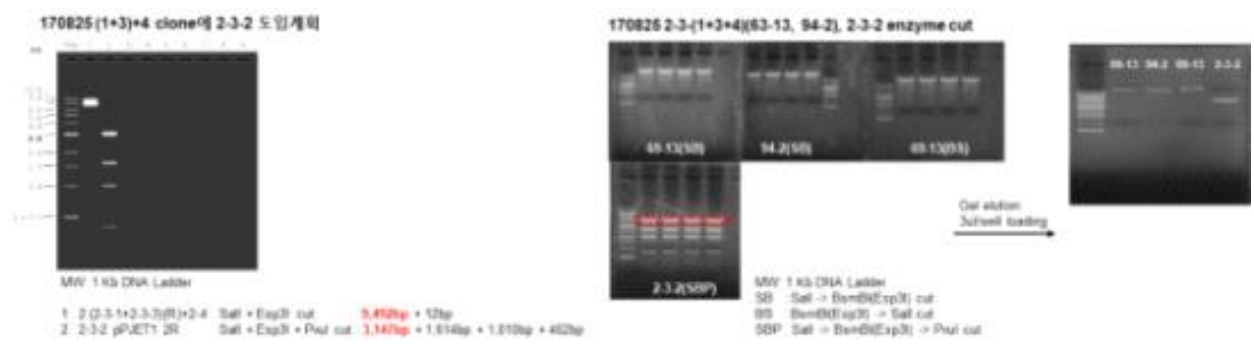
MW: 1 Kb DNA Ladder
1: 2 (2-3-1+2-3-3)(R)+2-4 BsaI cut : 5,964bp + 3,540bp
2: 2 (2-3-1+2-3-3)(R)+2-4 EcoRI cut : 7,544bp + 1,960bp
3: 2 (2-3-1+2-3-3)(R)+2-4 SpeI cut : 6,474bp + 3,030bp



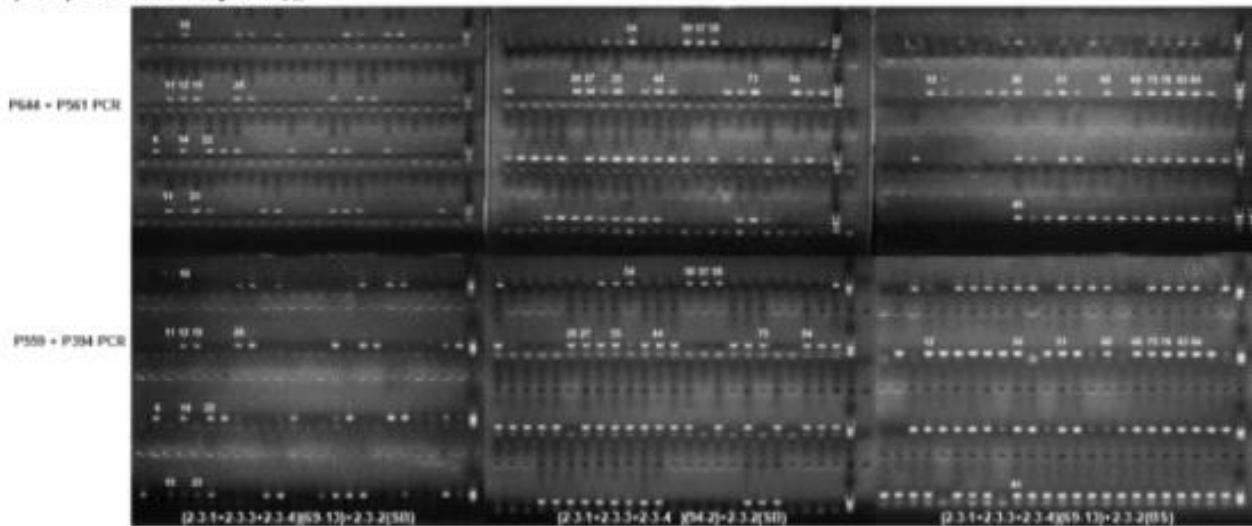
MW: 1 Kb DNA Ladder
Zug DNA overnight cut 확인 10ul/well loading

No.	Primer	염기서열 의뢰 Clone No.				
		위치	14-1-69-11	14-1-69-13	14-2-94-2	14-2-94-
564	P564-1a polyprotein-16758-R	2-3-1 -> vector	OK	OK	OK	OK
390	P390-attDR13-9031-R	2-3-1 -> vector	OK	OK	OK	OK
323	P323-pBHA-R	vector -> 2-3-1	OK	OK	OK	OK
391	P391-attDR13-8834-F	2-3-1	OK	OK	OK	OK
392	P392-attDR13-10442-R	2-3-1	OK	OK	OK	OK
393	P393-attDR13-10231-F	2-3-1	OK	OK	OK	OK
561	P561-1b polyprotein-23105-R	2-3-3 -> 2-3-1	OK	OK	OK	OK
632	P632-attDR13-11026-F	2-3-1 -> 2-3-3	OK	OK	OK	OK
559	P559-1a polyprotein-19475-F	2-3-1 -> 2-3-3	OK	OK	OK	OK
641	P641-PEDV-2-3-3-1b-16725R	2-3-3	OK	OK	OK	OK
401	P401-attDR13-15843-F	2-3-3	OK	OK	OK	OK
402	P402-attDR13-17443-R	2-4 -> 2-3-3	OK	OK	OK	OK
562	P562-1b polyprotein-24764-F	2-3-3 -> 2-4	OK	OK	OK	OK
403	P403-attDR13-17241-F	2-4	OK	OK	OK	OK
404	P404-attDR13-18847-R	2-4	OK	OK	OK	OK
322	P322-pBHA-F	vector -> 2-4	OK	OK	OK	OK
405	P405-attDR13-18650-F	2-4 -> vector	OK	OK	OK	OK
659	P659-pBHA-BeforeOri-R	vector(Ori, AmpR)	OK	OK	OK	OK
660	P660-pBHA-Amp-F	vector(Ori, AmpR)	OK	OK	OK	OK

SalI 및 Esp3I 제한효소를 사용하여 2-3-(1+3+4)가 연결된 clone에 2-3-2를 도입하는 실험을 진행함. Transformation 후 clone들을 PCR을 통해 확인 함. Clone들은 16시간 이상 배양에도 선별하기가 어려울 정도로 작게 자람. 1차로 확인된 clone들은 agar plate에 streaking 후 group 별로 10개씩 colony를 LB 액체배지에서 overnight 배양한 후 다음날 plasmid를 추출 함.

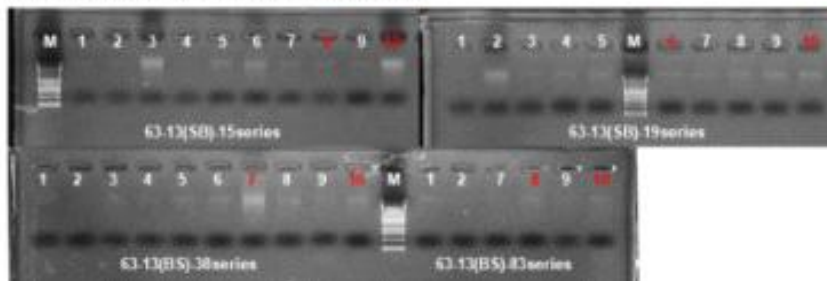


(1+3+4)+2-3-2 clone colony PCR 확인



DNA 추출결과 수율이 상당히 낮으며 이전과 마찬가지로 도입 유전자가 소실되는 현상을 확인 함. 비교적 높은 수율을 보이는 clone을 선별하여 DNA 염기서열 분석을 진행함.

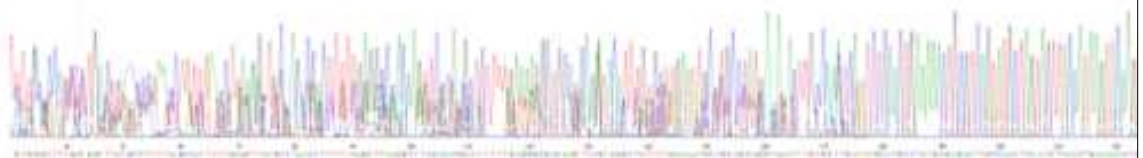
(1+3+4)+2-3-2 single clone miniprep. DNA 확인



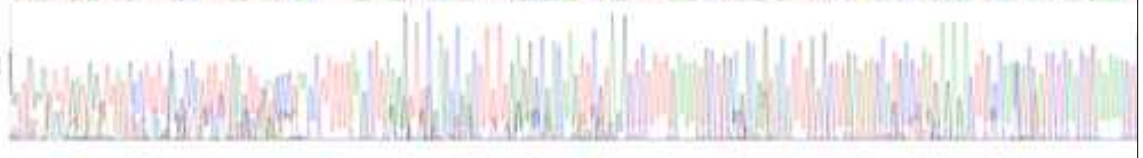
염기서열 분석결과 특정 프라이머 반응에서 mixed peak 양상을 보여 단일 집락에서 추출한 plasmid DNA를 대장균 competent cell에 transformation 하여 집락을 재분리하는 실험을 진행함.

