

발 간 등 록 번 호

11-1543000-001176-01

유전자칩 및 real-time PCR을 이용한 검역용 신속  
조류인플루엔자 검출시스템 개발

Development of microarray and real-time PCR for the  
rapid detection of avian influenza for quarantine and field  
applications.

건국대학교 산학협력단

농 립 축 산 식 품 부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “유전자칩 및 real-time PCR을 이용한 검역용 신속 조류인플루엔자 검출 시스템 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 12 월 30 일

주관연구기관명 : 건국대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 최 인 수

연 구 원 : 권 정 훈

연 구 원 : 에르텐 어치르

연 구 원 : 노진용

협동연구기관명 : 바이오코아㈜

협동연구책임자 : 황 승 용

# 요 약 문

## I. 제 목

유전자칩 및 real-time PCR을 이용한 검역용 신속 조류인플루엔자 검출시스템 개발

## II. 연구성과 목표 대비 실적

구 분	지식재산권		논문		학술 발표	기술 거래	교육 지도	사업화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시 A	기타
	출원	등록	SCI	비 SCI									
최종목표	2	1	4	1	3		3					6	2
1차년도	목표		1		1		1					2	0
	실적					1	2			1			
2차년도	목표	1	1	1		1	1					2	1
	실적	1		2		4	1			2		4	1
3차년도	목표	1		2	1	1	1					2	1
	실적	1	1	1		2						2	1
소 계	목표	2	1	4	1	3	3			0		6	2
	실적	2	1	2		7	3			3		6	2
종료 1차년도			1	2	1								
종료 2차년도													
종료 3차년도													
소 계			2	1									
합 계	2	2	4	1	7		3			3		6	2

## III. 연구개발의 목적 및 필요성

- 2003년 최초 발생 이후 현재까지 총 5차례의 고병원성 조류 인플루엔자 (HPAI) 발생이 있었으며, 특히 2014년도 발생한 H5N8형 clade 2.3.4.4 HPAI 바이러스의 경우 약 2년간 발생이 지속되면서 큰 피해를 일으키고 있음.
- 야생조류의 이동이 HPAI 바이러스 국가간 전파의 주요 원인인 것으로 여겨지고 있으나, 조류의 밀반입, 사람의 이동 등 다양한 요인에 의해 바이러스가 전파된 사례들이 보고되고 있으며 이를 검사하기 위한 현장 신속 진단 기술이 필요함.
- 우리나라를 포함한 대부분의 선진국들은 HPAI 발생 시 살처분 정책을 적용하여 바이러스를 박멸하는 것을 방역의 목적으로 함. 살처분 정책 적용 시 불필요한 살처분 감소 및 효율 증대를 위해서는 단시간내 진단 가능한 기술의 개발이 필요함.
- 현재 종란 접종법을 통하여 바이러스를 분리하고 바이러스의 유전자 염기서열 분석을 통하여 HPAI 바이러스를 진단하고 있으며 이는 약 5~7일 정도의 시간이 소요됨.
- 조류 인플루엔자 바이러스 진단을 위한 real-time PCR도 수행이 되고 있으나 현재 H5 subtype에 대한 real-time PCR은 민감도가 낮아 H5 subtype 확인 및 고병원성 여부 확인을 위해서는 종란접종법이 필요한 실정임.
- 효율적인 방역활동의 적용 및 단기간 내 HPAI 바이러스 종식을 위해서는 1일 안에 진단 가능한 신속·정확·정밀 진단 기술의 개발이 시급한 실정임.

#### IV. 연구개발 내용 및 범위

##### ○ 최종목표

- 유전자칩 및 real-time PCR을 이용한 검역용 신속 조류인플루엔자 검출시스템 개발

##### ○ 주요내용

###### [Real-time PCR을 이용한 검역 기술 개발]

- real-time PCR을 이용한 종란 검역용 조류인플루엔자 검역·검출 가이드라인 구축
- real-time PCR을 이용한 육류 검역용 조류인플루엔자 검역·검출 가이드라인 구축
- 현재 real-time PCR을 이용한 H5 subtype 감별 방법 개선

###### [유전자칩을 이용한 검역 기술 개발]

- 조류인플루엔자 주요 혈청형 감별 유전자칩의 내수용 시제품 제작 및 국내임상시험
- 조류인플루엔자 주요 혈청형 감별 유전자칩의 내수용 시제품 보완 및 해외임상시험
- 조류인플루엔자 주요 혈청형 감별 유전자칩의 수출용 시제품 제작 및 보완

###### [현장형 신속 조류인플루엔자 검역 검출 시스템 개발]

- 현장형 신속 조류인플루엔자 검역·검출시스템을 개발 및 산업화

#### V. 연구개발결과

- real-time PCR 기술 개선을 위한 double-quancher의 이용 결과 기존 single-quancher를 이용한 방법에 비하여 CT value를 감소시켜 민감도를 향상 시킬 수 있는 것으로 확인됨.
- real-time PCR 적용을 위한 추출 효율 비교 결과 high-throughput 자동화 RNA 추출 장치가 기존 방식보다 닭의 swab 시료 및 분변 시료에서 추출 효율이 좋았으며, Trizol을 이용한 바이러스의 전처리 방법이 다른 방법에 비하여 추출 효율이 좋음을 확인함.
- H5 subtype 검출용 primer 및 probe의 개선 결과 기존 방식에 비하여 검출한계농도를 100배정도 낮추는 것으로 확인됨.
- 종란 검사를 위한 검사방법 비교 실험 결과 난각 표면 swab 방법이 PBS wash, 혈구 이용 농축법 및 유제 방법에 비하여 민감도가 높은 것으로 확인됨.
- 육류 검사를 위한 검사방법 비교 실험 결과 계육 표면 swab 방법이 계육 분쇄법 및 혈구 이용 농축법에 비하여 민감도가 높은 것으로 확인됨.
- 내수용 유전자칩의 개발 및 보완 결과 국내 2010년도 발생 H5N1, 2014년도 발생 H5N8, 2015년도 발생 H5N8, 중국의 H7N9 바이러스를 포함하여 다양한 혈청형의 바이러스에서 subtype 구분 및 병원성이 유전자 분석결과와 일치하는 결과를 나타냄.
- 수출용 유전자칩의 개발 및 보완 결과 몽골의 36종 바이러스 모두 유전자 분석결과와 일치하는 결과를 나타냄.
- 유전자칩을 이용한 검사 결과 현장 시료에서 6시간 이내 subtype 및 병원성 구분이 가능한 것으로 확인됨.
- 현장형 진단 장비의 개발 및 검사 결과 실험실 검사 시 결과와 유사한 결과를 나타내어 현장 진단에 이용 가능한 것으로 확인되었으며, 4시간 이내에 AIV 검출이 가능함.

## VI. 연구성과 및 성과활용 계획

### [연구 성과]

- 특허 2건 출원 및 1건 등록
- SCI 급 논문 3편 게재
- 학술대회 발표 7건
- 이외 홍보전시, 인력양성, 타연구활용 등
- H5N8 HPAI 바이러스 대상 검출 한계 농도 100배 개선 가능한 real-time PCR 법 개발
- 6시간 이내 조류 인플루엔자 바이러스의 subtype 및 병원성 구분 가능한 유전자칩의 개발
- 현장형 진단 장비의 개발
- 종란 및 계육 방역을 위한 검사 방법 개발

### [활용 계획]

- 정책 제안을 통한 유전자칩의 진단 기술 채택 및 이를 통한 개발 제품의 상업화
- 논문 추가 게재 2건 출원한 특허의 등록 1건 이상
- 유전자칩의 제품 등록 및 상업화를 통한 이윤 창출
- 검역용 신속·정확 진단기술의 개발 및 활용을 통한 국가 방역기술 향상 및 전염병 피해액 감소

## SUMMARY

The subject of this project is development of diagnostic methods for rapid detection of highly pathogenic avian influenza (HPAI) virus. Rapid and accurate diagnostic methods are important because they can prevent further spread of the virus and reduce the time for eradication. In this project, we developed and improved of real-time PCR and diagnostic DNA microarray methods and evaluate sensitivity and specificity using several influenza virus. Further, we developed in-situ diagnostic equipment.

For improvement of real-time PCR based diagnostic methods, we compared the methods for sample collection and RNA extraction. Furthermore, we designed new primer and probe set for detection of H5 subtype HPAI viruses. The swab sample of egg and chicken meat showed higher sensitivity than homogenization or concentration using chicken RBC methods. New H5 primer and probe set decreased limit of detection of H5N8 virus from  $10^5$ EID<sub>50</sub>/ml to  $10^3$ EID<sub>50</sub>/ml.

For development of diagnostic DNA microarray, we finally selected total 69 DNA probes (19 probes for H5 subtype, 6 probes for H7 subtypes, 15 probes for H9 subtypes, 26 probes for high pathogenicity, and 3 probes for low pathogenicity) through analysis of nucleotide sequence of avian influenza virus and clinical test of developed diagnostic microarray. we built a prototype of diagnostic microarray and this diagnostic microarray can detect HA subtype (H5, H7 and H9) and pathotype. All of the propagated samples including H5 HPAI viruses isolated from South Korea and Mongolia showed H5 specific and highly pathogenic pattern. Further, H7N9 and other H7 viruses isolated from wild birds showed H7 patterns. H9 viruses also successfully detected in the microarray. This diagnostic microarray didn't showed any cross reactivity with other subtypes including H1, H3, H4, H10 avian influenza virus.

The in-situ diagnostic equipment was designed based on PCR methods. It contained centrifuge, vortexer, thermocycler, electrophoresis equipment and battery for field application. The sensitivity of this in-situ equipment was similar with the general equipments used in a lab.

These developed diagnostic methods can reduce the time for diagnosis of HPAI virus and improve the sensitivity for HPAI diagnosis from clinical samples. These advantages can allow rapid eradication of HPAI virus and reduction of economic loss. We will suggest this new methods as additional diagnostic methods for HPAI detection to animal quarantine agency and commercialize the products.

# CONTENTS

I. THE OUTLINE OF THE PROJECT AND THE ACCOMPLISHMENT .....	8
1. Background of the project .....	8
2. Objects of the study .....	12
3. The Accomplishments of the project .....	14
II. INFORMATION OF RELATED RESEARCH AND DEVELOPMENT TRENDS .....	15
1. Research trends in other countries .....	15
2. Research trends in Korea .....	16
III. METHODOLOGY AND RESULTS .....	17
1. Development of the real-time PCR based diagnostic method for AIV .....	17
2. Development of diagnostic microarray and in-situ diagnostic equipment .....	39
2. Conclusion .....	64
IV. RESEARCH ACHIEVEMENTS AND IMPACT ON THE RELATED FIELDS .....	65
1. Research objective and evaluation criteria .....	65
2. Qualitative research achievements .....	69
3. Impact on the related fields .....	72
V. THE ACCOMPLISHMENTS AND FUTURE AIMS .....	73
1. The accomplishments of the project .....	73
2. Future aims .....	78
VI. CURRENT KNOWLEDGE ON THE FOREIGN RESEARCH INFORMATION .....	81
VII. FACILITY AND EQUIPMENT .....	89
VIII. SAFETY MANAGEMENT OF THE LABORATORY .....	90
XI. REFERENCES .....	91

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 및 성과목표 .....	8
1.	연구개발의 필요성 .....	8
2.	연구개발의 목표 및 내용 .....	12
3.	연구성과 목표 대비 실적 .....	14
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	15
1.	국외 연구 동향 .....	15
2.	국내 연구 동향 .....	16
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	17
1.	Real-time PCR을 이용한 검역용 신속 AIV 검출시스템 개발 .....	17
2.	유전자 칩을 이용한 검역용 신속 AIV 검출시스템 개발 .....	39
3.	결론 .....	64
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	65
1.	연도별 연구목표 및 평가의 착안점 .....	65
2.	연구개발목표의 달성도 .....	69
3.	관련분야 기술발전 기여도 .....	72
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	73
1.	연구개발결과의 성과 .....	73
2.	성과 활용계획 .....	78
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	81
제 7 장	연구시설·장비 현황 .....	89
제 8 장	연구실 안전관리 이행실적 .....	90
제 9 장	참고문헌 .....	91
<첨부>	특허, 논문 및 시장분석 보고서 .....	93



# 제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

## 1절 연구개발의 필요성

- 조류인플루엔자(Avian influenza, AI) 바이러스는 병원성에 따라 닭에 감염 시 가벼운 호흡기 증상 및 1-30% 내외의 폐사와 산란저하를 유발하는 저병원성 조류인플루엔자 (Low pathogenic Avian influenza, LPAI) 그리고 95% 이상의 높은 치사성을 보이는 고병원성 조류인플루엔자 (Highly Pathogenic Avian Influenza : HPAI)로 크게 2가지 병형으로 구분할 수 있다. 고병원성 조류인플루엔자는 베트남, 인도네시아 등을 포함한 동남아시아에 상재하고 있으며, 국내에서는 2003년 최초로 H5N1 HPAI가 발생한 이후 현재까지 2010-2011년 최근 발생까지 포함하여 4차례의 HPAI가 발생하여, 국가적으로 큰 손실을 초래하였다.
- 저병원성 조류인플루엔자의 경우 국내에서 1996년 최초로 H9N2 LPAI가 발생한 이후 현재까지 산란계와 종계에서 심한 산란저하를 동반한 폐사유발로 심각한 경제적인 피해를 유발하고 있으며, 파키스탄, 중국을 비롯한 아시아 여러 지역에서도 LPAI로 인한 산란저하와 폐사 피해가 날로 커져가고 있다. 또한 H9N2 바이러스의 인체 감염 사례도 보고되어 있어 인플루엔자 대유행 바이러스로의 잠재적인 변이 위험성에 대하여 활발한 연구가 이루어지고 있다. 국내에서는 최근 생가금유통시장을 중심으로 활발한 유전자 교환을 통해 H9N2형 바이러스의 지속적이며 빠른 변이가 관찰되고 있으며, 이러한 바이러스의 감염실태 및 진화속도의 지속적인 역학조사 및 분석을 위하여 국가적인 조류인플루엔자 바이러스 예찰사업이 농장, 재래시장, 철새도래지 등을 중심으로 수행되고 있다.
- 2010-2011년에 발생한 HPAI는 H5N1형 clade 2.3.2.1에 속하는 바이러스로 기존 바이러스 보다 세계적으로 야생조류에서 많은 발생이 보고되고 있으므로 추후 철새의 이동시 가금류로의 빈번한 전파가 예상된다. 현재 새로운 변이 clade에 속하는 HPAI의 가금류 감염 및 전파가 지속적으로 발생하는 상황에서 인플루엔자 대유행 등의 비상시를 대비한 다양한 HPAI백신 및 진단법 등의 개발연구가 국내외 연구자들에 의하여 이루어지고 있다.
- 철새에 의한 유입이 HPAI의 주된 전파 경로로 밝혀지고 있어 현재 세계적으로 많은 연구기관에서 야생조류에서의 바이러스 검출을 통한 역학조사사업을 수행하고 있다. 또한, 철새 이외에도 밀수조류에 의한 HPAI 바이러스 유입이 보고되고 있어 공항·항만 등에서 철저하고 신속한 검역검사가 필요한 실정이다.
  - 공항·항만에서의 대표적 HPAI 바이러스 유입 사례
  - (1) 2004년 영국 공항에서 수입 앵무새로부터 HPAI 검출
  - (2) 2005년 벨기에 브뤼셀 공항에서 태국산 밀반입 맹금류 2마리에서 HPAI 검출
  - (3) 2005년 대만 항만에서 파나마 화물선에서 중국산 밀수 가금류에서 HPAI 검출



그림 1-1. 유럽으로 밀반입 된 동남아시아산 맹금류 (출처: birdflubook)

○ 국내의 경우 앵무새 등의 애완조류 및 유정란의 밀반입이 HPAI상재국인 인도네시아, 태국, 중국, 러시아 등으로부터 성행하고 있으나, 국내 AI방역은 철새 모니터링과 가금류 사육농가 관리에 주로 초점이 맞춰져 있어 현재 HPAI의 검출검역시스템의 보완 및 개선이 시급하다.



그림 1-2. 인천공항에서 압류된 밀수 태국산 앵무새 유정란 <출처: 인천공항 세관>



그림 1-3. 국내 밀반입 태국산 구관조 <출처: SBS>

#### 나. 분자진단기법의 도입 필요성

○ Real-time PCR법은 기존의 일반 PCR법보다 민감도가 뛰어나고, 시험법이 간편하며 정확한 시험결과를 도출 할 수 있다는 장점이 있으므로 병원체 진단분야에 폭 넓게 사용되

고 있다. 반응 후에 증폭 산물을 전기영동으로 확인할 필요가 없어, 간편한 장비로 신속하게 결과를 얻을 수 있을 뿐만 아니라, 시료의 contamination의 위험이 낮은 것 또한 장점이다. Real-time PCR법은 병원체 진단 외에 SNP typing, 유전자 조작 식품의 검사, 도입 유전자의 copy 수 해석 등 다양한 용도에 응용되고 있다. 최근에는 기존의 PCR법으로 검출하던 유전자 검사를 real-time PCR로 검출하려고 하는 시도가 활발하게 진행되고 있다.

○ 바이오칩(biochip)은 생물에서 유래된 효소, 단백질, 항체, DNA 등과 같은 생체 유기물과 반도체 등의 무기물을 조합하여 기존의 반도체 칩 형태로 만든 혼성 소자(hybrid device)이다. 바이오칩은 적은 양의 시료로도 진단이 가능하고 사용법이 간단하며 신속하고 정확한 결과를 얻을 수 있다는 점에서 최근 각광받고 있다. 또한 하나의 칩에 여러 정보를 담을 수 있어 1회 실험으로 다수 유전자 type의 감별이 동시에 가능하다는 장점이 있다.

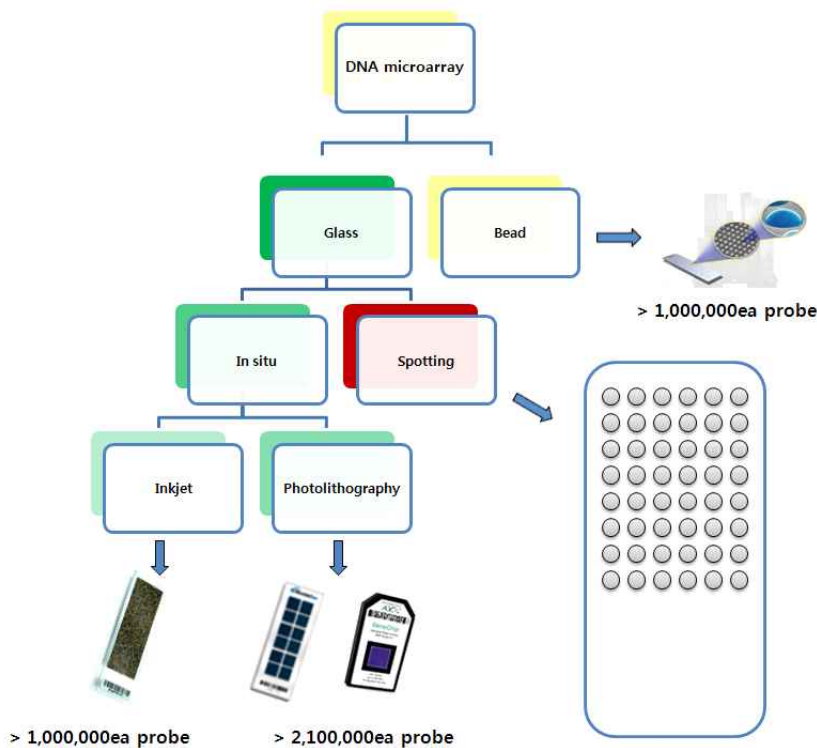


그림 1-4. 바이오칩(DNA microarray)의 종류

○ 미국의 바이오칩 관련 제품 및 서비스 시장 규모는 매년 20%씩 꾸준히 성장하고 있어 2013년에는 40억불을 초과할 것으로 예상된다. 현재 바이오칩 시장을 선도하는 분야는 단백질 분석, 유전자 발현을 이용하는 신약 발견과 전염병 연구이나 각종 진단 테스트 분야 역시 가격이 비싸다는 단점에도 불구하고 빠르게 성장하는 추세이다.

○ 기존의 바이오칩 기법을 이용한 인플루엔자 혈청형 감별법 연구는 대상 바이러스가 사람에서 최근 문제시 되고 있는 혈청형 (H1N1, H3N2, H5N1)에 치중되어 있는 실정이며, 양

계산업에서 중요시 되고 있는 혈청형 (H9N2, H5N1, H7N7 등)을 포함한 조류 바이러스 전문 유전자칩 관련 연구는 미미한 실정이다.

- 기존 Combimatrix사에서 개발된 HA 1-15형, NA 1-9형 을 판별할 수 있는 바이오 chip은 chip의 개당 단가가 700\$로 Large-scale influenza surveillance에는 적합하지 않은 것으로 평가된다.
- 현재 유전자를 활용하는 virus 진단 기술은 다양하게 연구되고 있는데, 특히 현실적으로 휴대용 장비에서 활용할 수 있는 기술로서 바이오칩의 활용성은 매우 뛰어나다. 따라서 인플루엔자 혈청형 감별 분석을 위한 휴대용 장비에 효과적인 유전자 contents를 제공할 수 있는 본 기술개발이 필요할 것으로 판단된다.

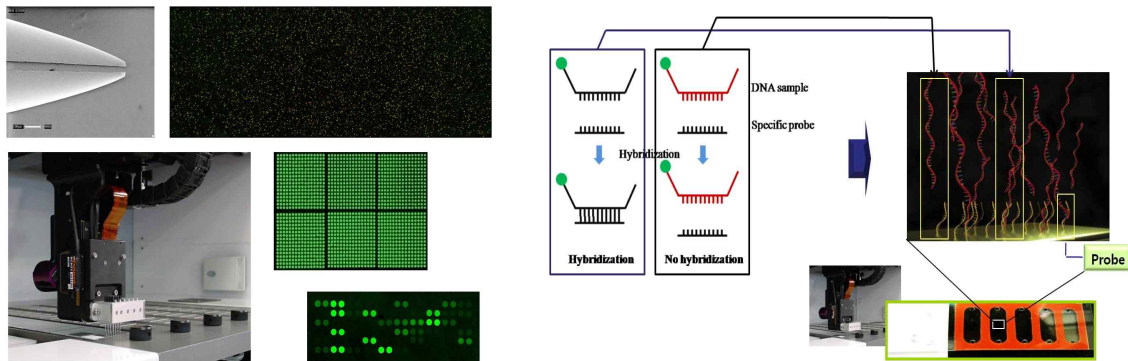


그림 1-5. DNA microarray의 제작과정 및 원리

-국의 연구동향

- 현재 유전자칩을 생산하여 판매 하고 있는 대표적인 회사는 미국의 Affymetrix사이며, Affymetrix사는 반도체 제조기술의 일종인 photolithography 기법을 최초 사용하여 1.28cm<sup>2</sup> 안에 65,000개의 서로 다른 oligonucleotide(25 mer)를 가진 chip을 제작하였고, 현재 400,000여개의 다른 oligonucleotide를 가진 chip을 제조 할 수 있는 기술을 보유하고 있으며, CYP 450, p53 그리고 HIV의 돌연변이를 검출하는 유전자칩을 개발하였다.
- 미국은 생명과학 기술 분야의 세계적 리더로서, 시장의 규모가 가장 크게 형성되어 있고 관련 정부, 학교 및 기업 내 연구소는 증가추세이며, 각각 독특한 기술로 경쟁력을 갖추고 있다.
- 유럽에서는 생명과학에 대한 연구 업적이나 뛰어난 기술을 바탕으로 생물정보학의 중요성을 인식하고 주도권을 잡기 위한 연구를 활발히 하고 있다.
- 일본의 생명과학기술 연구는 미국에 비해 크게 뒤져있으나 미세 가공이나 계측기술에 있어서 뛰어난 기술을 가지고 있는 일본 기업도 많으므로 그 기술을 살릴 수 있는 분야라고 할 수 있으며, Hitachi software engineering은 일본 내에서 처음으로 chip을 개발하는 벤처 기업 '유전자칩 연구소'에 출자하고 유전자칩 판매에 나서고 있다.

○ 본 연구에서는 공항·항만 등 현장에서 사용이 가능한 밀반입 조류, 유행, 불법휴대축산 품 대상 real-time PCR 신속검출법의 가이드라인을 개발하고, 신속하게 조류인플루엔자 바이러스의 혈청형 및 병원성을 감별할 수 있는 현장형 신속 바이오칩(biochip)을 국내 및 해외시장을 대상으로 개발하고자 한다.

## 2절 연구개발 목표 및 내용

### 1. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

#### ○ 최종목표

- 유전자칩 및 real-time PCR을 이용한 검역용 신속 조류인플루엔자 검출시스템 개발

#### ○ 주요내용

##### [1차년도]

- 조류인플루엔자 주요 혈청형 감별 유전자칩의 내수용 시제품 제작 및 국내임상시험  
- real-time PCR을 이용한 종란 검역용 조류인플루엔자 검역·검출 가이드라인 구축

##### [2차년도]

- 조류인플루엔자 주요 혈청형 감별 유전자칩의 내수용 시제품 보완 및 해외임상시험  
- real-time PCR을 이용한 육류 검역용 조류인플루엔자 검역·검출 가이드라인 구축

##### [3차년도]

- 조류인플루엔자 주요 혈청형 감별 유전자칩의 수출용 시제품 제작 및 보완  
- 현장형 신속 조류인플루엔자 검역·검출시스템을 개발 및 산업화

### 2. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

#### 가. 제1세부과제 연구개발의 목표 및 내용

##### ○ 조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형별 유전자 분석

- 최신 조류인플루엔자 바이러스 분리주의 주요 혈청형 유전자 정보 분석  
- 제2세부과제와의 협력연구를 통한 혈청형별 유전자 marker 탐색 및 검정

##### ○ real-time PCR을 이용한 검역용 조류인플루엔자 검역·검출 가이드라인 구축

- 종란 검역용 조류인플루엔자 검역·검출 가이드라인 구축  
- 육류 검역용 조류인플루엔자 검역·검출 가이드라인 구축

##### ○ 조류인플루엔자 주요 혈청형 감별 유전자칩 시제품의 임상시험

- 조류인플루엔자 주요 혈청형 감별 유전자칩의 내수용 시제품 보완 및 국내임상시험  
- 조류인플루엔자 주요 혈청형 감별 유전자칩의 수출용 시제품 보완 및 해외임상시험

나. 제2세부과제 연구개발의 목표 및 내용

- 조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형별 유전자 정보 분석 및 증폭 조건 확립
  - 제 1세부로부터 전달 받은 조류인플루엔자 바이러스 유전자 정보 분석
  - 유전자 정보 분석을 통한 혈청형별 유전자 marker 탐색
  - 혈청형별 유전자 marker에 따른 유전자 증폭 조건 확립
  
- 조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형별 특이적 유전자 probe 설계 및 유전자 칩 제작
  - 각 혈청형별 특이적 유전자 candidate probe의 설계
  - 설계된 candidate probe를 이용한 주요 혈청형 감별용 유전자 칩의 제작
  
- 조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형별 유전자 칩 실험 방법 확립 및 검증
  - 유전자 칩용 primer를 이용한 유전자 증폭 조건 확립
  - 증폭된 유전자를 통한 candidate probe의 검증
  - 반복 실험을 통한 candidate probe의 선별 및 검증
  
- 조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형 감별용 유전자 칩의 시제품 제작
  - 선별된 각 혈청형별 특이적 유전자 probe를 이용한 유전자 칩 제작
  - 국내·외 임상 시료를 이용한 유전자 칩의 검증
  - 주요 혈청형 감별용 유전자 칩의 시제품 제작

### 3절 연구성과 목표 대비 실적

#### 1. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

구 분	지식재산권		논문		학술 발표	기술 거래	교육 지도	사업화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시 A	기타
	출원	등록	SCI	비 SCI									
최종목표	2	1	4	1	3		3					6	2
1차년도	목표		1		1		1					2	0
	실적				1		2		1				
2차년도	목표	1	1	1	1		1					2	1
	실적	1		2	4		1		2			4	1
3차년도	목표	1		2	1	1	1					2	1
	실적	1	1	1	2							2	1
소 계	목표	2	1	4	1	3	3			0		6	2
	실적	2	1	2	7		3		3			6	2
종료 1차년도		1	2	1									
종료 2차년도													
종료 3차년도													
소 계			2	1									
합 계	2	2	4	1	7		3		3			6	2

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1절 국외연구동향

#### 1. 미국

- 미국은 생명과학 기술 분야의 세계적 리더로서, 시장의 규모가 가장 크게 형성되어 있고 정부 관련 기관, 학교 및 기업 내 연구소가 증가하고 있는 추세로, 각각 독특한 기술로 경쟁력을 갖추고 있음. 미국 국립보건원(National Institutes of Health ; NIH) 및 국립인간유전체연구소 (National Human Genome Research Institute ; NHGRI)에서도 사람의 유전자 및 질병과 관련하여 유전자칩 연구를 진행하고 있음.
- 현재 유전자칩을 생산하여 판매하고 있는 대표적인 회사는 미국의 Santa Clara에 있는 Affymetrix 사임.
- Affymetrix사는 반도체 제조기술의 일종인 photolithography 기법을 최초 사용하여 1.28 cm<sup>2</sup> 안에 65,000개의 서로 다른 oligonucleotide (25 mer)를 가진 chip을 제작하였고, 현재 400,000여개의 다른 oligonucleotide를 가진 chip을 제조할 수 있는 기술을 보유하고 있으며, 현재 CYP450, p53 그리고 HIV의 돌연변이를 검출하는 유전자칩을 개발하였음.
- 이외에도 Microarray 사에서 탄저균 (Bacillus anthracis), 살모넬라, 말라리아 등에 대한 유전자칩이 개발되어 있으며 로봇과 프린팅 기술을 사용하여 많은 수의 다른 oligonucleotide를 가진 chip을 제조하거나, 가독성이 좋은 칩의 개발을 진행하고 있음.

