

11-154
3000-0
03186-
01

기술사업화지원사업 2019년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003186-01

양돈 호흡기 질환 원인균 대응 용균 박테리오파지의
축산활용에 대한 과학적 근거 확보 및 이를 기반으로
한 최적형태의 제품 개발

최종보고서

2020.07.17.

주관연구기관 / (주)인트론바이오테크놀로지
협동연구기관 / 고신대학교
협동연구기관 / 경북대학교

최적형태의
축산활용에
대응 용균
박테리오파지
의
개발
과학적
근거
확보
및
이를
기반으로
한
최종
보고
서

2019

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “양돈 호흡기 질환 원인균 대응 용균 박테리오파지의 축산활용에 대한 과학적 근거 확보 및 이를 기반으로 한 최적형태의 제품 개발” (개발기간 : 2017. 08. 30. - 2019. 12. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 07. 08.

주관연구기관명 : (주)인트론바이오테크놀로지 (대표자) 윤성준 (인)
협동연구기관명 : 고신대학교 (대표자) 배성권 (인)
협동연구기관명 : 경북대학교 (대표자) ~~최재용~~ (인)

주관연구책임자 : 손지수
협동연구책임자 : 송정섭
협동연구책임자 : 박상준

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	817029-3	해당단계 연구기간	2017. 08. 30. ~ 2019. 12. 31.	단계구분	3차년도/ 3차년도
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	기술사업화지원사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	양돈 호흡기 질환 원인균 대응 용균 박테리오파지의 축산활 용에 대한 과학적 근거 확보 및 이를 기반으로 한 최적형태 의 제품 개발			
연구책임자	손지수	해당단계 참여연구원 수	총: 18 명 내부: 18 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 300,000 천원 민간: 100,000 천원 계: 400,000 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 18 명 내부: 18 명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 725,000 천원 민간: 242,000 천원 계: 967,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)인트론바이오테크놀로지 고신대학교 경북대학교			참여기업명: (주)인트론바이오테크놀로지	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
연구개발성과의 보안등급 및 사유	해당사항 없음				

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	Genes Genomi cs (2018) 40:1383 - 1388, Microbi ol Resour Annou nc. (2018)7: e00907- 18, Genes Genomi cs (2019) https:/ /doi.or g/10.10 07/s132 58-019- 00898-4	10-2018 -004197 5, 10-2018 -006406 2, 10-2018 -006406 4, 10-2018 -006406 5, PCT/K R2019/ 001942, PCT/K R2019/ 006558, PCT/K R2019/ 006562, PCT/K R2019/ 006566, KR10-2 041117									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

<p>요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)</p> <p>○ 양돈 산업에서 다발하고 있는 세균성 호흡기 질환에 대응할 수 있는 세균성 호흡기 질환 원인균들에 대하여 항균력을 갖는 박테리오파지들을 유효성분으로 하는 환경 친화적 항생제 대체 사료첨가제 및 자가 증식 특성을 갖는 환경정화제제의 개발/산업화</p> <p>○ 사용 유효성이 최대화될 수 있는 제품 형태 및 사양을 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 제품 효용성을 극대화 할 수 있는 농장 맞춤형 사용법을 도출 (현장적용시험) - 세균성 호흡기 질환 대응 박테리오파지들의 축산활용에 대한 과학적 근거를 확보 	<p>보고서 면수 155</p>
---	-----------------------

<요약문>

<p style="text-align: center;">연구의 목적 및 내용</p>	<p>1. 연구의 목적</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 양돈 세균성 호흡기 질환 원인균들에 대하여 항균력을 갖는 박테리오파지의 체내 분포 양상을 파악하고, 감염균의 주요 표적 기관에 효과적으로 작용할 수 있는 박테리오파지 제품 개발 (환경 친화적 항생제 대체 사료첨가제 및 자가 증식 특성을 갖는 환경정화제제) ○ 산업화에 관련하여, 1) 사용 유효성이 최대화될 수 있는 제품 형태 및 사양을 개발하고, 2) 제품 효용성을 극대화 할 수 있는 농장 맞춤형 사용법을 도출 ○ 현재의 박테리오파지 사용에 대한 과학적 EVIDENCE/PROOF가 없는 실정을 고려하여 향후 산업화에 유용하게 활용될 수 있는 세균성 호흡기 질환 대응 박테리오파지들의 축산활용에 대한 과학적 근거를 확보 <p>2. 연구개발내용</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 1차년도: 양돈 세균성 호흡기 질환 대응 박테리오파지의 과학적 근거 자료 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 형광 표지 박테리오파지를 이용한 체내 분포 양상 파악 및 증식 여부 파악을 위한 항체 제작 및 유효성 평가 - 호흡기 세균에 특이 항균력을 갖는 신규 박테리오파지의 확보 - 돼지 호흡기 상피세포주 (Primary Swine Bronchial Epithelial Cells) 개발 - 호흡기 질환 유발 병원성 세균의 특성 규명 - 호흡기 세균의 질병단계에 따른 병인기전/면역학적 특성 규명 - 마우스 모델을 대상으로 투여횟수/투여량에 따른 박테리오파지 체내 분포 양상 파악, 정량적 분석 및 안전성 조사 ○ 2차년도: 양돈 세균성 호흡기 질환에 적합한 박테리오파지의 제형 개발/특성화, 분자생물학적 기전 규명 및 목적 동물에서의 안전성 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 제형별 박테리오파지 시료 제조 및 효능 평가 - 박테리오파지의 체내 전달 효율 개선 연구 - 신규 박테리오파지의 특성화 및 증식/정제 공정 확립 - 호흡기 세균의 동물세포 감염과 관련된 병증 유발 인자 동정 - 동물세포에 호흡기 세균 감염 유도 후 농도별 박테리오파지 처치에 의한 사이토카인 변화 파악 - 동물세포에 호흡기 세균 감염 유도 후 박테리오파지 처치에 따른 세균 유전자 발현 양상 조사 - 폐지를 대상으로 투여횟수/투여량에 따른 박테리오파지의 체내 분포 양상 파악, 정량적 분석 및 안전성 조사 ○ 3차년도: 양돈 세균성 호흡기 질환 대응 박테리오파지의 시제품 도출 및 농장 시험을 통한 효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 호흡기 질환 대응 박테리오파지 시제품의 제조법 확립 및 시제품 생산 - 동물세포, 세균, 박테리오파지 간의 총체적 네트워크 구축 및 유용 마커 유전자 발굴 - 호흡기 질환 유행 농장에 박테리오파지 제제의 적용 및 효능 평가 				
<p style="text-align: center;">연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 양돈 산업에서 다발하고 있는 세균성 호흡기 질환에 대응할 수 있는 세균성 호흡기 질환 원인균들에 대하여 항균력을 갖는 박테리오파지들을 유효성분으로 하는 환경 친화적 항생제 대체 사료첨가제 및 자가 증식 특성을 갖는 환경정화제제의 개발/산업화 ○ 사용 유효성이 최대화될 수 있는 제품 형태 및 사양을 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 제품 효용성을 극대화 할 수 있는 농장 맞춤형 사용법을 도출 (현장적용시험) - 세균성 호흡기 질환 대응 박테리오파지들의 축산활용에 대한 과학적 근거를 확보 				
<p style="text-align: center;">연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 박테리오파지의 축산분야에서의 항생제 대체제로의 활용에 관련한 과학적 근거 확보 (EVIDENCE/PROOF) ○ 최근 여러 산업 분야에서 크게 주목을 받고 있는 박테리오파지라는 새로운 유용 생물소재에 대한 축산분야 활용 역량 제고 ○ 최근 문제가 되고 있는 항생제 내성균에 대한 축산분야의 대응 역량 제고 ○ 항생제 내성과 더불어 최근 심각한 이슈가 되고 있는 “antibiotic tolerance” 와 관련된 biofilm에 대한 축산분야의 대응 역량 제고 ○ 농장의 질병 발생 및 피해 감소를 통한 양돈산업 경쟁력 강화 ○ 박테리오파지 활용을 통한 새로운 산업 분야 성장 견인 ○ 수입 대체 및 수출 효과 ○ 다양한 타 산업분야로의 박테리오파지 기술 확장에 기여 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	박테리오파지	돼지	호흡기 질병	항생제 대체제	효능 및 안전성 평가
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	Bacteriophage	Swine	Respiratory diseases	Alternatives to antibiotics	Efficacy and Safety evaluation

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

제 1장. 연구개발과제의 개요	6
제 1절. 연구개발 목적	6
제 2절. 연구개발의 필요성	6
제 3절. 연구개발의 범위	6
제 2장. 연구수행 내용 및 결과	8
제 1절. 양돈 세균성 호흡기 질환 대응 박테리오파지의 과학적 근거 자료 확보 (1차년도)	8
제 2절. 양돈 세균성 호흡기 질환에 적합한 박테리오파지의 제형 개발/특성화, 분자생물학적 기전 규명 및 목적 동물에서의 안전성 조사 (2차년도)	36
제 3절. 양돈 세균성 호흡기 질환 대응 박테리오파지의 시제품 도출 및 농장 시험을 통한 효능 평가 (3차년도)	79
제 4절. 연구개발성과	141
제 3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	146
제 1절. 목표	146
제 2절. 목표 달성여부	147
제 3절. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)	148
제 4장. 연구결과의 활용 계획 등	149
제 1절. 연구개발 활용 방안	149
제 2절. 연구개발 및 사업화 추진	149
붙임. 참고 문헌	151

<본문작성 양식>

제 1장. 연구개발과제의 개요

제 1절. 연구개발 목적

- 양돈 세균성 호흡기 질환 원인균들에 대하여 항균력을 갖는 박테리오파지의 체내 분포 양상을 파악하고, 감염균의 주요 표적 기관에 효과적으로 작용할 수 있는 박테리오파지 제품 개발 (환경 친화적 항생제 대체 사료첨가제 및 자가 증식 특성을 갖는 환경정화제)
- 산업화에 관련하여, 1) 사용 유효성이 최대화될 수 있는 제품 형태 및 사양을 개발하고, 2) 제품 효용성을 극대화 할 수 있는 농장 맞춤형 사용법을 도출
- 현재의 박테리오파지 사용에 대한 과학적 EVIDENCE/PROOF가 없는 실정을 고려하여 향후 산업화에 유용하게 활용될 수 있는 세균성 호흡기 질환 대응 박테리오파지들의 축산활용에 대한 과학적 근거를 확보

제 2절. 연구개발의 필요성

- 본 연구개발은 아래의 사항들을 구체화하고자 하였음.
- 박테리오파지의 축산분야에서의 항생제 대체제로의 활용에 관련한 과학적 근거 확보 (EVIDENCE/PROOF)
 - 최근 여러 산업 분야에서 크게 주목을 받고 있는 박테리오파지라는 새로운 유용 생물소재에 대한 축산분야 활용 역량 제고
 - 최근 문제가 되고 있는 항생제 내성균에 대한 축산분야의 대응 역량 제고
 - 항생제 내성과 더불어 최근 심각한 이슈가 되고 있는 “antibiotic tolerance” 와 관련된 biofilm에 대한 축산분야의 대응 역량 제고
 - 농장의 질병 발생 및 피해 감소를 통한 양돈산업 경쟁력 강화
 - 박테리오파지 활용을 통한 새로운 산업 분야 성장 견인
 - 수입 대체 및 수출 효과
 - 다양한 타 산업분야로의 박테리오파지 기술 확장에 기여

제 3절. 연구개발 범위

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
제형별 박테리오파지 시료 제조 및 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 고상, 액상 제형의 박테리오파지 시료를 제조하여, 안정성 조사 실시 - 유효성 및 안전성 평가용 박테리오파지 시료 제조 	<ul style="list-style-type: none"> - 장기 안정성 조사 시험을 통해 박테리오파지의 적합 제형 개발 완료 - 동물 세포 시험용 박테리오파지 시료를 제조하여 제1협동기관에 공급 - 동물 시험 (마우스, 돼지)용 박테리오파지 시료를 제조하여 제2협동기관에 공급
박테리오파지의 체내 전달 효율 개선 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 형광 표지 박테리오파지 시료의 제조 - 박테리오파지 검출용 항체 제작 - 형광 표지 박테리오파지 및 박테리오파지 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>in vivo</i> imaging system을 이용한 마우스 모델에서 박테리오파지의 체내 분포 양상을 확인

	<p>항체를 이용한 마우스 대상 체내 전달을 조사</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 타겟 조직에서의 박테리오파지 정량 및 정성 평가 - 박테리오파지 항체를 이용한 타겟 조직에서의 정량 평가 (제2협동기관 공동 수행)
<p>신규 박테리오파지의 특성화 및 증식/정제 공정 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 확보 박테리오파지의 증식/정제 공정 개발 - 환경시료로부터 호흡기 세균에 항균력을 갖는 신규 박테리오파지 스크리닝 (추가 수행 연구) 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Streptococcus suis</i> 대응 박테리오파지의 증식 공정 개발 완료 - <i>Streptococcus suis</i> 대응 박테리오파지의 정제 공정 개발 완료 - <i>Pasteurella multocida</i>에 항균력을 갖는 신규 박테리오파지 확보
<p>호흡기 세균의 동물세포 감염과 관련된 병증 유발 인자 동정</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 특이적 병원균의 신호전달체계를 조절하는 세포 내 단백질 분석 - 기존의 사이토카인의 작용기전보다는 병원균에 의한 점액 과발현 신호전달체계를 촉진/억제하는 단백질이 작용할 것으로 사료됨 - 규명된 단백질이 세포 내 신호 전달이 조절되는지 규명 	<ul style="list-style-type: none"> - 두 가지의 돼지 호흡기 감염균을 정상 호흡기 세포 및 cell line에 처리했을 때의 분비되는 cytokine 변화 규명 - 증가되는 cytokine을 real-time PCR로 그 증감을 관찰하였음. - 변화되는 돼지 점액 유전자의 규명 및 유전자 발현 변화 규명
<p>동물세포에 호흡기 세균 감염 유도 후 농도별 박테리오파지 처치에 의한 사이토카인 변화 파악</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 호흡기 세균을 돼지 호흡기 세포에 처치한 후, 박테리오파지를 농도별로 처리 후 cytokine array를 실시 - 상기 두 결과를 비교하여 증감하는 cytokine을 규명/profiling - 확인된 cytokine을 좀 더 세밀하고 정량/정성적으로 확인하기 위해 ELISA 및 western blot을 실시하여 비교 확인 	<ul style="list-style-type: none"> - 박테리아를 처리 후 세포 내 독성 실험을 통하여 세포의 독성에는 영향을 주지 않음을 관찰 - <i>B. bronchiseptica</i>에 특이적 파지를 처리 후 세포 독성 실험 및 증가된 cytokine 및 Mucl의 유전자 발현 변화를 real-time PCR을 이용하여 규명
<p>동물세포에 호흡기 세균 감염 유도 후 박테리오파지 처치에 따른 세균 유전자 발현 양상 조사</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 호흡기 세균을 돼지 호흡기 세포에 처치한 후, 박테리오파지를 농도별로 처리 후 cytokine array를 실시 - 상기 두 결과를 비교하여 증감하는 cytokine을 규명/profiling - 확인된 cytokine을 좀 더 세밀하고 정량/정성적으로 확인하기 위해 ELISA 및 western blot을 실시하여 비교 확인 	<ul style="list-style-type: none"> - 특이적 병원균의 정상 호흡기 세포 및 cell-line 세포에 처치 후 융합 막 단백질의 변화를 RT-PCR로 관찰하였으나, 특이적으로 변화는 융합 막 단백질의 규명하지 못했음. 이는 융합 막 단백질의 변화에 의한 현상이 아니고 특이적 병원균에 의한 cytokine의 변화에 의해 일어나는 현상임을 규명함.
<p>돼지를 대상으로 투여횟수/투여량에 따른 박테리오파지의 체내 분포 양상 파악, 정량적 분석 및 안전성 조사</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 마우스 대상 체내 분포 양상 조사 및 장기 독성 평가 - 이유자돈 대상 독성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 형광 표지 박테리오파지의 마우스 체내 분포 양상 확인 (정량분석 및 IHC 분석) - 이유자돈 대상 박테리오파지의 독성 평가 실시를 통해 안전성 자료 확보

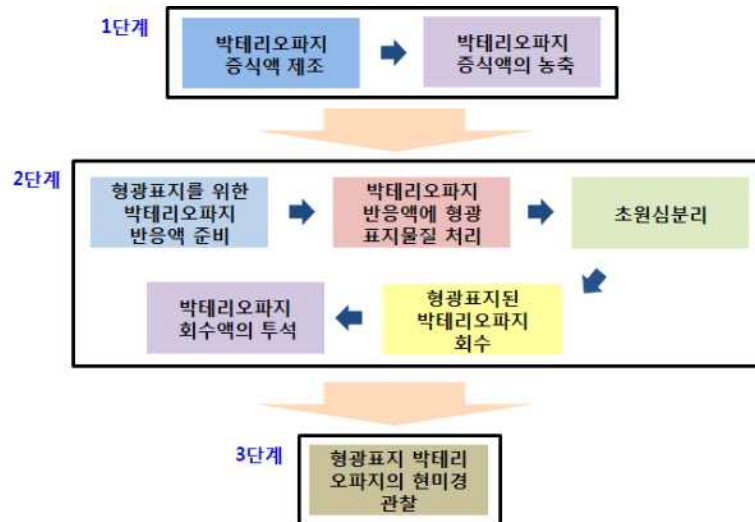
제 2장. 연구수행 내용 및 결과

제 1절. 양돈 세균성 호흡기 질환 대응 박테리오파지의 과학적 근거 자료 확보 (1차년도)

<주관연구기관>

1. 형광 표지 박테리오파지 시료 제작

- 박테리오파지의 동물 체내에서의 분포 양상을 파악하기에 앞서, 박테리오파지에 형광 표지 기술을 적용하여 형광 표지된 박테리오파지의 역가 및 형광 표지 효율을 조사하는 것이 필요함. 대상이 되는 박테리오파지는 *Bordetella bronchiseptica*에 항균력을 갖는 Bor-BRP-1과 *Pasteurella multocida*에 항균력을 갖는 Pas-MUP-1이며, 형광 표지 박테리오파지 시료는 아래 그림과 같이 단계별로 시험을 실시하여 확보할 수 있었음.



형광 표지 박테리오파지 시료 준비 과정

- 1단계 시험에서 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1의 증식액 및 농축액을 3회 반복 제조하였고, 이렇게 얻어진 박테리오파지 증식액 및 농축액은 top agar assay를 통해 titer를 측정 한 결과의 평균치는 아래와 같았음.

박테리오파지 증식액의 농축 결과

박테리오파지	박테리오파지 titer (pfu/ml)	
	증식액	농축액
Bor-BRP-1	2.4×10^9	1.3×10^{11}
Pas-MUP-1	1.1×10^9	1.2×10^{11}

- 2단계 시험인 형광 표지를 위한 박테리오파지 반응액 준비부터 박테리오파지 회수액의 투석까지는 아래와 같은 방법으로 실시되었음.

<형광 용액 준비>

- ① FITC isotype I (Sigma Cat. No., F7250)를 0.1M Na₂HPO₄ (pH 9.0)버퍼로 0.2 mg/ml 수준으로 잘 녹임.
- ② 원심분리 후 상등액을 amber e-tube에 넣은 후 냉장 보관

<박테리오파지 반응액 준비>

- ① PEG 농축액 1 ml에 1M KCl을 처리한 후 4°C에서 30분간 방치
- ② 원심분리 (13,000 rpm, 30 min, 4°C)한 후 상등액을 회수
- ③ e-tube에 소형 magnetic stir를 넣고 ②의 상등액 400 μ l 넣고 0.2M Na₂HPO₄ (pH 9.0) 100 μ l를 dropwise로 첨가

<박테리오파지 반응액에 형광 용액 처리 및 형광 표지 박테리오파지 시료의 확보>

- ① 교반 중인 박테리오파지 반응액 500 μ l에 FITC 200 μ l를 dropwise로 첨가
- ② FITC 첨가 후 25°C에서 1시간 반응
- ③ 20~70% CsCl density gradient (20, 30, 50, 70%) 형성
- ④ 박테리오파지 반응액을 ultracentrifuge tube에 loading한 후 초원심분리 (150,000 \times g, 20°C, overnight) 실시
- ⑤ 초원심분리 후 ultracentrifuge tube 내 형광 밴드를 회수한 후 EB buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0)를 이용해 7,000 MWCO dialysis tube로 투석 후 박테리오파지 용액 회수

- 2단계 시험을 통해 확보한 형광 표지 박테리오파지 액의 titer 측정은 top agar assay로 조사하였으며, 3회 실시한 결과의 평균치는 아래와 같음.

형광 표지 박테리오파지의 titer 측정 결과

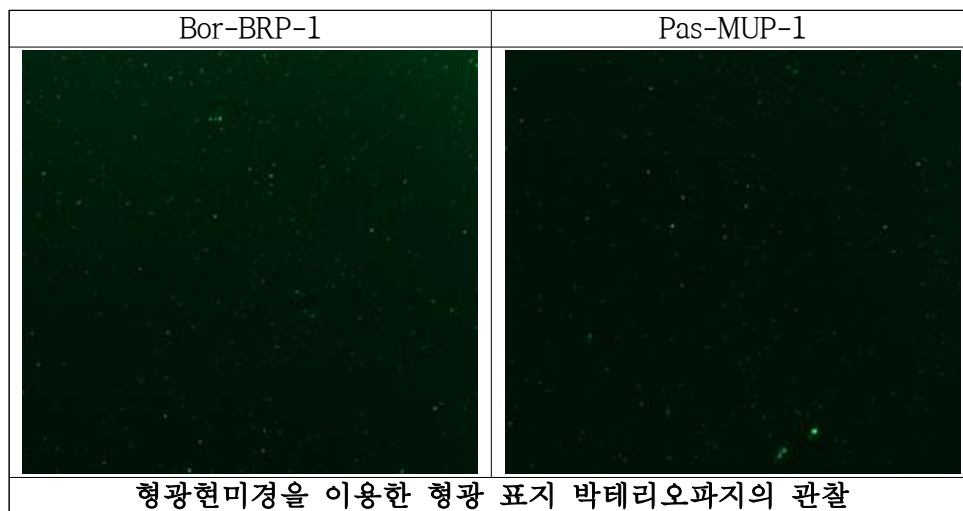
박테리오파지	박테리오파지 titer (pfu/ml)
Bor-BRP-1	1.1×10^{10}
Pas-MUP-1	8.5×10^9

- 본 시험을 통해 두 박테리오파지의 형광 표지 효율은 약 70~84% 수준이었으며, 추후 동물 시험용으로 충분히 활용될 수 있는 수준이라고 할 수 있음.

- 3단계 시험인 형광 표지 박테리오파지의 현미경 관찰은 2단계 시험을 통해 준비된 형광 표지 박테리오파지 액을 아래 제시한 방법과 같이 전처리하여 형광현미경(fluorescent microscopy)을 이용해 관찰하였음.

- ① 형광표지 박테리오파지 액을 슬라이드 글라스(MARIENFELD, Cat. No. 27-00175-01)에 10 μ l 점적
- ② 30분간 상온 건조
- ③ 커버 슬라이드(MARIENFELD, Cat. No. 27-00026-01)를 건조된 박테리오파지 부분에 올려 놓음
- ④ 형광현미경(Carl Zeiss, Axio Observer.Z1) 관찰

- 상기 방법에 따라 준비한 형광 표지 박테리오파지 시료를 형광현미경으로 관찰한 결과 fluorescent spot을 확인할 수 있었음. 대표 결과 사진을 제시하면 아래와 같음.



- 형광 표지 기술을 이용하여 준비된 형광 표지 박테리오파지 시료는 제2협동연구기관인 경북대학교와 공동으로 마우스 모델을 대상으로 투여 방식(경구, 비강)에 따라 처치한 후 면역조직화학법(immunohistochemistry) 및 생체 내 영상기법(*in vivo* imaging)을 이용해 체내 분포 양상 파악 시험을 2차년도에 수행함.

2. 마우스 시험용 박테리오파지 시료의 제조

가. 박테리오파지 증식액 제조

- 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1의 증식액의 제조는 하기에 제시한 조건에 따라 제조되었으며, 얻어진 증식액의 titer는 과제 수행에 있어 충분한 수준이라 할 수 있음.

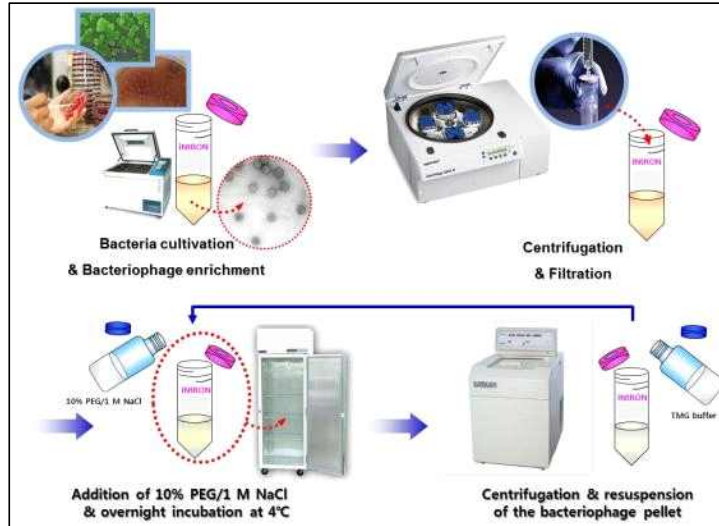
박테리오파지 증식 공정 개발 결과

박테리오파지	최종 박테리오파지 titer (pfu/ml)	주요 공정 변수			
		Bor-BRP-1	2.2×10^9	증식온도 (°C)	37
적합 host OD ₆₀₀	1.5			MOI	0.1
증식시간 (hr)	4			배양방식	Shaking
Salts	-				
Pas-MUP-1	1.2×10^9	증식온도 (°C)	37	적합배지	TSB
		적합 host OD ₆₀₀	1.0	MOI	1
		증식시간 (hr)	6	배양방식	Shaking
		Salts	MgCl ₂ 10 mM		

나. 박테리오파지 정제공정 구축 및 정제액 제조

- 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1을 대상으로 동물 시험에 적합한 순도를 갖는 박테리오파지 정제공정 구축을 위해 본 연구에서는 polyethylene glycol (PEG) 침전에 기반한 정제공정과 ion exchange chromatography에 기반한 정제공정을 개발하였음.

- PEG 침전법에 기반한 정제공정은 비교적 높은 순도가 요구되지 않는 박테리오파지 제조에 적합하고, chromatography 기반의 정제공정은 보다 고순도의 박테리오파지 제조에 적합함. 개발한 PEG 침전법은 다음의 그림과 같이 요약 제시할 수 있으며, 이는 기본적인 공정을 나타내고 있다고 할 수 있으며 세부 조건은 개별 박테리오파지별로 조금씩 달라짐. 이 PEG 침전에 기반한 정제법을 통해 얻어진 정제된 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1의 titer는 모두 1×10^9 pfu/ml 수준 (순도: 80% 이상) 이상이었음.



박테리오파지의 PEG 침전에 기반한 정제 공정 개략도

1	원심분리	박테리오파지 배양액을 20분간 8,000 rpm 조건에서 원심분리 하여 상층액 회수
2	Filtration	상층액을 0.45µm로 filtration
3	PEG 첨가	Filtrate에 1/6 부피만큼의 20% PEG 8000/2.5M NaCl 용액 첨가
4	침전	4°C에서 overnight 동안 침전하여 박테리오파지 침전
5	원심분리	박테리오파지 침전액을 20분간 8,000 rpm 조건으로 원심분리 하여 박테리오파지 펠렛 확보
6	PEG 첨가	상층액 제거 후 박테리오파지 펠렛을 Tris buffer로 풀 후, 3번 과정과 동일 방식으로 PEG 첨가
7	침전	4°C에서 1 시간 동안 침전하여 박테리오파지 침전
8	원심분리	박테리오파지 배양액을 10분간 14,000 rpm 조건으로 원심분리
9	회수	상층액 제거 후 박테리오파지 펠렛을 적절한 부피의 Tris buffer에 풀어서 박테리오파지액 확보

박테리오파지의 PEG 침전에 기반한 정제 공정

- Chromatography 기반의 정제 공정은 향후 동물용 의약품 등의 제제로의 개발도 고려하여 개발하였음. Column으로는 CIM[®] QA-8f tube monolithic column을 사용하여 수행하였으며, 각 세부 조건은 개별 박테리오파지마다 조금씩 다르나 (binding 조건, washing 조건, elution 조건) 큰 틀에서는 유사한 공정을 적용하였음. 결과적으로 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1는 90% 이상의 순도로 정제가 되었음. 정제공정 구축에 관련된 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1의 정제공정 조건을 하기에 제시하였음.

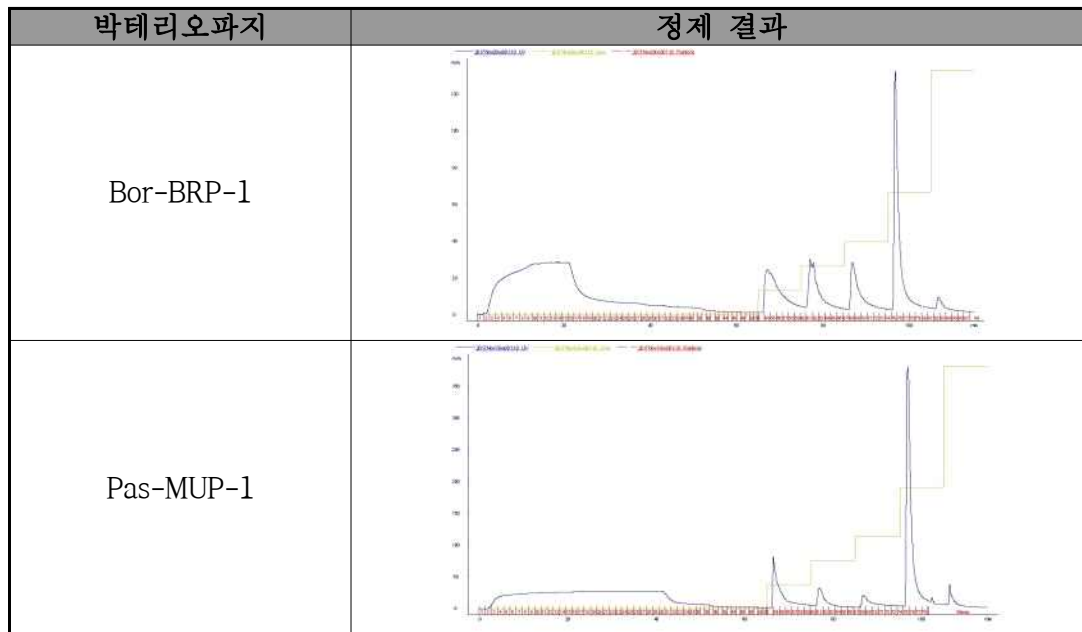
박테리오파지 Bor-BRP-1의 정제과정 조건

정제 과정		Chromatography 조건		
No.	수행 내용	필요한 시료 및 agent	수행 목적	시료의 양
1	박테리오파지 증식액의 여과액 500 ml에 equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0) 500 ml을 첨가한 후 5분 정도 방치	Sample	Sampling loading	1,000 ml
		Equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0)	Equilibration	400 ml
2	CIM [®] QA-8f tube monolithic column을 이용하여 정제를 실시	Equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl , pH 8.0)	Unbound washing	400 ml
		Elution buffer (50 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl , pH 8.0)	Elution	200 ml

박테리오파지 Pas-MUP-1의 정제과정 조건

정제 과정		Chromatography 조건		
No.	수행 내용	필요한 시료 및 agent	수행 목적	시료의 양
1	박테리오파지 증식액의 여과액 1,000 ml에 equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0) 500 ml을 첨가한 후 5분 정도 방치	Sample	Sampling loading	1,500 ml
		Equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0)	Equilibration	400 ml
2	CIM [®] QA-8f tube monolithic column을 이용하여 정제를 실시	Equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl , pH 8.0)	Unbound washing	400 ml
		Elution buffer (50 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl , pH 8.0)	Elution	200 ml

- 금번 연구 개발을 통하여 설정된 chromatography 조건을 바탕으로 박테리오파지 정제를 실시한 결과 대부분의 박테리오파지가 column에 흡착되어 있다가 NaCl gradient를 줌으로써 용출됨을 확인하였음. 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1의 정제 결과를 제시하면 다음의 그림과 같음.



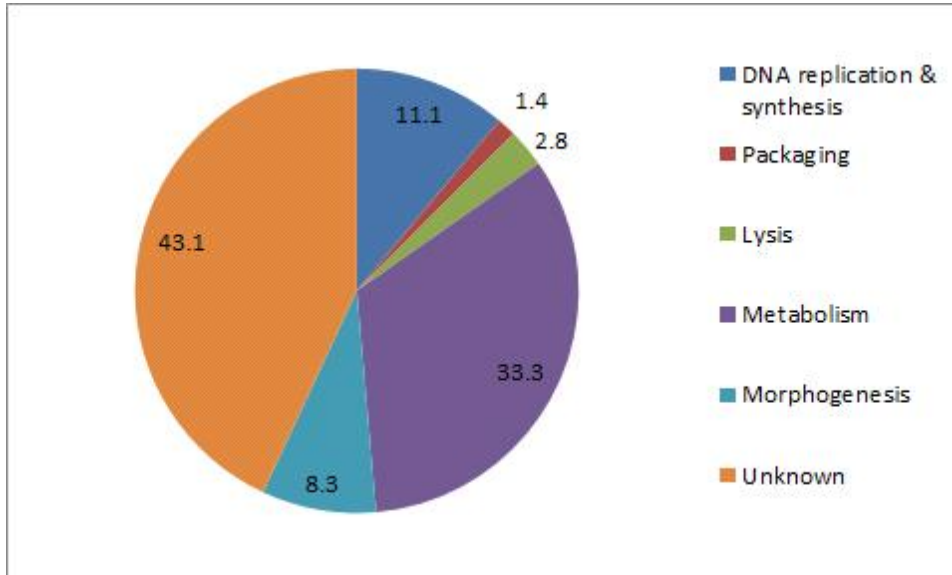
- 박테리오파지 정제 공정을 통하여 최종 박테리오파지 액을 제조하였으며, 최종 박테리오파지 액에서의 박테리오파지 titer는 1×10^{10} pfu/ml 수준 이상이었음. 이는 박테리오파지 증식액에서의 박테리오파지 titer 보다 높은 수준으로 정제과정에서 일정 수준의 농축 효과가 있었기에 가능하였다고 판단됨. 제조된 박테리오파지 정제액은 2협동기관에 제공하였고, 2협동기관에서는 박테리오파지 시료를 이용하여 마우스를 대상으로 투여횟수 및 투여량에 따른 박테리오파지의 안정성 시험을 수행함.

3. 박테리오파지의 유전체 분석 및 항체 제작용 후보 항원 유전자 선정, 클로닝

가. 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1의 유전체 분석

- 박테리오파지 특이 항체 제작을 위해, 박테리오파지 유전체 상에서 항원 단백질로 활용될 수 있는 유전자 군의 확보가 필수적임. 이를 위해 박테리오파지 Bor-BRP-1 및 Pas-MUP-1의 유전체 서열 정보를 바탕으로 Glimmer 및 NCBI BLAST 프로그램을 이용해 개방형해독틀(open reading frame, 이하 ORF)과 유전자들의 기능을 분석하였음.
- 박테리오파지 Bor-BRP-1의 유전체 내 개별 유전자들은 기능별로 구분하였을 때, 6개의 그룹으로 구분할 수 있었음. 전체 유전자에서 기능별 유전자 군이 차지하고 있는 비율(%)을 나타내면 아래 그림과 같음.

박테리오파지 Bor-BRP-1의 유전체 내 유전자들의 기능별 구분



- 박테리오파지 Bor-BRP-1의 유전체는 49,601 bp의 크기를 가지며, G+C content는 45.75%인 것으로 확인되었음. 유전체 상에는 72개의 ORF로 구성되어 있는 것으로 예측되었음. 박테리오파지 Bor-BRP-1의 유전체 상의 ORF 위치와 방향 및 function 등의 상세 정보를 제시하면 아래와 같음.

박테리오파지 Bor-BRP-1의 유전체 분석 결과

No. of ORFs	Start	Stop	Size (bp)	Strand	Function [Organism*]
1	469	672	204	+	Hypothetical protein
2	677	895	219	+	Sterol uptake control protein
3	1077	1274	198	+	Hypothetical protein
4	1380	2150	771	+	Hypothetical protein
5	2237	2446	210	+	Non-ribosomal peptide synthetase
6	2443	2814	372	+	Hypothetical protein
7	2960	3298	339	+	Protein ARG5,6, mitochondrial
8	3332	3460	129	+	Hypothetical protein
9	3478	3873	396	+	Hypothetical protein
10	3873	4394	522	+	Hypothetical protein
11	4369	4926	558	+	Hypothetical protein
12	4907	5107	201	+	Hypothetical protein
13	5117	5602	486	+	Hypothetical protein
14	5612	5980	369	+	D-tagatose-bisphosphate aldolase, class II
15	5986	6693	708	+	gamma-glutamyl-gamma-aminobutyrate hydrolase
16	6680	7357	678	+	ParA family protein
17	7366	8133	768	+	Carboxylate-amine ligase
18	8130	8786	657	+	Ankyrin repeat domain-containing protein
19	8776	9666	891	+	Amidoligase
20	9684	11120	1437	+	L-glutamine-D-fructose-6-phosphate aminotransferase [Pseudomonas phage PhiCHU]
21	11089	11802	714	+	ATP-grasp protein [Salinivibrio phage CW02]
22	11808	12182	375	+	Glycine cleavage system protein H
23	12230	12448	219	+	Hydroxyacid dehydrogenase
24	12399	12743	345	+	Kanadaptin-like
25	12754	13482	729	+	DNA primase [uncultured Mediterranean phage uvMED]
26	13614	13835	222	+	Hypothetical protein
27	13851	13973	123	+	Hypothetical protein
28	14190	16244	2055	+	DNA helicase DnaB-like protein [Rhizobium phage RHEph02]
29	16244	16429	186	+	Hypothetical protein
30	16413	16622	210	+	Hypothetical protein
31	16582	17754	1173	+	DNA polymerase [Vibrio phage ICP2_2011_A]
32	17756	17959	204	+	Hypothetical protein

Bor-BRP-1 박테리오파지의 유전체 분석 결과 (계속)

No. of ORFs	Start	Stop	Size (bp)	Strand	Function [Organism*]
33	17943	18677	735	+	DNA polymerase
34	18893	19447	555	+	Hypothetical protein
35	19598	19756	159	+	Structural protein [Escherichia phage 121Q]
36	19787	19951	165	+	Hypothetical protein
37	19948	20679	732	+	Exonuclease [uncultured Mediterranean phage uvMED]
38	20790	21023	234	+	Endodeoxyribonuclease
39	21013	21222	210	+	Radical SAM protein
40	21222	22766	1545	+	Metallo-dependent phosphoesterase [Acinetobacter phage Petty]
41	22759	23163	405	+	Phage related protein
42	23165	23737	573	+	Metal-dependent phosphohydrolase
43	23756	23923	168	+	Kelch-like protein
44	23916	24101	186	+	Hypothetical protein
45	24101	25864	1764	+	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha
46	25855	26829	975	+	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta
47	26841	27002	162	+	Hypothetical protein
48	27005	27199	195	+	Hypothetical protein
49	27615	27196	420	-	Lysozyme
50	31261	27602	3660	-	Pyroglutamyl-peptidase
51	32313	31261	1053	-	Hypothetical protein
52	33662	32313	1350	-	Hypothetical protein [Synechococcus phage S-SM1]
53	34117	33665	453	-	Acetyltransferase [Escherichia phage K AB-2017]
54	36125	34701	1425	-	Stabilization protein [EBPR podovirus]
55	36874	36125	750	-	HD domin-containing protein
56	37098	36871	228	-	Glycosyltransferase
57	37529	37098	432	-	DUF3154 domain containing protein [uncultured Mediterranean phage uvMED]
58	38425	37565	861	-	Hypothetical protein
59	39486	38434	1053	-	Tail fiber protein [Burkholderia virus DC1]
60	39934	39488	447	-	Phage-related tail fiber protein [uncultured Mediterranean phage uvMED]
61	40539	39934	606	-	Hypothetical protein
62	40803	40543	261	-	Hypothetical protein
63	41244	40822	423	-	lytic transglycosylase
64	42208	41294	915	-	Phage head protein [uncultured virus]

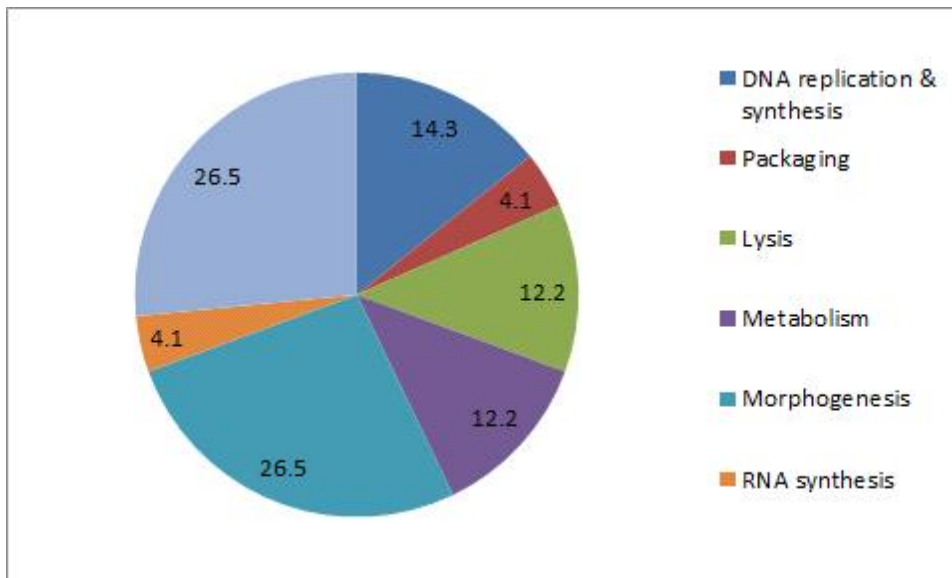
Bor-BRP-1 박테리오파지의 유전체 분석 결과 (계속)

No. of ORFs	Start	Stop	Size (bp)	Strand	Function [Organism*]
65	42797	42225	573	-	Hypothetical protein
66	43262	42846	417	-	Hypothetical protein
67	44067	43273	795	-	Fokhead-associated domain-containing protein
68	44396	44070	327	-	Co-chaperonin GroES [uncultured virus]
69	44509	44396	114	-	Hypothetical protein
70	46746	44554	2193	-	Hypothetical protein
71	48294	46750	1545	-	Phage protein
72	49161	48466	696	-	Hypothetical protein

* 박테리오파지/바이러스 유래인 것만 표기

- 박테리오파지 Pas-MUP-1의 유전체 내 개별 유전자들은 기능별로 구분하였을 때, 6개의 그룹으로 구분할 수 있었음. 전체 유전자에서 기능별 유전자 군이 차지하고 있는 비율 (%)을 나타내면 아래 그림과 같음.

박테리오파지 Pas-MUP-1의 유전체 내 유전자들의 기능별 구분



- 박테리오파지 Pas-MUP-1의 유전체는 39,497 bp의 크기를 가지며, G+C content는 40.59%인 것으로 확인되었음. 유전체 상에는 49개의 ORF로 구성되어 있는 것으로 예측되었음. 박테리오파지 Pas-MUP-1의 유전체 상의 ORF 위치와 방향 및 function 등의 상세 정보를 제시하면 아래와 같음.

Pas-MUP-1 박테리오파지의 유전체 분석 결과

No. of ORFs	Start	Stop	Size (bp)	Strand	Function [Organism*]
1	1	162	162	+	Hypothetical protein [Pasteurella phage PHB02]
2	152	1924	1773	+	DNA maturation protein [Pasteurella phage PHB02]
3	3146	3538	393	+	Hypothetical protein [Pasteurella phage PHB02]
4	3573	3920	348	+	Hypothetical protein [Pasteurella phage PHB02]
5	3920	4081	162	+	Hypothetical protein [Acinetobacter phage YMC13/03/R2096]
6	4160	4321	162	+	Hypothetical protein
7	4338	5012	675	+	Aminotransferase DegT
8	5022	5354	333	+	Hypothetical protein [Pasteurella phage PHB02]
9	5348	5530	183	+	Hypothetical protein [Pasteurella phage PHB02]
10	5523	5708	186	+	Gag protein [Feline virus]
11	5701	5931	231	+	Hypothetical protein
12	5985	8588	2604	+	DNA-directed RNA polymerase [Pasteurella phage PHB02]
13	8601	8735	135	+	Hypothetical protein [Pasteurella phage PHB02]
14	9045	10043	999	+	DNA ligase [Pasteurella phage PHB01]
15	10165	10521	357	+	Helicase domain protein
16	10523	11044	522	+	Phage protein [Escherichia phage LM33_P1]
17	11071	11187	117	+	Hypothetical protein [Pasteurella phage PHB01]
18	11184	11474	291	+	Sodium, proton antiporter
19	11467	11655	189	+	Hypothetical protein [Pasteurella phage PHB02]
20	11678	12376	699	+	Single stranded DNA-binding protein [Leclercia phage 10164-302]
21	12379	12849	471	+	Endonuclease I [Pasteurella phage PHB02]
22	12830	13282	453	+	Phage lysin, N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase [Pasteurella phage PHB02]
23	13296	13652	357	+	Phage lysin, N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase [Pasteurella phage PHB02]

Pas-MUP-1 박테리오파지의 유전체 분석 결과 (계속)

No. of ORFs	Start	Stop	Size (bp)	Strand	Function [Organism*]
24	13666	15339	1674	+	Primase/helicase protein [Pasteurella phage PHB01]
25	15484	15783	300	+	Antitoxin
26	15780	16013	234	+	Tail tubular A-like protein [Klebsiella phage K5]
27	16072	18222	2151	+	DNA Polymerase [Pasteurella phage PHB02]
28	18232	18486	255	+	Hypothetical protein [Pasteurella phage PHB01]
29	18479	18688	210	+	HNS binding protein [Pasteurella phage PHB01]
30	18685	18966	282	+	Murein L,D-transpeptidase
31	19104	19337	234	+	Hypothetical protein [Pasteurella phage PHB01]
32	19327	20232	906	+	Exonuclease [Pasteurella phage PHB01]
33	20277	20546	270	+	Peptidase
34	20546	20734	189	+	Beta-N-acetylhexosaminidase
35	20734	21030	297	+	Virion structural protein [Pseudomonas phage phi15]
36	21033	22661	1629	+	Collar protein [Pasteurella phage PHB02]
37	22676	23551	876	+	Capsid assembly protein [Pasteurella phage PHB02]
38	23587	24594	1008	+	Capsid and scaffold protein [Pasteurella phage PHB01]
39	24666	25253	588	+	Tail tubular protein A [Pasteurella phage PHB02]
40	25259	27637	2379	+	Phage tail fiber protein [Pasteurella phage PHB02]
41	27662	28171	510	+	Internal virion protein A [Pasteurella phage PHB02]
42	28150	28680	531	+	Protein inside capsid B [Pasteurella phage PHB01]
43	28680	30896	2217	+	Protein inside capsid C [Pasteurella phage PHB01]
44	30910	34995	4086	+	Protein inside capsid D [Pasteurella phage PHB01]
45	35049	38009	2961	+	Tail fiber protein [Pasteurella phage PHB02]
46	38052	38270	219	+	Holin [Pasteurella phage PHB02]
47	38504	38749	246	+	Holin [Pasteurella phage PHB02]

Pas-MUP-1 박테리오파지의 유전체 분석 결과 (계속)

No. of ORFs	Start	Stop	Size (bp)	Strand	Function [Organism*]
48	38736	38987	252	+	DNA packaging protein A [Pasteurella phage PHB01]
49	39112	39471	360	+	Endopeptidase [Pasteurella phage PHB02]

* 박테리오파지/바이러스 유래인 것만 표기

나. 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1의 항원 유전자 선발

- 유전체 분석을 통해 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1의 특이 항체 제작에 활용될 수 있는 항원 유전자 군을 하기와 같이 선발하였음. 선발한 유전자들은 주로 박테리오파지 구조와 연관되어 있는 head protein, capsid protein, tail fiber 등이었음.

박테리오파지 Bor-BRP-1의 항원 유전자 선발

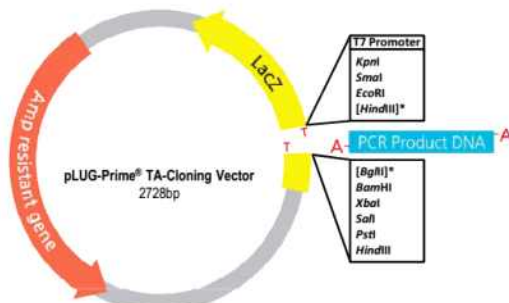
No. of ORFs	Start	Stop	Size (bp)	Function
35	19598	19756	159	Structural protein
41	22759	23163	405	Phage related protein
59	38434	39486	1053	Tail fiber protein
64	41294	42208	915	Phage head protein
71	46750	48294	1545	Phage protein

박테리오파지 Pas-MUP-1의 항원 유전자 선발

No. of ORFs	Start	Stop	Size (bp)	Function
35	20734	21030	297	Virion structural protein
36	21033	22661	1629	Collar protein

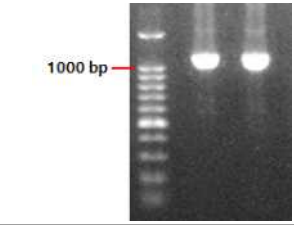

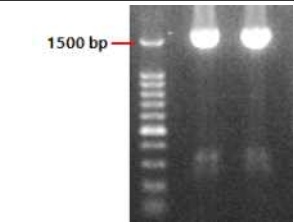
다. 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1의 항원 유전자 클로닝

- 선발된 항원 유전자는 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1의 genomic DNA를 각각 추출한 후 이를 template로 하여 하기에 제시한 primer set를 이용해 PCR을 수행하여 얻어진 PCR product를 TA cloning vector kit를 사용하여 클로닝하였음.

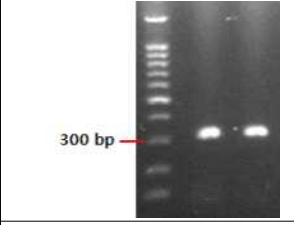
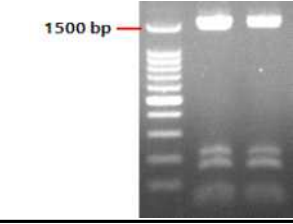


TA 클로닝 벡터 및 대표 시험 결과 사진

박테리오파지 Bor-BRP-1의 항원 유전자 클로닝에 사용한 primer 정보 및 PCR 결과

Name (target gene)	Nucleotide sequence (5' →3')	PCR 결과
ORF59 (Tail fiber protein)	GCGCCATGGATGCCTACGTCGGC	
	GCGCTCGAGTTAATAAATAAACTC	
ORF64 (Phage head protein)	GCGCCATGGATGGCTAACATTATCAC	
	GCGCTCGAGTTAATAAATAAACTC	
ORF71 (Phage protein)	GCGCCATGGATGAAACTAACAGCC	
	GCGCTCGAGTTAGTATCCCGTTG	

박테리오파지 Pas-MUP-1의 항원 유전자 클로닝에 사용한 primer 정보 및 PCR 결과

Name (target gene)	Nucleotide sequence (5' →3')	PCR 결과
ORF35 (Virion structural protein)	GCGCCATGGATGGGCTGGAACCC	
	GCGCTCGAGTTAAATATTAATCCCC	
ORF36 (Collar protein)	GCGCCATGGATGGCTAATTCAACAG	
	GCGCTCGAGTTAAACTGCTTCCATTCC	

- TA 클로닝된 항원 유전자들은 pBAD vector에 subcloning하여 최종 항원 발현용 plasmid를 제작 완료하였음.

4. 환경시료로부터 호흡기 세균에 항균력을 갖는 신규 박테리오파지의 스크리닝

가. 호흡기 질환 원인균의 확보 및 배양법 확립

- 본 과제는 양돈 산업에서 호흡기 질환에 효과적으로 대응할 수 있는 박테리오파지 기

반 제제의 개발 및 산업화를 목표로 하고 있음. 따라서 호흡기 질환을 일으키는 다양한 원인균들에 대한 유효 박테리오파지 확보는 매우 중요하다 할 수 있음. 이에 관련하여 농림축산검역본부 및 미생물자원센터로부터 대상 균주들을 분양 받아 확보하였으며, 확보 균주들의 적합 배양법 구축도 완료하였음.

호흡기 질환 원인균 확보 및 배양법 확립

균주	Strain	분양기관	배양법*
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	KVCC-BA-0000552	농림축산검역본부	A
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	KVCC-BA-0001851	농림축산검역본부	A
<i>Streptococcus suis</i>	1/2	농림축산검역본부	B
<i>Streptococcus suis</i>	2	농림축산검역본부	B
<i>Streptococcus suis</i>	3	농림축산검역본부	B
<i>Streptococcus suis</i>	4	농림축산검역본부	B
<i>Streptococcus suis</i>	9	농림축산검역본부	B
<i>Streptococcus suis</i>	KCTC 3557	미생물자원센터	B
<i>Streptococcus suis</i>	KVCC 0700673	농림축산검역본부	B
<i>Streptococcus suis</i>	KVCC 0602307	농림축산검역본부	B
<i>Streptococcus suis</i>	KVCC 0502326	농림축산검역본부	B
<i>Haemophilus parasuis</i>	HPS 경	농림축산검역본부	C
<i>Haemophilus parasuis</i>	HPS-10-12-07	농림축산검역본부	C

* 배양법

A: Brain Heart Infusion (BHI) + NAD (final conc. 10 μ g/ml), 37°C, 5% CO₂, w/o shaking;

B: Todd Hewitt Broth (THB), 37°C, w/ shaking;

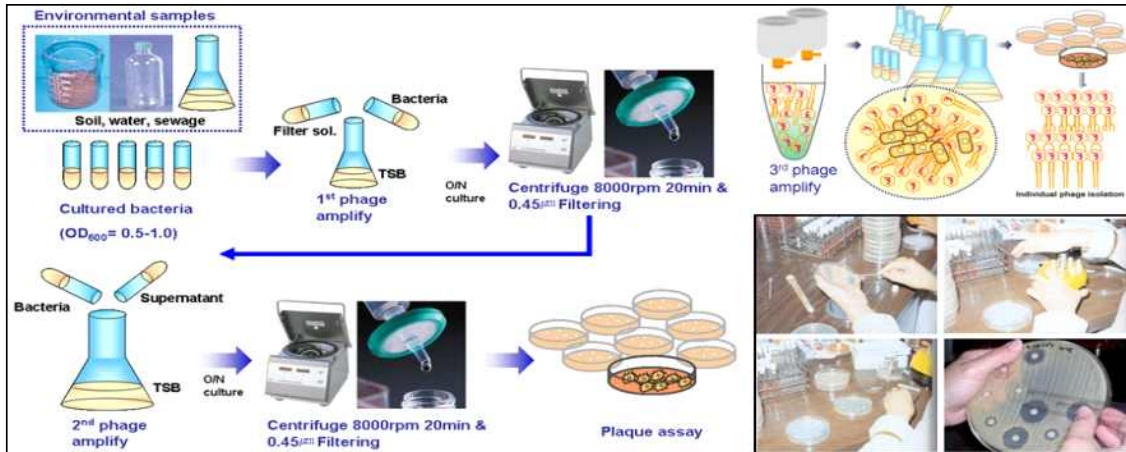
C: Brain Heart Infusion (BHI) + NAD (final conc. 200 μ g/ml), 37°C, 5% CO₂, w/o shaking;

나. 신규 박테리오파지 스크리닝

- 다양한 환경시료들 (서울, 경기 소재 하수종말처리장의 하수 시료, 양돈 농가 분변, 오폐수 시료, 강, 하천 시료를 약 100점)을 채취하여 아래와 같이 전처리를 실시하였음.

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ① 채취된 시료들을 pooling한 후 한밤 상온에 정치 ② 시료 상층액을 회수하여 8,000 rpm에서 20분간 원심분리 ③ 상층액을 회수하여 0.45 μm filter를 이용하여 여과 |
|---|

- 상기와 같이 처리하여 얻어진 시료를 신규 박테리오파지 스크리닝을 위해 사용하였음. 돼지 호흡기 질환 원인균들에 대하여 항균력을 갖는 박테리오파지의 스크리닝은 하기 그림과 같이 실시되었음.

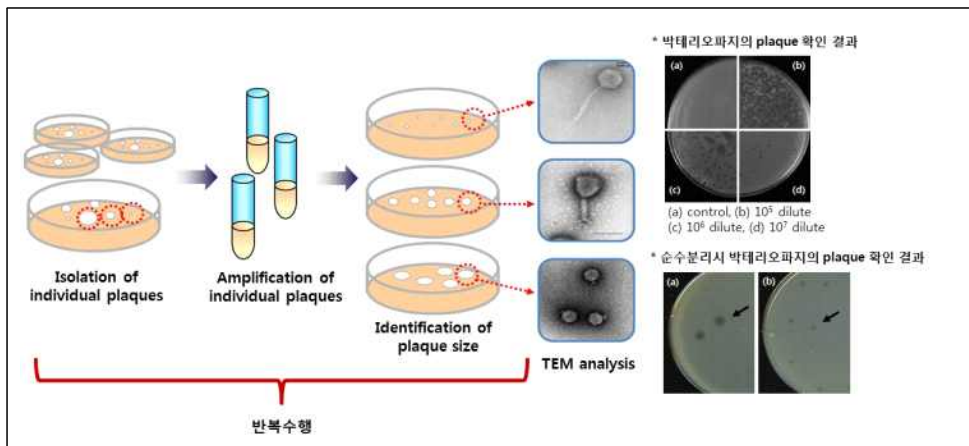


박테리오파지 스크리닝 과정을 보여주는 개략도

- 돼지 호흡기 질환 원인균들에 대하여 박테리오파지 스크리닝을 수행한 결과, *Streptococcus suis* KCTC 3557 strain에 항균력을 갖는 신규 박테리오파지를 확보할 수 있었음. 2차년도에도 다른 균종에 항균력을 갖는 신규 박테리오파지를 확보 업무를 지속적으로 수행할 계획임.