< Mixed peak 양상 >

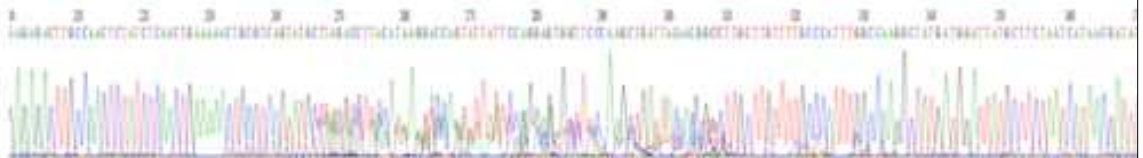
2-3 P391



2-11 P391



2-12 P391



miniprep. DNA 확인



전기영동 더 진행

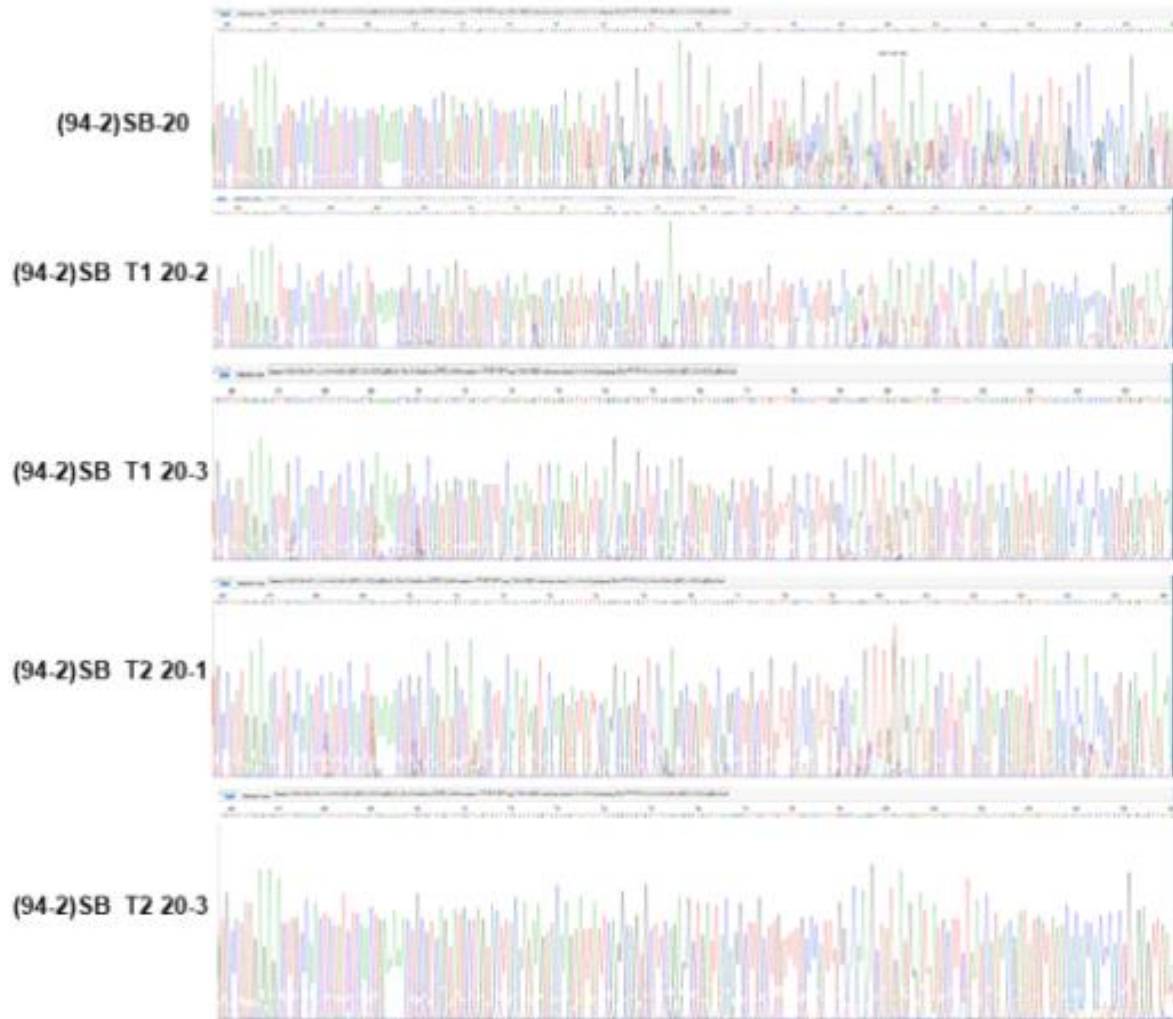


M : 1 kb marker
 10ml harvest -> 2개로 나누어 lysis 후 1개 column에 loading -> 50ul elution -> 5ul/well loading
 * (1+3+4)(63-13) + 2-3-2 -94 mixed clone miniprep DNA C-cell transformation = single clone DNA
 * T1 : 1차 transformation(clone가 희석 잘 못으로 1개만 나왔음)
 * T2 : 2차 transformation(같은 DNA를 다시 실험 한 것)

염기서열 분석결과 단일 peak를 보이는 clone을 선별할 수 있었음.

Clone	Primer	
	P390-attDR13-9031-R	P323-pBHA-R
94-2 SB T1 20-1	700bp 이후 mixed	700bp 이후 mixed
94-2 SB T1 20-2	OK	OK
94-2 SB T1 20-3	OK	OK
94-2 SB T1 20-4	mixed 후 반응안됨	mixed 후 반응안됨
94-2 SB T1 20-5	600bp 이후 mixed	500bp 이후 mixed
94-2 SB T1 20-6	600bp 이후 mixed	700bp 이후 mixed
94-2 SB T2 20-1	OK	OK
94-2 SB T2 20-2	600bp 이후 mixed	600bp 이후 mixed
94-2 SB T2 20-3	OK	OK
((63-13)(2-3-2)3-(24-4)	600bp 이후 mixed	600bp 이후 mixed
((63-13)(2-3-2)3-(24-5)	일부만(약 200bp)	반응 안됨
((63-13)(2-3-2)3-(24-6)	600bp 이후 mixed	전반적으로 mixed
((63-13)(2-3-2)3-(42-2)	400정도로 짧게 읽힘	mixed 후 반응안됨
((63-13)(2-3-2)3-(42-3)	mixed peak	mixed peak

< Mixed peak 양상 P391 분석 >



-DNA클론의 대장균 내에서의 독성문제를 해결하기 위해 전략을 바꿔서 샘플 모두를 다시 준비 하여 2-3-1과 2-3-2를 연결하고 2-3-3에 2-4를 각각 연결하기로 결정함

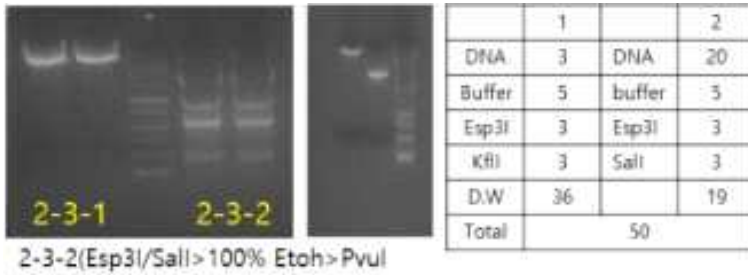
	1	2		3	4	Vector	2
DNA	3	20	DNA	2	4	Insert	3
Buffer	5	5	Buffer	5	5	T4	2
Esp3I	3	3	FspAI	3	3	Buffer	2
Sall	3	3	KflI	3	3	D.W	11
D.W	36	19	D.W	37	35	Total	20
Total	50		50		16°C·1h		

-colony PCR을 통해 1+2 6개 3+4 8개 clone을 확인하였고 각각 miniprep 하여 시퀀싱을 의뢰 하였음

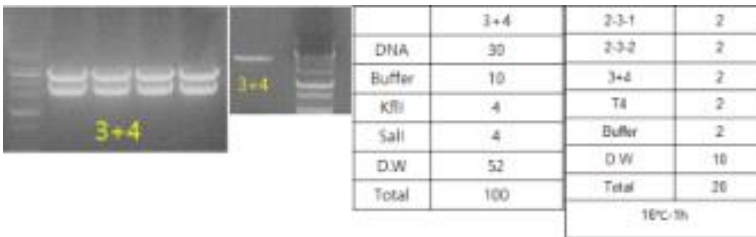
-1+2의 경우 miniprep으로는 plasmid 수율이 매우 낮아 작업이 어려워 다른 방법을 모색하고 3+4는 시퀀싱으로 연결이 확인되었음



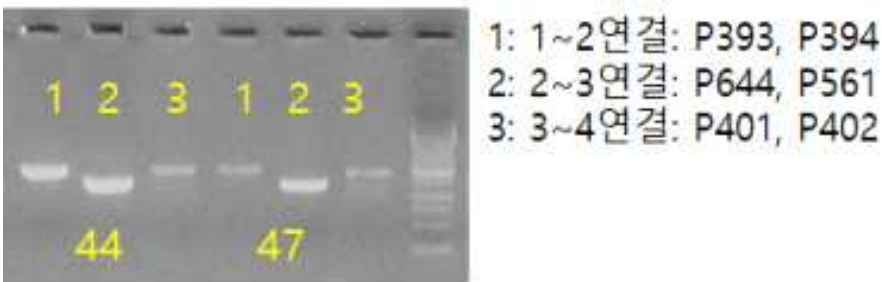
-2-3-1과 2-3-2의 연결이 매우 난해하여 2-3-1과 2-3-2의 plasmid부터 다시 준비 한 후 Esp3I과 KfII 그리고 Esp3I과 SalI을 이용하여 3+4를 한번 2-3-1과 cloning을 시도하였음



-2-3-2 CIP처리하여 ligation의 효율 오차를 줄이는 방법을 사용



-Colony PCR 진행 한것중 2가지 clone을 선별하여 1~4의 각 fragments의 연결 상태를 PCR로 확인.



-2-3-(1+2+3)+2-4의 clone으로 44번 선발

5. pSmart Bac v11-112 4R-(2)+54(2-5-1+2+3)+2-(1+2) vector에 2-3-(1+2+3)+2-4(44) 삽입을 위한 cloning

-이미 구축된 ps v11-112 4R-(2)+54(2-5-1+2+3)+2-(1+2) vector와 2-3-(1+2+3)+2-4를

NarI/KfII으로 절단하여 ligation 하고 transformation 진행

	Vector	#44
DNA	12	40
Buffer	10	10
NarI	8	8
D.W	70	42
Total	100	

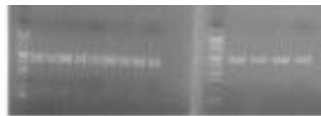
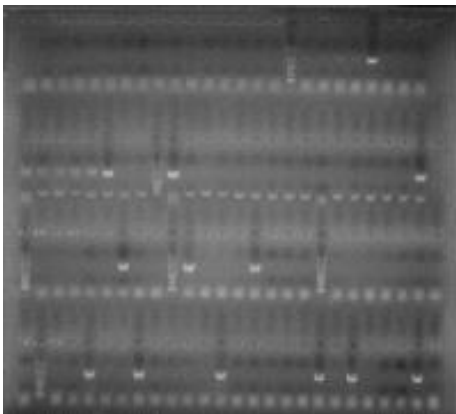