#### 2. 유럽

- 유럽에서는 생명과학에 대한 연구 업적이나 뛰어난 기술을 바탕으로 생물정보학의 중요성을 인식하고 주도권을 잡기 위한 연구를 활발히 하고 있음.
- European Biotech Network (EBN) 등 다양한 회사들이 여러 종류의 유전자칩 플랫폼을 개발 및 판매하고 있음.

#### 3. 일본

- 일본의 생명과학 기술 연구는 미국에 비해 크게 뒤져있으나, 미세 가공이나 계측기술에 있어서 뛰어난 기술을 가지고 있는 일본 기업이 많아 발전 가능성이 높은 분야임.
- Hitachi software engineering은 일본 내에서 처음으로 chip을 개발하는 벤처기업 ‘유전자칩 연구소’에 출자하고 유전자칩 판매에 나서고 있음.



#### 4. 인플루엔자 관련 국외 주요 연구개발 내용 및 활용 현황

연구수행기관	연구개발 내용	연구개발성과 활용 현황
콜로라도 대학 (미국)	-인플루엔자 A 바이러스용 HA, NA 유전자를 이용한 Fluchip 및 M 유전자를 이용한 M chip 발표 -인플루엔자 B 바이러스용 chip 발표	-
Combimatrix corporation	-인플루엔자 A 바이러스용 HA, NA 유전자를 이용한 subtype 판별chip 개발 및 판매	전 세계 판매중 (실험비용 : chip당 ~700\$)

#### 2절 국내 연구 동향

- 국내의 경우 인간의 HLA 유전자 chip, 인두유종 바이러스 (human papillomavirus) 판별 chip, 어류 및 조류의 종 판별 chip 과 같은 유전자칩이 활발하게 연구되고 있음.
- 조류인플루엔자 혈청형 및 병원성 감별 유전자칩과 관련되어 국내에서는 본 과제 수행팀이 가장 앞서 있으며, 추후 바이러스의 전파 및 유입을 빠르게 진단하고 대처 방안을 세울 수 있는데 큰 도움이 될 것으로 판단됨.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 1절 Real-time PCR을 이용한 검역용 신속 AIV 검출시스템 개발

#### 1. 수출입 및 밀수를 통한 HPAI 발생 사례 조사연구

##### 가. 2005년 영국에서 검역 중 HPAI 검출 사례

- 검출 종명: 대만 수입 잉꼬 (mesia)
- 검출 바이러스 명: A/mesia/England-Q/1219/2005 (H5N1)
- 병원성: IVPI 2.58
- HA cleavage site multiple basic amino acid: PPRERRRKR
- Clade 분류: Clade 2.3
- 관련 논문

AVIAN DISEASES 54:194-200, 2010

#### **Overview of Incursions of Asian H5N1 Subtype Highly Pathogenic Avian Influenza Virus into Great Britain, 2005-2008**

Dennis J. Alexander, Ruth J. Manvell, Richard Irvine, Brandon Z. Londt, Bill Cox, Vanessa Ceeraz, Jill Banks, and Ian H. Brown<sup>A</sup>

Virology Department, Veterinary Laboratories Agency-Weybridge, Addlestone, Surrey KT15 3NB, United Kingdom

Received 7 May 2009; Accepted and published ahead of print 27 October 2009

**SUMMARY.** Since 2005 there have been five incursions into Great Britain of highly pathogenic avian influenza (HPAI) viruses of subtype H5N1 related to the ongoing global epizootic. The first incursion occurred in October 2005 in birds held in quarantine after importation from Taiwan. Two incursions related to wild birds: one involved a single dead whooper swan found in March 2006 in the sea off the east coast of Scotland, and the other involved 10 mute swans and a Canada goose found dead over the period extending from late December 2007 to late February 2008 on or close to a swannery on the south coast of England. The other two outbreaks occurred in commercial poultry in January 2007 and November 2007, both in the county of Suffolk. The first of these poultry outbreaks occurred on a large turkey farm, and there was no further spread. The second outbreak occurred on a free-range farm rearing turkeys, ducks, and geese and spread to birds on a second turkey farm that was culled as a dangerous contact. Viruses isolated from these five outbreaks were confirmed to be Asian H5N1 HPAI viruses; the quarantine outbreak was attributed to a clade 2.3 virus and the other four to clade 2.2 viruses. This article describes the outbreaks, their control, and the possible origins of the responsible viruses.

##### 나. 2005년 벨기에 브뤼셀 공항 태국산 밀반입 맹금류 HPAI 검출 사례

- 검출 종명: Crested eagle
- 검출 바이러스 명: A/crested eagle/Belgium/01/2004 (H5N1)
- 병원성: IVPI 3.0
- HA cleavage site multiple basic amino acid: KRRKKR
- Clade 분류: Clade 1
- 관련 논문

# Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus in Smuggled Thai Eagles, Belgium

Steven Van Borm,\* Isabelle Thomas,†  
Germaine Hanquet,† Bénédicte Lambrecht,\*  
Marc Boschmans,\* Gérald Dupont,†  
Mireille Decaestecker,\* René Snacken,†  
and Thierry van den Berg\*

We report the isolation and characterization of a highly pathogenic avian influenza A/H5N1 virus from Crested Hawk-Eagles smuggled into Europe by air travel. A screening performed in human and avian contacts indicated no dissemination occurred. Illegal movements of birds are a major threat for the introduction of highly pathogenic avian influenza.

---

다. 2005년 대만 향만 밀수 가금류 HPAI 검출 사례

-검출 증명: 파나마 화물선 유래 중국산 밀수 가금류 (상사조 3종류, 276 폐사체)

-검출 바이러스: 2003년 중국 분리주와 HA 유전자가 96% 상동성을 보이는 H5N1 바이러스

-관련 논문

## Review

### Recent expansion of highly pathogenic avian influenza H5N1: a critical review

M. GAUTHIER-CLERC,<sup>1\*</sup> C. LEBARBENCHON<sup>1,2</sup> & F. THOMAS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Station Biologique de la Tour du Valat, Le Sambuc, 13200 Arles, France

<sup>2</sup>GEMI, UMR CNRS/IRD 2724, IRD, 911 av. Agropolis BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5, France

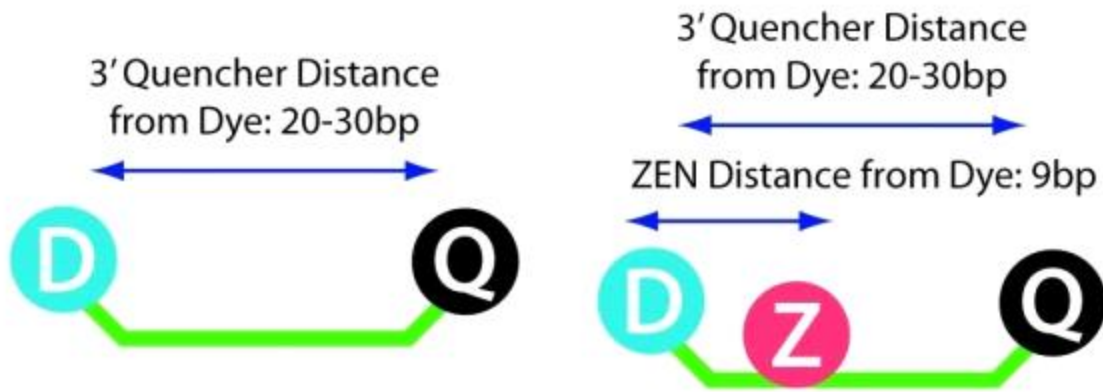
---

Wild birds, particularly waterfowl, are a key element of the viral ecology of avian influenza. Highly pathogenic avian influenza (HPAI) virus, subtype H5N1, was first detected in poultry in November 1996 in southeast China, where it originated. The virus subsequently dispersed throughout most of Asia, and also to Africa and Europe. Despite compelling evidence that the virus has been dispersed widely via human activities that include farming, and marketing of poultry, migratory birds have been widely considered to be the primary source of its global dispersal. Here we present a critical examination of the arguments both for and against the role of migratory birds in the global dispersal of HPAI H5N1. We conclude that, whilst wild birds undoubtedly contribute to the local spread of the virus in the wild, human commercial activities, particularly those associated with poultry, are the major factors that have determined its global dispersal.

2. 검역용 조류인플루엔자 real-time PCR의 조건 확립

가. 조류인플루엔자 real-time PCR의 조건 확립

- Real-time PCR을 이용한 조류인플루엔자 바이러스의 진단을 위하여 전 세계적으로 이용되고 있는 matrix 유전자를 대상으로 하는 검출법을 이용하여 real-time PCR 조건을 확립함.
- 최근 검출 민감도 개선 및 비특이반응을 줄일 수 있는 기술로 알려진 dual quencher probe를 제작하여 기존의 single quencher를 사용한 real-time PCR과 비교 분석을 실시함 (그림 3-1).



<그림 3-1. Dual quencher를 이용한 probe 제작 방법, Integrated DNA Technologies사>

- Single quencher를 이용한 probe는 FAM-TAMRA를 이용하고, dual quencher probe에는 FAM-/ZEN/-TAMRA를 사용함 (표 1).

표 3-1. 조류인플루엔자 검출 real-time PCR에 사용된 primer 및 probe

Target gene	Primer/probe <sup>A</sup>	Sequence (5' - 3')
M gene	M +25 primer	AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG
	M -124 primer	TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG
	M +64 probe-1 (Single quencher)	FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-TAMRA
	M +64 probe-1 (Dual quencher)	FAM-TCA GGC CCC /ZEN/ CTC AAA GCC GA-TAMRA

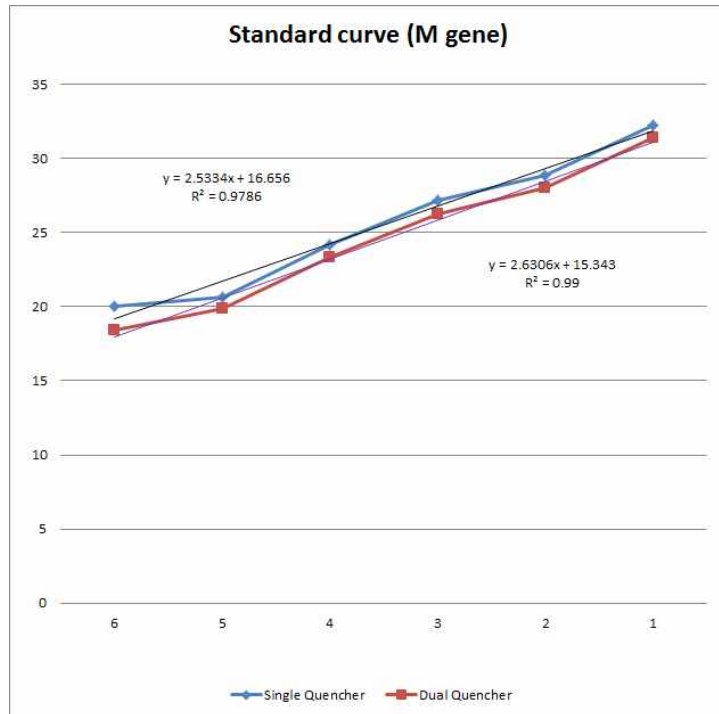
<sup>A</sup>J Clin Microbiol. 2002 Sep;40(9):3256-60.

- H9N2형 조류인플루엔자 바이러스의 matrix 유전자를 TA-cloning vector에 삽입 후 plasmid를 DH5-alpha competent cell을 이용하여 증폭 후 정제한 후, T7 promotor를 이용한 in vitro transcription을 실시하여 cRNA를 합성하고 copy number를 산출함.

- 산출된 copy number를 기준으로 100000 copy - 1 copy 까지 10진 희석 후 single quencher probe와 dual quencher probe를 이용한 real-time PCR법을 비교한 결과, dual quencher probe에서 single quencher probe에 비하여 더 적은 Ct value가 나타나는 경향이 있었으며 standard curve 작성시 더 높은 R<sup>2</sup> 값을 나타내었으나, 통계적 유의성을 보이지 않음 (표3-2, 그림 3-2).

표 3-2. Single quencher와 dual quencher probe의 Ct value 비교

M gene copy number	Single quencher (Ct value)			Dual quencher (Ct value)		
	1차	2차	평균	1차	2차	평균
100000	19.87	20.19	20.03	17.61	19.22	18.415
10000	20.39	20.87	20.63	19.62	20.13	19.875
1000	24.17	24.22	24.195	23.28	23.44	23.36
100	26.99	27.43	27.21	26.15	26.41	26.28
10	29.07	28.61	28.84	27.79	28.21	28
1	32	32.47	32.235	31.15	31.59	31.37



<그림 3-2. Single quencher와 dual quencher probe의 standard curve 비교>

- 합성된 cRNA를 이용하여 real-time PCR 검출법을 확립 후, 실제 조류로부터 유래된 샘플에 대한 검정을 위하여 조류인플루엔자 바이러스에 감염된 닭의 구강인두 및 총배설강 swab으로부터 유래된 시료로 확립된 real-time PCR을 이용하여 검출을 수행함. ABSL-2 시설에서 10수의 9주령 SPF닭에 비강경로로 10<sup>6.5</sup>EID<sub>50</sub>/100ul의 H9N2형 바이러스를 공격접종하고 5일 후 구강인두와 총배설강에서 swab 시료를 채취하고 10일령

SPF 종란을 이용하여 EID값을 산출 후 10진 희석하여 real-time PCR 검출법을 적용한 결과, 조류의 구강인두 및 총배설강으로부터 유래된 샘플에 본 real-time PCR 검출법을 사용 가능 할 것으로 판단됨 (표 3-3).

표 3-3. 조류 swab 시료를 이용한 real-time PCR Ct value의 비교

Log EID <sub>50</sub>	구강인두 swab (Ct value)		총배설강 swab (Ct value)	
	single quancher	dual quancher	single quancher	dual quancher
7	-	-	17.07	16.62
6	-	-	21	20.16
5	21.1	19.88	23.27	21.9
4	23.5	23.34	26.89	25.85
3	27.28	26.7	30.11	29.45
2	31.05	30.04	34.04	32.88
1	34.85	33.4	Neg	Neg
0	Neg	Neg	Neg	Neg

나. 조류인플루엔자 real-time PCR의 검출 한계 및 시험조건 확립

- 1차년도에 Real-time PCR을 이용한 조류인플루엔자 바이러스의 진단을 위하여 전 세계적으로 이용되고 있는 matrix 유전자를 대상으로 하는 검출법을 이용하여 real-time PCR 조건을 확립함.
- 1차년도에 확립된 Real-time PCR기법을 대량시료 처리가 가능할 수 있도록 유전자 추출 자동화 장비 및 96 channel Real-time PCR에 적용하기 위하여 기기별 검출 효율을 기존 방법과 비교분석함.
- RNA 추출 기기별 효율을 검출하기 위해 기존에 사용되고 있는 membrane column 방식의 Viral genespin(Intron) kit와 16개의 샘플을 동시에 추출 할 수 있는 high-throughput 장비인 Exiprep(Bioneer)장비를 비교함.
- H9N2형 조류인플루엔자에 감염된 닭의 구강인두와 총배설강의 샘플 8가지를 이용하여 위의 두가지방법으로 RNA를 추출 후 96channel Real-time PCR인 AB7500(Applied Biosystem)와 Exicycler(Bioneer)로 동시에 검출을 실시함.

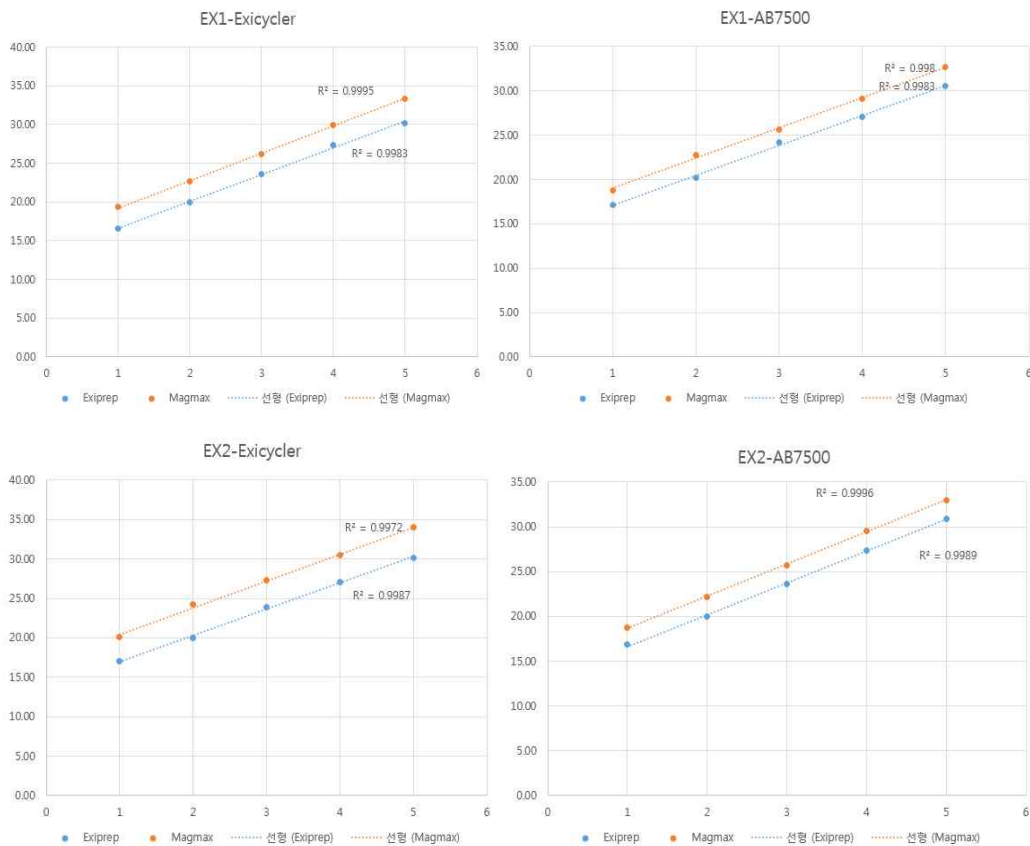
표 3-4. high-throughput RNA추출 후보 기기와 기존의 membrane방식 RNA 추출 방식 비교

Exicycler	Vent		Oro		AB7500	Vent		Oro	
	viral gene	Exiprep	viral gene	Exiprep		viral gene	Exiprep	viral gene	Exiprep
1	26.67	25.99	29.14	29.02	1	27.2561	25.4034	29.9835	28.6406
2	29.29	27.36	29.55	30.14	2	31.1826	27.55	29.8161	29.6831
3	31.3	30.39	30.05	29.15	3	30.6051	30.8267	31.0063	26.7204
4	39.	-	25.93	25.15	4	37.6834	39.0007	25.5311	24.5767
5	20.72	20.21	23.46	23.02	5	20.7903	20.0523	Not done	
6	38.83	35.93	32.36	31.34	6	37.8937	36.1968		
7	37.6	38.87	28.04	27.23	7	38.4078	36.1627		
8	26.68	26.33	31.73	26.14	8	26.4234	26.3421		

- 기존의 membrane 방식의 RNA추출 방식보다 high-throughput 자동화 RNA 추출 장치가 구강인두 샘플에서는 0.1~1 정도 cycle threshold (Ct) 값이 낮아지는 양상을 보임.
- CT 값 분석 결과, 두 가지 종류의 Real time RT-PCR 기기에서 유사한 경향의 결과를 나타냄.
- 따라서 기존의 방식보다 high-throughput 자동화 RNA 추출 장치가 닭의 구강인두 및 총배설강의 바이러스에서 높은 효율로 viral RNA를 추출함을 증명함.
- 국내 및 국외의 RNA 추출장치 별 검출 한계 및 효율을 시험하기 위해 위의 실험에서 이용한 국내 장비인 Exicycler (Bioneer) 외에 해외 수입 장비인 Magmax (Life Technology), Maxwell (Promega)와 비교실험을 실시함.
- SPF 10일 종란에 저병원성 조류인플루엔자 H9N2를 접종한 후 3일 뒤 allantoic fluid를 수거하여 수거된 샘플을 10-fold dilution을 실시하여 각각 RNA 추출 장비의 바이러스 회석에 따른 검출 정도의 상관성을 분석함.
- 추출된 RNA의 Real time RT-PCR 장비에 따른 차이를 분석하기 위해 국내 개발 장비인 Exicycler(Bioneer)와 AB7500(Applied biosystem)에서 동일한 샘플로 실험을 진행하였고, 총 2번의 반복실험을 통해 실험의 재현성을 확인함.
- 대표적인 국내장비와 해외장비를 비교해 보았을 때, 초기 샘플 소모량이 Exiprep에 비해 Magmax가 8배 적은 것을 감안하면 두 기기에서 추출된 viral RNA는 Exicycler와 AB7500 Real time RT-PCR에서 유의적인 차이가 없는 Ct값 결과를 산출 할 수 있었음.

표 3-5. 국내 생산 기기(Exiprep)과 해외 생산 기기(Magmax)의 RNA 추출 효율 비교

EX1					EX2				
Dilution	Exicycler		AB7500		Dilution	Exicycler		AB7500	
	Exiprep	Magmax	Exiprep	Magmax		Exiprep	Magmax	Exiprep	Magmax
10 <sup>-1</sup>	16.55	19.36	17.11	18.80	10 <sup>-1</sup>	17.03	20.12	16.87	18.74
10 <sup>-2</sup>	20.01	22.69	20.25	22.79	10 <sup>-2</sup>	20.01	24.28	19.96	22.16
10 <sup>-3</sup>	23.58	26.13	24.20	25.66	10 <sup>-3</sup>	23.83	27.25	23.57	25.67
10 <sup>-4</sup>	27.31	29.96	27.11	29.09	10 <sup>-4</sup>	27.02	30.48	27.32	29.53
10 <sup>-5</sup>	30.15	33.34	30.50	32.72	10 <sup>-5</sup>	30.19	33.99	30.89	32.96



<그림 3-3. 국내 생산 기기(Exiprep)과 해외 생산 기기(Magmax)의 RNA 추출 효율 비교>

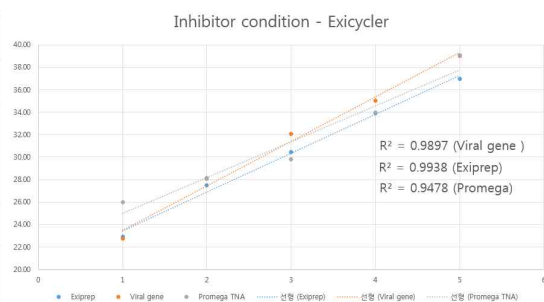
- 또한 계란에서 증폭된 바이러스 샘플을 이용하여 serial dilution을 실시하여 추세를 비교하였을 때 R<sup>2</sup>값이 0.99임을 확인하여 두 장비 모두 계란에서 증폭된 바이러스를 정량하기에 적합한 기기로 판단됨.
- 두 번의 반복실험에서 유사한 수치와 Ct 값을 얻을 수 있었으며, 이는 RNA 추출 장비와 Real time RT-PCR 장비가 모두 재현성 있는 것으로 판단됨.



다. PCR 저해물질이 포함된 시료의 유전자 추출 및 Real time RT-PCR 검출 효율 분석

- 국내 철새유래 조류인플루엔자 및 농장 내 조류인플루엔자 검출 시 환경샘플에는 RNA 추출과 Real time RT-PCR 검출에 민감도 저해 효과를 일으킬 수 있는 inhibitor들이 존재함.
- 따라서 다양한 inhibitor를 고려하여 조류인플루엔자의 검출 효율을 극대화 할 필요가 있으며, 본 과제에서 검증하고자하는 장비들을 대상으로 inhibitor 조건 시험을 실시함.
- 본 실험에서는 inhibitor 중 가장 저해 효과가 높은 것으로 알려진 분변 샘플을 대상으로 조류인플루엔자 검출을 시도하였으며, 국내 유행 저병원성 조류인플루엔자인 H9N2를 대상으로 실시함.
- SPF 닭에 H9N2 바이러스를 비강으로 감염시킨 후 총배설장에서 분변과 함께 배출되는 바이러스를 측정하기위해 감염 5일 후에 멸균 면봉을 이용하여 총배설장 샘플을 swab하여 1.5ml의 멸균 PBS에 희석함.
- 희석된 바이러스는 30초간 vortexing 한 후 15000×g로 1분간 원심 분리 후 상층액 만을 취함.
- 분변 inhibitor가 포함된 상층액을 기존 membrane column 방식인 viral genespin, 국내 생산 high-throughput장비인 Exiprep과 수입 모델인 Promega TNA system을 통해서 비교하였음. 또한 상층액을 10-fold dilution을 실시하여 각각 RNA 추출 장비의 바이러스 희석에 따른 검출 정도의 상관성을 분석함.

	Exiprep	Viral gene	Promega TNA
1	22.90	22.73	26.01
2	27.49	28.10	28.13
3	30.46	32.06	29.81
4	33.94	35.03	33.92
5	36.99	39.02	39.06



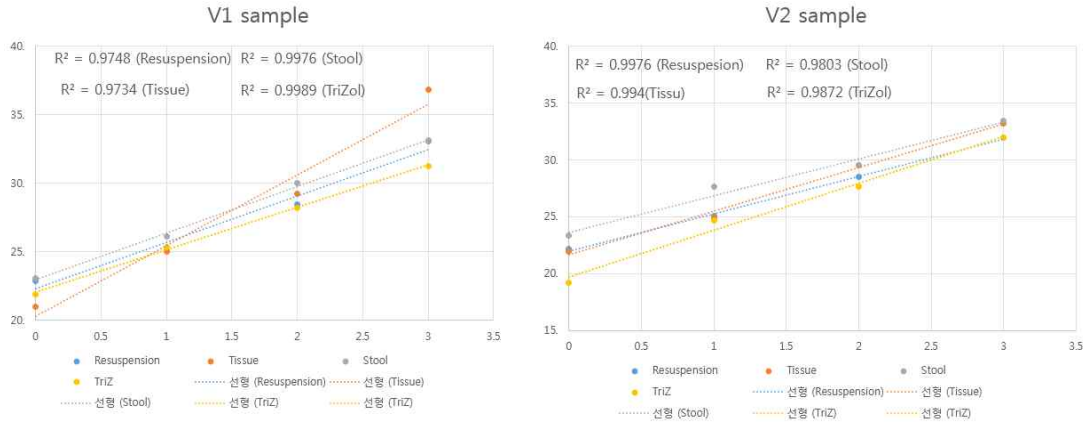
<그림 3-4. 분변 inhibitor 조건에서 RNA 추출장치 효율비교>

- 국내 생산 high-throughput장비인 Exiprep과 수입 모델인 Promega TNA를 비교하였음.
- 초기 샘플의 양이 Exiprep과 Promega TNA가 동일하게 400ul 입을 감안할 때 같은 조건의 Real time RT-PCR에서 Exiprep이 더 낮은 Ct값을 보였음. 이는 분변 조건의

샘플에서 기존 방식인 Viral gene spin(Intron)과 유사한 정도의 RNA 추출 및 inhibitor의 제거 능력을 나타낸다고 판단됨.