5. 확보 박테리오파지의 순수분리 및 특성화

- 통상 환경 시료로부터 박테리오파지를 분리할 경우 다수의 박테리오파지가 혼재된 mixture 상태로 분리되므로, 추가적인 순수분리 과정을 거쳐야만 단일 종의 순수 박테리오파지가 확보될 수 있음. 순수분리의 개략적 실험법은 아래 그림에 제시하였으며, 확보된 *Streptococcus suis* 박테리오파지를 대상으로 실시하였음.



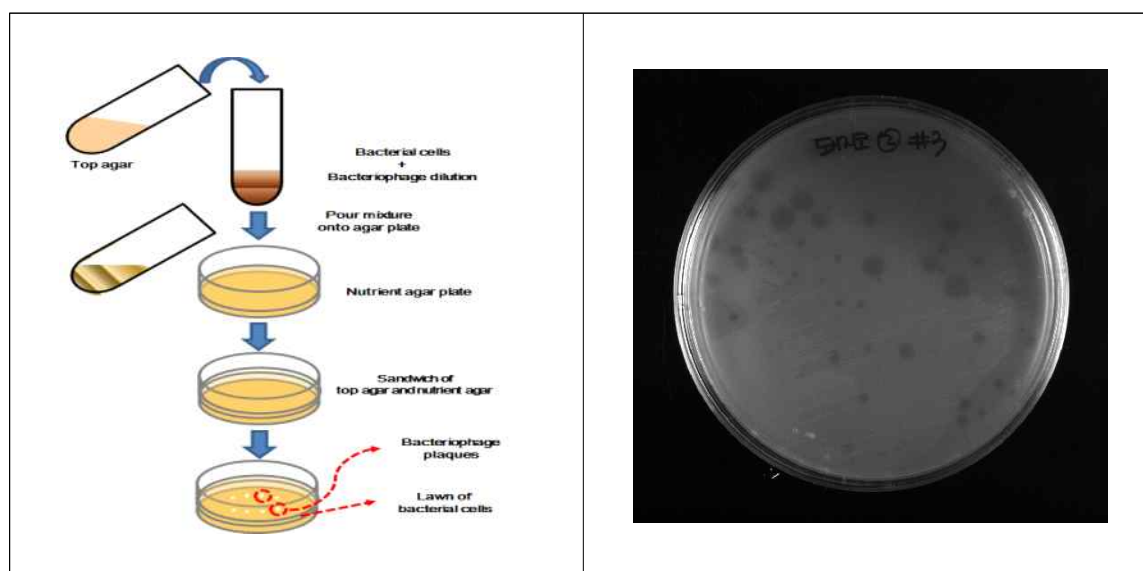
박테리오파지의 순수분리 과정

- 본 연구기관이 확보하고 있는 제반 기술을 활용하여 박테리오파지의 순수분리를 실시하였으며, 단일 박테리오파지로의 순수분리 완료 확인은 아래와 같이 3단계로 나눠 실시하

였음.

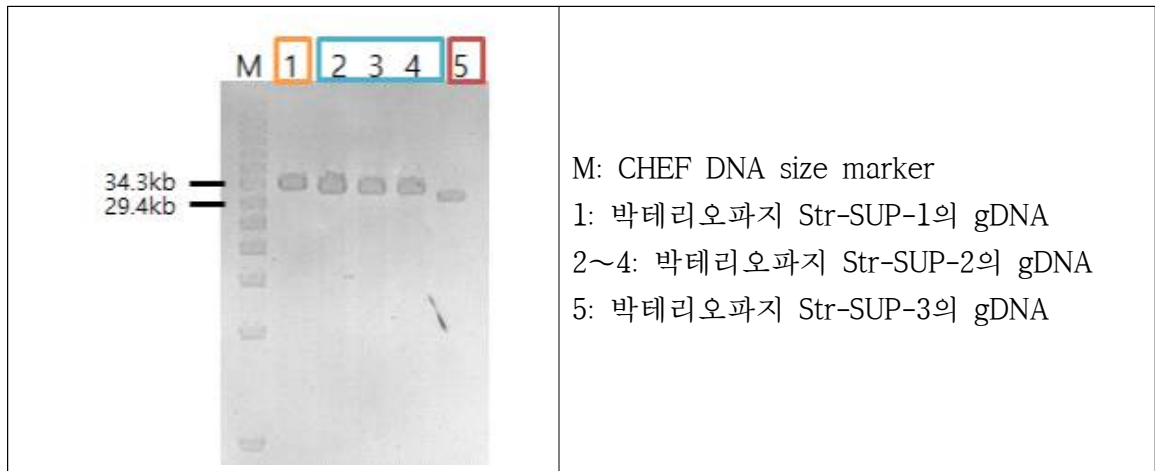
단계	순수분리 완료 확인 과정
1	Top agar assay를 통한 plaque의 morphology 조사
2	Pulse-field gel electrophoresis를 통한 단일 gDNA size 확인
3	투과전자현미경 조사를 통한 박테리오파지의 형태학적 특성 분석

- 1단계로 개별 박테리오파지의 순수분리 후 top agar assay를 실시하여 생성된 plaque morphology의 단일 형태 여부의 관찰을 통해서 순수분리 달성 여부를 조사하였으며, 실험 결과 *Streptococcus suis*에 항균력을 갖는 박테리오파지 3종 (Str-SUP-1, Str-SUP-2, Str-SUP-3)을 확보할 수 있었음. 대표 실험 사진을 제시하면 아래와 같음.



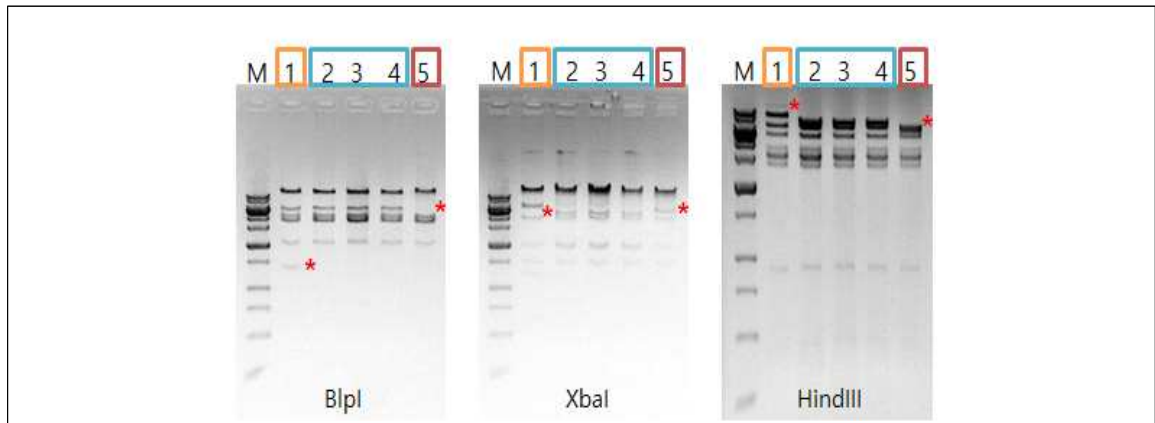
Top agar assay를 통한 *Streptococcus suis* 박테리오파지의 plaque morphology

- 2단계로 *Streptococcus suis* 박테리오파지들의 gDNA를 추출하여 pulse-field gel electrophoresis를 실시하였음. 이 때, 단일 밴드가 나타나는지 확인하여 단일 박테리오파지로의 순수분리가 달성되었음을 확인할 수 있었음. PFGE 분석 결과는 아래와 같으며, 박테리오파지 Str-SUP-1의 유전체 크기는 약 34 kb, 박테리오파지 Str-SUP-2의 유전체 크기는 약 32 kb, 박테리오파지 Str-SUP-3의 유전체 크기는 약 30 kb 정도로 확인되었음.



박테리오파지들의 gDNA에 대한 PFGE 분석 결과

- 또한, 확보 박테리오파지들 간에 유전체 차이를 확인하기 위해 gDNA를 특정 제한효소로 처리 후 DNA 절편 양상을 파악하는 restriction enzyme mapping 시험을 수행하였음. 그 결과는 아래와 같았음.



M: SiZer™ 1000 DNA marker
 1: 박테리오파지 Str-SUP-1의 gDNA
 2~4: 박테리오파지 Str-SUP-2의 gDNA
 5: 박테리오파지 Str-SUP-3의 gDNA
 *: DNA 절편 양상이 차이가 나는 부분의 표시

박테리오파지들의 restriction enzyme mapping 분석 결과

- PFGE와 Restriction enzyme mapping 시험을 통해, 3가지 후보 Str-SUP-2 (lane 2, 3, 4)는 유전체 크기 및 DNA 절편 양상이 비슷한 것으로 확인되어 동일 박테리오파지인 것으로 결론지을 수 있었음.
- 3단계로 *Streptococcus suis* 박테리오파지들의 형태학적 특성을 조사하기 위하여 전자현

미경 분석을 실시하였으며, 상세 실험 방법은 다음과 같았음.

<전자현미경 분석용 박테리오파지 준비>

- ① 박테리오파지 증식액을 CsCl gradient법 (1.7 g/ml, 1.5 g/ml, 1.45 g/ml)을 이용하여 ultracentrifugation (31,000 g, 12 hr)을 실시

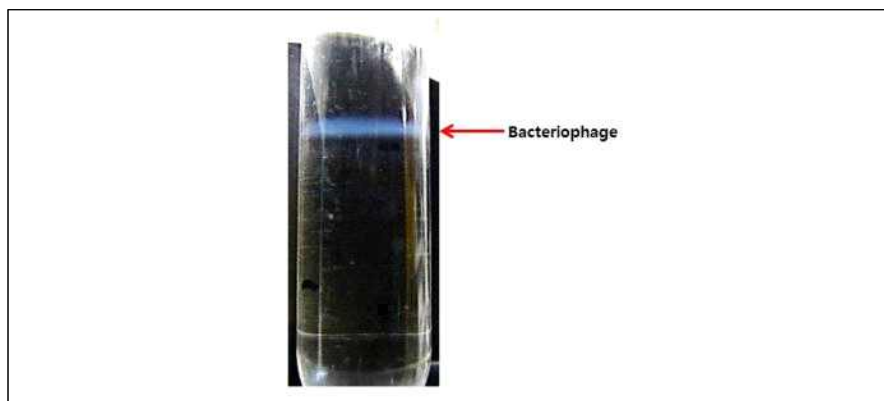


- ② Ultracentrifugation이 끝나면 박테리오파지 band를 조심스럽게 회수
- ③ 회수한 박테리오파지 액은 EB buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0)에 대하여 한밤동안 dialysis를 실시
- ④ Dialysis 한 시료를 투과전자현미경 분석에 사용

<전자현미경 분석용 시료 제작 및 분석>

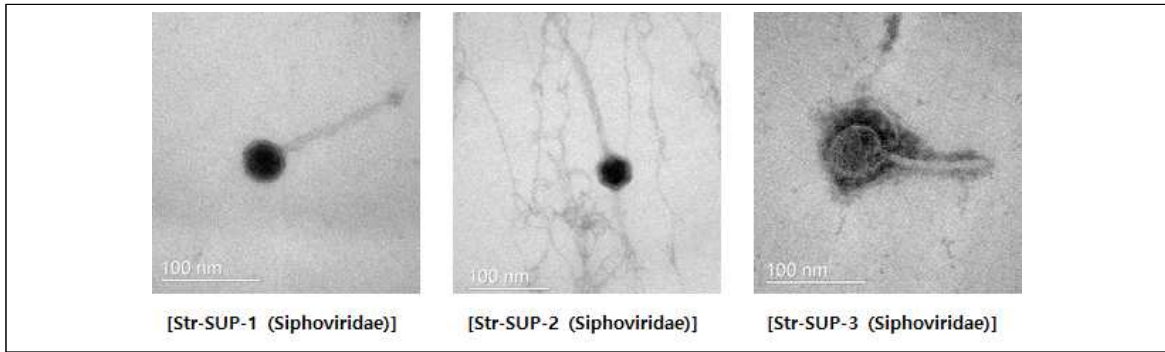
순수한 박테리오파지를 포함한 용액을 구리 격자 (copper grid)에 묻히고 2% 우라닐 아세테이트 (uranyl acetate)로 역염색법 (negative staining)과 건조를 수행한 후 transmission electron microscopy (TEM)를 통하여 그 형태를 촬영

- 참고로, 박테리오파지 시료를 ultracentrifugation한 후의 대표적 결과는 아래 그림과 같음.



박테리오파지의 ultracentrifugation 후의 대표적 실험 결과

- 확보된 박테리오파지들의 전자현미경 분석 결과를 제시하면 아래와 같음. 모든 박테리오파지가 전형적인 *Siphoviridae*의 morphology를 가지는 것으로 분석되었음.



확보 박테리오파지의 전자현미경 분석 결과

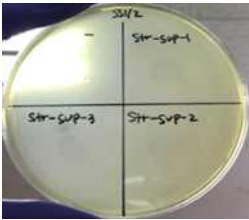


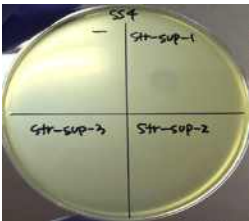

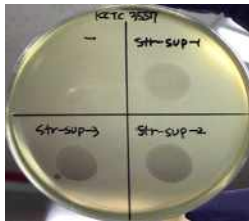

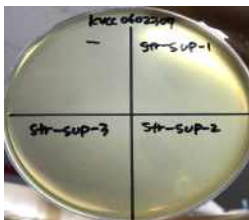
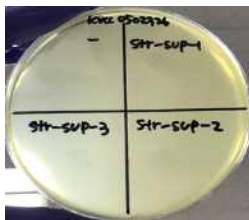
- 순수분리가 완료된 박테리오파지들은 *Streptococcus suis* 균주들에 대한 항균력 조사를 실시하였음. 대상이 되었던 *Streptococcus suis* 균주는 총 9개이며, *Streptococcus suis* 9 strain 1개를 제외한 모든 균주들에 대하여 확보 박테리오파지들의 항균력이 확인되었음. 시험은 3회 반복 수행하였으며, 대표적인 시험 결과는 아래와 같음.

확보 박테리오파지의 *Streptococcus suis* 균주에 대한 항균력 조사 시험 결과

Strain name	Antibacterial activity		
	Str-SUP-1	Str-SUP-2	Str-SUP-3
SS1/2	+	+	+
SS2	+	+	+
SS3	+	+	+
SS4	+	+	+
SS9	-	-	-
KCTC 3557	++	++	++
KVCC 0700673	+	+	+
KVCC 0602307	+	+	+
KVCC 0502326	+	+	+

* ++: Clear lytic activity, +: turbid lytic activity, -: no lytic activity

- 박테리오파지 확보 시에 사용되었던 KCTC 3557 균주에 대하여 가장 항균력이 우수한 것을 확인할 수 있었음.

<i>Streptococcus suis</i> 1/2	<i>Streptococcus suis</i> 2	<i>Streptococcus suis</i> 3
		
<i>Streptococcus suis</i> 4	<i>Streptococcus suis</i> 9	<i>Streptococcus suis</i> KCTC 3557
		
<i>Streptococcus suis</i> KVCC 0700673	<i>Streptococcus suis</i> KVCC 0602307	<i>Streptococcus suis</i> KVCC 0502326
		

확보 박테리오파지의 *Streptococcus suis* 균주에 대한 항균력 조사

- 신규 확보한 *Streptococcus suis* 박테리오파지들은 향후 제품화와 산업화를 고려하여 유전체 서열 확보, 증식 및 정제 공정 개발, 최적 제형 개발 등의 연구를 2, 3차년도에 단계적으로 수행함.

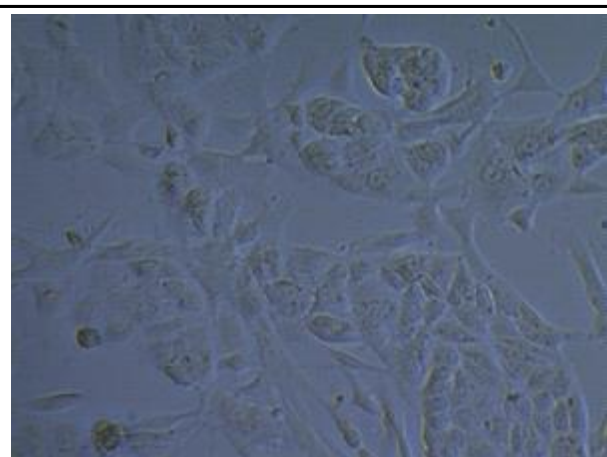
<제1협동연구기관>

1. 돼지 호흡기 상피세포의 배양 조건 확립 시험

- 돼지 호흡기 상피세포 (PT-K75; ATCC CRL-2528; pig nasal/turbinate mucosa cell line)를 ATCC로부터 구입하였음.
- 본 cell line은 갓 태어난 돼지의 비갑개 상피 세포 (turbinate mucosa cell)이며, stable하게 계대 배양 및 시험에 사용 가능하다고 판단하였기에 때문에 선정하였음. 돼지 비갑개 조직으로부터 primary cell을 확보하여 본 시험을 시작하기 전, pilot test로 사용하기에 적합하다고 생각됨.
- 돼지 호흡기 상피세포주를 하기 제시한 배지 및 조건 하에 배양을 실시하였음.

- ① PT-K75 cell line stock을 상온에서 해동
- ② 15 ml conical tube에 DMEM 배지 5 ml를 넣고, ①항에서 해동한 세포를 첨가하여 세포를 잘 부유시켜 줌
- ③ 원심분리 (3000 ×g 2 분) 실시하여 상층액을 버림
- ④ DMEM 배지 7 ml를 15 ml conical tube에 넣고 하단의 세포 펠렛을 잘 부유시켜 줌
; 잔여 세포부유액 2 ml 중 500 μ l를 e-tube에 넣어 mycoplasma 검출 유무 확인시험에 활용하고, 나머지 1.5 ml는 stock으로 제조
- ⑤ 세포 부유액 5 ml를 25cm² flask에 넣고 37°C incubator (air 95%, CO₂ 5%)에서 배양시킴
- ⑥ 다음날 25cm² flask를 꺼내 현미경으로 세포를 관찰하여 confluency를 확인하고, 세포수가 적은 경우에 ③~④단계를 거쳐 fresh한 DMEM 배지로 교체한 후 37°C incubator에 하루 배양시킴
; 다음날 배양된 세포를 현미경 관찰하여 세포수가 실험하기 적당한 수준 (90%이상 confluency)이 되었는지 여부를 확인함
- ⑦ incubator에서 25cm² flask를 꺼내 aspirator를 이용해 DMEM 배지를 모두 회수해 버리고, 0.25% trypsin/ 0.53 mM EDTA 1 ml를 넣어 37°C incubator 상에서 5분간 정치시킴 (참조: 75cm² flask의 경우, 처리되는 trypsin/EDTA의 양은 3 ml)
- ⑧ 25cm² flask를 꺼내어 세포가 잘 떨어졌는지 여부를 확인하고, 세포 부유액 모두를 15 ml conical tube에 잘 넣음
- ⑨ 원심분리 (3000 ×g 2 분) 실시하여 상층액을 버림
- ⑩ 1×PBS 5 ml를 ⑨항의 tube에 넣은 후 세포를 pipetting하여 잘 부유시킴
- ⑪ ⑩항 2회 반복 수행
- ⑫ 원심분리 (3000 ×g 2 분) 실시하여 상층액을 버린 후, DMEM 배지를 3~5 ml 넣고 세포를 pipetting하여 잘 부유시킴
- ⑬ 25cm² flask에 부유된 세포를 넣고 37°C static incubator에 배양시킴

- 3일마다 계대 배양하여 3주간 세포주 증식 여부를 확인한 결과, 정상적으로 세포 성장이 잘 유지되고 있음을 확인할 수 있었음. 대표적인 사진을 제시하면 아래와 같음.



Passage 3 (×100)



Passage 5 (×40)

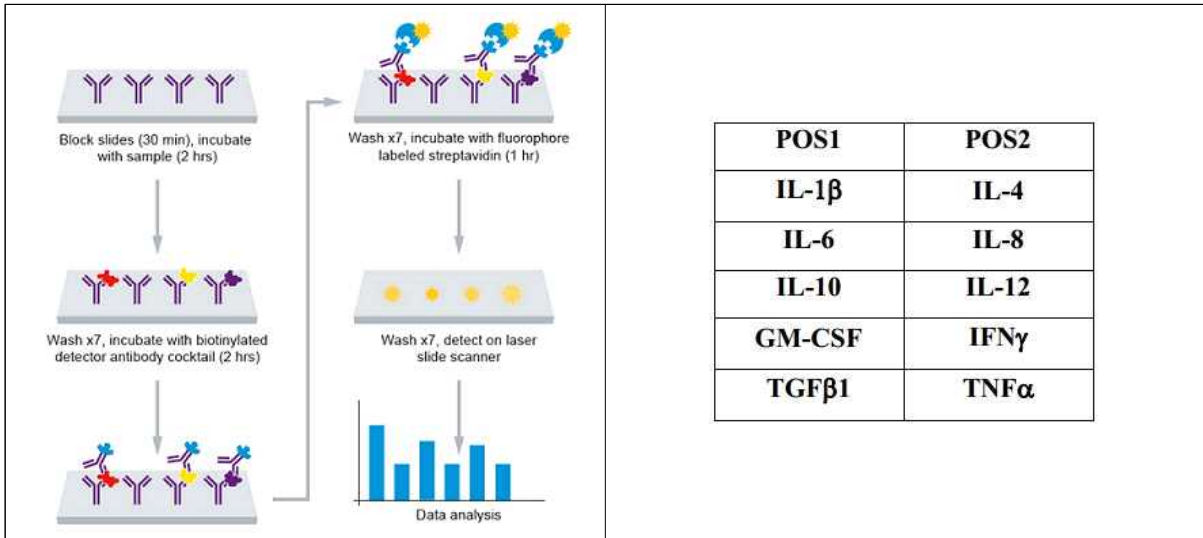
현미경 관찰을 통한 배양 세포의 형태 확인

2. 호흡기 질환 원인균을 돼지 호흡기 상피세포에 처치 후 cytokine array 실시

- 주관기관으로 제공받은 돼지 호흡기 질환 원인균인 *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*를 이용하여 돼지 호흡기 상피세포에 처치 후 cytokine 변화 양상을 파악하기 위해 cytokine array 시험을 아래와 같은 방법으로 실시함.

- ① 돼지 호흡기 상피세포를 6 well plate에 3×10^8 cell 수준으로 분주한 후 confluency에 도달되기 하루 전 FBS를 starvation 시킴
- ② *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* 균을 각각 10^5 , 10^6 , 10^7 cfu/ml 수준으로 배양된 돼지 호흡기 상피세포에 처치하여 감염을 유도함
- ③ 균 처치 후 4시간 시점에 6 well plate를 꺼내고 5,000 ×g 로 원심분리하여 배양 세포와 균을 모두 제거하고 세포 배양 상층액 만을 회수하도록 함
; 이 때 돼지 호흡기 상피세포는 Trizol을 이용하여 total RNA를 추출한 후 cDNA를 제작하여 RT-PCR을 실시함
- ④ 확보된 세포배양액은 Abcam porcine cytokine antibody array A kit (ab197479)를 이용하여 cytokine profile 분석하고, signal은 ECL (enhanced chemoluminescence) 방법으로 최종 결과를 확인함.

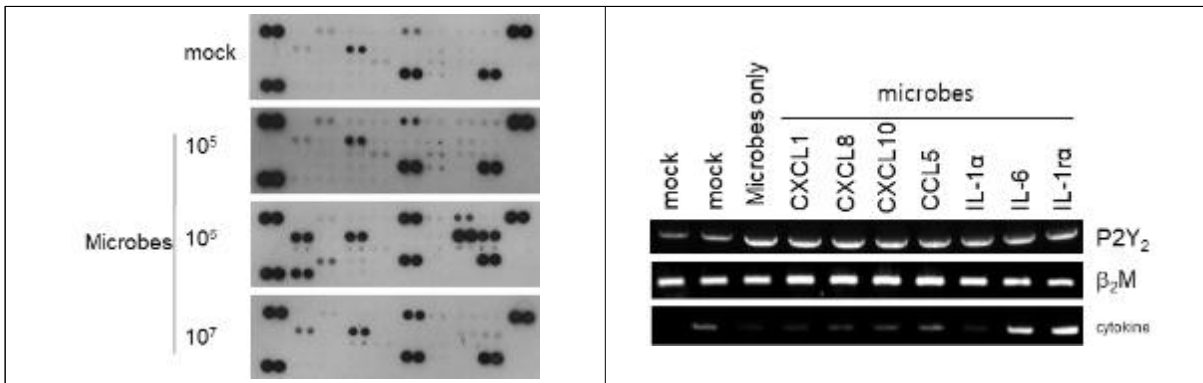
- Cytokine array 분석 모식도 및 본 시험에 사용한 kit를 이용하여 분석 가능한 cytokine의 종류를 제시하면 아래와 같음.



Cytokine array 분석의 개략도

분석 가능한 cytokine의 리스트

- Cytokine array를 반복 수행함. 본 기관에서 기확보하고 있는 cytokine array 결과를 예시로 제시하면 아래와 같음.



Cytokine array 결과

특정 cytokine 증가로 인한 염증 단백질 변화 관찰

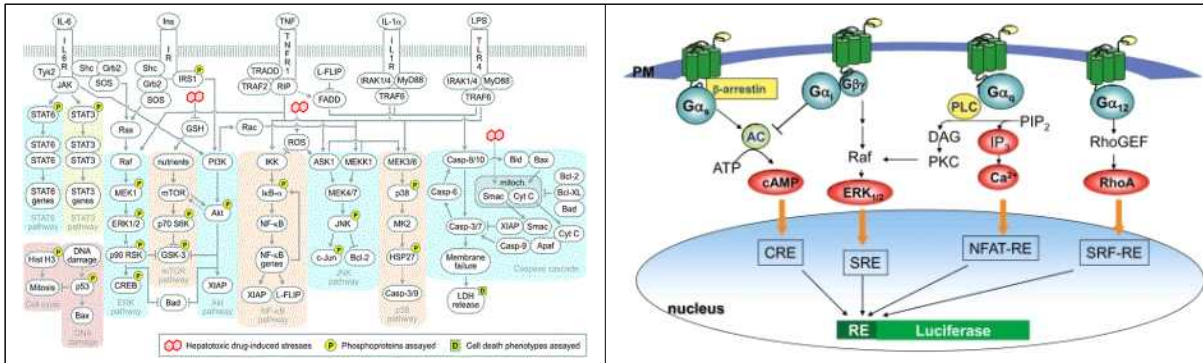
- 상기 제시한 cytokine array 결과에 대한 고찰을 아래와 같이 요약 제시함.

<결과에 대한 고찰>

- 돼지 호흡기 상피세포에 호흡기 질환 원인균이 감염 시, 호흡기 상피세포 자체 내 secretagogue에서 특정 cytokine을 분비하여 면역계를 활성화시키거나 인접한 세포에 염증성 cytokine을 분비하여 염증을 더욱 악화시킬 수 있음.
- 또한 염증성 cytokine을 분비하지 못하거나 항염증성 cytokine을 분비하여 항상성을 조절하게 할 수 있음.

3. 호흡기 질환 원인균을 돼지 호흡기 상피세포에 처치 후 병증 유발과 연관된 조절 단백질 탐색 및 특성화

- 특정 미생물에 의한 염증 유발과 관련된 조절 단백질을 발굴하기 위해서는 먼저 신호 전달 체계를 이해해야 함.
- 돼지 호흡기 상피세포에 특정 cytokine의 단독 처리, 특정 세균의 단독 및 병합 처리를 하여 신호 전달 체계를 규명해야 함.
- 외부 항원에 대한 면역계 조절과 연관된 cytokine과 생체 내 거의 모든 생리적 반응을 촉매하는 것으로 알려진 G protein-coupled receptor (GPCR) signaling의 모식도는 다음 그림과 같음.



Cytokine signaling 모식도

GPCR signaling 모식도

<제2협동연구기관>

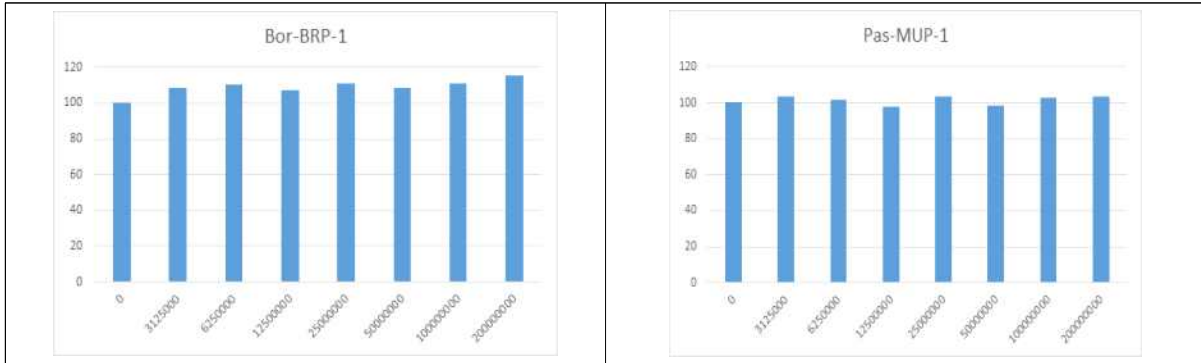
1. 박테리오파지의 세포독성평가

- 박테리오파지 Bor-BRP-1 (2×10^9 pfu/ml)과 Pas-MUP-1 (3×10^9 pfu/ml) 액상시료를 주 관연구기관으로부터 제공받아 동물시험에 앞서 세포주를 대상으로 세포독성시험을 아래와 같이 실시하였음. 시험 및 목적 동물을 대상으로 박테리오파지가 체내에 도입될 경우, 박테리오파지와 가장 반응성이 높을 것으로 예상되는 면역세포 중 하나인 macrophage 세포주로 알려진 Raw264.7 세포주를 이용하여 박테리오파지의 세포독성평가를 실시하였으며, 그 방법은 아래와 같음.

- ① Raw264.7 세포를 96 well plate에 well 당 1×10^4 cell 갯수로 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 subculture 후 각각의 박테리오파지를 다양한 농도로 처리하였음.
- ② 박테리오파지 Bor-BRP-1와 Pas-MUP-1의 최고 농도는 ml당 2×10^8 pfu 농도로 설정하여 10배씩 단계 희석하였으며, CCK-8 용액을 각 well 당 10μl씩 분주하여 2시간동안 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 triplicate으로 cell viability를 검사하였음.

- 실험 결과와 고찰에 대하여 요약하여 아래 표에 제시함.

- 박테리오파지 Bor-BRP-1을 처리한 어떠한 농도군에서도 세포독성이 관찰되지 않는 것으로 평가되었음. 이는 박테리오파지 Bor-BRP-1의 자체 독성과 박테리오파지 분리과정에 따른 세포독성은 없는 것으로 평가되어짐.
- 박테리오파지 Pas-MUP-1도 Bor-BRP-1을 처리한 경우와 마찬가지로 어떠한 농도군에서도 세포독성이 관찰되지 않았음. 이는 향후 박테리오파지의 동물 생체내 적용에 있어서도 안전할 것으로 예측되는 바임.



세포독성시험 결과 (좌: Bor-BRP-1, 우: Pas-MUP-1)

2. 박테리오파지의 안전성평가

- 주관연구기관으로부터 공급받은 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1 액상 시료를 이용하여 1주 반복투여에 따른 마우스 아급성 독성평가를 실시하였음.
- 마우스 독성시험을 위한 시험군의 구성은 정상대조군, 용매대조군, 박테리오파지 Bor-BRP-1 저농도군 (1×10^6 pfu/ml), 박테리오파지 Bor-BRP-1 고농도군 (1×10^8 pfu/ml), 박테리오파지 Pas-MUP-1 저농도군 (1×10^6 pfu/ml), 박테리오파지 Pas-MUP-1 고농도군 (1×10^8 pfu/ml)으로 나누어 실시하였음. 투여농도설정은 다른 참고문헌을 참조하여 설정하였고 군당 6마리에 1주간 반복 경구투여하였음.
- 독성평가항목으로 일반증상 관찰, 마우스 체중측정, 장기중량 측정, 혈액생화학적 검사, 부검소견 관찰 및 병리조직학적 평가를 중심으로 아래와 같은 방법으로 분석하였음.

① 시험물질 및 부형제

- 시험물질: 박테리오파지 Bor-BRP-1 (2×10^9 pfu/ml), Pas-MUP-1 (3×10^9 pfu/ml)
- 부형제: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
- 보관: 4°C 보관

② 투여시험물질

- 박테리오파지 Bor-BRP-1와 Pas-MUP-1는 부형제를 이용하여 저농도군은 1×10^6 pfu/head/day, 고농도군은 1×10^8 pfu/head/day으로 사용하였음.

③ 시험군의 구성

군	성별	동물수	동물번호	투여액량 (ml/head/day)	투여량 (pfu/head/day)
정상대조군	M	6	1-6	0.25	0
용매대조군	M	6	7-12	0.25	0
Bor-BRP-1 저농도군	M	6	13-18	0.25	1×10^6
Bor-BRP-1 고농도군	M	6	19-24	0.25	1×10^8
Pas-MUP-1 저농도군	M	6	25-30	0.25	1×10^6
Pas-MUP-1 고농도군	M	6	31-36	0.25	1×10^8

④ 투여량의 설정

주관연구기관과 협의 및 참고문헌을 참조하여 설정하였음.

⑤ 투여

; 투여법과 관련된 사항을 요약하면 아래와 같음.

투여경로 및 선택이유	경구투여, 박테리오파지 제제의 사료를 통한 급여방식을 감안하여 선택
투여횟수 및 기간	1회/1일, 7일, 오후 2시
투여액량 산출	0.25ml/head/day
투여방법	경구용 존데와 주사기를 이용하여 안정적인 상태에서 투여

⑥ 관찰 및 검사

- 일반증상: 투여 및 관찰기간 동안 사망 및 일반증상여부를 관찰함.
- 체중: 1, 3, 5, 7일에 시험물질 투여 전에 측정하였음.

⑦ 혈액생화학적 검사

- 부검 전날 절식 (16시간)시킨 후 alfaxan을 이용하여 마취시켜 후대정맥을 통하여 혈액을 채혈하였음. 채혈된 혈액은 곧바로 헤파린이 처리된 E-tube에 담아 일정시간동안 rotation시킨 후 혈청을 원심분리하여 -70°C defreezer에 보관하여 측정 시 꺼내어 사용하였음.
- 혈청분석은 대구경북침단의료복합단지 실험동물센터에 의뢰하여 검사결과를 분석하였음.

⑧ 조직병리

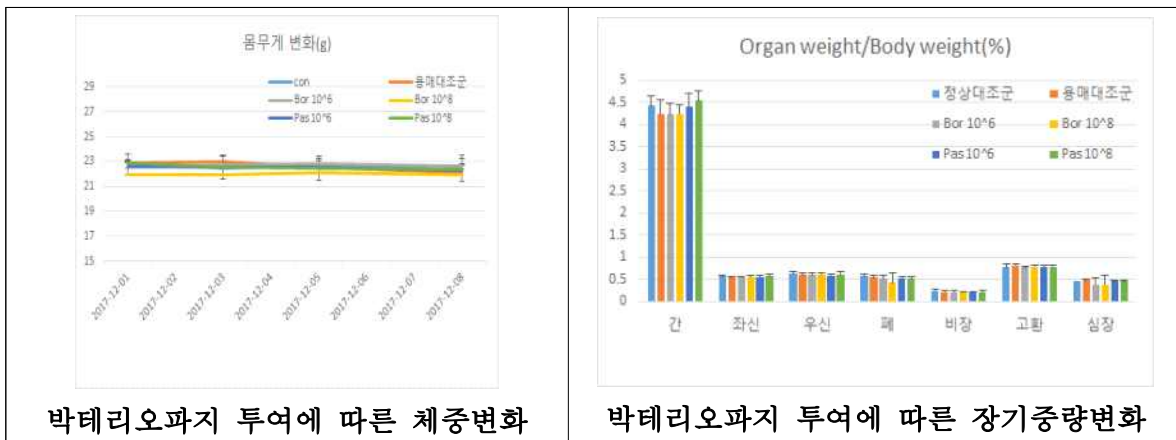
- 혈액생화학적 검사를 위한 채혈 후 간, 신장, 폐, 심장, 비장 및 고환을 육안 관찰 후 장기중량을 측정하였음. 이 후 각 장기를 10% 중성완충포르말린에 2일간 고정 후 파라핀블럭을 만들어 HE 염색하여 현미경 검경을 실시하였음.

⑨ 통계학적 분석

- Student's t-test를 사용하여 정상대조군 및 용매대조군과 유의적인 차이가 나타나는지를 확인하였음.

- 실험 결과를 아래 표에 제시함.

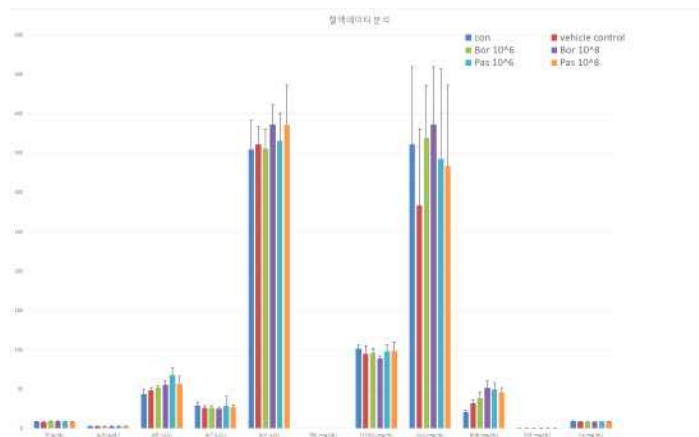
- ① 일반증상: 모든 시험군에서 이상증상은 나타나지 않았음.
- ② 체중 및 장기중량변화: 모든 시험군에서 체중의 유의한 차이를 나타내지 않았음.



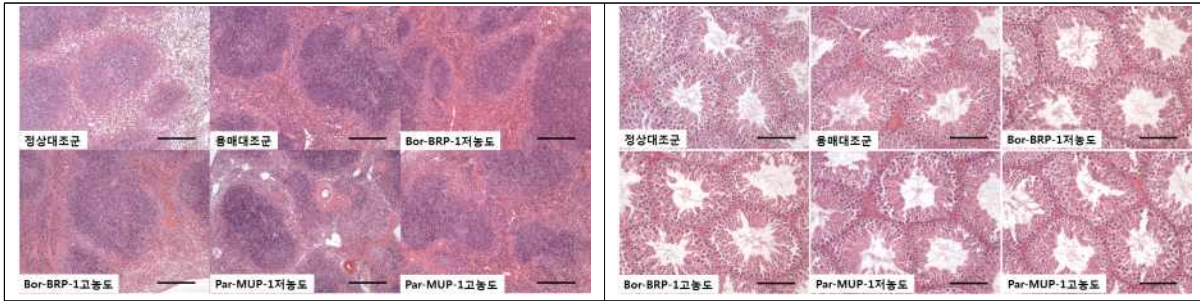
박테리오파지 투여에 따른 체중변화

박테리오파지 투여에 따른 장기중량변화

- ③ 혈액생화학적 검사: 시험군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았음.

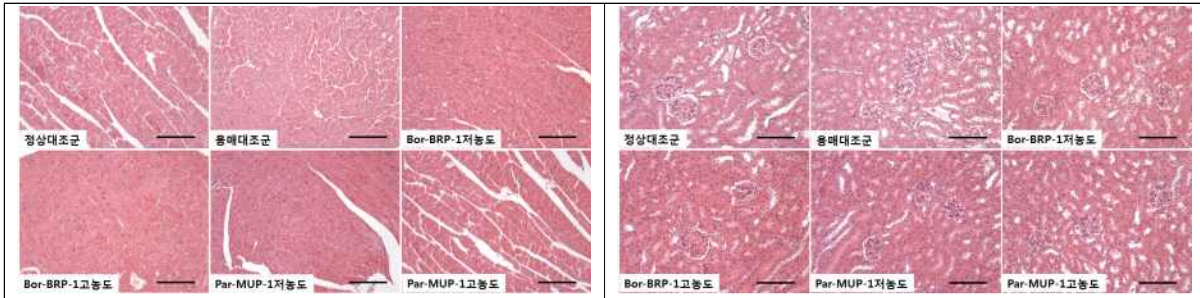


- ④ 조직병리학적 소견: 모든 시험군에서 특이적 이상 조직소견이 관찰되지 않았음. 따라서 본 시험에 사용된 박테리오파지가 동물에 안전한 물질이라고 판단되어짐.



비장조직의 조직병리학적 분석 결과

고환조직의 조직병리학적 분석 결과



심장조직의 조직병리학적 분석 결과

신장조직의 조직병리학적 분석 결과

- 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1에 대한 세포독성 및 1주 반복투여에 따른 일반독성을 평가한 결과, 독성이 없는 것으로 평가되었음. 이는 생체적용에 있어 무해할 것으로 예측되며, 향후 산업화 적용에 있어서도 안전할 것으로 평가되어짐.

제 2절. 양돈 세균성 호흡기 질환에 적합한 박테리오파지의 제형 개발/특성화, 분자생물학적 기전 규명 및 목적 동물에서의 안전성 조사 (2차년도)

<주관연구기관>

1. 제형별 박테리오파지 시료 제조 및 효능 평가

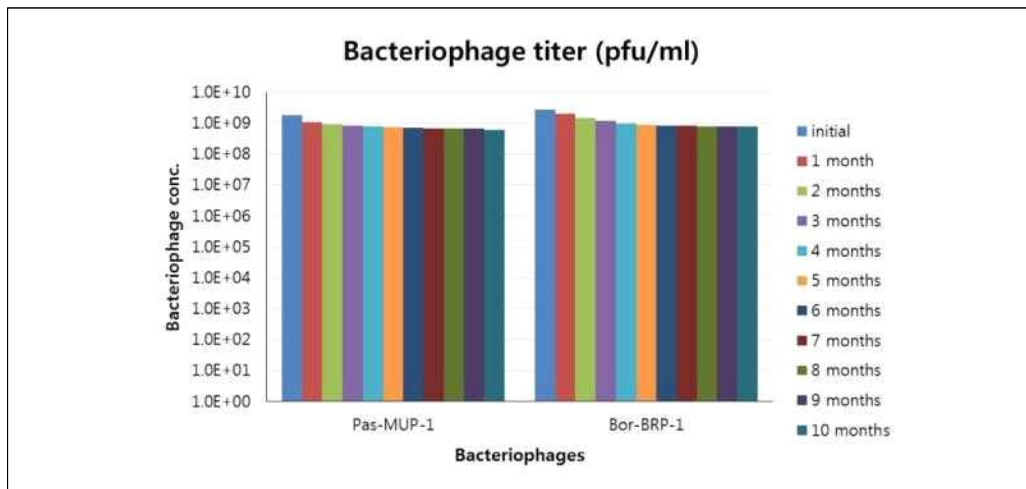
가. 박테리오파지의 최적 액상 제형 개발 및 장기 보관 안정성 조사

- 1차년도 증식 및 정제 공정 개발을 통해 확보된 최종 박테리오파지 액을 이용하여 적합 액상 제형 개발을 수행하였음. 대상 박테리오파지는 *Bordetella bronchiseptica*에 항균력을 갖는 Bor-BRP-1과 *Pasteurella multocida*에 항균력을 갖는 Pas-MUP-1이며, 하기에 제시한 3종류의 formulation candidate (phosphate-buffered saline, sodium chloride solution, TMG buffer)를 선정한 후 각 formulation candidate에 대한 적합성을 조사하여 적합 액상 제형을 선정하였음. 적합성 여부는 적용한 버퍼 조건에서 박테리오파지의 안정성 측면을 평가하여 최적 formulation을 결정하였음.

Formulation candidate 및 이의 조성

Formulation Candidate	Composition
Phosphate-buffered Saline	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄
Sodium chloride solution	100 mM Sodium chloride
TMG buffer	10 mM Tris-HCl, 10 mM MgSO ₄ , 0.1% Gelatin, pH 7.5

- 실험적으로 최종 박테리오파지 액을 formulation candidate로 buffer exchange를 실시한 후에 이를 장기 보관 (통상 6~12개월) 하면서 박테리오파지 titer 변화 양상을 조사하는 방식으로 수행하여 박테리오파지 안정성을 평가하였음. 박테리오파지의 titer는 top agar assay 방법으로 조사하였음. 보관 온도는 4°C와 30°C로 하였음.
- 실험 결과, 3종류의 액상 formulation candidate에서의 박테리오파지 안정성은 유사하였음. 하지만, 보관 온도 조건 (4°C, 30°C)에 대해서는 차이가 있었음. 4°C 조건에 6개월 간 보관한 경우에는 박테리오파지의 titer가 크게 감소하지 않고 비교적 안정적이었으나, 30°C 조건에서는 1개월이 지난 시점부터 일부 박테리오파지들의 titer가 점차적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었음. 따라서 액상 박테리오파지의 적정 보관 온도는 4°C로 결정하였음. 최종적으로 냉장 보관 조건에서 3종류의 액상 제형 모두 유사한 성능을 제공할 수 있으리라 판단하였으며, 향후 산업적 활용에서는 용도에 맞게 3종의 액상 제형 모두를 적절히 사용하면 될 것으로 결론을 내렸음. 박테리오파지에 따라 차이는 있을 수 있지만, 일반적으로 박테리오파지 기반 액상 시료 혹은 제품은 냉장 보관 시 1년 이상 안정적임. TMG buffer formulation에서 개별 박테리오파지의 4°C에서 10개월 간 실시한 안정성 시험 결과를 하기에 제시함.



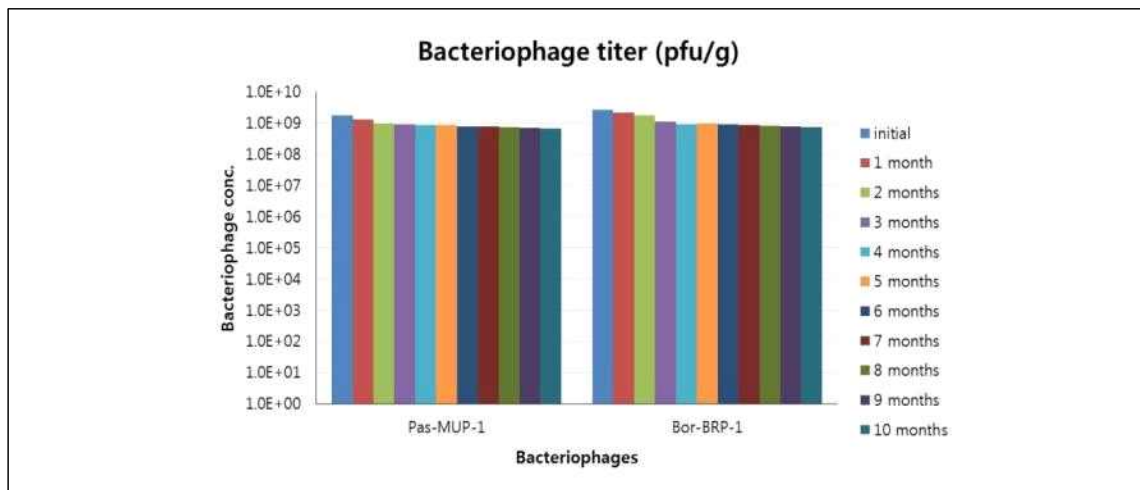
TMG buffer formulation에서 개별 박테리오파지의 안정성 시험 결과

나. 박테리오파지의 최적 고상 제형 개발 및 장기 보관 안정성 조사

- 정제된 최종 박테리오파지 액을 이용하여 적합 고상 제형을 개발하였음. 최종 박테리오파지

파지 액에 부형제와 안정화제를 다양한 조성으로 첨가한 다음에 이를 동결건조하여 고상 시료를 제조하는 전략으로 적합 고상 제형을 개발하였음.

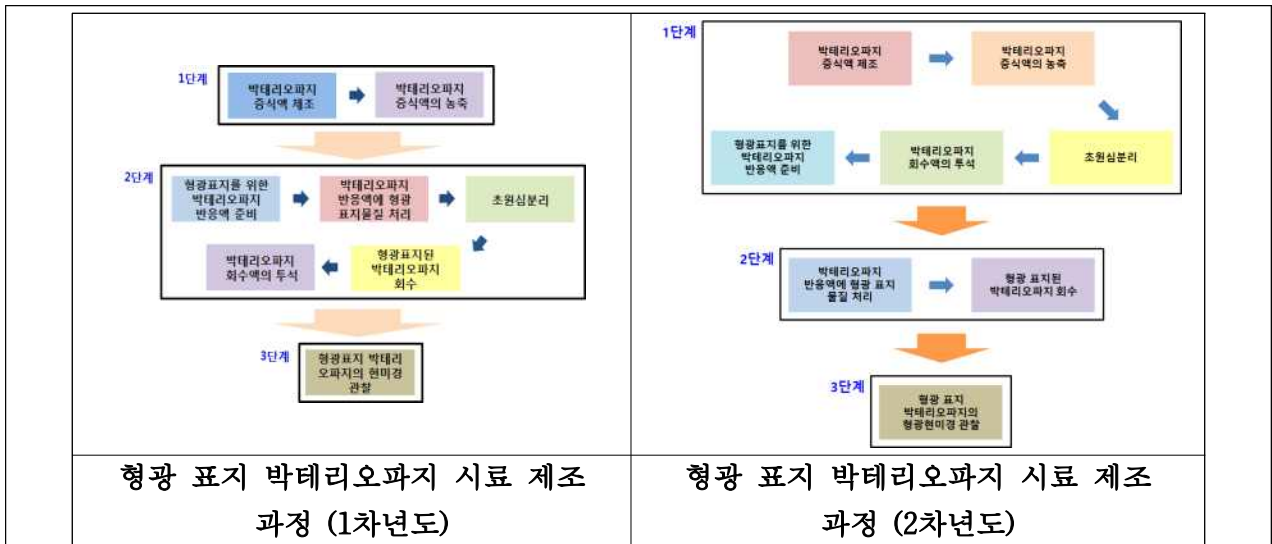
- 개발 대상이 된 부형제는 첨가제로 널리 사용되는 물질인 skim milk, sucrose, maltodextrin이었으며 (30-40% 적용), 안정화제 역시 널리 사용되는 물질인 trehalose, mannitol, sorbitol이었음 (10-20% 적용). 다양한 조성으로 고상 시료들을 제조한 후 시료 내 초기 박테리오파지 titer와 10개월 간 4°C에 보관했을 때의 안정성을 평가 요소로 설정하여 고상 제형 개발을 수행하였음. 박테리오파지의 titer는 top agar assay 방법으로 조사하였음.
- 시험 결과, 실험한 모든 조건에서의 동결건조 후 얻어진 고상 시료 내의 초기 박테리오파지 titer는 유사한 수준이었음. 한편, 이들을 10개월 간 4°C에 보관했을 때의 안정성도 유사하였음. 그러나 부형제로 maltodextrin (40%)을, 안정화제로 trehalose (10%)를 사용한 경우가 가장 우수한 4°C 보관능을 나타내었음. 이에 따라 maltodextrin (40%)/trehalose (10%)를 적합 고상 제형으로 선정하였음.
- Maltodextrin (40%)/trehalose (10%) 제형으로 제조한 개별 박테리오파지의 고상 시료를 4°C에서 10개월 간 보관했을 때의 안정성 시험 결과를 하기에 제시함.



Maltodextrin (40%)/trehalose (10%) 제형의 개별 박테리오파지 안정성 시험 결과

2. 박테리오파지의 체내 전달 효율 개선 연구

- 박테리오파지의 동물 체내 분포 양상 및 전달 효율을 파악하기 위해 박테리오파지에 형광 표지 기술을 적용하였음. 1차년도에 형광 표지 박테리오파지 제조 과정에서 사용하였던 형광 표지 물질이 변경되었기에 2차년도의 형광 표지 박테리오파지 제조법도 변경하여 시험을 수행하였음. 상세 시험법은 아래에 제시함.



가. 형광 표지용 박테리오파지 시료 제작

- 형광 표지 실험에 앞서 개별 박테리오파지 증식액을 확보하였으며, 역가를 확인한 결과는 아래와 같음.

박테리오파지 증식액의 농축 결과

박테리오파지	박테리오파지 역가 (pfu/ml)	
	증식액	농축액
Bor-BRP-1	1.2×10^9	2.0×10^{11}
Pas-MUP-1	2.4×10^9	1.8×10^{11}

- 1차년도에 사용하였던 FITC는 마우스 체내로 들어가면 fluorescence signal이 약하여 측정에 어려움이 있었음. 즉, FITC는 동물실험용 형광 표지 박테리오파지 제조 시약으로 적절하지 않은 것으로 판단되어 fluorescence dye를 Qdot™ 655 Streptavidin Conjugate (Invitrogen, Q10121MP)으로 변경함. 형광 표지 박테리오파지 제조는 아래의 방법으로 실시하였음.

<형광 표지용 시약>

- 24 mM EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin solution
- 2.5% glycine
- Qdot™ 655 Streptavidin Conjugate (Invitrogen, Q10121MP)

<형광 표지 박테리오파지 제조>

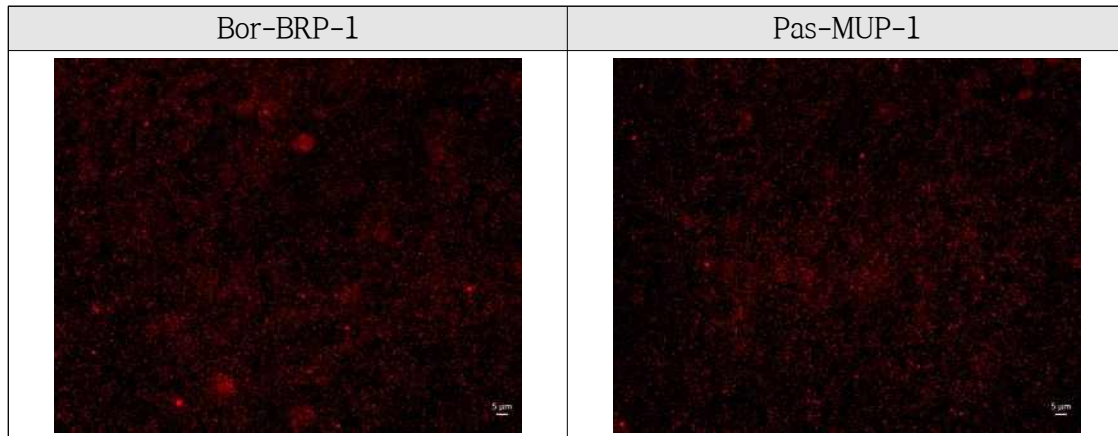
- CsCl로 정제한 박테리오파지를 회수한 뒤, 1× PBS로 buffer exchange
- ①의 시료에 25 μM EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin solution 처리
- ②의 시료에 0.025% glycine을 처리하여 반응 종료
- ③의 시료에 10 nM Qdot 처리 후 RT, 2 min
- 원심분리 (5,000 ×g, 5 min) 하여 상등액 회수

나. 형광 표지 박테리오파지 형광현미경 관찰

- 위의 방법에 따라 준비한 형광 표지 박테리오파지 시료는 아래의 방법으로 전처리를 하여 형광현미경 (fluorescent microscopy) 관찰하였음.

- ① 형광 표지 박테리오파지를 슬라이드 글라스에 10 μ l 점적
- ② 커버 글라스를 ①의 위에 올린 뒤 고정
- ③ 슬라이드 글라스를 뒤집어서 형광현미경 (Carl Zeiss, Axio Observer.Z1) 관찰

- 위의 방법으로 준비한 형광 표지 박테리오파지 시료를 형광현미경으로 관찰한 결과, 형광 signal을 확인할 수 있었음. 대표적 시험 결과 사진은 아래와 같음.



형광현미경을 이용한 형광 표지 박테리오파지의 관찰 ($\times 640$)

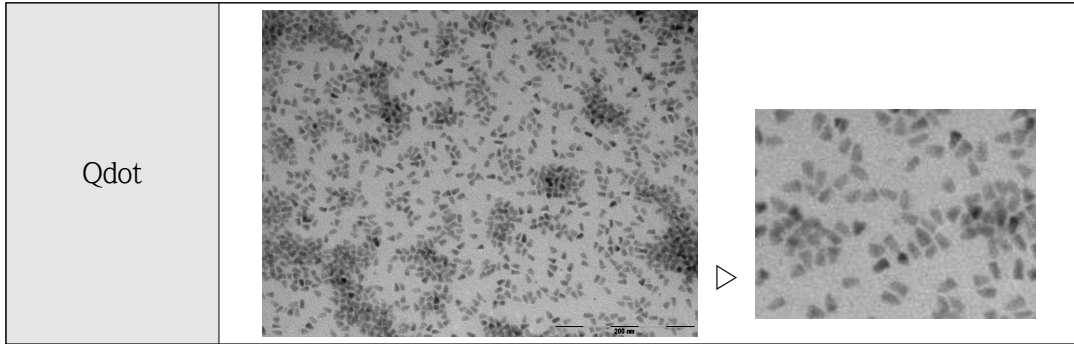
다. 형광 표지 박테리오파지 투과전자현미경 (TEM) 관찰

- 박테리오파지에 형광 표지 물질의 부착 여부 확인을 위한 투과전자현미경 촬영을 실시하였으며, 시료의 전처리는 아래와 같이 실시함.