DNA	40
Buffer	10
KfII	5
D.W	45
Total	100
37°C-1h	



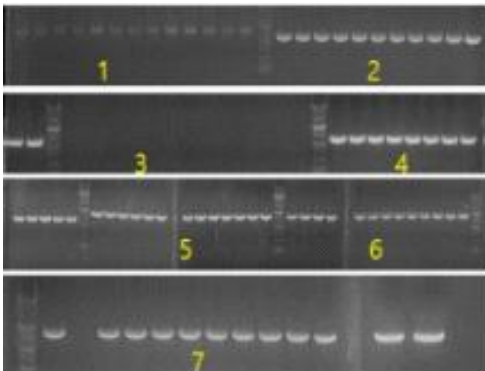
Vector	4
Insert	4
T4	2
Buffer	2
D.W	8
Total	20
16°C-1h	

-형성된 colony는 PCR을 진행하여 13개 colony를 확보

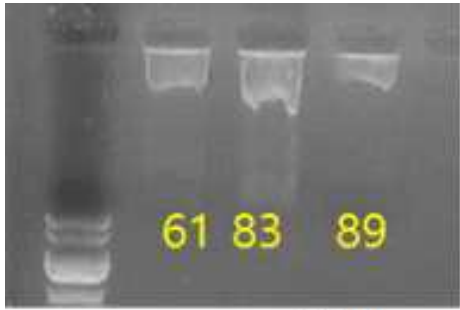


Positiv만 다시 전기영동
중 13개 colony확보

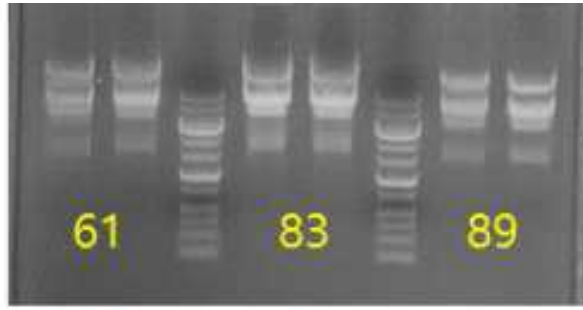
-각 연결부위에 대한 PCR을 진행한 결과 마지막 2-3-(1+2+3)+2-4의 pSmart BAC에 삽입된 것을 확인하였음(최종선발 #83,#89)



- 1: 2-(1+2)-2-3-1연결-p389,p390
- 2: 2-(1+2)-2-3-1연결-p389,p564
- 3: 1+2연결 -p393,p394
- 4: 2+3연결 -p644,p561
- 5: 3+4연결 -p401,p402
- 6: 4+vector -p405, ps1-4-3end-R
- 7: P393,p394-rePCR



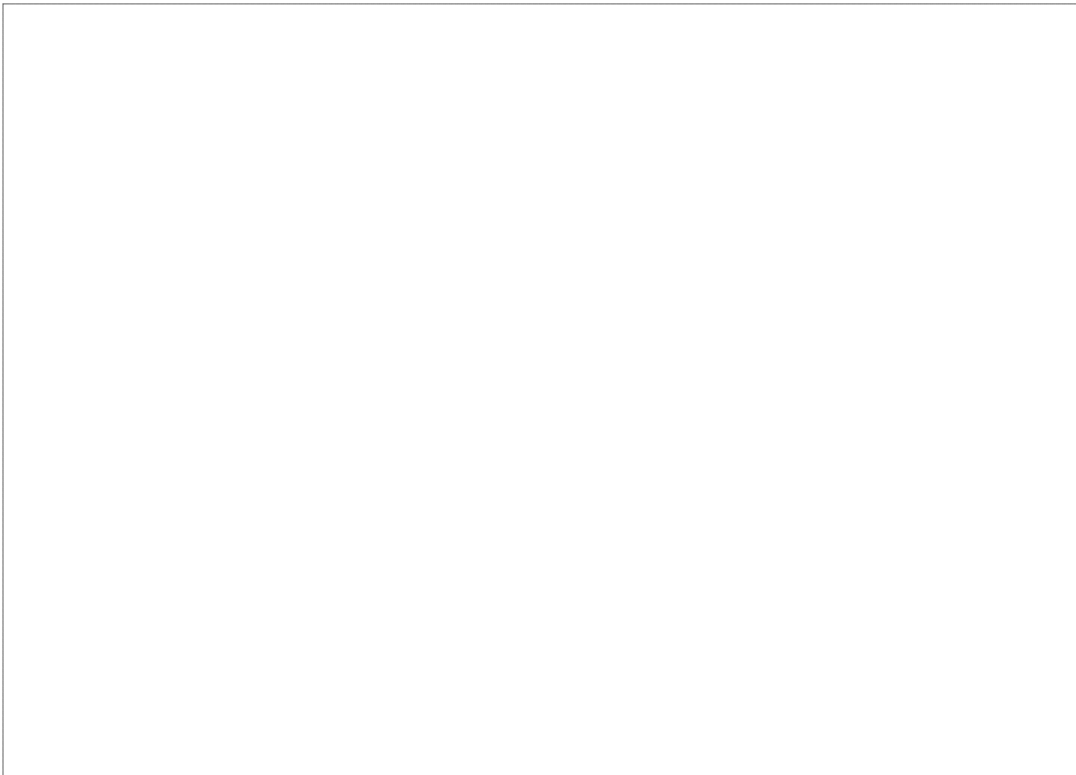
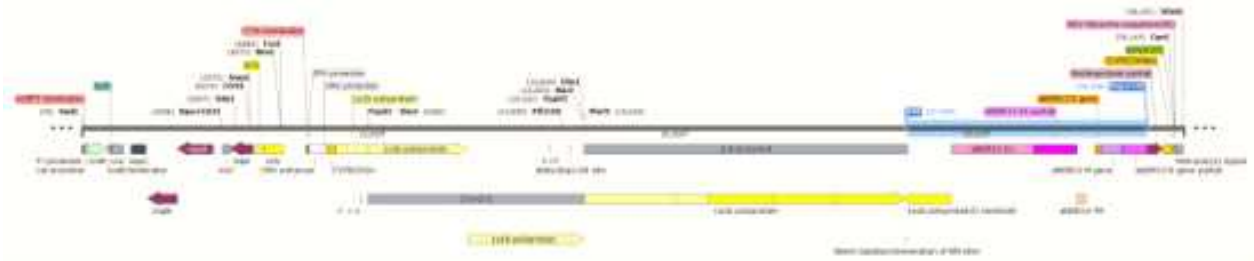
Plasmid 정제



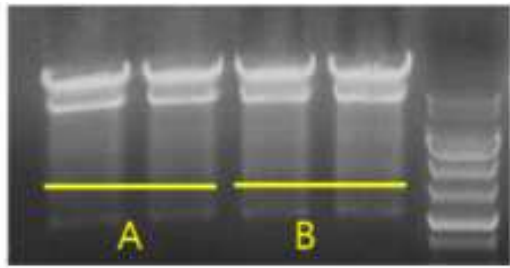
RFLP(EcoRI,Sall)

6. Spike gene substitution

54번에 대한 PED infectious clone이 완성 되어 Spike gene(51,49,67)을 치환하기 위해 ps v11-112 4R-(2) 54(2-5-1+2+3)+2-(1+2)+2-3(1+2+3)+2-4를 KfII과 BstBI 제한효소 처리하여 각 virus의 Spike를 삽입하는 방식으로 진행



-vector를 KfII으로 제한효소 처리 하여 1시간 37°C 반응 시키고 100% Etoh ppt 후 다시 BstBI 제한효소 처리 하여 Gel extraction으로 linear vector를 준비



DNA	38
kfII	4
Cutsmat	6
D.W	12
Total	60
37°C-2h Ecos transformation	

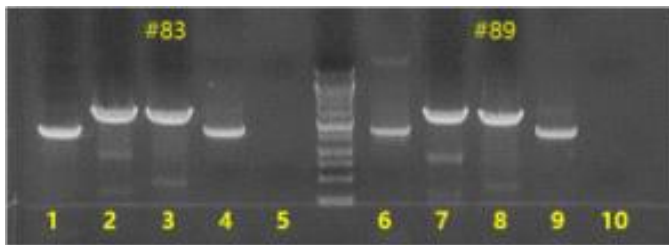
A: psV11-112+54(2-5-1+2+3)-2-(1+2)-2-3-(1+2+3)-#83
 B: psV11-112+54(2-5-1+2+3)-2-(1+2)-2-3-(1+2+3)-#89

-Vector의 제한효소 처리 확인을 위한 PCR을 진행

-제한효소 처리 되지 않은 vector와 처리된 vector를 동시에 PCR하여 cutting된 부분의 유전자 증폭 차이를 비교 하기 위함

-cutting된 vector에서 54번이 제거 되었음을 PCR을 통해 확인함

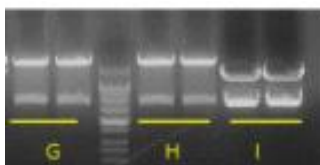
-확인된 vector 50ul에 D.W 150ul를 넣고 CIP 2~3ul를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응 후 PCI 처리하여 최종적으로 ligation에 필요한 vector를 준비함



DNA	1	PCR condition		
tdx	2	94°C	3min	25 cycle
dNTP	1	94°C	30sec	
F	0.3	50°C	30sec	
R	0.3	72°C	2min30s	
Tag	0.2	72°C	10min	
D.W	15.2	4°C	90	
Total	20	16kb, 2.3kb		

1-3, 6-8: psV11-112 4R-2+54-(2-5)+2-(1+2)+2-3-(1+2+3+4) 4-5, 9-10: 4H(X)RL BstBI-54제거
 1 & 6: p389.p390 4 & 9: p389.p390
 2 & 7: P405.ps1-4-54-2-5 5 & 10: p405, ps1-4-54-2-5
 3 & 8: P405.ps1-4-51-2-5

-49번과 67번은 pSmart BAC v11-112 4R-(2) vector에 삽입 작업을 진행 54와 51번과 동일한 방법으로 진행하였으나 transformation은 electrophoresis방식이 아닌 Ecos를 이용한 heat shock 방법을 이용하여 시행하여 49와 67 모두 다수의 colony를 확보 하여 최종 spike 치환에 이용할 plasmid를 준비함