- 또한 회석에 따른 추세선 분석에도 Exiprep 장비가 가장 R<sup>2</sup>값이 1에 가까운 것을 확인하여 분변 inhibitor 조건에서도 바이러스의 정량적인 분석에 가장 적합함을 증명함.
- 본 결과에는 포함되지 않았으나 96개의 샘플을 동시에 처리 할 수 있는 Magmax(Life Technology)도 분변 inhibitor 조건에서 동일하게 비교시험을 하였으나, 민감도가 Exiprep과 Promgea TNA에 비해 떨어지는 것을 관찰 할 수 있었으며, 특히 샘플의 회석 후 Ct값의 추세선 분석에서 가장 상관관계 계수(R<sup>2</sup>)가 1에서 멀어짐을 확인함. 따라서 대량의 샘플 진단에 적합한 장비지만 민감도 및 특이도가 떨어지는 것으로 판단하고 제외시킴.
- 분변조건의 조류인플루엔자 바이러스는 특히 국내 유래 철새에서 조사되는 경우가 많이 있으며, 특히 고병원성 조류인플루엔자의 경우 샘플의 이동과정에서 오염이 발생할 수 있음.
- 따라서 분변 샘플의 불활화 과정이 함께 진행된 시료의 유전자 추출 및 real-time PCR 검출 효율 분석이 필요함.
- 본 연구에서 분변 샘플의 lysis buffer 조건에 따른 RNA 추출 및 real-time PCR 검출 효율을 비교하기 위해 총 4가지의 sample lysis buffer로 국내유행 저병원성 조류인플루엔자(H9N2) 검출 효율 분석을 실시하였고, RNA추출 및 real time RT-PCR 장비는 위의 결과를 토대로 Exiprep-Exicycler(Bioneer)장비를 이용함.

	V2					V2			
	Resuspension	Tissue	Stool	TriZ		Resuspension	Tissue	Stool	TriZ
0	22.91	21.02	23.1	21.93	0	22.2	21.96	23.32	19.24
1	25.09	25.04	26.15	25.33	1	25.04	24.93	27.67	24.72
2	28.44	29.26	30.04	28.23	2	28.49	29.51	29.56	27.69
3	33.05	36.83	33.11	31.29	3	32.	33.2	33.44	31.95
4	36.31	-	-	-	4	-	-	-	-
5	-	-	-	-	5	-	-	-	-



<그림 3-5. 분변 inhibitor 조건에서 lysis buffer에 따른 효율비교>

- 총 4가지(Resuspension buffer, Tissue lysis buffer, Stool lysis buffer, Trizol buffer) lysis buffer를 사용하였음.
- 분변 샘플 200ul와 위의 buffer 200ul를 혼합하고, 30초간 격렬하게 vortex 한 후 Exiprep 장비를 이용하여 RNA를 추출하였음.
- 2가지 분변샘플(V1, V2)에 대해서 Real time RT-PCR을 실시한 결과 Trizol 처리를 한 샘플이 가장 낮은 Ct값을 나타내어 높은 RNA 추출 효율 및 inhibitor의 제거 능력을 나타낸다고 판단됨.
- 또한 회석에 따른 추세선 분석은 V1 샘플에서는 Trizol을 처리한 샘플이 가장 상관관계 계수( $R^2$ )가 1에 가까웠고, V2 샘플에서는 suspension buffer, Tissue lysis buffer가 가장 1에 가까웠음.
- 위의 결과를 종합한 결과 lysis buffer 중에서 Trizol 처리가 가장 높은 민감도를 보였고, 샘플의 정량적인 분석에도 적합함을 증명하였음.

라. HPAI H5 subtype 검출용 real-time PCR design

- 2014년 1월 발생한 clade 2.3.4.4의 H5N8형 조류 인플루엔자 바이러스는 현재 미국 USDA의 E. Sparkman 등 연구진에 의해 개발된 H5 subtype 검출용 리얼타임 PCR에 민감도가 매우 낮은 것으로 확인됨.
- 현재 이용되고 있는 H5 subtype 검출용 real-time PCR의 낮은 민감도로 인해 현장 시료에서 바로 H5 subtype 검출이 불가능 하며, 종란집중을 통하여 바이러스의 배양 과정이 필요한 실정임.
- 본 연구팀은 고병원성 바이러스에 대한 real-time PCR의 검출효율 향상을 위해 최근 분리된 중국 유래 H5형 고병원성 조류 인플루엔자를 대상으로 새로운 primer 및

probe를 디자인 함.

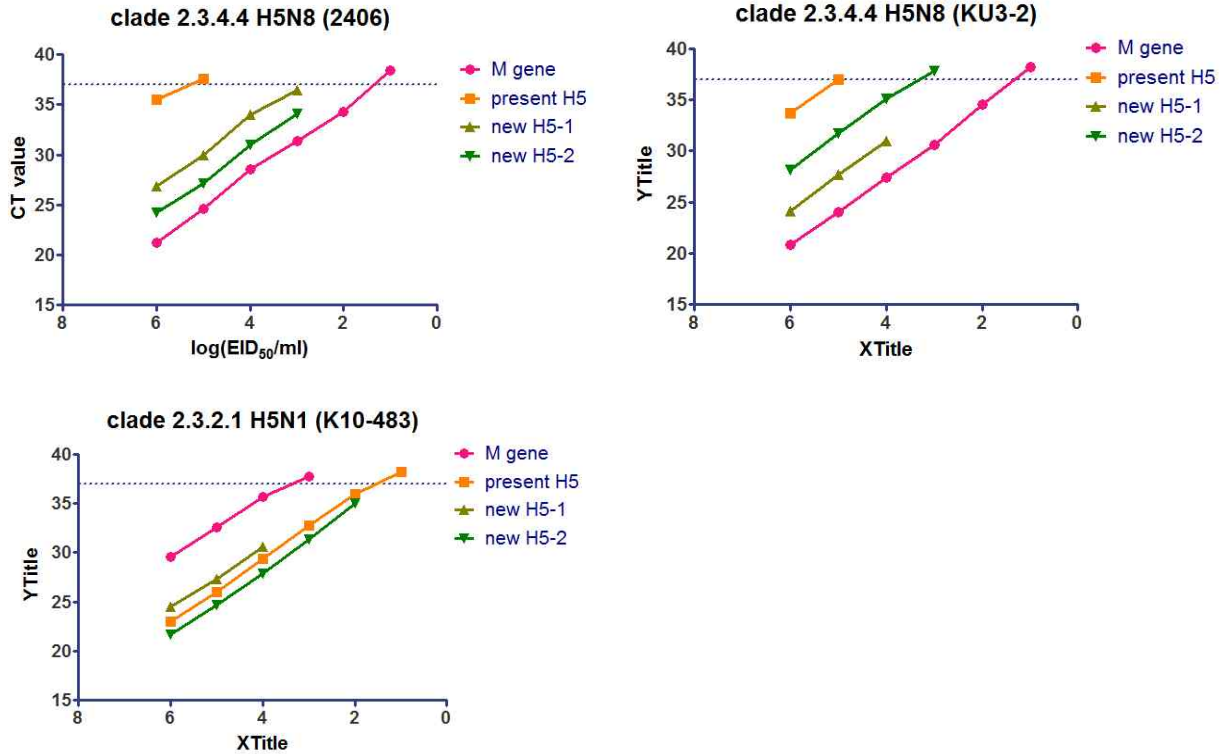
- 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스 약 1500개 sequence를 분석하여 고병원성 H5 subtype 검출용 primer 및 probe 5세트를 디자인 하여 평가를 진행함 (표 3-6).

표 3-6. 신규 H5 subtype 검출 용 real-time PCR primer, probe 선별

Name	Sequence	Strand	Position	Tm °C	Purification method	Modification
<b>Primer Set 1: Amplicon Size = 88</b>						
H5_1_82F	TCRACARAGCAGGTTGACAC	forward	82	60.03	HPLC	
H5_1_150R	GYTTCCCGTTGTGTGCTTT	reverse	150	60.16	HPLC	
H5_1_130p	CAYGCCCAAGACATACTGGA	forward	130	59.52	HPLC	5'Fam - 3'Tamra
<b>Primer Set 2: Amplicon Size = 90</b>						
H5_2_1607F	ATTCAACAGTGGCGAGYTCC	forward	1607	60.12	HPLC	
H5_2_1677R	TTCTGCACTGTAACGAYCCR	reverse	1677	60.11	HPLC	
H5_2_1637P	TAGACCAGCYAYTGATTG	reverse	1637	59.52	HPLC	5'Fam - 3'Tamra
<b>Primer Set 3: Amplicon Size = 96</b>						
H5_3_1423F	AATGCAAARGAGCTKGGTAA	forward	1423	59.71	HPLC	
H5_3_1499R	MGGGTAGTCATACGTYCCRT	reverse	1499	59.88	HPLC	
H5_3_1443P	YGGTTGTTTCGAGTTCTATCAC	forward	1443	58.77	HPLC	5'Fam - 3'Tamra
<b>Primer Set 4: Amplicon Size = 82</b>						
H5_4_1077F	ATGGCAGGGAATGGTAGAYG	forward	1077	59.77	HPLC	
H5_4_1139R	KGATTCTTTGTCTGCAGCGT	reverse	1139	60.41	HPLC	
H5_4_1104P	TGGGTAYCAYCAYAGCAAYG	forward	1104	59.27	HPLC	5'Fam - 3'Tamra
<b>Primer Set 5: Amplicon Size = 105</b>						
H5_5_130F	CAYGCCCAAGACATACTGGA	forward	130	59.52	HPLC	
H5_5_215R	GAGGAGCCATCCAGCTACAC	reverse	215	59.83	HPLC	
H5_5_150P	AAAGACACACAACGGGAARC	forward	150	60.16	HPLC	5'Fam - 3'Tamra

- clade 2.3.4.4 H5N8 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 간이 테스트를 진행하여 primer set 1 및 set 5 의 경우 높은 민감도를 나타내어 해당 primer, probe 세트를 이용하여 추가적인 실험을 진행함.

- 2010년 국내 발생 주인 clade 2.3.2.1 H5N1 바이러스 1종 (A/mandarin duck/Korea/K10-483/2010(H5N1)) 및 2014년 및 2015년 발생 clade 2.3.4.4 H5N8 바이러스 2종 (A/baikal teal/Korea/2406/2014(H5N8), A/mallard/Korea/KU3-2/2015(H5N8))을 대상으로 바이러스 농도 별 민감도를 인플루엔자 검출 용 M gene 세트 및 기존 H5 검출용 primer, probe 세트와 비교하여 측정하였으며 결과는 그림 10. 과 같음.



<그림 3-6. 선별 primer probe 셋트의 H5N1 및 H5N8 바이러스에 대한 민감도 비교 실험>

- 민감도 비교 실험 결과 clade 2.3.2.1 H5N1 바이러스의 경우 기존 H5 및 새로 디자인한 2개의 세트 모두 비슷한 민감도로 H5 subtype을 검출 가능한 것으로 확인됨.
- clade 2.3.4.4 H5N8을 대상으로 진행한 실험의 경우 기존 H5 검출용 rRT-PCR은 민감도가 매우 낮아 약  $10^5$ EID<sub>50</sub>/ml 이상의 고농도의 바이러스가 있을 경우에만 검출이 가능한 것으로 확인됨. 이에 비해 새로 디자인한 2개의 H5 검출용 rRT-PCR의 경우 약  $10^3$ EID<sub>50</sub>/ml의 상대적으로 적은양의 바이러스에서도 검출 가능한 것으로 확인되었음.
- 새로 디자인한 H5 rRT-PCR의 경우 실제 적용을 위하여 추가적인 검증작업을 수행할 예정임.

마. 종란 검역용 조류인플루엔자 real-time PCR의 조건 확립

- 종란 검역용 조류인플루엔자 real-time PCR 방법을 확립하기 위하여 난각 표면의 바이러스를 회수하는 방법을 비교 분석함.
- 0.1g의 닭 분변과 0.1ml의 저병원성 조류인플루엔자 H5N1 virus를 혼합한 후 PBS에 적셔놓은 면봉을 이용하여 난각에 도포함. 난각 표면의 바이러스를 회수하기 위하여 (1)난각표면을 PBS로 세척한 후 formalin-fixed RBC로 농축하는 방법, (2)난각표면을

swab하는 방법, (3)난각을 유제하는 방법을 비교함.

(1) 난각표면을 PBS로 세척한 후 formalin-fixed RBC로 농축하는 방법

- 계란을 지퍼백에 넣고 40ml의 PBS와 200 $\mu$ l의 10% formalin fixed RBC를 첨가한 후 가볍게 흔들어준 후 50ml tube로 옮겨 1800g, 20min으로 원심을 돌림. Supernatant를 제거 후 1.5ml PBS로 RBC pellet을 풀어 2ml e-tube로 옮김. 6000g, 3min으로 원심분리 후 230 $\mu$ l의 PBS에 재부유 함.

(2) 난각표면을 swab하는 방법

- PBS에 적셔진 면봉으로 난각을 닦은 후 1ml의 PBS가 들어있는 15ml conical tube에 넣고 vortexing, 원심 3000rpm, 10min 후 상층액 200ul을 사용함.

(3) 난각을 유제하는 방법

- 난각을 50ml conical tube에 넣고 유제한 후, PBS 5ml을 넣고 vortexing 후 원심 분리 (3000rpm, 10min)를 한 뒤 상층액 200 $\mu$ l을 사용함.
- 난각으로부터 회수된 바이러스의 RNA를 Qiagen사의 RNeasy minikit을 이용하여 추출하고 Real-time PCR을 수행하여 Ct value를 비교한 결과, 난각표면 swab법 > PBS세척액 formalin-fixed RBC 농축법 > 난각 유제법의 순서로 검출한계가 우수하였음. 그러므로, 난각표면 swab 후 유전자를 추출하여 Real-time PCR을 수행하는 방법이 가장 민감한 방법으로 확인되어 본 방법을 종란으로부터 바이러스 검출 방법으로 설정함 (표3-7, 8, 9).

표 3-7. PBS세척액 formalin-fixed RBC 농축 후 Real-time PCR 결과

도포 virus dose (logEID50/0.1ml)	계란 1	계란 2	계란 3
4	30.09	26.70	28.66
3	31.94	32.25	32.32
2	-	-	-
1	-	-	-
0	-	-	-
(-)	-	-	-

표 3-8. 난각표면 swab 후 Real-time PCR 결과

도포 virus dose (logEID50/0.1ml)	계란 1	계란 2	계란 3
4	28.50	27.77	29.58
3	32.35	32.11	32.49
2	32.18	-	34.15
1	-	-	34.62
0	-	-	-
(-)	-	-	-

표 3-9. 난각 유제 후 Real-time PCR 결과

도포 virus dose (logEID50/0.1ml)	계란 1	계란 2	계란 3
4	33.26	-	-
3	-	-	-
2	-	-	-
1	-	-	-
0	-	-	-
(-)	-	-	-

바. 육류로부터 조류인플루엔자 바이러스 검출방법 비교연구 (swab, wash, wash후 농축법)

- Real-time PCR을 이용한 조류인플루엔자 바이러스의 진단을 위하여 전 세계적으로 이용되고 있는 matrix 유전자를 대상으로 하는 검출법을 이용하여 real-time PCR 조건을 확립함.
- 0.1ml의 저병원성 조류 인플루엔자 H9N2 바이러스를 마이크로 피펫을 이용하여 계육(닭가슴살) 부위에 도포 후 15분간 건조하였으며, 이를 회수하기 위하여 (1)계육을 PBS와 함께 스토마커를 이용 분쇄하는 방법, (2)계육을 PBS와 함께 스토마커를 이용 분쇄 후 RBC로 농축하는 방법, (3)계육 표면을 swab하는 방법을 비교함.

(1) 계육을 PBS와 함께 스토마커를 이용 분쇄하는 방법

- 계육(닭가슴살)을 20ml의 PBS와 함께 지퍼백에 넣고 스토마커를 이용 분쇄 후 PBS를 50ml tube로 옮겨 3000rpm, 10분 원심분리 후 상층액 400ul를 RNA 추출에 이용함.

표 3-10. 계육을 PBS와 함께 스토마커를 이용 분쇄하는 방법의 Real-time PCR 결과 (Ct value)

도포 virus dose (logEID50/0.1ml)	계육 1	계육 2	계육 3
5	31.64	31.22	31.84
4	34.36	33.78	32.11
3	36.83	36.35	38.71
2	Undetermined	39.70	Undetermined

(2) 계육을 PBS와 함께 스토마커를 이용 분쇄 후 RBC로 농축하는 방법

- 계육(닭가슴살)을 20ml의 PBS와 함께 지퍼백에 넣고 스토마커를 이용 분쇄 후 PBS를 50ml tube로 옮겨 1200rpm, 5분 원심분리 후 상층액을 제거하고 1.5ml e-tube로 옮겨 다시 6000g 5분 원심분리 후 400ul PBS에 재부유 하여 RNA 추출에 이용함

표 3-11. 계육을 PBS와 함께 스토마커를 이용 분쇄 후 RBC로 농축하는 방법의 Real-time PCR 결과 (Ct value)

도포 virus dose (logEID50/0.1ml)	계육 1	계육 2	계육 3
5	33.43	33.24	33.49
4	36.09	33.65	34.86
3	37.71	Undetermined	Undetermined
2	Undetermined	Undetermined	Undetermined

(3) 계육 표면을 swab하는 방법

- PBS에 적셔진 면봉으로 계육을 닦은 후 1ml의 PBS가 들어있는 15ml conical tube에 넣고 vortexing 후 3000rpm, 10min 원심분리 하여 상층액 400ul을 사용함.

표 3-12. 계육 표면을 swab하는 방법의 Real-time PCR 결과 (Ct value)

도포 virus dose (logEID50/0.1ml)	계육 1	계육 2	계육 3
5	27.37	26.04	25.58
4	30.48	29.58	32.38
3	34.70	35.17	34.17
2	35.96	35.58	36.09

- 계육(닭가슴살)으로부터 회수된 바이러스의 RNA를 Bioneer사의 Exiprep™ 16 DX RNA 자동 추출 장비를 이용하여 RNA를 추출하고 Real-time PCR을 수행하여 Ct value를 비교한 결과, 계육 표면 swab법 > 계육 분쇄법 > 계육 분쇄 후 RBC 농축법의 순서로 검출한계가 우수하였음. 그러므로, 계육표면 swab 후 유전자를 추출하여 Real-time PCR을 수행하는 방법이 가장 민감한 방법으로 확인되어 본 방법을 종관으로부터 바이러스 검출 방법으로 설정함 (표 3-10, 11, 12).



### 3. 조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형별 유전자 분석

#### 가. 2010-2012년도 분리·보고된 조류인플루엔자 바이러스 유전자 분석

- H5형 조류인플루엔자의 검출을 위한 Probe를 최신 바이러스 유전정보를 기반으로 갱신하기 위하여 2010년-2011년에 유라시아 대륙에서 분리된 유전자 염기서열 217개를 alignment하고 염기서열 변화가 적은 부위를 분석하고 기타 subtype바이러스와 선정부위의 염기서열을 비교 분석을 하여 H5 detection probe를 제작함 (그림 3-7).

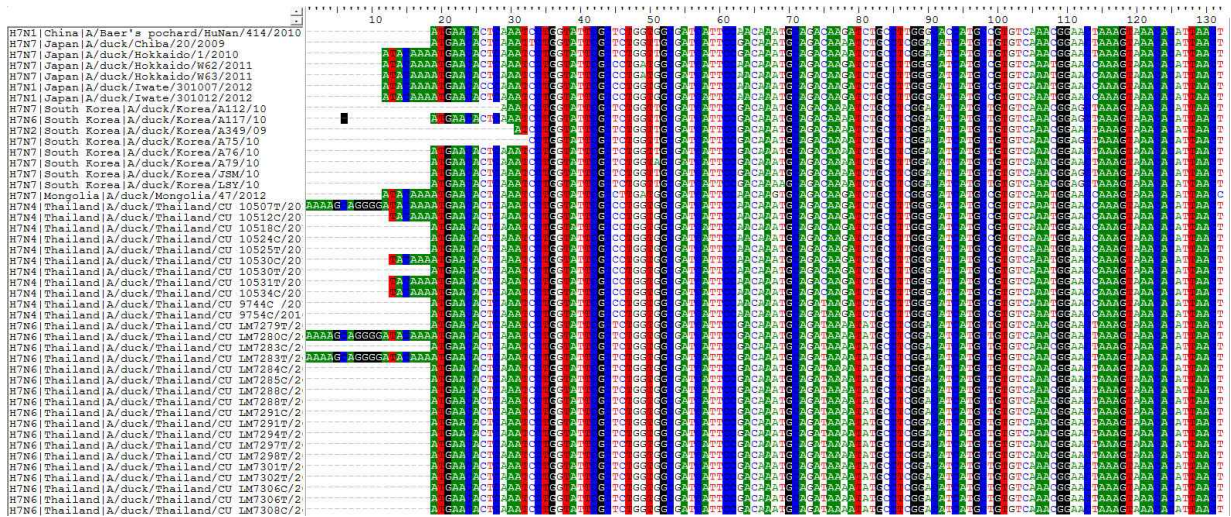
- 2010년 이후 유라시아 지역에서 분리되어 보고된 H5형 조류인플루엔자 바이러스의 HA gene에 대하여 phylogenetic analysis를 수행한 결과 HPAI clade 2.3.2.1 바이러스가 광범위하게 전파되고 있는 것을 확인함 (그림 3-10).



<그림 3-7. 2010-2011년 분리 H5형 조류인플루엔자 바이러스 분석, n=217>

- H7형 조류인플루엔자의 검출을 위한 Probe를 최신 바이러스 유전정보를 기반으로 갱신하기 위하여 2009년-2012년에 유라시아 대륙에서 분리된 유전자 염기서열 70개를 alignment하고 염기서열 변화가 적은 부위를 분석하고 기타 subtype바이러스와 선정부위의 염기서열을 비교 분석을 하여 H7 detection probe를 제작함 (그림 3-8).

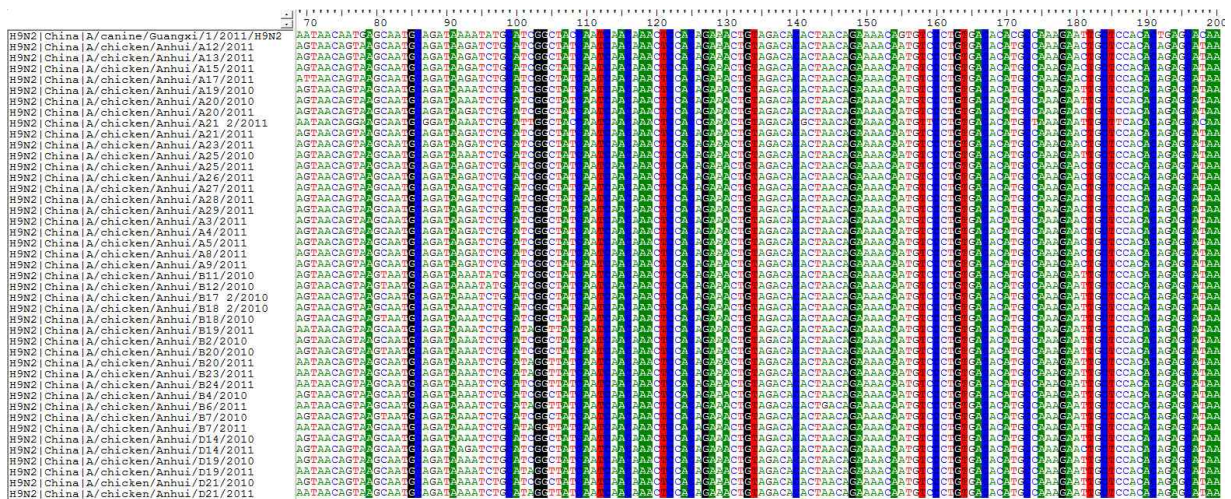
- 2010년 이후 유라시아 지역에서 분리되어 보고된 H7형 조류인플루엔자 바이러스의 HA gene에 대하여 phylogenetic analysis를 수행한 결과 2013년에 조류로부터 인간에게 전파된 다수의 H7N9형 바이러스가 중국지역에서 확인됨 (그림 3-11).



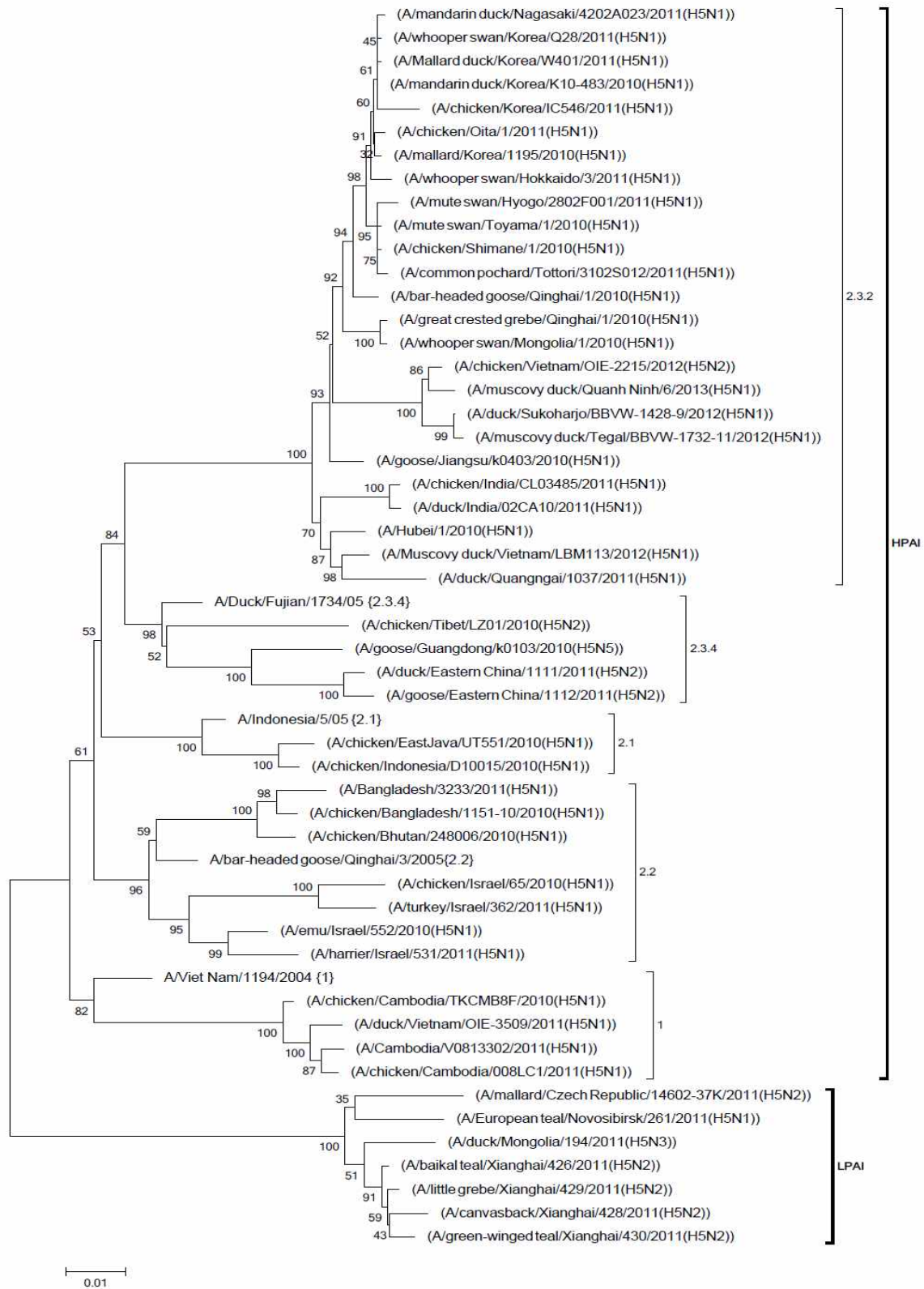
<그림 3-8. 2009-2012년 분리 H7형 조류인플루엔자 바이러스 분석, n=70>

- H9형 조류인플루엔자의 검출을 위한 Probe를 최신 바이러스 유전정보를 기반으로 갱신하기 위하여 2010년-2012년에 유라시아 대륙에서 분리된 유전자 염기서열 799개를 alignment하고 염기서열 변화가 적은 부위를 분석하고 기타 subtype바이러스와 선정 부위의 염기서열을 비교 분석을 하여 H9 detection probe를 제작함 (그림 3-9).