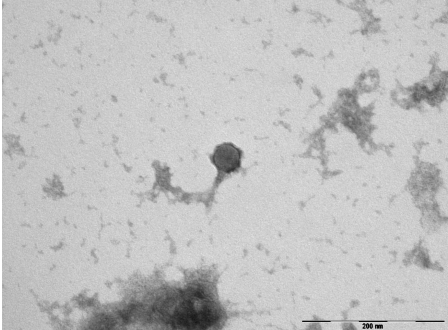
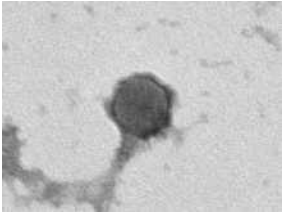
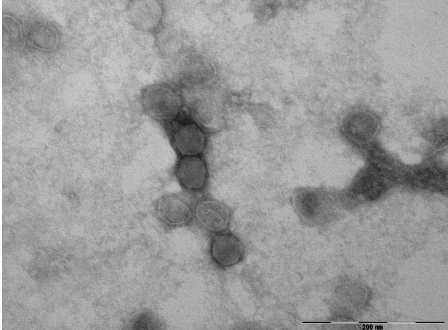

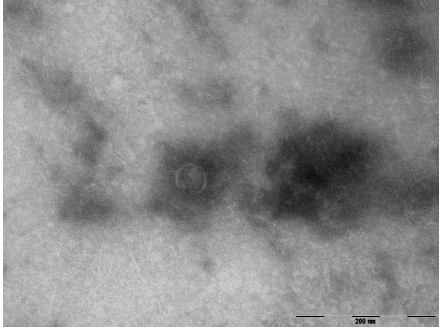

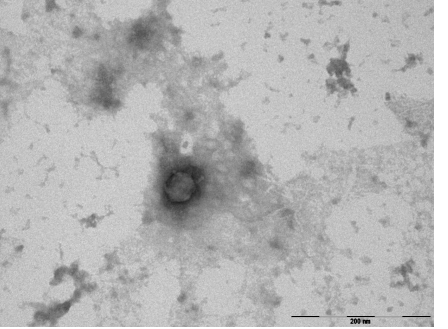
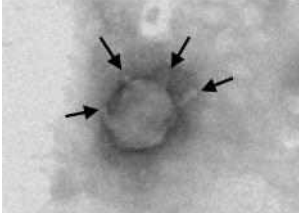
<역염색법 (Negative staining)>

형광 표지 물질과 박테리오파지 용액을 구리 격자 (copper grid)에 묻히고 2% 우라닐 아세테이트 (uranyl acetate)로 염색과 건조를 수행한 후 transmission electron microscopy (TEM)를 통하여 그 형태를 촬영

- 위의 방법에 따라 형광 표지 물질인 Qdot을 관찰한 사진은 아래와 같음.



형광 표지 물질의 투과전자현미경 관찰 결과 (×200K)

Bor-BRP-1		
Pas-MUP-1		
Qdot labeled Bor-BRP-1		
Qdot labeled Pas-MUP-1		

형광 표지 박테리오파지의 투과전자현미경 관찰 결과 (×200K)

- 형광 표지하지 않은 박테리오파지와 형광 표지 박테리오파지를 투과전자현미경으로 관찰하여 비교했을 때, 박테리오파지 외막 단백질 표면에 형광 표지 물질인 Qdot이 붙어있는 것을 확인함. 준비된 형광 표지 박테리오파지 시료를 이용하여 마우스 대상 체내 분포 조사 실험을 수행함.

라. 형광 표지 박테리오파지의 대상 세균에 대한 부착능 조사 시험

- 형광 표지한 박테리오파지의 경우, 형광 표지로 인한 본래 숙주에 대한 부착능이 상실될

수도 있기 때문에 이를 확인하기 위해 본 실험을 수행함. 본 실험에서 사용한 ‘LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit’ 는 살아있는 대상 박테리아와 사멸한 박테리아를 서로 다른 염색 시약으로 염색하여 형광으로 관찰할 수 있는 kit임. Kit 구성품 중 살아있는 박테리아만을 염색하는 시약을 이용하여 박테리아를 염색하고, 형광 표지 박테리오파지를 섞어서 대상 박테리아에 잘 부착하는지 여부를 형광 현미경을 이용하여 관찰함. 박테리아를 형광 염색 시약으로 염색하는 과정은 아래와 같음.

<박테리아 염색용 kit 및 시약>

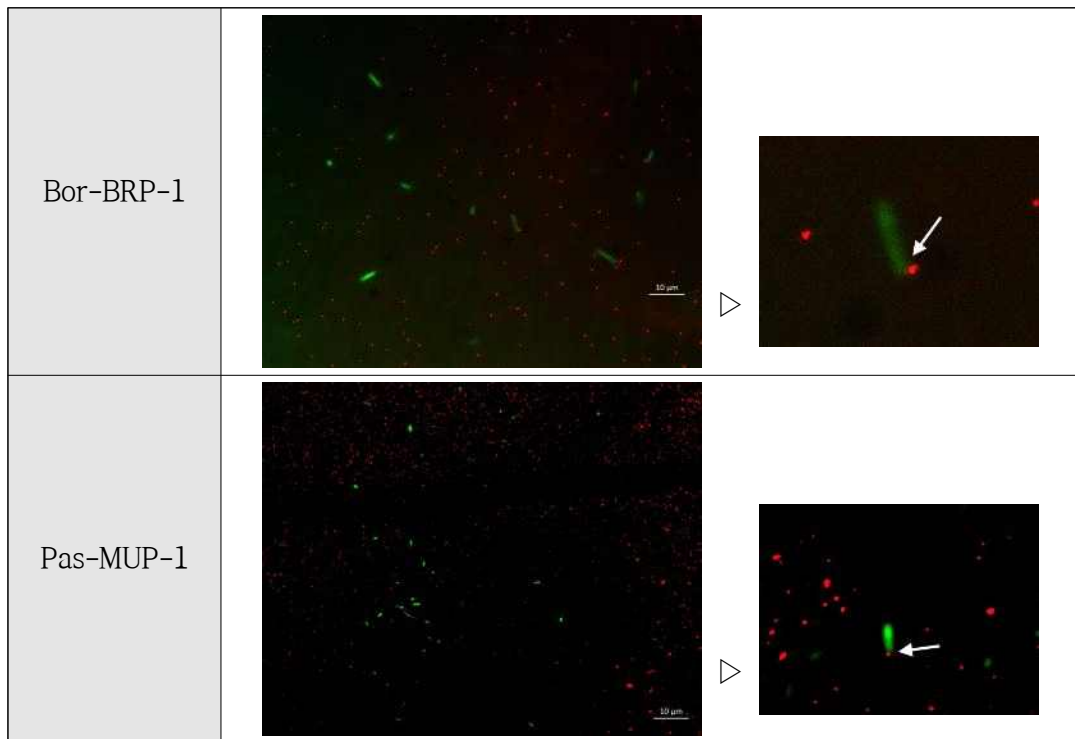
- i) LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit, for microscopy (Invitrogen, Cat No. L7012)
- ii) 0.85% NaCl

<박테리아 염색>

- ① 박테리아를 배지 25 ml에 OD₆₀₀=0.5까지 배양하여 원심분리 (10,000×g, 15 min)
- ② 상등액을 제거하고 1 ml 0.85% NaCl으로 resuspension
- ③ 50 ml tube에 옮긴 후 20 ml 0.85% NaCl 용액을 넣고 resuspension
- ④ 상온에서 1시간 (15분마다 vortexing) 반응 후 원심분리 (10,000×g, 15 min)
- ⑤ 상등액을 제거하고 20 ml 0.85% NaCl 용액을 넣고 resuspension 후 ④를 반복
- ⑥ 상등액을 제거하고 10 ml 0.85% NaCl 용액을 넣고 resuspension
- ⑦ 1.5 ml amber tube에 ⑥을 1 ml을 옮긴 뒤, kit의 Component A 1.5 μl를 첨가 후 vortexing
- ⑧ 상온에서 15분 반응

<현미경 촬영>

- ① 위에서 준비한 박테리아 500 μl와 형광 표지 박테리오파지 (108 pfu/ml)를 섞어줌.
- ② ①을 슬라이드 글라스에 10 μl 점적
- ③ 커버 글라스를 ②의 위에 올린 뒤 고정
- ④ 슬라이드 글라스를 뒤집어서 형광현미경 (Carl Zeiss, Axio Observer.Z1) 관찰



형광 표지 박테리오파지의 박테리아에 대한 부착능 관찰

- 시험 결과, 박테리아의 세포벽 표면에 형광 표지 박테리오파지가 부착해 있는 것을 최종적으로 확인할 수 있었음. 즉, 형광 표지로 인한 박테리오파지의 대상 박테리아에 대한 부착능은 크게 영향이 없음을 알 수 있었음. 또한, 형광 표지하지 않은 박테리오파지와 형광 표지한 박테리오파지의 역가를 조사해 본 결과 서로 간에 역가 차이가 크지 않음을 확인할 수 있었음.

박테리오파지 형광 표지 전, 후의 역가 비교 결과

박테리오파지	박테리오파지 역가 (pfu/ml)
형광 표지하지 않은 Bor-BRP-1	1.2×10^{10}
형광 표지한 Bor-BRP-1	1.0×10^{10}
형광 표지하지 않은 Pas-MUP-1	1.5×10^{10}
형광 표지한 Pas-MUP-1	1.2×10^{10}

마. 마우스 시험용 박테리오파지 시료 제조

- Qdot™ 655의 경우, 마우스 체내에서 형광 signal이 약한 것으로 확인되어 파장대가 높은 형광 dye를 사용하여 시료 제조를 하였음. 사용한 dye는 Qdot™ 800 Streptavidin Conjugate (Invitrogen, Q10171MP)이며, 시료 제조 방법은 상기 기술하였던 Qdot™ 655을 표지하는 방법과 동일한 조건으로 수행함.
- 형광 표지 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1을 마우스에 경구투여하여 조직 내 분포 양상을 파악하는 시험은 아래와 같이 수행되었음.

<시험동물>

- BALB/c nude mouse, 4 weeks, female



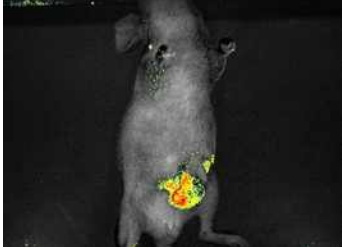
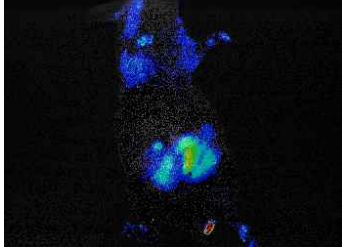
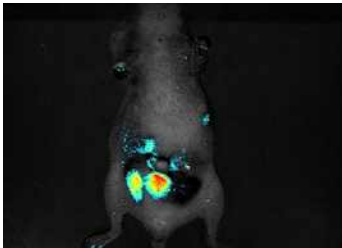
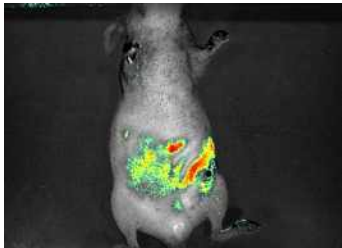
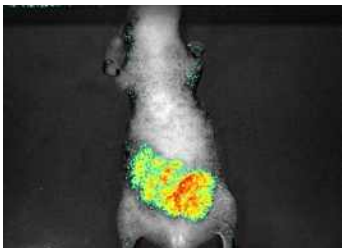
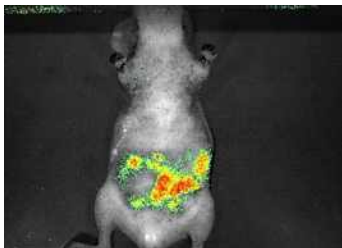
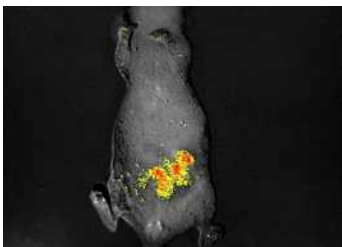
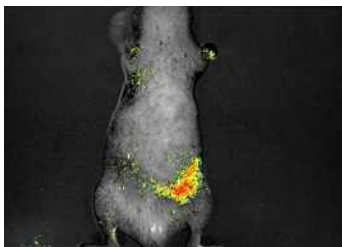
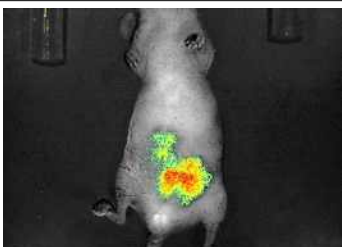
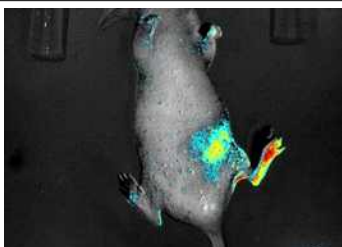
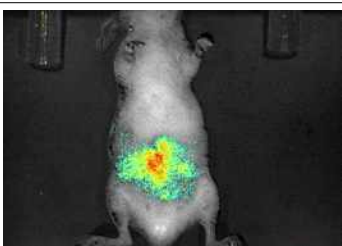
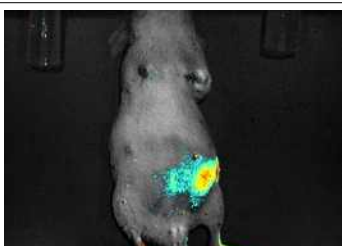
BALB/c nude mouse



Maestro II *in vivo* imaging system 장비

<실험 방법>

- ① 마우스에 형광 표지 박테리오파지의 경구투여 실시 (투여량: 200 μ l)
- ② 경구투여 후 2시간, 4시간, 3일, 7일, 10일, 12일 시점에 마우스를 마취시킨 후 Maestro II *in vivo* imaging system을 이용하여 체내 분포 양상을 조사

Samples Time, Day	Qdot labeled Bor-BRP-1	Qdot labeled Pas-MUP-1
2 hrs		
4 hrs		
3 days		
7 days		
10 days		
12 days		

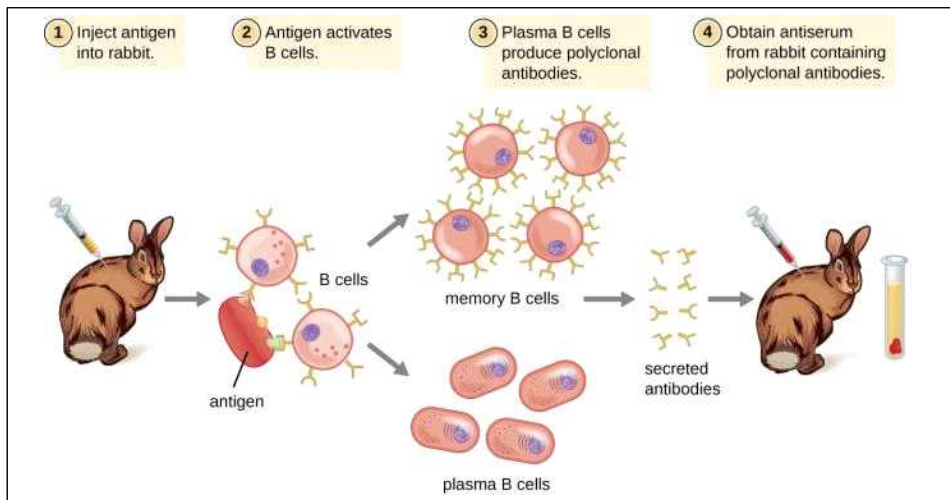
형광 표지 박테리오파지를 경구투여한 후 시간, 일자별 체내 형광 분포 양상 관찰

- 형광 표지 박테리오파지를 경구투여한 후, 12일까지 monitoring해 본 결과 대장 부분에

강한 형광 signal을 확인할 수 있었음. 표적 기관인 폐 조직 부근의 signal을 관찰하기 어려워서 경구투여한 마우스의 폐 조직을 적출하여 전 처리 후, 투여한 박테리오파지 특이 primer를 이용하여 PCR을 수행하였음. 그 결과 PCR 양성으로 확인되어 투여한 박테리오파지가 폐 조직까지 잘 전달되었음을 알 수 있었음. 또한 면역조직화학염색 (immunohistochemistry, IHC) 법을 이용하여 폐 조직에서 형광 박테리오파지의 signal을 관찰할 수 있었음 (제2협동기관 공동수행).

바. 박테리오파지 항체 제작

- 1차년도 연구에서 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1의 특이 항체 제작에 활용할 유전자를 선별하여 cloning한 유전자 (외막 단백질)를 대상으로 단백질 발현 유도 시험을 수행하였으나, 단백질 발현이 잘 되지 않아 polyclonal antibody 제작을 실시함. 항체 제작의 과정은 아래와 같음.



Polyclonal antibody의 제작 과정

- 위의 방법을 이용하여 polyclonal antibody를 제작하였으며, 개별 박테리오파지 ($\geq 10^9$ pfu/ml)를 토끼에 주사하여 총 4회 차까지 boosting을 진행하였음. 아래 그림은 1차 boosting과 4차 boosting하여 serum을 채취 후, 이를 이용하여 효소결합 면역침강 분석 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 실시하여 항체 역가를 조사한 결과임.

구분 횟수	Bor-BRP-1 polyclonal antibody	Pas-MUP-1 polyclonal antibody																																																																																		
1차	<p>ELISA test of 1st bleeding serum(Bor-BRP-1)</p> <table border="1"> <tr> <td>ELISA reader</td> <td>PerkinElmer Victor X3</td> <td>Antigen Coating</td> <td>2.5x10⁶ CFU/well</td> </tr> <tr> <td>Measurement filter</td> <td>450 nm</td> <td>2nd antibody (Rabbit IgG-HRP)</td> <td>1: 10,000 dilution</td> </tr> <tr> <td>Measurement mode</td> <td>Single Point Photo</td> <td>Substrate</td> <td>TMB</td> </tr> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Sample</th> <th rowspan="2">Dilution factor</th> <th colspan="2">Bor-BRP-1</th> </tr> <tr> <th>#1</th> <th>#2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">Pre-serum</td> <td>1:100</td> <td>1.125</td> <td>0.119</td> </tr> <tr> <td>1:100</td> <td>0.145</td> <td>0.388</td> </tr> <tr> <td rowspan="6">Test serum</td> <td>1:1,000</td> <td>0.538</td> <td>0.154</td> </tr> <tr> <td>1:5,000</td> <td>0.207</td> <td>0.137</td> </tr> <tr> <td>1:10,000</td> <td>0.133</td> <td>0.124</td> </tr> <tr> <td>1:50,000</td> <td>0.070</td> <td>0.094</td> </tr> <tr> <td>1:100,000</td> <td>0.051</td> <td>0.098</td> </tr> </tbody> </table>	ELISA reader	PerkinElmer Victor X3	Antigen Coating	2.5x10 ⁶ CFU/well	Measurement filter	450 nm	2 nd antibody (Rabbit IgG-HRP)	1: 10,000 dilution	Measurement mode	Single Point Photo	Substrate	TMB	Sample	Dilution factor	Bor-BRP-1		#1	#2	Pre-serum	1:100	1.125	0.119	1:100	0.145	0.388	Test serum	1:1,000	0.538	0.154	1:5,000	0.207	0.137	1:10,000	0.133	0.124	1:50,000	0.070	0.094	1:100,000	0.051	0.098	<p>ELISA test of 1st bleeding serum(Pas-MUP-1)</p> <table border="1"> <tr> <td>ELISA reader</td> <td>PerkinElmer Victor X3</td> <td>Antigen Coating</td> <td>2.5x10⁶ CFU/well</td> </tr> <tr> <td>Measurement filter</td> <td>450 nm</td> <td>2nd antibody (Rabbit IgG-HRP)</td> <td>1: 10,000 dilution</td> </tr> <tr> <td>Measurement mode</td> <td>Single Point Photo</td> <td>Substrate</td> <td>TMB</td> </tr> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Sample</th> <th rowspan="2">Dilution factor</th> <th colspan="2">Pas-MUP-1</th> </tr> <tr> <th>#1</th> <th>#2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">Pre-serum</td> <td>1:100</td> <td>0.141</td> <td>0.306</td> </tr> <tr> <td>1:100</td> <td>0.234</td> <td>0.533</td> </tr> <tr> <td rowspan="6">Test serum</td> <td>1:1,000</td> <td>0.125</td> <td>0.196</td> </tr> <tr> <td>1:5,000</td> <td>0.096</td> <td>0.115</td> </tr> <tr> <td>1:10,000</td> <td>0.081</td> <td>0.091</td> </tr> <tr> <td>1:50,000</td> <td>0.059</td> <td>0.056</td> </tr> <tr> <td>1:100,000</td> <td>0.046</td> <td>0.050</td> </tr> </tbody> </table>	ELISA reader	PerkinElmer Victor X3	Antigen Coating	2.5x10 ⁶ CFU/well	Measurement filter	450 nm	2 nd antibody (Rabbit IgG-HRP)	1: 10,000 dilution	Measurement mode	Single Point Photo	Substrate	TMB	Sample	Dilution factor	Pas-MUP-1		#1	#2	Pre-serum	1:100	0.141	0.306	1:100	0.234	0.533	Test serum	1:1,000	0.125	0.196	1:5,000	0.096	0.115	1:10,000	0.081	0.091	1:50,000	0.059	0.056	1:100,000	0.046	0.050
	ELISA reader	PerkinElmer Victor X3	Antigen Coating	2.5x10 ⁶ CFU/well																																																																																
Measurement filter	450 nm	2 nd antibody (Rabbit IgG-HRP)	1: 10,000 dilution																																																																																	
Measurement mode	Single Point Photo	Substrate	TMB																																																																																	
Sample	Dilution factor	Bor-BRP-1																																																																																		
		#1	#2																																																																																	
Pre-serum	1:100	1.125	0.119																																																																																	
	1:100	0.145	0.388																																																																																	
Test serum	1:1,000	0.538	0.154																																																																																	
	1:5,000	0.207	0.137																																																																																	
	1:10,000	0.133	0.124																																																																																	
	1:50,000	0.070	0.094																																																																																	
	1:100,000	0.051	0.098																																																																																	
	ELISA reader	PerkinElmer Victor X3	Antigen Coating	2.5x10 ⁶ CFU/well																																																																																
Measurement filter	450 nm	2 nd antibody (Rabbit IgG-HRP)	1: 10,000 dilution																																																																																	
Measurement mode	Single Point Photo	Substrate	TMB																																																																																	
Sample	Dilution factor	Pas-MUP-1																																																																																		
		#1	#2																																																																																	
Pre-serum	1:100	0.141	0.306																																																																																	
	1:100	0.234	0.533																																																																																	
Test serum	1:1,000	0.125	0.196																																																																																	
	1:5,000	0.096	0.115																																																																																	
	1:10,000	0.081	0.091																																																																																	
	1:50,000	0.059	0.056																																																																																	
	1:100,000	0.046	0.050																																																																																	
	4차	<p>ELISA test of final bleeding serum(Bor-BRP-1)</p> <table border="1"> <tr> <td>ELISA reader</td> <td>PerkinElmer Victor X3</td> <td>Antigen Coating</td> <td>1x10⁶ CFU/well</td> </tr> <tr> <td>Measurement filter</td> <td>450 nm</td> <td>2nd antibody (Rabbit IgG-HRP)</td> <td>1: 10,000 dilution</td> </tr> <tr> <td>Measurement mode</td> <td>Single Point Photo</td> <td>Substrate</td> <td>TMB</td> </tr> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Sample</th> <th rowspan="2">Dilution factor</th> <th colspan="2">Bor-BRP-1</th> </tr> <tr> <th>#1</th> <th>#2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">Pre-serum</td> <td>1:100</td> <td>0.353</td> <td>0.120</td> </tr> <tr> <td>1:100</td> <td>1.548</td> <td>0.458</td> </tr> <tr> <td rowspan="6">Test serum</td> <td>1:1,000</td> <td>0.683</td> <td>0.147</td> </tr> <tr> <td>1:5,000</td> <td>0.369</td> <td>0.087</td> </tr> <tr> <td>1:10,000</td> <td>0.234</td> <td>0.069</td> </tr> <tr> <td>1:50,000</td> <td>0.188</td> <td>0.050</td> </tr> <tr> <td>1:100,000</td> <td>0.131</td> <td>0.045</td> </tr> </tbody> </table>	ELISA reader	PerkinElmer Victor X3	Antigen Coating	1x10 ⁶ CFU/well	Measurement filter	450 nm	2 nd antibody (Rabbit IgG-HRP)	1: 10,000 dilution	Measurement mode	Single Point Photo	Substrate	TMB	Sample	Dilution factor	Bor-BRP-1		#1	#2	Pre-serum	1:100	0.353	0.120	1:100	1.548	0.458	Test serum	1:1,000	0.683	0.147	1:5,000	0.369	0.087	1:10,000	0.234	0.069	1:50,000	0.188	0.050	1:100,000	0.131	0.045	<p>ELISA test of final bleeding serum(Pas-MUP-1)</p> <table border="1"> <tr> <td>ELISA reader</td> <td>PerkinElmer Victor X3</td> <td>Antigen Coating</td> <td>1x10⁶ CFU/well</td> </tr> <tr> <td>Measurement filter</td> <td>450 nm</td> <td>2nd antibody (Rabbit IgG-HRP)</td> <td>1: 10,000 dilution</td> </tr> <tr> <td>Measurement mode</td> <td>Single Point Photo</td> <td>Substrate</td> <td>TMB</td> </tr> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Sample</th> <th rowspan="2">Dilution factor</th> <th colspan="2">Pas-MUP-1</th> </tr> <tr> <th>#1</th> <th>#2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">Pre-serum</td> <td>1:100</td> <td>0.169</td> <td>0.244</td> </tr> <tr> <td>1:100</td> <td>1.119</td> <td>1.168</td> </tr> <tr> <td rowspan="6">Test serum</td> <td>1:1,000</td> <td>0.343</td> <td>0.493</td> </tr> <tr> <td>1:5,000</td> <td>0.237</td> <td>0.324</td> </tr> <tr> <td>1:10,000</td> <td>0.236</td> <td>0.279</td> </tr> <tr> <td>1:50,000</td> <td>0.230</td> <td>0.211</td> </tr> <tr> <td>1:100,000</td> <td>0.169</td> <td>0.157</td> </tr> </tbody> </table>	ELISA reader	PerkinElmer Victor X3	Antigen Coating	1x10 ⁶ CFU/well	Measurement filter	450 nm	2 nd antibody (Rabbit IgG-HRP)	1: 10,000 dilution	Measurement mode	Single Point Photo	Substrate	TMB	Sample	Dilution factor	Pas-MUP-1		#1	#2	Pre-serum	1:100	0.169	0.244	1:100	1.119	1.168	Test serum	1:1,000	0.343	0.493	1:5,000	0.237	0.324	1:10,000	0.236	0.279	1:50,000	0.230	0.211	1:100,000	0.169
ELISA reader		PerkinElmer Victor X3	Antigen Coating	1x10 ⁶ CFU/well																																																																																
Measurement filter	450 nm	2 nd antibody (Rabbit IgG-HRP)	1: 10,000 dilution																																																																																	
Measurement mode	Single Point Photo	Substrate	TMB																																																																																	
Sample	Dilution factor	Bor-BRP-1																																																																																		
		#1	#2																																																																																	
Pre-serum	1:100	0.353	0.120																																																																																	
	1:100	1.548	0.458																																																																																	
Test serum	1:1,000	0.683	0.147																																																																																	
	1:5,000	0.369	0.087																																																																																	
	1:10,000	0.234	0.069																																																																																	
	1:50,000	0.188	0.050																																																																																	
	1:100,000	0.131	0.045																																																																																	
	ELISA reader	PerkinElmer Victor X3	Antigen Coating	1x10 ⁶ CFU/well																																																																																
Measurement filter	450 nm	2 nd antibody (Rabbit IgG-HRP)	1: 10,000 dilution																																																																																	
Measurement mode	Single Point Photo	Substrate	TMB																																																																																	
Sample	Dilution factor	Pas-MUP-1																																																																																		
		#1	#2																																																																																	
Pre-serum	1:100	0.169	0.244																																																																																	
	1:100	1.119	1.168																																																																																	
Test serum	1:1,000	0.343	0.493																																																																																	
	1:5,000	0.237	0.324																																																																																	
	1:10,000	0.236	0.279																																																																																	
	1:50,000	0.230	0.211																																																																																	
	1:100,000	0.169	0.157																																																																																	

ELISA를 통한 polyclonal antibody 역가 측정 결과

- 총 4차 boosting까지 수행하였으나, 항체 역가가 낮게 측정됨. 박테리오파지 Bor-BRP-1 과 Pas-MUP-1의 항체가 동물 체내에서 잘 형성되지 않는 것으로 판단되었음. 이는 아마도 동물 체내에서 두 가지 박테리오파지를 항원으로 잘 인식하지 않아 발생하는 현상으로 추정하였음. 낮은 항체 역가를 보이긴 했지만 제작된 polyclonal antibody를 이용하여 면역조직화학염색 시험을 제2협동연구기관에서 수행하였음.

3. 신규 박테리오파지의 확보, 특성화 및 증식/정제 공정 개발 확립

가. *Pasteurella multocida* 분리 및 특성화 (추가 연구)

- *Pasteurella multocida*는 capsular type에 따라 다양한 질병을 일으키는 것으로 알려져 있음. Type 별 숙주와 일으키는 질병은 아래와 같음.

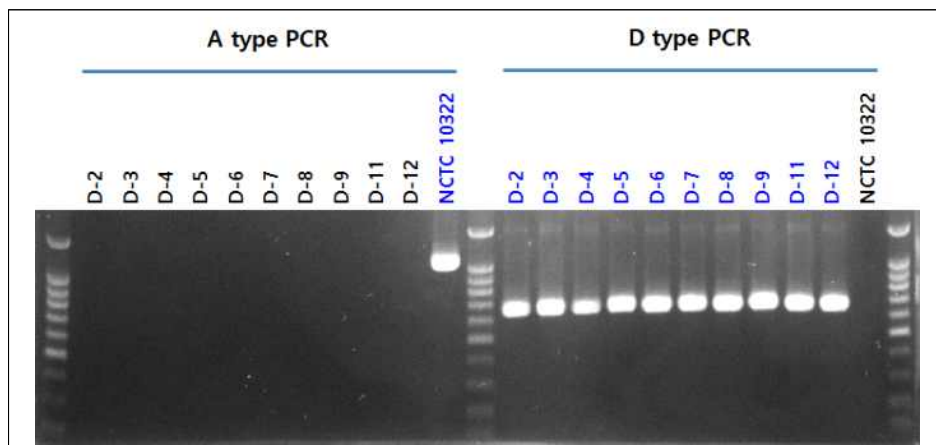
*Pasteurella multocida*의 type별 숙주 및 질병 정보

Capsular type	숙주	질병
A	소	유행성 폐렴
A	돼지	폐렴, 위축성 비염
A	토끼	기관지 폐염 (스너플스)
A	가금류	가금 콜레라
D	돼지	위축성 비염
D	돼지, 가금류	폐렴

- Capsular type은 A, B, C, D, E, F가 있지만, 위의 표에 제시된 것을 참고하면 실질적으로 병을 일으키는 주요 type은 A type과 D type임.
- 국내 양돈 농장 검체 (폐, 기관지 등)를 이용하여 *Pasteurella multocida* 검출 여부를 universal PCR을 통해 확인한 후 PCR 양성인 시료에서 순수 분리 및 배양 과정을 거쳐 총 10개의 균주를 확보하였음. 이들을 대상으로 ‘동물질병 표준검사법 (농림축산검역본부)’을 참고하여 typing PCR을 수행하였음. 시험에 사용한 Capsular typing용 primer 목록과 PCR 조건은 아래와 같음. NCTC 10322는 *Pasteurella multocida* A type control 균주로 사용하였음.

Pasteurella multocida capsular type PCR

Target gene	Primer sequence	Product size	Capsular type
<i>hyaD-hyaC</i>	F : TGCCAAAATCGCAGTCAG R : TTGCCATCATTGTGTCAGTG	1,044 bp	A
<i>dcbF</i>	F : TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC R : CATCTACCCACTCAACCATATCAG	657 bp	D
PCR conditions	95°C 5min, 30 cycle (95°C 30s, 55°C 30s, 72°C 30s), 72°C 5min		



보유 *Pasteurella multocida* capsular typing PCR 결과

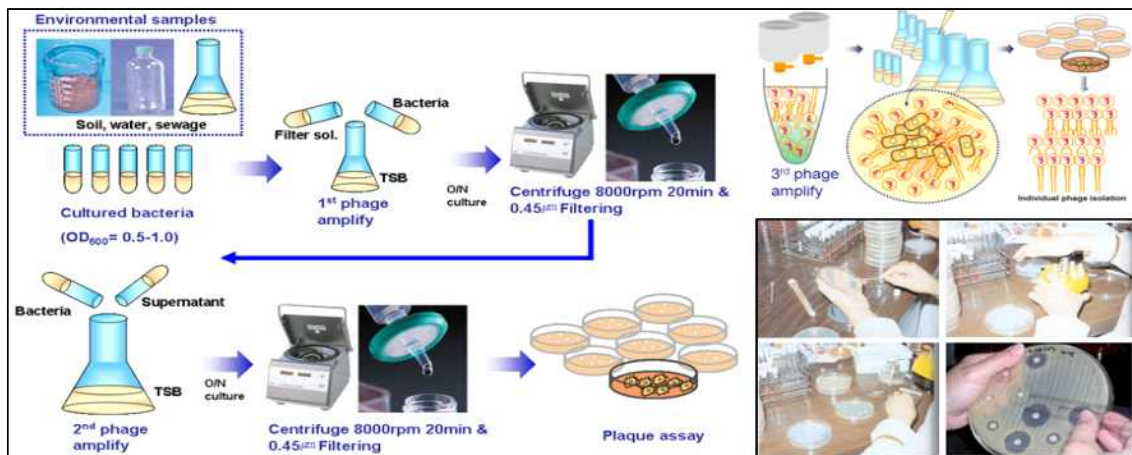
- 시험 결과, 확보한 *Pasteurella multocida* 는 모두 D type임을 확인할 수 있었음.

나. 신규 박테리오파지 확보

- 확보한 *Pasteurella multocida* D type 균주를 대상으로 신규 박테리오파지 스크리닝 시험을 진행하였음. 사용한 시료는 돼지 허파이며, 아래와 같이 전처리를 실시하였음.

- ① 멸균된 가위를 이용하여 허파를 적절한 크기로 잘라줌 (약 50~100g)
- ② 1× PBS에 ①의 시료를 넣고 10분 간격으로 vortexing을 1시간 수행
- ③ 시료를 4,500 rpm에서 20분간 원심분리
- ④ 상층액을 회수하여 0.45 μm filter를 이용하여 여과

- 위의 방법으로 얻어진 시료를 이용하여, 본 기관이 보유하고 있는 박테리오파지 스크리닝 방법에 따라 *Pasteurella multocida* D type 균주에 대한 박테리오파지 스크리닝을 실시하였음.

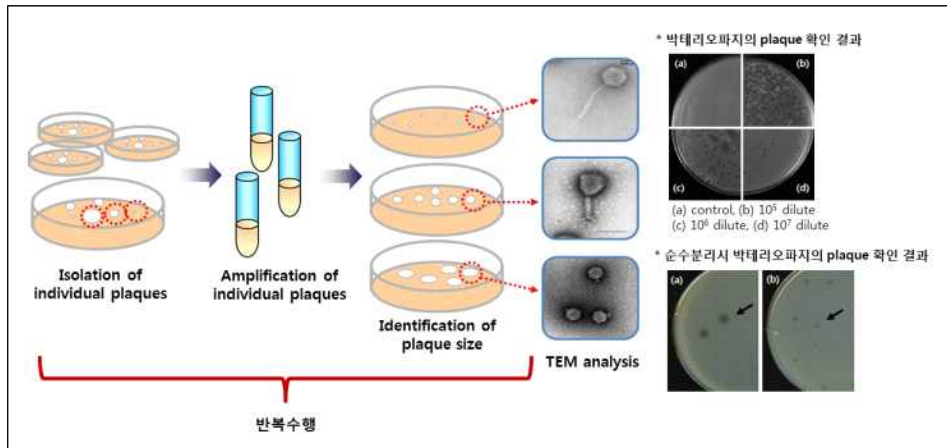


박테리오파지 스크리닝 과정을 보여주는 개략도

- 그 결과, *Pasteurella multocida* D type에 항균력을 갖는 신규 박테리오파지를 확보할 수 있었음.

다. 확보 박테리오파지의 순수분리 및 특성화

- 통상적으로 박테리오파지를 스크리닝하여 얻은 시료의 경우, 다양한 박테리오파지가 존재할 가능성이 있음. 따라서 순수분리 과정을 거쳐야 단일 박테리오파지를 확보할 수 있음. 이에 확보 박테리오파지의 순수분리의 실험법은 아래와 같이 수행하였음.



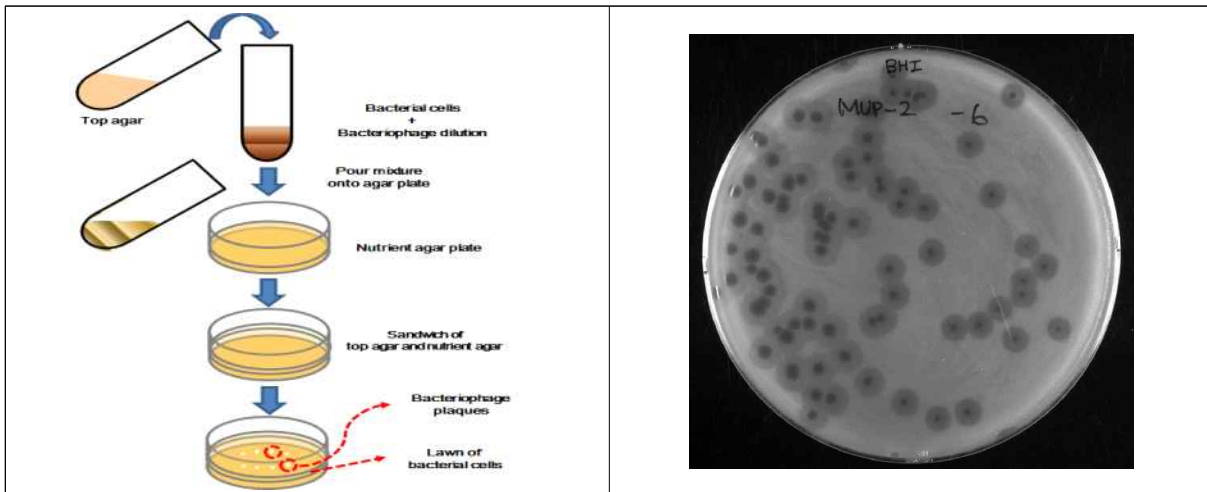
Plaque size 기반의 박테리오파지의 순수분리 과정

(1) 신규 박테리오파지의 순수분리

- 순수분리 여부는 본 연구기관이 보유하고 있는 방법에 따라 아래와 같이 단계별로 수행함.

단계	순수분리 완료 확인 과정
1	Top agar assay를 통한 plaque의 morphology 조사
2	투과전자현미경 (TEM) 조사를 통한 박테리오파지의 형태학적 특성 분석
3	Pulse-field gel electrophoresis (PFGE)를 통해 gDNA size 확인

- 1단계 과정을 통해, *Pasteurella multocida* D type 균주에 항균력을 갖는 박테리오파지 1종 (plaque diameter: 2 mm)을 확보할 수 있었음. 실험 방법과 plaque 형태는 아래와 같으며, 확보 박테리오파지는 Pas-MUP-2라 명명함.



Top agar assay를 통한 *Pasteurella multocida* 박테리오파지의 plaque morphology

(2) 확보 박테리오파지의 항균력 조사 및 유전적 차이 조사

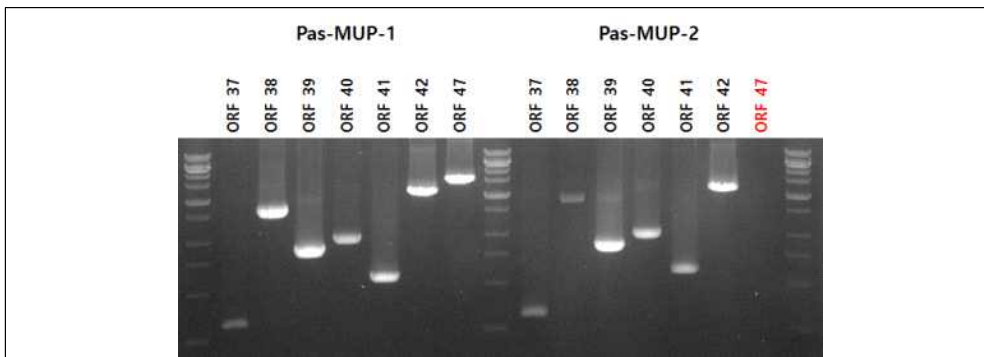
- 확보 박테리오파지 Pas-MUP-2를 대상으로 앞서 분리 동정한 D type 10 균주를 대상으

로 항균력 조사시험을 수행한 결과, D type 균주 모두에 대해 항균력이 있음을 확인하였음.

- 기확보 박테리오파지인 Pas-MUP-1과 신규 확보한 박테리오파지 Pas-MUP-2의 유전적 차이를 확인하기 위하여, 박테리오파지 Pas-MUP-1의 유전체 내 핵심 유전자를 선별한 후, 이를 대상으로 primer를 design한 후 PCR을 진행함. 선별한 핵심 유전자는 아래와 같음. 참고로 박테리오파지 Pas-MUP-1의 경우, 전체 유전체 내에 49개의 ORF (open reading frame)를 가지고 있음.

박테리오파지 Pas-MUP-1의 핵심 유전자 정보

No.	Start	Stop	size	Function
37	20734	21030	297	Virion structural protein
38	21033	22661	1629	Collar protein
39	22676	23551	876	Capsid assembly protein
40	23587	24594	1008	Capsid and scaffold protein
41	24666	25253	588	Tail tubular protein A
42	25259	27637	2379	Tail fiber protein
47	35049	38009	2961	Phage-related tail fiber protein

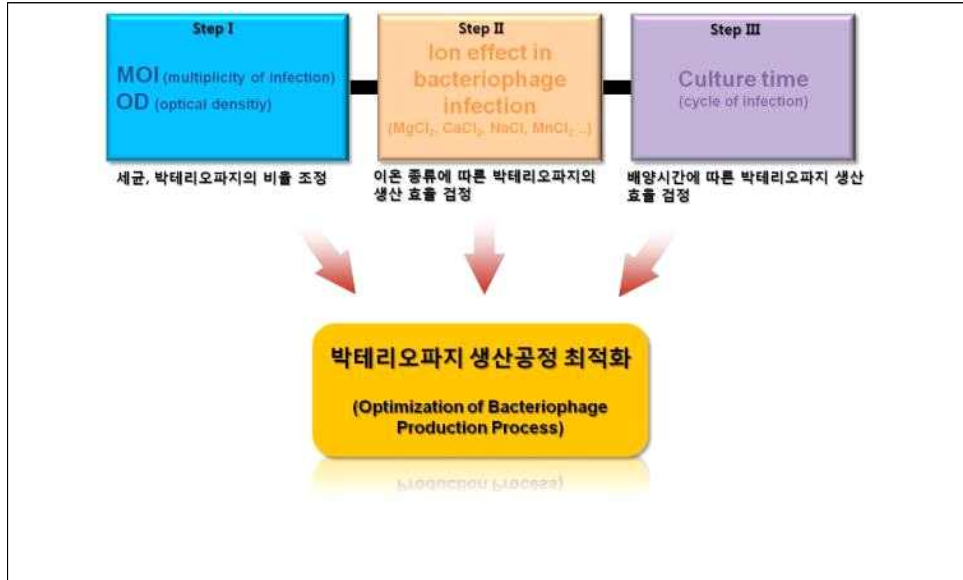


박테리오파지 Pas-MUP-1과 Pas-MUP-2의 핵심 유전자 차이 조사 결과

- PCR을 통해 박테리오파지 Pas-MUP-2는 Pas-MUP-1의 핵심 유전자들을 공유하긴 하나, ORF 47 (Phage-related tail fiber protein)이 Pas-MUP-2에서는 존재하지 않음을 확인함. 3차년도에 후속 연구 (whole genome sequencing 및 genome analysis 등)를 통해 신규 확보한 박테리오파지 Pas-MUP-2의 유전적 특성 분석 연구를 수행하였음. 아울러, 투과전자 현미경 촬영을 통해 박테리오파지 Pas-MUP-2의 형태학적 분석을 실시함.

라. 박테리오파지 증식 공정 구축

- 신규 확보한 박테리오파지는 추후 산업적 활용을 고려하여 적합 증식 공정 개발 연구를 수행함. 대상 박테리오파지는 1차년도에 확보한 *Streptococcus suis*에 항균력을 갖는 박테리오파지 3종 (Str-SUP-1, Str-SUP-2, Str-SUP-3)이며, 상세 실험 과정은 아래와 같음.



박테리오파지 증식 공정 구축 전략

증식 공정 구축 연구 재료

Host 박테리아	• <i>Streptococcus suis</i> KCTC 3557 strain		
증식 대상 박테리오파지	• Str-SUP-1	• Str-SUP-2	• Str-SUP-3
배지	• Bacto™ Todd Hewitt Broth (THB, BD, Cat. No. 249240) • Bacto™ Agar (BD, Cat. No. 214010)		
양이온	• Calcium chloride (CaCl ₂ ; Amresco, Cat. No. 0556) • Magnesium chloride (MgCl ₂ ; Sigma, Cat. No. M8266)		

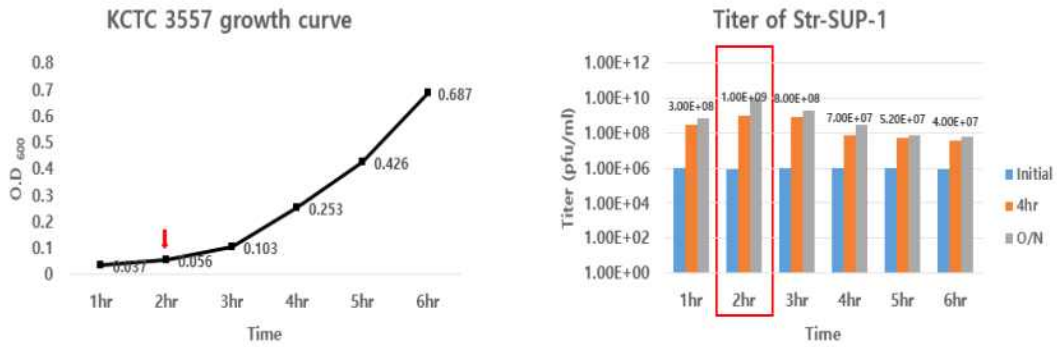
(1) Small scale 증식 조건 설정

(가) 적정 infection 시점 설정 실험

- ① 250 ml flask에 100 ml의 THB를 첨가한 다음에 O/N culture한 박테리아 배양액을 1/100 volume 비율로 접종하여 잘 섞어줌
- ② 50 ml conical tube에 ①에서 준비한 박테리아 배양액 10 ml씩을 분주한 다음, 이 tube들을 37°C incubator에서 배양
- ③ 배양 1, 2, 3, 4, 5, 6 시간 후 해당 실험 tube에 최종농도가 10 mM이 되도록 CaCl₂를 첨가한 후 잘 섞어준 다음 박테리오파지 (Stock titer: 1.0×10^8 pfu/ml) 를 100 μ l씩 첨가하여 infection을 실시하고, infection 직후 (initial)와 infection 후 4시간 및 O/N 경과 시점에서 sampling을 실시한 다음 top agar assay를 통해 박테리오파지 역가를 확인

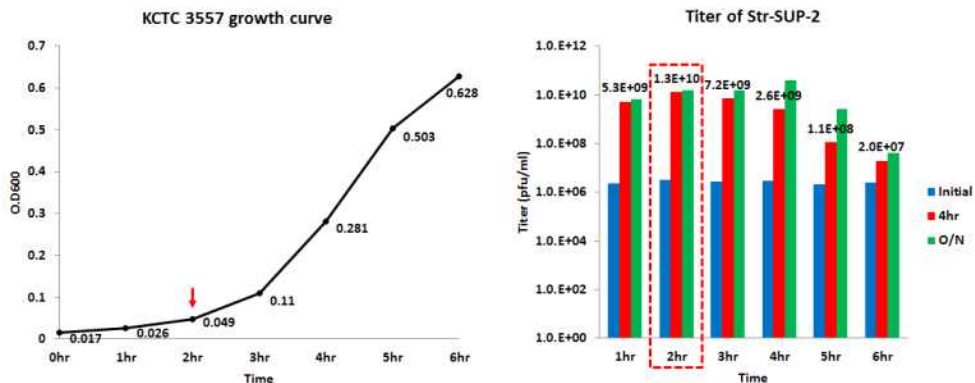
- 위의 실험방법으로 얻어진 결과는 아래와 같음.

Small scale - 적정 infection 시점 설정 실험 (Str-SUP-1)



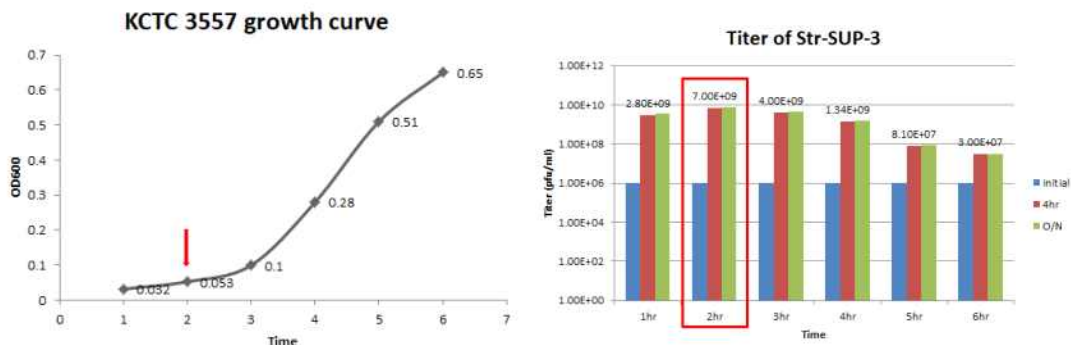
- 배양 2 시간째 (OD₆₀₀ = 0.056)에서 박테리오파지 Str-SUP-1의 infection을 실시한 경우가 가장 높은 최종 역가를 나타냄을 확인함

Small scale - 적정 infection 시점 설정 실험 (Str-SUP-2)



- 배양 2 시간째 (OD₆₀₀ = 0.049)에서 박테리오파지 Str-SUP-2의 infection을 실시한 경우가 가장 높은 최종 역가를 나타냄을 확인함

Small scale - 적정 infection 시점 설정 실험 (Str-SUP-3)



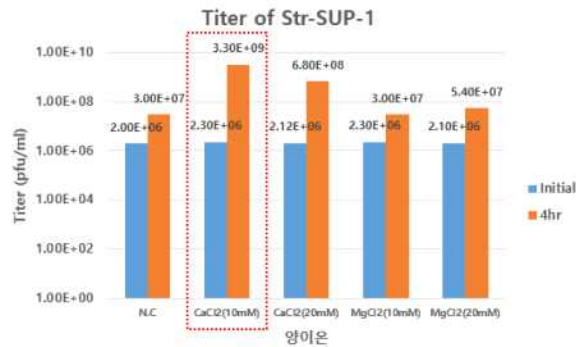
- 배양 2 시간째 (OD₆₀₀ = 0.053)에서 박테리오파지 Str-SUP-3의 infection을 실시한 경우가 가장 높은 최종 역가를 나타냄을 확인함

(나) 적정 양이온 설정 실험

- ① 250 ml flask에 100 ml의 THB를 첨가한 다음에 O/N culture한 박테리아 배양액을 1/100 volume 비율로 접종하여 잘 섞어준 다음 OD₆₀₀ = 0.05에 도달할 때까지 37°C 에서 배양
- ② 박테리오파지를 infection 시키기에 적절한 OD₆₀₀ = 0.05에 도달하면 ①의 배양액을 50 ml conical tube에 10 ml씩 분주
- ③ ②에서 준비한 50 ml conical tube 8개 각각에 CaCl₂ 및 MgCl₂의 최종농도가 10 mM 과 20 mM이 되도록 첨가
- ④ 양이온들이 tube내에서 잘 섞이도록 ③의 tube들을 vortex하여 잘 섞어준 후, 박테리 오파지 (Stock titer: 1.0 × 10⁸ pfu/ml)를 100 μl씩 첨가하여 infection을 실시하고 37°C 에서 배양
- ⑤ Infection 직후 (initial)와 증식 후 4 시간 경과시점에 sampling을 실시하여 top agar assay로 박테리오파지 역가를 확인

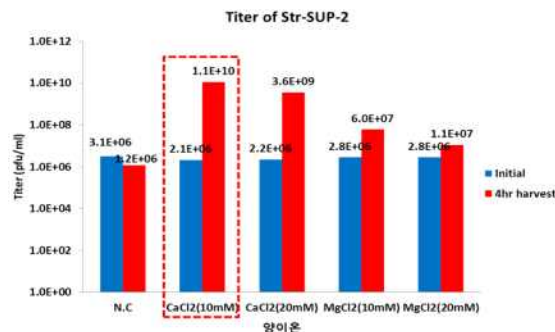
- 위의 실험방법으로 얻어진 결과는 아래와 같음.

Small scale - 적정 양이온 설정 실험 (Str-SUP-1)



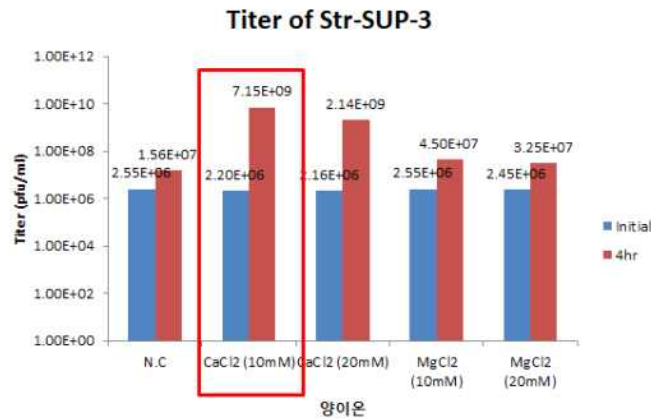
- CaCl₂를 최종농도가 10 mM이 되도록 첨가한 후 박테리오파지 Str-SUP-1의 infection을 실시한 경우에서 가장 높은 역가를 나타냄을 확인함

Small scale - 적정 양이온 설정 실험 (Str-SUP-2)



- CaCl₂를 최종농도가 10 mM이 되도록 첨가한 후 박테리오파지 Str-SUP-2의 infection을 실시한 경우에서 가장 높은 역가를 나타냄을 확인함

Small scale - 적정 양이온 설정 실험 (Str-SUP-3)



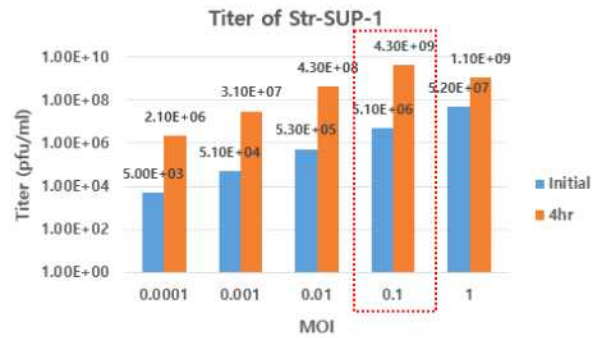
- CaCl₂를 최종농도가 10 mM이 되도록 첨가한 후 박테리오파지 Str-SUP-3의 infection을 실시한 경우에서 가장 높은 역가를 나타냄을 확인함

(다) 적정 MOI 설정 실험

- ① 250 ml flask에 100 ml의 THB를 첨가한 다음에 O/N culture한 박테리아 배양액을 1/100 volume 비율로 접종하여 잘 섞어준 다음 OD₆₀₀ = 0.05에 도달할 때까지 37°C 에서 배양
- ② 박테리오파지를 infection 시키기에 적정한 OD₆₀₀ = 0.05에 도달하면 ①의 배양액을 50 ml conical tube에 10 ml씩 분주하고 최종농도가 10 mM이 되도록 CaCl₂를 배지에 첨가
- ③ ②에서 준비한 50 ml conical tube 5개 각각에 박테리오파지를 MOI = 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0이 되도록 각각 infection을 실시
- ④ 박테리오파지가 tube내에서 잘 섞이도록 ③의 tube들을 vortex하여 잘 섞어 준 후, infection 직후 (initial)와 증식 후 4 시간 경과시점에 sampling을 실시하여 top agar assay로 박테리오파지 역가를 확인

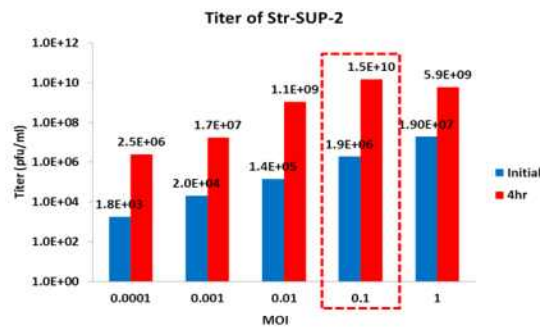
- 위의 실험방법으로 얻어진 결과는 아래와 같음.