G: psV11-112-4R-2-#1
 H: psV11-112-4R-2-#2
 I: TA-49-2-5-1+2+3

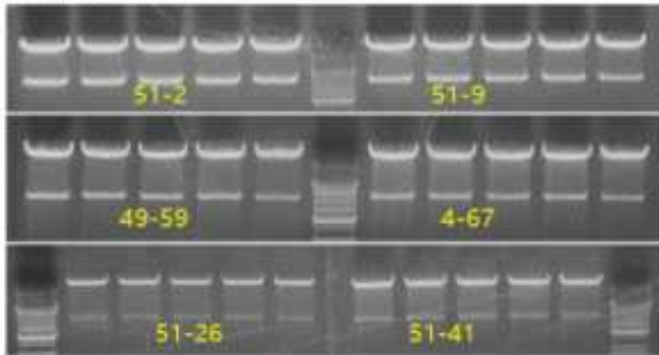


49 44 45 46 59 67
 4R-2+49-59
 4R-2+49-67

psV11-112-4R-2-67-GC-PED
 colony PCR



KflI/SalI



	51-2	51-9	49-59	49-67	67-6	67-20
DNA	5	8	20	20	15	15
Buffer	10					
KflI	3					
SalI	3					
D.W	79	76	64	64	69	69

15kb band Gel Extraction
 ↓
 BstBI enzyme cutting

DNA	36
BstBI	2
Cutsmart	5
D W	8
Total	50
37°C 2h Ecos transformation	

DNA	30
FspAI	3
buffer	5
D W	12
Total	50
37°C 2h Ecos transformation	

FspA



- Insert(49 & 67)은 KflI/BstBI으로 잘랐을 때 원하는 사이즈의 fragment가 불필요한 유전자와 겹치는 상황이 발생하여 KflI/SalI으로 먼저 제한효소 처리 후 Gel extraction 진행
- Elution sample은 BstBI으로 처리 한 후 100% Etoh ppt를 진행하여 다시 FspAI 제한효소 처리하여 Gel extraction으로 최종 Insert 분리
- 준비된 vector와 Insert는 Ligation하여 16°C에서 4시간 반응 후 transformation을 진행

Vector	2
Insert	5
T4	1
Buffer	2
D W	10
Total	20
16°C-overnight	

1차 colony PCR에서 ps v11-112 4R-(2)+49(2-5-1+2+3)+2-(1+2)+2-3(1+2+3)+2-4-59와 ps v11-112 4R-(2)+51(2-5-1+2+3)+2-(1+2)+2-3(1+2+3)+2-4-26-40에서 총 3개의 양성 반응을 확인하였다.

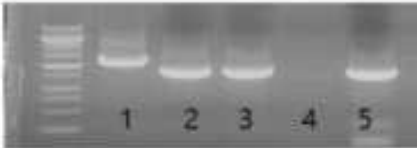
Ps 4H-49



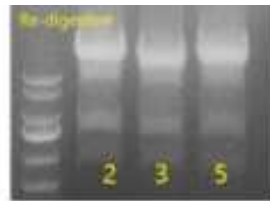
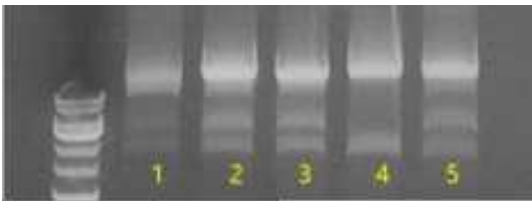
1: p389,p390
2: p405,ps1-4-51-2-5-R



1: Ps 4H-49-59-38
2: Ps 4H-51-26-40



1: p538,p382(vecto와 2-1연결)
2: p383,p384(2-1과 2-2연결)
3: p393,p394(2-3-1+2연결)
4: p644,p561(2-3-2+3연결)
5: p401,p402(2-3-3+4연결)



DNA	10
BarrH	1
Nari	2
Buffer	3
D.W	14
Total	30
37°C 2h	

1: psv11-112-4R-(2)+54(2-5-1+2+3)+2-(1+2)+2-3(1+2+3)+2-4-#83(control)
2: psv11-112-4R-(2)+49(2-5-1+2+3)+2-(1+2)+2-3(1+2+3)+2-4-#59-1
3: psv11-112-4R-(2)+49(2-5-1+2+3)+2-(1+2)+2-3(1+2+3)+2-4-#59-38
4: psv11-112-4R-(2)+51(2-5-1+2+3)+2-(1+2)+2-3(1+2+3)+2-4-#2-35(control)
5: psv11-112-4R-(2)+51(2-5-1+2+3)+2-(1+2)+2-3(1+2+3)+2-4-#26-40

- 총 4개 clone 후보 중 3개에서 RFLP 예상패턴과 동일한 결과를 확인(49-59-1, 49-59-38, 67-26-40)
- 확인된 클론들은 염기서열 분석을 통해 변이가 없음을 확인하고 바이러스 작출에 사용되었다.

3) 바이러스의 작출

실험 1-2일 전 새로운 flask로 세포를 배양하여 실험 당일 사용하려는 세포가 70-90% confluent 상태가 되도록 준비. T75 flask에 배양해 놓은 vero cell을 6well plate로 옮기고 OPTI-MEM 배지로 희석한 vaccinia virus를 감염. 37°C CO2 배양기에서 1시간 감염진행.

Lipofectaimine 시약을 사용하여 full length cDNA clone의 유전자를 세포내 도입 함. Transfection 6시간 후 FBS를 첨가한 배지로 교체하고 하룻밤 배양. Transfection 24시간 후 trypsin을 첨가하여(1ug/well) 작출된 PEDv가 vero 세포에 재감염되도록 함. 4-5일 후 배양액을 harvest하여 3회 freeze-thawing한 후 Vero cells에 2대 더 배양하여 purification 함.

Transfection 5일 후 24well plate로부터 상층액을 harvest 한 후 sample을 3-5개씩

pooling하여 1차 PCR 확인함.



- 9. 1/20+1/40 vaccinia virus vector 3 T25 passage
- 10. 1/20 vaccinia virus vector 4 6well passage
- 11. 1. 1/20 vaccinia virus vector 4 6well passage
- 12. 1/20 vaccinia virus vector 5 6well passage
- 13. 1/20+1/40 vaccinia virus vector 4+5 T25 passage
- 14. 1/40 vaccinia virus cell control 6well passage
- 15. 1/20 vaccinia virus cell control 6well passage
- 16. 무감염 세포 상층액

그림. PPEDV S gene에 대한 RT-PCR 및 PCR에 의한 EDV의 작출을 확인 및 PEDV에 의한 Vero세포 주에서의 세포변성 확인. 9번 lane의 경우 PCR의 거의 증폭되지 않았으나, RT-PCR에 의해서만 PED유전자가 상당한 증폭을 보여 tranfection에 사용된 DNA가 아닌 작출된 PEDV의 RNA가 검출된 것으로 볼 수 있으며, 작출에 성공된 PEDV는 Vero세포 주에서 PED특이 세포변성효과인 거핵세포가 관찰되었음.

현재까지 BACv system을 통해 새롭게 작출된 PED 바이러스는 DR13 백신 주 감염성 클론(V11-49)와 DR13 백신 주에서 S1 gene만 2014년 당진에서 분리된 야외 강병원성 PEDV(G2 type)로 교체된 감염성 클론(V11-51)등 2종임. 이들 작출된 바이러스들은 전체 염기서열 분석을 통해 유전자 변이 여부를 확인 중에 있음(보고서 작성 시점 현재 작출 바이러스들의 전체 게놈 염기서열 분석 중에 있음).

제2협동과제 (서울대학교 수의과 대학):

1차년도

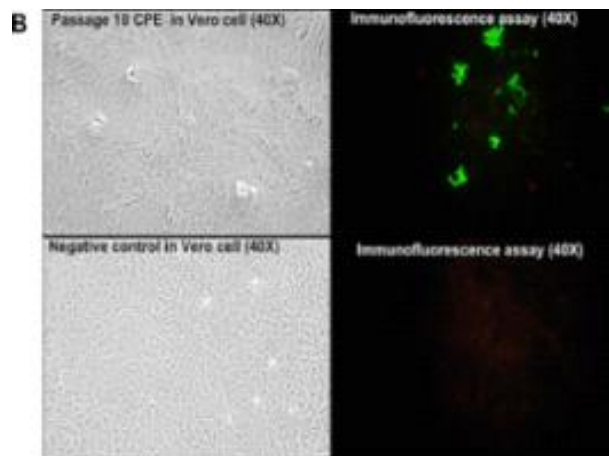
□ 야외 가검물의 수집 및 분석

양돈장에서 수집된 설사 가검물 중 PED 양성인 가검물을 선발하여 S1 gene일부의 염기서열을 분석. 그 결과를 중심으로 PED의 분자유전학적인 연구 및 추적을 통한 국내 PED 바이러스의 역학조사를 실시. 가검물의 양성여부를 판별하기 위하여 RT-PCR을 수행함. 이때 사용한 프라이머 염기서열은 다음과 같음.

Primer name	염기서열 (5'-3')	증폭산물 크기
S1-F	GAT TTA AGC AAG TTC AAT TGT AAG C	800bp
S1-R	TGG CCT AGT CCA TAA ATC TTA GG	

2013년 10월부터 2014년 12월까지 9개 지방에서 돼지 사체와 분변면봉을 수거하여, 12개의 돼지장기 와 30개의 분변,면봉 가검물에서 PED 바이러스를 검출.

바이러스를 분리하기 위하여 vero cell에 세포 계대배양을 시도. 가검물은 1x Phosphate-buffered saline에 10%로 희석해 준 뒤 파쇄하여 0.2µm 필터를 이용해 필터. vero cell은 1x Phosphate-buffered saline으로 2번 세척한 후 30분간 바이러스를 흡착시킴. 그 후 유지배지(DMEM에 트립신(10µg/ml), yeast extract (0.04%), tryptose phosphate broth(0.6%), Antibiotic-Antimycotic 100x(4µl/ml))를 1:9의 비율로 첨가. 접종된 세포는 3~4일 뒤에 계대배양을 실시하였고 같은 방식으로 4번을 반복하여 실시. 가검물 중 한 가지 가검물(BM1)만이 vero cell에 적응하여 자람. 바이러스는 CPE(cytopathic effect), immunofluorescence assay를 통하여 확인하였음. viral RNA정량을 통하여 계대한 숫자가 증가할수록 viral RNA또한 증가함을 확인. passage2일 때 10^{4.7} TCID₅₀/ml 이었고 passage10 때 10^{7.9} TCID₅₀/ml임을 확인.