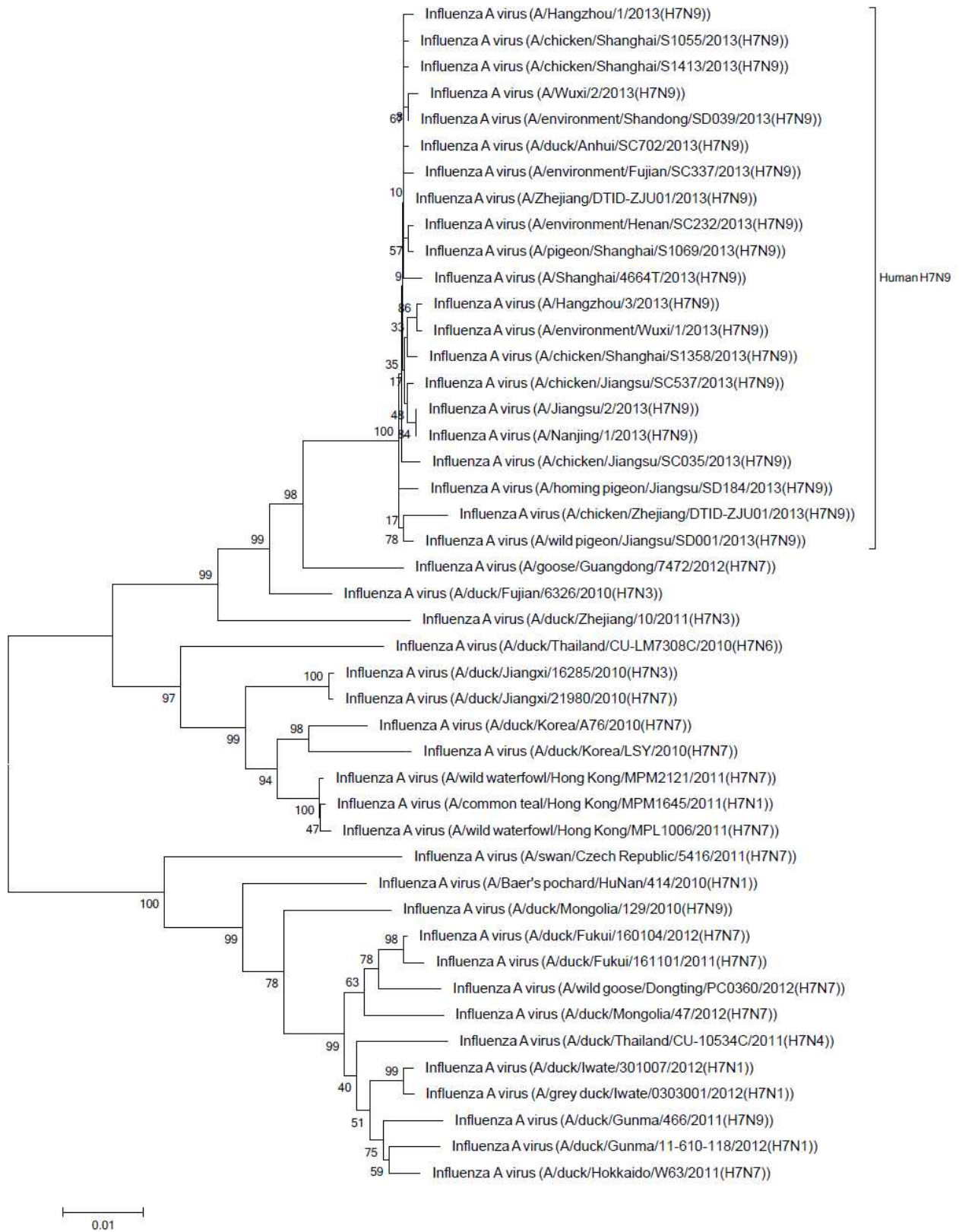
- 2010년 이후 유라시아 지역에서 분리되어 보고된 H9형 조류인플루엔자 바이러스의 HA gene에 대하여 phylogenetic analysis를 수행한 결과 Y280-lineage, Y439-lineage, G1-lineage 바이러스가 유럽 및 아시아 지역을 중심으로 전파되고 있는 것을 확인함 (그림 3-12).



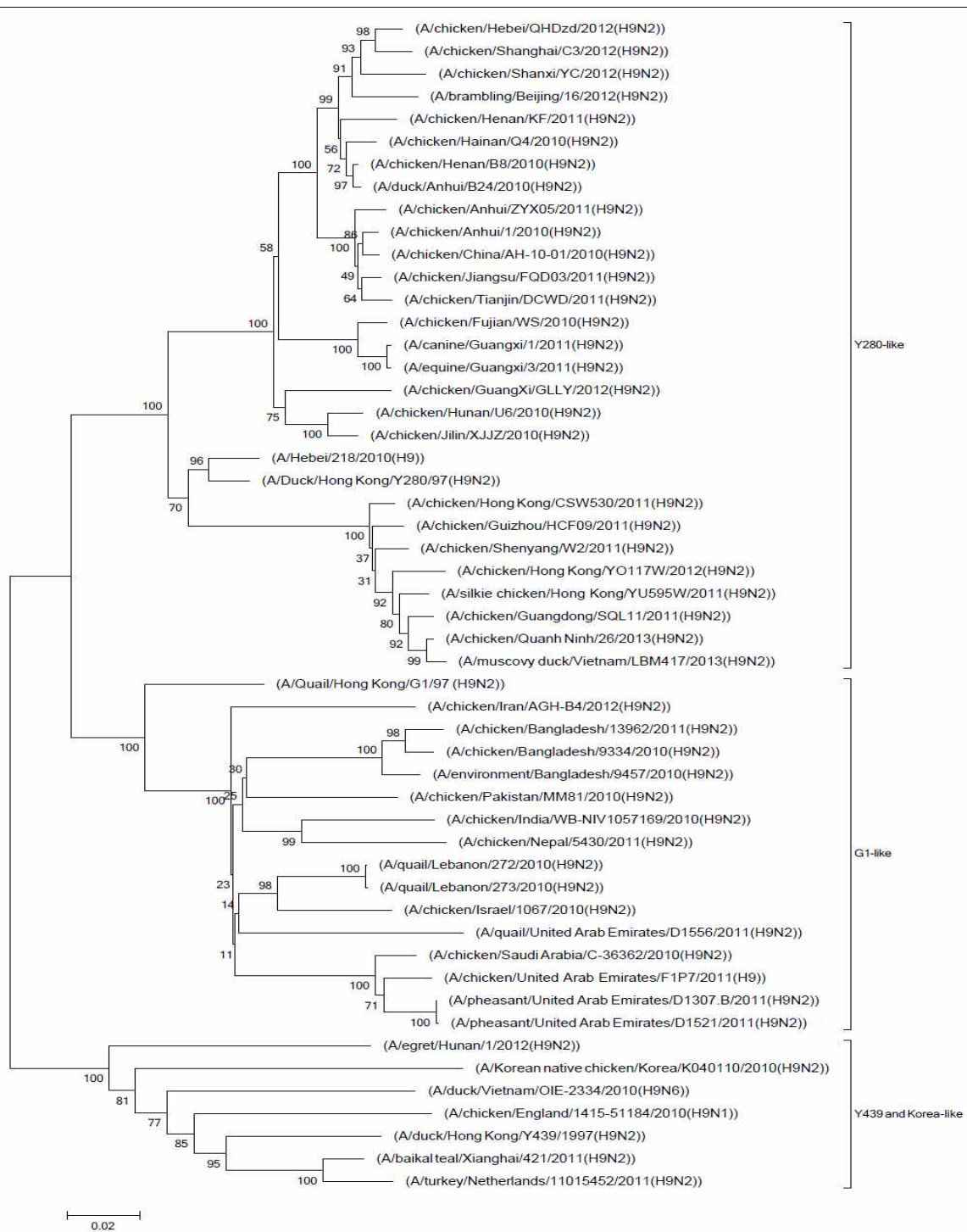
<그림 3-9. 2010-2012년 분리 H9형 조류인플루엔자 바이러스 분석, n=799>



<그림 3-10. 최근분리 H5형 조류인플루엔자 바이러스의 phylogenetic tree>



<그림 3-11. 최근분리 H7형 조류인플루엔자 바이러스의 phylogenetic tree>



<그림 3-12. 최근분리 H9형 조류인플루엔자 바이러스의 phylogenetic tree>

4. 현장형 조류 인플루엔자 검역 검출 장비 검출 효율 평가 및 조건 확립

가. 현장형 진단 장비의 연쇄효소중합반응 (PCR) 효율 확인

- 2세부에서 제작한 현장형 진단 장비 (3장 2절 8. 참조)의 인플루엔자 현장진단 적용 가능성 평가를 진행함.
- 현장형 진단 장비의 PCR 효율 확인을 위하여 2014년 발생 H5N8 균주를 이용하여 희석배수 별 PCR을 이용한 유전자 증폭 가능 여부를 확인하였으며, 결과는 표 11과 같음.

표 3-13. 현장형 유전자 증폭장치의 효율 평가 시험 결과

sample	Log(EID <sub>50</sub> /ml)	CT value	일반 장비 (Proflex)	현장형 장비
24016/2014 (H5N8)	0	38.14	-	-
	1	36.99	-	-
	2	33.49	-	-
	3	29.73	+	-
	4	26.34	+	+
	5	22.85	+	+
	6	19.45	++	++
	7	16.45	++	++

- 현장형 진단 장비의 경우 PCR 효율이 기존 Thermocycler (Proplex, Invitrogen) 제품을 이용한 경우보다 약 10배가량 민감도가 떨어지는 것으로 확인됨.
- 현장형 진단 장비의 경우 배양된 바이러스를 이용한 조건에서 10<sup>4</sup> EID<sub>50</sub>/ml 까지 검출 가능한 것으로 확인되어 동물의 swab 시료 등을 직접 이용하는 경우에는 진단이 가능한 것으로 확인됨.

나. 현장형 진단 장비용 one-step PCR 조건 확립

- 현장 진단의 편의성을 위하여 PCR 조건을 기존의 two-step PCR 조건에서 One-step PCR 조건을 확립하기로 함.
- One-step PCR의 경우 사용 키트와 대상 유전자의 조합에 따라 증폭효율이 달라지는 경향을 나타내어 4개의 One-step kit 를 이용하여 분변 시료 8건 및 바이러스 희석 시료 7건에 대한 인플루엔자 M gene 증폭 효율 변화를 확인하였으며 결과는 표 12와 같음.

표 3-14. 현장형 유전자 증폭장치의 효율 평가 시험 결과

type	sample	CT value	2-step PCR results	1-step PCR results			
				Qiagen	Enzynomics	Takara	Maxime
feces	216-1	31.98	-				
	263-5	31.19	-				
	265-1	22.39	+	-	-	+	-
	246	32.56	-				
	334	27.20	+	-	-	약+	-
	350	26.12	+	-	-	약+	-
	353	28.60	+	-	-	+	-
2406/ 2014 (dilution)	7	16.45	++	+	-	++	-
	6	19.45	++	+	-	+	-
	5	22.85	+	-	-	+	-
	4	26.34	+	-	-	-	-
	3	29.73	-	-	-	-	-
	2	33.49	-	-	-	-	-
	1	36.99	-	-	-	-	-

- 시험 결과 다른 One-step PCR M gene에 대한 증폭효율이 매우 낮은 것으로 확인되었으나 Takara사의 primescript 제품의 경우 현장진단용 장비에서 two-step PCR과 비슷한 수준의 M gene 증폭효율을 나타내었으며, 분변 샘플을 이용한 검사에서도 two-step PCR과 같은 양성률을 나타냄.
- 현장진단 장비의 적용 시 사용자의 전문성 및 편의성, 현장에서의 실험 진행 용이성 등을 고려하여 One-step PCR을 이용한 진단이 가능할 것으로 여겨짐.
- PCR을 기반으로한 진단 장비의 경우 특이도는 높으나 real-time PCR 및 종란접종법 대비 민감도는 낮아 양성 진단은 가능하나 음성 확진용으로 사용은 어려울 것으로 판단됨.
- M gene을 이용한 PCR 진단 방법은 현장에서 적용 가능한 가장 빠른 진단방법이며, 향후 본 과제를 통해 개발된 유전자칩을 이용한 subtype 및 pathotype의 구분과 함께 적용되어 4시간 이내의 조류 인플루엔자 진단 및 6시간 이내 고병원성 여부 진단이 가능함.

#### 5. 리얼타임 PCR이용 조류 인플루엔자 검역·검출 가이드라인 요약

- 샘플채취방법: 종란의 경우 PBS를 적신 면봉을 이용하여 종란의 표면 부분을 고루 swab 한다. 계육의 경우 PBS를 적신 면봉을 이용하여 계육의 표면을 충분히 swab 한다.
- 채취 샘플 처리 방법: swab 면봉의 끝 부분을 1ml PBS를 담은 tube에 넣어 약 1분간 vortexing을 실시한 후 원심분리 후 RNA 추출을 위한 상층액을 채취함.
- 자동화기기 이용 HTS 유전자 추출: 샘플의 수가 많은 경우 Bioneer사의 Exiprep 및 Roche사의 MagNA Pure 96등 자동화 추출장비를 이용하여 추출 가능함.
- 추출한 RNA는 본 과제를 통하여 개발된 primer, probe를 이용하여 real-time PCR 및 유전자칩을 검사를 통해 조류 인플루엔자, 주요 subtype 및 고병원성 여부를 확인한다.

## 2절 유전자 칩을 이용한 검역용 신속 AIV 검출시스템 개발

### 1. 조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형 감별 내수용 유전자 칩 제작

#### 가. 국내 조류인플루엔자 바이러스 주요 혈청형별 유전자 분석

- 제 1세부과제로부터 보유한 2010-2012년도 분리 보고된 조류 인플루엔자 바이러스의 유전자 분석결과 H5형의 경우 국내 분리주와 일본 분리주가 높은 유사도를 보인 반면 중국을 포함한 다른 분리주와는 상당한 유전적 변이를 보임 (그림 3-13)



그림 3-13. 국가별 H5형 조류인플루엔자 바이러스 유전자 비교

- H7형은 H5형과는 달리 일본을 포함한 다른 나라의 분리주와 상당한 유전적 변이를 보임(그림 3-14)

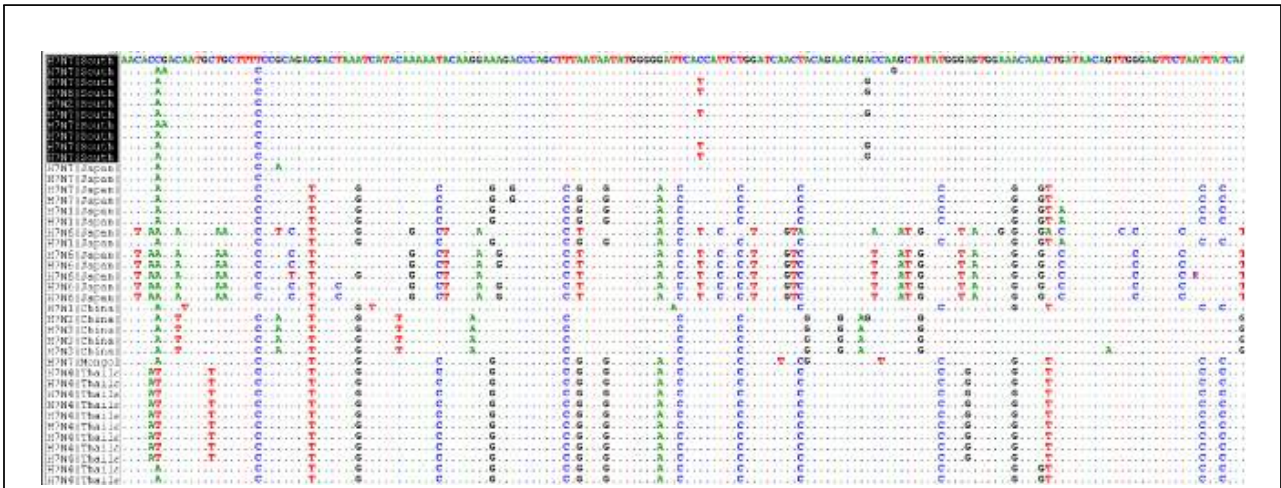


그림 3-14. 국가별 H7형 조류인플루엔자 바이러스 유전자 비교

- H9형의 경우도 H7형과 같이 국내 분리주와 다른 나라의 분리주 사이에 상당한 유전적 변이를 보임 (그림 3-15)





그림 3-15. 국가별 H9형 조류인플루엔자 바이러스 유전자 비교

- 기존 제 1세부과제에서 보유하고 있던 조류인플루엔자 바이러스의 유전자와 새롭게 추가 분리 보고된 조류인플루엔자 바이러스의 유전자 분석 결과, 기존의 조류인플루엔자 바이러스와 추가 분리된 조류인플루엔자 바이러스 상의 상당한 유전적 변이를 보임 (그림 3-16)
- H7형과 H9형의 경우도 H5형과 마찬가지로 기존의 조류인플루엔자 바이러스와 추가 분리된 조류인플루엔자 바이러스 상의 상당한 유전적 변이를 보임



그림 3-16. 기존 H5형과 추가 분리된 H5형 조류인플루엔자 바이러스 유전자 비교

나. 국내 주요 혈청형별 특이적 probe 설계

- 1차년도에 조류인플루엔자 바이러스의 혈청형별 유전자 분석결과를 바탕으로 선행연구결과에서 도출된 특이 probe의 새롭게 추가 분리된 국내 분리주에 특이적인 probe를 혈청형 별로 보완 및 추가설계 함

- 2차년도 의 유효성 평가 및 보완을 통하여 최종적으로 52개의 specific probe를 선정함  
(표 3-15)

표 3-15. 국내 주요 혈청형별 특이적 probe information			
Index	Name	Sequence (5'-3')	Target
1	H5-01	CARCTTAGGGATAATGCAAA	H5
2	H5-02	ATAAACTCTAGTATGCCATTCCACA	
3	H5-03	TGAAACACCTATTGAGCRGA	
4	H5-04	AGTGTAGCKGGATGGCTHC	
5	H5-05	ACYCAAAAGGCAATAGAYGG	
6	H5-06	CARCTTARGGATAATGCAA	
7	H5-07	CARCTTARGGATAATGCAAA	
8	H5-08	ACYCAAAAGGCAATAGAYGG	
9	H5-09	GAAACACCTATTGAGCAGG	
10	H5-10	AGTGTAGCGGGATGGCTCC	
11	H5-11	ACTCAAAAGGCAATAGACGG	
12	H5-12	CYGCTTAAGGATAATGCARA	
13	H7-01	AATGCTGAAGAAGATGGVAC	H7
14	H7-02	CAATGTGACCAATTCCTAGAA	
15	H7-03	GRAGAAGCTCTGAGGCAAAT	
16	H7-04	AAYGCYGAAGAAGATGGVAC	
17	H7-05	GRARAASCTCTGAGGCARAT	
18	H9-01	CDACTGTCGCCTCATCTCT	H9
19	H9-02	ATTTATTCGACTGTTCGCCTC	
20	H9-03	ACTGTTCGCCTCATCTCTTGT	
21	H9-04	CDACYGTCGCCTCATCTCT	
22	H9-05	ATTTATTCGACYGTCGCCTC	
23	HPAI-01	AGAAGAAAAAAGAGAGGACTTTTT	HPAI (고위험군)
24	HPAI-02	GAAGAAAAAAGAGAGGGCTATTT	
25	HPAI-03	AGAAGAAGAAAAAGAGGACTATTT	
26	HPAI-04	GAAGAAGAAGAAAGAGAGGACTATTT	
27	HPAI-05	GAAGAAGAAAAAGAGGACTGTTT	
28	HPAI-06	GAAGAAGAAAAAGAGGACTGTTTGG	
29	HPAI-07	GAAGAAAAAGAGGACTGTTTGGAGC	
30	HPAI-08	GAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGGAC	
31	HPAI-09	AAGAAGAAAAAAGAGAGGAYTATTT	
32	HPAI-10	AGAAGAAGAAAAAGAGGACTRTTT	
33	HPAI-11	CAAAGAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGGA	
34	HPAI-12	CAAAGGGAGAGAAGAAGAAAAAGAGGA	
35	HPAI-13	CTAAGAGAGAAGAGAAGAAAAAGAGGA	
36	HPAI-14	TAGAGGGAAGAAGAAGAAAAAGAGGACT	
37	HPAI-15	TAGAGAGAAGAAGAAGAAAAAGGGGACT	
38	HPAI-16	GAGAGAAAAGAAGAAAAAARAGAGGACT	
39	HPAI-17	GAGAGGGAAGAAGAAAAAAGAGAGGA	
40	HPAI-18	GRGRRARRAGAAGAAAAAGAGGAYTRTTT	
41	HPAI-19	GAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGGACTGTTT	
42	HPAI-20	GAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGGATTGTTT	
43	HPAI-21	GAGAGAAGAGAAGAAAAAGAGGACTATTT	
44	HPAI-22	GAGAAAAGAGAAGAAAAAGAGGACTGTTT	
45	HPAI-23	GAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGGATTATTT	
46	HPAI-24	GGGAGAGAAGAAGAAAAAGAGGACTGTTT	
47	HPAI-25	AGGGAAGAAGAAGAAAAAGAGGACTATTT	
48	HPAI-26	AGAGAAGAAGAAGAAAAAGGGGACTGTTT	

49	LP AI-01	CAAAGAGAAACAAGAGGACTATTC	LP AI (저위험군) M gene
50	LP AI-02	TCAAAGAGAAACAAGAGGACTATTT	
51	LP AI-03	CCTCAAAGAGAAACAAGAGGACTATTT	
52	PC	GGARTGGYTWAAGACAAGACCWATY	

2. 특이적 probe를 이용한 주요 혈청형 감별 내수용 유전자 칩 제작 및 실험조건 확립

가. 유전자 증폭조건 확립

- 1차년도에 제 1세부과제로부터 제공받은 기존 (2010년 이전) 시료를 사용하여 HA gene 및 positive control로 사용되는 M gene의 PCR증폭 조건을 검증함

- 1차년도에서 사용된 HA gene primer를 보완하기 위하여 2차년도에 primer를 추가 설계하여 제 1세부과제에서 종란에 접종하여 분리한 분리주를 이용하여 PCR증폭조건을 보완함 (표 3-16,17,18,19)

Target	Primer Name	Sequence (5' - 3')
HA gene	HA-F	AGCAAAAGCAGGGG
	HA-R	Cy3-AGTAGAAACAAGGGTGTTTT
	HP/LPAI-F	GGAAAYTTYATTGCTCCAG
	HP/LPAI-R	Cy3- TAGAGTYCTCTCATTTTCCAT
M gene	AI PC - F	Cy3-AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTGC
	AI PC - R	Cy3-CACTKGGCACGGTGAGC

Template	2X pre-mix	HA-F (10pmole/ul)	HA-R (10pmole/ul)	HP/LPAI-F (10pmole/ul)	HP/LPAI-R (10pmole/ul)	D.W	Total
1ul	10ul	0.5ul	0.5ul	0.25ul	0.25ul	7.5ul	20ul

Template	2X pre-mix	AI PC-F (10pmole/ul)	AI PC-R (10pmole/ul)	D.W	Total
1ul	10ul	0.125ul	0.125ul	8.75ul	20ul

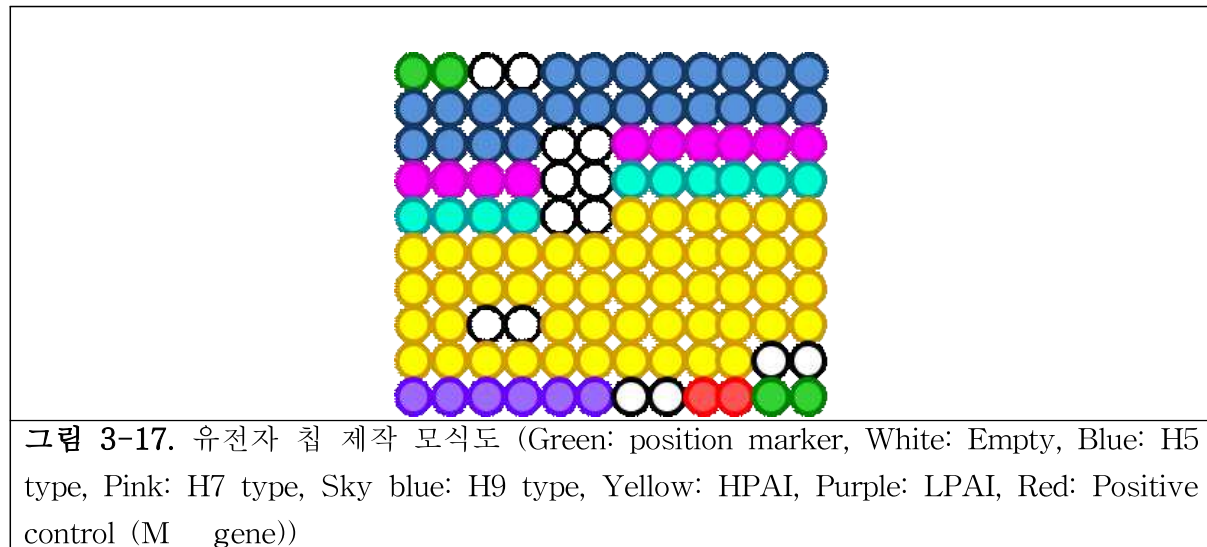
온도	95℃	95℃	57℃	72℃	72℃
시간	5 min	1 min	1 min	1.5 min	10 min
Cycle	40cycle				

나. 조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형 감별 내수용 유전자 칩 설계

- Position marker와 blank를 포함한 60개의 probe로 구성된 유전자 칩을 설계함 (표 3-20)

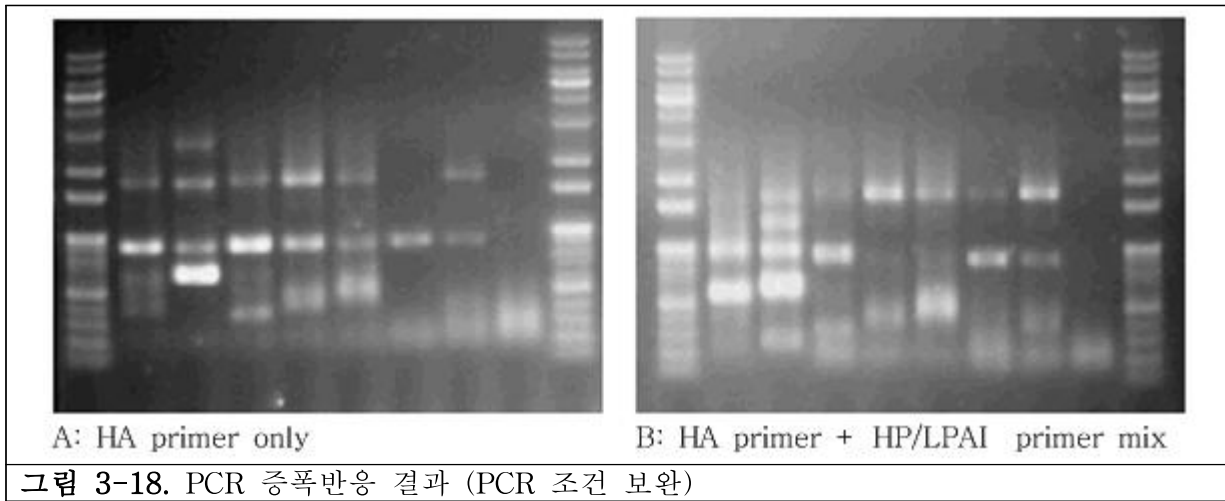
- 모든 특이적 probe는 2번 반복해서 slide glass위에 spotting을 하여, 총 120개의 spot으로 제작됨 (그림 3-17)

Index	Probe_Name	Index	Probe_Name	Index	Probe_Name	Index	Probe_Name
1	Position	16	H7-01	31	HPAI-04	46	HPAI-18
2	Empty	17	H7-02	32	HPAI-05	47	HPAI-19
3	H5-01	18	H7-03	33	HPAI-06	48	HPAI-20
4	H5-02	19	H7-04	34	HPAI-07	49	HPAI-21
5	H5-03	20	H7-05	35	HPAI-08	50	HPAI-22
6	H5-04	21	Empty	36	HPAI-09	51	HPAI-23
7	H5-05	22	H9-01	37	HPAI-10	52	HPAI-24
8	H5-06	23	H9-02	38	HPAI-11	53	HPAI-25
9	H5-07	24	H9-03	39	HPAI-12	54	HPAI-26
10	H5-08	25	H9-04	40	HPAI-13	55	Empty
11	H5-09	26	H9-05	41	HPAI-14	56	LPAI-01
12	H5-10	27	Empty	42	HPAI-15	57	LPAI-02
13	H5-11	28	HPAI-01	43	HPAI-16	58	LPAI-03
14	H5-12	29	HPAI-02	44	Empty	59	Empty
15	Empty	30	HPAI-03	45	HPAI-17	60	Position



다. PCR 증폭 및 유전자 칩 교잡반응 실험결과

- 2차년도에서 보완된 PCR 증폭 조성 및 조건으로 PCR 증폭과 유전자 칩 교잡반응 실험을 진행한 결과 1차년도에 비해 상향된 결과를 확인함 (그림 3-18, 19)





3. 제작된 유전자 칩을 이용한 내수용 시제품 국내 임상시험 및 유효성 검증 결과

가. 2010년 이전 시료를 이용한 유전자 칩 실험 조건 확립

- 1차년도에 제작된 내수용 유전자 칩을 이용하여, 선행연구결과의 혈청형별 probe와 보완/추가된 probe를 바탕으로 1차 유전자 칩을 제작하고, 기존 시료를 사용하여 유전자 칩의 실험조건을 검증함 (그림 3-20)

- 각 혈청형에 따른 특이 probe의 반응을 확인할 수 있었으며, 총 63개의 시료를 사용하여 유전자 칩 결과를 도출하였으며, 5개의 시료의 경우, 유전자 증폭단계에서 증폭반

응이 일어나지 않아 혈청형별 특이 probe에 반응하지 않음.