Small scale - 적정 MOI 설정 실험 (Str-SUP-1)



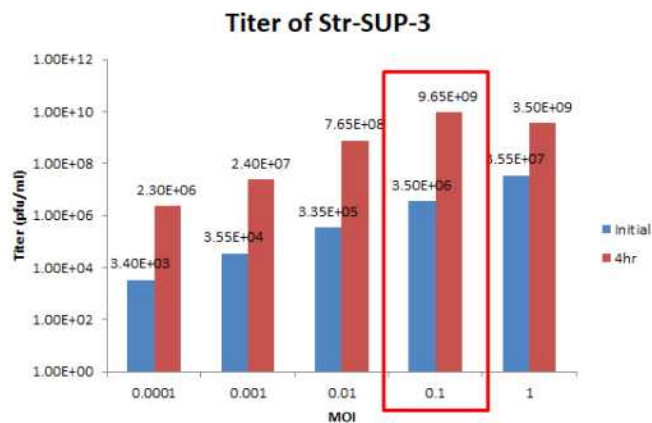
- MOI= 0.1 수준으로 infection하여 4 시간 배양 시, 가장 높은 역가를 나타냄을 확인함

Small scale - 적정 MOI 설정 실험 (Str-SUP-2)



- MOI= 0.1 수준으로 infection하여 4 시간 배양 시, 가장 높은 역가를 나타냄을 확인함

Small scale - 적정 MOI 설정 실험 (Str-SUP-3)



- MOI= 0.1 수준으로 infection하여 4 시간 배양 시, 가장 높은 역가를 나타냄을 확인함

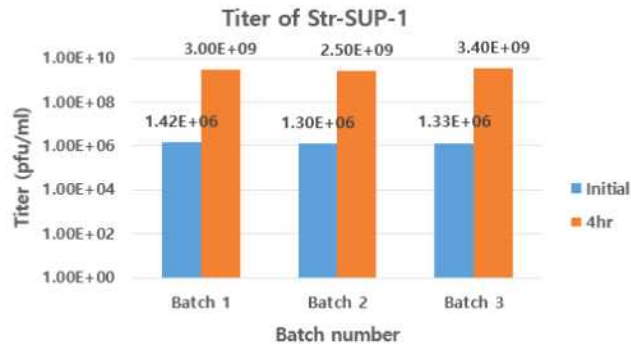
(2) Large scale에서의 증식 조건 설정

(가) 500 ml 증식 공정 확인 실험

- ① 2 L flask에 500 ml의 THB와 O/N culture한 박테리아 배양액을 1/100 volume 비율로 접종하여 37°C incubator에서 배양 (2 batches)
- ② OD₆₀₀ = 0.05가 될 때까지 배양한 후, 최종농도가 10 mM이 되도록 CaCl₂를 첨가한 다음 박테리오파지 (Stock titer: 1.0 × 10⁸ pfu/ml) 를 MOI = 0.1이 되도록 infection 시키고, infection 직후 (initial)와 infection 후 4 시간 경과 시점에 sampling을 실시한 다음 top agar assay로 박테리오파지 역가를 조사

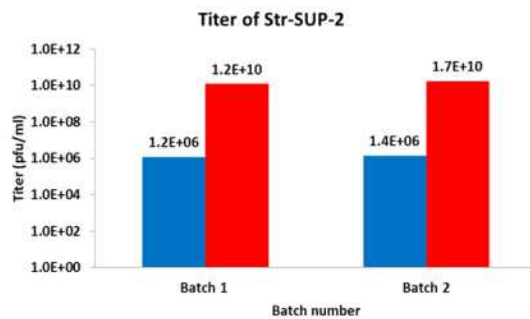
- 위의 실험방법으로 얻어진 결과는 아래와 같음.

Large scale - 500 ml 증식 공정 설정 실험 (Str-SUP-1)



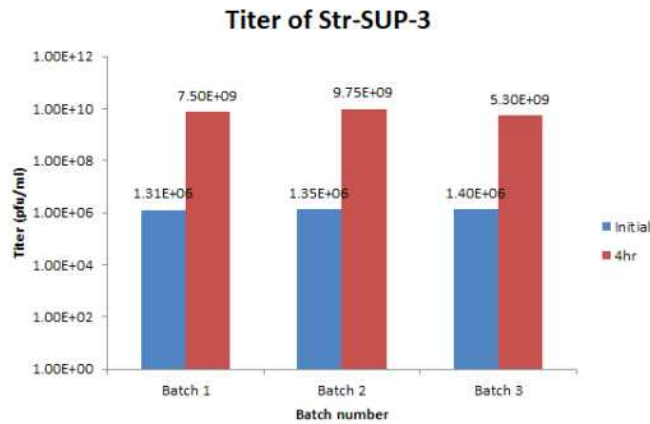
- OD₆₀₀ = 0.05에서 최종농도가 10 mM이 되도록 CaCl₂를 첨가하여 MOI = 0.1로 infection을 실시한 다음, 4 시간 동안 박테리오파지를 증식시킨 3 batch 모두에서 2.5 × 10⁹ pfu/ml 이상의 역가를 갖는 박테리오파지 증식액을 확보할 수 있었음.

Large scale - 500 ml 증식 공정 설정 실험 (Str-SUP-2)



- OD₆₀₀ = 0.05에서 최종농도가 10 mM이 되도록 CaCl₂를 첨가하여 MOI = 0.1로 infection을 실시한 다음, 4 시간 동안 박테리오파지를 증식시킨 2 batch 모두에서 1.2 × 10¹⁰ pfu/ml 이상의 역가를 갖는 박테리오파지 증식액을 확보할 수 있었음.

Large scale - 500 ml 증식 공정 설정 실험 (Str-SUP-3)



- OD₆₀₀ = 0.05에서 최종농도가 10 mM이 되도록 CaCl₂를 첨가하여 MOI = 0.1로 infection을 실시한 다음, 4 시간 동안 박테리오파지를 증식시킨 3 batch 모두에서 5.0 × 10⁹ pfu/ml 이상의 역가를 갖는 박테리오파지 증식액을 확보할 수 있었음.

- 증식 공정 개발 연구를 통해, 3종의 박테리오파지 (Str-SUP-1, Str-SUP-2, Str-SUP-3) 모두 10⁹ pfu/ml 이상의 titer를 갖는 증식액을 확보할 수 있었음. 3차년도에 설정된 증식 공정을 바탕으로 제조 공정을 scale up하여 시제품으로 적합한 증식 공정 최적화 연구를 수행함.

(3) 박테리오파지 정제 공정 구축

- 1차년도에 구축한 박테리오파지 정제 공정을 활용하여 박테리오파지 Str-SUP-1, Str-SUP-2, Str-SUP-3의 정제 공정 개발 연구를 수행하였음. 정제는 PEG침전법에 기반한 정제공정을 적용하였고, 이를 통해 3종의 박테리오파지 모두 10¹⁰ pfu/ml 이상의 titer를 갖는 정제액 (순도 80% 이상)을 확보 할 수 있었음.

1	원심분리	박테리오파지 배양액을 20분간 8,000 rpm 조건에서 원심분리 하여 상층액 회수
2	Filtration	상층액을 0.45μm로 filtration
3	PEG 첨가	Filtrate에 1/6 부피만큼의 20% PEG 8000/2.5M NaCl 용액 첨가
4	침전	4°C에서 overnight 동안 침치하여 박테리오파지 침전
5	원심분리	박테리오파지 침전액을 20분간 8,000 rpm 조건으로 원심분리 하여 박테리오파지 펠렛 확보
6	PEG 첨가	상층액 제거 후 박테리오파지 펠렛을 Tris buffer로 푼 후, 3번 과정과 동일 방식으로 PEG 첨가
7	침전	4°C에서 1 시간 동안 침치하여 박테리오파지 침전
8	원심분리	박테리오파지 배양액을 10분간 14,000 rpm 조건으로 원심분리
9	회수	상층액 제거 후 박테리오파지 펠렛을 적절한 부피의 Tris buffer에 풀어서 박테리오파지액 확보

박테리오파지의 PEG 침전에 기반한 정제 공정

<제1협동연구기관>

1. Porcine primary tracheal epithelial cell 배양법 확립

- Porcine primary tracheal epithelial cells; (P-6033; isolated from porcine tracheal tissue)
Cell biologics를 통해 구입하여 하기 조건에서 배양함.

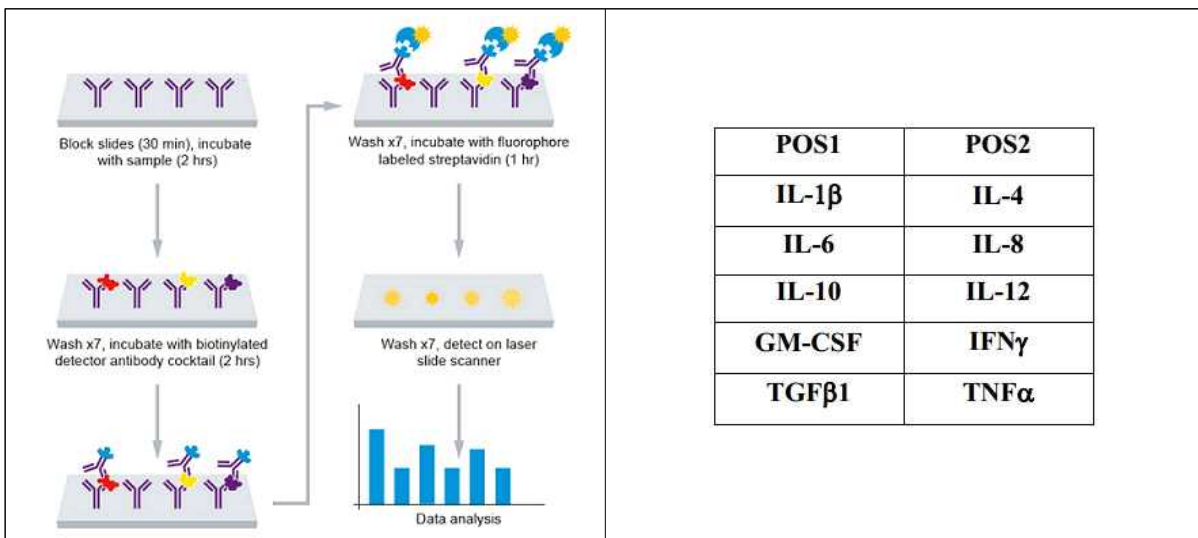
- ① 2% gelatin으로 dish coating
 - ② Porcine primary tracheal epithelial cells stock을 상온에서 해동하여 DMEM 배지 첨가 후 dish 에 분주시킴
 - ③ 2 시간 후 새로운 DMEM 배지로 교체해주고 37°C incubator (air 95%, CO₂ 5%)에서 배양시킴
 - ④ 다음날 현미경으로 세포를 관찰하여 confluency를 확인하고, 세포 수가 적은 경우에 fresh한 DMEM 배지로 교체한 후 37°C incubator에 하루 더 배양시킴
; 다음날 배양된 세포를 현미경 관찰하여 세포수가 실험하기 적당한 수준 (90%이상 confluency)이 되었는지 여부를 확인함
 - ⑤ Incubator에서 dish를 꺼내 aspirator를 이용해 DMEM 배지를 모두 회수해 버리고, PBS 로 wash 해준 다음 trypsin- EDTA for primary cell 1 ml를 넣어 37°C incubator 상에서 5분간 정치시킴
 - ⑥ 세포가 잘 떨어졌는지 여부를 확인하고, trypsin neutralizing solution을 이용하여 세포를 부유시키고 부유액 모두를 15 ml conical tube에 넣음
 - ⑦ 원심분리 (3000 ×g 2 분) 실시하여 상층액을 버림
 - ⑧ DMEM 배지를 넣은 후 세포를 pipetting하여 잘 부유시킴
 - ⑨ 일부는 실험에 사용하고 일부는 amplify 하여 stock 제조함
- * 3일마다 계대 배양하여 1주간 세포 증식 여부를 확인한 결과, 정상적으로 세포 성장이 잘 유지되고 있음을 확인함

2. 돼지 호흡기 질환 원인균을 primary cells에 처치 후 cytokine array 실시

- *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*를 이용하여 primary cell에 처치 후 cytokine 변화 양상을 파악하기 위해 cytokine array 시험을 아래와 같은 방법으로 실시함.

- ① Primary cell을 6 well plate에 5×10^5 cell 수준으로 분주한 후 confluency에 도달되기 하루 전 FBS를 starvation 시킴
- ② *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* 균을 PBS wash 후 각각 10^6 , 10^7 , 10^8 cfu/ml 수준으로 배양된 primary cell에 처치하여 감염을 유도함
- ③ 균 처치 후 4시간 시점에 6 well plate를 꺼내고 $5,000 \times g$ 로 원심분리하여 배양 세포와 균을 모두 제거하고 세포 배양 상층액 만을 회수하도록 함
; 이 때 돼지 호흡기 상피세포는 Trizol을 이용하여 total RNA를 추출한 후 cDNA를 제작하여 RT-PCR을 실시함
- ④ 확보된 세포배양액은 Abcam porcine cytokine antibody array A kit (ab197479)를 이용하여 cytokine profile 분석하고, signal은 ECL (enhanced chemoluminescence) 방법으로 최종 결과를 확인함.

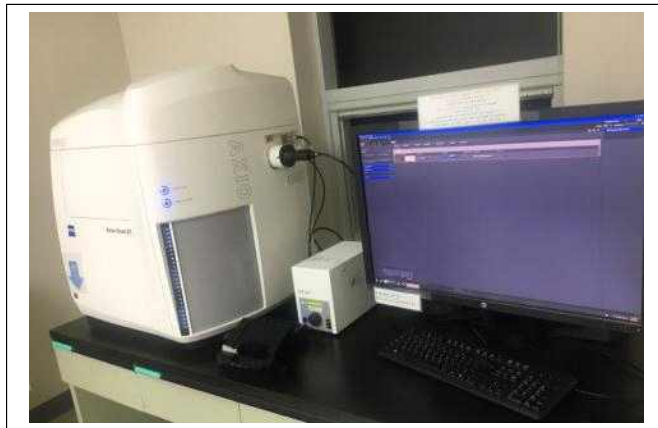
- Cytokine array 분석 모식도 및 본 시험에 사용한 kit를 이용하여 분석 가능한 cytokine의 종류를 제시하면 아래와 같음.



Cytokine array 분석의 개략도

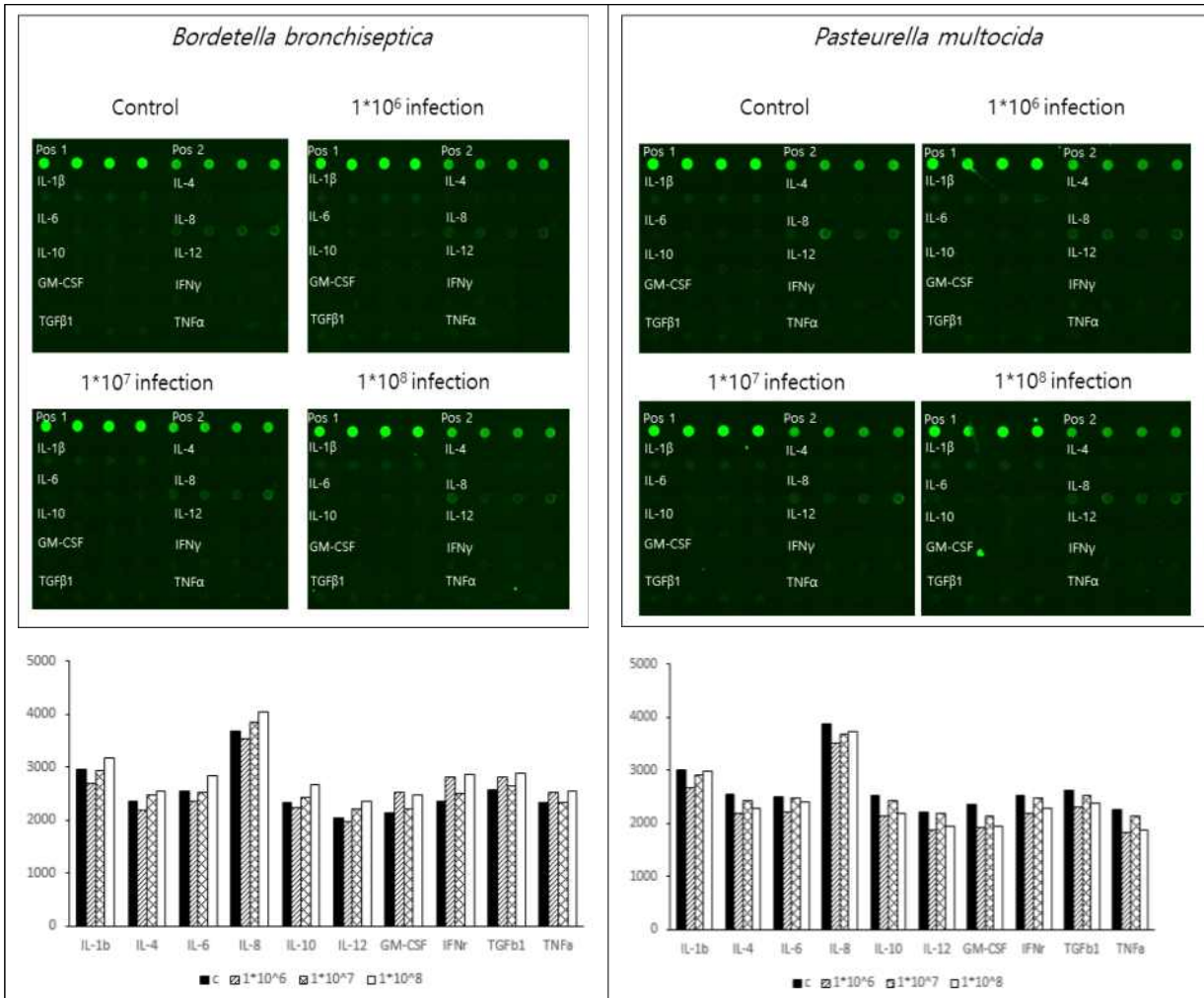
분석 가능한 cytokine의 리스트

- 부산대학교 공동실험실습관에 보유하고 있는 디지털 형광 슬라이드 스캐너 (Digital Fluorescence Slide Scanner; Axio Scan Z1)을 이용하여 분석함.



디지털 형광 슬라이드 스캐너

- 상기 장비가 제공하는 소프트웨어를 이용하여 스캔된 형광신호를 정량적으로 측정 후 Pos1, Pos2를 이용하여 값을 보정하고 그에 따른 정량적 분석 결과는 다음과 같음.



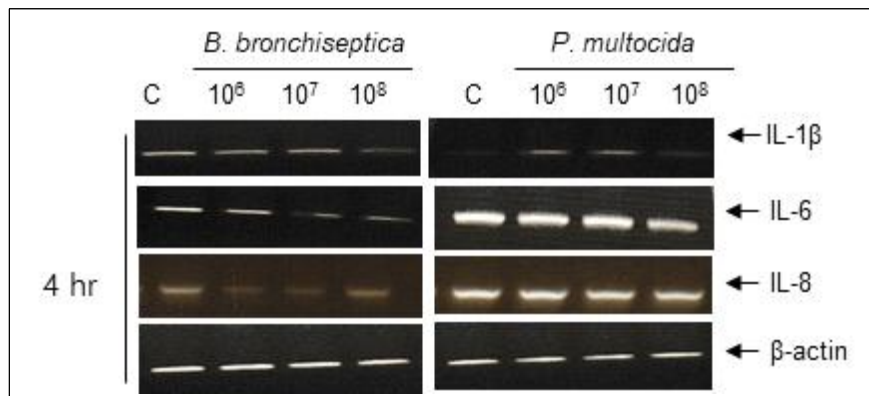
cytokine array 결과 (좌: *B. bronchiseptica*, 우: *P. multocida*)

- Primary cells에서 *B. bronchiseptica*, *P. multocida* 감염 시 두 균주 모두 의미 있는 cytokine의 변화가 관찰되지 않았음.

3. Reverse Transcriptase-PCR 시행

- Cytokine array를 바탕으로 해당되는 cytokine의 primer를 주문·제작하여 cytokine의 gene expression 변화를 확인하였음. primer sequence는 아래 제시함.

Primer (product size)	Forward	Reverse
β -actin (233 bp)	5' -GGACTTCGAGCAGGAGATGG-3'	5' -GCACCGTGTGGCGTAGAGG-3'
IL-1 β (202 bp)	5' -GGGATCAAGGGAAAGAATCTG-3'	5' -CTGCTTGAGAGGTGCTGATGT-3'
IL-6 (493 bp)	5' -ATGAACTCCCTCTCCACAAGC-3'	5' -TGGCTTTGTCTGGATTCTTTC-3'
IL-8 (266 bp)	5' -TTTCTGCAGCTCTCTGTGAGG-3'	5' -CTGCTGTTGTTGTTGCTTCTC-3'



RT-PCR 결과

- Cytokine array와 RT-PCR 결과 primary cell에서 *B. bronchiseptica*, *P. multocida*에 의한 cytokine의 의미 있는 변화가 확인되지 않아 돼지 호흡기 상피세포 (PT-K75 cell)에서 상기균을 감염시킨 후 그 변화를 확인해보고자 하였음.

4. 돼지 호흡기 질환 원인균과 박테리오파지의 세포독성평가 실시

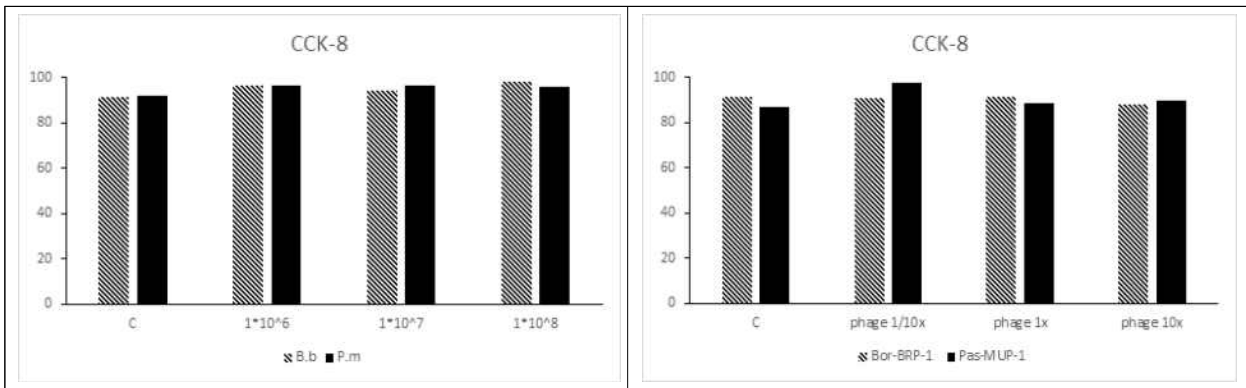
- 호흡기 질환 원인균 (*Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*)과 박테리오파지 (Bor-BRP-1, Pas-MUP-1)를 돼지 호흡기 상피세포 (PT-K75) 에 처치 후 다음과 같이 세포독성평가를 실시하였음. 실험 방법은 아래와 같음.

- ① PT-K75 세포를 96 well plate에 well 당 1×10^4 cell 갯수로 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 subculture 후 *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*를 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 cfu/ml로 각각 24시간 처리함.
- ② 박테리오파지 (Bor-BRP-1, Pas-MUP-1)는 각각 *Bordetella bronchiseptica* (1×10^7), *Pasteurella multocida* (1×10^6) 농도의 1/10 배, 1배, 10배 농도로 24시간 처리함.
- ③ 균과 박테리오파지를 같이 처리했을 때의 세포 독성검사를 시행함. 균을 24시간 처리 후 박테리오파지를 24시간 처리, 박테리오파지를 24시간 처리 후 균을 24시간 처리하는 방법으로 시행하였음.

<i>Bordetella bronchiseptica</i> (1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 cfu/ml) 24hr	<i>Pasteurella multocida</i> (1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 cfu/ml) 24hr
Bor-BRP-1 (1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 cfu/ml) 24hr	Pas-MUP-1 (1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 cfu/ml) 24hr
Bor-BRP-1 (1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 cfu/ml) 24hr → <i>Bordetella bronchiseptica</i> (1×10^7) 24hr	Pas-MUP-1 (1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 cfu/ml) 24hr → <i>Pasteurella multocida</i> (1×10^6) 24hr
<i>Bordetella bronchiseptica</i> (1×10^7) 24hr → Bor-BRP-1 (1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 cfu/ml) 24hr	<i>Pasteurella multocida</i> (1×10^6) 24hr → Pas-MUP-1 (1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 cfu/ml) 24hr

- ④ CCK-8 용액을 각 well 당 10 μ l 씩 분주하여 2시간동안 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 triplicate으로 cell viability를 검사하였음.

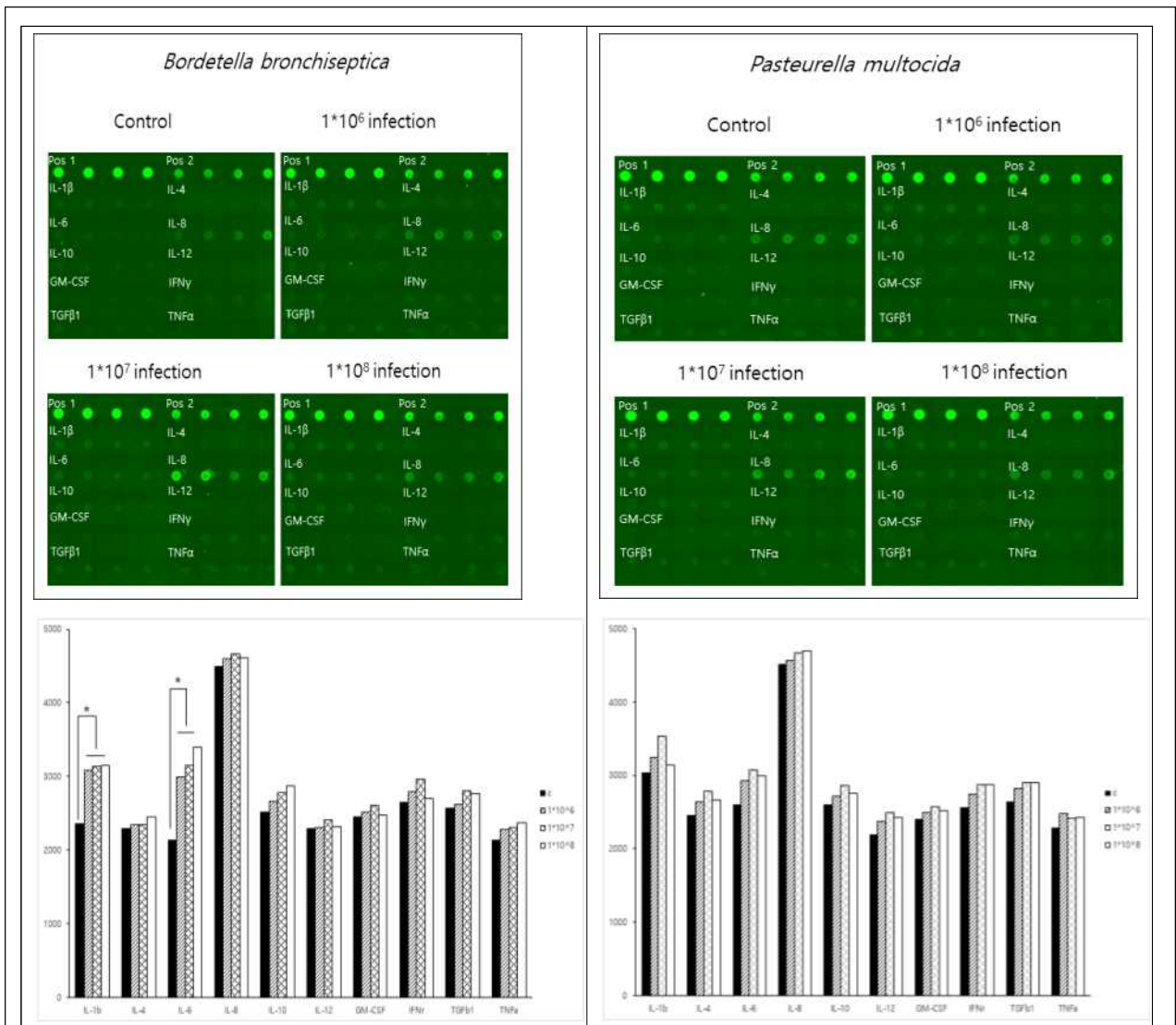
- 실험 결과, 두 종류의 호흡기질환 원인균 모두 해당 농도에서 유의미한 세포독성이 관찰되지 않는 것으로 평가되었음.
- 박테리오파지 처리 시점과 농도에 따른 세포독성도 관찰되지 않았음.



세포독성시험 결과 (좌: 호흡기질환 원인균, 우: 박테리오파지)

5. 돼지 호흡기 질환 원인균을 돼지 호흡기 상피세포에 처치 후 cytokine array 실시

- PT-K75 cell 에 돼지 호흡기 질환 원인균인 *Bordetella bronchiseptica*와 *Pateurella multocida*를 감염시켜 cytokine 변화를 확인함.
- 앞서 primary cell에 감염시켰던 조건과 동일하게 10^6 , 10^7 , 10^8 cfu/ml 수준으로 감염시켜 cytokine array를 실시하였음.
- Cytokine array 결과 *B. bronchiseptica*를 처리한 돼지 호흡기 상피세포에서 농도와 비례하여 IL-1 β 와 IL-6가 유의미하게 증가됨을 확인하였으나 *P. multocida*를 처리한 세포에서는 cytokine의 의미 있는 변화가 관찰되지 않았음.
- *B. bronchiseptica* 처리농도를 1×10^7 cfu/ml 로 정하고 박테리오파지는 균 처리 농도의 1/10 배, 1배, 10배 농도로 24시간 처리하여 항균효과를 확인함.



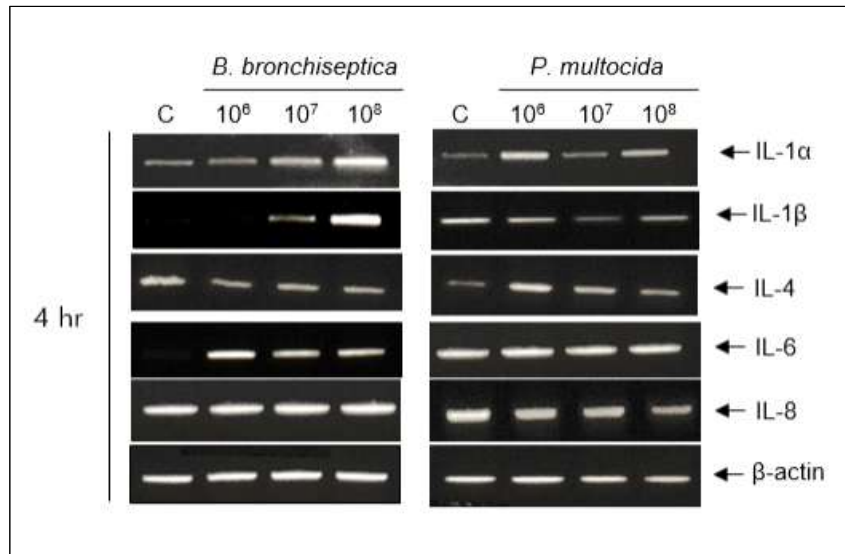
Cytokine array 결과 (좌: *B. bronchiseptica*, 우: *P. multocida*)

- 돼지 호흡기 상피세포에 호흡기 질환 원인균, 특히 *B. bronchiseptica*에 감염되었을 때 세포의 독성에는 큰 영향을 주지 않지만 IL-1 β , IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokine 이 분비되어 inflammatory signaling이 활성화됨을 확인할 수 있음.

6. Reverse Transcriptase-PCR 수행

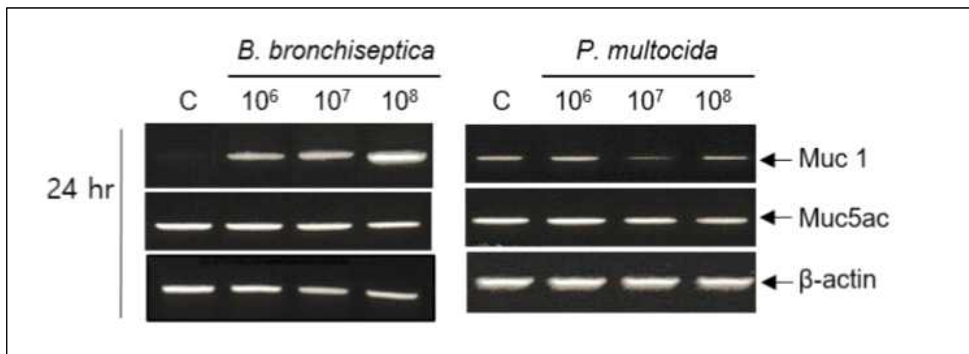
- Cytokine array 결과를 바탕으로 primer를 이용하여 cytokine의 gene expression 변화를 확인함. 사용한 primer sequence는 아래와 같이 사용함.

Primer (product size)	Forward	Reverse
IL-1 α (337 bp)	5' -TGCCAGCTATGAGCCACTTCC-3'	5' -TGACGGGTCTCGAATGATGCT-3'
IL-4 (324 bp)	5' -TACCAGCAACTTCGTCCAC-3'	5' -ATCGTCTTTAGCCTTTCCAA-3'
IL-10 (446 bp)	5' -GCATCCACTTCCCAACCA-3'	5' -CTTCCTCATCTTCATCGTCAT-3'
TGF- β (254 bp)	5' -TGGAGGAGAACTGCTGTGTG-3'	5' -GGTCCTCCCACGTAGTACA-3'
TNF- α (247 bp)	5' -CCACCAACGTTTTCTCACT-3'	5' -CCAAAATAGACCTGCCCAGA-3'
Mucl (308 bp)	5' -CTTTCTTCTTCGGGCTGTTG-3'	5' -GGAGAGGACATGCCAGTTGT-3'
Muc5ac (352 bp)	5' -CAACCTCTGTGGTCCCAAGT-3'	5' -GTGTCTACCATCTCGCAGCA-3'



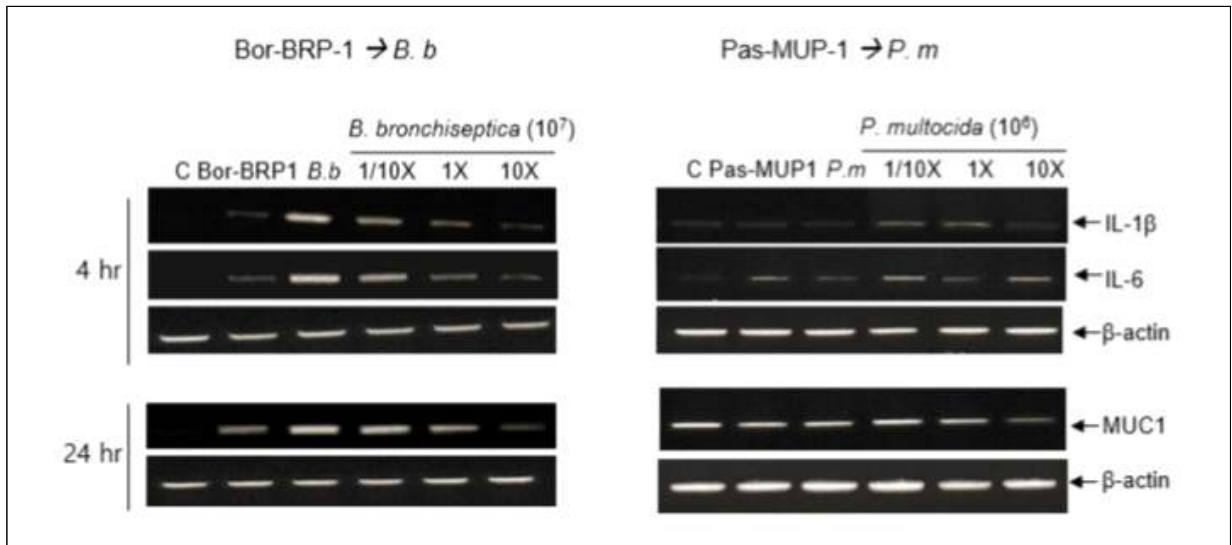
Cytokine의 gene expression 변화

- Trizol로 추출한 RNA로 RT-PCR을 수행한 결과는 위의 그림에 제시하였으며, *B. bronchiseptica*를 처치한 세포에서 IL-1 β 와 IL-6 gene expression이 증가함을 확인할 수 있었고 그 외 다른 cytokine은 의미 있는 변화를 보이지 않았음.
- 돼지 호흡기 상피세포에 호흡기 질환 원인균을 24시간 처치하여 mucin의 변화를 RT-PCR로 확인함. *B. bronchiseptica*에 감염 시 Muc1 gene expression이 증가했으나 Muc5ac는 의미 있는 변화를 보이지 않음.



호흡기 질환 원인균을 24시간 처치 후 mucin의 변화

- 호흡기 질환균 처리하기 24시간 전, 각 박테리오파지를 먼저 처리한 다음 *B. bronchiseptica*, *P. multocida*를 4시간 처리하여 IL-1 β 와 IL-6의 gene expression을 확인한 결과 아래와 같은 변화를 보임. 또한 mucin 확인을 위해 호흡기 질환균을 24시간 처치 후 muc1 변화도 아래와 같이 확인하였음. 박테리오파지 처치 농도가 증가함에 따라 IL-1 β , IL-6, 그리고 mucin 1이 감소함을 확인하였음.



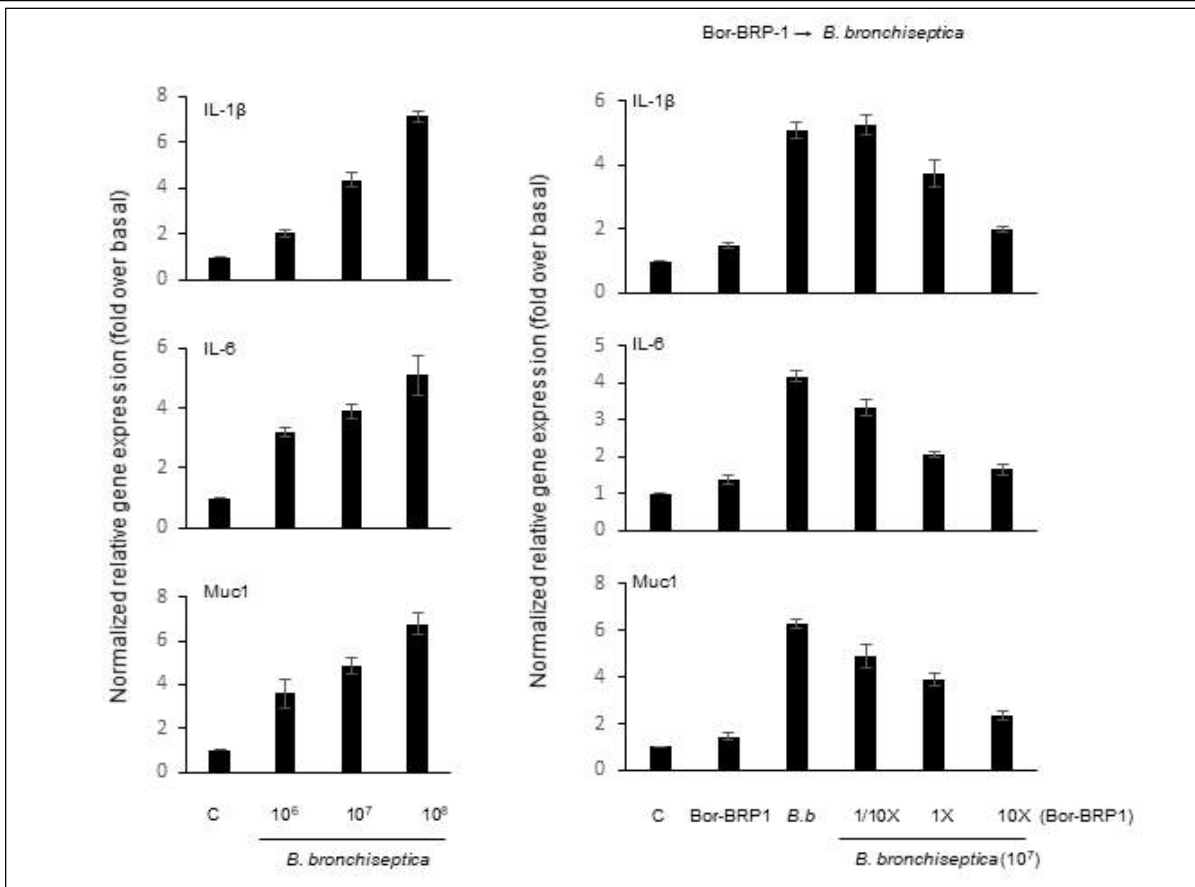
박테리오파지 처치 농도 증가에 따른 IL-1 β , IL-6, mucin 1의 변화

7. Real time PCR

- 돼지 호흡기 상피세포에 *B. bronchiseptica*를 감염 시켰을 때 유의미한 결과를 보였던 RT-PCR 결과를 바탕으로 real-time PCR을 시행하였음. primer sequence는 아래와 같이 사용함.

Primer (product size)	Forward	Reverse
IL-1 β	5' -GAGCATCAGGCAGATGGTGT-3'	5' -CAAGGATGATGGGCTCTTCTTC-3'
IL-6	5' -GCTGCTTCTGGTGATGGCTACTGCC-3'	5' -TGAAACTCCACAAGACCGGTGGTGA-3'
Muc1	5' -GTGCCGACGAAAGAACTG-3'	5' -TGCCAGGTTGAGTAAGAG-3'
β -actin	5' -CACGCCATCCTGCGTCTGGA-3'	5' -AGCACCGTGTGGCGTAGAG-3'

- IL-1 β , IL-6, Muc1 gene expression이 *B. bronchiseptica*의 감염 수에 dose-dependent하게 유전자 발현이 증가됨을 확인함.
- *B. bronchiseptica* 감염 24시간 전에 박테리아 특이적인 파지인 Bor-BRP-1을 처치했을 때, 박테리오파지 처치 농도가 증가함에 따라 증가하였던 특이적 유전자 발현이 의미 있게 감소함을 확인하였음.
- 이와 같은 결과로 보아 일반적인 RT-PCR 결과와 동일하게 나왔으며, 박테리아만 단독 처리 시 증가하였던 cytokine과 점액 유전자의 발현이 박테리오파지 Bor-BRP-1에 의해 유효하게 감소되었음.



Real-time PCR 결과

<제2협동연구기관>

1. 마우스 모델에서 박테리오파지의 체내 분포 양상 파악

가. 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1의 체내분포 양상 파악을 위한 PCR 및 이를 기반으로 박테리오파지 titer의 정량 분석

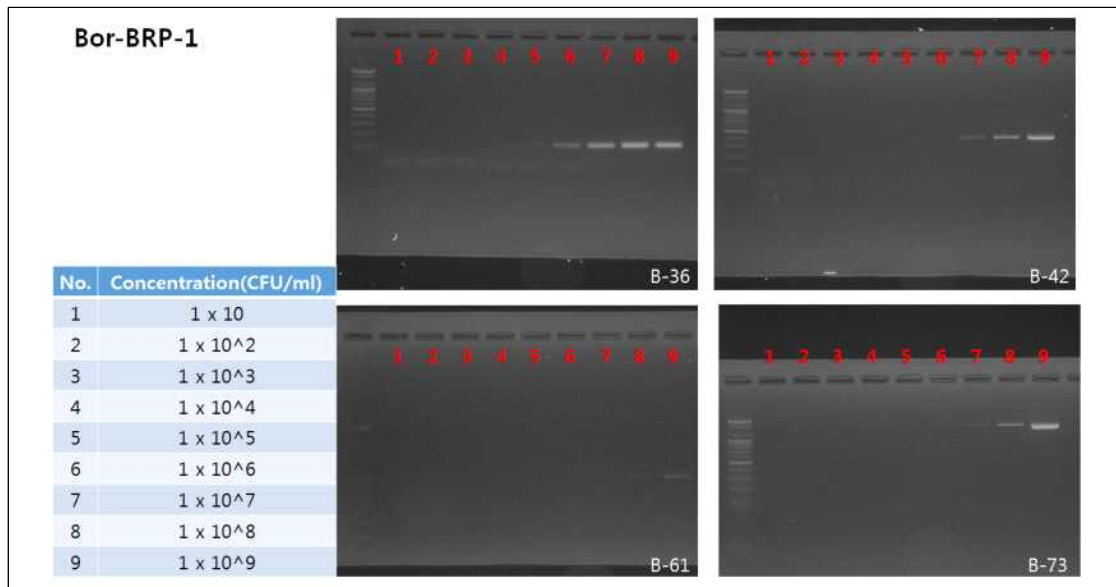
- 주관연구기관에서 제공한 박테리오파지 Bor-BRP-1 검출용 프라이머 4 set와 박테리오파지 Pas-MUP-1 검출용 프라이머 4 set에 대해 하기 제시한 PCR 조건으로 PCR 분석을 실시하였음.

※ PCR조건:

94°C(1min) → 30 cycles [94°C(20sec) → annealing temp. → 72°C(extension time)] → 72°C(7min) → 4°C

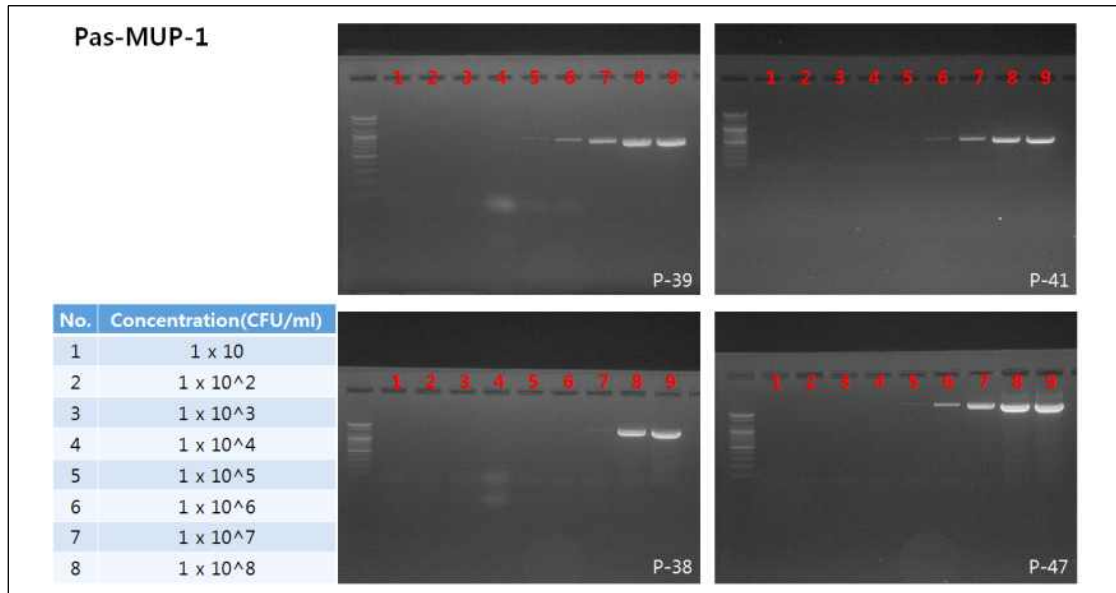
No	Name	Bacteriophage	ORF No.	Annealing temp.	Extension time	Length
1	B-36	Bor-BRP-1	ORF 36	58°C	1 min	138 bp
2	B-42		ORF 42	58°C		417 bp
3	B-61		ORF 61	57°C(58°C)	1 min 40 sec	1065 bp
4	B-73		ORF 73	58°C		1557 bp
5	P-38	Pas-MUP-1	ORF 38	59°C	1min 40 sec	1641 bp
6	P-39		ORF 39	52°C	1 min	876 bp
7	P-41		ORF 41	52°C		588 bp
8	P-47		ORF 47	50°C	3min	2961 bp

- 박테리오파지 Bor-BRP-1 경우, 4 set의 primer (B-36, B-42, B-61, B-73)에 대해 모두 PCR 양성이었음. 각 PCR 증폭산물의 intensity와 실제 박테리오파지 titer가 상관관계가 있음을 확인함. 이 primer중 B-36이 가장 민감도가 높음 (detection limit: 10^5 pfu/ml 수준)을 확인함.



Bor-BRP-1에 대한 PCR 및 titer 정량비교

- 박테리오파지 Pas-MUP-1 경우, 4 set의 primer (P-38, P-39, P-41, P-47)에 대해 모두 PCR 양성이었음. 각 PCR 증폭산물의 intensity와 실제 박테리오파지 titer가 상관관계가 있음을 확인함. 이 중 P-47이 가장 민감도가 높음 (detection limit: 10^5 pfu/ml 수준)을 확인함.



Pas-MUP-1에 대한 PCR 및 titer 정량비교

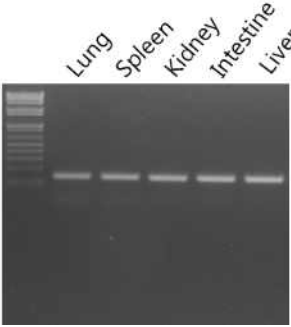

나. 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1를 경구투여 후 마우스 조직에서의 박테리오파지 분석

- 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1를 마우스에 1×10^9 pfu/ml 농도로 경구투여한 후 3일째 체내분포를 확인하기 위하여, 상기 시험에서 민감도가 높았던 primer를 이용해 다양한 조직 (간, 장, 신장, 비장, 폐)에서 분포 여부를 조사하였음.

※ 박테리오파지 조직 내 PCR 검출방법

- ① 각 장기에 PBS를 넣고 조직분쇄기를 사용하여 분쇄함
- ② 10,000g에서 10분간 원심분리한 후 상층액만 분리함
- ③ 분리된 상층액을 다시 13,000rpm로 원심분리하여 상층액을 취해 PCR template로 사용함

- 박테리오파지 Bor-BRP-1에 대해 PCR을 실시한 결과, 주로 간, 장, 신장, 비장, 폐 대부분의 장기에서 PCR 양성으로 확인되었으며 장기별로 박테리오파지 분포 관련하여 PCR 민감도의 차이는 크지 않음을 확인하였으며, 아래 표의 왼쪽 그림으로 제시함.
- 박테리오파지 Pas-MUP-1의 경우에도 Bor-BRP-1과 거의 유사한 분포 양상을 보임을 확인할 수 있었으며, 아래 표의 오른쪽 그림으로 제시함.

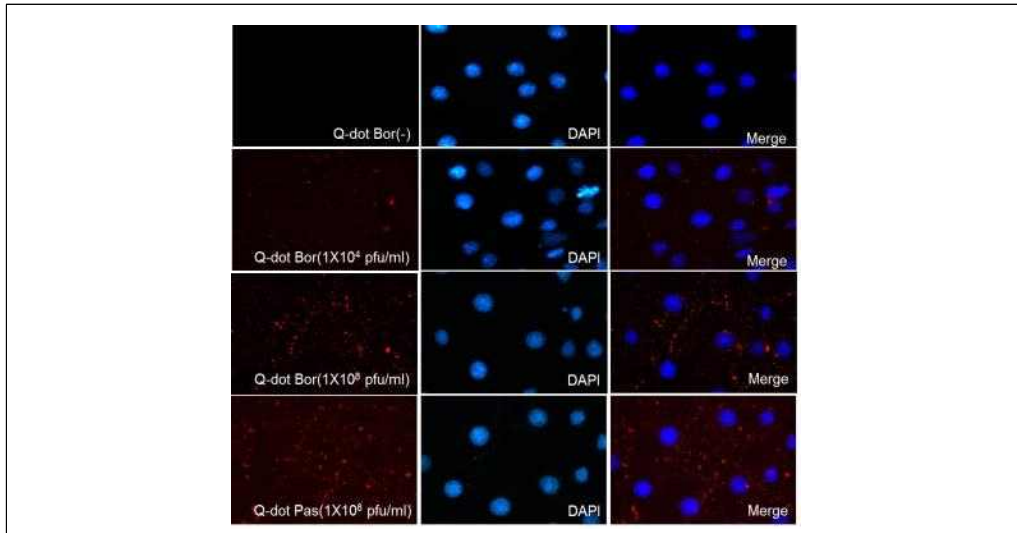
	
<p>조직 대상으로 Bor-BRP-1 검출용 PCR 수행 결과 (B-36)</p>	<p>조직 대상으로 Pas-MUP-1 검출용 PCR 수행 결과 (P-47)</p>

다. Q-dot 형광 표지 박테리오파지의 동물세포에 대한 영향 평가

- Q-dot으로 형광 표지된 박테리오파지 Bor-BRP-1 (2×10^9 pfu/ml)과 Pas-MUP-1 (3×10^9 pfu/ml) 액상시료를 주관연구기관으로부터 제공받아 COS-7 세포주에 처리하여 세포에서의 분포를 확인하고자 하였음.

- ① COS-7 세포를 24 well plate에 1×10^5 개/ml로 배양함
- ② 24시간 후 Q-dot 형광 표지된 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1을 1×10^4 개/ml와 1×10^8 개/ml 농도로 24 well에 처치시킴
- ③ 24시간 후 PBS로 well을 2번 wash하여 건조시킨 후 anti-fade mounting solution (DAPI 포함)을 이용하여 Q-dot을 형광현미경으로 관찰함
- ④ Q-dot 형광은 600nm 파장대의 형광 filter를 사용하여 세포 사진을 촬영

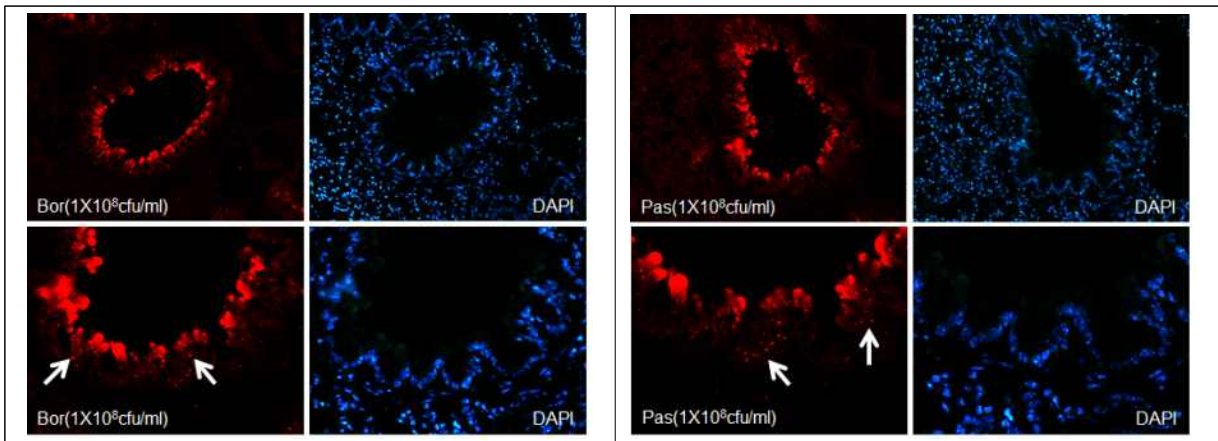
- COS-7 세포에 Q-dot 형광 표지된 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1을 24시간 처리 후 형광현미경 관찰 시, 농도 의존적으로 세포 주위에 분포하고 있는 것이 관찰되었음. 또한 Q-dot 형광 표지된 박테리오파지들이 aggregation 되지 않고 세포주위에 일정하게 분포되어있는 것을 관찰할 수 있었음. 또한 형광 표지 박테리오파지들에 의한 세포형태의 변화나 독성에 의한 세포이상 소견들은 관찰되지 않았음.



Q-dot 형광 표지 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1의 COS-7 세포에서의 분포 양상

라. Q-dot 라벨된 형광박테리오파지의 마우스 폐 조직 내의 분포

- 호흡기성 질병 타겟 박테리오파지의 폐 조직 내의 분포를 알아보기 위해, 마우스 비강에 형광 표지된 박테리오파지를 $20\mu\text{l}$ (1×10^8 pfu/ml) 주입하여 3일 뒤 형광을 관찰한 결과, 비강 상피세포 주위에 Q-dot 형광 표지된 박테리오파지 Bor-BRP-1이 집중적으로 나타나는 것을 알 수 있었음. 또한 Q-dot 형광 표지된 Pas-MUP-1도 기관지 상피세포 주위에 집중적으로 나타나는 것을 알 수 있음. 이는 호흡기성 세균들의 1차적인 침입경로인 기관지 상피세포에서 이들 세포주위에 박테리오파지들이 숙주 세균을 공격할 수 있다는 것을 시사함.



기관지 상피세포 주위에 분포된 형광 표지된 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1

마. 마우스 대상 박테리오파지의 안전성평가 (4주간 반복투여)

- 주관연구기관의 요청에 따라 2차년도에는 4주간 반복투여에 의한 마우스 독성평가를 실

시하였음. 1차년도에는 1주간만 투여하여 장기 반복투여에 의한 독성을 파악하지 못하였음. 이에 주관연구기관으로부터 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1 액상 시료를 공급받아 4주간 반복투여에 따른 마우스 장기 독성평가를 실시하였음.

- 마우스 독성시험을 위한 시험군의 구성은 용매대조군, 박테리오파지 Bor-BRP-1 투여군 (1×10^8 pfu/ml), 박테리오파지 Pas-MUP-1 투여군 (1×10^8 pfu/ml)으로 나누어 실시하였음. 투여농도설정은 1차년도의 최고농도를 사용하여 군당 6마리에 4주간 반복 경구투여 하였음.
- 독성평가항목으로 일반증상 관찰, 마우스 체중측정, 장기중량 측정, 혈액생화학적 검사, 부검소견 관찰 및 병리조직학적 평가를 중심으로 아래와 같은 방법으로 분석하였음.

① 시험물질 및 부형제

- 시험물질: 박테리오파지 Bor-BRP-1 (2×10^9 pfu/ml), Pas-MUP-1 (3×10^9 pfu/ml)
- 부형제: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
- 보관: 4°C 보관

② 투여시험물질

- 박테리오파지 Bor-BRP-1와 Pas-MUP-1는 부형제를 이용하여 1×10^8 pfu/head/day 농도로 희석하여 투여하였으며 용매대조군은 부형제를 투여하였음.

③ 시험군의 구성

군	성별	동물수	동물번호	투여액량 (ml/head/day)	투여량 (pfu/head/day)
용매대조군	M	6	1-6	0.2	0
Bor-BRP-1 고농도군	M	6	7-12	0.2	1×10^8
Pas-MUP-1 고농도군	M	6	13-18	0.2	1×10^8

④ 투여량의 설정

주관연구기관과 협의 및 참고문헌을 참조하여 설정하였음.

⑤ 투여

; 투여법과 관련된 사항을 요약하면 아래와 같음.

투여경로 및 선택이유	경구투여, 박테리오파지 제제의 사료를 통한 급여방식을 감안하여 선택
투여횟수 및 기간	1회/1일, 30일, 오후 2시
투여액량 산출	0.2ml/head/day
투여방법	경구용 존데와 주사기를 이용하여 안정적인 상태에서 투여

⑥ 관찰 및 검사

- 일반증상: 투여 및 관찰기간 동안 사망 및 일반증상여부를 관찰함.

- 체중: 1, 2, 3, 4주에 시험물질 투여 전에 측정하였음.

⑦ 혈액생화학적 검사

- 부검 전날 절식 (16시간)시킨 후 alfaxan을 이용하여 마취시켜 후대정맥을 통하여 혈액을 채혈하였음. 채혈된 혈액은 곧바로 헤파린이 처리된 E-tube에 담아 일정시간동안 rotation시킨 후 혈청을 원심분리하여 -70℃ 냉동고에 보관하여 측정 시 꺼내어 사용하였음.
- 혈청분석은 대구경북첨단의료복합단지 실험동물센터에 의뢰하여 검사결과를 분석하였음.