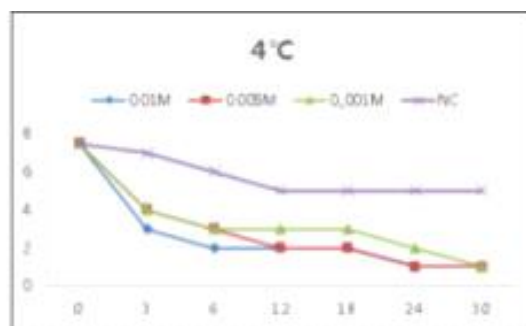
분리된 BM농장의 양성가검물에 대한 S gene 유전자분석 실시 결과 4161 뉴클레오티드, 1386개의 아미노산으로 구성되어 있음이 확인 됨. S gene의 spike protein중 SS6 에피토프 이 LQDGQVKI에서 SQSGQVKI로 바뀌었지만 SS2, 2C10에피토프는 변이되지 않음. S gene의 계통분석을 실시한 결과 PED 바이러스의 genogroup2의 subgroup2에 속하며 미국에서 발생한 PED바이러스와 99.2~99.7%의 상동성을 나타냄. 이 결과는 N gene에서도 마찬가지였으며 결과적으로 BM1 strain이 기존 백신과의 상동성이 떨어진다는 것이 확인 됨.

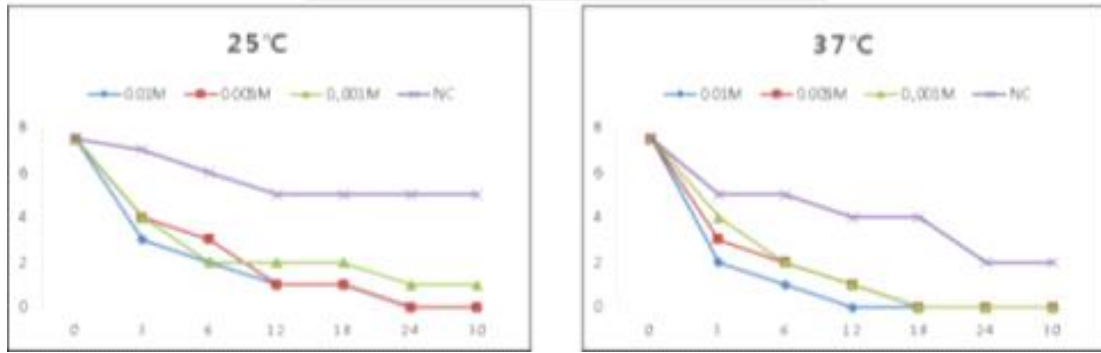
요약하자면, PED 백신접종을 하지 않은 농장의 이유자돈 설사에서 BM1 strain을 분리하였으며 이 strain은 vero cell에 적응하였고 높은 역가를 나타냈음. 이 strain은 북아메리카에서 발생한 PED바이러스가 속한 genogroup2에 속하며, 한국 백신이 속해져 있는 genogroup 1과는 상대적으로 연관성이 낮음. 따라서 분리주는 향후 한국에서 다시 PED 바이러스가 발생하는 것을 막기 위한 백신을 제작하는데 기여할 수 있을 것으로 기대됨.

□ 바이러스 불활화

독성이 있는 바이러스를 백신으로 사용하기 위한 방법으로는 연속적인 계대배양을 거쳐 순화시킨 생백신과 화학약품을 이용하여 독성을 제거한 사백신이 있음. 본 과제에서는 사백신을 만들기 위하여 Binary Ethylenimine을 이용하여 바이러스를 불활화 시키는 방법을 이용함. BEI(Binary Ethylenimine)용액은 쉽게 조제할 수 있으며 불활화제로서의 안전성과 면역원성 또한 이미 입증됨. 이러한 BEI는 바이러스 표면항원 구조에는 최소한의 영향을 주면서 안전하고 고도의 면역을 기대할 수 있음.

본 실험은 BEI의 농도와 시간에 따라서 실행되었으며 결과는 다음과 같다.





BEI는 모든 실험조건에서 유효한 효과를 나타냄. 그 중에서도 가장 높은 효과를 보인 실험군은 37°C 실험군으로 확인 됨. 가장 빠른 시간 내에 불활화 되었으며 농도에 상관없이 24시간 이내에 모두 불활화 되는 것이 확인 됨.

2차년도

□ 야외 가검물의 수집 및 유전자 분석

미국의 PEDV 발생시점에 (2013년 4월) 따라 한국농가에서의 PEDV 역학적 발생상황의 패턴비교가 필요하다고 판단되어 한국 상업 농장으로부터 서울대학교 수의과대학으로 의뢰된 2012년 1월 부터 2013년 12월까지 607개의 분변 샘플, 2014년 1월부터 2015년 3월까지의 223 개의 분변샘플의 수집된 시기를 서로 나누어서 재분석을 실시.

표1. 미국의 PEDV 발생시점에 따른 한국의 2012년부터 2013년 , 2014년부터 2015년 까지의 PEDV 양성률 파악

2012-13 year	Suckling	Weaned	Grower	Finisher	Gilt	Sow	Total
Number of samples	440	88	22	12	12	33	607
Positive samples	3	2	0	0	0	0	5
%	0.68%	2.27%	0%	0%	0%	0%	0.82%
2014-15 year	Suckling	Weaned	Grower	Finisher	Gilt	Sow	Total
Number of samples	92	40	54	20	4	13	223
Positive samples	25	8	6	4	1	2	46
%	27.17%	20%	11.11%	20%	25%	15.38%	20.63%

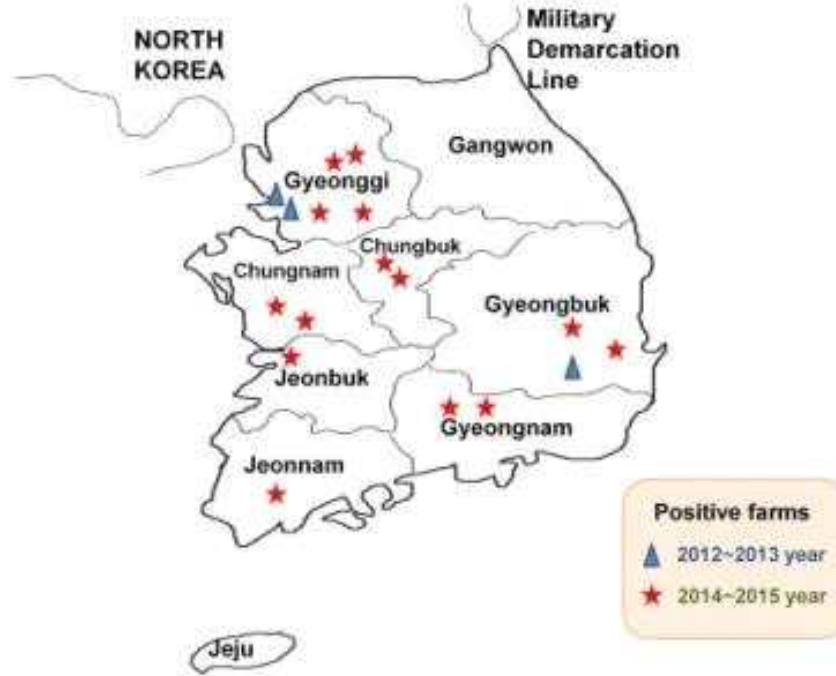


그림 1. 2012년부터 2015년 까지 한국 상업돼지농가에서의 PEDV 양성률 농가 표시

2012년 1월 부터 2013년도 12월까지의 의뢰된 양성률 분석에서는 (5/607) 0.82%의 양성률을 나타내었고, 2013년도 1월 부터 2015년도 3월까지의 양성률 분석에서는 (46/223) 20.63%의 양성률을 나타냄.

양성률 발생 농가는 주로 2012년에서 2013년에는 경기지역과 경북지역에서만 양성이 검출되었고 2014년에서 2015년에는 강원과 제주 지역을 제외한 전 지역에서 PEDV가 발생되고 있었음 (그림1).

연령별로 특이한 점은 2012~2013년도에서는 모돈 및 후보돈에서 양성률이 발생되지 않았지만, 미국의 양상과는 다르게 2014~2015년도 분석에서는 후보돈, 모돈 등의 전 연령대에서 PEDV 양성이 확인 됨 (표 1).

□ 작출된 바이러스의 세포를 이용한 바이러스의 연속계대 및 유전자 분석

위의 연구에서 얻은 국내 상업농가의 패턴별 분석한 양성샘플 30개에서 새롭게 2개의 (BM3, J3142) strains 들이 분리 됨 (표2).

Complete S 유전자의 분석결과 BM3와 J3142 모두 현재 circulation 되는 북미주에 속하였고 J3142는 미국주보다 중국주에 훨씬 가까움은 것으로 확인 됨 (그림 2).

표 2. J3142와 BM3 strains의 passage별 CPE 및 Titer 측정 결과

Isolate and parameter	Collected sample		Result								
	Farm	Province	Sample homogenate								
	Date			P1	P3	P5	P7	P8	P9	P10	
J3142	TH										
Cytopathic effect	Gyungdo		N.D.	N.D.	+	+	+	+	+	+	+
Infectious titer (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)	2013, December		N.D.	N.D.	2.0	2.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.5
BM3	BM										
Cytopathic effect	Gyungbuk		N.D.	N.D.	+	+	+	+	+	+	+
Infectious titer (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)	2014, October		N.D.	N.D.	2.0	2.5	2.5	3.5	4.0	4.0	4.0