- 총 63개의 시료 분석결과 H5, H7 및 H9 이외의 혈청형은 모두 반응하지 않았으며, 28개의 H5, H7 및 H9 시료(H5 13, H7 8, H9 7) 중 5개 (H9 3종, H5 1종, H7 1종) 시료의 경우 각 혈청형 특이 프로브와 반응하지 않는 것으로 확인됨. 나머지 23개의 시료는 모두 각각의 혈청형 특이 probe와 반응함.
- 이 결과를 바탕으로 1차 유전자 칩의 프로브 조성 및 실험조건 계획을 수립함. (표 3-20)

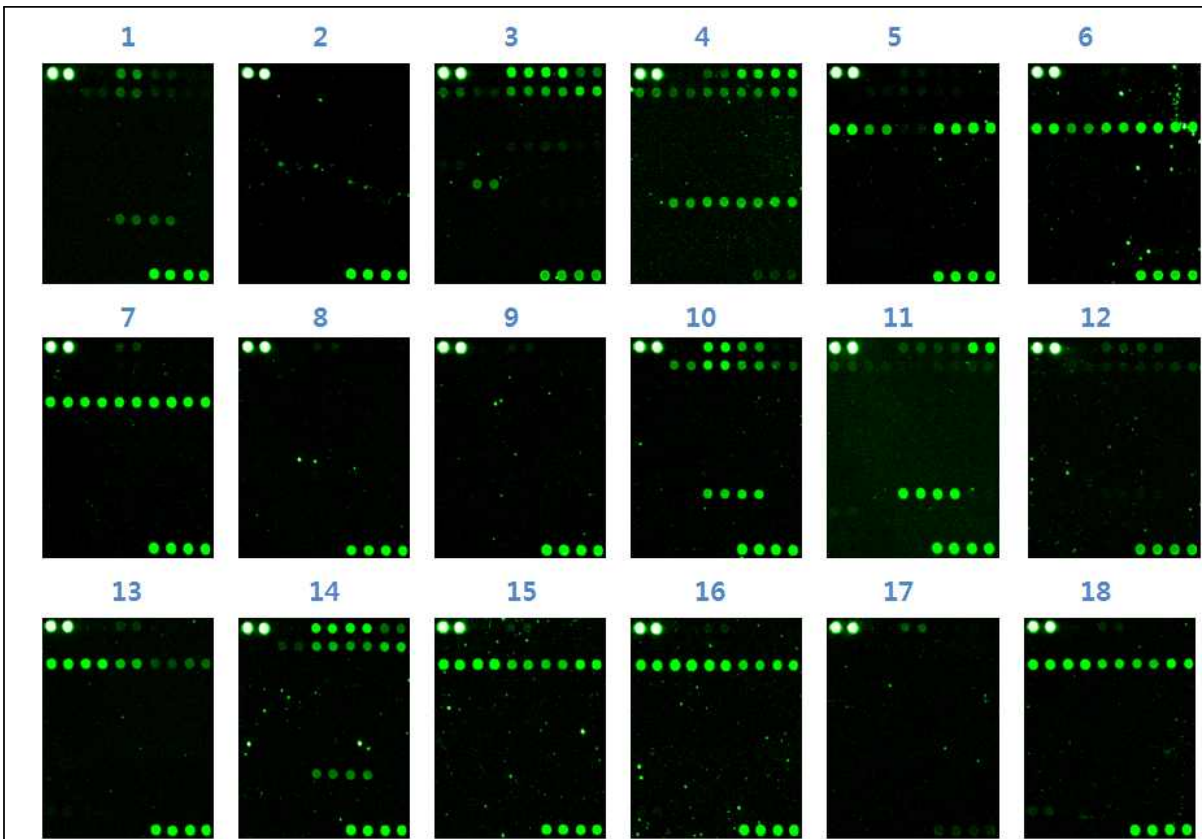


그림 3-20. 2010년 이전시료를 이용한 유전자 칩 교잡반응 결과 (일부, 유전자 칩 실험조건 확립)

표 3-20. 2010년 이전시료를 이용한 유전자칩 실험 결과

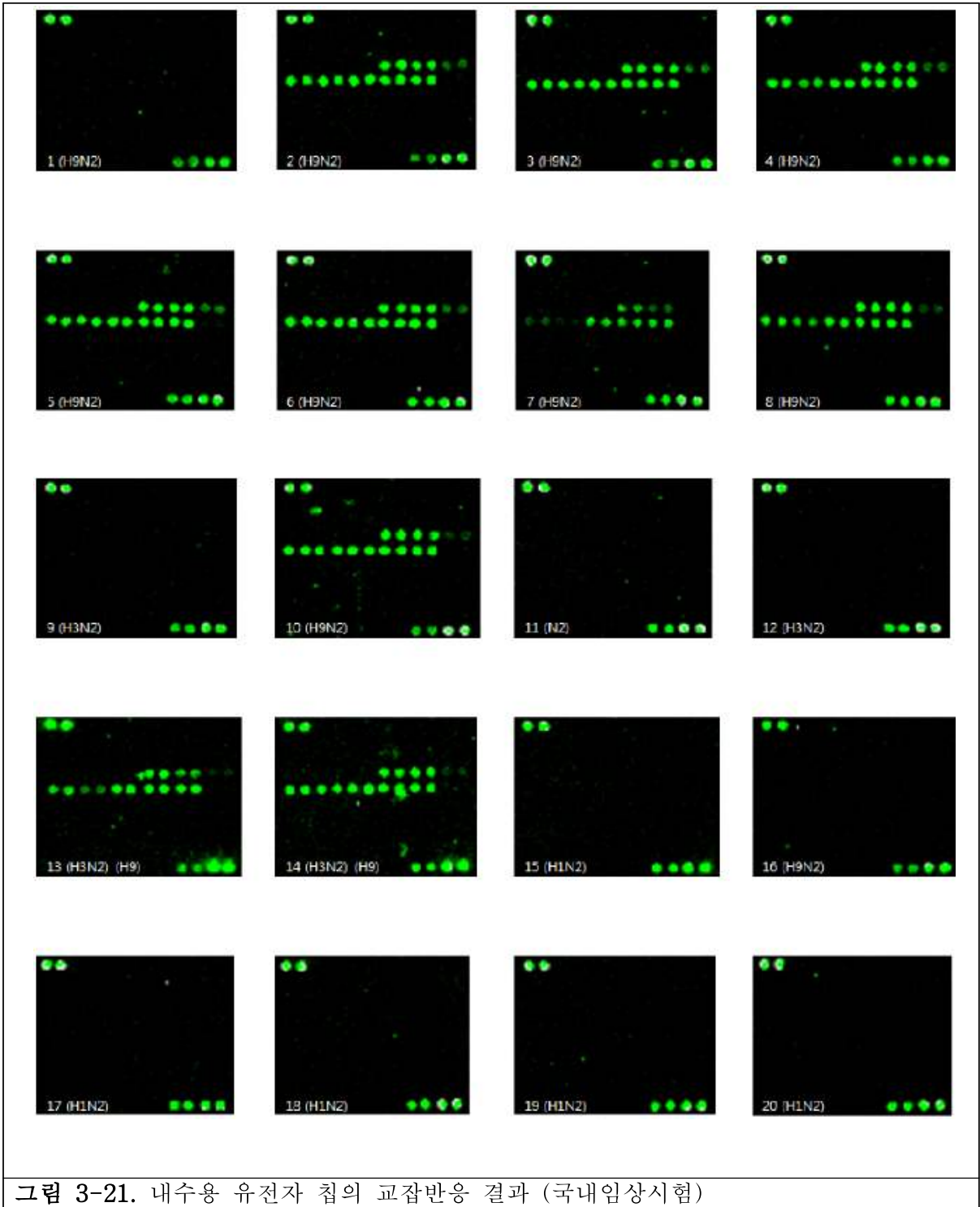
Index	Sample	HA	H/LPAI	Index	Sample	HA	H/LPAI
1	662(H5N1)	H5	LPAI	33	479(H4N6)	-	-
2	PR/8(H1N1)	-	-	34	481(H4N6)	-	-
3	IS/06(H5N1)	H5	HPAI	35	525(H4N6)	-	-
4	GJ/08(H5N1)	H5	HPAI	36	543-1(H4N6)	-	-
5	09-65(H9N2)	H9	-	37	07-1621(H9N2)	X	X
6	09-92(H9N2)	H9	-	38	07-78(H3N2)	-	-
7	09-230(H9N2)	H9	-	39	N09-159T(H9N2)	X	X
8	09-236(H9N2)	X	X	40	665(H4N6)	-	-
9	09-237(H6N2)	-	-	41	544(H4N6)	-	-

10	08-683(H5N2)	H5	LPAI	42	8G-46(H6N5)	-	-
11	09-652(H5N2)	H5	LPAI	43	ag-53(H12N5)	-	-
12	8-G9(H5N2)	H5	LPAI	44	8G5(H6N5)	-	-
13	SH21(H7N3)	H7	-	45	6D2(H6N5)	-	-
14	SH61(H5N3)	H5	LPAI	46	522(H4N6)	-	-
15	SH20-17(H7N3)	H7	-	47	634(H5N2)	H5	LPAI
16	BC10(H7N3)	H7	-	48	17-7(H4N6)	-	-
17	SH17-1(H2N3)	-	-	49	7D19(H4N6)	-	-
18	SD175(H7N3)	H7	LPAI	50	71(H7N8)	H7	-
19	K08-679(H8N4)	-	-	51	11(H7N7)	X	X
20	08-729(H1N5)	-	-	52	8-D36(H5N2)	H5	LPAI
21	187(H4N6)	-	-	53	A17(H5N8)	H5	LPAI
22	638(H4N6)	-	-	54	B14(H6N1)	-	-
23	21-107(H4N6)	-	-	55	AG63(H5N2)	H5	LPAI
24	21-131(H4N6)	-	-	56	K08-121(H5N2)	H5	LPAI
25	17-45(H4N6)	-	-	57	AG33(H5N2)	H5	LPAI
26	MHC5-8(H7N7)	H7	LPAI	58	08436(H5N1)	X	X
27	GH170(H7N7)	H7	LPAI	59	12c3(H2N8)	-	-
28	518(H3N8)	-	-	60	K09-821(H4N6)	-	-
29	12c3(H2N8)	-	-	61	08-453(H9N2)	H9	-
30	6-D1(H3N8)	-	-	62	448(H3N2)	-	-
31	7D10(H4N6)	-	-	63	8G50(H3N8)	-	-
32	476(H4N6)	-	-				

나. 조류인플루엔자 주요 혈청형 감별 유전자 칩의 내수용 국내임상시험

- PCR primer, PCR 증폭조성 및 조건은 1차 유전자 칩 실험조건 확립단계의 조건과 동일하게 수행하였고, 유전자 칩 실험조건 확립에 사용한 1차 유전자 칩의 보완을 위해 혈청형별 특이 probe 및 고/저위험군을 검출할 수 있는 특이 probe를 추가 설계하여 2차 유전자 칩 probe를 구성함
- 최신 분리주를 이용한 실험실 내 효능시험을 통한 주요 혈청형 감별 내수용 유전자 칩의 검증을 위해 제1세부과제에서 최근 분리주 42개 시료를 확보하였고, 임상시험을 수행함 (그림 3-21, 표 3-21)
- 최신 분리주를 이용한 국내임상시험 결과, 기존 non-target type으로 분리된 2개의 시료가 H9형으로 검출됨. 또한 기존 H9형으로 분리된 2개의 시료 (1개 시료는 PCR 증폭반응이 일어나지 않음)가 H9형 특이 probe에서 반응을 하지 않음. 2개 시료를 제외한 40개의 시료에서 모두 H5, H7, H9형 바이러스의 혈청형을 구분함.
- 재래시장 유래 H3N2 시료 2건의 경우 (N12-036, N13-010) H9 특이 프로브에 반응함. 이 시료의 경우 확인 결과 H3 및 H9 바이러스가 혼합 감염된 시료인 것으로 확인됨. 이러한 결과는 본 과제를 통해 개발된 유전자 칩의 경우 혼합된 시료에서 기존 검출방법 보다 우수한 성능을 보일 수 있음을 나타냄.





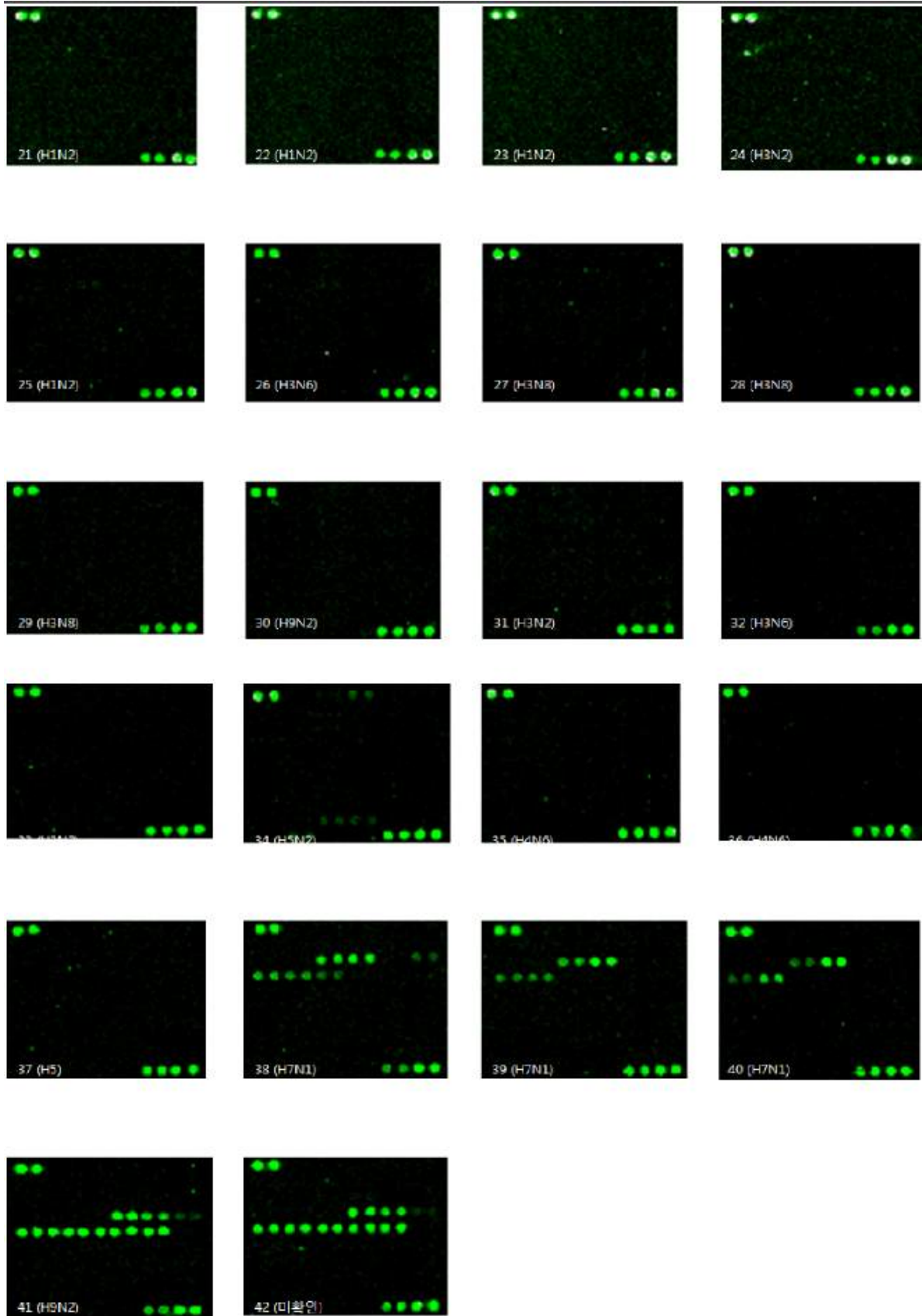


그림 3-21. 내수용 유전자 칩의 교잡반응 결과 (국내임상시험) - 계속

**표 3-21. 국내 임상시료를 이용한 유전자칩 실험 결과**

Index	Sample	HA	H/LPAI	Index	Sample	HA	H/LPAI
1	N11-86 (H9N2)	H9	-	22	ENV2-24 (H1N2)	-	-
2	N11-87 (H9N2)	H9	-	23	ENV2-26 (H1N2)	-	-
3	N12-004 (H9N2)	H9	-	24	ENV2-29 (H1N2)	-	-
4	N12-005 (H9N2)	H9	-	25	ENV2-35 (H1N2)	-	-
5	N12-008 (H9N2)	H9	-	26	K11-147 (H3N6)	-	-
6	N12-012 (H9N2)	H9	-	27	K11-155 (H3N6)	-	-
7	N12-013 (H9N2)	H9	-	28	K11-164 (H3N6)	-	-
8	N12-014 (H9N2)	H9	-	29	K11-166 (H3N6)	-	-
9	N12-015 (H3N2)	-	-	30	K11-220 (H9N2)	X	-
10	N12-030 (H9N2)	H9	-	31	K11-230 (H3N2)	-	-
11	N12-032 (N2)	-	-	32	K11-231 (H3N6)	-	-
12	N12-034 (H3N2)	-	-	33	K11-232 (H3N2)	-	-
13	N12-036 (H3N2)	H9 (X)	-	34	K11-243 (H5N2)	H5	LPAI
14	N13-010 (H3N2)	H9 (X)	-	35	K11-291 (H4N6)	-	-
15	N13-011 (H1N2)	-	-	36	K11-293 (H4N6)	-	-
16	N13-008 (H9N2)	X	-	37	K11-310 (H5)	H5	X
17	ENV11-115 (H1N2)	-	-	38	K12-162 (H7N1)	H7	LPAI
18	ENV11-117 (H1N2)	-	-	39	K12-203 (H7N1)	H7	LPAI
19	ENV11-129 (H1N2)	-	-	40	K12-207 (H7N1)	H7	LPAI
20	ENV11-135 (H1N2)	-	-	41	K12-255 (H9N2)	H9	-
21	ENV11-141 (H1N2)	-	-	42	K12-256 (unknown)	H9	-

다. 국내 현장시료를 통한 내수용 유전자 칩의 유효성 평가 및 보완

- 국내임상시험 결과를 바탕으로 2차년도에 보다 정확한 특이 probe의 검증을 위해 국내 현장시료를 포함한 많은 시료를 이용하여 유전자 교잡반응을 진행하였으며, PCR 증폭 조성 및 조건과 혈청형별 특이 probe를 추가 설계 및 보완하여 내수용 유전자 칩의 최종 probe를 구성함
- 내수용 유전자 칩 보완을 위해 제1세부과제에서 바이러스 시료 및 현장시료 (plasmid DNA 포함) 98개 시료를 확보하였고, 유전자 칩 시험을 수행함 (그림 3-22, 표 3-22)
- 유전자 칩의 유효성 평가를 위해 기간별 검증 (그림 3-23)

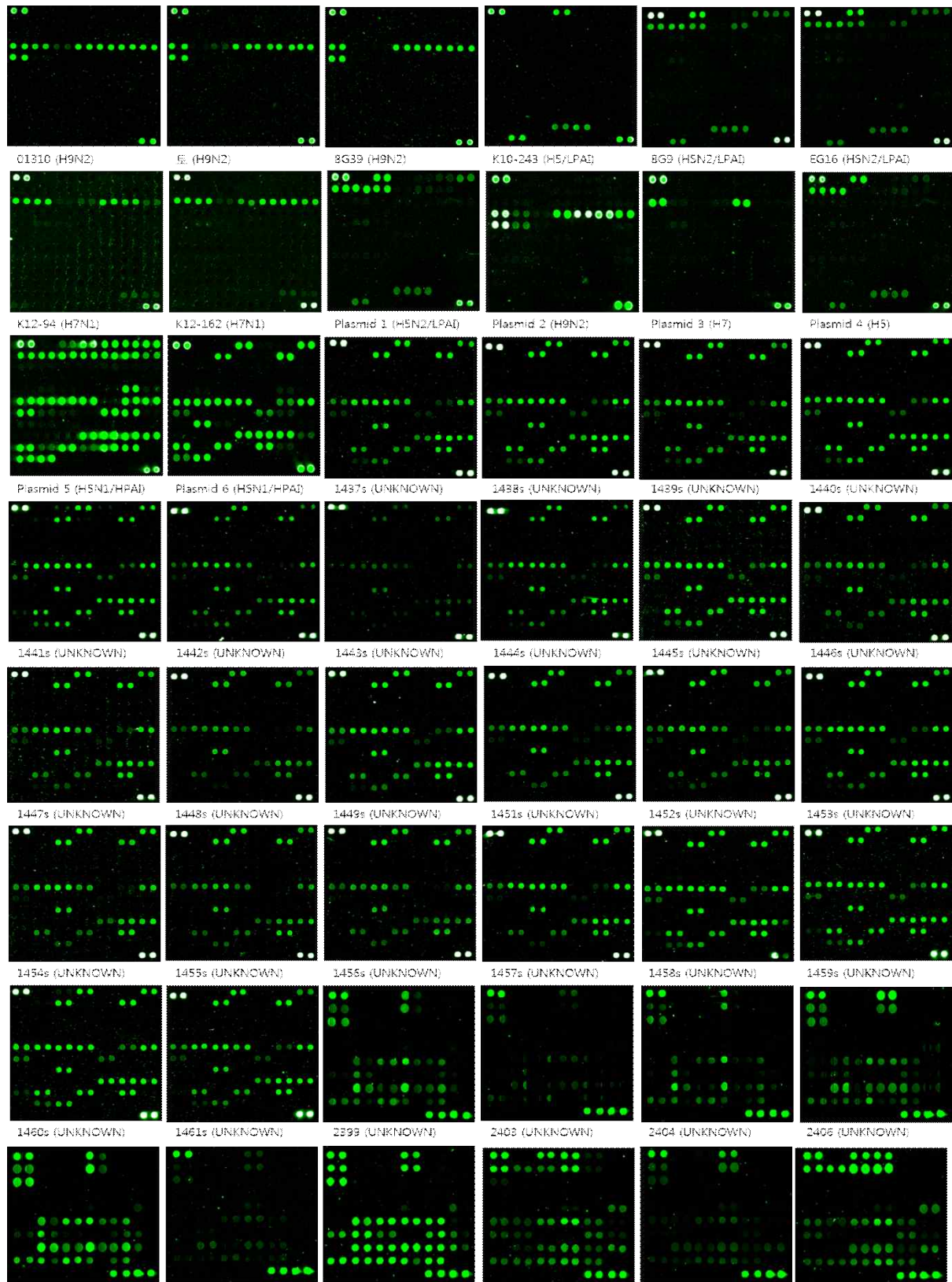


그림 3-22. 내수용 유전자 칩의 교잡반응 결과 (유효성 평가 및 보완) - 계속

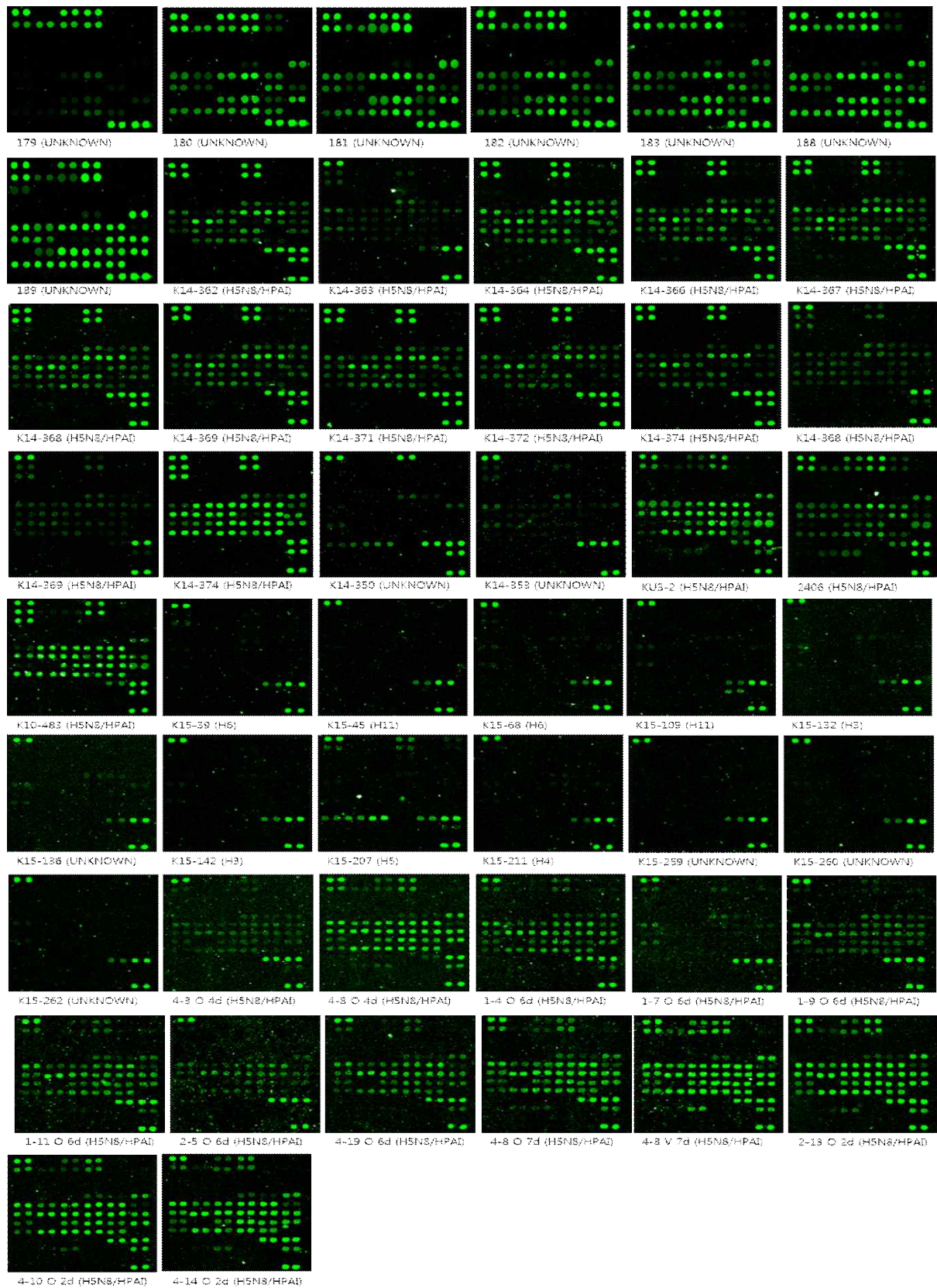
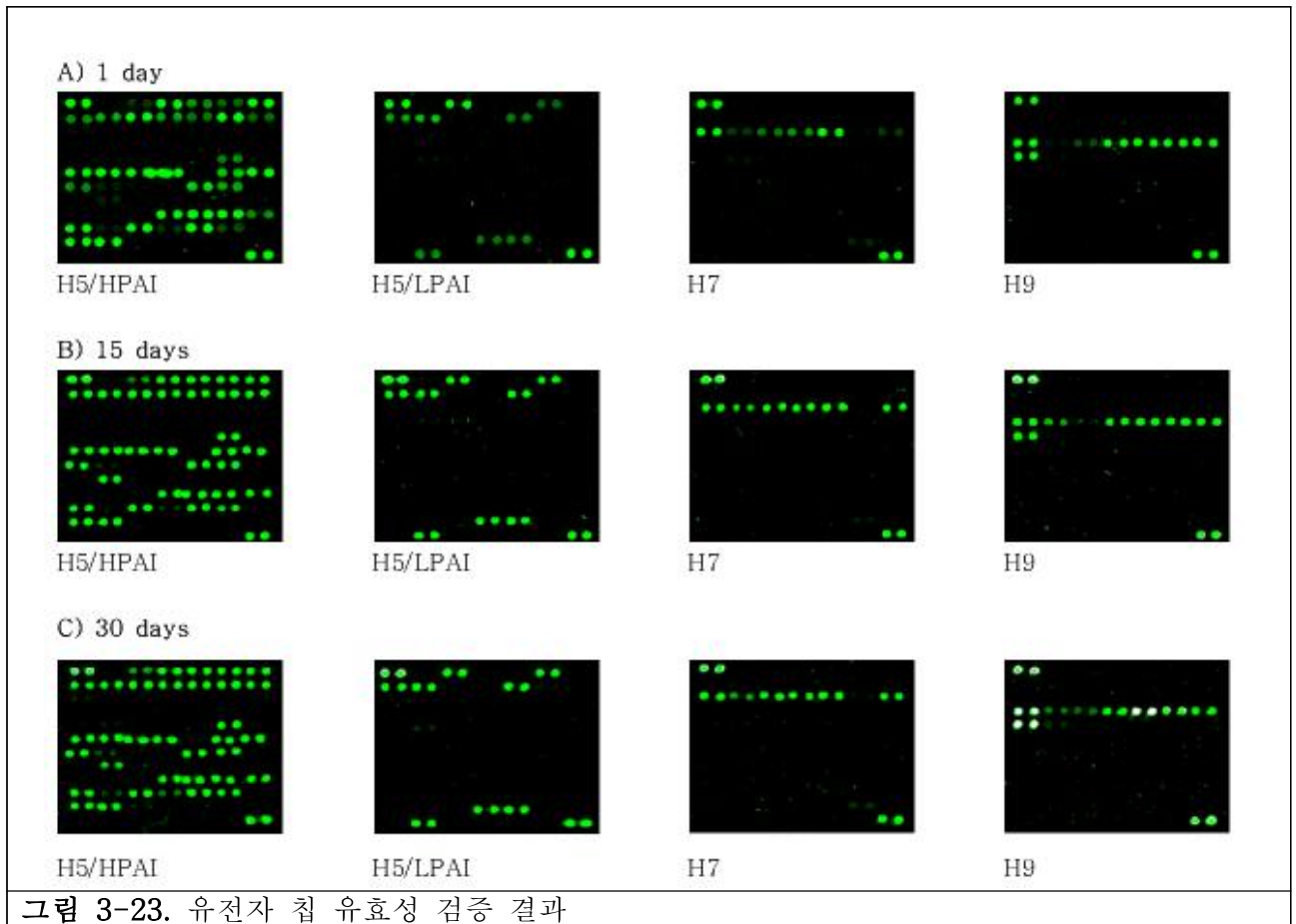