⑧ 조직병리

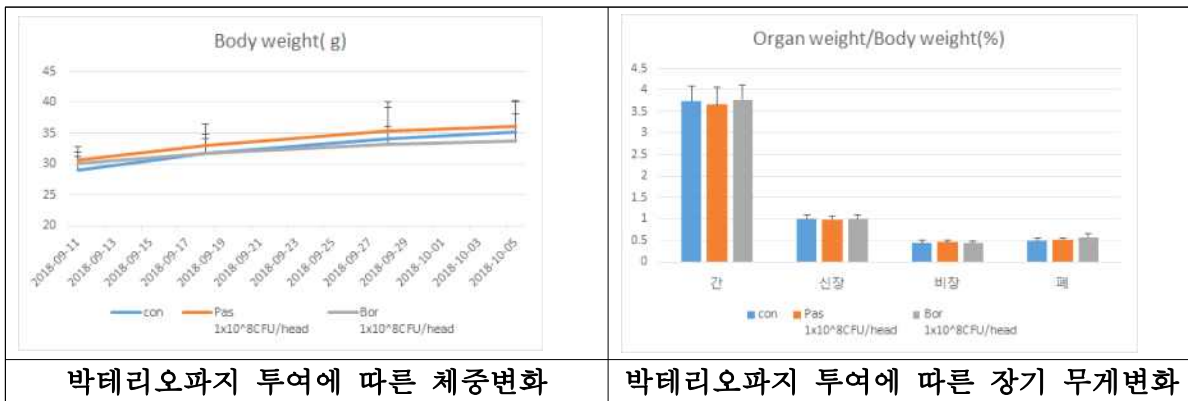
- 혈액생화학적 검사를 위한 채혈 후 간, 신장, 폐, 심장, 비장 및 고환을 육안 관찰 후 장기중량을 측정하였음. 이 후 각 장기를 10% 중성완충포르말린에 2일간 고정 후 파라핀블럭을 만들어 HE 염색하여 현미경 검경을 실시하였음.

⑨ 통계학적 분석

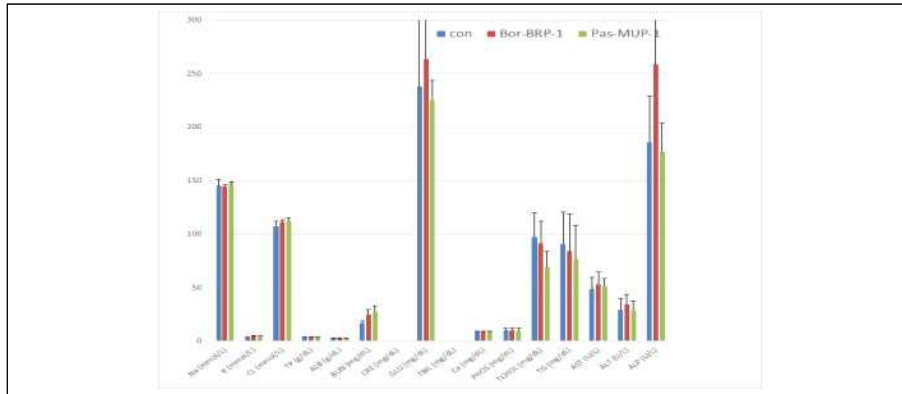
- Student's t-test를 사용하여 정상대조군 및 용매대조군과 유의적인 차이가 나타나지 않을 것을 확인하였음.

- 실험 결과를 아래 표에 제시함.

- ① 일반증상: 모든 시험군에서 시험기간동안 박테리오파지투여에 의해 이상증상은 관찰되지 않았음.
- ② 체중 및 장기중량변화: 모든 시험군에서 체중 및 장기의 무게가 유의한 차이를 나타내지 않았음.

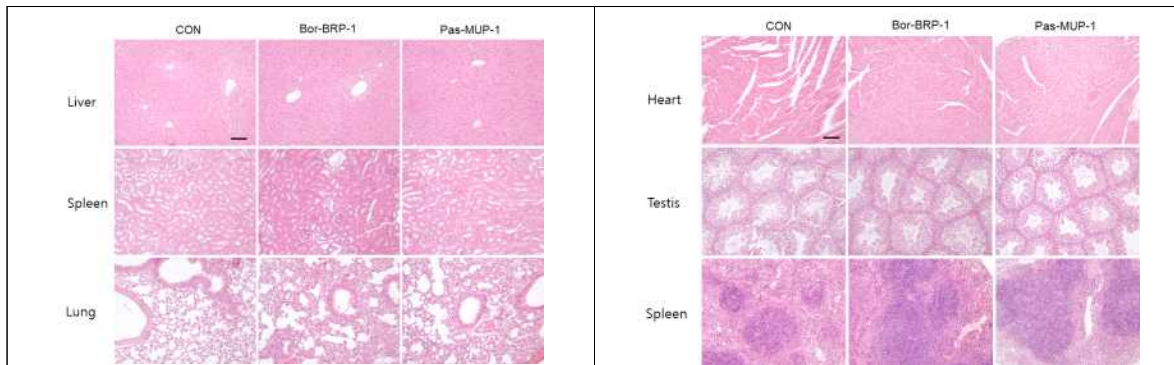


- ③ 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1을 각각 1×10^8 pfu/head/day 농도로 마우스에 4주간 경구투여한 경우, 혈액생화학검사결과에서도 독성에 대한 유의적인 변화는 나타나지 않는 것으로 확인되었음. 단지 Bor-BRP-1 파지를 투여한 군에서 glucose와 ALP가 약간 증가하였으나 유의성은 없는 것으로 평가되었음 (그림 9).



박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1을 4주간 경구투여한
마우스에서의 혈액생화학적 검사 결과

④ 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1을 각각 1×10^8 pfu/head/day 농도로 마우스에 4주간 경구투여한 결과, 처치군에서 독성 평가 항목 (체중, 장기별 무게, 혈액생화학 검사결과)에 있어 특이적인 조직병리학적 소견을 나타내지 않았음 (그림 10). 이는 1차년도 단기독성 시험결과와 유사하며, 박테리오파지를 시험동물에 장기 투여 시에도 특별한 부작용이 나타나지 않고 안전한 것으로 평가되었음.



박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1을 4주간 경구투여한 마우스에서의
병리조직학적 조사

바. 마우스에 4주간 반복투여한 박테리오파지의 조직 내 분포 양상 파악 시험

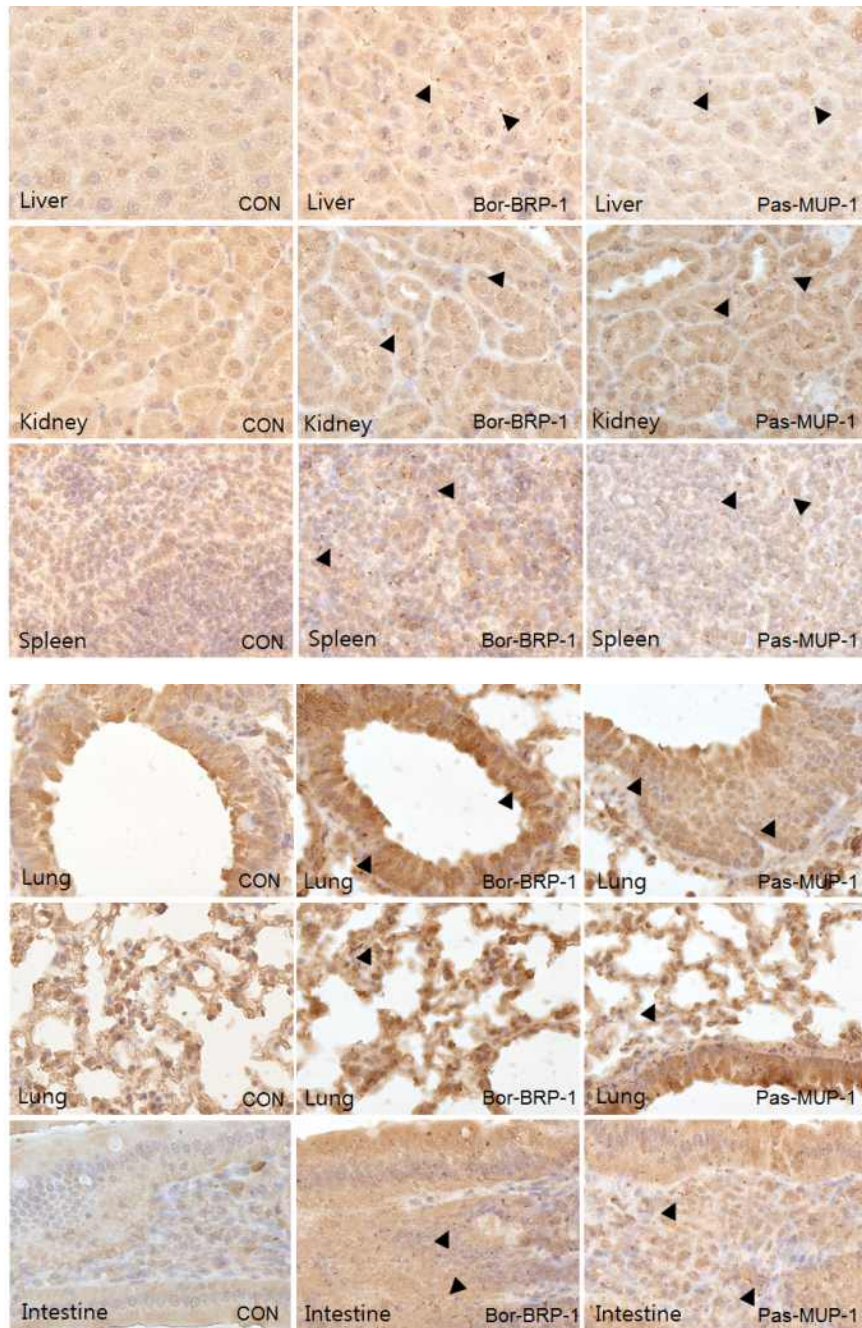
- 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1을 4주간 경구투여한 마우스 조직 내에서의 분포를 확인하기 위해 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1에 대한 정제된 항체를 주관연구기관으로부터 제공받아 마우스 조직 내에서 이들 항체를 사용한 면역조직화학적 염색을 실시하였음.

※ 면역조직화학적 염색법

① 4주간 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1을 경구투여한 마우스의 간, 신장, 비장, 장 조직을 10%중성포르말린에 2일간 고정함

- ② 고정된 각종 장기를 적당한 크기로 재고정한 후 2시간 동안 흐르는 물에 수세함
- ③ 파라핀절편조직을 만들기 위해 자동 tissue processor를 이용하여 파라핀블럭을 제작함
- ④ 조직절편기를 이용하여 파라핀블럭을 3 μ m두께로 절편하여 건조시킴
- ⑤ 파라핀조직절편을 크실렌 및 알콜을 이용하여 탈파라핀을 실시함
- ⑥ 탈파라핀된 조직내에 내인성 peroxidase를 없애기 위해 0.5% 과산화수소에 5분간 침지시킴
- ⑦ 수세후 항원의 노출을 용이하게 하기위해 pressure cooker를 사용하여 antigen retrieval을 실시함
- ⑧ 다시 수세후 비특이적 반응을 줄이기 위해 normal goat serum으로 blocking을 실시함
- ⑨ 주관연구기관에서 보내준 정제된 파지항체를 1:10으로 희석하여 overnight으로 반응시킴
- ⑩ 다음날 ABC vectorstain 면역염색킷을 사용하여 2차, 3차 항체반응시킨 후 DAB 발색제를 사용하여 항원의 노출을 검사함

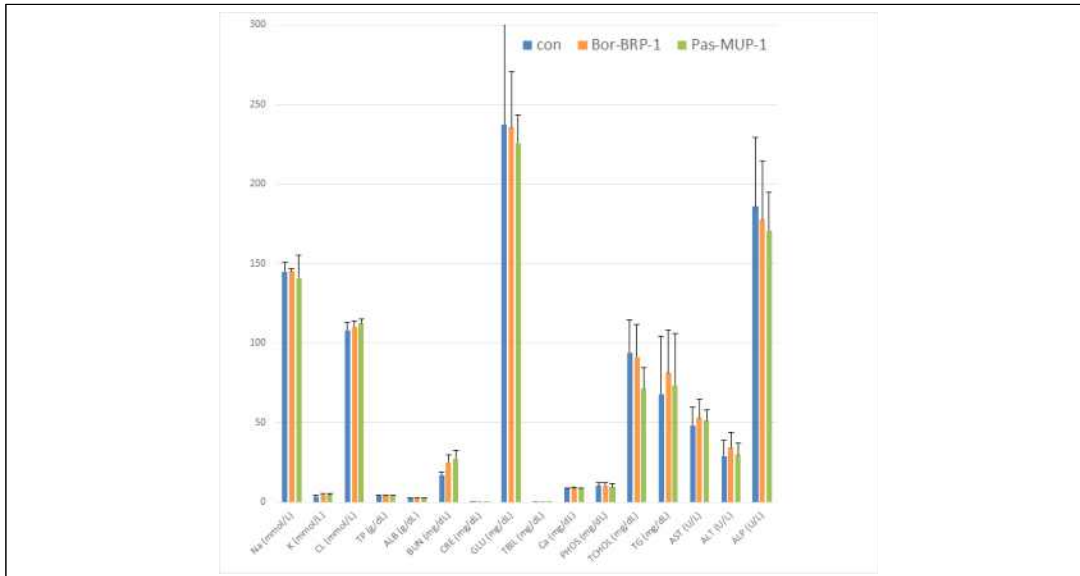
- 면역조직화학적 염색을 실시한 결과, 부형제 대조군에서는 항체에 의한 양성반응이 관찰되지 않았으나 박테리오파지를 4주간 투여한 간, 신장, 비장, 폐, 장 조직에서는 박테리오파지들의 양성반응이 관찰되었음. 장기별로 관찰되어지는 파지들의 빈도가 차이를 보이는 하나 대부분의 장기들에서 관찰되어짐. 본 연구의 타겟장기인 폐 조직에서도 폐 기관지 및 폐포 상피세포들에서 이들 파지 양성반응을 관찰할 수 있었음.



박테리오파지 Bor-BRP-1 및 Pas-MUP-1에 대한 면역조직화학 분석 결과

2. 15주령 이유자돈에서의 박테리오파지 독성 평가

- 15주령의 이유자돈에서의 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1의 독성을 검사하기 위해 부형제 대조군, 박테리오파지 Bor-BRP-1 투여군 및 Pas-MUP-1 투여군 3군으로 나누어 각각 군당 2마리씩 독성검사를 실시하였음. 박테리오파지 투여량은 1×10^9 pfu/ml 농도로 하여 5 ml을 경구로 한달 간 투여하였음. 마우스의 독성시험과 마찬가지로 이유자돈에서도 임상증상 및 혈액생화학적 변화가 투여군간에 거의 없는 것으로 평가되었음.



이유자돈에서의 박테리오파지 투여에 따른 혈액생화학적 변화양상

제 3절. 양돈 세균성 호흡기 질환 대응 박테리오파지의 시제품 도출 및 농장 시험을 통한 효능 평가 (3차년도)

<주관연구기관>

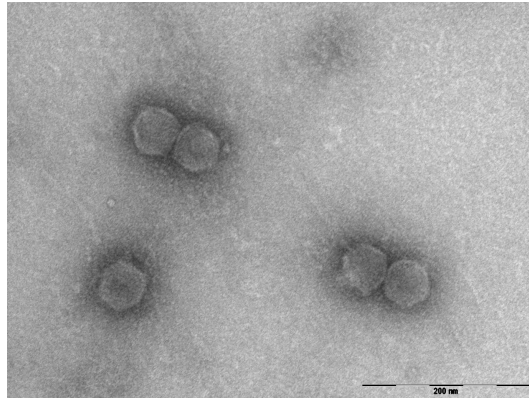
1. 확보 박테리오파지의 순수분리 확인 및 특성화

가. 박테리오파지 순수분리 여부 확인

- 3차년도 연구에서 확보된 *Pasteurella multocida* D type 균주에 항균력을 갖는 박테리오파지 1종 (Pas-MUP-2)는 순수분리가 완료되었으며, 아래와 같은 방법으로 TEM (Transmission electron microscopy) 분석용 시료를 준비함.

- ① 박테리오파지 증식액의 원심분리 (8,000 rpm, 4°C, 30 min)를 통하여 박테리오파지가 포함된 상등액을 회수
- ② 회수한 박테리오파지 액에 대하여 PEG 침전을 실시 (10% PEG / 1 M NaCl 처리 후 4°C overnight 방치)
- ③ 다음날 원심분리 (8,000 rpm, 4°C, 30 min)하여 pellet을 회수
- ④ 회수한 pellet을 TMG Buffer에 부유시킴
- ⑤ CsCl₂ 밀도구배 (1.70, 1.50, 1.45 g/cm³)를 이용한 초원심분리 (31,000 rpm, 4°C, 16 hrs) 수행
- ⑥ 밀도구배 1.45 g/cm³에 있는 박테리오파지 band를 회수
- ⑦ EB buffer로 dialysis 실시
- ⑧ Dialysis 후 회수된 박테리오파지 시료 20 μl를 TEM 분석 시료로 사용

- TEM 촬영을 통해 순수분리가 달성된 것을 확인하였으며, Pas-MUP-2는 Podoviridae과에 속함을 확인함.



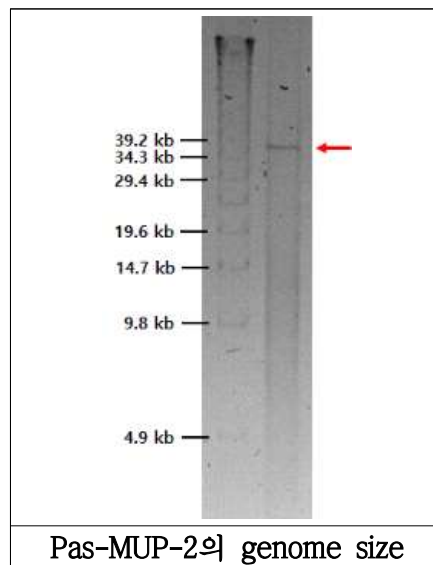
Pas-MUP-2의 TEM 관찰 결과 (×200K)

나. 박테리오파지 유전체 서열 확보 및 분석

- 박테리오파지 Pas-MUP-2의 genome 서열 확보를 위한 gDNA 추출 및 gDNA size 조사는 아래와 같이 수행함.

- ① 박테리오파지 시료 300 μ l (10^9 pfu/ml)를 Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA Extraction Kit (Cat. No. 17151, iNtRON)를 이용하여 박테리오파지 DNA를 추출
- ② NanoDrop을 이용해 추출한 DNA의 농도를 측정
- ③ Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE, DNA loading 양: 2.5 μ g, 전류: 150 ~ 170 mA, 14°C, overnight)를 실시하여 DNA size를 확인

- PFGE 분석을 통해 Pas-MUP-2의 genome size는 약 35 kb인 것을 확인하였으며, 준비한 시료로 NGS (Next-Generation Sequencing) 분석을 통해 Pas-MUP-2의 유전체 서열을 확보함.



Pas-MUP-2의 genome size

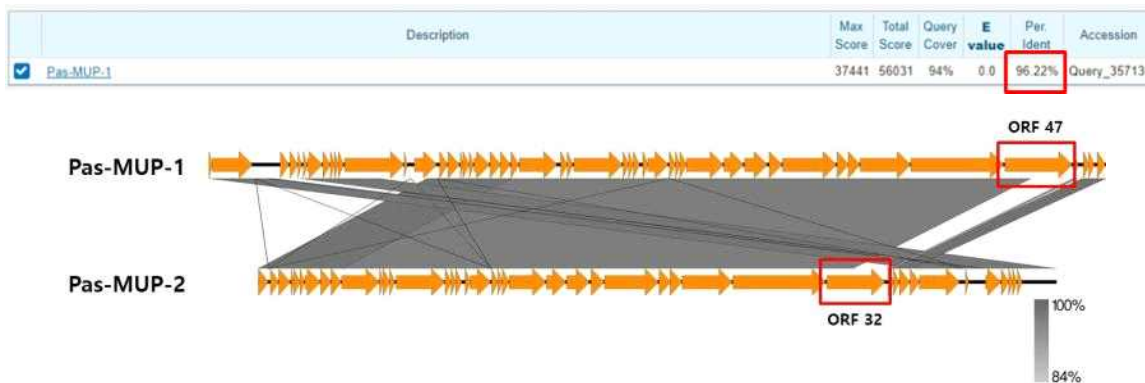
- 확보된 Pas-MUP-2의 유전체 서열과 기확보 Pas-MUP-1의 유전체 서열을 비교한 결과는

아래와 같음.

Pas-MUP-1과 Pas-MUP-2의 유전체 비교

Bacteriophage name	Genome Size (bp)	GC contents (%)	Topology	No. of ORFs
Pas-MUP-1	39,497	40.60	linear	51
Pas-MUP-2	35,151	40.53	linear	43

- 두 박테리오파지의 유전체 서열을 Genome Align-BLAST를 통해 유사도를 확인한 결과, 96.22% 일치하는 것을 확인하였음. 또한, comparative genome analysis를 수행한 결과, 두 박테리오파지의 유전체 서열은 유사하나, 일부 ORF가 유전체 상에서 다르게 배치되어 있음을 확인. 가장 큰 차이를 보이는 ORF는 Pas-MUP-1의 ORF 47과 Pas-MUP-2의 ORF 32임을 알 수 있었음.



- Pas-MUP-1의 ORF 47의 nucleotide size는 2,961 bp이며, Pas-MUP-2의 ORF 32는 2,565 bp로 nucleotide size에서 차이가 있었으며, 해당 유전자를 translation하여 Align-BLAST를 통해 서열을 비교한 결과, 두 유전자 간의 상동성은 낮은 것을 확인함. 이 유전자의 차이로 *P. multocida* A type 균주와 D type 균주간의 항균력 차이를 나타나게 한 것이라고 유추됨.



Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Pas-MUP-2_ORF32	628	736	53%	0.0	86.72%	Query_50885

2. 신규 박테리오파지의 산업적 제조 공정 scale-up (5 L)

- 신규 박테리오파지를 분리하면 산업적 활용에 이용될 수 있도록 증식 공정을 구축함. 지난 연도에 500 ml large scale 증식 공정을 구축하였으며, 이를 기반으로 5 L 증식 공정을 구축하기 위해 본 실험을 진행함. 실험 과정과 연구 자료는 아래와 같음.



증식 공정 구축 연구 재료

Host 박테리아	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Pasteurella multocida</i> type A strain	<i>Pasteurella multocida</i> type D strain	<i>Streptococcus suis</i> KCTC 3557
증식 대상 박테리오파지	- Bor-BRP-1	- Pas-MUP-1	- Pas-MUP-2	- Str-SUP-1 - Str-SUP-2 - Str-SUP-3
배지	- Difco™ Brain Heart Infusion (BD, Cat. No. 237500) - Bacto™ Agar (BD, Cat. No. 214010)			- Bacto™ Todd Hewitt Broth (THB, BD, Cat. No. 249240) - Bacto™ Agar (BD, Cat. No. 214010)
양이온	- Calcium chloride (CaCl ₂ ; Amresco, Cat. No. 0556) - Magnesium chloride (MgCl ₂ ; SIGMA, Cat. No. M8266)			

가. Large scale에서의 증식 조건 설정

(1) 5 L 증식 공정 확인 실험

<B. bronchiseptica, P. multocida 대응 박테리오파지>

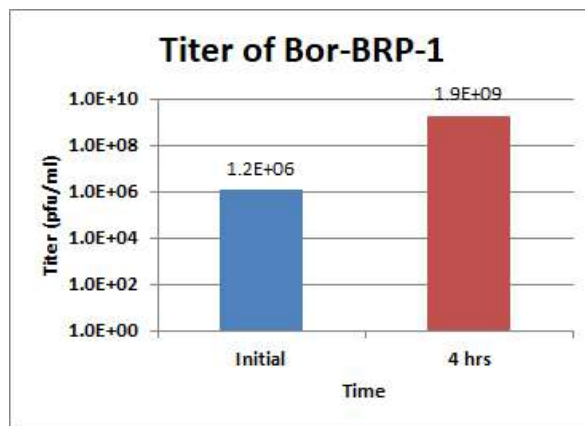
- ① 10 L fermenter jar에 5 L의 BHI를 준비한 다음 O/N culture한 박테리아 배양액을 1/100 volume 비율로 접종하여 37°C의 온도 조건에서 배양
- ② OD₆₀₀ = 0.5 도달하면, 최종농도가 10 mM이 되도록 MgCl₂를 첨가한 다음 박테리오파지 (Stock titer: 1.0 × 10⁸ pfu/ml)를 MOI = 0.1이 되도록 infection 시키고, infection 직후 (initial)와 infection 후 4 시간 경과 시점에 sampling을 실시한 다음 top agar assay로 박테리오파지 역가를 조사

<Streptococcus suis 대응 박테리오파지>

- ① 10 L fermenter jar에 5 L의 THB를 준비한 다음 O/N culture한 박테리아 배양액을 1/100 volume 비율로 접종하여 37°C의 온도 조건에서 배양
- ② OD₆₀₀ = 0.05 도달하면, 최종농도가 10 mM이 되도록 CaCl₂를 첨가한 다음 박테리오파지 (Stock titer: 1.0 × 10⁸ pfu/ml)를 MOI = 0.1이 되도록 infection 시키고, infection 직후 (initial)와 infection 후 4 시간 경과 시점에 sampling을 실시한 다음 top agar assay로 박테리오파지 역가를 조사

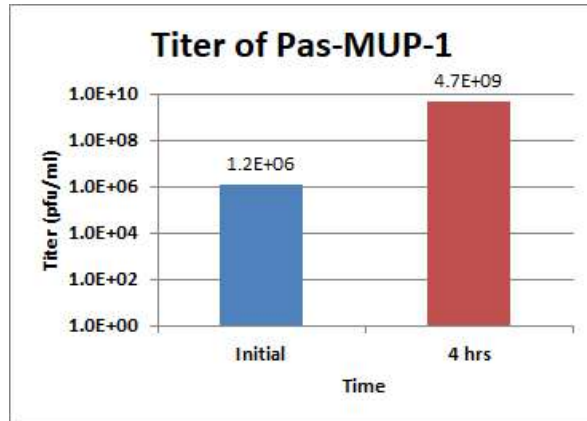
- 위의 실험방법에 따라 진행한 결과는 아래와 같음.

5 L 증식 공정 설정 실험 (Bor-BRP-1)



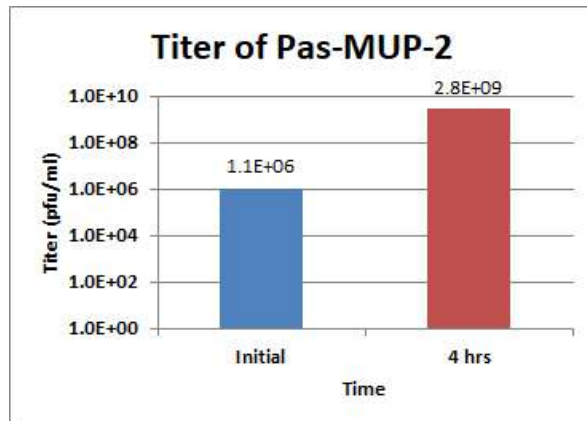
- 적정 OD₆₀₀ (OD₆₀₀ = 0.513)에서 최종농도가 10 mM이 되도록 MgCl₂를 첨가하고 MOI = 0.1로 infection을 실시한 다음, 4 시간 동안 박테리오파지를 증식시킨 배양액에서 1.9 × 10⁹ pfu/ml의 박테리오파지 증식액을 얻음

5 L 증식 공정 설정 실험 (Pas-MUP-1)



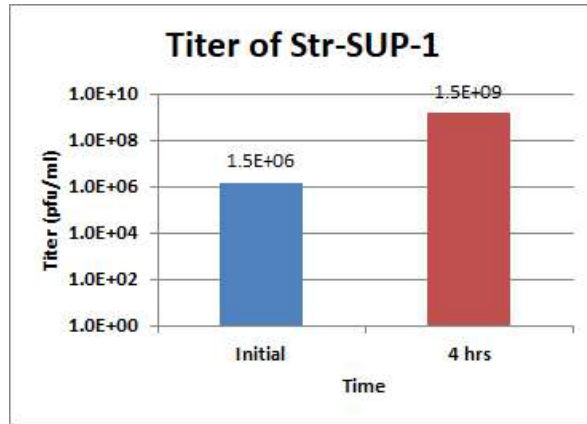
- 적정 OD₆₀₀ (OD₆₀₀ = 0.527)에서 최종농도가 10 mM이 되도록 MgCl₂를 첨가하고 MOI = 0.1로 infection을 실시한 다음, 4 시간 동안 박테리오파지를 증식시킨 배양액에서 4.7×10^9 pfu/ml의 박테리오파지 증식액을 얻음

5 L 증식 공정 설정 실험 (Pas-MUP-2)



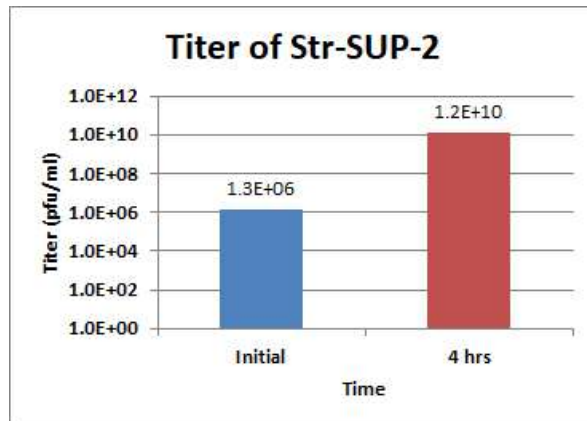
- 적정 OD₆₀₀ (OD₆₀₀ = 0.504)에서 최종농도가 10 mM이 되도록 MgCl₂를 첨가하고 MOI = 0.1로 infection을 실시한 다음, 4 시간 동안 박테리오파지를 증식시킨 배양액에서 2.8×10^9 pfu/ml의 박테리오파지 증식액을 얻음

5 L 증식 공정 설정 실험 (Str-SUP-1)



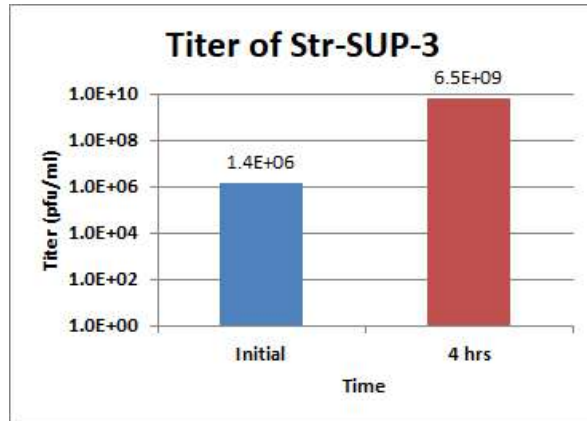
- 적정 OD₆₀₀ (OD₆₀₀ = 0.049)에서 최종농도가 10 mM이 되도록 CaCl₂를 첨가하고 MOI = 0.1로 infection을 실시한 다음, 4 시간 동안 박테리오파지를 증식시킨 배양액에서 1.5×10^9 pfu/ml의 박테리오파지 증식액을 얻음

5 L 증식 공정 설정 실험 (Str-SUP-2)



- 적정 OD₆₀₀ (OD₆₀₀ = 0.052)에서 최종농도가 10 mM이 되도록 CaCl₂를 첨가하고 MOI = 0.1로 infection을 실시한 다음, 4 시간 동안 박테리오파지를 증식시킨 배양액에서 1.2×10^{10} pfu/ml의 박테리오파지 증식액을 얻음

5 L 증식 공정 설정 실험 (Str-SUP-3)



- 적정 OD₆₀₀ (OD₆₀₀ = 0.050)에서 최종농도가 10 mM이 되도록 CaCl₂를 첨가하고 MOI = 0.1로 infection을 실시한 다음, 4 시간 동안 박테리오파지를 증식시킨 배양액에서 6.5 × 10⁹ pfu/ml의 박테리오파지 증식액을 얻음

3. 박테리오파지의 정제 공정 개발

- *B. bronchiseptica* 대응 박테리오파지 Bor-BRP-1과 *P. multocida* 대응 박테리오파지 Pas-MUP-1, Pas-MUP-2 총 3종의 박테리오파지 증식 공정 개발 후에 후속 연구로 정제 공정 개발을 수행함. 1차년도에 개발된 chromatography법에 기반한 정제 공정 (ion exchange chromatography 기반의 정제 공정)을 개발함. 1차년도와 동일하게 CIM QA monolithic column을 사용하였으며 binding 조건, washing 조건, elution 조건을 최적화하여 정제공정을 구축함. 그 결과로 박테리오파지 Bor-BRP-1, Pas-MUP-1, Pas-MUP-2, Str-SUP-1, Str-SUP-2, Str-SUP-3는 90% 이상의 순도로 정제가 되었으며, elution fraction에서의 박테리오파지의 titer는 모두 1 × 10¹⁰ pfu/ml 수준임. 대표적인 박테리오파지 3종의 정제 결과는 아래와 같음.

박테리오파지 정제 결과

박테리오파지	정제 결과
Bor-BRP-1	
Pas-MUP-1	
Pas-MUP-2	

4. 농장의 야외 온도 조건에서 시제품의 안정성 조사

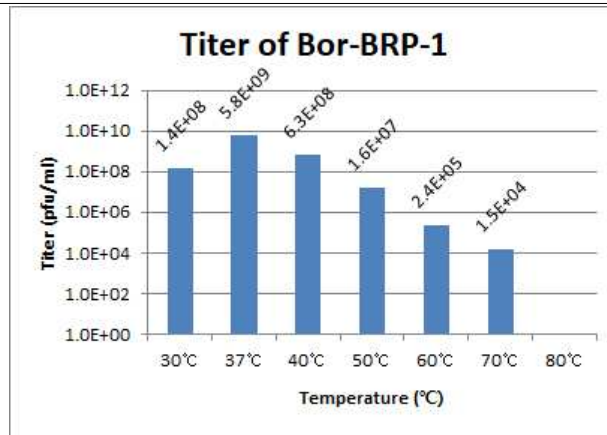
- 국내 농장의 사료빈은 FRP (Fiber Glass Reinforced Plastic) 재질의 주로 사용함. 여름철

에 외부 온도가 33℃임을 가정했을 때, 햇빛이 직접 닿는 부분은 73℃, 내부 온도는 63℃, 반대편은 45℃로 측정되며, 돈사내 급이기 사료 온도는 30℃ 정도로 측정됨. 박테리오파지와 사료를 혼합하여 급이할 때, 여름철에도 안정성이 있는지 조사하기 위해 본 실험을 진행함.

- ① 박테리오파지액을 30℃, 37℃, 40℃, 50℃, 60℃, 70℃, 80℃의 온도 조건에서 1 시간 incubation
- ② 1.5 ml microcentrifuge tube에 열처리한 박테리오파지 및 박테리아 배양액을 1:1 부피비로 섞어 top agar assay로 박테리오파지 역가를 조사

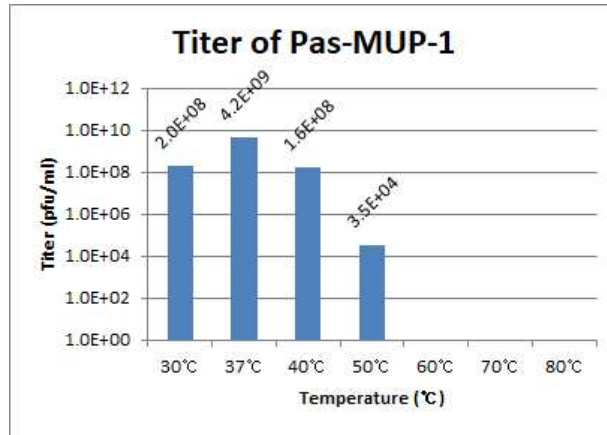
- 위의 실험방법에 따라 진행한 결과는 아래와 같음.

야외 온도 조건에서 박테리오파지의 안정성 조사 결과 (Bor-BRP-1)



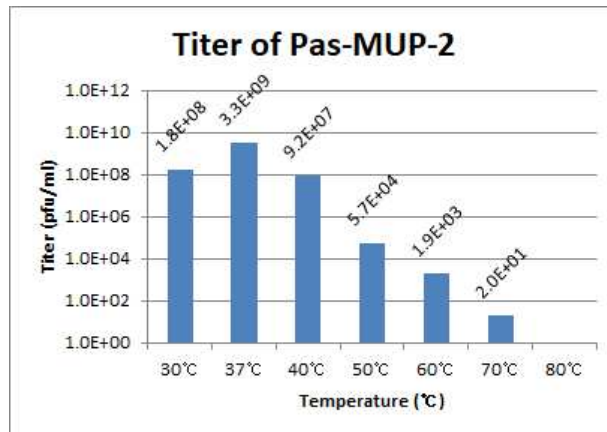
- 박테리오파지 Bor-BRP-1의 온도에 따른 안정성 조사 결과, 온도가 높아질수록 역가가 줄어드는 경향을 보였으며, 70℃까지는 활성이 있음을 확인함. 3종의 박테리오파지 중 열 안정성이 가장 높은 것을 확인함.

야외 온도 조건에서 박테리오파지의 안정성 조사 결과 (Pas-MUP-1)



- 박테리오파지 Pas-MUP-1의 온도에 따른 안정성 조사 결과, 온도가 높아질수록 역가가 줄어드는 경향을 보였으며, 50°C까지는 활성이 있음을 확인함. 3종의 박테리오파지 중 열 안정성이 가장 낮은 것을 확인함.

야외 온도 조건에서 박테리오파지의 안정성 조사 결과 (Pas-MUP-2)



- 박테리오파지 Pas-MUP-2의 온도에 따른 안정성 조사 결과, 온도가 높아질수록 역가가 줄어드는 경향을 보였으며, 70°C까지는 활성이 있음을 확인함.

5. 농장 실증 시험

가. 이유자돈 사료 내 박테리오파지의 첨가가 면역에 미치는 영향

(1) 재료 및 방법

(가) 시험설계, 시험동물 및 시험사료

- 본 연구는 강원대학교 동물윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인 받아 진행하였으며, 실험 정보를 아래 제시함.

① 시험 동물: 총 24두의 평균 체중 6.57 ± 0.61 kg인 3원 교잡종

[(Landrace × Yorkshire) × Duroc]

② 시험 장소: 강원대학교 부속실험목장에서 진행하였으며, 사료와 물의 자유급이가 가

능하고 온도 조절 가능한 돈사에서 사육

- ③ 시험 기간: 총 2단계로 나누어 진행하였으며, phase 1은 1주, phase 2는 2주로 총 2주간 사양시험을 수행
- ④ 처리구 : 총 4처리 6반복, 반복 당 1두씩 완전임의 배치하였으며, 처리구에 대한 정보는 아래 표와 같음.

Items	NC ¹	Challenge		
		CC ²	DB ³	SB ⁴
Heads/Rep.	1	1	1	1
Rep.	6	6	6	6
Total	6	6	6	6

¹ NC: non-challenge+control diet

² CC: control diet+challenge

³ DB: control diet+challenge+bacteriophage in feed (0.1%)

⁴ SB: control diet+challenge+bacteriophage as nasal spray (0.1%)

- ⑤ 사료: NRC (2012) 에 제시된 영양소 요구량을 충족하거나 초과하도록 배합하였으며, 사료의 배합비 및 영양소 함량은 아래와 같음.

Items	Basal diet
Ingredient (%)	
Corn	30.44
SBM	18.00
Fish chile	5.00
Whey	15.00
Lactose	12.00
SDPP	5.00
Sugar	6.00
Vegetable oil	5.62
Choline-Liquid 50%	0.08
Lysine 78%	0.17
Methionine 100%	0.05
Tryptophan 10%	0.46
Limestone	1.10
MCP	0.34
ZnO	0.30
Salt	0.11
Vitamin premix1	0.11
Mineral premix2	0.22
Total	100.00
Chemical composition (%)	
ME (Kcal/kg)	3,490
CP	21
Av. Lys	1.4
Av. Met+Cys	0.82
Ca	0.85
Av.P	0.6

Abbreviations: SDPP, spray-dried porcine plasma; MCP, mono-calcium phosphate; ME metabolizable energy; CP, Crude protein; Av, Available.

¹ Supplied per kilogram of diet: 16,000 IU vitamin A, 3,000 IU vitamin D3, 40 IU vitamin E, 5.0 mg vitamin K3, 5.0 mg vitamin B1, 20 mg vitamin B2, 4 mg vitamin B6, 0.08 mg vitamin B12, 40 mg pantothenic acid, 75 mg niacin, 0.15 mg biotin, 0.65 mg folic acid.

² Supplied per kilogram of diet: 45 mg Fe, 0.25 mg Co, 50 mg Cu, 15 mg Mn, 25 mg Zn, 0.35 mg I, 0.13 mg Se.

(나) 공격접종 및 박테리오파지 처치

- 시험 방법을 아래 표에 제시함.

- ① *Pasteurella multocida*와 *Bordetella bronchiseptica*는 주관연구기관에서 공급받아 공격 접종을 실시
- ② 박테리오파지는 DB의 경우 기초사료와 먼저 혼합 후 0.1% 수준에 맞추어 계단식 배합을 진행
- ③ SB는 이유자돈의 표준섭취량의 0.1% 수준의 박테리오파지를 비강에 매일 일정시간에 분무

(다) 조사항목

- 조사항목과 각 항목에 대한 시험법을 아래 표에 제시함.

1) 직장온도

- ① 이유자돈의 직장온도는 디지털 체온계 (SATO, SK-1260, Japan)를 직장 내 삽입하여 측정
- ② 시험기간 동안 처리구당 6두씩 매일 하루 2회(08:00, 17:00) 측정하여 기록

2) 혈액성상

- ① 혈액 생화학적 분석은 시험 개시 후 7일과 14일에 이유자돈의 경정맥에서 5 mL씩 채혈하여 EDTA 튜브 (BD vacutainer, BD Franklin, USA)에 보관하여 혈액을 이용하여 분석
- ② 수집한 혈액은 24시간 안에 혈구 분석기 (HEMAVET, Drew Scientific Inc., Oxford, CT)를 이용하여 백혈구 (white blood cell, WBC), 적혈구 (red blood cell, RBC), 헤모글로빈 (hemoglobin), 헤마토크리트 (hematocrit), 림프구 (lymphocytes), 호산구 (eosinophil) 및 호염구 (basophil)를 측정

3) IgM, IgG

- ① 면역글로불린을 조사하기 위해 시험 개시와 각 단계 종료 시에 경정맥에서 혈액을 채취
- ② 채혈 후 3,000rpm, 18°C 에 15분간 원심분리
- ③ 원심분리 후 혈청을 분리하여 분석 전까지 냉동고에 보관
- ④ 혈청 내 면역글로불린 (IgM, IgG) 분석은 ELISA 방법을 통해 수행되었으며, 분석 kit로는 ELISA accessory starter kit (E101; Bethyl Laboratories Inc., USA)와 quantitation kit (E100; BETHYL)를 사용

4) IFN γ , IL-6, IL-10, TNF α , CCL20, CCL28

- ① 시험 종료 후 반복 당 1두씩을 도축하여 폐, 기도, 간 조직 약 10 g 씩 채취 후 유전자 발현 분석에 이용함. 채취된 조직들을 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, USA)로 total RNA를 추출하여 유전자 발현 분석을 실시
- ② 분리한 total RNA는 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 농도로 정량하고, Improm-II Reverse transcription system (Promega, Fitchburg, USA)을 이용하여 cDNA를 합성
- ③ Real-time PCR은 Mx3000P real-time PCR (Stratagen, USA)를 이용하여 시행하였으며, 상대적인 유전자 발현량은 delta delta 방법을 이용하여 분석하였으며, 본 시험에 이용된 primer들의 정보는 아래 표에 제시

Gene	Primer sequence (5' →3')
GAPDH_F	ACTCACTCTTCTACCTTTGATGCT
GAPDH_R	TGTTGCTGTAGCCAAATTCA
IFN γ _F	GATCCAGCGCAAAGCCATCA
IFN γ _R	TCTGGCCTTGGAACATAGTCTG
IL6_F	GCTGCTTCTGGTGATGGCTACTGCC
IL6_R	TGAAACTCCACAAGACCGGTGGTGA
IL10_F	ATGCCAGCTCAGCACTGC
IL10_R	TCAGTTCTTCTCATCTTCATC
TNF α -F	GGATCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAAG
TNF α -R	GTTTCAGGACGCAGACAATGTTCT
CCL20-F	GCTCCTGGCTGCTTTGATGTC
CCL20-R	CATTGGCGAGCTGCTGTGTG
CCL28-F	TCTTCATCCCAGCCTGAACC
CCL28-R	AGCGCAGAAGAGTCTGTGGTC
IL8-F	CAAGCAAAAACCCATTCTCCG
IL8-R	CCAGCACAGGAATGAGGCATA
TLR4_F	GCTTTTACCACTATCCAGAGCA
TLR4_R	ATTGGCATCCCGCTCAGTTT

IFN, Interferon; IL, Interleukin; TNF, Tumor necrosis factor; CCL, chemokine (C-C motif) ligand.

(라) 통계분석

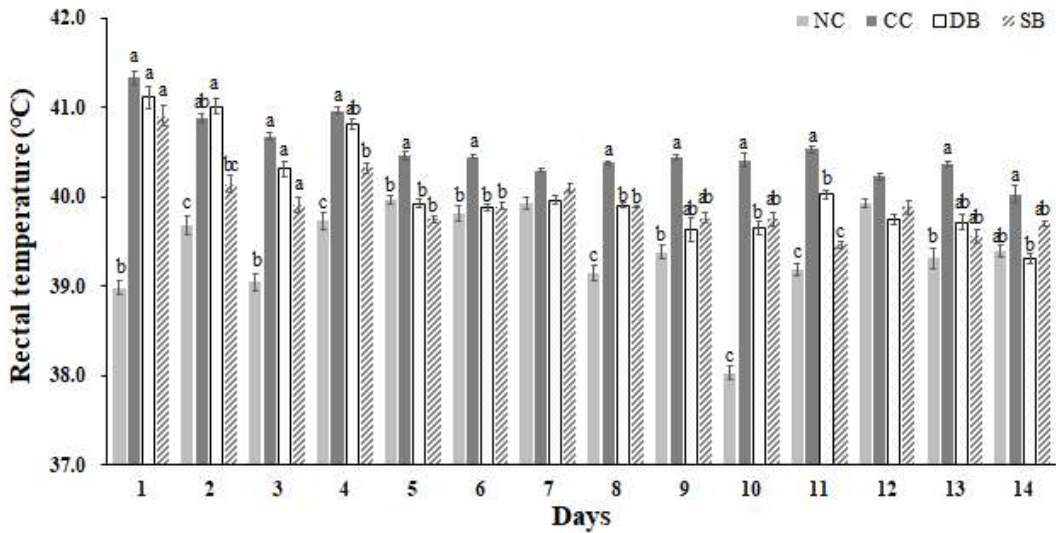
- 본 시험에서 측정된 모든 데이터는 SAS (SAS Inst., USA) 프로그램의 One-way ANOVA를 이용하여 분석하였고, Turkey 검정을 이용해 P<0.05 수준에서 사후검정을 실시함.

(2) 결과 및 고찰

(가) 직장온도

- 박테리오파지 처치 방식 (dietary supplementation vs. nasal spray treatment)과 *Pasteurella multocida*와 *Bordetella bronchiseptica* 공격접종에 따른 이유자돈의 직장온도는 아래 그림으로 제시함.

박테리오파지 처치 방식과 공격접종에 따른 이유자돈의 직장온도 변화



NC, non-challenge+control diet; CC, control diet+challenge; DB, control diet+challenge+bacteriophage in feed (0.1%); SB, control diet+challenge+bacteriophage as nasal spray (0.1%). Error bars represent standard error. Bars with different letters (a-c) differ significantly across all 4 treatment groups ($P<0.05$).

- 공격접종 후 1일 차에는 공격접종구들 (CC, DB, SB)에서 이유자돈의 직장온도가 비공격접종구인 (NC)에 비해 유의적으로 높았고 ($P<0.05$), 공격접종구들 간에 차이는 나타나지 않음.
- 공격접종 후 2일 차 NC의 직장온도가 가장 낮게 ($P<0.05$) 나타났고, 공격접종구들에서는 DB에서 가장 높게 ($P<0.05$) 나타남.
- 공격접종 후 3~4일 차 또한 공격접종구들이 NC보다 직장온도가 높게 ($P<0.05$) 나타났으며, 공격접종 후 4일 차에 공격접종구들에서 SB의 직장온도가 CC보다 낮게 ($P<0.05$) 나타남.
- 공격접종 후 5~6일 차에 공격접종구인 CC에서 직장온도가 가장 높았고 ($P<0.05$), 공격접종구인 DB와 SB 그리고 비공격접종구인 NC 간에는 직장온도의 유의적인 차이는 나타나지 않았음.
- 공격접종 후 7일 차에는 모든 처리구 간에 직장온도의 차이는 나타나지 않았으나, 공격접종 후 8~11일 동안 모든 처리구들 중 공격접종구인 CC에서 직장온도가 가장 높게 ($P<0.05$) 나타났고, 8, 9, 10 일 차에는 비공격접종구인 NC의 직장온도가 가장 낮게 ($P<0.05$) 나타남.
- 동일 기간 공격접종구들 간의 직장온도의 유의적인 차이는 공격접종 후 8, 10, 11일 차에서 확인되었으며, 공격접종 후 8일 차에서는 공격접종구 DB와 SB의 직장온도가 CC보다 낮게 ($P<0.05$) 나타났고, 공격접종 후 10일 차에는 DB의 직장온도가 CC보다 낮게

(P<0.05) 나타남.

- 공격접종 후 11일 차 공격접종구들에서 CC, DB 그리고 SB 순으로 직장온도가 낮아 (P<0.05) 졌으나, SB와 NC 간에 유의적 차이는 나타나지 않았음.
- 공격접종 후 12일 차에는 모든 처리구 간에 직장온도의 차이는 나타나지 않으나, 공격접종 후 13~14일 차에서 공격접종구인 CC의 직장온도가 가장 높게 (P<0.05) 나타났으며, 13일에는 NC의 직장온도가 가장 낮았고 (P<0.05) 14일에서는 DB의 직장온도가 가장 낮았음 (P<0.05).
- 본 결과에 따르면 1~14일 간 공격접종구들의 직장온도가 비공격접종구의 직장온도보다 대체로 높았음. 이는 공격접종을 통한 면역자극에 의해 나타나는 적응 반응으로 생각됨. 하지만 공격접종 후 4~14일 동안은 공격접종구들 중 일반사료를 섭취한 구 (CC)에 비해 박테리오파지가 처치된 구들 (DB, SB)에서 직장온도가 낮아지는 것이 관찰되었으며, 공격접종 후 기간이 지날수록 비공격접종구와 박테리오파지가 처치된 구들 간에 직장온도의 차이는 크지 않은 것으로 확인됨.
- 이러한 결과는 *Pasteurella multocida*와 *Bordetella bronchiseptica*로 공격접종한 이유자돈에 대하여 박테리오파지가 대상 세균에 대한 항균 및 억제 효과를 나타내었기 때문인 것으로 사료됨.

(나) 혈액성상

- 박테리오파지 처치 방식 (dietary supplementation vs. nasal spray treatment)과 *Pasteurella multocida*와 *Bordetella bronchiseptica* 공격접종에 따른 이유자돈의 혈액성상을 조사한 결과는 아래 표와 같음.

박테리오파지 처치 방식과 공격접종에 따른 이유자돈의 혈액성상						
Item	NC	Challenge			SEM	P-value
		CC	DB	SB		
WBC, 10 ³ /ul						
Day 7	9.55 ^c	27.94 ^b	30.91 ^{ab}	34.32 ^a	1.33	0.001
Day 14	16.38 ^c	25.83 ^a	22.28 ^b	20.58 ^b	0.88	0.001
RBC, 10 ⁶ /ul						
Day 7	7.71	7.46	7.97	7.62	0.21	0.401
Day 14	8.23	7.57	7.44	7.97	0.40	0.493
Lymphocytes, k/ul						
Day 7	66.68 ^b	77.62 ^a	76.73 ^a	74.11 ^a	0.99	0.001
Day 14	70.96	76.31	72.44	72.80	1.61	0.150
Eosinophil, k/ul						
Day 7	0.17 ^b	0.77 ^a	0.59 ^a	0.67 ^a	0.06	0.001
Day 14	0.42	0.68	0.50	0.55	0.08	0.136
Basophil, k/ul						
Day 7	0.04	0.06	0.09	0.12	0.03	0.178
Day 14	0.06	0.05	0.05	0.08	0.01	0.330
NC,	non-challenge+control diet;	CC,	control diet+challenge;	DB,	control	

diet+challenge+bacteriophage in feed (0.1%); SB, control diet+challenge+bacteriophage as nasal spray (0.1%).

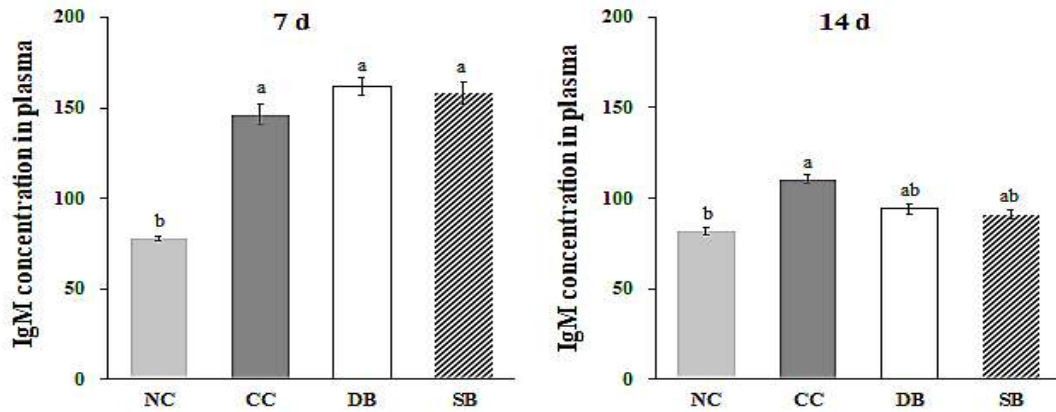
^{a-c} means values with different superscripts within the same row differ (P<0.05)

- 박테리오파지 처치 방식 (dietary supplementation vs. nasal spray treatment)과 *Pasteurella multocida*와 *Bordetella bronchiseptica* 공격접종에 따른 이유자돈의 혈액성상을 비교해 볼 때 WBC, Lymphocytes, eosinophil에서 유의적인 차이가 나타났으나, RBC와 basophil에서는 유의적 차이가 관찰되지 않음.
- 공격접종 후 7, 14일 차에는 모두 공격접종구들 (CC, DB, SB)의 WBC가 비공격접종구 (NC)보다 높게 (P<0.01) 나타남.
- 공격접종 후 7일 차에서는 SB에서 WBC가 가장 높게 (P<0.01) 나타났지만, 14일 차에는 CC에서 WBC가 가장 높게 (P<0.01) 나타남.
- Lymphocytes와 basophil 모두 공격접종 후 7일 차에서 공격접종구들이 비공격접종구보다 높게 (P<0.01) 나타났으며, 14일 차에는 그룹 간 유의적인 차이는 확인되지 않음.
- 공격접종 후 7일 차에 공격접종구 내 이유자돈의 혈액 내 WBC, lymphocyte와 eosinophil의 증가는 공격접종에 의한 영향으로 사료되며, 14일 차에 공격접종구들 중 박테리오파지를 처치한 DB와 SB의 WBC가 공격접종 후 일반사료만 섭취한 CC보다 낮아진 결과는 박테리오파지가 공격접종된 *Pasteurella multocida*와 *Bordetella bronchiseptica*를 항균 및 억제 하는데 관여했기 때문인 것으로 판단됨.
- 공격접종 후 14일에 lymphocyte와 eosinophil의 수치는 처리구 간에 유의적인 차이는 관찰되지 않았지만, lymphocyte와 eosinophil 모두 DB와 SB에서 수치적으로 CC보다 낮고 NC와는 비슷함이 확인됨.
- 하지만 CC에서는 lymphocyte와 eosinophil은 공격접종 후 7일 차와 14일 차에 모두 높은 수치를 나타내었고, 이는 공격접종 후 *Pasteurella multocida*와 *Bordetella bronchiseptica*의 체내 감염으로 인한 영향인 것으로 생각됨.

(다) 면역단백질

- 박테리오파지 처치 방식 (dietary supplementation vs. nasal spray treatment)과 *Pasteurella multocida*와 *Bordetella bronchiseptica* 공격접종에 따른 이유자돈의 혈액 내 면역단백질 (IgM, IgG)을 조사한 결과는 아래 그림으로 제시함.

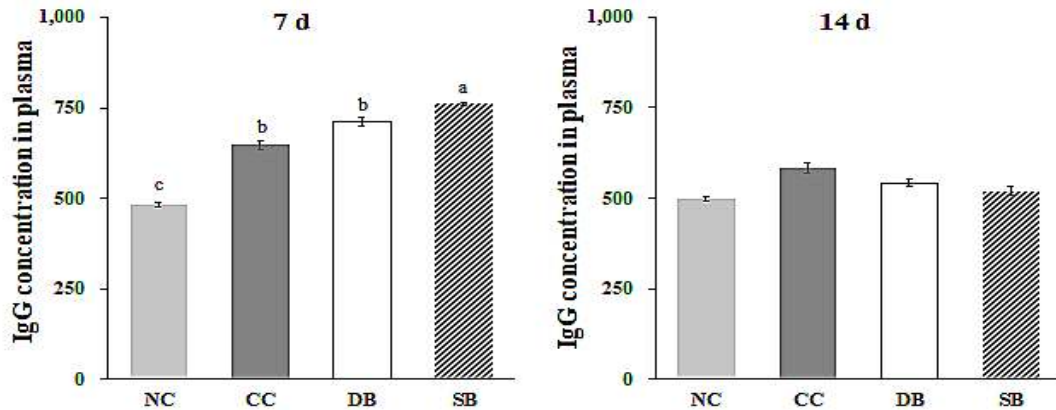
박테리오파지 처치 방식과 공격접종에 따른 이유자돈의 IgM 조사 결과



NC, non-challenge+control diet; CC, control diet+challenge; DB, control diet+challenge+bacteriophage in feed (0.1%); SB, control diet+challenge+bacteriophage as nasal spray (0.1%).