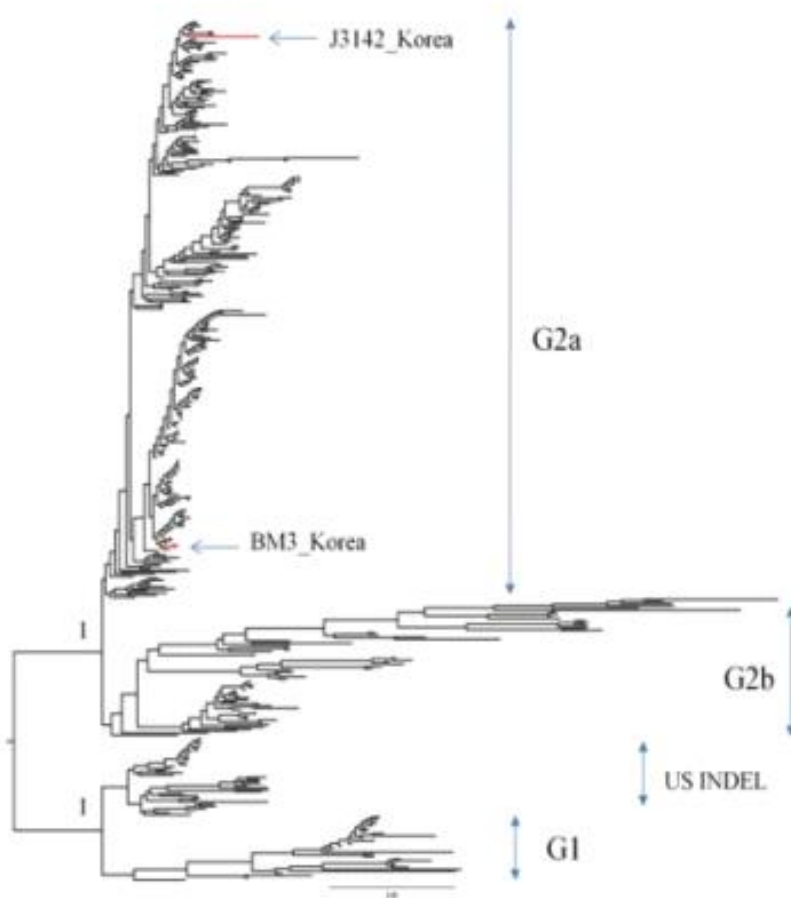


그림 2. PEDV complete S 유전자의 여러 strain과 분리된 BM3, J3142strains 과의 비교

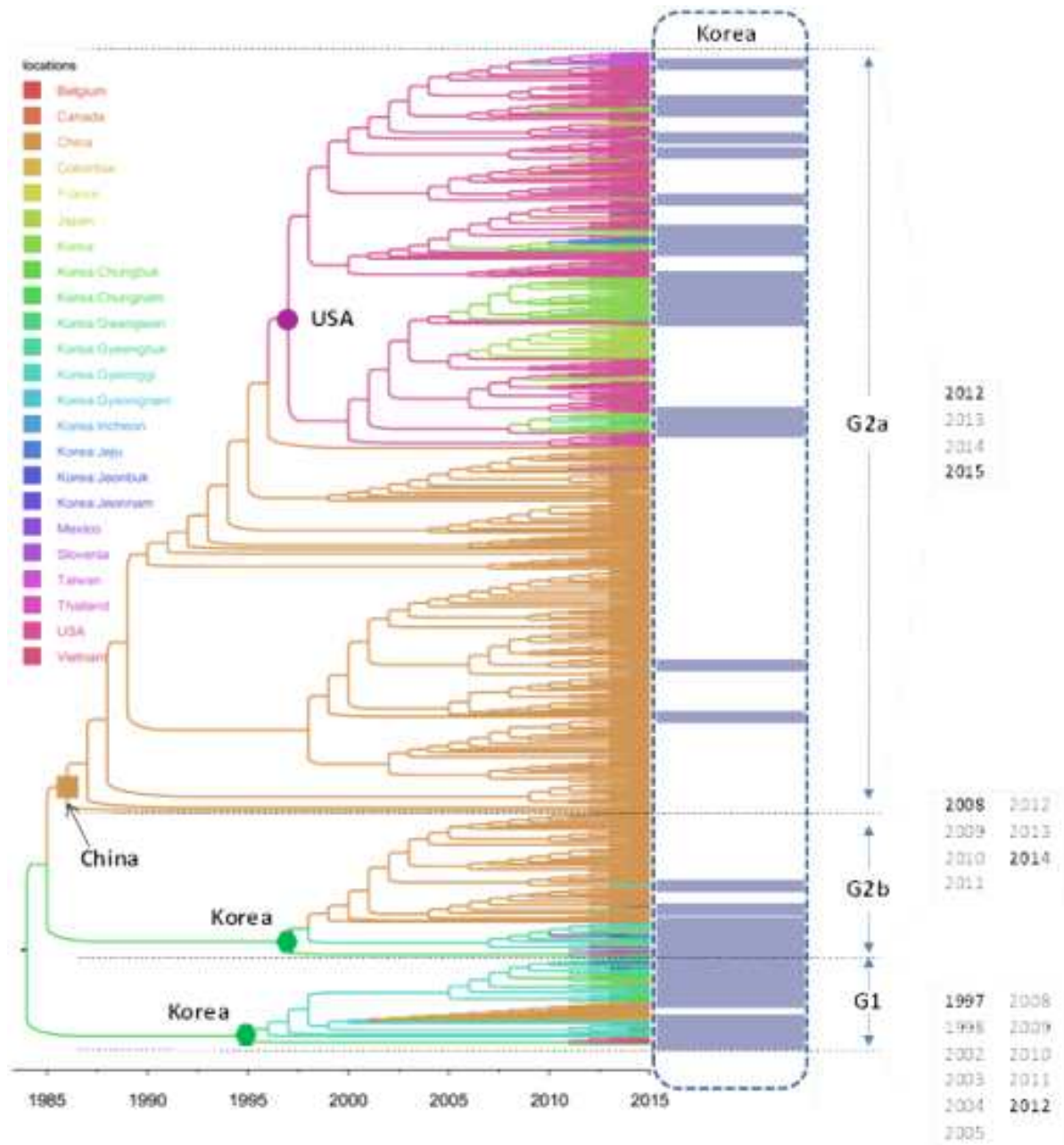


그림 3. 한국의 1997년부터 2015년까지의 PEDV 발생 패턴 분석

한국의 PEDV 발생패턴을 파악 위하여 1997년부터 2015년까지 PEDV 805개의 양성 유전자 PEDV S유전자 정보를 수집하여 발생패턴을 조사 함. 1997년부터 2012년 까지는 한국이 ancestor로 G1에서 주로 발생 하였고, 최근 발생되고 있는 2012년에서 2015년까지는 주

로 미국과 중국의 ancestor로 한국에서 널리 퍼지고 있었고, 위 연구에서 분리된 J3142는 한국에서 두 번째로 중국의 기원이 되고있는 strain이 발생 하였음 (그림3).

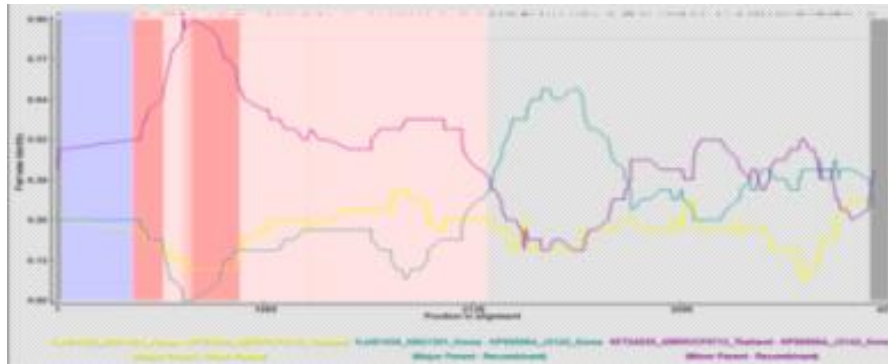


그림 4. 분리된 J3142 strain 과 PEDV complete S gene 과의 recombination 관계 분석

Recombination 분석결과 J3142 strain은 한국의 G2a 속하는 KNU1303_Korea strain (KJ451046)과 45RWVCF0712_Thailand strain (KF724935) 의 두 stains에서 recombination 구간이 발견 됨 (그림 4).

이는 한국에서도 Thailand strain과 비슷한 stain이 존재하여 서로 recombination 되었을 확률이 있었음을 증명하는 결과에 해당함.

□ 분리된 바이러스의 병원성 실험

2014년 경북지역의 BM 농장에서 분리된 BM1, BM45 strain의 각각의 passage에서 oral 접종 titer 3.0 TCID50/mL의 3번의 1주령 미만의 돼지 challenge 시험에서 접종 군 및 control 군에서 설사 및 임상증상이 발견되지 않았고 분변에서의 RT-PCR 결과 모두 음성으로 확인 됨 (표 3).

표 3. BM1, BM45 strains에서의 3회 동물실험 결과

Times	Virus strain	Oral inoculated*	Contact controls*	Aero controls*
1	BM1 35 Passage	3	2	2
2	BM1 25 Passage	3	2	2
3	BM45 50 Passage	3	2	2
RT- PCR Result (iNtron iTGE/PED Kit)		Negative	Negative	Negative

*of animals

기존의 CPE titer는 다른 바이러스가 혼재되어 순수 분리가 되지 않아 오류가 있었던 것으로 판단하였음.

새로운 가검물에서의 분리와 백신 후보주 선별이 다시 필요할 것으로 사려 되어 현재 새로운 후보주를 선별 중에 있음.

표2. 한국의 양돈농가에서의 2016년부터 1월부터 2017년 1월 까지의 PEDV 양성률 파악

2016.1.1.~ 2017.1.31	포유 자돈	30-60일	60-90일	90-120일	후보돈	모돈	Total
검사두수	154	54	16	41	154	129	412
양성두수	18	3	0	15	1	4	41
%	11.7%	5.56%	0%	36.6%	5.5%	3.1%	0.82%

□ 수집된 PEDV 양성개체의 Genotype 구분

제 1 세부과제에서 디자인된 Genotype 1,2를 구분할 수 있는 primer를 사용하여 2016년 1월부터 2017년 1월 까지의 PEDV 양성 샘플 41개체를 수집하여서 디자인된 프라이머로 진단 결과 41개체 중 G1 = 0%(0/41), G2=70.7% (29/41), Not detect= 29.3% (12/41)의 양성률을 확인함. (표 3). **본 시험에서 2016년도 서울대 수의대 바이러스학실에 PED감염으로 의심되어 의뢰된 가검물에서 검출된 PED바이러스는 100% 최근 유행주인 G2 subtype으로 확인 됨.**

표 3. PEDV의 양성샘플에서의 Genogroup 1,2의 분포

2016.1.1~2017.1.31	G-1	G-2	Not detect	Total
검사두수	41	41	41	41
양성두수	0	29	12	29
%	0	70.7%	29.3%	70.7%

□ 면역증강 물질의 어주반트 효능 평가

1차년도 경구용 면역증강제 시험에 이어 근육주사용 어주반트를 이용한 면역원성 시험을 수행하였음. 역유전학 바이러스를 이용한 PED바이러스 백신주가 작출되었을 때 기존에 사용되고 있는 어주반트가 아닌 개선된 어주반트를 이용하여 제품을 생산하기 위하여 새로운 어주반트 및 면역증강제에 대한 시험을 실시하였음.