그림 3-22. 내수용 유전자 칩의 교잡반응 결과 (유효성 평가 및 보완) - 계속

**표 3-22.** 내수용 유전자 칩 유효성 평가 및 보완을 위한 현장샘플을 이용한 유전자칩 실험 결과

Index	Sample	HA	H/LPAI	Index	Sample	HA	H/LPAI
1	01310 (H9N2)	H9	-	50	180 (H5N8)	H5	HPAI
2	k040110 (H9N2)	H9	-	51	181 (H5N8)	H5	HPAI
3	8G39 (H9N2)	H9	-	52	182 (H5N8)	H5	HPAI
4	K10-243 (H5/LPAI)	H5	LPAI	53	183 (H5N8)	H5	HPAI
5	8G9 (H5N2/LPAI)	H5	LPAI	54	188 (H5N8)	H5	HPAI
6	EG16 (H5N2/LPAI)	H5	LPAI	55	189 (H5N8)	H5	HPAI
7	K12-94 (H7N1)	H7	-	56	K14-362 (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
8	K12-162 (H7N1)	H7	-	57	K14-363 (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
9	Plasmid 1 (H5N2/LPAI)	H5	LPAI	58	K14-364 (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
10	Plasmid 2 (H9N2)	H9	-	59	K14-366 (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
11	Plasmid 3 (H7)	H7	-	60	K14-367 (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
12	Plasmid 4 (H5)	H5	LPAI	61	K14-368 (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
13	Plasmid 5 (H5N1/HPAI)	H5	HPAI	62	K14-369 (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
14	Plasmid 6 (H5N1/HPAI)	H5	HPAI	63	K14-371 (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
15	1437s (H5N8)	H5	HPAI	64	K14-372 (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
16	1438s (H5N8)	H5	HPAI	65	K14-374 (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
17	1439s (H5N8)	H5	HPAI	66	K14-368 (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
18	1440s (H5N8)	H5	HPAI	67	K14-369 (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
19	1441s (H5N8)	H5	HPAI	68	K14-374 (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
20	1442s (H5N8)	H5	HPAI	69	K14-350 (UNKNOWN)	H5	LPAI
21	1443s (H5N8)	H5	HPAI	70	K14-353 (UNKNOWN)	H5	HPAI
22	1444s (H5N8)	H5	HPAI	71	KU3-2 (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
23	1445s (H5N8)	H5	HPAI	72	2406 (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
24	1446s (H5N8)	H5	HPAI	73	K10-483 (H5N1/HPAI)	H5	HPAI
25	1447s (H5N8)	H5	HPAI	74	K15-39 (H6)	-	-
26	1448s (H5N8)	H5	HPAI	75	K15-45 (H11)	-	-
27	1449s (H5N8)	H5	HPAI	76	K15-68 (H6)	-	-
28	1451s (H5N8)	H5	HPAI	77	K15-109 (H11)	-	-
29	1452s (H5N8)	H5	HPAI	78	K15-132 (H3)	-	-
30	1453s (H5N8)	H5	HPAI	79	K15-136 (UNKNOWN)	-	-
31	1454s (H5N8)	H5	HPAI	80	K15-142 (H3)	-	-
32	1455s (H5N8)	H5	HPAI	81	K15-207 (H5)	H5	LPAI
33	1456s (H5N8)	H5	HPAI	82	K15-211 (H4)	-	-
34	1457s (H5N8)	H5	HPAI	83	K15-259 (UNKNOWN)	-	-
35	1458s (H5N8)	H5	HPAI	84	K15-260 (UNKNOWN)	-	-
36	1459s (H5N8)	H5	HPAI	85	K15-262 (UNKNOWN)	-	-
37	1460s (H5N8)	H5	HPAI	86	4-3 O 4d (H5N8/HPAI)	H5	HPAI

38	1461s (H5N8)	H5	HPAI	87	4-8 O 4d (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
39	2399 (H5N8)	H5	HPAI	88	1-4 O 6d (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
40	2403 (H5N8)	H5	HPAI	89	1-7 O 6d (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
41	2404 (UNKNOWN)	H5	HPAI	90	1-9 O 6d (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
42	2406 (H5N8)	H5	HPAI	91	1-11 O 6d (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
43	2410 (H5N8)	H5	HPAI	92	2-5 O 6d (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
44	2412 (H5N8)	H5	HPAI	93	4-19 O 6d (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
45	2413 (H5N8)	H5	HPAI	94	4-8 O 7d (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
46	172 (H5N8)	H5	HPAI	95	4-8 V 7d (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
47	173 (H5N8)	H5	HPAI	96	2-13 O 2d (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
48	176 (H5N8)	H5	HPAI	97	4-10 O 2d (H5N8/HPAI)	H5	HPAI
49	179 (H5N8)	H5	HPAI	98	4-14 O 2d (H5N8/HPAI)	H5	HPAI



- 98개 시료를 이용한 내수용 유전자 칩의 유효성 검증 결과 98개 모든 시료에서 알려진 조류 인플루엔자 sample 타입과 일치하는 유전자 칩 결과를 확인할 수 있었으며, 알려지지 않은 타입의 조류 인플루엔자 sample의 타입도 확인할 수 있었음. 또한 유전자 칩이 표적으로 하는 타입이 아닌 sample에서는 비 특이적 결합은 없었음
- 본 실험에서는 2014년 동림저수지에서 H5N8 HPAI 바이러스 감염으로 폐사한 가창 오리 swab 시료 (Index 15~45번) 및 실험적으로 H5N8 HPAI 바이러스를 감염시킨 야생조류의 swab 시료 (Index 86~98번)를 이용하여 실험을 진행하였으며, 이 결과는 본 유전자칩의 임상시료 적용이 가능함을 나타냄.

4. 조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형 감별 내수용 유전자 칩 시제품 제작

- 최종 선택된 51개의 특이적 probe와 Position marker & blank를 포함한, 총 60개의 probe 구성된 조류인플루엔자 바이러스 혈청형 감별 내수용 유전자 chip 시제품을 제작함
- 한 장의 유전자 칩으로 4개의 각기 다른 sample을 실험할 수 있게 제작함 (그림 3-24)

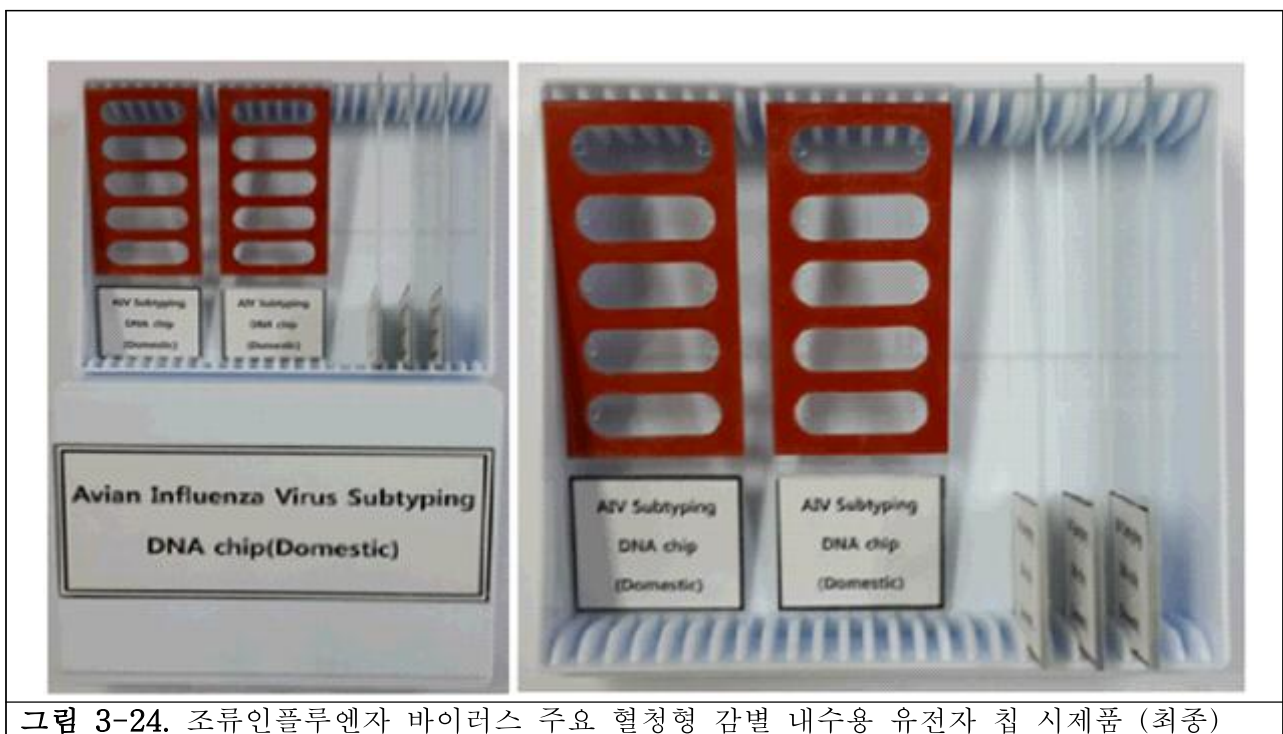


그림 3-24. 조류인플루엔자 바이러스 주요 혈청형 감별 내수용 유전자 칩 시제품 (최종)



5. 조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형 감별 수출용 유전자 칩 제작

가. 해외 조류인플루엔자 바이러스 주요 혈청형별 유전자 분석

- 1차년도에 분석한 조류인플루엔자 바이러스의 유전자정보와 2차년도에 추가된 해외 조류인플루엔자 바이러스의 유전자정보를 통합하여 분석한 결과, H5형의 경우 국내와 해외 조류인플루엔자 바이러스 간에 상당한 유전적 변이를 보임 (그림 3-25)

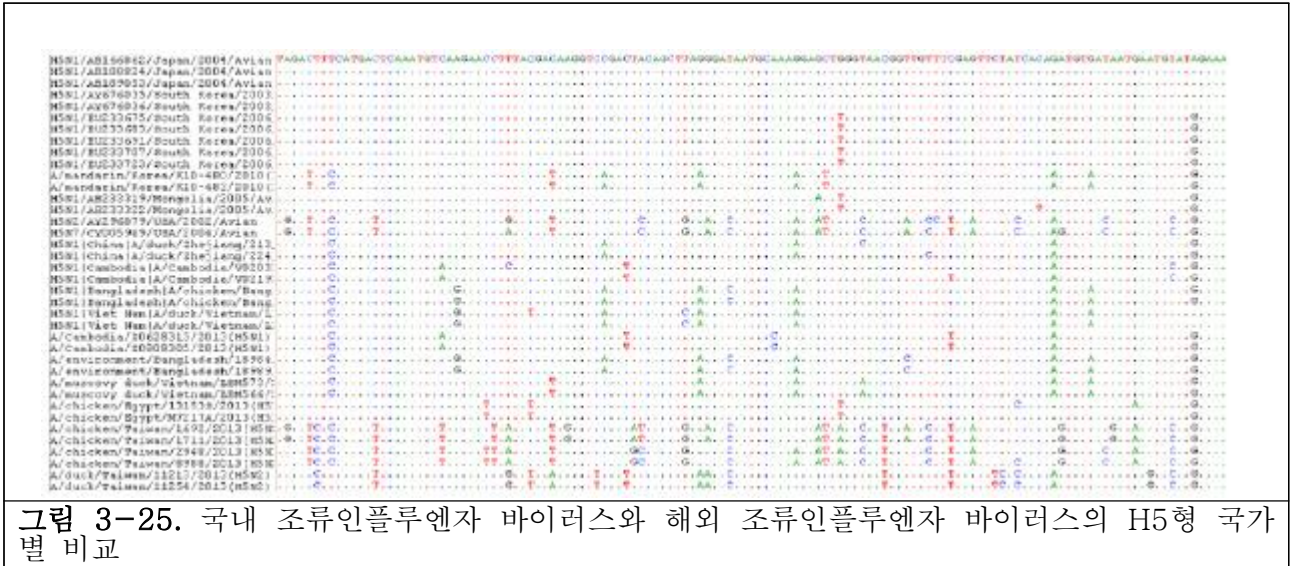


그림 3-25. 국내 조류인플루엔자 바이러스와 해외 조류인플루엔자 바이러스의 H5형 국가별 비교

- H7형은 H5형과는 달리 상당히 비슷한 유전적 변이를 보임 (그림 3-26)



그림 3-26. 국내 조류인플루엔자 바이러스와 해외 조류인플루엔자 바이러스의 H7형 국가별 비교

- H9형은 H5형과 같이 상당한 유전적 변이를 보임 (그림 3-27)



그림 3-27. 국내 조류인플루엔자 바이러스와 해외 조류인플루엔자 바이러스의 H9형 국가별 비교

나. 해외 주요 혈청형별 특이적 probe 설계

- 1차년도에 국내 조류인플루엔자 바이러스의 혈청형별 유전자와 추가된 해외 조류인플루엔자 바이러스의 혈청형별 유전자 분석결과, 내수용 특이 probe를 수출용 유전자 칩에 적용이 가능할 것으로 판단되어 내수용 특이 probe를 바탕으로 상당한 유전적 변이를 보인 H5와 H9형의 해외 조류인플루엔자 바이러스를 감별할 수 있는 특이적인 probe와 비슷한 유전자변이를 보인 H7형을 보완할 수 있는 특이적인 probe를 추가 설계함 (표 3-23)

표 3-23. 해외 조류인플루엔자 바이러스 특이 probe information

Index	Name	Sequence (5'-3')	Target	Origin	
1	H5-13	CWRCTKARRGAYAAAYGCMMAA	H5	Common	
2	H5-14	WTRAAYTCHAGYMTGCCHTTYCAHA		Bangladesh	
3	H5-15	CAGCTTAGGGATAATGCCAA			Egypt
4	H5-16	CAGCTTAAGGACAATGCAAA			
5	H5-17	CAACTGAGGGATAATGCAAA			Vietnam, Israel, Egypt, China
6	H5-18	ATAAAITCYAGTATGCCATTCCACA	H7	Taiwan	
7	H5-19	WTRAAYTCCAGYATGCCTTTCCAWA		Common	
8	H7-06	CAATGYGAYCWRTTYCTRRAR	H9	Common	
9	H9-07	CMACDAAITYYACVGADWYNGK		Bangladesh	
10	H9-08	CARRRAATAGARGRRRTNAA			bangladesh, Egypt, Iran, Lebanon, Nepal, Israel
11	H9-09	CRACAAATCTACAGAAACTGT			
12	H9-10	CAACAAATTCACAGAAACTGT		India	
13	H9-11	CAACAAATTCACGGAAACTGT		Japan, China, Nepal, India	
14	H9-12	CAGAAAATAGAAGGGGTCAA			Arab emirates, Saudi Arabia, China (Guangdong)
15	H9-13	CAGAAAATAGAGGGGGTTAA			

16	H9-14	CAGRAAATAGAAGGGGTYAA	pakistan, iran
17	H9-15	CAGARAATAGARGGRGTCAA	

6. 특이적 probe를 이용한 주요 혈청형 감별 수출용 유전자 칩 제작 및 실험조건 확립

가. 유전자 증폭조건 확립

- 내수용 유전자 칩에서 사용한 유전자 증폭조건과 동일하게 적용함 (표 3-17, 18, 19)

나. 조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형 감별 수출용 유전자 칩 설계

- 조류인플루엔자 바이러스 특이적인 probe 17개와 1개의 position marker를 추가하여 내수용 유전자 칩 probe 뒤로 위치하게 하여, position marker와 blank 포함 총 78개의 probe로 구성된 유전자 chip을 설계함 (표 3-24)
- 모든 특이적 probe는 2번 반복해서 slide glass위에 spotting을 하여, 총 156개의 spot으로 제작함 (그림 3-28)

**표 3-24. 특이 probe의 배열순서 (수출용 유전자 칩)**

Index	Probe_Name	Index	Probe_Name	Index	Probe_Name	Index	Probe_Name
1	Position	21	Empty	41	H5-14	61	H5-13
2	Empty	22	H9-01	42	H5-15	62	H5-14
3	H5-01	23	H9-02	43	H5-16	63	H5-15
4	H5-02	24	H9-03	44	Empty	64	H5-16
5	H5-03	25	H9-04	45	H5-17	65	H5-17
6	H5-04	26	H9-05	46	H5-18	66	H5-18
7	H5-05	27	Empty	47	H5-19	67	H5-19
8	H5-06	28	H5-01	48	H5-20	68	H7-06
9	H5-07	29	H5-02	49	H5-21	69	H9-07
10	H5-08	30	H5-03	50	H5-22	70	H9-08
11	H5-09	31	H5-04	51	H5-23	71	H9-09
12	H5-10	32	H5-05	52	H5-24	72	H9-10
13	H5-11	33	H5-06	53	H5-25	73	H9-11
14	H5-12	34	H5-07	54	H5-26	74	H9-12
15	Empty	35	H5-08	55	Empty	75	H9-13
16	H7-01	36	H5-09	56	LPAI-01	76	H9-14
17	H7-02	37	H5-10	57	LPAI-02	77	H9-15
18	H7-03	38	H5-11	58	LPAI-03	78	Position
19	H7-04	39	H5-12	59	Empty		
20	H7-05	40	H5-13	60	Position		

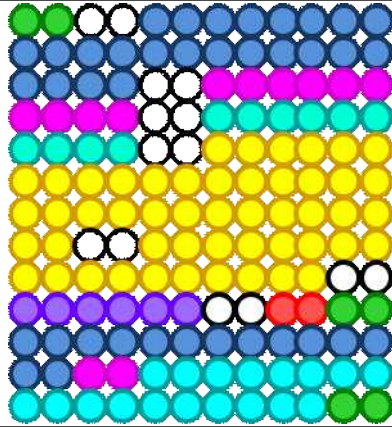
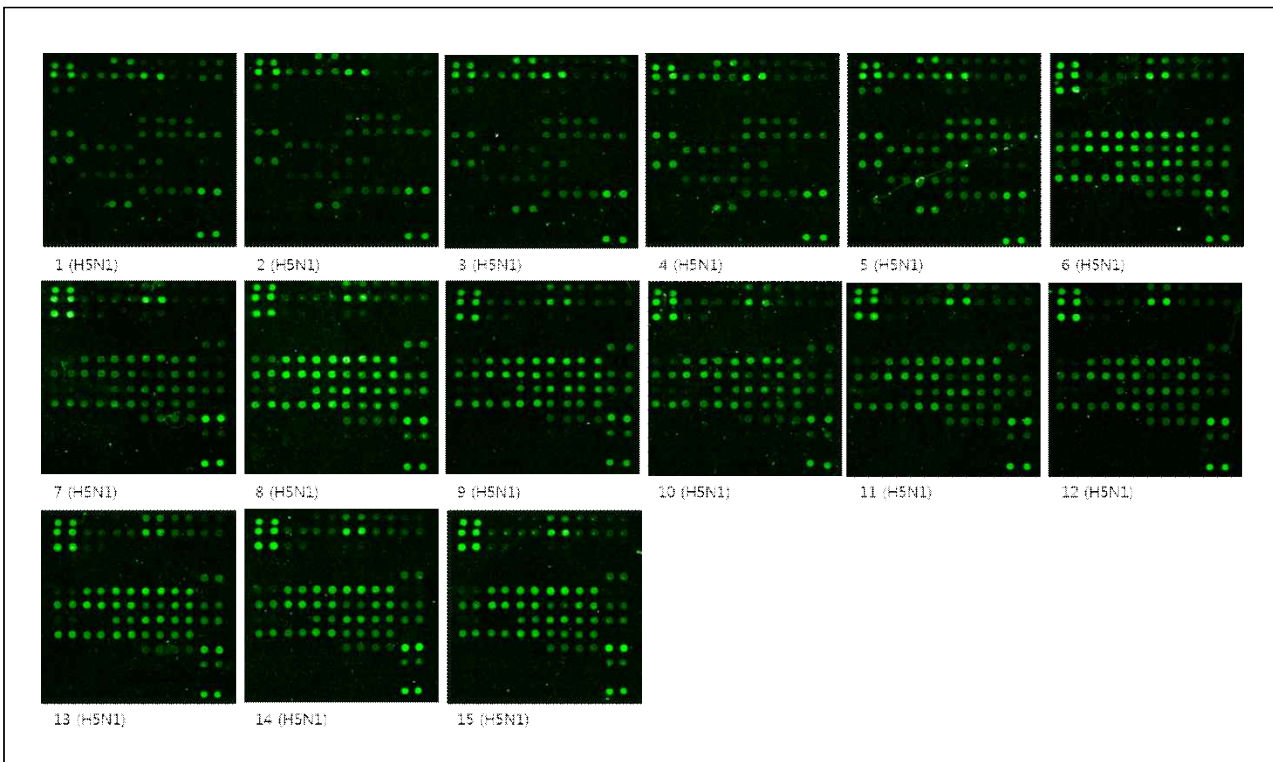


그림 3-28. 유전자 칩 제작 모식도 (Green: position marker, White: Empty, Blue: H5 type, Pink: H7 type, Sky blue: H9 type, Yellow: HPAI, Purple: LPAI, Red: Positive control (M gene))

다. 제작된 유전자 칩을 이용한 수출용 시제품 임상시험 및 유효성 검증 결과

- 제 1세부과제를 통해 확보한 36개의 몽골 sample을 이용하여 제작된 수출용 유전자 칩의 임상시험 및 유효성 검증을 진행함 (그림 3-29, 표 3-25).
- PCR 및 유전자 칩 교잡반응 조성 및 조건은 내수용 유전자 칩과 동일하게 적용함.
- 국내 조류인플루엔자 바이러스 특이적 probe는 해외 시료에도 적용이 가능함.



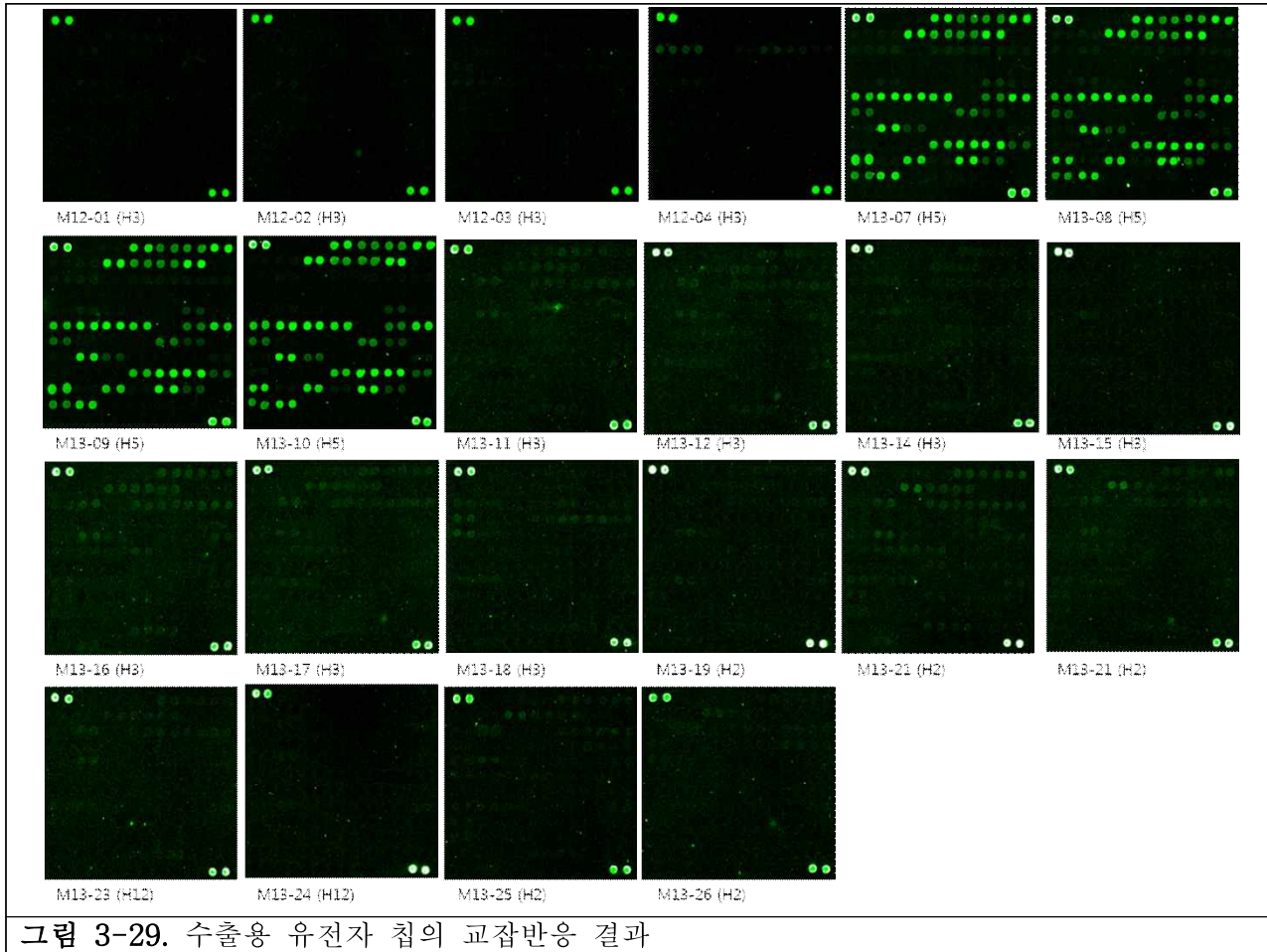


그림 3-29. 수출용 유전자 칩의 교잡반응 결과

표 3-25. 수출용 유전자 칩 유효성 평가 및 보완을 위한 현장샘플을 이용한 유전자칩 실험 결과

Index	Sample	HA	H/LPAI	Index	Sample	HA	H/LPAI
1	M12-01 (H3)	-	-	19	M13-23 (H12)	-	-
2	M12-02 (H3)	-	-	20	M13-24 (H12)	-	-
3	M12-03 (H3)	-	-	21	M13-25 (H2)	-	-
4	M12-04 (H3)	-	-	22	M13-26 (H2)	-	-
5	M13-07 (H5)	H5	HPAI	23	1 (H5N1)	H5	HPAI
6	M13-08 (H5)	H5	HPAI	24	2 (H5N1)	H5	HPAI
7	M13-09 (H5)	H5	HPAI	25	3 (H5N1)	H5	HPAI
8	M13-10 (H5)	H5	HPAI	26	4 (H5N1)	H5	HPAI
9	M13-11 (H3)	-	-	27	5 (H5N1)	H5	HPAI
10	M13-12 (H3)	-	-	28	6 (H5N1)	H5	HPAI
11	M13-14 (H3)	-	-	29	7 (H5N1)	H5	HPAI
12	M13-15 (H3)	-	-	30	8 (H5N1)	H5	HPAI
13	M13-16 (H3)	-	-	31	9 (H5N1)	H5	HPAI
14	M13-17 (H3)	-	-	32	10 (H5N1)	H5	HPAI
15	M13-18 (H3)	-	-	33	11 (H5N1)	H5	HPAI
16	M13-19 (H2)	-	-	34	12 (H5N1)	H5	HPAI

17	M13-21 (H2)	-	-	35	13 (H5N1)	H5	HPAI
18	M13-22 (H2)	-	-	36	14 (H5N1)	H5	HPAI

7. 조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형 감별 수출용 유전자 칩 시제품 제작

- 최종 선택된 68개의 특이적 probe와 position marker & blank를 포함한 총 78개의 probe 구성된 조류인플루엔자 바이러스 혈청형 감별 수출용 유전자 chip 시제품을 제작함
- 한 장의 유전자 칩으로 8개의 각기 다른 sample을 실험할 수 있게 제작함 (그림 3-30)