Error bars represent standard error. Bars with different letters (a-b) differ significantly across all 4 treatment groups ($P < 0.05$).

박테리오파지 처치 방식과 공격접종에 따른 이유자돈의 IgG 조사 결과



NC, non-challenge+control diet; CC, control diet+challenge; DB, control diet+challenge+bacteriophage in feed (0.1%); SB, control diet+challenge+bacteriophage as nasal spray (0.1%).

Error bars represent standard error. Bars with different letters (a-c) differ significantly across all 4 treatment groups ($P < 0.05$).

- 이유자돈 혈액 내 IgM과 IgG의 농도는 박테리오파지 처치 방식 및 공격접종 여부에 따라 유의적인 차이가 관찰됨.
- 이유자돈 혈액 내 IgM의 농도는 공격접종 후 7일 차 및 14일 차에 모두 NC에서 가장 낮게 ($P < 0.01$) 나타남.
- 7일 차에는 공격접종구들 간 이유자돈 혈액 내 IgM의 농도의 차이는 없었으나, 14일 차

에서 공격접종구들 중 박테리오파지 처치구들 (DB, SB)의 혈액 내 IgM의 농도가 CC에 비해 낮아지는 경향이 관찰됨.

- IgG의 경우 공격접종 후 7일 차에서는 처리구 간에 유의적인 차이가 나타나지만, 14일 차부터는 유의적 차이는 확인되지 않았음.
- 공격접종 후 7일 차에 이유자돈 혈액 내 IgG의 농도는 공격접종구인 SB에서 가장 높게 나타났으며 (P<0.01) 비공격접종구인 NC에서 가장 낮았음 (P<0.001).
- 공격접종 후 7일 차에 공격접종구들 간의 이유자돈 혈액 내 IgG의 농도는 CC와 DB가 SB에 비해 낮게 (P<0.001) 나타남.
- 본 시험 결과 공격접종구들의 IgM과 IgG의 농도는 모두 NC에 비해 높게 나타났으며, 이는 *Pasteurella multocida*와 *Bordetella bronchiseptica* 공격접종에 의한 것으로 사료됨.

(라) 조직 내 IFN γ , IL-6, IL-10, TNF α , CCL20, CCL28 발현

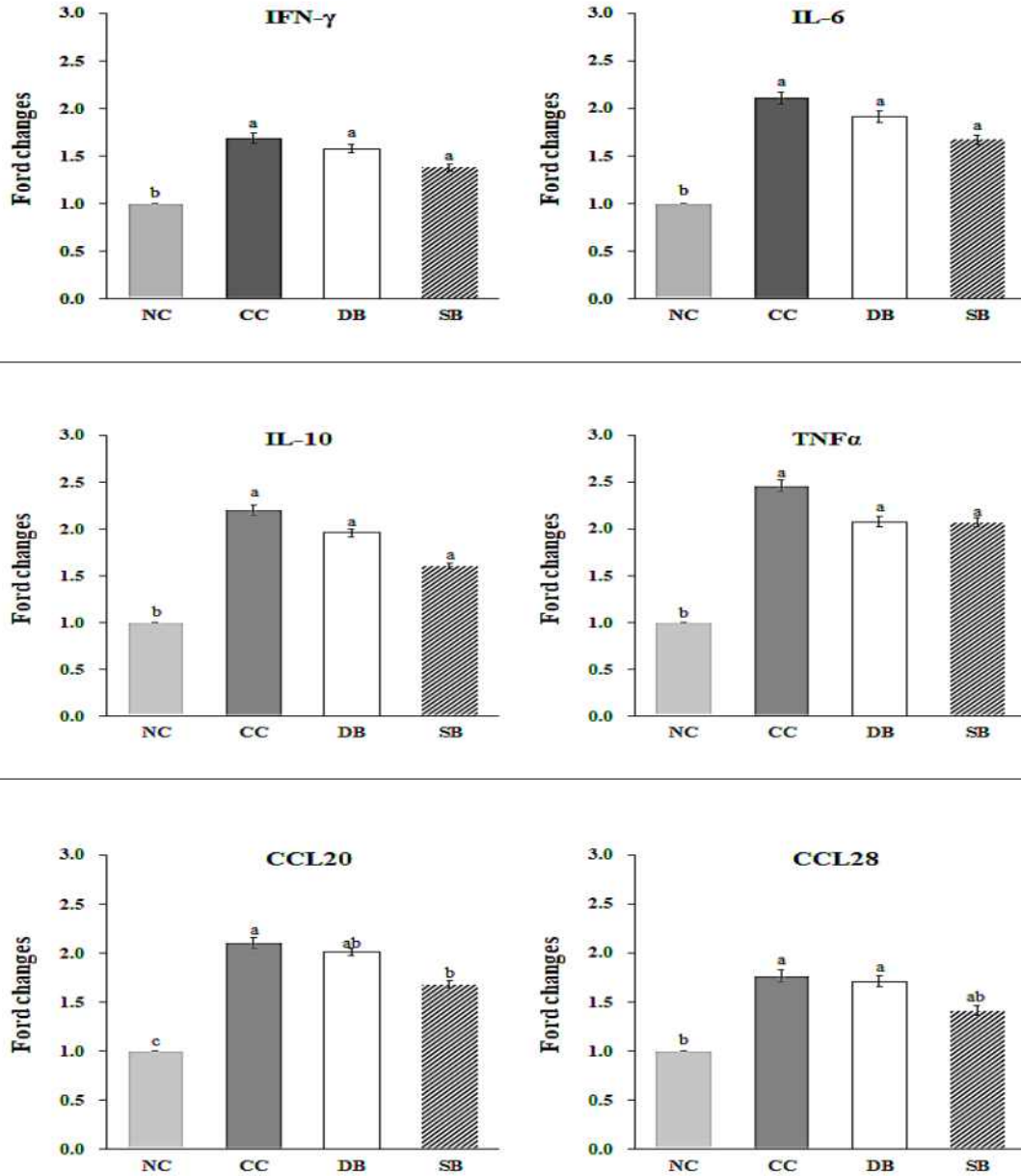
- 본 연구 결과에서 공격접종구들의 폐와 간 조직 모두에서 IFN γ 의 발현이 상향조절 되었으며 이는 공격접종 영향인 것으로 사료됨.
- Halloy 등, (2005)은 *Pasteurella multocida*에 노출된 돼지의 폐 조직에서 IFN γ 와 TNF α 의 발현이 증가한다고 보고하였고, Adhikari 등, (2017)과 Chappell 등, (2009)는 동물체 내 미생물 감염 시 장기 조직 내 IFN γ 의 발현이 상향조절 된다고 설명함. 이는 본 시험의 결과와 흡사한 것으로 사료됨.
- 하지만 본 시험의 공격접종구들에서 폐와 간 조직 IFN γ 의 발현은 박테리오파지 처치 유무에 따라 수치적 또는 유의적으로 감소하는데 이는 박테리오파지의 *Pasteurella multocida*와 *Bordetella bronchiseptica*에 대한 항균 및 억제 작용 때문이었을 것이라 사료됨.
- 본 시험에서 공격접종구들의 폐와 기관지에서는 IL-6, TNF α 발현이 공통적으로 증가하였는데, 이러한 결과는 공격접종 후 이유자돈 체 내에서 *Pasteurella multocida*와 *Bordetella bronchiseptica*에 대항하기 위한 면역반응의 결과로 미루어 볼 수 있음.
- 공격접종구들의 폐와 기관지에서 TNF α 발현의 증가와 더불어 공격접종구들의 폐, 기관지, 그리고 간에서 IL-6 발현이 모두 증가하였고, 이는 TNF α 가 염증반응을 위해 IL-6을 상향 조절한 것으로 사료됨.
- 또한 이유자돈의 폐와 기관지 조직 내 IL-6, TNF α 발현이 공격접종구들 사이에서 수치상 낮아지는 것으로 나타났고, 이는 이유자돈의 직장 온도의 변화와 비슷한 경향을 보이고 있음. 따라서 박테리오파지가 이유자돈의 체내로 유입된 *Pasteurella multocida*와 *Bordetella bronchiseptica*에 대한 항균 및 억제 작용으로 이러한 결과가 도출되었다고 사료됨.

- 본 연구에서 공격접종구들의 폐와 간 조직에서 CCD20와 CCD28의 발현 증가가 확인됨. CCD28은 돼지의 비강, 점막, 소장 및 대장, 타액 및 유선과 같은 상피 조직에서 발현됨. 또한 점막 세포 및 타액에서 CCD28은 외부로부터 유해균의 침입 시 항균 작용을 하는 것으로 알려져 있음. 따라서 공격접종구들에서 CCD28의 높은 발현은 접종된 *Pasteurella multocida*와 *Bordetella bronchiseptica*을 대항할 방어기전으로 생성된 것으로 사료됨.
- 본 연구의 상세 결과는 아래와 같음.

① 폐

- 박테리오파지 처치 방식 (dietary supplementation vs. nasal spray treatment)과 *Pasteurella multocida*와 *Bordetella bronchiseptica* 공격접종에 따른 이유자돈 폐 조직 내 IFN γ , IL-6, IL-10, TNF α , CCD20, CCD28 발현 양상을 조사한 결과는 아래 그림에 제시함.

박테리오파지 처리 방식과 공격접종에 따른 이유자돈의 폐 조직 내 IFN γ , IL-6, IL-10, TNF α , CCD20, CCD28 발현 양상



NC, non-challenge+control diet; CC, control diet+challenge; DB, control diet+challenge+bacteriophage in feed (0.1%); SB, control diet+challenge+bacteriophage as nasal spray (0.1%).

IFN, Interferon; IL, Interleukin; TNF, Tumor necrosis factor; CCL, chemokine (C-C motif) ligand.

Error bars represent standard error. Bars with different letters (a-c) differ significantly across all 4 treatment groups ($P < 0.05$).

- 공격접종 후 폐 조직의 IFN γ , IL-6, IL-10, TNF α , CCD20, CCD28 발현량은 모든 공격접종구들 (CC, DB, SB)이 비공격접종구 (NC)에 비해 높음 ($P < 0.05$)을 확인할 수 있었으며, NC의 IFN γ , IL-6, IL-10, TNF α , CCD20, CCD28 발현량은 모든 처리구에 대해 낮게

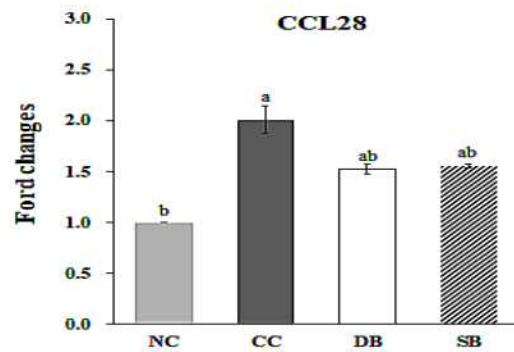
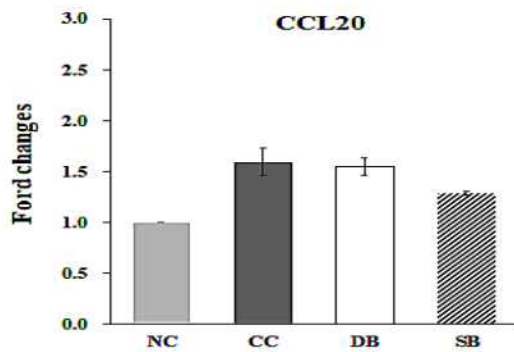
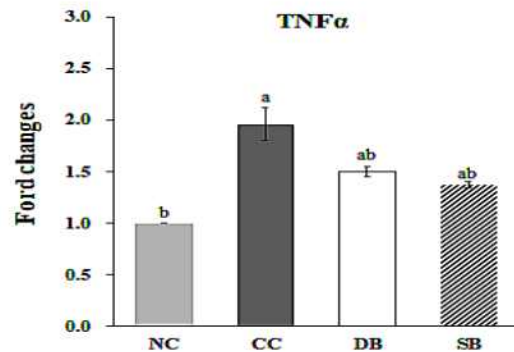
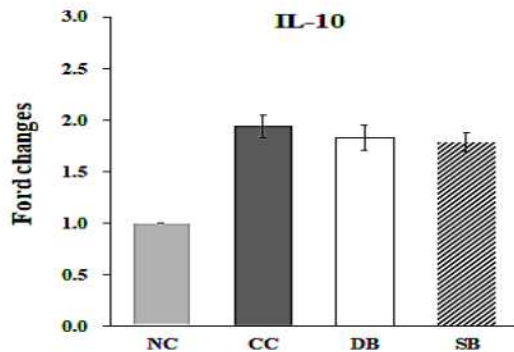
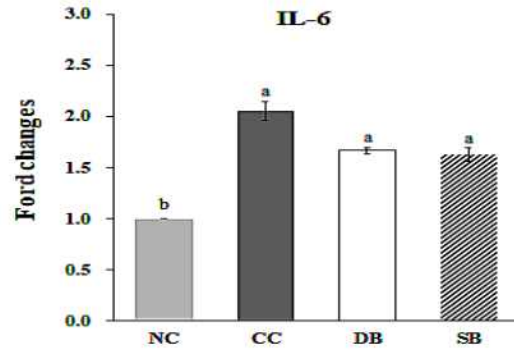
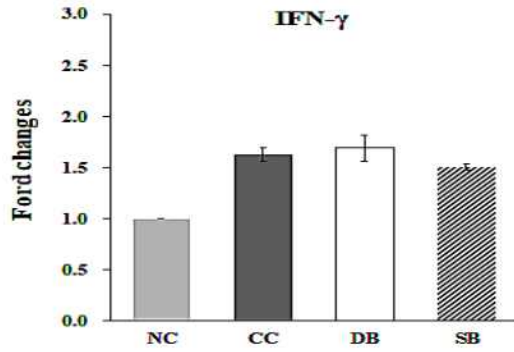
(P<0.05) 나타남.

- 폐 조직의 면역 관련 유전자들의 발현 양상을 살펴볼 때, 공격접종구들 간에서는 CCL20 발현이 유의적인 차이를 나타내었으며, 특히 CC의 CCL20 발현량이 SB의 CCL20보다 높게 (P<0.05) 나타남.

② 기관지

- 박테리오파지 처치 방식 (dietary supplementation vs. nasal spray treatment)과 *Pasteurella multocida*와 *Bordetella bronchiseptica* 공격접종에 따른 이유자돈 기관지 조직 내 IFN γ , IL-6, IL-10, TNF α , CCD20, CCD28 발현 양상을 조사한 결과는 아래 그림에 제시함.

박테리오파지 처치 방식과 공격접종에 따른 이유자돈의 기관지 내 IFN γ , IL-6, IL-10, TNF α , CCD20, CCD28 발현 양상



NC, non-challenge+control diet; CC, control diet+challenge; DB, control diet+challenge+bacteriophage in feed (0.1%); SB, control diet+challenge+bacteriophage as nasal spray (0.1%).

IFN, Interferon; IL, Interleukin; TNF, Tumor necrosis factor; CCL, chemokine (C-C motif) ligand.

Error bars represent standard error. Bars with different letters (a-b) differ significantly across all 4 treatment groups ($P < 0.05$).

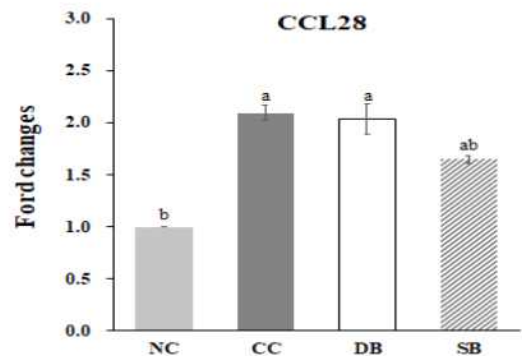
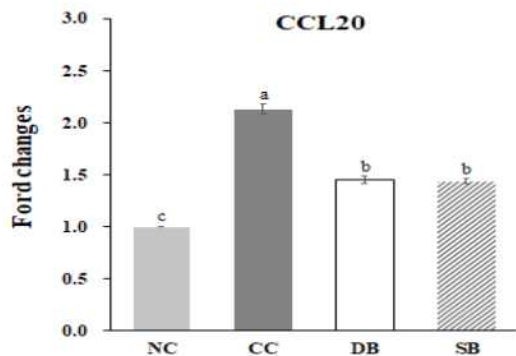
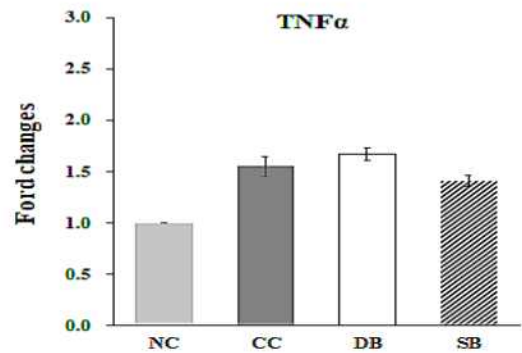
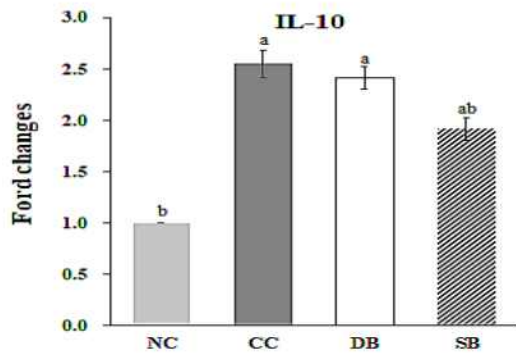
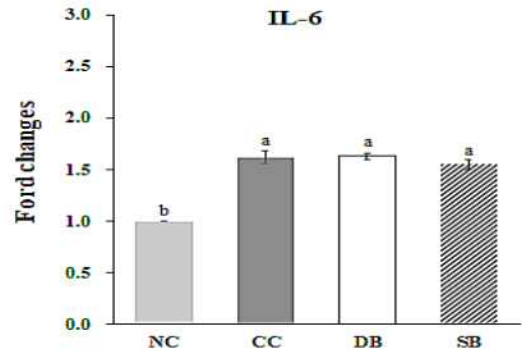
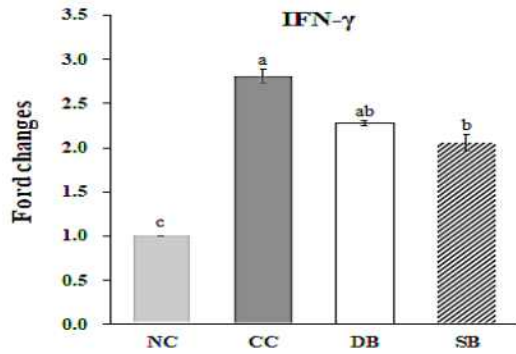
- 공격접종 후 기관지 조직에서 IL-6, TNF α , CCD28의 발현은 그룹 간에 유의적인 차이가 관찰되었으나, IFN γ , IL-10, CCD20의 발현은 그룹 간에 유의적인 차이가 나타나지 않음.

- 기관지 조직에서 IL-6의 발현은 공격접종구들 (CC, DB, SB)이 비접종구(NC) 보다 높게 ($P < 0.05$) 나타났고, $TNF\alpha$ 와 CCL28의 발현 모두 CC에서 가장 높게 ($P < 0.05$) 나타났고 NC에서 가장 낮았음 ($P < 0.05$).

③ 간

- 박테리오파지 처치 방식 (dietary supplementation vs. nasal spray treatment)과 *Pasteurella multocida*와 *Bordetella bronchiseptica* 공격접종에 따른 이유자돈 간 조직 내 $IFN\gamma$, IL-6, IL-10, $TNF\alpha$, CCD20, CCD28 발현 양상을 조사한 결과는 아래 그림에 제시함.

박테리오파지 처치 방식과 공격접종에 따른 이유자돈의 간 조직 내 IFN γ , IL-6, IL-10, TNF α , CCD20, CCD28 발현 양상



NC, non-challenge+control diet; CC, control diet+challenge; DB, control diet+challenge+bacteriophage in feed (0.1%); SB, control diet+challenge+bacteriophage as nasal spray (0.1%).

IFN, Interferon; IL, Interleukin; TNF, Tumor necrosis factor; CCL, chemokine (C-C motif) ligand.

Error bars represent standard error. Bars with different letters (a-c) differ significantly across all 4 treatment groups ($P < 0.05$).

- 공격접종 후 간 조직에서 IFN γ , IL-6, IL-10, CCD20, CCD28 발현은 그룹 간에 유의적인 차이가 관찰되었으나, TNF α 의 발현은 그룹 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았음.

- 간 조직에서 IFN γ 의 발현은 CC에서 가장 높게 (P<0.05) 나타났으며, NC에서 가장 낮게 (P<0.05) 나타남.
- 이와 더불어 공격접종구들 중 SB의 간 조직 내 IFN γ 발현은 CC보다 낮게 (P<0.05) 나타남.
- 간 조직에서 IL-6 발현은 공격접종구들 (CC, DB, SB)이 비공격접종구 (NC)에 비해 높게 (P<0.05) 나타났으며, IL-10 발현은 공격접종구인 CC와 DB에서 가장 높게 (P<0.05) 나타났고, 비공격접종구인 NC에서 가장 낮게 (P<0.05) 나타남.
- CCL20 발현은 CC에서 가장 높았고 (P<0.05), NC가 가장 낮았고, (P<0.05). CCL20 발현은 CC에 비해 DB와 SB에서 낮게 (P<0.05) 나타남.
- 한편, CCL28 발현은 CC와 DB에서 높았고 (P<0.05), NC가 가장 낮게 (P<0.05) 나타남.

(3) 요약 및 결론

- 1~14일 간 공격접종구들 (CC, DB, SB)의 이유자돈 직장온도가 비공격접종구 (NC)의 직장온도보다 대체로 높았음. 이는 공격접종을 통한 면역자극에 의한 정상적 적응 반응으로 생각되지만, 공격접종 후 4~14일 동안은 공격접종구들 중 일반사료를 섭취한 구 (CC)에 비해 박테리오파지가 처치된 구들 (DB, SB)에서 직장온도가 낮아지는 것이 관찰됨.
- 공격접종 후 7, 14일 차에 모두 공격접종구들 (CC, DB, SB)의 WBC가 비공격접종구 (NC)보다 높게 (P<0.01) 나타남. 공격접종 후 7일 차에서는 SB에서 WBC가 가장 높게 (P<0.01) 나타났지만, 14일 차에는 CC에서 WBC가 가장 높게 (P<0.01) 나타남. Lymphocytes와 basophil 모두 공격접종 후 7일 차에서 공격접종구들이 비접종구 (NC)보다 높게 (P<0.01) 나타남.
- 이유자돈 혈액 내 IgM의 농도는 공격접종 후 7일차 14일 차 모두 NC에서 가장 낮게 (P<0.01) 나타남. 공격접종 후 7일 차에 이유자돈 혈액 내 IgG의 농도는 공격접종구인 SB에서 가장 높게 나타났으며 (P<0.01) 비공격접종구인 NC에서 가장 낮았음 (P<0.001).
- 공격접종 후 폐 조직에서의 IFN γ , IL-6, IL-10, TNF α , CCD20, CCD28 발현은 모든 공격접종구들 (CC, DB, SB)이 비공격접종구 (NC)보다 높게 (P<0.05) 나타났으며, NC의 IFN γ , IL-6, IL-10, TNF α , CCD20, CCD28 발현은 모든 처리구에 비해 낮게 (P<0.05) 나타남.
- 폐 조직의 면역 관련 유전자들의 발현 양상을 살펴볼 때, 공격접종구들 간에서는 CCL20 발현이 유의적인 차이를 나타내었으며, 특히 CC의 CCL20 발현량이 SB의 CCL20보다 높게 (P<0.05) 나타남.
- 공격접종 후 이유자돈 기관지 조직에서 IL-6의 발현은 공격접종구들 (CC, DB, SB)이 비공격접종구 (NC) 보다 높게 (P<0.05) 나타남. 기관지 조직에서 TNF α 와 CCL28의 발현 모

두 CC에서 가장 높게 ($P<0.05$) 나타났고, NC에서 가장 낮았음 ($P<0.05$).

- 공격접종 후 이유자돈 간 조직에서 IFN γ 의 발현은 CC에서 가장 높게 ($P<0.05$) 나타났으며, NC에서 가장 낮게 ($P<0.05$) 나타남. 이와 더불어 간 조직에서 IFN γ 의 발현은 공격접종구들 중 SB가 CC 보다 낮게 ($P<0.05$) 나타남. 또한, IL-6 발현은 공격접종구들 (CC, DB, SB)이 비공격접종구 (NC)보다 높게 ($P<0.05$) 나타남. IL-10 발현은 공격접종구인 CC와 DB에서 가장 높게 ($P<0.05$) 나타났으며, 비공격접종구에서는 가장 낮게 ($P<0.05$) 나타남.
- 따라서 본 연구를 통해 박테리오파지의 처치는 *Pasteurella multocida*와 *Bordetella bronchiseptica*의 감염 시 유도되는 면역 반응에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 조사되었으며, 사료 내 박테리오파지를 첨가하여 급여 시에 가장 일관된 결과를 보였음. 향후 본 연구 결과를 바탕으로 낙후된 환경을 가진 양돈 농가에서는 박테리오파지를 사료 첨가제 형태로 급여한다면 질병 예방 및 생산성 유지를 통한 농가소득 증대를 모색할 수 있으리라 판단됨.

나. 이유자돈 시험에 따른 조직 내 박테리아와 박테리오파지 검출 시험

- 이유자돈 시험에서 분류한 4개의 군에서 돼지의 비강 및 폐 조직 시료에서의 세균, 박테리오파지 검출 여부 조사 시험을 실시함.

(1) 그룹의 설정

- 실험은 총 2차로 진행하였고, 각 차수마다 받은 시료는 아래와 같음.
 - i) 1차 시료: 시험 개시 7일차에 그룹 개체 별로 비강 swab 시료 2점 (총 48점)
 - ii) 2차 시료: 시험 종료 시 (3주 차)에 그룹 개체 별로 비강 swab 시료 2점 (48점) 및 그룹 내 3개체의 폐 조직 시료 각 1점 (특정 그룹 내 1개체의 폐 조직 시료를 1점 더 받았기에 총 13점)

(2) 시료의 전처리

- i) 비강 swab 시료
 - ① 15 ml conical tube에 2 ml $1\times$ PBS를 첨가
 - ② 비강 swab sample을 ①항의 tube에 넣고, 1분간 vortexing 실시
- ii) 폐 조직 시료
 - ① 그룹 내 3개체의 폐 조직을 수령 (50 ml conical tube에 약 1g의 폐 조직이 담겨짐을 확인)
 - ② 10 mL $1\times$ PBS와 50 μ L protease inhibitor cocktail을 첨가하여 homogenization
 - ③ 원심분리 (4,500 rpm, 4°C, 20 min)하여 상등액만 취해 새 15 ml conical tube에 옮겨담음

(3) 세균 검출 여부 조사 시험

① 정성 시험

㉞ ID-PCR 수행

→ 상기의 전처리 시료 2 μ l를 template로 하여 세균 특이 primer set를 이용한 ID-PCR을 실시함.

i) *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*)

Target gene	Primer sequence (5' to 3')	Product size (bp)
<i>flaA</i>	F: TGGCGCCTGCCCTATC	237
	R: AGGCTCCCAAGAGAGAAAGGCTT	
Conditions	95°C 10 min → 35 cycles (94°C 1 min, 53°C 15 sec, 72°C 20 sec) → 72°C 7 min	

ii) *Pasteurella multocida* (*P. multocida*)

Target gene	Primer sequence (5' to 3')	Product size (bp)
<i>hyaD-hyaC</i> (type A)	F: TGCCAAAATCGCAGTCAG	1,044
	R: TTGCCATCATTGTCAGTG	
<i>dcbF</i> (type D)	F: TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC	657
	R: CATCTACCCACTCAACCATATCAG	
Conditions	95°C 5 min → 30 cycles (95°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 30 sec) → 72°C 5 min	

㉟ 선택 배지를 이용한 세균 분리

- 선택 배지에서 자란 colony를 멸균 tip으로 따서 50 μ l EB buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5)가 담겨진 PCR tube에 잘 풀어준 후, 2 μ l를 ID-PCR template로 사용

i) *B. bronchiseptica* 선택 배지

- Bordet Gengou Agar (기산바이오, Cat. No. MB-B1006)

Bordet Gengou Agar (1 L 기준)	
- Potato Infusion 4.5 g - Peptic Digest of Animal Tissue 5.0 g - Pancreatic Digest of Casein 5.0 g - Sodium Chloride 5.5 g - Agar 20.0 g Final pH=7.5 at 25°C 121°C, 15min autoclave 45~50°C 까지 cooling후 오른쪽 supplement 첨가	<Supplement> - 2 vials of Bordetella supplement (MB-B1813) - 15 % defibrinated sheep blood (MB-S1876)

ii) *P. multocida* 선택 배지

- Knight agar

Knight agar (1 L 기준)	
- Brain Heart infusion (BD, Cat No. 237500) 37.0 g	<Blood supplement> - 5% defibrinate horse blood
- Agar 15.0 g	<Antimicrobial supplement>
121°C, 15min autoclave	- Clindamycin phosphate 5.0 mg/L
55°C 까지 cooling 후	- Gentamicin sulphate 0.75 mg/L
오른쪽 supplement 첨가	- Potassium tellurite 2.5 mg/L
	- Amphotericin B 5.0 mg/L

- MacConkey agar (ATSKorea, Cat No. LAB045)

(PM의 경우, Knight media에서는 자라고, MacConkey agar에서는 자라지 않음.)

② 정량 시험

- 세균 배양 희석액 (하기 ④항의 희석액)을 이용하여 real-time PCR 및 생균수 조사 시험을 통해 standard curve를 설정함 (*P. multocida*는 D type 균주만 한정해 real-time PCR을 수행).

- ① *B. bronchiseptica* BB-01 및 *P. multocida* PM-D08를 20 ml BHIB (Brain Heart Infusion Broth)가 담겨진 50 ml conical tube에 각각 접종하여 한밤 배양 (공격 접종 시에 사용한 균주와 동일 균주임)
- ② 배양액을 원심분리 (6,000 rpm, 4°C, 5 min)하여 균체 회수
- ③ 10 ml 1x PBS로 균체를 부유시킨 후, 원심분리 (6,000 rpm, 4°C, 5 min) 실시
- ④ 균 부유액을 1x PBS를 이용하여 십진 희석 (10-fold serial dilution)
- ⑤ 희석액 100 μ l를 BHIA (Brain Heart Infusion Agar)에 도말 후 37°C 한밤 배양
- ⑥ Colony 계수

- 희석액 2 μ l를 template로 하여 real-time PCR을 수행함.

Bacteria	Gene	Primer sequence (5' to 3')
<i>B. bronchiseptica</i> (BB)	<i>bfrZ</i>	QF: CGGAGTGAGATCGTGCATCA
		QR: CCACCAAACGCAATGACCTG
<i>P. multocida</i> (PM)	<i>toxA</i>	QF: GAAATGGCTGGAAAAACCAGTG
		QR: GAAAAGGCGCTGAAATTACTGTATC
	Conditions	95°C, 10 min → 48 cycles (95°C, 15 sec → 60°C, 45 sec)
	Conditions	95°C, 10 min → 40 cycles (95°C, 15 sec → 60°C, 60 sec)

- 비강 swab/폐 조직 전처리 시료 2 μ l를 template로 하여 상기 조건으로 real-time PCR을 수행한 후, standard curve 결과와 비교하여 swab 전처리 시료 내 *B. bronchiseptica*와 *P. multocida* 균수를 예측함.

(4) 박테리오파지 검출 여부 조사 시험

① 정성 시험

- 비강 swab/폐 조직 내 박테리오파지 검출 유무를 확인하기 위하여 아래의 시험을 실시함.

- ① 비강 swab/폐 조직 전처리 시료 1 ml를 0.2 μ m syringe filtration 실시
- ② ①항의 여과액 2 μ l를 template로 하여 standard PCR 수행 (하기 표 참조)
- ③ Standard PCR product 2 μ l를 template로 하여 nested PCR을 수행 (하기 표 참조)

i) Standard PCR

Phage name	ORF No.	Primer sequence (5' to 3')	Annealing temp (°C)	Size (bp)
Bor-BRP-1	36	F: GCGCCATGGATGGCTGCTGCGGC	58.0	138
		R: GCGCTCGAGTTATCGTCCCCGTTGGG		
	42	F: GCGCCATGGATGCTTAATGAACACG	58.0	417
		R: GCGCTCGAGTTAAAGAGTGTCCCC		
61	F: GCGCCATGGATGCCTACGTCGGC	57.0	1,065	
	R: GCGCTCGAGTTAATAAATAAACTC			
73	F: GCGCCATGGATGAAACTAACAGCC	58.0	1,557	
	R: GCGCTCGAGTTAGTATCCCGTTG			
Pas-MUP-1	38	F: GCGCCATGGATGGCTAATTCAACAG	59.0	1,641
		R: GCGCTCGAGTTAAACTGCTTCCATTCC		
	39	F: ATGAATAACGCAGAAGTATATGCC	52.0	876
		R: TTA CTTCATTAGGGCTACTTTACGC		
41	F: ATGCAACAGGATTTAAGTATAACC	52.0	588	
	R: TTACCTCGCTAGAAGACCATTAATG			
Pas-MUP-2	47	F: ATGTCATCAAGAGATATCAGTACGG	50.0	2,961
		R: TCATGCTAACTTCTTTGTC		

ii) Nested PCR

Phage name	ORF No.	Primer sequence (5' to 3')	Annealing temp (°C)	Size (bp)
Bor-BRP-1	36	nF: GCCTTTGCCCGAAAGG	57.0	71
		nR: TTACGGCCCTTATCAGCC		
	42	nF: GATGTTAAATCAGGGACTCC	56.0	349
		nR: ATCCAGGTCCGGATGA		
61	nF: CAATTTACTAACAACGCCAC	58.0	997	
	nR: GTCCAGGTGCCGGATTTG			
73	nF: GGGGTTGGTCGGTTCTTG	60.0	1,490	
	nR: CCGCCCCTTCGTTTGATT			
Pas-MUP-1	38	nF: GGGTACGTTAGCTGAAGAAGG	58.0	1,572
		nR: GCTTGCGCAGCTACTTC		
	39	nF: GGTAATGCAGTAATTACCTC	56.0	803
		nR: GTATATGCTTTATCGCGACC		
	41	nF: CCTTGAAGCTGTAAACC	54.0	518
		nR: CCTGAATACCATTGTAGC		
47*	nF: CGAATCGACGGTTCC	54.0	2,895	
	nR: CAACACGATACTCACCC			

(* 해당 ORF를 대상으로 한 PCR 결과로 두 박테리오파지 (Pas-MUP-1, Pas-MUP-2)를 구분 지을 수 있음. PCR 결과가 양성일 경우에는 시료 내 박테리오파지 Pas-MUP-1가 존재하는 것이고, 음성일 경우에는 시료 내 박테리오파지 Pas-MUP-2가 존재하는 것임)

② 정량 시험

- Top agar assay에 사용한 박테리오파지 시료는 아래와 같이 준비

- ① 비강 swab/폐 조직 전처리 시료 여과액을 사용
- ② 1.5 ml microcentrifuge tube에 800 μ l BHIB, 한밤 배양된 대상 숙주 배양액 100 μ l 및 비강 swab 전처리 시료 여과액 100 μ l를 넣어 37°C overnight 배양
- ③ 배양액을 원심분리 (13,000 rpm, 4°C, 2 min) 및 0.2 μ m syringe filtration 실시
- ④ 여과액을 이용하여 Top agar assay 실시

(5) 세균 분리 및 검출 시험 결과 (1차)

① 정성 시험 결과

- 1, 2, 3, 4군의 비강 swab 전처리 시료 (총 48점)를 ID-PCR을 실시한 결과, 모든 시료가 PCR 음성이었음. 이를 통해, 시료 내 세균이 존재하지 않거나 매우 적게 존재할 것이라 판단하였음.
- 3가지 선택 배지 상에서 확보된 colony는 아래와 같았음.

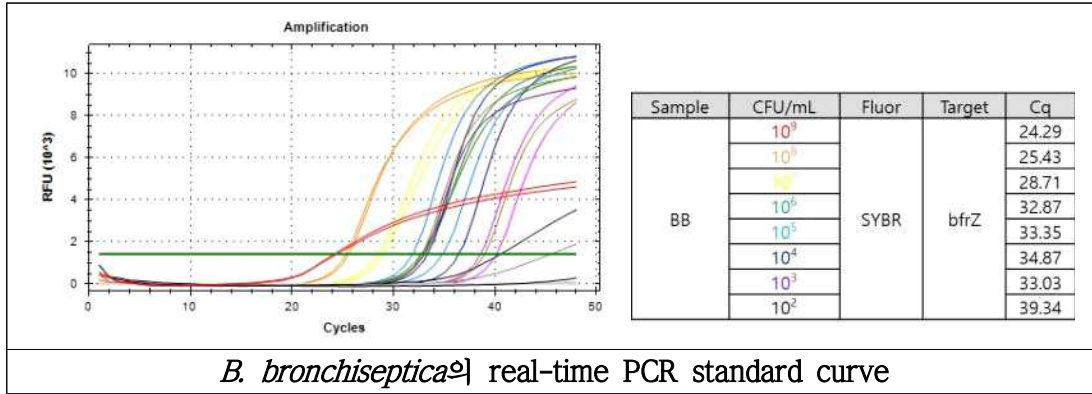
배지 구분	확보 colony 수
Bordet Gengou agar	25
Knight agar	20
MacConkey agar	1

- 배양된 colony를 대상으로 ID-PCR을 수행한 결과, *B. bronchiseptica* 및 *P. multocida* 균주는 검출되지 않았음.

② 정량 시험 결과

i) *B. bronchiseptica* (BB)

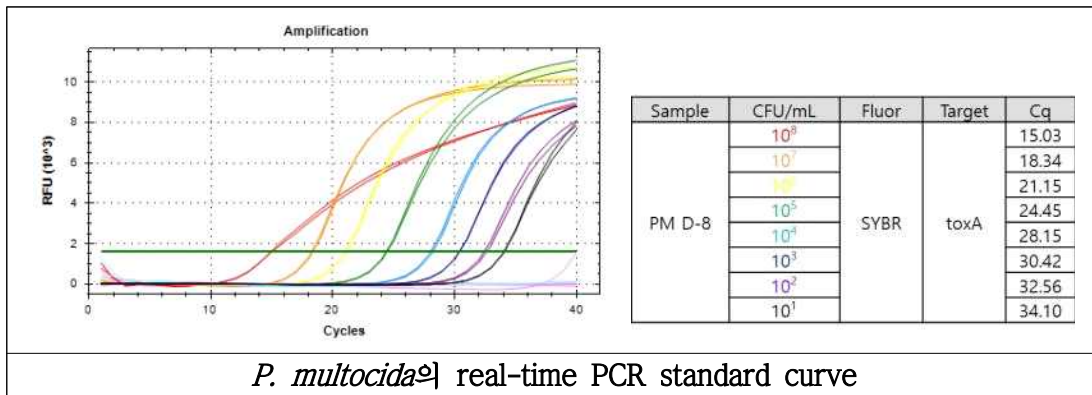
- Standard curve 설정을 위해 real-time PCR을 실시한 결과, 생균수가 낮을 경우에는 primer가 non-specific하게 붙는 경향이 있었음 (생균수가 적은 시료에서 melting curve가 고르지 못하였음). 시료 내 BB가 10^2 cfu/ml수준 이하로 존재할 경우에는 real-time PCR로 정량화 할 수 없다고 판단하였음.



- 4개 군의 swab 시료를 대상으로 real-time PCR을 실시한 결과, 모든 시료가 non-specific하게 증폭이 되는 것을 확인함. 즉, 4개 군 모두 BB가 10^2 cfu/ml보다 훨씬 적거나 거의 존재하지 않는다는 것을 알 수 있었음.

ii) *P. multocida* (PM)

- Standard curve 설정을 위해 real-time PCR을 실시한 결과, PM은 희석 배수에 비례적으로 Cq값이 증가되는 것을 확인할 수 있었음 (melting curve가 고르게 나옴).



- 비강 swab sample을 이용하여 real-time PCR을 수행한 결과, 1군의 swab 시료에서는 PM 균이 검출되지 않았음
- 그러나, 2군에서는 5개체, 3군에서는 4개체, 4군에서는 3개체의 swab 시료에서 PM이 10^1 cfu/ml수준으로 존재하는 것으로 확인되었음. 대표적인 실험 결과를 아래에 제시함.

세균 검출 정량 시험 결과 (3군)

	Results	Melting curve																																																								
3군-L	<table border="1"> <thead> <tr> <th>No</th> <th>Sample</th> <th>Fluor</th> <th>Target</th> <th>Cq</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>3-1L</td> <td rowspan="7">SYBR</td> <td rowspan="7">toxA</td> <td>35.56</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>3-2L</td> <td>34.36</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>3-3L</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>3-4L</td> <td>39.19</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>3-5L</td> <td>37.43</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>3-6L</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>PM D-8</td> <td>20.08</td> </tr> </tbody> </table>	No	Sample	Fluor	Target	Cq	1	3-1L	SYBR	toxA	35.56	2	3-2L	34.36	3	3-3L	-	4	3-4L	39.19	5	3-5L	37.43	6	3-6L	-	7	PM D-8	20.08	<table border="1"> <thead> <tr> <th>No</th> <th>Sample</th> <th>Fluor</th> <th>Target</th> <th>Melt Temp</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>3-1L</td> <td rowspan="7">SYBR</td> <td rowspan="7">toxA</td> <td>79.75</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>3-2L</td> <td>79.75</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>3-3L</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>3-4L</td> <td>76.75</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>3-5L</td> <td>79.75</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>3-6L</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>PM D-8</td> <td>79.5</td> </tr> </tbody> </table>	No	Sample	Fluor	Target	Melt Temp	1	3-1L	SYBR	toxA	79.75	2	3-2L	79.75	3	3-3L	-	4	3-4L	76.75	5	3-5L	79.75	6	3-6L	-	7	PM D-8	79.5
	No	Sample	Fluor	Target	Cq																																																					
1	3-1L	SYBR	toxA	35.56																																																						
2	3-2L			34.36																																																						
3	3-3L			-																																																						
4	3-4L			39.19																																																						
5	3-5L			37.43																																																						
6	3-6L			-																																																						
7	PM D-8			20.08																																																						
No	Sample	Fluor	Target	Melt Temp																																																						
1	3-1L	SYBR	toxA	79.75																																																						
2	3-2L			79.75																																																						
3	3-3L			-																																																						
4	3-4L			76.75																																																						
5	3-5L			79.75																																																						
6	3-6L			-																																																						
7	PM D-8			79.5																																																						
3군-R	<table border="1"> <thead> <tr> <th>No</th> <th>Sample</th> <th>Fluor</th> <th>Target</th> <th>Cq</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>3-1R</td> <td rowspan="7">SYBR</td> <td rowspan="7">toxA</td> <td>32.11</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>3-2R</td> <td>34.39</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>3-3R</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>3-4R</td> <td>34.12</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>3-5R</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>3-6R</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>PM D-8</td> <td>20.08</td> </tr> </tbody> </table>	No	Sample	Fluor	Target	Cq	1	3-1R	SYBR	toxA	32.11	2	3-2R	34.39	3	3-3R	-	4	3-4R	34.12	5	3-5R	-	6	3-6R	-	7	PM D-8	20.08	<table border="1"> <thead> <tr> <th>No</th> <th>Sample</th> <th>Fluor</th> <th>Target</th> <th>Melt Temp</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>3-1R</td> <td rowspan="7">SYBR</td> <td rowspan="7">toxA</td> <td>80.00</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>3-2R</td> <td>79.75</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>3-3R</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>3-4R</td> <td>79.50</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>3-5R</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>3-6R</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>PM D-8</td> <td>79.50</td> </tr> </tbody> </table>	No	Sample	Fluor	Target	Melt Temp	1	3-1R	SYBR	toxA	80.00	2	3-2R	79.75	3	3-3R	-	4	3-4R	79.50	5	3-5R	-	6	3-6R	-	7	PM D-8	79.50
	No	Sample	Fluor	Target	Cq																																																					
1	3-1R	SYBR	toxA	32.11																																																						
2	3-2R			34.39																																																						
3	3-3R			-																																																						
4	3-4R			34.12																																																						
5	3-5R			-																																																						
6	3-6R			-																																																						
7	PM D-8			20.08																																																						
No	Sample	Fluor	Target	Melt Temp																																																						
1	3-1R	SYBR	toxA	80.00																																																						
2	3-2R			79.75																																																						
3	3-3R			-																																																						
4	3-4R			79.50																																																						
5	3-5R			-																																																						
6	3-6R			-																																																						
7	PM D-8			79.50																																																						

(6) 박테리오파지 검출 여부 조사 시험 결과 (1차)

① 정성 시험 결과

- Standard PCR 수행 결과, 모든 시료가 PCR 음성이었음.
- Nested PCR 수행 결과, 3군의 1개체 (비강 시료 1점)와 4군의 4개체 (비강 시료 6점)가 PCR 양성임을 확인할 수 있었음.
- 본 결과를 통해 3, 4군이 박테리오파지 처치군인 것으로 생각되었으나, 매우 적은 양으로 존재하고 있음을 확인할 수 있었음

그룹별 박테리오파지 정성 시험 결과

	BRP-1	MUP-1	MUP-2		BRP-1	MUP-1	MUP-2
1-1L	-	-	-		1-1R	-	-
1-2L	-	-	-		1-2R	-	-
1-3L	-	-	-		1-3R	-	-
1-4L	-	-	-		1-4R	-	-
1-5L	-	-	-		1-5R	-	-
1-6L	-	-	-		1-6R	-	-
	BRP-1	MUP-1	MUP-2		BRP-1	MUP-1	MUP-2
2-1L	-	-	-		2-1R	-	-
2-2L	-	-	-		2-2R	-	-
2-3L	-	-	-		2-3R	-	-
2-4L	-	-	-		2-4R	-	-
2-5L	-	-	-		2-5R	-	-
2-6L	-	-	-		2-6R	-	-
	BRP-1	MUP-1	MUP-2		BRP-1	MUP-1	MUP-2
3-1L	-	-	-		3-1R	-	-
3-2L	-	-	-		3-2R	-	-
3-3L	-	+	-		3-3R	-	-
3-4L	-	-	-		3-4R	-	-
3-5L	-	-	-		3-5R	-	-
3-6L	-	-	-		3-6R	-	-
	BRP-1	MUP-1	MUP-2		BRP-1	MUP-1	MUP-2
4-1L	+	-	+		4-1R	-	-
4-2L	-	-	-		4-2R	-	-
4-3L	+	-	+		4-3R	-	+
4-4L	+	-	+		4-4R	-	+
4-5L	-	-	-		4-5R	-	+
4-6L	-	-	-		4-6R	-	-

② 정량 시험 결과

- PCR 양성 결과가 나온 시료와 대상 균주를 함께 배양 후 확보된 여과액을 이용하여 top agar assay를 실시한 결과, 모두 10^3 pfu/ml수준의 박테리오파지가 검출되었음.

※ 1차 실험 결과 요약

- 비강 swab 시료 내 박테리아 및 박테리오파지 검출 실험 결과를 통해 아래와 같이 그룹이 구분되어 있을 것이라 추정됨. 어느 군이 사료 또는 비강 처치 군인지는 알 수 없으나, 3군과 4군이 박테리오파지 처치군이라 판단됨.

	1군	2군	3군	4군
박테리아 검출 개체수	0/6	5/6	4/6	3/6
박테리오파지 검출 개체수	0/6	0/6	1/6	4/6
결과	NC	CC	SB	DB

(7) 세균 분리 및 검출 시험 결과 (2차)

① 정성 시험 결과 (폐 조직)

- 1, 2, 3, 4군의 폐 조직 전처리 시료 (총 13점)를 ID-PCR을 실시한 결과, 모든 시료가 PCR 음성이었음. 이를 통해, 시료 내 세균이 존재하지 않거나 매우 적게 존재할 것이라 판단하였음.

② 정성 시험 결과 (비강 swab 시료)

- 1, 2, 3, 4군의 비강 swab 전처리 시료 (총 48점)를 ID-PCR을 실시한 결과, 모든 시료가 PCR 음성이었음. 이를 통해, 시료 내 세균이 존재하지 않거나 매우 적게 존재할 것이라 판단하였음.

③ 정량 시험 결과

i) *B. bronchiseptica* (BB)

- Real-time PCR 결과, 4개 군의 폐조직과 비강 swab 시료 내에 BB가 검출되지 않았음.

ii) *P. multocida* (PM)

- 폐조직 시료에서는 4개 군 모두 PM이 검출되지 않았지만, 비강 swab 시료에서는 4개군 중에 1군을 제외한 나머지 3개 군에서는 PM이 검출되었음.
- 2군에서는 3개체, 3군에서는 2개체, 4군에서는 2개체의 swab 시료에서 PM이 존재하는 것으로 확인되었음. 2군 2번 개체가 나머지 개체에 비해 PM이 상대적으로 높은 수준 존재하는 것으로 확인되었음 (10^2 cfu/ml)

(8) 박테리오파지 검출 여부 조사 시험 결과 (2차)

① 정성 시험 결과

- Standard PCR 수행 결과, 폐조직 및 비강 swab 시료 모두 PCR 음성이었음.
- Nested PCR 수행 결과, 폐조직 시료의 경우, 3군을 제외한 3개 군에서 1개체씩 검출이 되었음. 비강 swab 시료의 경우도 3군을 제외한 3개 군에서 검출되었는데, 1군에서는 2개체, 2군에서는 1개체, 4군에서는 2개체에서 검출되었음.

그룹별 박테리오파지 정성 시험 결과 (폐조직 시료)

	BRP-1	MUP-1	MUP-2		BRP-1	MUP-1	MUP-2
1-1	-	-	-		2-1	-	+
1-2	-	-	+		2-2	-	-
1-3	-	-	-		2-3	-	-
	BRP-1	MUP-1	MUP-2		BRP-1	MUP-1	MUP-2
3-1_1	-	-	-		4-1	+	-
3-1_2	-	-	-		4-2	-	-
3-2	-	-	-		4-3	-	-
3-3	-	-	-				

그룹별 박테리오파지 정성 시험 결과 (비강 swab 시료)

	BRP-1	MUP-1	MUP-2		BRP-1	MUP-1	MUP-2
1-1L	-	-	-	1-1R	+	-	-
1-2L	-	-	-	1-2R	+	-	-
1-3L	-	-	-	1-3R	-	-	-
1-4L	-	-	-	1-4R	-	-	-
1-5L	-	-	-	1-5R	-	-	-
1-6L	-	-	-	1-6R	-	-	-
	BRP-1	MUP-1	MUP-2		BRP-1	MUP-1	MUP-2
2-1L	-	-	-	2-1R	-	-	-
2-2L	-	-	-	2-2R	-	-	-
2-3L	-	-	-	2-3R	-	-	-
2-4L	-	-	-	2-4R	+	-	-
2-5L	-	-	-	2-5R	-	-	-
2-6L	-	-	-	2-6R	-	-	-
	BRP-1	MUP-1	MUP-2		BRP-1	MUP-1	MUP-2
3-1L	-	-	-	3-1R	-	-	-
3-2L	-	-	-	3-2R	-	-	-
3-3L	-	-	-	3-3R	-	-	-
3-4L	-	-	-	3-4R	-	-	-
3-5L	-	-	-	3-5R	-	-	-
3-6L	-	-	-	3-6R	-	-	-
	BRP-1	MUP-1	MUP-2		BRP-1	MUP-1	MUP-2
4-1L	-	-	-	4-1R	-	-	-
4-2L	-	-	-	4-2R	-	-	-
4-3L	+	-	-	4-3R	-	-	-
4-4L	-	-	-	4-4R	-	-	-
4-5L	-	-	+	4-5R	-	-	-
4-6L	-	-	-	4-6R	-	-	-

- 앞서 박테리아 정량 시험을 통해 1군은 박테리아 공격 접종을 실시하지 않은 것으로 확인되었으나, 박테리오파지 정성 시험 결과 1, 2, 4군이 PCR 양성이었음. 이를 통해 1군의 경우, 박테리오파지 처치군과의 교차 오염이 발생되었을 가능성이 있다고 생각됨.

② 정량 시험 결과

- 1차 시험과 동일 조건 하에 실험을 실시한 결과, 모두 10^3 pfu/ml 수준의 박테리오파지가 검출되었음.

※ 2차 실험 결과 요약

- 폐 조직 및 비강 swab 시료 내 박테리아 및 박테리오파지 검출 실험 결과를 통해 아래와 같이 그룹이 구분되어 있을 것이라 추정됨. 어느 군이 사료 또는 비강 처치 군인지는 알 수 없으나, 2군과 4군이 박테리오파지 처치군이라 판단됨.

		1군	2군	3군	4군
폐조직	박테리아	0/3	0/3	0/4	0/3
	검출 개체수	1/3	0/3	0/4	1/3
비강 swab 시료	박테리오파지	0/6	3/6	2/6	2/6
	검출 개체수	2/6	1/6	0/6	2/6
결과		NC	DB	CC	SB

- 실험 종료 후, 강원대학교로부터 대조군 및 박테리오파지 처치군에 대한 정보를 제공받았을 때 1, 2차 실험 결과와 부합됨을 확인할 수 있었음.

(9) 비강 내 상재균 조사

- 1차 비강 swab 시료에서 그룹 별로 2개씩을 무작위 선택하여, BHIA에 배양하여 확보한 single colony를 16S rRNA 분석을 실시한 결과는 아래와 같았음. 본 실험을 통해, 비강 내 상재 균에 대한 개략적인 정보를 파악할 수 있었음.

Group명	No.	16S rRNA 동정 결과
1군	1-1	<i>Streptococcus hyovaginalis</i>
	1-2	<i>Staphylococcus edaphicus</i>
2군	2-1	<i>Staphylococcus edaphicus</i>
	2-2	<i>Enterococcus hirae</i>
3군	3-1	<i>Staphylococcus cohnii</i>
	3-2	<i>Staphylococcus cohnii</i>
4군	4-1	<i>Staphylococcus edaphicus</i>
	4-2	<i>Enterococcus durans</i>

<제1협동연구기관>

1. 호흡기 상피세포 (PT-K75 cell)에서의 박테리오파지의 활성 조사

- 돼지 호흡기 상피세포 (PT-K75 cell)에 호흡기 원인균 (*Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*)의 박테리오파지 (Bor-BRP-1, Pas-MUP-1)를 처리하고 그 이후 균을 감염시켜 다음과 같이 real time quantitative PCR을 시행함. 실험 방법은 아래와 같음.

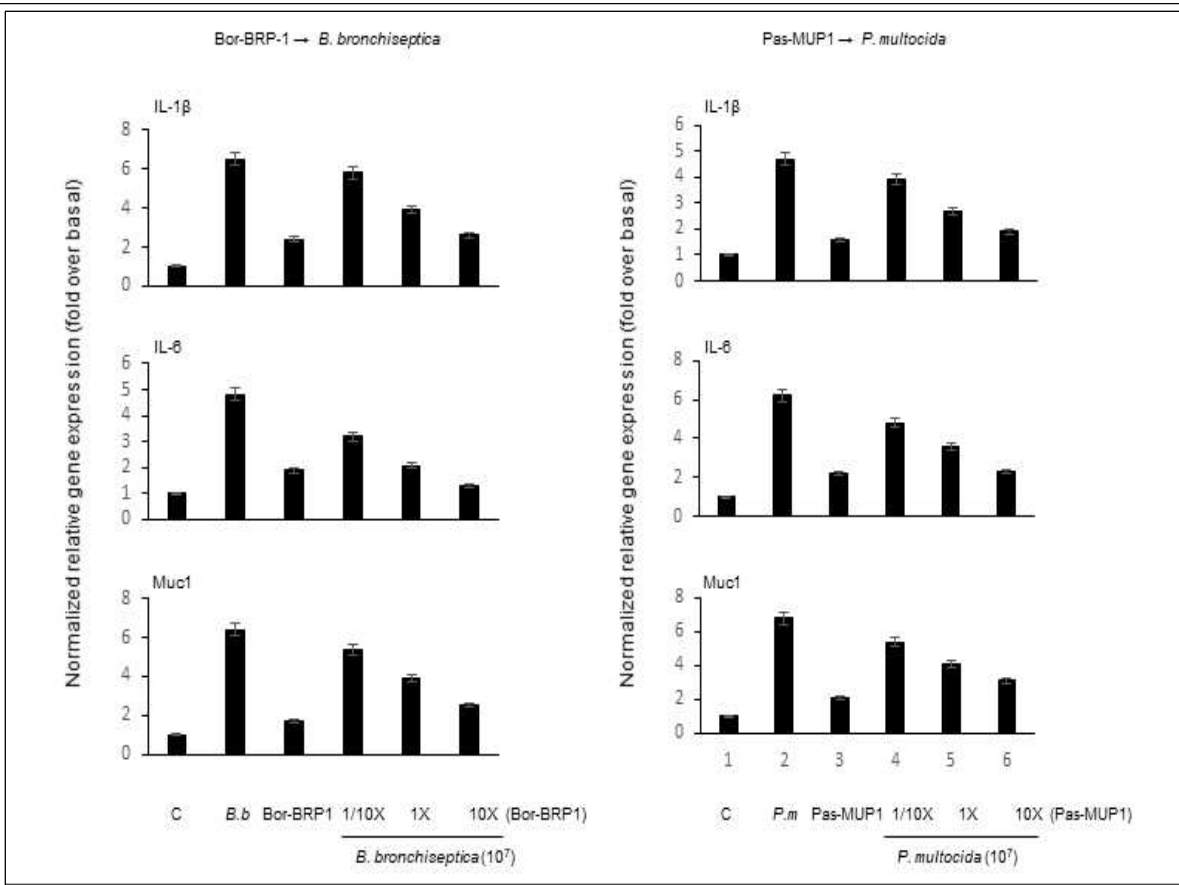
- ① Day 1: PT-K75 세포를 6 well plate에 well 당 5×10^5 cell 로 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양
- ② Day 2: 0.2% FBS 포함된 배지로 배지를 교환
- ③ Day 3: 박테리오파지 (Bor-BRP-1, Pas-MUP-1)는 *B. bronchiseptica*, *P. multocida*의 처치농도 (1×10^7 cfu/ml) 의 1/10 배, 1배, 10배 농도로 24시간 처리
- ④ Day 4: *B. bronchiseptica*, *P. multocida*를 1×10^7 cfu/ml 로 4시간/ 24시간 처치

Sample 목록
i) 대조군 (Control; 배지)
ii) 박테리아 (1×10^7 cfu/ml)
iii) 박테리오파지를 MOI=0.1로 접종하여 24시간 배양 후 박테리아 처치
iv) 박테리오파지를 MOI=1로 접종하여 24시간 배양 후 박테리아 처치
v) 박테리오파지를 MOI=10로 접종하여 24시간 배양 후 박테리아 처치

- ⑤ Day 5: TRIzol harvest 하여 RNA 추출하고 Reverse transcriptase-PCR 시행하여 cDNA를 합성함.