- 현재 시판중인 PED사독백신의 어주반트 및 함량을 기준으로 새로 적용하고자 하는 어주반트 농도별, 면역증강제 농도별 면역원성 시험 진행

• 시험군의 구성

시험에 공시된 어주반트는 스쿠알렌 계열의 어주반트 A, 폴리머 계열의 어주반트 B를 사용하였음. 어주반트 시험 시 어주반트의 농도는 20%로 고정하여 시험을 진행하였음. 면역증강제의 경우 모두 재조합 단백질로 100ug과 200ug(x2)의 농도로 기존의 PED사독백신에 혼합하여 사용하였음. 모돈수 38두로 농장내 임신 모돈 접종 시험은 3회의 나누어 진행하였음.

표. 어주반트 및 면역증강제를 이용한 PED면역원성 시험

시험군	내용	공시모돈	접종 프로그램	채혈 및 초유 채취
1	어주반트 A	5	분만 5주전 / 분만 2주전	분만 직후
2	어주반트 B	5		
3	면역증강제 A	5		
4	면역증강제 A x2	5		
5	면역증강제 B	5		
6	면역증강제 B x2	5		
7	PED사독 백신	5		
8	비접종 대조군 (PBS)	3		

• 평가항목은 접종 후 안전성, 분만 후 면역원성 (혈액 및 초유 중화항체가)을 측정하였음. 안전성의 경우 접종 후 급성 접종 반응으로 식불 및 발열을 평가하였음. 또한 유사산 발생 및 분만 자돈 수로 번식성적 비교하였음.

• 안전성 평가 결과 (급성 접종 반응)

공시모돈 38두의 접종전, 접종후 2시간 체온 측정 결과 유의적인 변화가 관찰되지 않았음. 식불을 보이는 개체도 확인 되지 않았음.

표. 시험군의 접종전 접종 2시간후 평균 체온 비교

시험군	접종전	접종 2시간후
1	39.64	39.8
2	39.72	39.5
3	39.74	39.42
4	39.42	39.16
5	39.64	39.56
6	39.36	39.86
7	39.46	39.6
8	38.6	39.7

• 안전성 평가 결과 (번식성적)

전 공시 두수에서 유사산이나 조산이 발생하지 않았음. 대조군 (시험군8)과 백신군 (시험군 1~7)간 산자수의 유의적인 차이 관찰되지 않았음.

표. 시험군의 분만후 평균 산자수

시험군	평균 산자수 (두)
1	12.4
2	11.6
3	12.4
4	11.2
5	11.4
6	10.8
7	11.8
8	12.3

• 면역원성 결과 (중화항체가)

각 백신의 중화항체 검사 결과 기존 PED사독백신에 면역증강제 A를 권장 농도의 2배로 넣은 백신의 중화항체가 가장 높은 것을 확인할 수 있었음.

시험군	내용	분만시 모든 평균 중화항체가 (기하평균)	
		혈청	초유
1	어주반트 A	64	91
2	어주반트 B	51	61
3	면역증강제 A	48	160
4	면역증강제 A x2	80	256
5	면역증강제 B	61	107
6	면역증강제 B x2	56	96
7	PED사독 백신	80	59
8	비접종 대조군 (PBS)	<4	<4

- 어주반트 및 면역증강제를 포함한 PED백신 면역원성 시험 결과 어주반트 후보 A, B의 효과는 백신 대조군 (시험군7)에 비해 혈청 중화항체가에서 큰 차이를 보이지 않았으나 초유내 중화항체는 약간 높은 수치로 보였음.

백신에 면역증강제 A를 2배 용량으로 넣은 시험군 4의 혈청중화항체는 시험군 7과 유사하게 확인되었으나, 초유내 항체가에서 월등히 높은 수치를 보이는 것이 확인되었음. 면역증강제 A에 대한 추가 연구를 통해 백신 효능을 높일 수 있을 것으로 판단됨.

- 연구개발성과(등록·기탁 대상 연구개발성과에 대해 자세한 내용과 등록·기탁 번호를 기술)

10번 항목에 기술

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06
성과목표	목표 달성도 (%)	관련분야 기여도	
백신주의 증식성을 높일 수 있는 세포주 및 배양조건 확립	100%	PED바이러스 증식에 적합한 Vero cell clone을 확보하였음. 역유전학 바이러스뿐만 아니라 다른 PED바이러스 백신 생산성 향상에 기여할 것으로 기대됨	
백신의 면역원성을 증가 시킬 수 있는 아주반트 선발	80%	본 과제에서 선발된 면역증강제에 대한 추가적인 평가가 필요한 상황이지만 성공적으로 선발될 경우 피이디 백신 뿐만 아니라 다른 분야에도 기여할 것으로 판단됨	
대량 시스템 확립 및 시험 백신 생산	70%	부유배양을 통한 대량 생산 시스템을 확립하여 이후 사용하려고 하고 있음. 작출된 바이러스의 대량 배양이 지연되고 있어 시험백신 생산 준비중	
PED바이러스 역유전학 시스템 확립	100%	다양한 PEDV 바이러스 역유전학 시스템을 확립하였음.	
역유전학을 이용한 PED바이러스 작출	90%	세포적응이 완료된 PEDV의 역유전학을 이용한 작출 뿐 아니라 세포적응과정을 거치지 않은 최근 야외주 PEDV의 S1 gene을 그대로 갖는 PEDV의 작출에 성공함.	
PED리셉터 탐색	40%	야외주 PEDV S gene 발현 및 정제시험 수행, 돼지 소장상피 cDNA라이브러리 작성 등은 수행하였으나, bioassay system에 사용할 S protein의 충분한 발현 및 정제는 달성하지 못했음.	
야외 가검물의 수집 및 유전자 분석	100%	1년간 의뢰된 PED 가검물을 이용한 PEDV의 분자역학 자료 확립 완료	
분리된 PED바이러스 배양	60%	야외주 PED 분리중 다른 바이러스 혼입으로 인한 순수 분리 실패, 유전학적 특징 확보 완료	

5. 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

- 본 과제를 통하여 부유세포 배양으로의 전환을 시도하게 되었음. 비록 완전한 형태의 부유세포 배양 기술은 아니지만 microcarrier를 통해 배양할 수 있는 기반이 조성되어 차후 개선 발전 방향에 대한 연구가 가능하게 되었음.
- 본 과제를 통해 개발된 감별진단 프라이머 세트의 경우 현재 백신제조사에서 다루는 크게 두가지 종류의 PED바이러스를 효과적으로 감별할 수 있는 기술로 백신의 품질관리에 크게 기여할 것으로 보임, 좀 더 편리한 방법으로 감별할 수 있는 방법도 개발할 수 있을 것으로 판단됨.
- 최초 사용한 Targeted RNA recombination 방법을 이용한 바이러스 작출이 실패하였으며 BACs system을 이용한 바이러스 작출 시스템으로 전환하여 BACs system을 이용한 PEDV full length cDNA작출, 이를 이용하여 역유전학 PED바이러스의 back bone바이러스인 PEDV DR13바이러스를 작출해 냄. 본 시스템을 이용하여 다양한 PED바이러스를 작출해 낼 수 있는 기반 시스템 확립
- 본 시스템을 이용하여 바이러스를 작출하여 배양중인 바이러스를 증식시켜 백신주로서의 가능성 여부를 판단하여 산업화 계획
- 야외주에서 모니터링을 통하여 얻은 유전적 정보는 현재 PEDV의 발생패턴을 확인 할 수 있는 농가 정책자료로 사용될 수 있고 향후 돼지 사육농가에서의 경제적 안전성을 확보할 수 있음.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08
<p>○돼지 유행성 설사병 바이러스 (PEDV)는 코로나비리대(Coronaviridae)에 속하며, 막을 가진 단일 가닥의 RNA 바이러스이다 (Woo et al., 2012).</p>	
<p>○돼지 유행성 설사병 바이러스 (PEDV)는 1978년 유럽에서 처음 확인된 이후, 2013년도에 미국에서 그리고 다른 국가들에서도 PEDV에 의한 발병이 지속적으로 보고되어 왔으며 (Song and Park, 2012, Huang et al., 2013), 국내에서는 1992년도에 처음으로 확인되었다 (Kweon et al, 1993) .</p>	
<p>○2014년과 2015년에 걸쳐 분석 된 30개의 PEDV 양성 샘플들 중에서 두 개의 바이러스 J3142와 BM3기 새롭게 분리되었고, 이들을 분석하였다 (Chung et al, 2015; Lee and Lee, 2014).</p>	
<p>분리된 바이러스의 스파이크 (S) 유전자 전체를 유전학적으로 분석한 결과, 현재 백신주로 사용되는 바이러스들은 G1a 그룹에 속해 있는 반면, 분리된 두 바이러스들은 모두 G2a 유전 그룹으로 분류되었다 (Chung et al, 2016).</p>	
<p>○새롭게 분리된 두 바이러스들과 백신주로 사용되는 DR13과 CV777의 S 유전자 전체와 N 말단 부위의 뉴클레오타이드 비교 분석에서도 89.2%~89.5%의 낮은 유사성을 보였다 (Wang et al, 2014) .</p>	
<p>○아미노산 비교분석을 통해 BM3와 J3142 두 바이러스들의 SS6 항원결정부위의 변이도 확인하였다. J3142 바이러스의 경우 표준 참고 바이러스들과의 유전자재조합 탐지 프로그램을 통해 분석한 결과, G2a 그룹에 속하는 국내 바이러스KNU1303과 G2b 그룹에 속하는 태국 바이러스 KF724935의 유전자들이 재조합 된 가능 부위를 확인하였다 (Vlasova et al, 2014, Cima, et al, 2013).</p>	
<p>현재 PEDV 포함, TGEV, SARS-CoV, HCoV-OC43, FIPV 및 MERS-CoV 등의 coronavirus 백신개발에 다양한 역유전학방법들이 사용되어지고 있음. 1) 주로 숙주세포 특이성을 이용한 targeted RNA recombination 방법을 적용하거나 2) BAC system 또는 3) <i>in vitro</i> ligation등 3가지 방법으로 감염성 cDNA clone을 제작하고 이로부터 신규 바이러스를 작출하는 연구가 진행되고 있음. <u>첫 번째</u>로 개발된 PEDV바이러스 역유전학 기술은 <u>목표 RNA 재조합(targeted RNA recombination)방법</u>임(Li 등, 2013). 그러나, Li 등이 작출한 바이러스는 DR13백신 주를 그대로 만들어 냈을 뿐 최근 유행하는 야외주는 아님. <u>두 번째</u>는 BAC system을 이용하는 방법으로써, Jengarn 등에 의해서 세포에 적응되어 합포체 형성능이 우수한 PEDV_{AVCT12}주의 유전자를 추출하고 <u>박테리아의 인공 염색체(BAC)에 클로닝하여 감염성 있는 PEDV의 게놈 cDNA를 제작하였음</u>(Jengarn 등, 2015). 그러나,</p>	