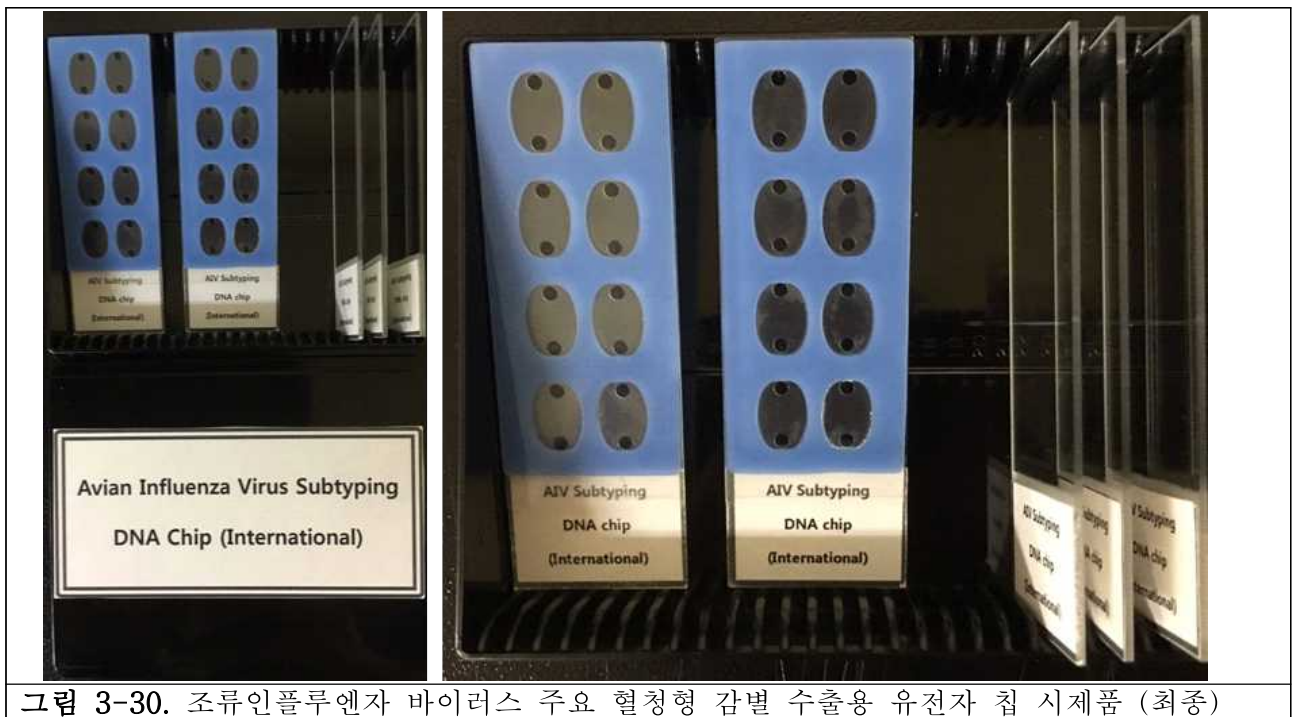


그림 3-30. 조류인플루엔자 바이러스 주요 혈청형 감별 수출용 유전자 칩 시제품 (최종)

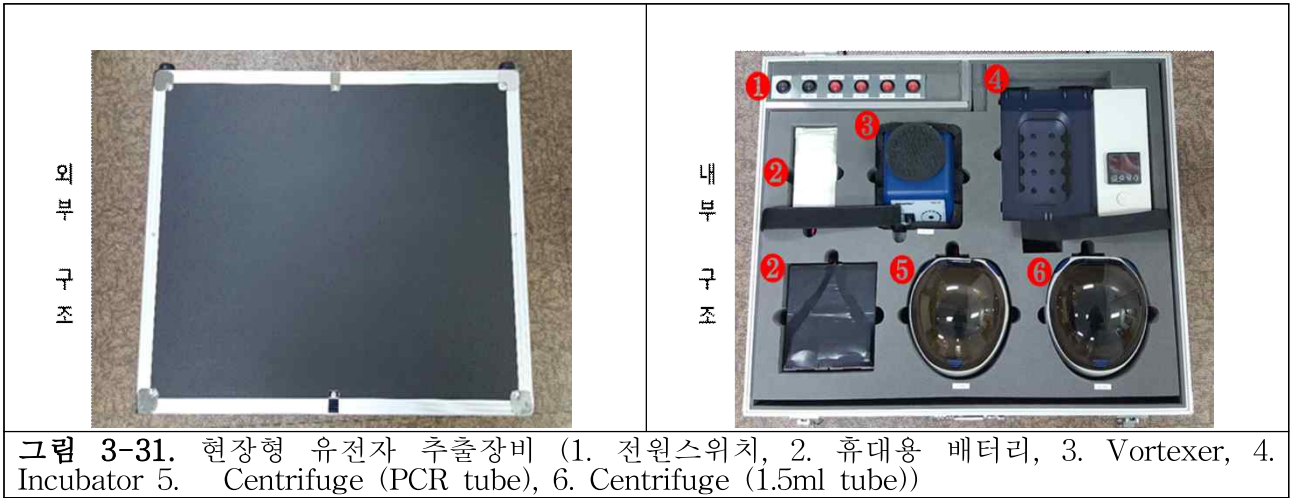
8. 현장형 신속 조류인플루엔자 바이러스 검역 및 검출시스템 개발 및 산업화

가. 현장형 신속 조류인플루엔자 바이러스 검역 및 검출 시스템 개발

- 현장형 유전자 추출장비 세트와 현장형 유전자 증폭 및 검출장비세트로 구성함

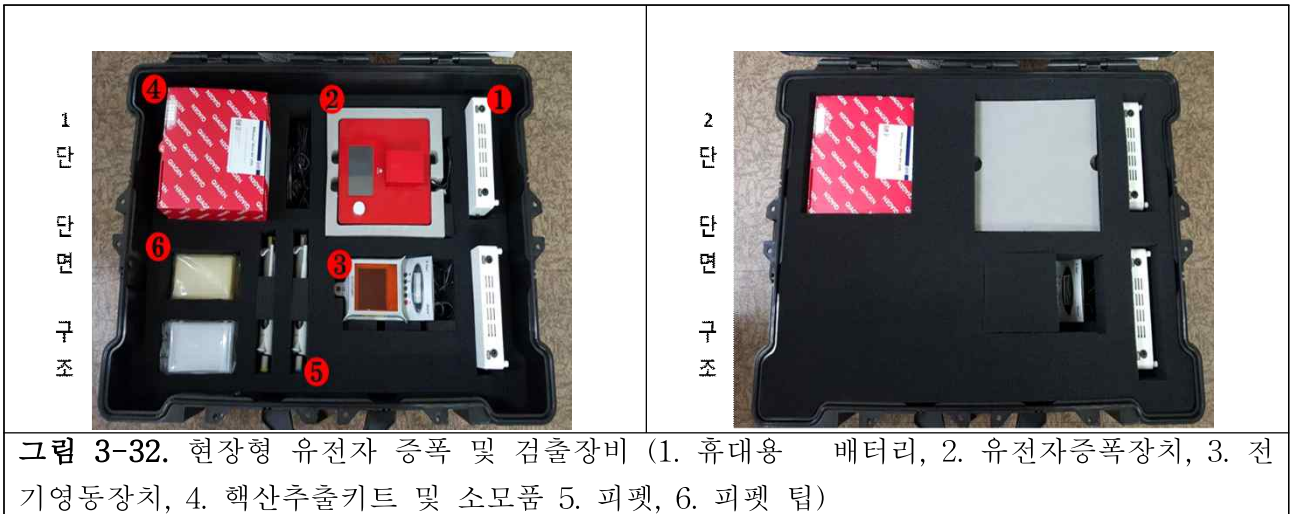
나. 현장형 유전자 추출장비 개발

- 현장에서 채취한 시료에서 조류인플루엔자 바이러스의 존재유무를 확인하기 위하여 조류인플루엔자 바이러스의 유전자를 포함하는 전체 유전자를 추출하기 위한 장비를 개발
- 휴대형 케이스 내에 vortexer, incubator, centrifuge로 구성을 하고, 배터리를 이용하여 장비를 구동하게 하여, 현장에서 핵산추출 키트를 이용하여 유전자를 추출할 수 있게 함 (그림 3-31)



다. 현장형 유전자 증폭 및 검출장비 개발

- 추출된 유전자에서 조류인플루엔자 바이러스 유전자의 존재유무를 확인하고 조류인플루엔자 바이러스의 M 유전자만을 특이적으로 증폭시키기 위한 장비를 개발
- 휴대형 케이스 내에 핵산추출키트와 기타 소모품 및 피펫, 그리고 유전자증폭장치와 전기영동 장치로 구성을 하고 배터리를 이용하여 장비를 구동하게 함 (그림 3-32)



라. 현장형 검역 및 검출시스템 검증

- 표적 유전자인 M gene은 문헌조사를 통해 확인한 M gene universal primer를 이용하였고, 유전자 칩 실험에서 positive control PCR 조건 및 조성으로 PCR을 진행함 (표 3-26)
- 개발된 휴대형 신속 조류인플루엔자 바이러스 검역 및 검출 시스템을 활용하여 유전자를 추출하고, 조류인플루엔자 바이러스의 M 유전자를 증폭하여 원하는 유전자의 증폭산물을 전기영동 장치를 통해 현장에서 육안으로 확인함 (그림 3-33)
- 현장에서 4시간안에 유전자 추출부터 표적유전자확인까지 모든 과정이 완료됨.

- 본 제품은 오염 방지를 위하여 별도의 장소에서 Lysis buffer와 반응 후 tube 주변을 에탄올을 이용 세척 및 소독 후 본 장비에서 사용하도록 제품 매뉴얼을 구성 예정이며, 이와 같은 매뉴얼 준수 시 최초 시료는 사멸된 바이러스 이므로 장비 사용 시 생물안전 위험은 없음. 기타 사용 주의사항은 일반 기기와 동일함.

표 3-26. M gene universal primer sequence information			
Target	Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon size
M gene	Bm-M-1	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGTAG	~1 KB
	Bm-M-1027R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTT TT	

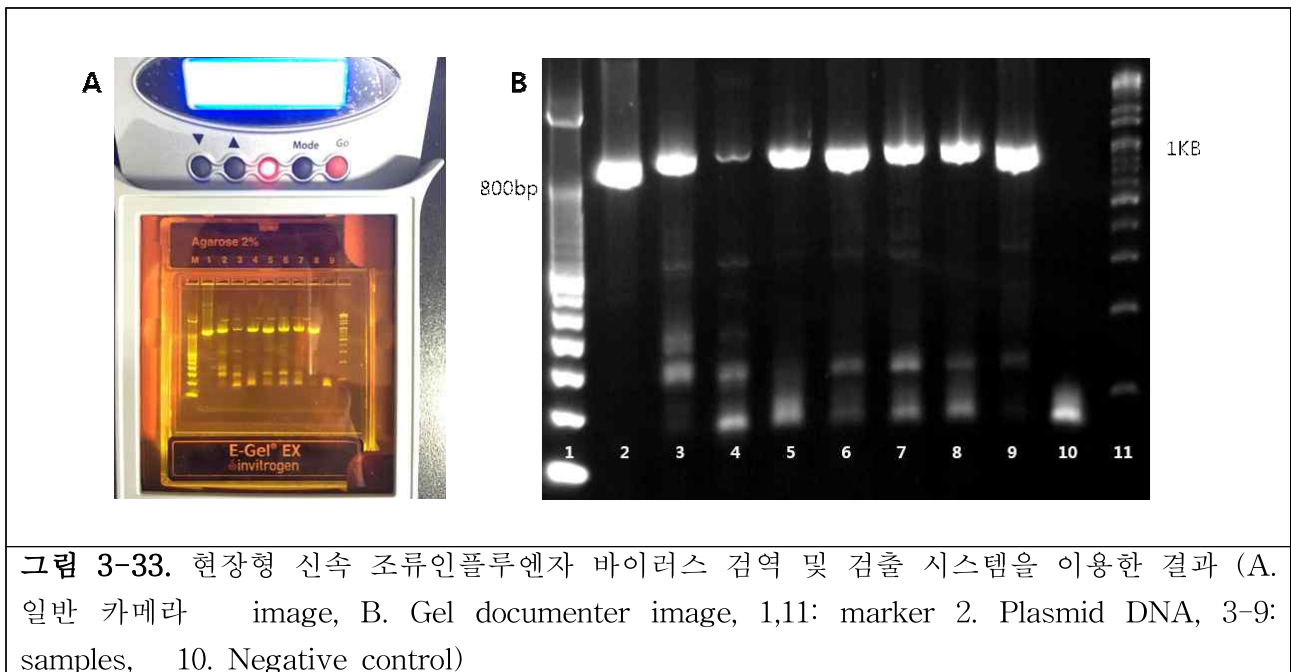


그림 3-33. 현장형 신속 조류인플루엔자 바이러스 검역 및 검출 시스템을 이용한 결과 (A. 일반 카메라 image, B. Gel documenter image, 1,11: marker 2. Plasmid DNA, 3-9: samples, 10. Negative control)



### 3절 결론

- real-time PCR 기술 개선을 위한 double-quancher의 이용 결과 기존 single-quancher를 이용한 방법에 비하여 CT value를 감소시켜 민감도를 향상 시킬 수 있는 것으로 확인됨.
- real-time PCR 적용을 위한 추출 효율 비교 결과 high-throughput 자동화 RNA 추출 장치가 기존 방식보다 닭의 swab 시료 및 분변 시료에서 추출 효율이 좋았으며, Trizol을 이용한 바이러스의 전처리 방법이 다른 방법에 비하여 추출 효율이 좋음을 확인함.
- H5 subtype 검출용 primer 및 probe의 개선 결과 기존 방식에 비하여 검출한계농도를 100배정도 낮추는 것으로 확인됨.
- 종란 검사를 위한 검사방법 비교 실험 결과 난각 표면 swab 방법이 PBS wash, 혈구 이용 농축법 및 유제 방법에 비하여 민감도가 높은 것으로 확인됨.
- 육류 검사를 위한 검사방법 비교 실험 결과 계육 표면 swab 방법이 계육 분쇄법 및 혈구 이용 농축법에 비하여 민감도가 높은 것으로 확인됨.
- 내수용 유전자칩의 개발 및 보완 결과 국내 2010년도 발생 H5N1, 2014년도 발생 H5N8, 2015년도 발생 H5N8, 중국의 H7N9 바이러스를 포함하여 다양한 혈청형의 바이러스에서 subtype 구분 및 병원성이 유전자 분석결과와 일치하는 결과를 나타냄.
- 수출용 유전자칩의 개발 및 보완 결과 몽골의 36종 바이러스 모두 유전자 분석결과와 일치하는 결과를 나타냄.
- 유전자칩을 이용한 검사 결과 현장 시료에서 6시간 이내 subtype 및 병원성 구분이 가능한 것으로 확인됨.
- 현장형 진단 장비의 개발 및 검사 결과 실험실 검사 시 결과와 유사한 결과를 나타내어 현장 진단에 이용 가능한 것으로 확인되었으며, 4시간 이내에 AIV 검출이 가능함.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1절 연도별 연구목표 및 평가의 착안점

#### 1. 연차별 연구개발 목표 및 내용

<1차년도>

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1세부과제	2012년	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 수출입 및 밀수를 통한 HPAI 발생 사례 조사연구</li> <li>○ 검역용 조류인플루엔자 real-time PCR의 조건 확립</li> <li>○ 조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형별 유전자 분석</li> <li>○ 조류인플루엔자 주요 혈청형 감별 유전자칩의 내수용 시제품 국내임상 시험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 검역·검출 가이드라인 개발 기초자료 확립을 위한 국내·외 공항·항만의 수출입 및 밀수를 통한 HPAI 전파 사례 분석</li> <li>- 검역용 조류인플루엔자 real-time PCR의 검출 한계 및 시험조건 확립</li> <li>- real-time PCR을 이용한 종란 검역용 조류인플루엔자 검역·검출 가이드라인 구축</li> <li>- 최신 조류인플루엔자 바이러스 분리주의 주요 혈청형 유전자 정보 분석</li> <li>- 제2세부과제와의 협력연구를 통한 혈청형별 유전자 marker 탐색 및 검증</li> <li>- 제2세부과제에서 개발된 내수용 유전자칩 시제품의 국내임상시험 (민감도, 특이도, 검출한계, 야외적용시험)</li> </ul>
2세부과제	2012년	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형 감별 내수용 유전자 칩 제작</li> <li>○ 국내 임상 시험을 통한 내수용 유전자 칩의 검증 및 시제품 제작</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내 조류인플루엔자 바이러스 주요 혈청형별 유전자 분석</li> <li>- 국내 주요 혈청형별 특이적 probe 설계</li> <li>- 특이적 probe를 이용한 주요 혈청형 감별 내수용 유전자 칩 제작 및 실험 조건 확립</li> <li>- 최신분리주를 이용한 실험실내 효능 시험을 통한 주요 혈청형 감별 내수용 유전자 칩의 검증</li> <li>- 검증된 내수용 유전자 칩의 시제품 제작</li> </ul>

<2차년도>

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1세부과제	2013년	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Real-time PCR을 이용한 검역용 조류인플루엔자 검역·검출 가이드라인 구축</li> <li>○ 조류인플루엔자 주요 혈청형 감별 유전자칩의 내수용 시제품 해외임상시험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 제2세부과제와의 협력연구를 통한 수출용 혈청형별 유전자 marker 탐색 및 검정</li> <li>- Real-time PCR을 이용한 육류 검역용 조류인플루엔자 검역·검출 가이드라인 구축</li> <li>- 제2세부과제에서 개발된 유전자칩 시제품의 해외임상시험 (민감도, 특이도, 해외 분리주 적용시험)</li> </ul>
2세부과제	2013년	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형 감별 내수용 유전자 칩 시제품의 보완</li> <li>○ 조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형 감별 수출용 유전자 칩 제작</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내 현장 시료를 통한 1차년도에 제작된 내수용 유전자 칩의 유효성 평가 및 보완</li> <li>- 해외 조류인플루엔자 바이러스 주요 혈청형별 유전자 분석</li> <li>- 해외 주요 혈청형별 특이적 probe 설계</li> <li>- 특이적 probe를 이용한 주요 혈청형 감별 수출용 유전자 칩 제작 및 실험 조건 확립</li> </ul>

<3차년도>

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1세부과제	2014년	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 조류인플루엔자 주요 혈청형 감별 유전자칩의 내수용 시제품 해외임상시험</li> <li>○ 조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형 감별 수출용 유전자 칩 의 보완</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 제2세부과제에서 개발된 유전자칩 시제품의 해외임상시험 (민감도, 특이도, 해외 분리주 적용시험)</li> <li>- 조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형 감별 수출용 유전자 칩 시제품의 검정 및 보완 (제2세부와 협동)</li> </ul>
2세부과제	2014년	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형 감별 수출용 유전자 칩 의 시제품 제작</li> <li>○ 현장형 신속 조류인플루엔자 검역·검출시스템을 개발 및 산업화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 해외 현장 시료 검정시험을 통한 2차년도에 제작된 수출용 유전자 칩의 유효성 평가 및 보완</li> <li>- 최종 검증된 조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형 감별 수출용 유전자 칩 시제품 제작</li> <li>- 공항·항만 등에서 사용이 가능한 현장형 신속 조류인플루엔자 검역·검출시스템 개발 및 산업화</li> </ul>

## 2. 평가의 착안점

- Real-time PCR을 이용한 검역용 조류인플루엔자 검역·검출 가이드라인의 유용성
- 유전자 정보 분석을 통한 혈청형별 유전자 marker 탐색의 독창성 및 차별성
- 혈청형별 유전자 marker에 따른 유전자 증폭 조건의 안정성
- 각 혈청형별 특이적 유전자 candidate probe의 안정성 및 특이성
- 설계된 candidate probe를 이용한 주요 혈청형 감별용 유전자 칩 제작의 안정성
- 유전자 칩용 primer를 이용한 유전자 증폭 조건의 우수성 및 안정성
- 증폭된 유전자를 통한 candidate probe의 선택성 및 특이성
- 반복 실험을 통한 candidate probe의 검증방법의 안정성
- 국내·외 임상 시료를 이용한 유전자 칩의 검증방법의 우수성
- 주요 혈청형 감별용 유전자 칩의 시제품 제작 및 응용 가능성
- 기존 연구 결과와의 상호 보완성 및 독창성

## 2절 연구개발목표의 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012-3)	[제1세부] Real-time PCR을 이용한 검역용 신속 조류인플루엔자 검출시스템 개발	수출입 및 밀수를 통한 HPAI 발생 사례 조사연구	100	- 검역·검출 가이드라인 개발 기초자료 확립을 위한 국내·외 공항·항만의 수출입 및 밀수를 통한 HPAI 전파 사례 분석
		검역용 조류인플루엔자 real-time PCR의 조건 확립	100	- 검역용 조류인플루엔자 real-time PCR의 검출 한계 및 시험조건 확립  - real-time PCR을 이용한 종란 검역용 조류인플루엔자 검역·검출 가이드라인 구축
		조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형별 유전자 분석	100	- 최신 조류인플루엔자 바이러스 분리주의 주요 혈청형 유전자 정보 분석  - 제1협동과제와의 협력연구를 통한 혈청형별 유전자 marker 탐색 및 검정
		조류인플루엔자 주요 혈청형 감별 유전자칩의 내수용 시제품 국내임상시험	100	- 제1협동과제에서 개발된 내수용 유전자칩 시제품의 국내임상시험 (민감도, 특이도, 검출한계, 야외적용시험)
	[제1협동] 유전자 칩을 이용한 검역용 신속 조류인플루엔자 검출시스템 개발	조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형 감별 내수용 유전자 칩 제작	100	- 국내 조류인플루엔자 바이러스 주요 혈청형별 유전자 분석  - 국내 주요 혈청형별 특이적 probe 설계  - 특이적 probe를 이용한 주요 혈청형 감별 내수용 유전자 칩 제작 및 실험 조건 확립
		국내 임상 시험을 통한 내수용 유전자 칩의 검증 및 시제품 제작	100	- 최신 분리주를 이용한 실험실내 효능 시험을 통한 주요 혈청형 감별 내수용 유전자 칩의 검증  - 검증된 내수용 유전자 칩의 시제품 제작

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2013-4)	[제1세부] Real-time PCR을 이용한 검역용 신속 조류인플루엔자 검출시스템 개발	검역용 조류인플루엔자 real-time PCR의 조건 확립	100	- 검역용 조류인플루엔자 real-time PCR의 검출 한계 및 시험조건 확립
		Real-time PCR을 이용한 검역용 조류인플루엔자 검역·검출 가이드라인 구축	100	- Real-time PCR을 이용한 육류검역용 조류인플루엔자 검출방법 비교시험
		조류인플루엔자 주요 혈청형 감별 유전자칩의 내수용 시제품 해외임상시험	100	- 최신 조류인플루엔자 바이러스 분리주의 주요 혈청형 유전자 정보 분석  - 제1협동과제와의 협력연구를 통한 혈청형별 유전자 marker 탐색 및 검정  - 제1협동과제에서 개발된 유전자칩 시제품의 해외임상시험 (민감도, 특이도, 해외 분리주 적용시험)
	[제1협동] 유전자 칩을 이용한 검역용 신속 조류인플루엔자 검출시스템 개발	조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형 감별 내수용 유전자 칩 시제품의 보완	100	- 국내 현장 시료를 통한 1차년도에 제작된 내수용 유전자 칩의 유효성 평가 및 보완
		조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형 감별 수출용 유전자 칩 제작	100	- 해외 조류인플루엔자 바이러스 주요 혈청형별 유전자 분석 (몽골, 중국, 일본 등 인접국)  - 해외 주요 혈청형별 특이적 probe 설계  - 특이적 probe를 이용한 주요 혈청형 감별 수출용 유전자 칩 제작 및 실험 조건 확립

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2014-5)	[제1세부] Real-time PCR을 이용한 검역용 신속 조류인플루엔자 검출시스템 개발	검역용 조류인플루엔자 real-time PCR의 조건 확립	100	- 최근 발생한 H5 subtype 검출용 real-time PCR 셋팅
		조류인플루엔자 주요 혈청형 감별 유전자칩의 내수용 시제품 해외임상시험	100	- H5N1, H5N8 등 국가간 전파형의 HPAI virus 및 중국의 인체감염형의 H7N9 바이러스 포함 신규 분리주를 이용한 평가 진행
		조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형 감별 수출용 유전자 칩 의 보완	85	- 몽골 균주 39건에 대한 평가 진행 - 중국 H7N9, 대륙 간 전파된 H5 strain (icA)를 이용한 내수용 유전자칩의 검출 성능 평가
	[제1협동] 유전자 칩을 이용한 검역용 신속 조류인플루엔자 검출시스템 개발	조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형 감별 수출용 유전자 칩 의 시제품 제작	100	- 해외 균주 분석을 통한 수출용 유전자칩의 시제품 제작 - 국내용 유전자칩의 해외 균주 적용 가능성 평가
		현장형 신속 조류인플루엔자 검역·검출시스템을 개발 및 산업화	100	- PCR 기반의 현장형 진단 장비의 개발 - 현장형 진단 장비의 검출한계농도 및 효능 평가 진행



- 조류인플루엔자 바이러스의 주요 혈청형 감별 수출용 유전자 칩의 보완을 위한 해외 임상실험은 중국 및 미국 바이러스의 수입에 관한 절차가 진행 중에 있음.