Primer	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
IL-1 β	GAGCATCAGGCAGATGGTGT	CAAGGATGATGGGCTCTTCTTC
IL-6	GCTGCTTCTGGTGATGGCTACTGCC	TGAAACTCCACAAGACCGGTGGTGA
Muc 1	GTGCCGACGAAAGAACTG	TGCCAGGTTTCGAGTAAGAG
GAPDH	AAGGAGTAAGAGCCCTGGA	TCTGGGATGGAACTGGAAG

- 위 실험을 수행한 결과, 호흡기 질환균을 처치하기 24시간 전에 각 박테리오파지를 먼저 처리한 후 *B. bronchiseptica*, *P. multocida*를 4시간 처치했을 때의 IL-1 β 와 IL-6의 gene expression을 확인한 결과 아래와 같은 변화를 보임. 또한 mucin 확인을 위해 호흡기 질환균 24시간 처치 후 muc1 변화도 아래와 같이 확인하였음. 박테리오파지 처리 농도가 증가함에 따라 IL-1 β , IL-6, 그리고 mucin 1이 감소함을 확인하였음.



박테리아와 박테리오파지의 처치에 따른 IL-1β, IL-6, Muc1의 변화

2. Transcriptome analysis

- 돼지 호흡기 상피세포에 대표적인 호흡기 원인균인 *B. bronchiseptica*와 *P. multocida*를 감염시켰을 때 전염증성 사이토카인인 IL-1β, IL-6 와 항염증성 뮤신인 muc1의 유의미한 발현 증가를 확인하였고 호흡기 원인균에 대한 박테리오파지를 처리하였을 때 해당 유전자들이 농도에 따라 발현이 감소됨을 확인하였음. 호흡기 원인균과 박테리오파지에 따른 전체적인 유전자 변화를 확인하기 위해 e-biogen에 RNA sequencing 분석을 의뢰함. 실험 방법은 아래와 같음.

- ① Day 1: PT-K75 세포를 6 well plate에 well 당 5×10^5 cell 로 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양
- ② Day 2: 0.2% FBS 포함된 배지로 배지를 교환
- ③ Day 3: 박테리오파지 (Bor-BRP-1, Pas-MUP-1)는 *B. bronchiseptica*, *P. multocida*의 처치농도 (1×10^7 cfu/ml) 의 10배 농도로 24시간 처리
- ④ Day 4: *B. bronchiseptica*, *P. multocida*를 1×10^7 cfu/ml 로 4시간 처치

Sample 목록
i) 대조군 (Control; 배지)
ii) 박테리아 (1×10^7 cfu/ml)
iii) 박테리오파지를 MOI=10로 접종하여 24시간 배양
iv) 박테리오파지를 MOI=10로 접종하여 24시간 배양 후 박테리아를 4시간 처치

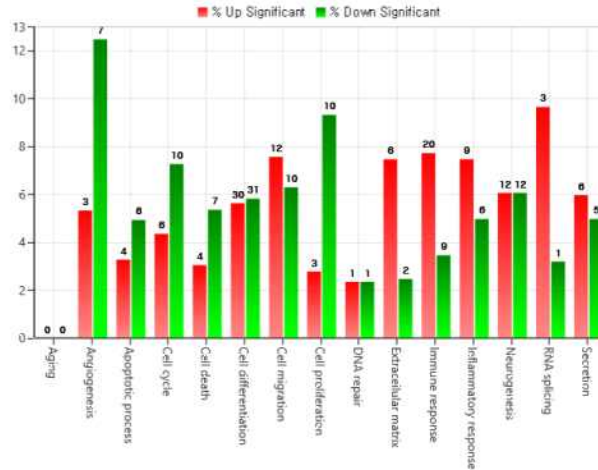
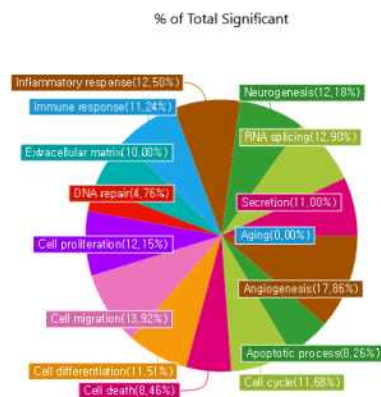
- ⑤ Day 5: TRIzol harvest 하여 e-biogen 에 sequencing 의뢰함.

- 본 실험에서 전체 3684개의 유전자를 분석하였고, 그 중 그룹간의 fold change 2 이상, p-value 0.05 이하인 유전자를 선택; *B. bronchiseptica*와 관련된 유전자는 953개, *P. multocida*와 관련된 유전자 868개를 분석하였음.

가. *B. bronchiseptica*

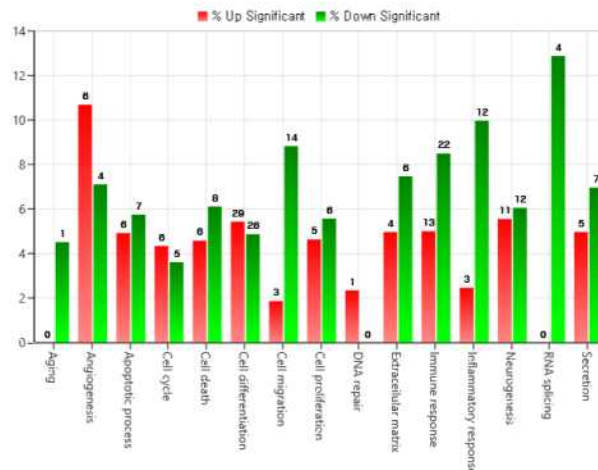
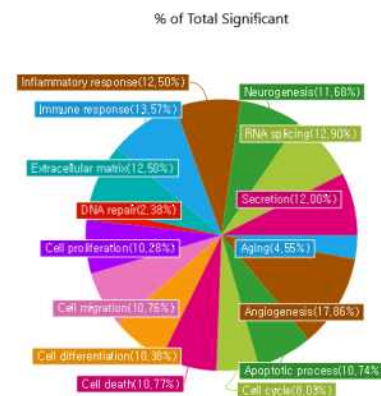
(1) Control vs. *B. bronchiseptica*

- Control 그룹 (C 그룹)과 *B. bronchiseptica*를 처리한 그룹을 비교했을 때, 유의미한 변화를 보이는 유전자의 분포는 아래와 같았음. C 그룹에 비해 *B. bronchiseptica*를 처치한 그룹에서 inflammatory response, immune response, cell migration, cell differentiation, RNA splicing 과 관련된 유전자가 유의미하게 증가됨.



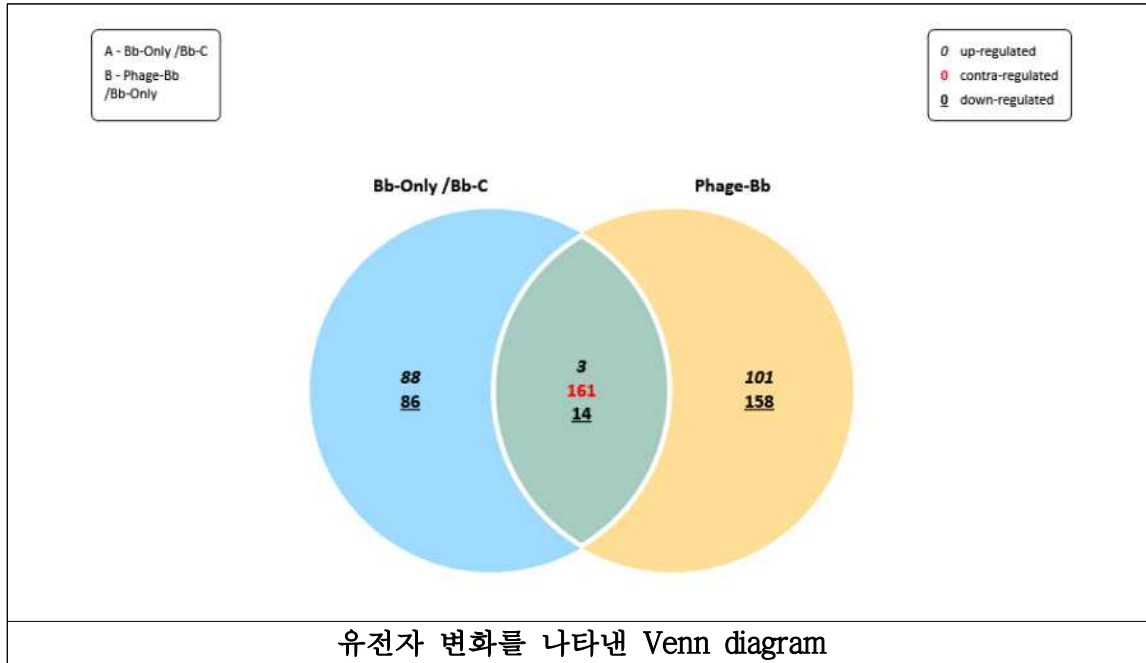
B. bronchiseptica 처리에 따른 유전자 변화

(2) Bor-BRP-1 24시간 처리 후 *B. bronchiseptica* 처치군 vs. *B. bronchiseptica* 처치군
 - Bor-BRP-1 24시간 처리 후 *B. bronchiseptica*를 감염시킨 그룹과 *B. bronchiseptica*만 감염시킨 그룹을 비교했을 때 유전자의 변화 양상은 아래와 같았음. *B. bronchiseptica*만 처치한 그룹에 비해 Bor-BRP-1 처리 후 *B. bronchiseptica*를 처치한 그룹에서 immune response, inflammatory response 등과 관련 있는 유전자의 확연한 down-regulation이 보임.



B. bronchiseptica 와 Bor-BRP-1 처리에 따른 유전자 변화

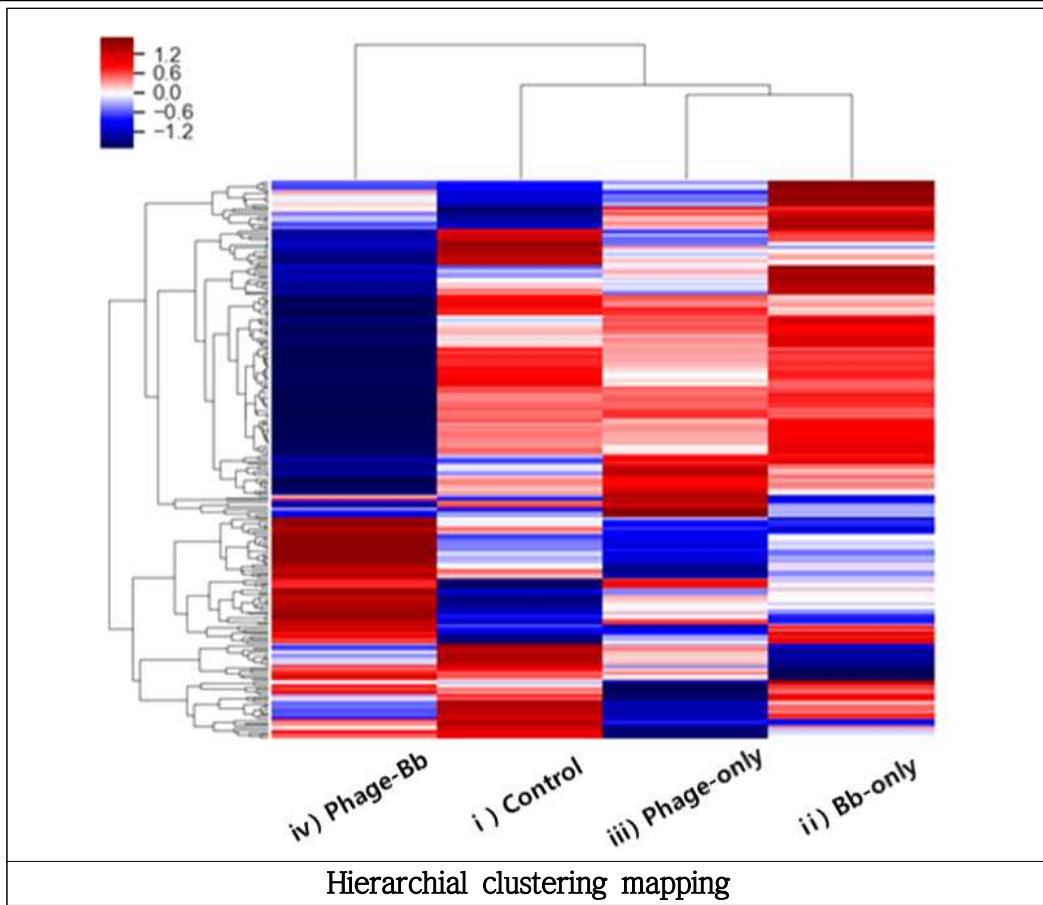
(3) Venn diagram
 - *B. bronchiseptica* / C 그룹에서 증감된 유전자와 Bor-BRP-1 처리 후 *B. bronchiseptica* / *B. bronchiseptica*만 감염시킨 그룹에서 증감된 유전자를 비교했을 때 아래와 같았음.



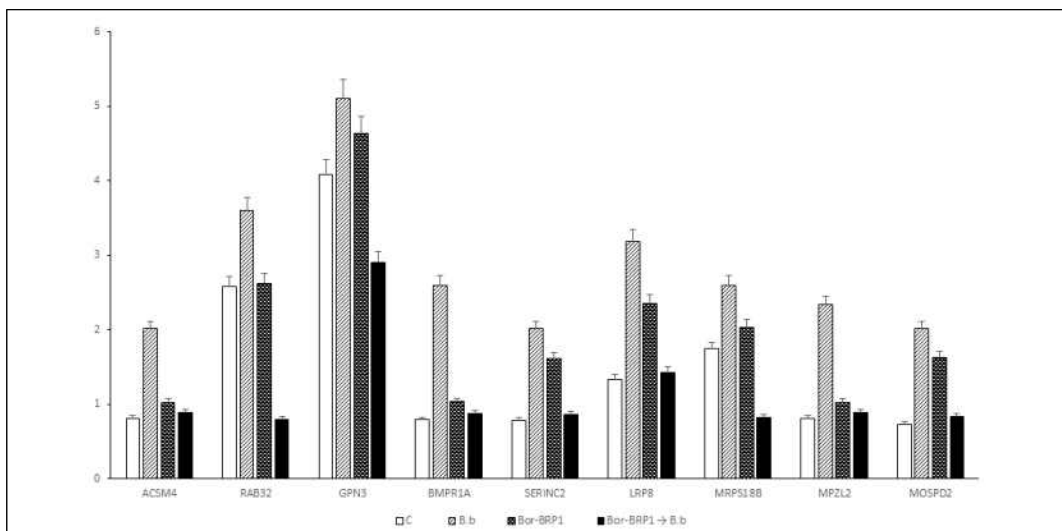
- C 그룹에 비해 *B. bronchiseptica* 그룹에서 88개 유전자는 up-regulated, 86개의 유전자는 down-regulated 되었음.
- 박테리오파지 처리 후 *B. bronchiseptica*를 처리한 그룹은 *B. bronchiseptica* 만 처리한 그룹에 비해 101개의 유전자가 up-regulated 되고 158개의 유전자가 down-regulated 되었음. 각 그룹간의 비교에서 공통된 유전자 중 증가된 유전자는 3개, 감소된 유전자는 14개 였고 반대로 조절된 유전자의 개수는 161개였음.

(4) Hierarchical clustering mapping

- 각 그룹간의 fold change 2 이상, normalized data 4 이상, p-value 0.05 이하인 유전자를 선택; *B. bronchiseptica*와 관련된 유전자는 304개를 분석하였음.
- 전체 304개의 유전자의 전반적인 증감은 아래와 같음. 붉은색은 증가, 파란색은 감소를 나타냄. *B. bronchiseptica* 처치군에서 증가된 여러 유전자들이 Bor-BRP-1 처리 후 *B. bronchiseptica*를 처치한 군에서는 감소되는 것을 확인했음.



- 전반적인 유전자의 증감 중 몇몇 유전자를 선택하여 각 그룹에서의 유전자 발현정도를 비교하였음. 각 유전자의 그룹 간 변화는 아래와 같이 유사한 양상을 보였음. Bor-BRP-1 처리 후 *B. bronchiseptica* 처치 군에서 *B. bronchiseptica*만 처치한 군에 비해 유전자 발현정도가 감소되는 것을 확인할 수 있었음.



각 처리군에 따른 유전자 변화

- (5) DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) 분석
 - 304개 유전자 중 유의미한 결과를 보이는 유전자는 다음과 같이 주로 immune response 와 관련된 유전자가 많았음.

박테리아, 박테리오파지 처치 시 유의미한 변화를 보이는 유전자 목록				
GO Term	Function	Count	P-value	Genes
GO:0043944	Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	14	4.844290657	MEF2A, CREB3, COPB5, MITF, BMPR2, SMAD3, CCNC, IL33, CDK7, PARK7, PLAGL1, SHOX2, HEY2, PKD1
GO:0006955	Immune response	11	3.806228374	CSF2, IL6, CCL20, IL1B1, SLPI, SMAD3, CD70, OAS1, OAS2, SLA-5, LTB
GO:0051607	Defense response to virus	9	3.114186851	IFIT3, CD86, IFIT1, C2H19ORF66, RSAD2, OAS1, IL33, OAS2, MX2
GO:0045087	Innate immune response	9	3.114186851	CD46, TLR2, CNPY3, SLPI, RSAD2, OAS1, PTK3, MX2, SYK
GO:0006366	Transcription from RNA polymerase II promoter	6	2.076124567	PLAGL1, POLR2I, BMPR2, GTF2H4, CDK7, USF1
GO:0006508	Proteolysis	6	2.076124567	ACY1, CD46, ADAM17, CELA2A, MMP1, PLAU
GO:0010628	Positive regulation of gene expression	6	2.076124567	SPDYA, CSF2, CD46, TLR2, ITGB3, DTNBP1
GO:0001701	In utero embryonic development	6	2.076124567	SRSF1, MSX1, SMAD3, ANGPT1, SCO2, RTCB
GO:0045071	Negative regulation of viral genome replication	5	1.730103806	IFIT1, C2H19ORF66, SLPI, RSAD2, OAS1
GO:0051603	Proteolysis involved in cellular protein catabolic process	5	1.730103806	PSMB10, PSMA5, PSMB8, PSMB9
GO:0032091	Negative regulation of protein binding	5	1.730103806	IFIT1, SLPI, DTNBP1, PARK7, LRPAP1
GO:0010468	Regulation of gene expression	5	1.730103806	FUT8, EIF4A2, DDX39B, PRKAA2, PHLDA2
GO:0001666	Response to hypoxia	5	1.730103806	PLAT, NR4A2, SMAD3, USF1, PLAU
GO:0006468	Protein phosphorylation	5	1.730103806	SRPK3, NRBP1, SMAD9, PRKAA2, SYK

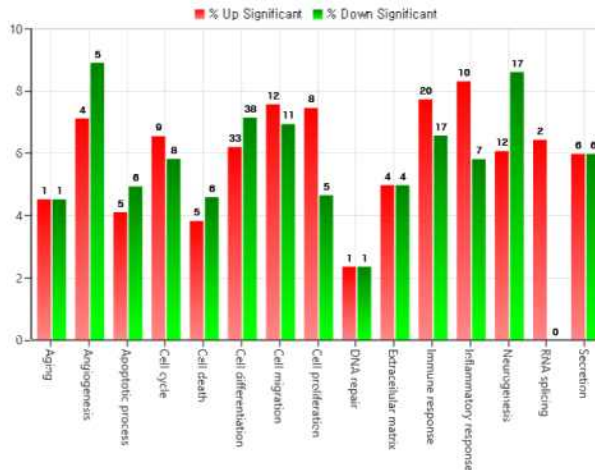
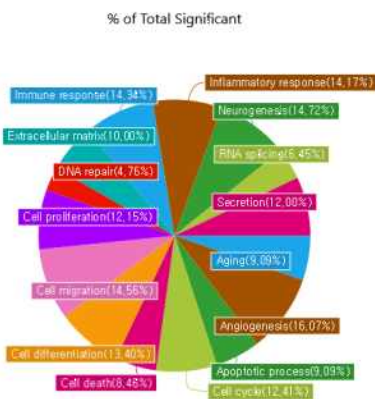
- 각 유전자들이 어떤 pathway 에 포함되어있는지 확인하기 위해 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 분석을 시행한 결과는 아래와 같음.

유전자의 KEGG 분석		
KEGG_PATHWAY	Count	P-value
Metabolic pathways	40	0.00204919
PI3K-Akt signaling pathway	12	0.090067616
Rheumatoid arthritis	11	1.33E-05
Transcriptional misregulation in cancer	11	0.001503855
Influenza A	10	0.009469765
TNF signaling pathway	9	0.002125179
Measles	9	0.007234067
Herpes simplex infection	9	0.041334494
Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	8	0.055703547
Proteasome	7	3.58E-04
Chagas disease (American trypanosomiasis)	7	0.026951108
AMPK signaling pathway	7	0.039284442
Hepatitis C	7	0.054732598

나. *P. multocida*

(1) Control vs. *P. multocida*

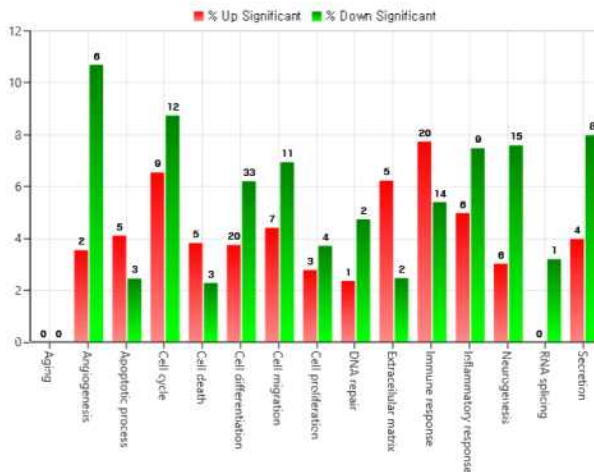
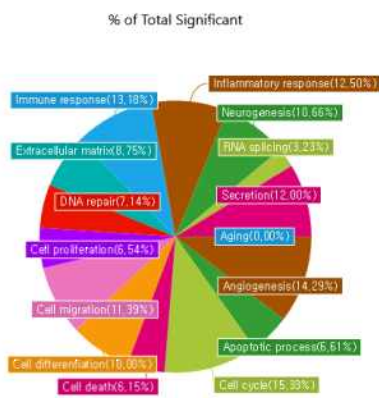
- Control 그룹 (C 그룹)과 *P. multocida*를 처치한 그룹을 비교했을 때 유의미한 변화를 보이는 유전자의 분포는 아래와 같았음. *P. multocida*를 처치한 그룹에서 C 그룹에 비해 inflammatory response, immune response, cell migration, cell differentiation, RNA splicing 과 관련된 유전자가 유의미하게 증가됨.



P. multocida 처리에 따른 유전자 변화

(2) Pas-MUP-1 24시간 처리 후 *P. multocida* 처치군 vs. *P. multocida* 처치군

- Pas-MUP-1 24시간 처리 후 *P. multocida*를 감염시킨 그룹과 *P. multocida*만 감염시킨 그룹을 비교했을 때 유전자의 변화 양상은 아래와 같았음. Pas-MUP-1 처리 후 *P. multocida*를 처치한 그룹에서 *P. multocida*만 처치한 그룹에 비해 cell differentiation, cell migration, secretion, inflammatory response 등과 관련 있는 유전자의 확연하게 down-regulation 됨.

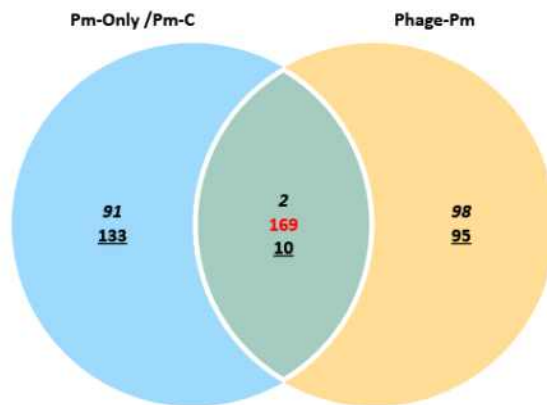


P. multocida 와 Pas-MUP-1 처리에 따른 유전자 변화

(3) Venn diagram

A - Pm-Only /Pm-C
 B - Phage-Pm
 /Pm-Only

0 up-regulated
 1 contra-regulated
 2 down-regulated

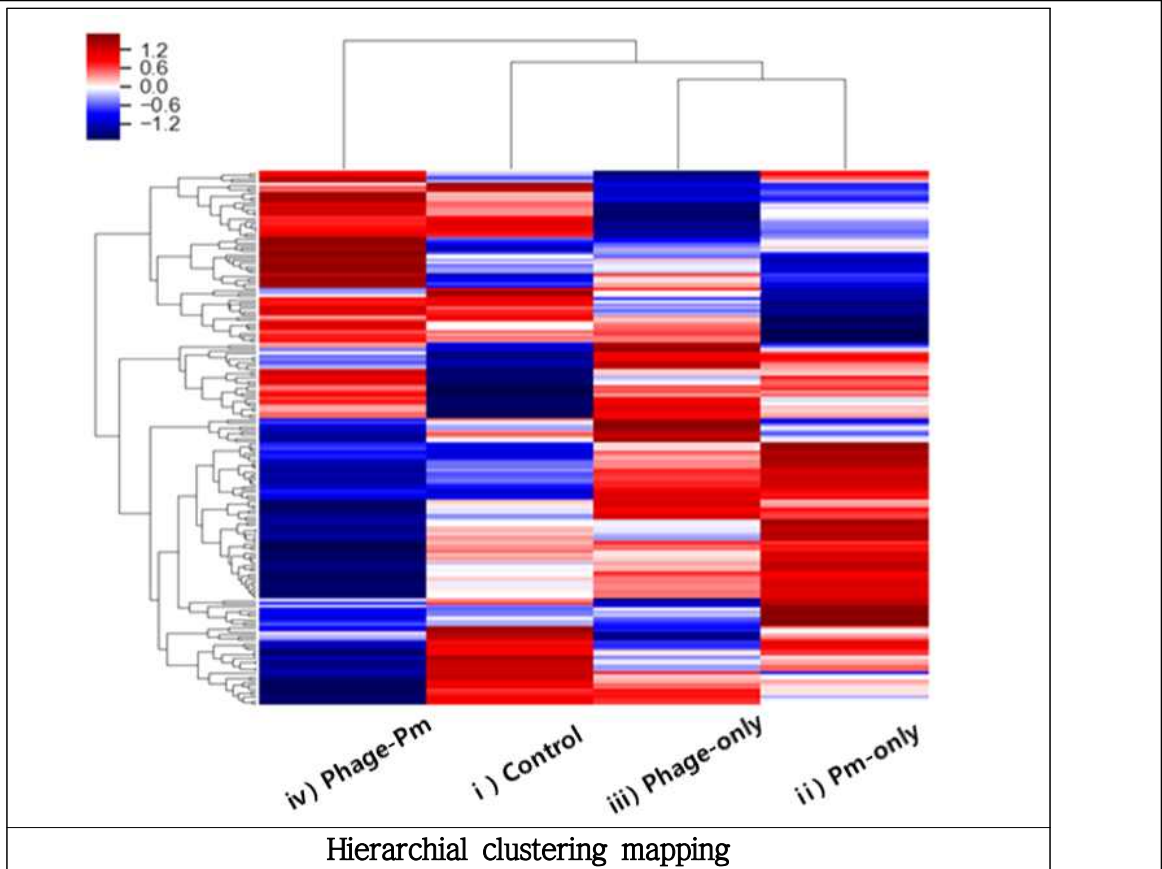


유전자 변화를 나타낸 Venn diagram

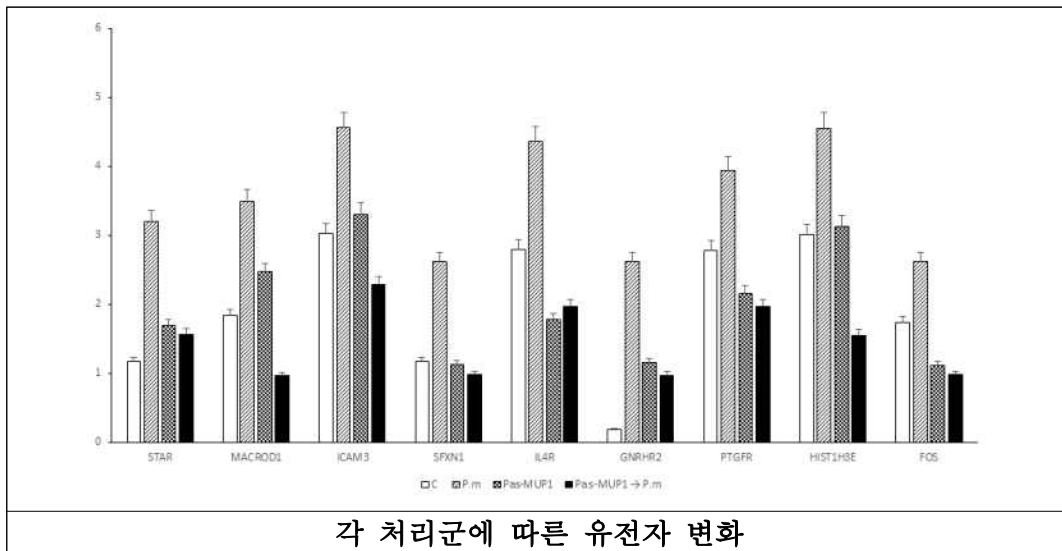
- *P. multocida*만 처치한 그룹에서 C 그룹에 비해 91개 유전자는 up-regulated, 133개의 유전자는 down-regulated 되었음.
- Pas-MUP-1 처리 후 *P. multocida*를 처치한 그룹은 *P. multocida*만 처치한 그룹에 비해 98개의 유전자가 up-regulated 되고 95개의 유전자가 down-regulated 되었음.
- 각 그룹간의 비교에서 공통된 유전자 중 증가된 유전자는 2개, 감소된 유전자는 10개였고 반대로 조절된 유전자의 개수는 169개였음.

(4) Hierarchical clustering mapping

- 각 그룹간의 fold change 2 이상, normalized data 4 이상, p-value 0.05 이하인 유전자를 선택; *P. multocida*와 관련된 유전자 230 개를 분석하였음.
- 전체 230개의 유전자의 전반적인 증감은 아래와 같음. 붉은색은 증가, 파란색은 감소를 나타냄. Pas-MUP-1 처리 후 *P. multocida*를 처치한 군에서 *P. multocida*만 처치 군에 비해 여러 유전자들이 는 감소되는 것을 확인했음.



- 전반적인 유전자의 증감 중 몇몇 유전자를 선택하여 각 그룹에서의 유전자 발현정도를 비교하였음. 각 유전자의 그룹 간 변화는 아래와 같이 유사한 양상을 보였음. Pas-MUP-1 을 미리 처리한 후 *P. multocida* 처치 군에서는 *P. multocida*만 처치한 군에 비해 유전자 발현정도가 감소되는 것을 확인할 수 있었음.



(5) DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) 분석

- 230개 유전자 중 유의미한 결과를 보이는 유전자는 다음과 같이 주로 immune response 와 관련된 유전자가 많았음.

박테리아, 박테리오파지 처치 시 유의미한 변화를 보이는 유전자 목록

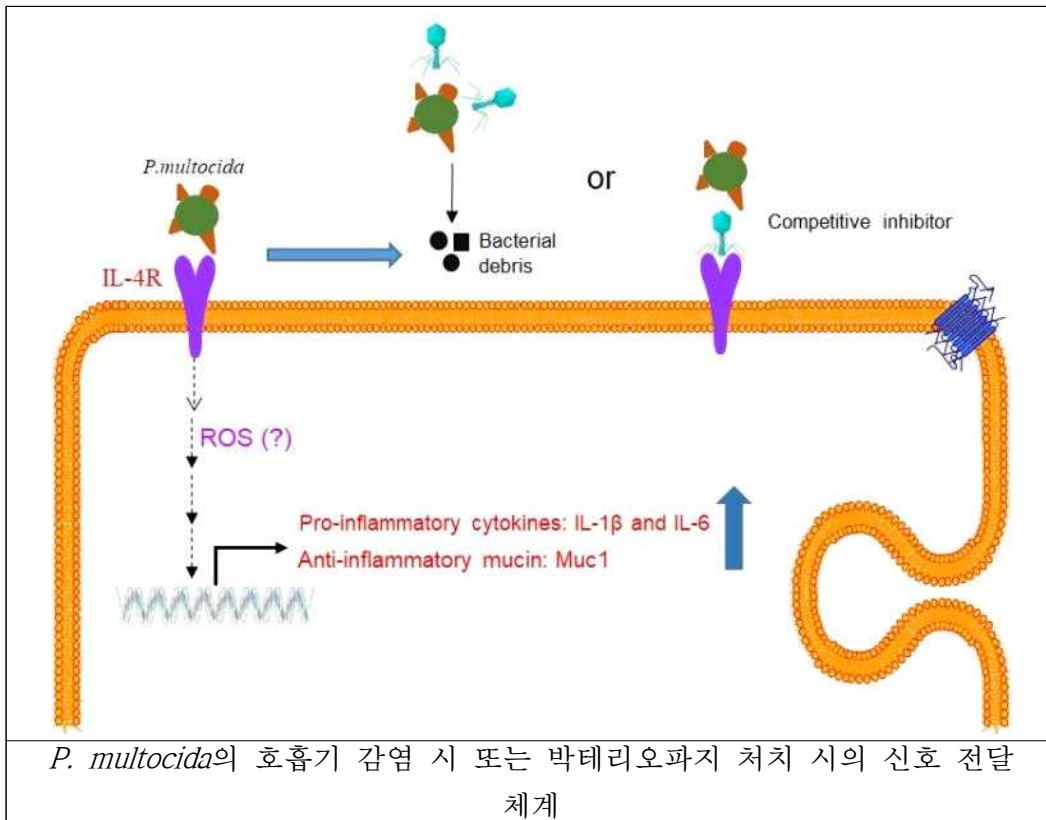
GO Term	Function	Count	P-value	Genes
GO:0045944	Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	12	0.073772473	PLAGL1, SHOX2, NCOA3, RP66KA1, SFRP2, IRF7, BMPR2, MOSPD1, TRAF6, BMPR1B, MYC, CHUK
GO:0051607	Defense response to virus	10	0.0000734	CD86, IFIT1, C2H19ORF66, LOC733579, RSAD2, OAS1, OAS2, MX1, MX2, CXCL10
GO:0006955	Immune response	10	0.003532398	CSF2, CCL20, IL18, SLPI, OAS1, OAS2, TRAF6, THBS1, LTB, CXCL10
GO:0006954	Inflammatory response	9	0.00833183	CCL2, CCL20, IL18, ANXA1, LIAS, BMPR1B, THBS1, SYK, CXCL10
GO:0045087	Innate immune response	8	0.015162285	CD46, ANXA1, LOC733579, SLPI, RSAD2, OAS1, MX2, SYK
GO:0008284	Positive regulation of cell proliferation	8	0.025585022	PDCD10, NTF3, SFRP2, IL18, BMPR1B, STAT1, MYC, CXCL10
GO:0045071	Negative regulation of viral genome replication	6	0.0000219	IFIT1, C2H19ORF66, SLPI, RSAD2, OAS1, MX1
GO:0010628	Positive regulation of gene expression	6	0.030284164	SPDYA, CSF2, PDCD10, IL18, CD46, QKI
GO:0030154	Cell differentiation	6	0.038946815	PLAGL1, GRB2, VEGFA, QKI, ANGPT1, SYK
GO:0033138	Positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation	5	0.003849594	PDCD10, NTF3, SFRP2, VEGFA, ANGPT1

- 각 유전자들이 어떤 pathway 에 포함되어있는지 확인하기 위해 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 분석을 시행한 결과는 아래와 같음.

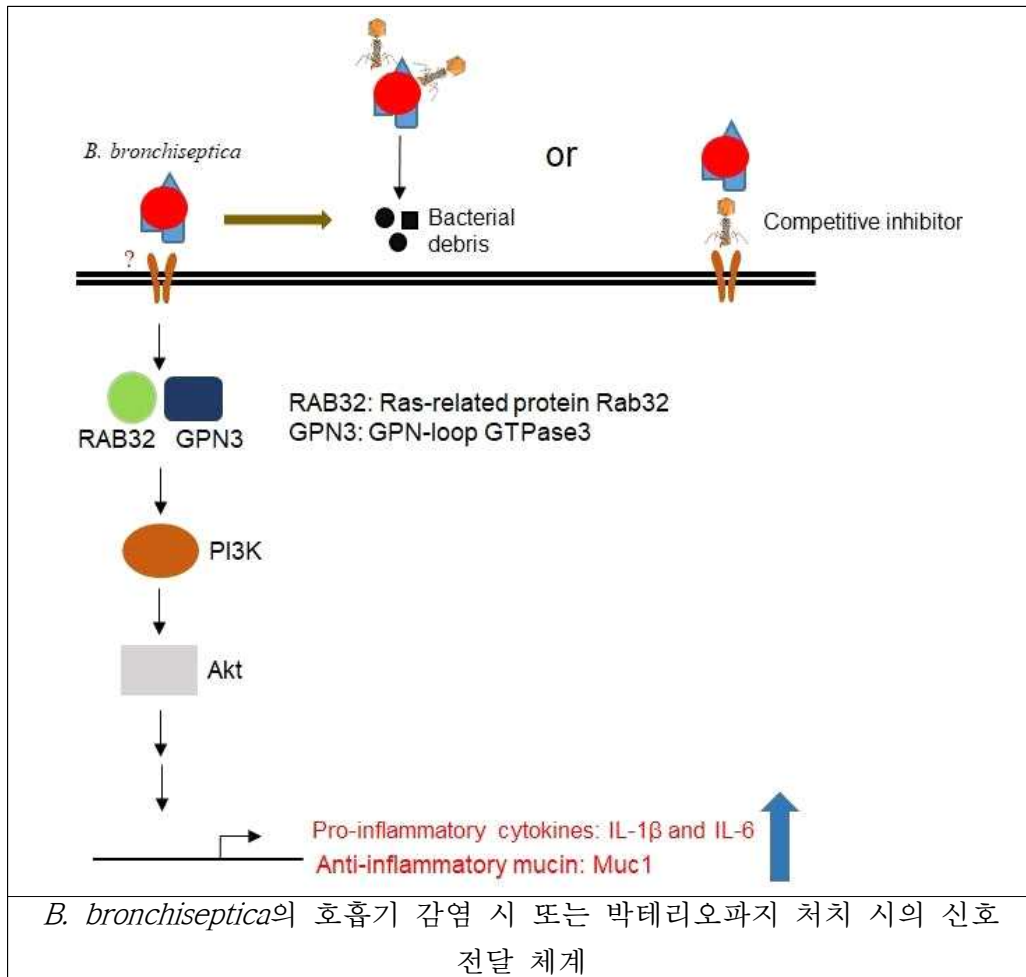
유전자의 KEGG 분석

KEGG_PATHWAY	Count	P-value
Metabolic pathways	28	0.045930905
Cytokine-cytokine receptor interaction	11	0.001999562
Hepatitis C	10	0.000271
Influenza A	10	0.001947888
Herpes simplex infection	9	0.011507352
Rheumatoid arthritis	8	0.000578
Measles	8	0.00672635
Purine metabolism	8	0.031977674
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	7	0.022179597
Transcriptional misregulation in cancer	7	0.042950161
Chemokine signaling pathway	7	0.071510436
RIG-I-like receptor signaling pathway	6	0.005592731
TGF-beta signaling pathway	6	0.009407456
Pyrimidine metabolism	6	0.022650112
Toll-like receptor signaling pathway	6	0.02748645
TNF signaling pathway	6	0.03529262
Neurotrophin signaling pathway	6	0.048619082
Cytosolic DNA-sensing pathway	5	0.019142468

- 본 연구를 통해 도출된 결과들을 종합하여 호흡기 질환 유발 세균, 박테리오파지 및 동물세포 (호흡기 상피세포) 간의 상호작용 및 신호 전달 체계를 도식화하면 아래와 같음.



- *P. multocida*의 호흡기 감염 시, IL-4R을 경유하여 활성산소 (reactive oxygen species, ROS) signaling을 통해 proinflammatory cytokines 및 anti-inflammatory mucin의 발현을 촉진시킨다는 모델을 확립함. *P. multocida*에 의한 질환 예방 목적으로 박테리오파지를 처치 시에는 박테리오파지의 *P. multocida*에 대한 항균 효과로 인해 *P. multocida* 감염으로 인해 유도되던 cytokines 및 mucin의 발현 촉진 현상이 일어나지 않을 것이라고 판단되었음.



- *B. bronchiseptica*의 호흡기 감염 시, 정확한 receptor는 규명되지 않았으나 RAB32/GPN3, PI3K, Akt signaling을 통해 proinflammatory cytokines 및 anti-inflammatory mucin의 발현을 촉진시킨다는 모델을 확립함. 이는 상기 *P. multocida*와 비교 시에 내부 신호전달 체계의 차이가 있을 뿐 유사한 면역 유도 반응이 일어나는 것으로 파악되었음. 마찬가지로 *B. bronchiseptica*에 의한 질환 예방 목적으로 박테리오파지를 처치 시에는 박테리오파지의 *B. bronchiseptica*에 대한 항균 효과로 인해 *B. bronchiseptica* 감염으로 인해 유도되던 cytokines 및 mucin의 발현 촉진 현상이 일어나지 않을 것이라고 판단되었음.

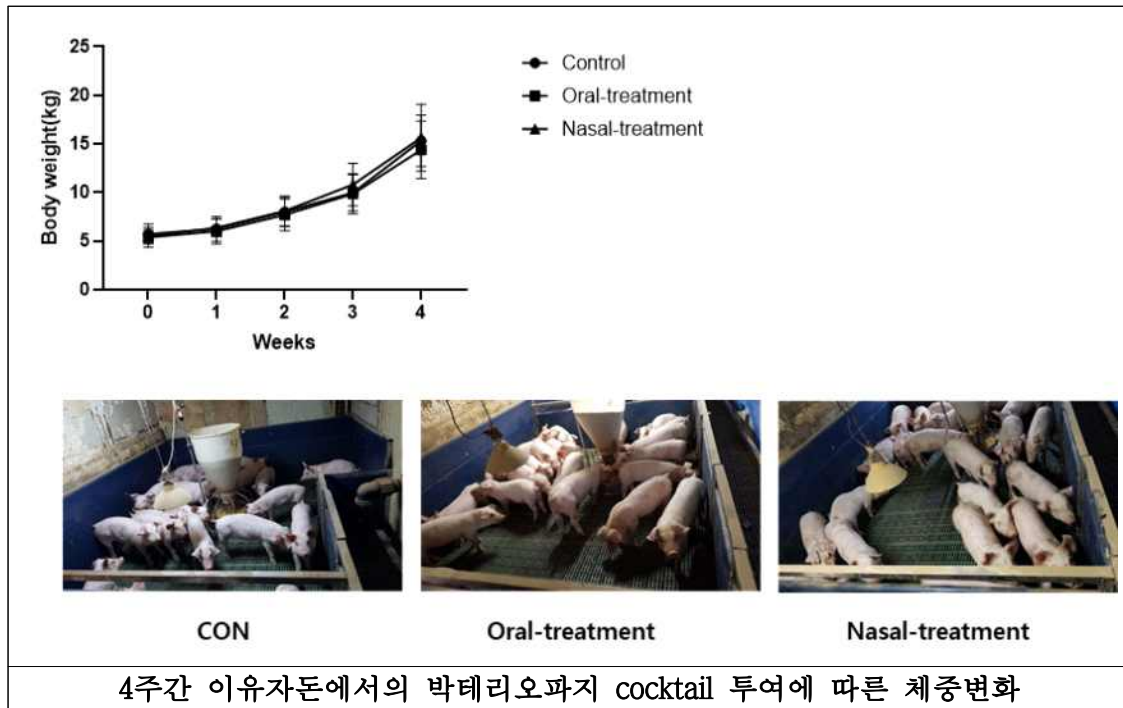
<제2협동연구기관>

1. 이유자돈에서 투여경로에 따른 4주간 박테리오파지 cocktail 투여에 의한 독성 평가

가. 이유자돈에서 투여경로에 따른 4주간 박테리오파지 cocktail 투여에 의한 체중변화

- 이유자돈에서의 박테리오파지 Bor-BRP-1과 Pas-MUP-1을 cocktail한 파지혼합제제 (분말 및 액상)들에 대한 증체율과 장기 독성을 검사하기 위해 부형제 대조군, cocktail 경구 투여군 및 cocktail 비강 투여군으로 각각 나누어 군당 6마리씩 4주간 농장실험을 실시하였음. 각각의 박테리오파지 농도는 1×10^8 pfu/ml로 혼합되었으며, 부형제 대조군 및 경구 투여군은 사료에 섞어 투여하였으며, 비강 투여군들은 양쪽 코에 각각 비강분무노즐을

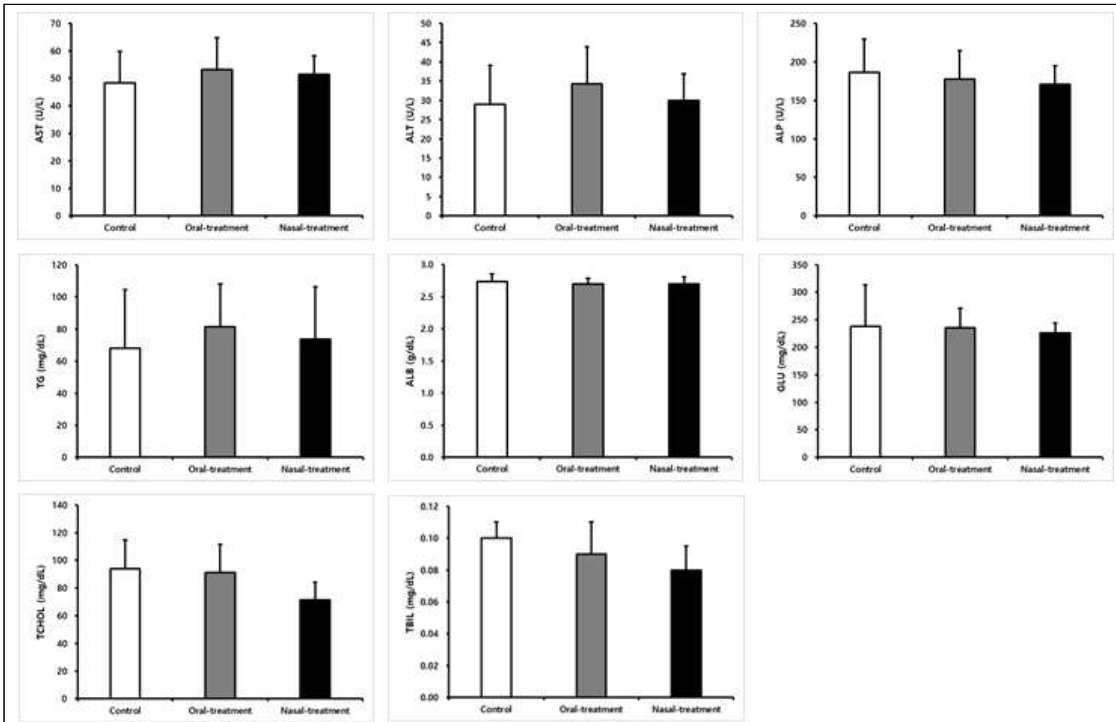
이용하여 각각 1ml씩 2일에 한 번씩 비강 투여하였음. 이들 파지 cocktail을 4주간 경구 및 비강 투여한 결과, 체중변화 및 증체율에는 영향을 미치지 않는 것으로 평가되었음.



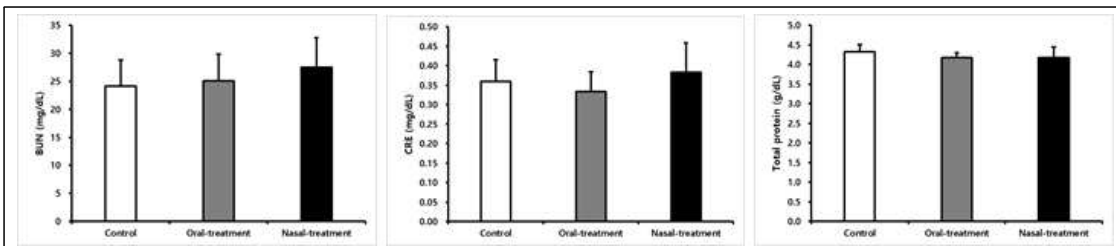
4주간 이유자돈에서의 박테리오파지 cocktail 투여에 따른 체중변화

나. 이유자돈에서의 박테리오파지 cocktail의 투여경로에 따른 혈액생화학적 변화

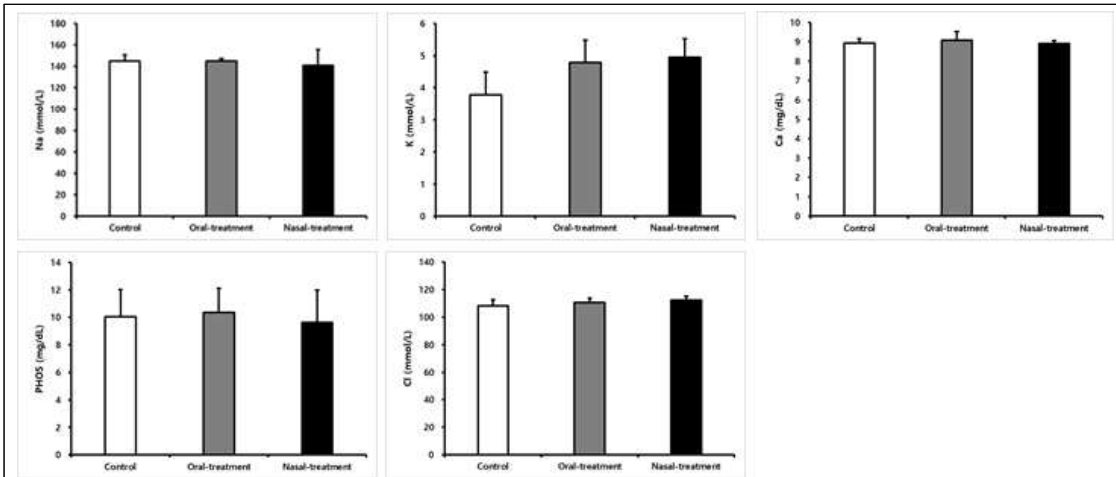
- 박테리오파지 cocktail을 경구 및 비강으로 투여한 후 혈액생화학적 검사를 실시한 결과, 간 손상 관련 바이오마커들이 투여경로에 대해서는 유의적인 변화들이 관찰되지 않았음. 또한 신장 손상수치들에 있어서도 군간에 유의적인 차이들이 나타나지 않았음. 대사관련 무기질 원소들에 있어서도 군간에 차이를 나타내지 않았음. 이는 박테리오파지 cocktail의 투여경로에 대한 장기 독성은 확인되지 않았으며 대사 관련 혈액생화학 수치를 살펴볼 때 안전한 것으로 평가되었음.



이유자돈에서 4주간 박테리오파지 cocktail의 투여경로에 따른 간 손상관련 혈액생화학적 수치변화

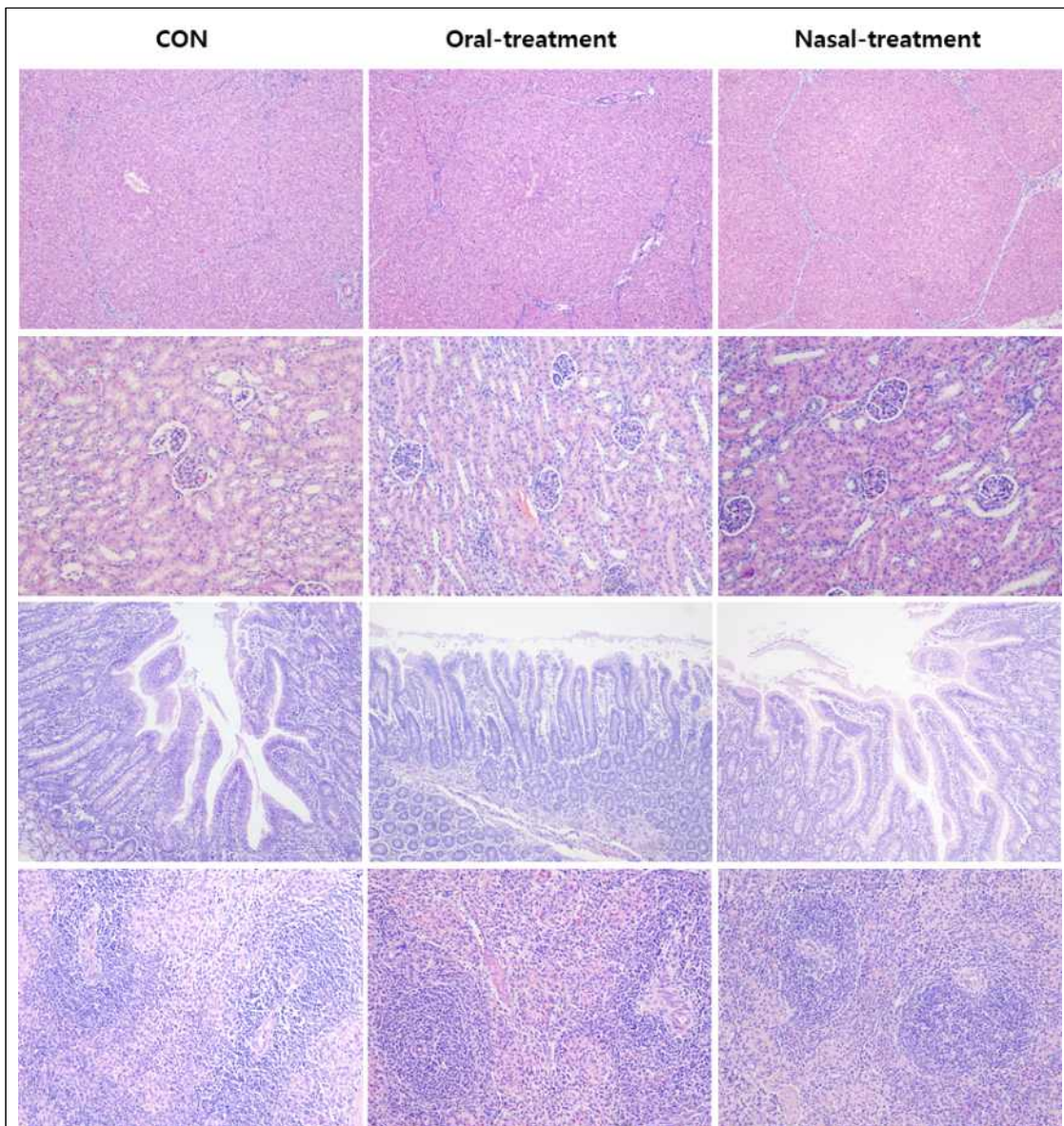


이유자돈에서 4주간 박테리오파지 cocktail 투여경로에 따른 신장 손상관련 혈액생화학적 수치변화



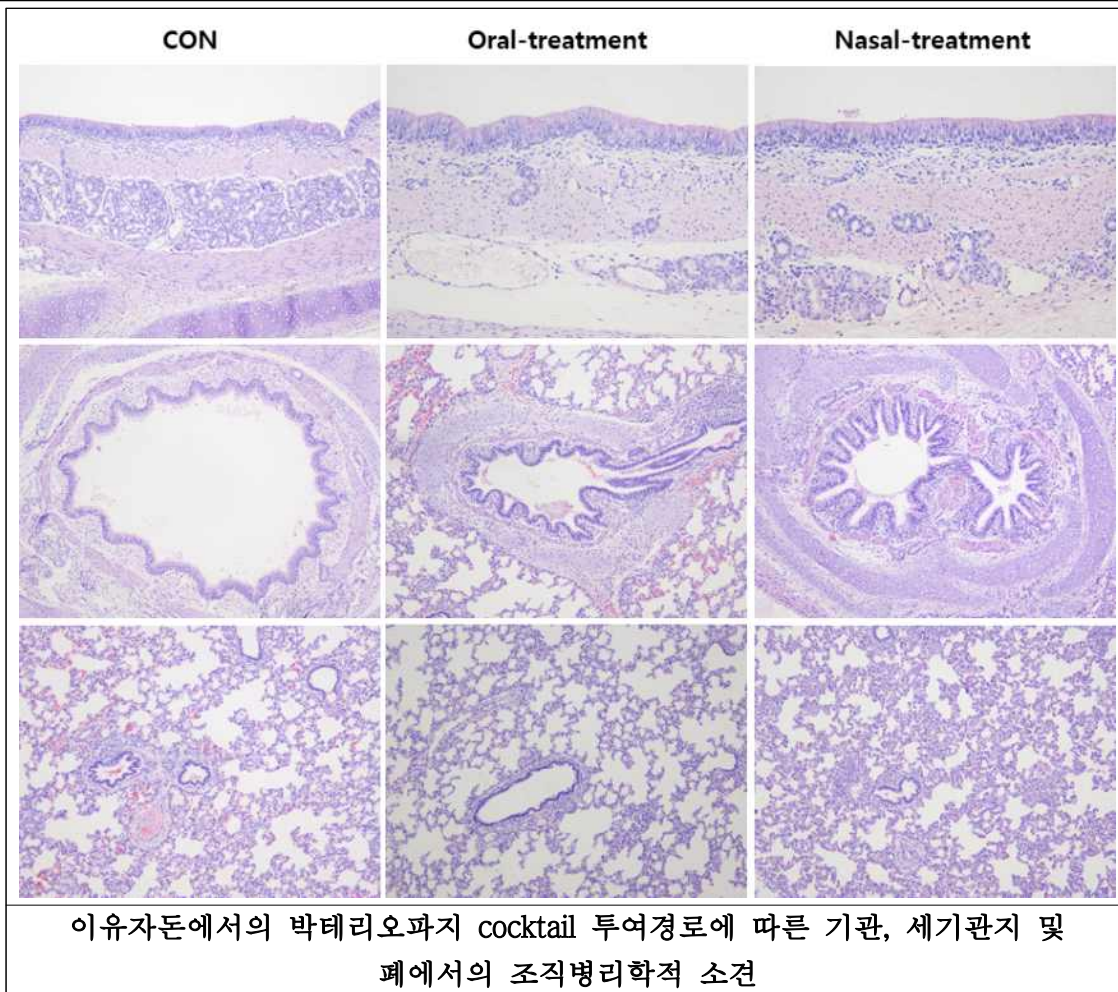
이유자돈에서의 박테리오파지 cocktail 투여경로에 따른 무기질 대사관련 혈액생화학적 변화

- 다. 이유자돈에서 4주간 박테리오파지 cocktail의 투여경로에 따른 조직병리학적 변화
- 4주간 박테리오파지 cocktail을 투여경로에 따른 조직병리학적 변화를 검사한 결과, 간, 신장, 소장, 비장에서 비정상적인 소견이 관찰되지 않았음. 이는 이들 소화 및 면역장기에 있어 독성을 나타내지 않는 것으로 판단되어짐.