이들이 만든 PEDV_{AVCT12}주는 S단백 말단 일부 및 ORF3가 소실되어 이미 세포배양에 적응되었던 바이러스로 최근 야외 강병원성 PEDV의 S단백과는 상이한 바이러스임. PEDV의 게놈 유전자는 크기도 28kb이상으로 매우 큰 편일뿐 아니라 NSP1등이 불안정하며 대장균등 숙주세포 내에서 매우 독성이 강해 감염성 있는 cDNA클론을 쉽게 얻을 수 없는 어려움이 있음. 마지막으로 **세 번째 방법은** 지금까지의 어려움을 개선한 방법으로 Beall등은 ***In vitro ligation* 방법**을 적용해 게놈 cDNA를 여러 조각으로 나누어 클로닝 한 후 시험관 내에서 접합하고 전사하는 방식임(Beall 등, 2016). 그러나 Beall등이 작출한 PEDV도 세포주를 통해 분리 및 배양이 성공한 소수의 PEDV중 다시 4회 추가 계대된 PC22A주를 사용하였음. 그러므로 세포배양에 적응되지 않은 야외 강병원성 PEDV의 S단백의 원형을 그대로 갖는 바이러스에 대한 역유전학 기법으로도 아직은 개발되지 않고 있음.

7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○없음		

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
○없음		

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	특허	돼지 유행성 설사 바이러스의 유전자형 분석용 프라이머 및 이의 용도	녹십자수의약품	발명자	대한민국		2017.09.06	단독사사	출원
2	논문	Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines	녹십자수의약품	공동 1저자	Clinical and Experimental Vaccine Research		2015.07.29	중복사사	비SCI
3	논문	Isolation of Porcine Epidemic Diarrhea Virus during Outbreaks in South Korea, 2013-2014	서울대 수의대	제1저자	Emerging Infectious Diseases	8.22	2015.12.01	중복사사	SCI
4	논문	New emergence pattern with variant porcine epidemic diarrhea viruses, South Korea, 2012 - 2015	서울대 수의대	제1저자	Virus Research	2.628	2016.12.01	중복사사	SCI
5	논문	Genetic characterization of s1 domain of porcine epidemic diarrhea viruses spike proteins isolated in Korea	서울대 수의대	제1저자	Journal of Immune Disorder	.	2017.09.01	중복사사	비SCI
6	학술 발표	Isolation of porcine epidemic diarrhea virus from 2014-outbreaks in south korea	서울대 수의대	제1저자	대한수의학회 춘계 학술대회		2015.04.29	중복사사	학회 포스터 발표
7	학술 발표	Virological and bacterial investigation of swine intestinal disease in South Korea, 2015-2016	서울대 수의대	참여저자	대한수의학회 춘계 학술대회		2016.04.29	단독사사	학회 포스터 발표
8	학술 발표	Genetic characterization of S1 Domain of Porcine Epidemic Diarrhea Viruses Spike Proteins Isolated in Korea	서울대 수의대	제1저자	2017년 대한수의학회 춘계 학술 심포지움		2017.04.28	단독사사	학회 포스터 발표

11. 기타사항

코드번호	D-13
○ 제 2협동- 연구수행중 2016년 2월부터 박봉균 서울대 수의대 교수의 농림축산검역본부장으로 취임되어서 서울대 수의대 박건택 교수가 제 2협동 세부 연구책임자 직책을 대신 수행함- 위 내용은 농림수산물식품부에 기승인을 받음	

12. 참고문헌

코드번호	D-14
<p>Chen J., Wang C., Shi H., Qiu H., Liu S., Chen X., Zhang Z. and Feng L., 2010. Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China. Archives of virology 155, 1471-1476.</p>	
<p>Chung, H.C., Nguyen, V.G., Moon, H.J., Lee, J.H., Park, S.J., Lee, G.E., Kim, H.K., Noh, Y.S., Lee, C.H., Goede, D., 2015. Isolation of Porcine Epidemic Diarrhea Virus during Outbreaks in South Korea, 2013 - 2014. Emerg. Infect. Dis. 21(12), 2238-2240.</p>	
<p>Cima, G., 2013. Viral disease affects US pigs: porcine epidemic diarrhea found in at least 11 states. J. Am. Vet. Med. Assoc. 243(1), 30-31.</p>	
<p>Jung, K., Wang, Q., Scheuer, K.A., Lu, Z., Zhang, Y., Saif, L.J., 2014. Pathology of US porcine epidemic diarrhea virus strain PC21A in gnotobiotic pigs. Emerg. Infect. Dis. 20(4), 662-665</p>	
<p>Lee, D.K., Cha, S.Y., Lee, C.H., 2011. The N-terminal region of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein is important for the receptor binding. J. Microbiol. Biotechnol. 39(1), 40-50.</p>	
<p>Lee, S., Lee, C., 2014. Outbreak-related porcine epidemic diarrhea virus strains similar to US strains, South Korea, 2013. Emerg.Infect.Dis. 20(7), 1223-1226.</p>	
<p>Lee D.K., Park C.K., Kim S.H. and Lee C., 2010. Heterogeneity in spike protein genes of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea. Virus Res 149, 175-182.</p>	
<p>Mole, B., 2013. Deadly pig virus slips through US borders. Nature 499(7459), 388.</p>	
<p>Park, S., Kim, S., Song, D., Park, B., 2014. Novel porcine epidemic diarrhea virus variant with large genomic deletion, South Korea. Emerg. Infect. Dis. 20(12), 2089-2092.</p>	
<p>Park S.J., Moon H.J., Yang J.S., Lee C.S., Song D.S., Kang B.K. and Park B.K. 2007a. Sequence analysis of the partial spike glycoprotein gene of porcine epidemic diarrhea</p>	

viruses isolated in Korea. *Virus Genes* 35, 321–332.

Park S.J., Song D.S., Ha G.W. and Park B.K., 2007b. Cloning and further sequence analysis of the spike gene of attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13. *Virus Genes* 35, 55–64.

Saif L.J. 1993. Coronavirus immunogens. *Vet Microbiol* 37, 285–297

Rottier P.J.M., 1995. The coronavirus membrane protein. In: Siddell S.G. (Ed.) *The Coronaviridae*. Plenum Press, New York, pp. 115–139.

Song, D., Park, B., 2012. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes* 44(2), 167–175.

Sun RQ, Cai RJ, Chen YQ, Liang PS, Chen DK, Song CX., 2012. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China. *Emerg Infect Dis* 2012;18:161–3.

Vlasova, A.N., Marthaler, D., Wang, Q., Culhane, M.R., Rossow, K.D., Rovira, A., Collins, J., Saif, L.J., 2014. Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013 - February 2014. *Emerg.Infect.Dis.* 20(10), 1620–1628.

Woo P, Lau S, Lam C, Lau C, Tsang A, Lau J, Bai R, Teng J, Tsang C and Wang M, 2012. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in Deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *J Virol*, 06540–06511.

Woo, P.C., Lau, S.K., Lam, C.S., Lau, C.C., Tsang, A.K., Lau, J.H., Bai, R., Teng, J.L., Tsang, C.C., Wang, M., 2012. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in Deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *J. Virol.* 86(7), 3995–4008.

Xuan, H., 1984. Culture of porcine epidemic diarrhea virus by using pig intestinal monolayer cell. *J. people's Liberation Army Vet. Univ.* 4:202–208 (in Chinese).

Yang, Z., 2007: PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol Biol Evol*, 24, 1586–1591.

Yang, D.K., et al. (2017) "Isolation and characterization of a new porcine epidemic diarrhea virus variant that occurred in Korea in 2014." *Journal of veterinary science*.

Chung, H. C., et al. (2016). "New emergence pattern with variant porcine epidemic diarrhea viruses, South Korea, 2012–2015." *Virus Res* 226: 14–19.

Hain, K. S., et al. (2016). "Immunogenicity of a recombinant parapoxvirus expressing the spike protein of Porcine epidemic diarrhea virus." *J Gen Virol* 97(10): 2719–2731.

Kim, H., et al. (2016). "Recent vaccine technology in industrial animals." *Clin Exp Vaccine Res* 5(1): 12–18.

Lin, C. M., et al. (2017). "Attenuation of an original US porcine epidemic diarrhea virus strain PC22A via serial cell culture passage." *Vet Microbiol* 201: 62–71.

Oh, J., et al. (2014). "Immunogenicity and protective efficacy of recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein." *Arch Virol* 159(11): 2977–2987.

Park, S. J., et al. (2008). "Cloning and further sequence analysis of the ORF3 gene of wild- and attenuated-type porcine epidemic diarrhea viruses." *Virus Genes* 36(1): 95–104.

Su, Y., et al. (2016). "Detection and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus in central China based on the ORF3 gene and the S1 gene." *Virol J* 13(1): 192.

Sun, R., et al. (2014). "Genetic variability and phylogeny of current Chinese porcine epidemic diarrhea virus strains based on spike, ORF3, and membrane genes." *ScientificWorldJournal* 2014: 208439.

Van Diep, N., et al. (2015). "US-like isolates of porcine epidemic diarrhea virus from Japanese outbreaks between 2013 and 2014." *Springerplus* 4: 756.

Yu, R., et al. (2017). "[Advances in reverse genetics to treat porcine epidemic diarrhea virus]." *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 33(2): 205-216.

Zhang, Y., et al. (2016). "Construction of a bivalent DNA vaccine co-expressing S genes of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus delivered by attenuated *Salmonella typhimurium*." *Virus Genes* 52(3): 354-364.

Li., et al. (2013) Manipulation of the porcine epidemic diarrhea virus genome using targeted RNA recombination. *PLoS One* 8 (8), e69997.

Jengarn, J., et al. (2015). "Genetic manipulation of porcine epidemic diarrhoea virus recovered from a full-length infectious cDNA clone" *J Gen Virol*, 96(8): 2206-2218.

Beall, et al. (2016). "Characterization of a Pathogenic Full-Length cDNA Clone and Transmission Model for Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strain PC22A." *MBio* 7(1) e01451-15.