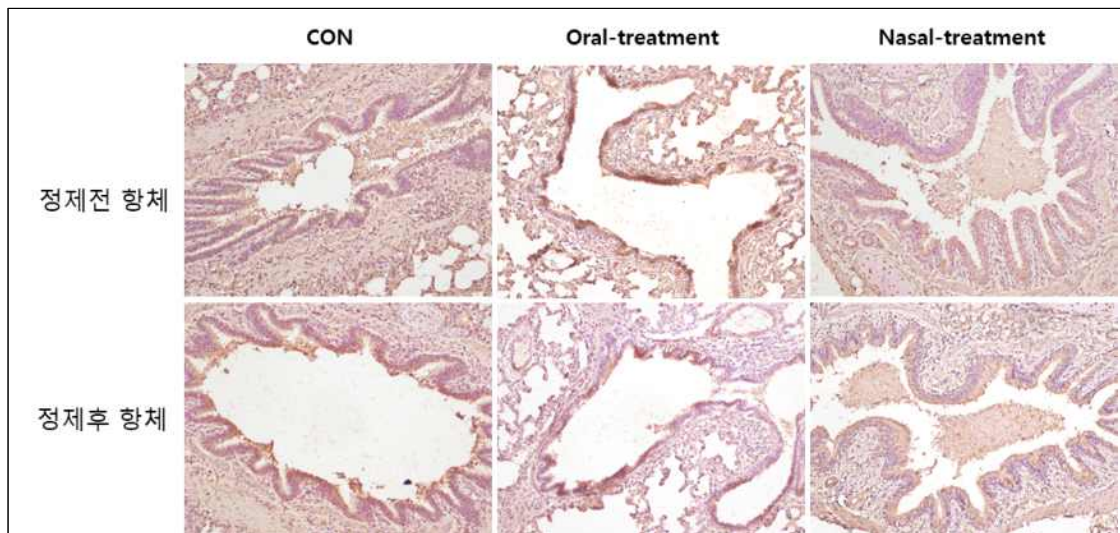
이유자돈에서의 박테리오파지 cocktail 투여경로에 따른 간, 신장, 소장 및 비장의 조직병리학적 소견

- 4주간 박테리오파지 cocktail을 투여경로에 따른 조직병리학적 변화를 검사한 결과, 기관, 기관지 및 폐 조직에서 비정상적인 소견이 관찰되지 않았음. 특히 비강 투여군에 있어서도 별다른 이상소견을 나타내지 않았음.



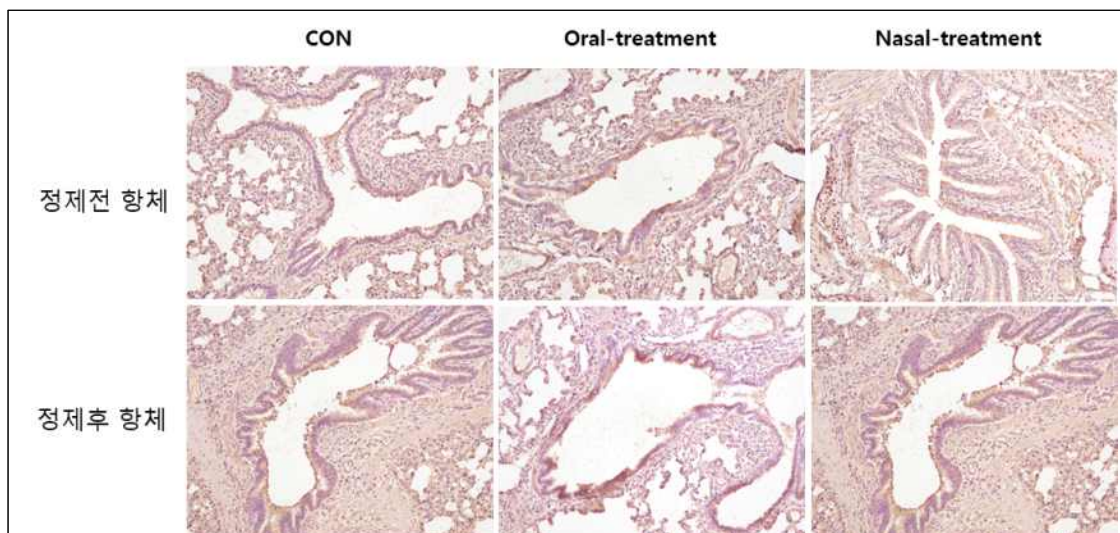
라. 이유자돈의 폐 조직에서 4주간 투여한 박테리오파지 cocktail의 투여경로에 따른 조직병리학적 변화

- 이유자돈 폐 조직에서 박테리오파지 cocktail의 검출을 위해 *Bordetella bronchiseptica* 박테리오파지 (Bor-BRP-1)에 대한 항체를 사용하여 면역조직화학 분석을 실시한 결과, 경구 투여한 개체의 세기관지 점막상피에서 다소 강한 양성반응을 나타내었음.



이유자돈에서의 박테리오파지 cocktail 투여에 따른 폐 조직 내에서의 *Bordetella bronchiseptica* 박테리오파지 (Bor-BRP-1) 검출을 위한 면역조직화학적 염색

- 이유자돈 폐 조직에서 박테리오파지 cocktail의 검출을 위해 *Pasteurella multocida* 박테리오파지 (Pas-MUP-1)에 대한 항체를 사용하여 면역조직화학 분석을 실시한 결과, 경구 투여한 개체의 세기관지 점막상피에서 다소 강한 양성반응을 나타내었음. 정제 전 항체 보다 정제 후 항체를 사용하였을 경우가 양성반응 관찰에 용이하였음.

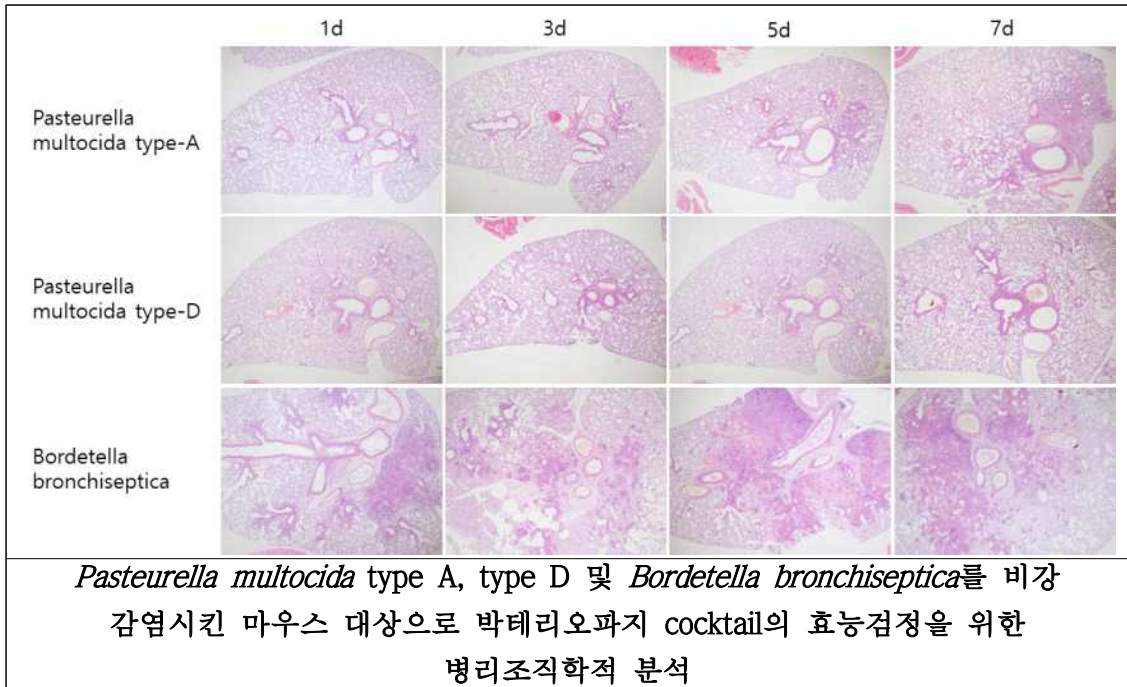


이유자돈에서의 박테리오파지 cocktail 투여에 따른 폐 조직 내에서의 *Pasteurella multocida* 박테리오파지 (Pas-MUP-1) 검출을 위한 면역조직화학적 염색

2. *Bordetella bronchiseptica*와 *Pasteurella multocida*를 비강으로 감염시킨 마우스에서 박테리오파지 cocktail의 효능실험

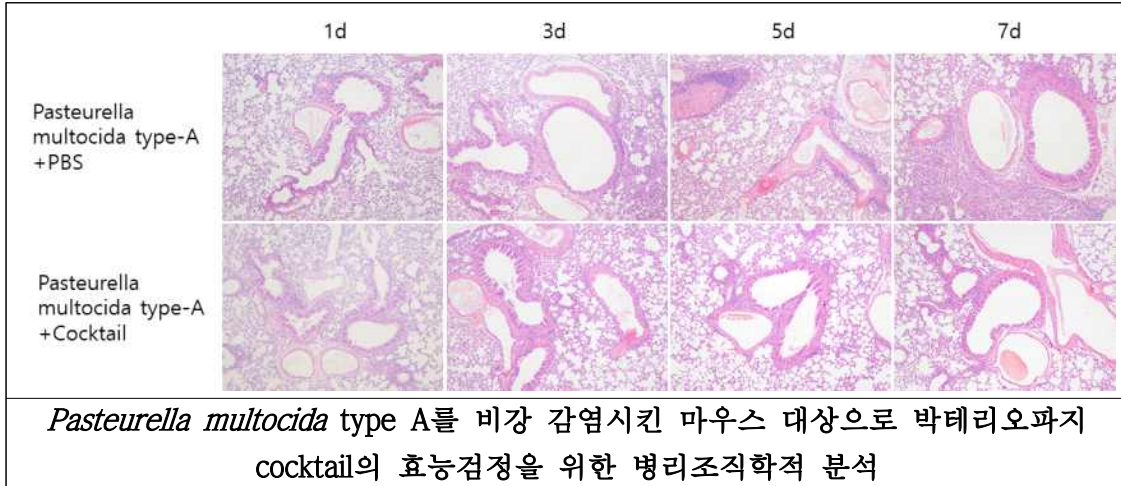
가. *Bordetella bronchiseptica*와 *Pasteurella multocida*를 비강으로 감염시킨 마우스의 병리조직학적 관찰

- *Bordetella bronchiseptica*와 *Pasteurella multocida*를 비강으로 감염시킨 마우스의 병리조직학적 관찰을 실험하기 위해 마우스에 각각의 균주 (1×10^8 PFU/ml)를 양쪽 비강을 통하여 각각 20 μ 씩 감염시킨 후, 1일, 3일, 5일 및 7일에 부검하여 병리조직학적 관찰을 통한 폐의 병변을 관찰하였음. *Pasteurella multocida* type A와 type D는 1일째부터 폐세기관지 및 세정맥주위로 염증세포의 침윤이 나타나기 시작하여 서서히 이들 세포들의 침윤이 폐포로 염증이 증가되는 소견을 나타내었음. 그러나 *Bordetella bronchiseptica*는 감염 1일째부터도 세기관지 및 세정맥주위로 과도한 염증세포의 침윤이 나타나기 시작하였음. 3일째부터는 폐포의 더욱더 염증성 피사소들이 증가되었으며, 5일 이후에는 폐포의 구조들이 거의 잘 관찰되지 않았음.

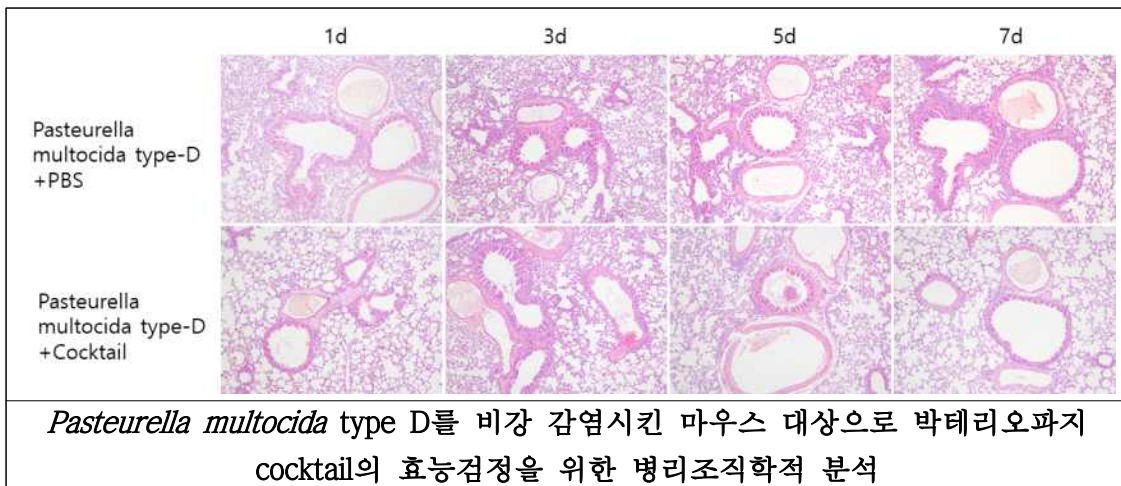


나. *Bordetella bronchiseptica*와 *Pasteurella multocida*를 비강으로 감염시킨 마우스의 폐 조직에서 박테리오파지 cocktail의 병리조직학적 효능검정

- *Pasteurella multocida* type A를 비강으로 감염시킨 마우스에서 이들 박테리오파지 cocktail의 효능을 실험하기 위해 마우스의 비강에 균감염 후 1시간 뒤에 양쪽 비강으로 20 μ l 씩 7일간 매일 투여하였음. 박테리오파지 cocktail을 투여한 마우스들에 있어 염증 침윤부위들이 일령이 지나갈수록 염증부위가 감소되어지는 것을 알 수 있었음. 따라서 박테리오파지 cocktail을 비강 투여한 마우스에 있어 용균효능이 있는 것으로 관찰되었음.

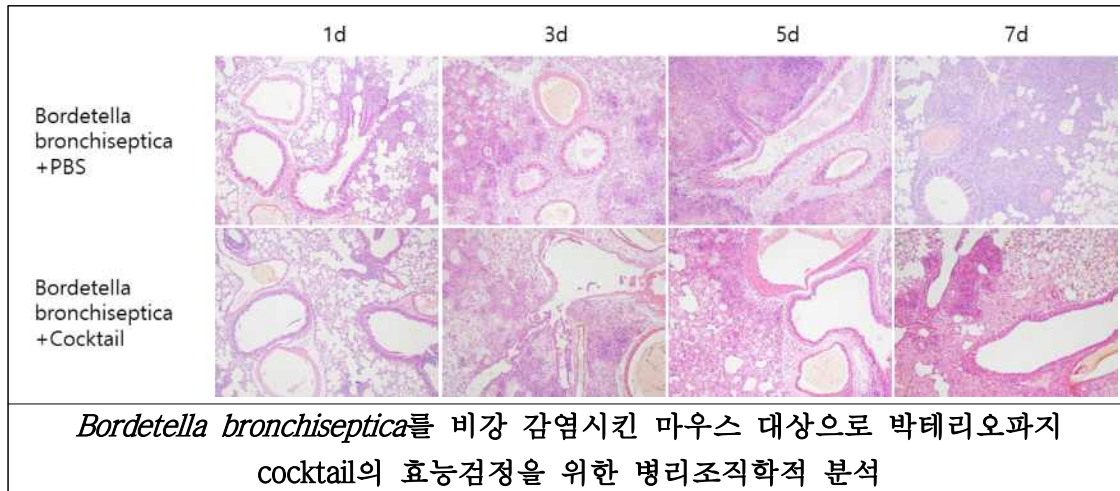


- *Pasteurella multocida* type D를 비강으로 감염시킨 마우스에서 이들 박테리오파지 cocktail의 효능을 실험하기 위해 마우스의 비강에 균감염 후 1시간 뒤에 양쪽 비강으로 20 μ l 씩 7일간 매일 투여하였음. 박테리오파지 cocktail을 투여한 마우스들에 있어 염증 침윤부위들이 일령이 지나갈수록 염증부위가 감소되어지는 것을 알 수 있었음. 따라서 박테리오파지 cocktail을 비강 투여한 마우스에 있어 용균효능이 있는 것으로 관찰되었음.



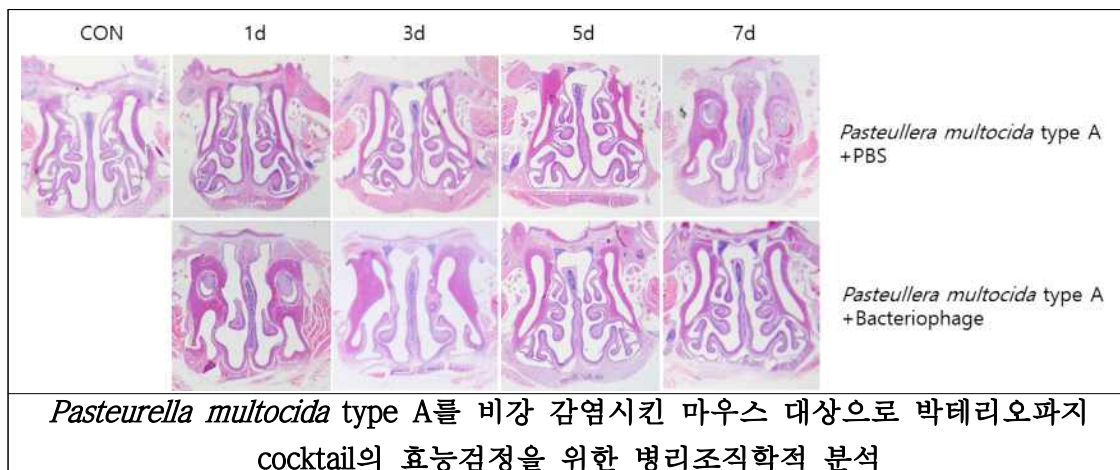
- *Bordetella bronchiseptica*를 비강으로 감염시킨 마우스에서 이들 박테리오파지 cocktail의 효능을 실험하기 위해 마우스의 비강에 균감염 후 1시간 뒤에 양쪽 비강으로 20 μ l 씩 7

일간 매일 투여하였음. *Bordetella bronchiseptica*를 감염시킨 마우스의 폐 병변부위가 감염 3일째부터 광범위하게 증가되어 박테리오파지 cocktail을 투여한 마우스들에 있어 효능관찰이 잘 나타나지 않았음. 본 실험에 사용된 Balb/c 마우스는 *Bordetella bronchiseptica* 균주에 감수성이 매우 높은 것으로 파악되어짐.

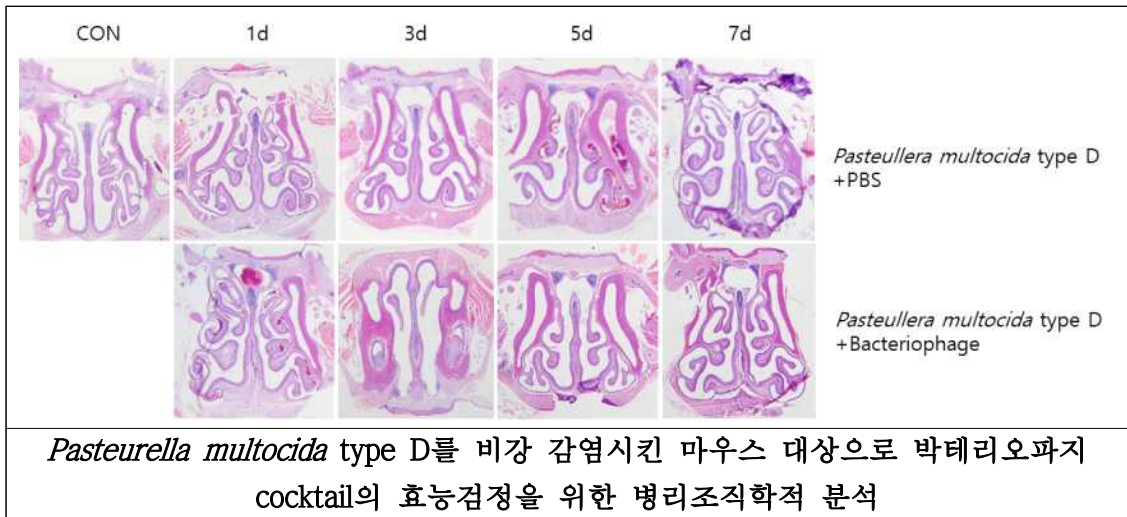


다. *Bordetella bronchiseptica*와 *Pasteurella multocida*를 비강으로 감염시킨 마우스의 비강 조직에서 이들 박테리오파지 cocktail의 병리조직학적 효능검정

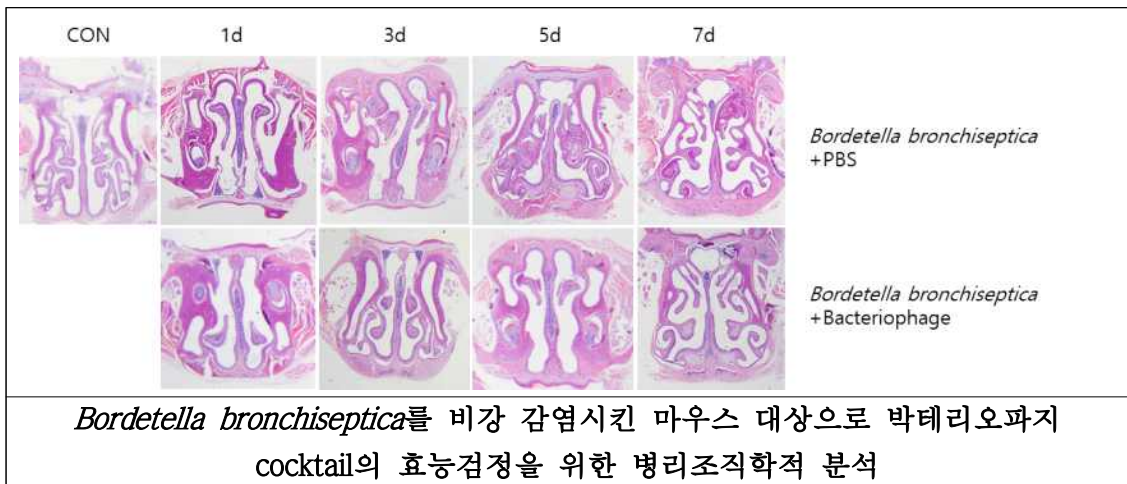
- *Pasteurella multocida* type A를 비강으로 감염시킨 마우스의 비강 조직의 병리조직학적 분석 결과, 비강 점막 내에 염증세포의 침윤이 관찰되었으며, 시간이 경과할수록 비강 내 염증이 증가되는 것을 관찰할 수 있었음. 박테리오파지 cocktail을 투여한 군에서는 비강 점막 내에 염증세포의 침윤이 감소되는 것을 관찰할 수 있었음.



- *Pasteurella multocida* type D를 비강으로 감염시킨 마우스의 비강 조직의 병리조직학적 분석 결과, 비강 점막 내에 염증세포의 침윤이 관찰되었으며, 시간이 경과할수록 비강 내 염증이 증가와 약간의 비만곡이 미약하게 유도되는 것을 관찰 할 수 있었음. 박테리오파지 cocktail을 투여한 군에서는 비강 점막 내에 염증세포의 침윤이 감소되는 것을 관찰할 수 있었음.

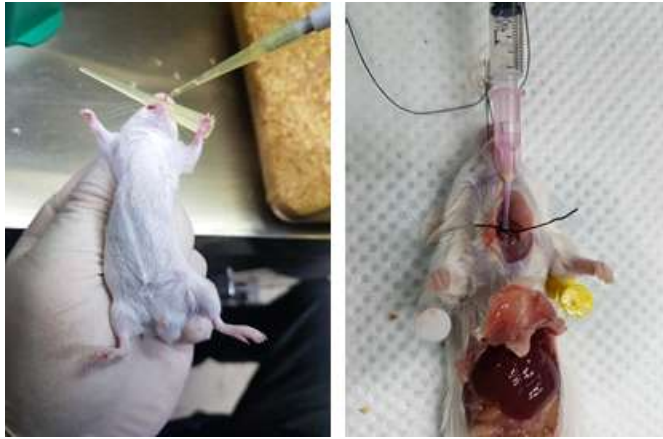


- *Bordetella bronchiseptica*를 비강으로 감염시킨 마우스의 비강 조직의 병리조직학적 분석 결과, 비강 점막 내에 과도한 염증세포의 침윤이 관찰되었으며, 3일째부터 과도한 비강 내에 염증세포의 침윤과 비만골 소견이 관찰되었음. 박테리오파지 cocktail을 투여한 군에서는 비강 점막 내에 염증세포의 침윤과 비만골 소견이 감소되는 것을 관찰할 수 있었음.



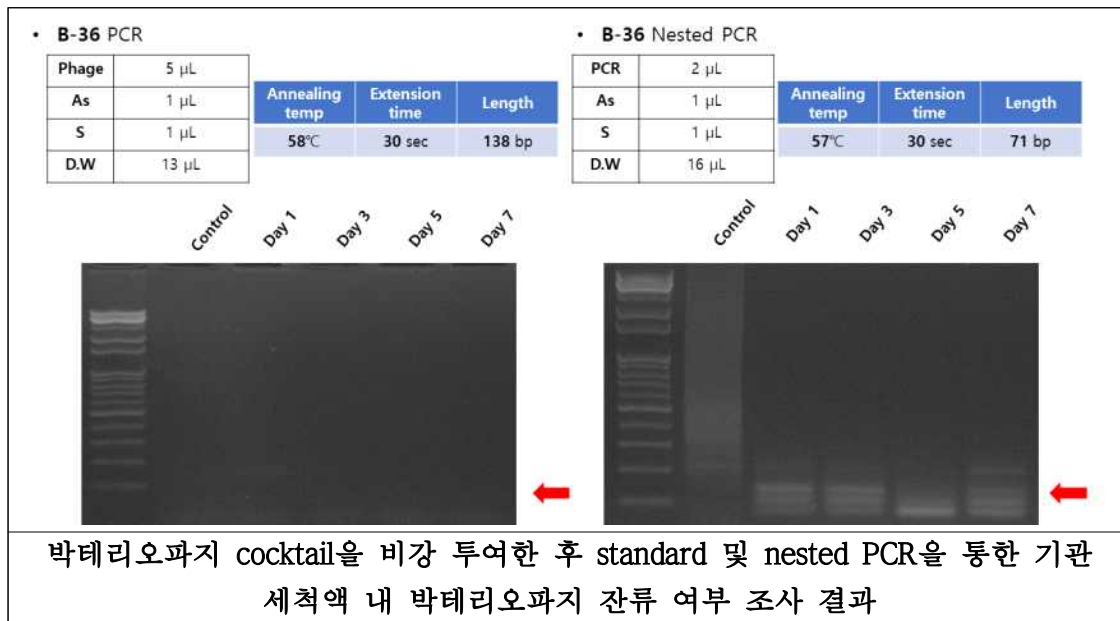
3. 박테리오파지 cocktail을 비강 투여 후 시간대 별로 호흡기 내 잔류 여부 조사

- 박테리오파지 cocktail을 양쪽 비강으로 각각 20 μ l씩 단회 투여한 후 1, 3, 5 및 7일 째 0.2 ml PBS를 이용하여 기관 세척한 후 standard PCR 및 nested PCR을 실시하여 기관 내 박테리오파지 cocktail 잔류 정도를 조사하였음.



박테리오파지 cocktail을 비강 투여한 후 기관 세척을 통한 호흡기 내 잔류 여부 조사 (동물 실험 예시)

- 박테리오파지 cocktail 내의 Bor-BRP-1 특이 standard 및 nested PCR primer를 제작하여 실험을 진행한 결과, 일반 PCR에서는 1일째 희미한 밴드를 관찰할 수 있었으나 nested PCR에서는 1, 3, 5 및 7일에서 밴드를 관찰할 수 있었음. 특히 1일과 3일째 밴드가 강하게 나타나는 것을 알 수 있었음. 따라서 호흡기 내 박테리오파지 cocktail들이 기관 내에 일주일 정도 잔류하는 것을 알 수 있었음.



제 4절. 연구개발성과

1. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Complete Genome Sequence of <i>Aeromonas rivipollensis</i> KNMc-11N1, Isolated from a Wild Nutria (<i>Myocastor coypus</i>) in South Korea	Microbiology Resource Announcements	Seon Young Park	7	미국	The American Society for Microbiology	비SCI	2018.08.02	2576-098X
2	<i>Bordetella bronchiseptica</i> bacteriophage suppresses <i>B. bronchiseptica</i> induced inflammation in swine nasal turbinate cells	Genes & Genomics	Ga Young Park	40	한국	Springer	SCI	2018.10.23. (Online)	1976-9571
3	<i>Pasteurella multocida</i> specific bacteriophage suppresses <i>P. multocida</i> -induced inflammation: Identification of genes related to bacteriophage signaling by <i>Pasteurella multocida</i> -infected swine nasal turbinate cells	Genes & Genomics	Ga Young Park	-	한국	Springer	SCI	2019.12.18. (Online)	1976-9571
4	Specific bacteriophage of <i>Bordetella bronchiseptica</i> regulates <i>B. bronchiseptica</i> -induced microRNA expression profiles to decrease inflammation in swine nasal turbinate cells	Genes & Genomics	Ga Young Park	-	한국	Springer	SCI	2019.12.11. (Accepted)	1976-9571

2. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	KMB 2019 annual meeting & international symposium	InHwang Kim, Hyun-Jin Yu, Hyoung-Rok Paik, Seong-Jun Yoon, Soo-Youn Jun, Sang-Hyeon Kang, Jee-Soo Son	2019.6.24	ICC JEJU	한국
2	KMB 2019 annual meeting & international symposium	Hyoung-Rok Paik, Hyun-Joo Lim, Seong-Jun Yoon, Soo-Youn Jun, Sang-Hyeon Kang, Jee-Soo Son	2019.6.24	ICC JEJU	한국

3. 생명자원(생물자원)/화합물

No	생명자원(생물자원)/화합물명	등록/기탁번호	등록/기탁기관	발생년도

4. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	신규한 살모넬라 티피뮤리움 박테리오파지 STP-2 및 이의 살모넬라 티피뮤리움 균 증식 억제 용도	한국	(주)인트론바이오 테크놀로지	2018.04.11	10-2018-0041975				50
2	신규한 스트렙토코커스 수이스 박테리오파지 Str-SUP-1 및 이의 스트렙토코커스 수이스 균 증식 억제 용도	한국	(주)인트론바이오 테크놀로지	2018.06.04	10-2018-0064062				35
3	신규한 스트렙토코커스 수이스 박테리오파지 Str-SUP-2 및 이의 스트렙토코커스 수이스 균 증식 억제 용도	한국	(주)인트론바이오 테크놀로지	2018.06.04	10-2018-0064064				35
4	신규한 스트렙토코커스 수이스 박테리오파지 Str-SUP-3 및 이의 스트렙토코커스 수이스 균 증식 억제 용도	한국	(주)인트론바이오 테크놀로지	2018.06.04	10-2018-0064065				35
5	신규한 살모넬라 티피뮤리움 박테리오파지 STP-2 및 이의 살모넬라 티피뮤리움 균 증식 억제 용도	PCT	(주)인트론바이오 테크놀로지	2019.02.19	PCT/KR2019/001942				50
6	신규한 스트렙토코커스 수이스 박테리오파지 Str-SUP-1 및 이의 스트렙토코커스 수이스 균 증식 억제 용도	PCT	(주)인트론바이오 테크놀로지	2019.05.31	PCT/KR2019/006558				35
7	신규한 스트렙토코커스 수이스 박테리오파지 Str-SUP-2 및 이의 스트렙토코커스 수이스 균 증식 억제 용도	PCT	(주)인트론바이오 테크놀로지	2019.05.31	PCT/KR2019/006562				35
8	신규한 스트렙토코커스 수이스 박테리오파지 Str-SUP-3 및 이의 스트렙토코커스 수이스 균 증식 억제 용도	PCT	(주)인트론바이오 테크놀로지	2019.05.31	PCT/KR2019/006566				35
9	신규한 살모넬라 티피뮤리움 박테리오파지 STP-2 및 이의 살모넬라 티피뮤리움 균 증식 억제 용도	한국				(주)인트론바이오 테크놀로지	2019.10.31	KR10-2041117	50

5. 저작권(소프트웨어, 서적 등)

No	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록번호	저작권자명	기여율

6. 전문연구 인력양성

No	분류	기준 년도	현 황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	

7. 산업기술 인력양성

No	프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원

8. 기술거래(이전) 등

No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
1	직접실시	호흡기 질환 원인균에 제어력을 갖는 박테리오파지 기반 제제 기술	(주)인트론 바이오테크 놀로지	19.08.09	1,750,000원	1,750,000원

9. 사업화 투자실적

No	추가 R&D 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자자금 성격
					1) 내부자금 2) 신용대출 3) 담보대출 4) 투자유치 5) 기타

10. 사업화 현황

(단위 : 명, 년)

No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생년도	기술 수명
							국내 (백만원)	국외		
1	자기실시	신제품개발	국내	박테리오파지 제제 기술	박테리오파지 기반 사료첨가 제	(주)인 트론바 이오테 크놀로 지	10		2019년	

11. 표준화

No	수행기관명	표준화 주제	표준화 기구	표준화 단계	관련번호	제출(채택)일	국가
						yyyy.mm.dd	

12. 기술요약정보

연도	기술명	요약내용	기술완성도	등록번호

13. 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록번호

제 3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제 1절. 목표

구분	내용
최종목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 양돈 세균성 호흡기 질환 원인균들에 대하여 항균력을 갖는 박테리오파지의 체내 분포 양상을 파악하고, 감염균의 주요 표적 기관에 효과적으로 작용할 수 있는 박테리오파지 제품 개발 (환경 친화적 항생제 대체 사료첨가제 및 자가 증식 특성을 갖는 환경정화제제) ○ 산업화에 관련하여, 1) 사용 유효성이 최대화될 수 있는 제품 형태 및 사양을 개발하고, 2) 제품 효용성을 극대화 할 수 있는 농장 맞춤형 사용법을 도출 ○ 현재의 박테리오파지 사용에 대한 과학적 EVIDENCE/PROOF가 없는 실정을 고려하여 향후 산업화에 유용하게 활용될 수 있는 세균성 호흡기 질환 대응 박테리오파지들의 축산활용에 대한 과학적 근거를 확보
세부목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1차년도: 양돈 세균성 호흡기 질환 대응 박테리오파지의 과학적 근거 자료 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 형광 표지 박테리오파지를 이용한 체내 분포 양상 파악 및 증식 여부 파악을 위한 항체 제작 및 유효성 평가 - 호흡기 세균에 특이 항균력을 갖는 신규 박테리오파지의 확보 - 돼지 호흡기 상피세포주 (Primary Swine Bronchial Epithelial Cells) 개발 - 호흡기 질환 유발 병원성 세균의 특성 규명 - 호흡기 세균의 질병단계에 따른 병인기전/면역학적 특성 규명 - 마우스 모델을 대상으로 투여횟수/투여량에 따른 박테리오파지 체내 분포 양상 파악, 정량적 분석 및 안정성 조사 ○ 2차년도: 양돈 세균성 호흡기 질환에 적합한 박테리오파지의 제형 개발/특성화, 분자생물학적 기전 규명 및 목적 동물에서의 안전성 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 제형별 박테리오파지 시료 제조 및 효능 평가 - 박테리오파지의 체내 전달 효율 개선 연구 - 신규 박테리오파지의 특성화 및 증식/정제 공정 확립 - 호흡기 세균의 동물세포 감염과 관련된 병증 유발 인자 동정 - 동물세포에 호흡기 세균 감염 유도 후 농도별 박테리오파지 처치에 의한 사이토카인 변화 파악 - 동물세포에 호흡기 세균 감염 유도 후 박테리오파지 처치에 따른 세균 유전자 발현 양상 조사 - 돼지를 대상으로 투여횟수/투여량에 따른 박테리오파지의 체내 분포 양상 파악, 정량적 분석 및 안전성 조사 ○ 3차년도: 양돈 세균성 호흡기 질환 대응 박테리오파지의 시제품 도출 및 농장 시험을 통한 효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 호흡기 질환 대응 박테리오파지 시제품의 제조법 확립 및 시제품 생산 - 동물세포, 세균, 박테리오파지 간의 총체적 네트워크 구축 및 유용 마커 유전자 발굴 - 호흡기 질환 유행 농장에 박테리오파지 제제의 적용 및 효능 평가

제 2절. 목표 달성여부

1. 1차년도

성과목표	달성도 (%)	자 체 평 가
형광 표지 박테리오파지를 이용한 체내 분포 양상 파악	100	형광 표지 기술을 이용하여 형광 표지된 박테리오파지 시료를 재현성 있게 제조할 수 있었음. 제2협동기관과 협력하여 마우스 모델을 대상으로 투여방식에 따른 체내 분포 양상을 파악함.
박테리오파지의 체내 증식 여부 파악을 위한 항체 제작 및 유효성 평가	100	<i>Bordetella bronchiseptica</i> 및 <i>Pasteurella multocida</i> 에 항균력을 갖는 박테리오파지의 유전체 분석을 통해 항체 제작에 활용될 수 있는 후보 항원을 선별하여 클로닝을 완료하였음. 특히 호흡기 질환 대응 박테리오파지의 유전체 내 특정 유전자의 기능 연구 및 활용 부분이 전무하므로 본 연구를 통한 성과 도출은 의의가 크다고 생각함.
호흡기 세균에 특이 항균력을 갖는 신규 박테리오파지의 확보	100	양돈 농가에서 다발하고 있는 호흡기 질환의 원인균 중 하나인 <i>Streptococcus suis</i> 에 항균력을 갖는 신규 박테리오파지에 대한 보고는 전세계적으로 1건 밖에 없는 상황이며, 실용화되지 않았음. 본 과제 수행을 통해 확보한 <i>Streptococcus suis</i> 특이 박테리오파지는 다양한 <i>Streptococcus suis</i> strain에 대하여 항균력을 나타내었기 때문에 추후 호흡기 질환 대응 박테리오파지 제제로 충분히 활용될 수 있을 것임. 이러한 점에서 본 성과는 우수하다고 자체 평가함.
분석에 적합한 동물세포주 선정	100	돼지 호흡기 질환 원인균 및 호흡기 질환 대응 박테리오파지를 처리하여 유효한 시험 결과의 도출 및 재현성을 담보할 수 있는 동물세포주가 선정되었다고 판단됨.
호흡기 질환 유발 병원성 세균의 생리학적 특성 규명 및 신호 전달 체계 규명	100	돼지 호흡기 질환 원인균을 동물세포주에 처리 후 나타나는 cytokine의 변화 양상을 파악하여 이에 대한 profiling을 완료. 염증성 cytokine의 생리학적 기능을 규명하고 이에 대한 세포내 신호 전달 체계를 규명함.
호흡기 세균의 질병단계에 따른 병인기전/면역학적 특성 규명	100	돼지 호흡기 질환 원인균 및 이에 특이적인 박테리오파지를 동물세포주에 처리한 후 점액 과발현 신호전달체계의 촉진 및 억제하는 단백질을 발굴.
마우스 모델을 대상으로 투여횟수/투여량에 따른 박테리오파지 체내 분포 양상 파악, 정량적 분석 및 안전성 조사	100	박테리오파지를 이용하여 세포독성 및 투여횟수/투여량을 고려하여 마우스에 반복 처치한 후 안전성을 파악하였음. 시험기간 중 독성이나 부작용은 발견되지 않았음. 추가 시험으로 세포주에 박테리오파지를 처리하였을 때도 독성이나 세포사멸이 유도되지 않았음. 박테리오파지의 투여 기간을 길게하였을 경우에도 안전성이 유지됨을 확인함. 본 연구결과는 동물에 박테리오파지를 안전하게 사용 가능하다는 것을 입증하는 자료이므로 추후 홍보 및 마케팅 자료로 충분히 활용될 수 있을 것이라 생각됨. 따라서 우수한 결과가 도출되었다고 자체 평가함.
돼지를 대상으로 투여횟수/투여량에 따른 박테리오파지의 체내 분포 양상 파악, 정량적 분석 및 안전성 조사	100	마우스 모델에서의 체내 분포 양상 확인 마우스/돼지 모델을 대상으로 개별 박테리오파지의 안전성 검증

2. 2차년도

성과목표	달성도 (%)	자 체 평 가
제형별 박테리오파지 시료 제조 및 효능 평가	100	고상 및 액상 형태로 박테리오파지를 제조하여, 각 제형별 안정성 조사 및 이를 통한 적합 제형 개발
박테리오파지의 체내 전달 효율 개선 연구	100	형광 표지 박테리오파지의 체내 전달을 파악 및 표적 기관에서의 박테리오파지 검출 여부 조사
신규 박테리오파지의 특성화 및 증식/정제 공정 확립	100	개별 박테리오파지의 특성에 맞는 플라스크 규모의 증식 공정 개발 개별 박테리오파지의 특성에 맞는 PEG침전 기반의 정제 공정 개발
호흡기 세균의 동물세포 감염과 관련된 병증 유발 인자 동정	100	호흡기 세균의 동물세포 감염과 병증 유발 관련한 후보 인자 확인 및 선별
동물세포에 호흡기 세균 감염 유도 후 농도별 박테리오파지 처치에 의한 사이토카인 변화 파악	100	호흡기 세균의 동물세포 감염과 병증 유발 관련한 사이토카인 확인 및 박테리오파지 처치에 의한 항염증 효과 검증
동물세포에 호흡기 세균 감염 유도 후 박테리오파지 처치에 따른 세균 유전자 발현 양상 조사	100	호흡기 세균의 동물세포 감염 후, 박테리오파지 처치에 의한 up, down-regulation 되는 유전자 확인 및 발현양 파악

3. 3차년도

성과목표	달성도 (%)	자 체 평 가
호흡기 질환 대응 박테리오파지 시제품의 제조법 확립 및 시제품 생산	100	호흡기 질환 대응 박테리오파지의 산업적 제조공정 scale-up 완료 (생산액 및 정제도 목표치 달성)
동물세포, 세균, 박테리오파지 간의 총체적 네트워크 구축 및 유용 마커 유전자 발굴	100	전사체 분석을 통해 숙주, 세균, 박테리오파지 간 신호전달 체계 구축 및 관련 마커 유전자 발굴
호흡기 질환 유행 농장에 박테리오파지 제제의 적용 및 효능 평가	100	동물시험 및 목적동물 대상의 실증시험을 통해 박테리오파지 제제의 효능을 평가

제 3절. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 해당사항 없음

제 4장. 연구결과의 활용 계획 등

제 1절. 연구개발 활용 방안

- 확보 박테리오파지의 유전자 기능 연구
 - 본 과제를 통해 확보한 박테리오파지의 유전체 서열을 바탕으로 유용 유전자 확보 및 유전자 기능 연구 등의 후속 연구를 수행할 수 있음.
- 박테리오파지 제제를 이용해 도출된 자료의 활용
 - 동물시험을 통해 입증된 박테리오파지 제제의 유효성 및 안전성 데이터는 추후 인허가 시에 유용하게 활용될 수 있을 것임.

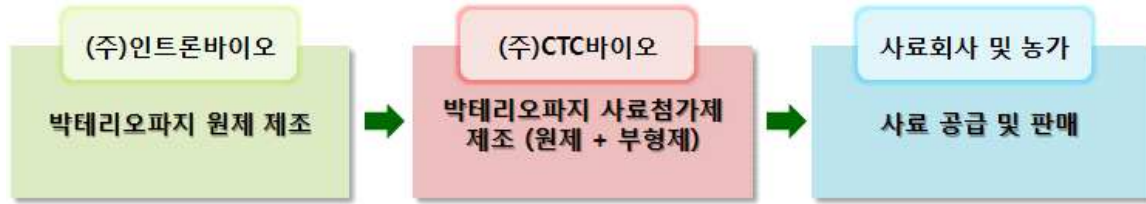
제 2절. 연구개발 및 사업화 추진

- 확보 박테리오파지의 적용분야 확대
 - 호흡기 질환 박테리오파지 (특히, 위축성 비염) 대응 박테리오파지 기반 제제는 관련 호흡기 질환 원인균 예방 및 제어에 효과적일 것이라 기대하고 있으며, 특정 질환의 주요 원인균에 유효한 박테리오파지 제제 개발 및 사업화를 점차적으로 확장하여 추진할 것임.
 - 본 연구과제의 대상 세균에 의해 문제시되는 돼지 이외의 동물 (조류, 토끼, 애완견 등)로의 적용분야 확대 가능.
- 확보 박테리오파지의 상품화 추진
 - 다양한 제제 (침가제, 소독제 등)로 상품화될 수 있음.
- 시장 개척을 위한 마케팅 실시
 - 본 과제수행을 통해 도출된 박테리오파지 제품의 대외 홍보.
 - 국외도 고려하여 수출용 제품 개발.
- 박테리오파지 제품 사용 농가의 규모 및 실정을 고려하여 유효성 및 경제성 여부를 지속적으로 파악해 나갈 계획이며, 본격적인 사업 추진을 위해 파트너사와의 협업을 통해 농장 실증 시험을 점차 확대하여 유효성 데이터를 확보할 계획.
- 사업화/마케팅 추진 전략 수립
 - 국내외 사료/사료첨가제 관련 시장 조사 및 분석에 기반하여 향후 산업화에 있어 협업할 (주)CTC바이오사의 자문을 받아 국내외로 구분하여 아래와 같이 사업화/마케팅 추진 전략을 수립하였음. 국외 사업화와 관련하여서는 러시아 Darleks사의 자문을 받아 사업화/마케팅 추진 전략을 수립하였음.

가. 국내 사업화 추진 전략

- 앞서 기술한 바와 같이 국내의 경우 박테리오파지는 보조사료 사용 가능 인정물질로 등록 및 고시되어 있어 사료첨가제로 판매가 가능함. 본 기관은 (주)CTC바이오와 협업하여 소화기 질환 대응 박테리오파지 제제의 산업화에 성공한 바 있음. 이러한 경험을 바탕으로 향후 호흡기 질환 대응 제제의 산업화를 추진할 계획임.
- 호흡기 질환 대응 박테리오파지 사업화와 관련한 사업 구조는 아래 그림과 같이 본 기관

에서 박테리오파지 원료를 제조하여 (주)CTC바이오社에 공급하고 (주)CTC바이오社에서 박테리오파지 원료에 부형제를 혼합한 사료첨가제를 제조한 후 사료회사 및 농가에 판매할 계획임.



- 호흡기 질환 대응 보조사료로 사용가능하도록 원료사료등재 후 제품화를 추진할 계획임

나. 국외 사업화 추진 전략

- 국외의 경우 박테리오파지는 식육 가공 과정에 오염 세균 제거 및 환경 정화 목적으로 분무할 수 있는 액상 제제 형태로 제품이 출시되어 판매되고 있음. 하지만 박테리오파지 기반의 사료첨가제 형태로의 판매는 한국이 유일함.
- 본 기관은 러시아 Darleks社와 함께 러시아 현지에서 박테리오파지를 축산용 사료 첨가제로의 사업화를 추진 중에 있음. 현재 박테리오파지 제제 등록 추진과 함께 러시아 현지에 적합한 박테리오파지 제제 개발 업무를 수행 중에 있음. 또한 중국 Phagelux社, 미국 Ampliphi社와도 인체, 축산 및 수산 분야에서 박테리오파지 제제 개발 및 사업화를 공동으로 추진 중에 있음.
- 본 기관이 보유하고 있는 호흡기 질환 대응 박테리오파지는 전세계적으로 아직 보고되지 않은 신규한 것으로, 다양한 국외 기업에서 많은 관심을 가지고 있음.
- 호흡기 질환 대응 박테리오파지 제제의 국외 사업화 추진은 국내 사업화 추진 전략과 동일한 방식으로 진행할 계획임. 본 기관은 박테리오파지 원제 제조하여 (주)CTC바이오社에 공급하고, 국외 대상국에 (주)CTC바이오社가 박테리오파지 완제품을 수출하는 형태로 추진될 것임.
- 국외 사업화 추진과 관련한 상세 사항 (제반 사항, 기존자원의 활용정도, 투자 계획 등)은 국내 사업화 추진 전략 및 계획과 거의 유사하며, 현지 상황에 맞게 대상 기업과 협의하여 조율을 할 생각임.

붙임. 참고 문헌

1. Carter, G.R., Studies on *Pasteurella multocida*. II. Identification of antigenic characteristics and colonial variants. Am J Vet Res, 1957. **18**(66): p. 210-3.
2. Konopa, G. and K. Taylor, Coliphage lambda ghosts obtained by osmotic shock or LiCl treatment are devoid of J- and H-gene products. J Gen Virol, 1979. **43**(3): p. 729-33.
3. Knight, D.P., J.E. Paine, and D.C. Speller, A selective medium for *Pasteurella multocida* and its use with animal and human specimens. J Clin Pathol, 1983. **36**(5): p. 591-4.
4. Smith, I.M. and A.J. Baskerville, A selective medium for the isolation of *P. multocida* in nasal specimens from pigs. Br Vet J, 1983. **139**(6): p. 476-86.
5. Avril, J.L., P.Y. Donnio, and P. Pouedras, Selective medium for *Pasteurella multocida* and its use to detect oropharyngeal carriage in pig breeders. J Clin Microbiol, 1990. **28**(6): p. 1438-40.
6. Rozengurt, E., et al., *Pasteurella multocida* toxin: potent mitogen for cultured fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(1): p. 123-7.
7. Bisgaard, M., Ecology and significance of *Pasteurellaceae* in animals. Zentralbl Bakteriol, 1993. **279**(1): p. 7-26.
8. Lariviere, S., et al., Comparison of isolation methods for the recovery of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from the nasal cavities of piglets. J Clin Microbiol, 1993. **31**(2): p. 364-7.
9. Lichtensteiger, C.A., et al., Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(12): p. 3035-9.
10. Cull, M.G. and P.J. Schatz, Biotinylation of proteins *in vivo* and *in vitro* using small peptide tags. Methods Enzymol, 2000. **326**: p. 430-40.
11. Pajunen, M., S. Kiljunen, and M. Skurnik, Bacteriophage phiYeO3-12, specific for *Yersinia enterocolitica* serotype O:3, is related to coliphages T3 and T7. J Bacteriol, 2000. **182**(18): p. 5114-20.
12. Lax, A.J. and A.E. Grigoriadis, *Pasteurella multocida* toxin: the mitogenic toxin that stimulates signalling cascades to regulate growth and differentiation. Int J Med Microbiol,

2001. **291**(4): p. 261-8.
13. Takamatsu, D., M. Osaki, and T. Sekizaki, Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*. *Plasmid*, 2001. **46**(2): p. 140-8.
14. Halloy, D.J., et al., Oral exposure to culture material extract containing fumonisins predisposes swine to the development of pneumonitis caused by *Pasteurella multocida*. *Toxicology*, 2005. **213**(1-2): p. 34-44.
15. Liu, C.M., et al., A novel fluorescent probe: europium complex hybridized T7 phage. *Bioconjug Chem*, 2005. **16**(5): p. 1054-7.
16. Edgar, R., et al., High-sensitivity bacterial detection using biotin-tagged phage and quantum-dot nanocomplexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(13): p. 4841-5.
17. Capparelli, R., et al., Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. **51**(8): p. 2765-73.
18. McVay, C.S., M. Velasquez, and J.A. Fralick, Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. **51**(6): p. 1934-8.
19. Edgar, R., et al., Bacteriophage infection is targeted to cellular poles. *Mol Microbiol*, 2008. **68**(5): p. 1107-16.
20. Ma, Y.L. and C.P. Lu, Isolation and identification of a bacteriophage capable of infecting *Streptococcus suis* type 2 strains. *Vet Microbiol*, 2008. **132**(3-4): p. 340-7.
21. Rashel, M., et al., Tail-associated structural protein gp61 of *Staphylococcus aureus* phage phi MR11 has bifunctional lytic activity. *FEMS Microbiol Lett*, 2008. **284**(1): p. 9-16.
22. Chappell, L., et al., The immunobiology of avian systemic salmonellosis. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009. **128**(1-3): p. 53-9.
23. Coutinho, T.A., et al., Performance of transport and selective media for swine *Bordetella bronchiseptica* recovery and its comparison to polymerase chain reaction detection. *Braz J Microbiol*, 2009. **40**(3): p. 470-9.

24. Lee, S.H., et al., A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Enteritidis in meats. J Vet Sci, 2009. **10**(1): p. 43-51.
25. Yim, P.B., et al., Quantitative characterization of quantum dot-labeled lambda phage for *Escherichia coli* detection. Biotechnol Bioeng, 2009. **104**(6): p. 1059-67.
26. Jakutyte, L., et al., Bacteriophage infection in rod-shaped gram-positive bacteria: evidence for a preferential polar route for phage SPP1 entry in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 2011. **193**(18): p. 4893-903.
27. Lecours, M.P., et al., Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suliyisin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. J Infect Dis, 2011. **204**(6): p. 919-29.
28. Adriaenssens, E.M., et al., CIM((R)) monolithic anion-exchange chromatography as a useful alternative to CsCl gradient purification of bacteriophage particles. Virology, 2012. **434**(2): p. 265-70.
29. Kim, J.H., et al., Isolation and characterization of a lytic Myoviridae bacteriophage PAS-1 with broad infectivity in *Aeromonas salmonicida*. Curr Microbiol, 2012. **64**(5): p. 418-26.
30. Lee, K.E., et al., Phenotypic characterization and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Pasteurella multocida* isolated from Korean pigs. J Vet Med Sci, 2012. **74**(5): p. 567-73.
31. Tang, F., et al., Comparative genomic analysis of twelve *Streptococcus suis* (pro)phages. Genomics, 2013. **101**(6): p. 336-44.
32. Bourdin, G., et al., Amplification and purification of T4-like *Escherichia coli* phages for phage therapy: from laboratory to pilot scale. Appl Environ Microbiol, 2014. **80**(4): p. 1469-76.
33. Dabrowska, K., et al., Immunogenicity studies of proteins forming the T4 phage head surface. J Virol, 2014. **88**(21): p. 12551-7.
34. Hasan, M.R., et al., Evaluation of amplification targets for the specific detection of *Bordetella pertussis* using real-time polymerase chain reaction. Can J Infect Dis Med

- Microbiol, 2014. **25**(4): p. 217-21.
35. Tizolova, A., et al., Development of real-time PCR assay for differential detection of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2014. **78**(4): p. 347-51.
 36. Kramberger, P., L. Urbas, and A. Strancar, Downstream processing and chromatography based analytical methods for production of vaccines, gene therapy vectors, and bacteriophages. *Hum Vaccin Immunother*, 2015. **11**(4): p. 1010-21.
 37. Wang, H. and J. Ye, Regulation of energy balance by inflammation: common theme in physiology and pathology. *Rev Endocr Metab Disord*, 2015. **16**(1): p. 47-54.
 38. Furusawa, T., et al., Phage Therapy Is Effective in a Mouse Model of Bacterial Equine Keratitis. *Appl Environ Microbiol*, 2016. **82**(17): p. 5332-9.
 39. Scherrer, S., D. Frei, and M.M. Wittenbrink, A novel quantitative real-time polymerase chain reaction method for detecting toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal swabs from swine. *Acta Vet Scand*, 2016. **58**(1): p. 83.
 40. Zaczek, M., et al., Antibody Production in Response to Staphylococcal MS-1 Phage Cocktail in Patients Undergoing Phage Therapy. *Front Microbiol*, 2016. **7**: p. 1681.
 41. Adhikari, P., et al., Effect of dietary supplementation of nitrocompounds on *Salmonella* colonization and ileal immune gene expression in laying hens challenged with *Salmonella Enteritidis*. *Poult Sci*, 2017. **96**(12): p. 4280-4286.
 42. Chang, R.Y., et al., Production of highly stable spray dried phage formulations for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017. **121**: p. 1-13.
 43. Petrovic, A., et al., The First Siphoviridae Family Bacteriophages Infecting *Bordetella bronchiseptica* Isolated from Environment. *Microb Ecol*, 2017. **73**(2): p. 368-377.
 44. Jakociune, D. and A. Moodley, A Rapid Bacteriophage DNA Extraction Method. *Methods Protoc*, 2018. **1**(3).
 45. Park, G.Y., et al., *Bordetella bronchiseptica* bacteriophage suppresses *B. bronchiseptica*-induced inflammation in swine nasal turbinate cells. *Genes Genomics*,

2018. **40**(12): p. 1383-1388.

46. Trinh, J.T., et al., Fluorescent nanodiamond-bacteriophage conjugates maintain host specificity. *Biotechnol Bioeng*, 2018. **115**(6): p. 1427-1436.

주 의

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