### 3절 관련분야 기술발전 기여도

- 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스는 백신으로 완전한 바이러스 박멸이 어려워 살처분 정책을 이용하고 있음. 살처분 정책의 효율적인 적용을 위해서는 즉각적이 조치를 위한 신속·정확 진단기술의 개발이 필수적임
- 본 연구를 통하여 개발된 real-time PCR 기반의 진단기술의 개선안은 샘플채취 방법 및 primer, probe의 변경을 통하여 현재 real-time PCR 대비 검출한계농도를 감소시켜 현장시료에 바로 적용 시 검출 민감도를 향상시킴
- 본 연구를 통하여 개발된 유전자칩은 유전자 정제 및 염기서열 분석 과정 없이 PCR 이후 바로 subtype 구분이 가능하도록 하여 검사 소요시간을 대폭 감소시킴.
- 본 연구를 통하여 개발된 유전자칩은 PCR 통해 증폭된 HA 유전자의 농도가 낮은 상태에서도 적용이 가능하여 현장시료의 적용 범위를 넓힘.
- 현장에서 검사 가능한 PCR 기반 현장형 장비의 개발을 통하여 비상 시 현장에서의 즉각적인 검출이 가능하도록 하였으며, 이를 통하여 샘플 이동에 소요되는 시간을 절약하고, 샘플 이동으로 발생하는 전파 위험을 차단함.
- 이러한 본 연구의 개발품은 현장시료에서의 HPAI 검출 가능성을 높이고, 검사시간을 감소시켜 즉각적인 방역조치가 이루어지도록 기여함.
- 진단소요 시간의 감소를 통하여 방역조치의 효율성을 증대하여 HPAI 발생 시 전파 차단 및 조기 종결을 통한 피해액의 감소 효과를 나타낼 것으로 기대됨.
- 개발 기술에 대한 SCI 논문 게재를 통한 관련 과학기술 분야의 발전에 기여함.
- 개발 기술의 특허 출원 및 제품화를 통하여 관련 산업 발전에 기여함.
- 본 과제를 통해 개발된 신속·정확 진단기술의 적용을 통하여 2014년 발생 HPAI 발생이 지속되는 상황에서 발생 종결에 기여할 것으로 기대됨.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1절 연구개발결과의 성과

#### 1. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

구 분	지식재산권		논문		학술 발표	기술 거래	교육 지도	사업화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시 A	기타
	출원	등록	SCI	비 SCI									
최종목표	2	1	4	1	3		3					6	2
1차년도	목표		1		1		1					2	0
	실적				1		2			1			
2차년도	목표	1	1	1	1		1					2	1
	실적	1		2	4		1			2		4	1
3차년도	목표	1		2	1	1	1					2	1
	실적	1	1	1		2						2	1
소 계	목표	2	1	4	1	3	3			0		6	2
	실적	2	1	2		7	3			3		6	2
종료 1차년도		1	2	1									
종료 2차년도													
종료 3차년도													
소 계			2	1									
합 계	2	2	4	1	7		3			3		6	2

2. 지식재산권

지식재산권[발명특허, 실용신안, 의장, 상표, 규격], <b>신품종, 프로그램개발</b> 등으로 구분하고, 세부적으로 전부(건별로) 기록하며, 국외인 경우 반드시 국명을 기록합니다]									
구분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
출원	조류인플루엔자 바이러스를 고감도로 검사하기 위한 키트, 이를 위한 조류인플루엔자 바이러스 검사용 프로브 조성물 및 유전자 칩, 그리고 이들을 이용한 조류인플루엔자 바이러스 검사방법	대한민국	바이오코아(주) & 건국대학교 공동출원	2014. 10. 07	10-2014-0134765				등록 결정 (등록번호 발급 예정)
등록	조류인플루엔자 바이러스 검사용 프로브 조성물, 유전자 칩 그리고 이들을 이용한 조류인플루엔자 바이러스 검사방법	대한민국				바이오코아(주) & 건국대학교 & 농림축산검역본부	2016. 02. 01	10-1592247	
출원	조류인플루엔자 바이러스를 고감도로 검사하기 위한 키트, 이를 위한 조류인플루엔자 바이러스 검사용 프로브 조성물 및 유전자 칩, 그리고 이들을 이용한 조류인플루엔자 바이러스 검사방법		바이오코아(주) & 건국대학교 공동출원	2015. 10. 02	PCT/KR 2015/010460				국제특허출원

3. 논문게재 및 학술회의 발표

가. 논문게재

논문(국내외 전문학술지) 게재							
번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부(SCI/비SCI)
1	Complete genome sequence of a natural reassortant H9N2 avian influenza virus found in bean goose ( <i>Anser fabalis</i> ): Direct evidence for virus exchange between Korea and China via wild birds	Infection, Genetics and Evolution	Dong-Hun Lee	8(1)	Netherlands	Elsevier Science	SCI
2	Rapid hemagglutinin subtyping of novel avian-origin influenza A(H7N9) virus using a diagnostic microarray	BioChip J.	Dong-Hun Lee	26	Korea (South)	Korean Biochip Society	SCI
3 (게재승인)	Simultaneous subtyping and pathotyping of the novel reassortant influenza A (H5N8) virus from clinical samples using a diagnostic microarray.	BioChip J.	Jung-Hoon Kwon, Ji-Hoon Kim	2016년 9월 게재 예정	Korea (South)	Korean Biochip Society	SCI
4 (review 중)	Isolation of Novel Influenza A (H5N8) Virus in Seoul, Korea	Veterinary Records	Jung-Hoon Kwon	review 중	United Kingdom	British Veterinary Association	SCI
5 (review 중)	Application of diagnostic microarray technique in diagnosis of avian influenza viruses isolated in Mongolia.	The Journal of Bacteriology and Virology	Jung-Hoon Kwon	review 중	Korea (South)	대한바이러스학회	비SCI

나. 국내 및 국제 학술회의 발표

국내 및 국제 학술회의 발표 (학술회의명을 세부적으로 전부(건별로) 기록하고, 국외인 경우 반드시 국명을 기록. 본 연구과제의 수행결과로 발표한 것만 기재합니다.)					
번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	대한수의학회 추계국제학술대회	이동훈	2013.10.10	The-K 서울호텔	대한민국
2	한국가금학회	이동훈	2013.11.08	서울대학교	대한민국
3	기초의학학술대회 (P143)	이동훈	2014.06.27	서울 코엑스 E홀	대한민국
4	기초의학학술대회 (P144)	이동훈	2014.06.27	서울 코엑스 E홀	대한민국
5	바이오칩학회	김지훈	2014.04.02	롯데시티호텔 제주	대한민국
6	9 <sup>th</sup> International symposium on Avian Influenza	김지훈	2015.04.12	The university of Georgia	미국
7	2015 DASAN Conference	권정훈	2015.10.29	더케이호텔 경주	대한민국

4. 기술거래 및 기술료

기술거래(이전)					
번호	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)

5. 교육 및 지도활용 내역

교육 및 지도활용 내역				
번호	교육명	교재명	주요내용	활용년도
1	조류인플루엔자 바이러스 유전자 분석방법		유전자염기서열 contig 방법 및 phylogenetic tree 작성법 교육	2014
2	DNA chip 실무 워크샵		DNA chip 제작과정 및 결과 해석방법 교육	2014
3	유전자 분석 실무 워크샵		유전자 sequencing 기법의 이해 및 적용	2014

6. 사업화

기술사업화								
번호	제품(상품)명	제품(상품)설명	활용 업체명	사업화 여부	매출 발생여부	제품 매출액	고용 창출	R&D 기여율

7. 기술 및 제품 인증

기술 및 제품 인증						
구 분	인증분야	인증기관	인증내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증번호		

8. 인력활용/양성

연구인력 활용/양성 성과												
번호	분류	기준년도	인력양성 현황									
			학위별				성별		지역별			
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권
1	학위취득	2013	1				1		1			
2	학위취득	2014		1			1		1			
3	취업	2014				Post doc	1					미국

9. 정책활용 내역

정책활용 내역(농정시책 반영 및 정책건의)				
번호	정책활용상태	주관부처	시책추진실적 및 계획	활용년도

10. 홍보/전시

가. 홍보실적

홍보실적(신문, 방송, 저널 등)				
번호	홍보유형	매체명	홍보내용	홍보일자

나. 전시회 등 참여

전시회 등 참여(전시회, 박람회, 제품설명회 등)					
번호	유형	행사명	전시품목	장소	활용년도
1	제품설명회	2014 대한 바이러스학회 및 대한 미생물학회 부스 전시	조류인플루엔자 및 분석법	진단 양양 을지인력개발원	2014
2	제품설명회	2015 바이오칩 학회 부스 전시	조류인플루엔자 용 바이오칩	진단 분당 차바이오 컴플렉스	2015

다. 기타 활용 및 홍보실적

기타 활용 및 홍보실적(단행본 발간, CD 제작 등)			
번호	일자	활용명칭	활용내역
1	2013. 03. 11	유전자원 등록	유전자원 등록: GenBank acc. KC209494-KC209501
2	2013. 05. 31	유전자원 등록	유전자원 등록 GenBank acc. KC693639-KC693646
3	2014. 07. 08	유전자원 등록	유전자원 등록 GenBank acc. DI340572 - DI340654

## 11. 기타

### 가. 국제화 협력성과

국제화 협력성과								
번호	유치기간	국적	학위	전공	과건기간	과건국	학위	전공
-	-	-	-	-	-	-	-	-

### 나. 타 연구개발사업에의 활용

타 연구개발사업에의 활용					
번호	연구사업명	과제명	책임자	과제발주처 (부처)	활용년도
1	AI 상시예찰계획에 따른 AI 항원 항체 검사 위탁 계약“ 연구사업에 활용	AI 상시예찰계획에 따른 AI 항원 항체 검사 위탁 계약	송창선	가축위생방역지원본부	2014
2	개방형연구사업	AI 현장진단 및 모니터링 시스템 검출효율 검증·평가	송창선/이석	한국과학기술원	2014

### 다. 포상 및 수상 실적

포상 및 수상실적					
종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일자	포상기관
-	-	-	-	-	-

## 2절 성과 활용 계획

### 1. 산업화 계획

#### 가. 인플루엔자 subtype 및 pathotype 구분 용 유전자 칩

- 개발된 기술의 동물용의약품 등록 및 농림축산검역본부로부터 부가적인 인플루엔자 진단 기술로 인증 받아 산업화의 기반을 구축할 예정임.
- 시제품의 제품화 및 바이오코아(주) 내 대량생산 시설 구축을 통하여 자체 산업화를 완료 할 계획임.
- 각 AI 검사기관 및 연구시설에 시범사업 적용 후 제품 판매를 통하여 수익을 창출하고자 함.

#### 나. 현장형 진단 장비

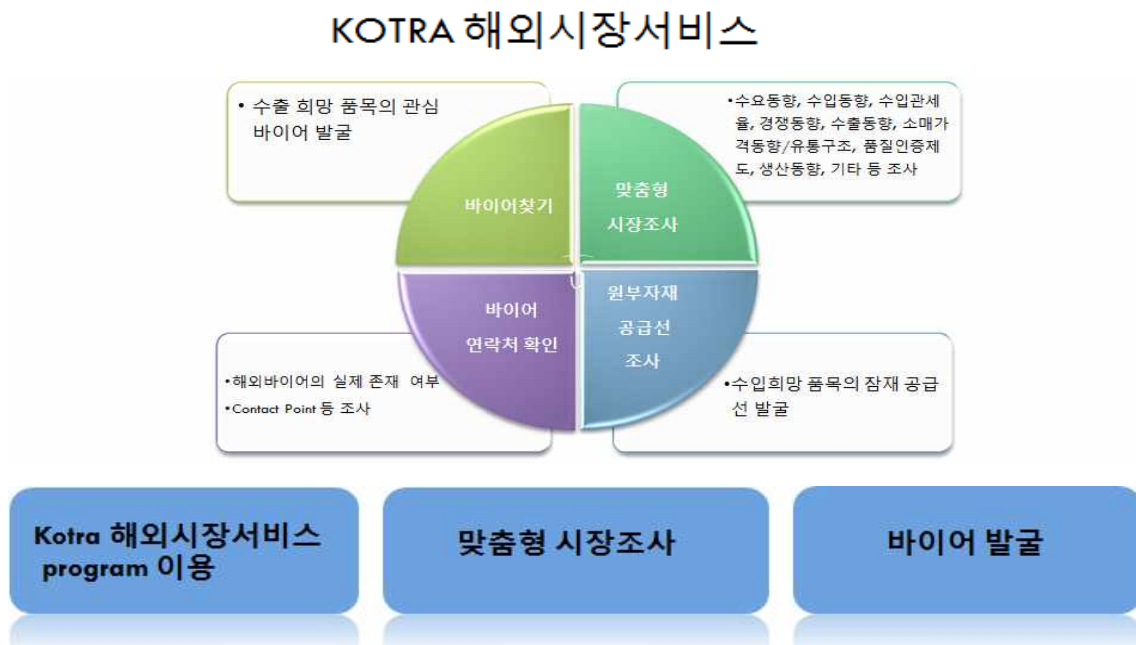
- 각 학회 부스를 통한 현장형 진단 장비의 홍보를 통하여 수요를 조사할 예정이며, 대한과학과의 협조를 통하여 산업화를 완료할 예정임.
- 건국대학교에서 1차적으로 구매 후 사용하여 관련 결과를 추가 도출하고자 함.
- lab 서비스 업체와 판매권 계약을 통한 제품의 산업화 및 판매를 진행하고자 함.



<유전자칩 및 현장진단 장비의 산업화 및 활용계획 모식도>

## 2. 기술확산 계획

- HPAI 발생국인 동남아 시장 및 KOTRA 해외시장서비스를 이용하여 중국을 포함한 동남아시아 및 유럽 등에 관심 바이어를 지속적으로 발굴하여 수출을 확대해나갈 예정이다.





- 수출용 유전자칩 및 내수용 유전자칩 2종류 모두 해외 임상실험 자료를 기반으로 학회 및 기술박람회 등 참석을 통하여 제품홍보를 진행할 예정임.

### 3. 지식재산권 확보계획

#### 가. 특허 확보 계획

- 본 과제를 수행하면서 개발된 유전자칩과 관련하여 ‘조류인플루엔자 바이러스를 고감도로 검사하기 위한 키트, 이를 위한 조류인플루엔자 바이러스 검사용 프로브 조성물 및 유전자 칩, 그리고 이들을 이용한 조류 인플루엔자 바이러스 검사방법’의 주제로 국내 특허 1건 및 PCT 국제 특허 1건을 출원한 상태이며 향후 등록이 완료될 것으로 예상됨.

#### 나. 논문 확보 계획

- 현재 개발된 유전자칩의 임상시료 이용 결과와 관련하여 ‘Simultaneous subtyping and pathotyping of the novel reassortant influenza A (H5N8) virus from clinical samples using a diagnostic microarray.’의 제목으로 Biochip Journal (IF: 1.090)에 투고되어 있으며 내년 초 게재될 것으로 예상됨.
- 최근 발생한 고병원성 H5 subtype 검출용 real-time PCR primer 및 probe 성능에 관한 논문을 작성하여 Archives of Virology (IF: 2.390)에 투고할 예정임.
- 발표된 논문을 바탕으로 제품등록 및 홍보에 이용할 예정임.

### 4. 추가연구 계획

- 현재 개발된 H5 real-time PCR의 성능 향상을 위한 연구를 추가적으로 수행하여 최소 검출농도를 10배 추가적으로 감소시키고자 함.
- 수출용 유전자칩 및 내수용 유전자칩의 해외 임상시험을 추가적으로 실시하여 추가적인 효능 검증을 실시하고자 하며, 이를 통하여 두 가지 유전자칩의 단일화 방안에 대해 연구를 수행하고자 함.
- 개발 제품의 국내 동물용의약품 등록을 위하여 농림축산검역본부와 협의를 통해 추가적인 필요사항에 대한 연구를 수행하고자 함.
- 개발된 현장진단용 장비의 구제역, MERS 등 전파 억제를 위하여 밀폐된 공간에서의 현장진단이 필요한 질병에 대한 적용 가능성에 대한 연구를 수행하고자 함.
- 개발된 현장진단용 장비의 무게 감소를 위하여 케이스 재질 및 관련장비 최소화 방안에 대한 추가 연구를 수행하고자 함.
- 본 개발 제품 적용 가능한 소형 유전자칩 scanner 탐색을 통하여 유전자칩의 현장적용에 대한 연구를 수행하고자 함

### 5. 타 연구 활용 계획

- 본 연구를 통해 개발된 인플루엔자 바이러스 subtype 및 병원성 구분 유전자칩을 KIST ORP 과제를 통해 개발되고 있는 진단차량 (Mobile laboratory)에 적용하고자 함.
- 개발된 real-time PCR 기술을 이용하여 KIST ORP 과제를 통해 개발되고 있는 조류

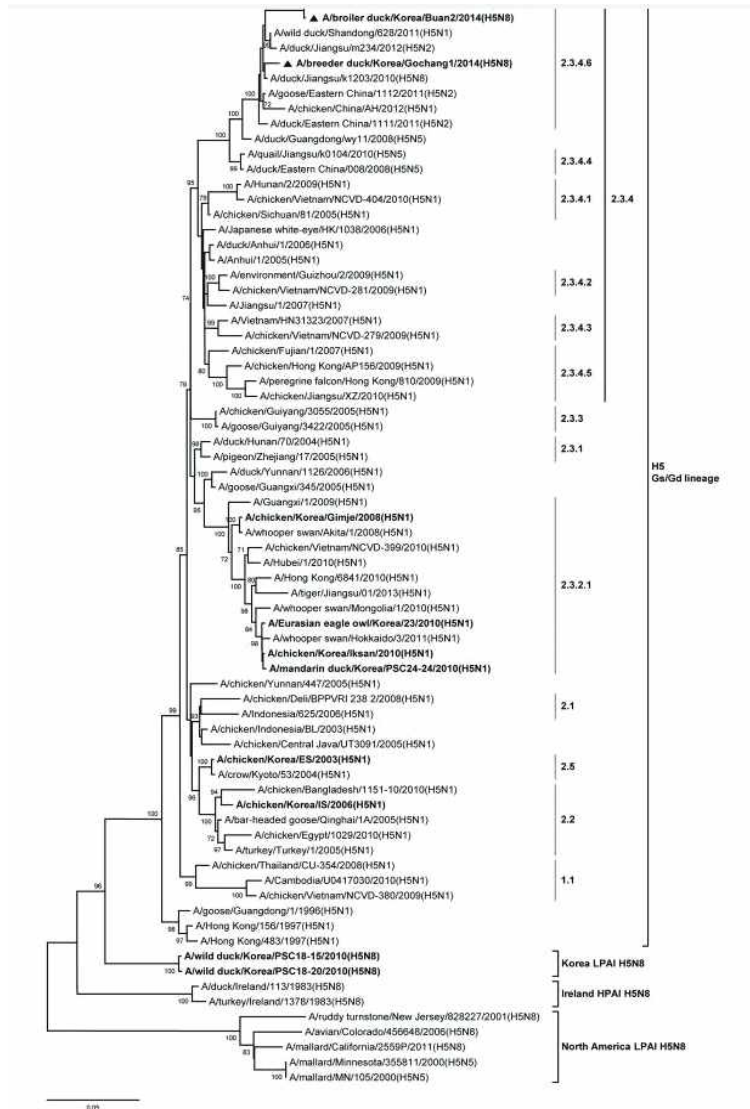
인플루엔자 진단 용 multiplex real-time PCR 기술 개발에 활용하고자 함.

- 개발된 real-time PCR 기술을 통하여 철새 AI 모니터링 과제, AI 상시예찰 사업 등 AI 모니터링 과제에 활용하고자 함.
- 개발된 real-time PCR 기술 및 유전자칩 기술을 통하여 AI 방역조치 후속대책 연구에 활용하고자 함.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. Novel reassortant influenza A(H5N8) viruses, South Korea, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2014 Jun;20(6):1087-9. Lee YJ, Kang HM, Lee EK, Song BM, Jeong J, Kwon YK, Kim HR, Lee KJ, Hong MS, Jang I, Choi KS, Kim JY, Lee HJ, Kang MS, Jeong OM, Baek JH, Joo YS, Park YH, Lee HS.

지난 2014년 전북 동림저수지 주변 고창 종오리 농가와 부안 소재 종오리 농가, 그리고 동림저수지에서 폐사한 가창오리에서 각각 분리한 Avian influenza virus를 분석한 결과, 고병원성 H5N8형으로 밝혀졌다. 부안2와 동림3 바이러스는 서로 99.5%이상 동일했고, 고창1 바이러스는 두 바이러스와 87%~97%의 염기서열 상동성을 보였다. BLAST 분석결과 이 바이러스들은 2010년 중국 장수에서 분리된 H5N8과 2009년에서 2012년 사이에 중국 동부에서 유행하던 다른 subtype들과의 재조합에서 유래된 것으로 보인다. 세 바이러스 모두 H5 clade 2.3.4.6에 속하는 것으로 밝혀졌다.



<그림 6-1. Phylogenetic tree of hemagglutinin (HA) genes of influenza A(H5N8) viruses, South Korea, 2014.>

2. Intercontinental Spread of Asian-Origin H5N8 to North America through Beringia by Migratory Birds. J Virol. 2015 Jun;89(12):6521-4. Lee DH, Torchetti MK, Winker K, Ip HS, Song CS, Swayne DE.

Phylogenetic network analysis와 철새들의 이동경로를 분석한 결과, Clade 2.3.4.4 Eurasian H5N8은 2013년 후반에 중국에서 발생하였으며, 철새들에 의해 2014년 초에는 한국과 일본으로 퍼졌고, 2014년 여름에는 시베리아와 베린지아에 이르렀음이 밝혀졌다. 세 가지의 유전적으로 다른 subgroup이 발생하였으며 각각 다른 철새 이동경로에 의해 2014년 가을경 유럽과 북아메리카, 동아시아에 퍼져나갔다. 3가지 subgroup 모두 유라시아와 북아메리카에서 온 철새들이 월동하는 장소인 일본에서 재발견되었다.

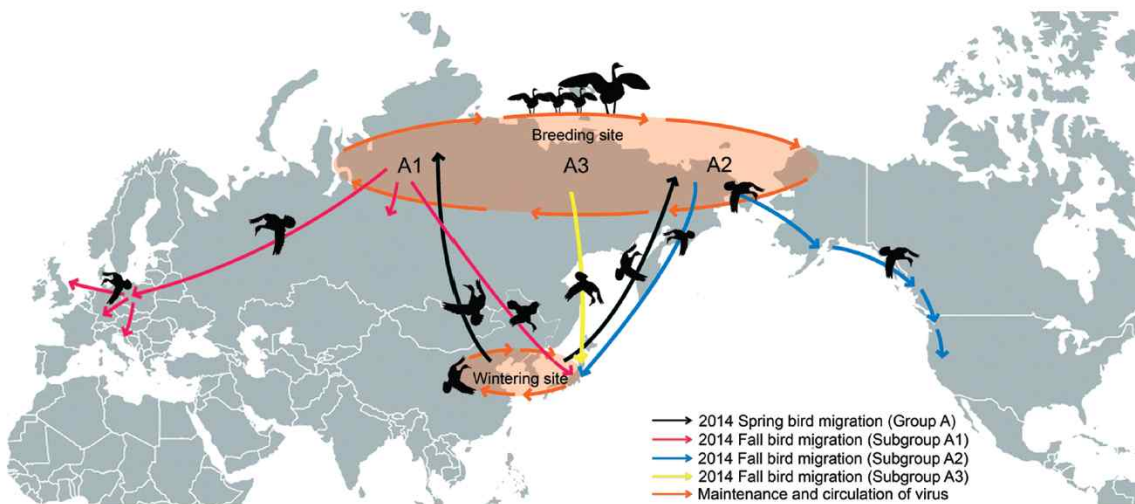


FIG 2 Geographic map showing the movement of H5N8 HPAIV in Asia, Europe, and North America in relation to regional waterfowl migration routes. The map, by Dmthoth, is from Wikipedia Commons ([http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blank\\_Map\\_Pacific\\_World.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blank_Map_Pacific_World.svg)).

<그림 6-2. H5N8 바이러스의 대륙간 전파 모식도>

3. H5 avian influenza virus pathotyping using oligonucleotide microarray. J Virol Methods. 2015 Aug;220:39-42. Wang LC, Huang D, Cheng MC, Lee SH, Wang CH.

고병원성 H5 바이러스는 가금산업에 큰 영향을 주고 있기 때문에, H5형 AI의 발생 시 고병원성과 저병원성 여부를 빠르게 구분하는 것은 매우 중요하다. 본 연구에서는 H5 virus의 특정한 HA gene과 cleavage site에 존재하는 염기성 아미노산 숫자를 oligonucleotide microarray에 의해 확인하였다. 대만에서 분리된 HPAI와 LPAI를 13개의 microarray probe를 사용하여 맨눈으로 구분할 수 있었다. 검출한계는 3.4 RNA copies 였으며 기존의 RT-PCR에 비해 1000배 더 민감한 것으로 확인되었다.

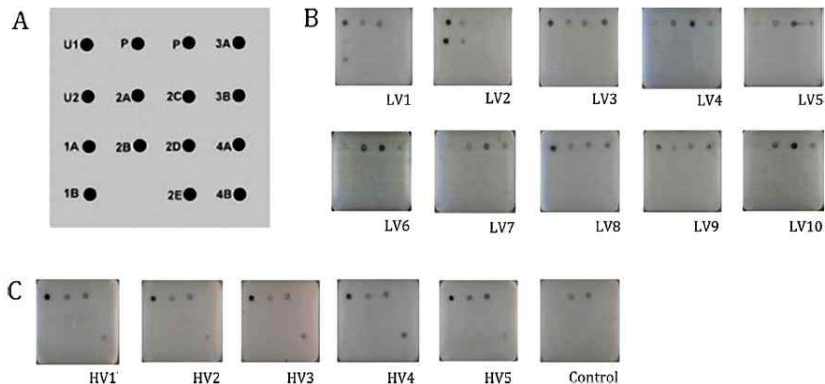
**Table 2**  
Probes used to detect and discriminate the basic amino acid number at the Xn of the PQ-Xn-GLF motif at CS of H5 viruses.

Probe <sup>a</sup>	Sequence (5'-3')	Corresponding amino acids <sup>b</sup>	Basic amino acid number at Xn <sup>c</sup>	AIV strains used in this study
U1 <sup>b</sup>	GAGTGYCCMAARTAYGTSAAAT			
U2 <sup>b</sup>	GAATGYCCCARATAYGTGAAAT			
1A	CCY CAR ATA GAR ACA AGR	PQ- <u>I</u> ETR	1	LV1
1B	CCY CAR GGA GAR ACA AGR	PQ- <u>G</u> ETR	1	
2A	CCY CAR AGA GAR ACR AGA	PQ- <u>R</u> ETR	2	LV2
2B	CCY CAA AAR GAA ACA ARA	PQ- <u>K</u> ETR, PQ- <u>K</u> ETK	2	
2C	CCY MAA ARA GAA RCA AGA	PK- <u>R</u> ETR, PQ- <u>K</u> EAR	2	
2D	CCY CAA AGA RCC ACA ARA	PQ- <u>R</u> ATR, PQ- <u>R</u> ATK, PQ- <u>R</u> TTR	2	
2E	CCA GAG AAT CCA AAG CCC	PE- <u>N</u> KPR	2	
3A	MGA GAA AAA AGA GGM CTA	REKR- <u>G</u> L	3	LV3-LV10
3B	CCY CAA AGA AAA ACA AGA	PQ- <u>R</u> KTR	3	
4A	CCY CAA AGR ARR AAA AGA	PQ- <u>R</u> KKR, PQ- <u>R</u> RKR	4	HV1-HV3HV4-HV5
4B	CCY CAG AAG AAR AAG AGA	PQ- <u>K</u> KKR	4	

<sup>a</sup> Probe 1A, 2A, 3A and 4A were used to detect H5 AIVs in Taiwan; while others were encompassed to detect those rather than Taiwan strains preemptively.

<sup>b</sup> Universal probes. All H5 AIVs can hybridize with either probe U1 or U2, or both.

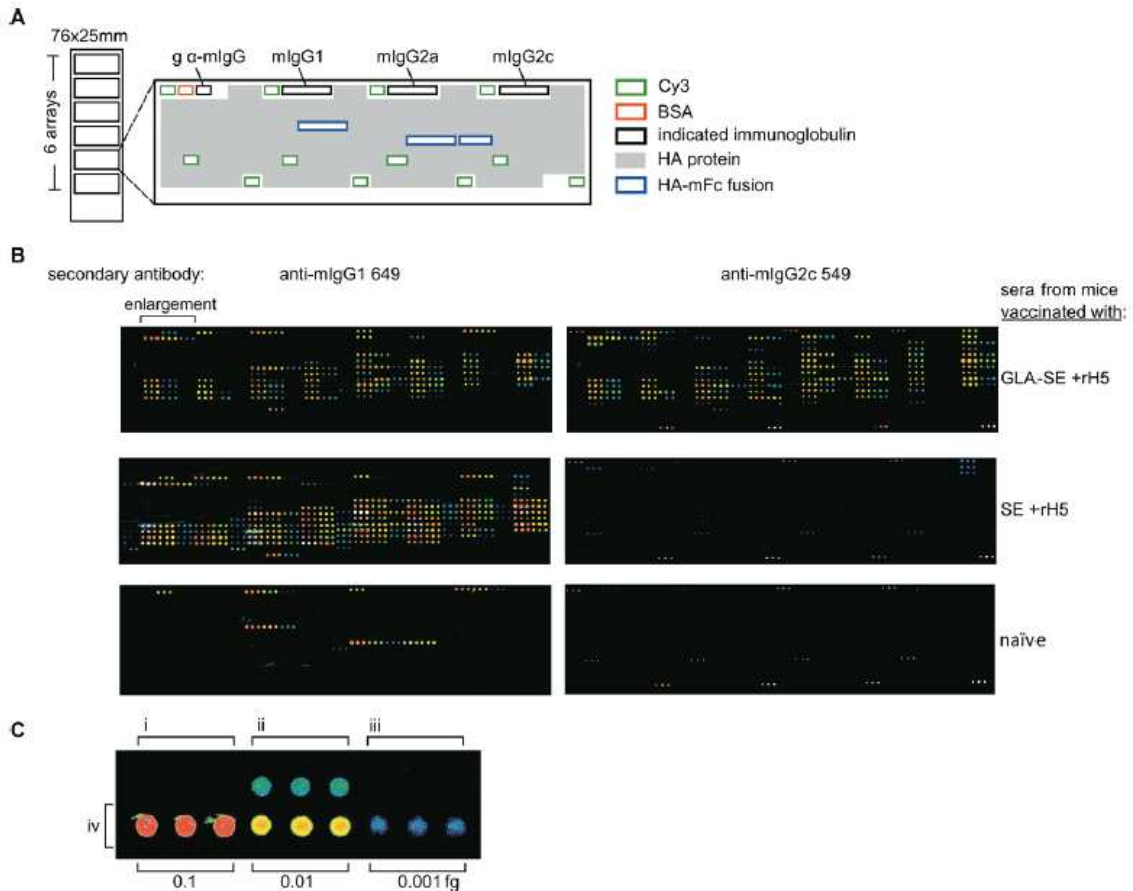
<sup>c</sup> Basic amino acid at the Xn is marked with a bottom line and the number is counted.



<그림 6-3 대만 H5 병원성 분석 용 유전자칩 실험 결과>

4. Development of a high density hemagglutinin protein microarray to determine the breadth of influenza antibody responses. Biotechniques. 2013 Jun;54(6):345-8. Desbien AL, Van Hoeven N, Reed SJ, Casey AC, Laurance JD, Baldwin SL, Duthie MS, Reed SG, Carter D.

본 논문에서는 다양한 인플루엔자 strain에 의해 유도되는 체액성 반응을 확인하기 위한 HA protein microarray를 개발하였다. 각각의 array는 60개의 바이러스로부터 얻어진 127개의 HA antigen을 포함하며 한 array에 1296개의 spot을 포함하도록 구성되었다. 6개의 array가 한 개의 slide를 구성하며, 2개의 isotype 특이적인 형광 이차항체를 사용하여 한 슬라이드에서 15000개 이상의 data를 동시에 추적할 수 있다. 본 논문에서는 이 시스템을 활용하여 마우스, 페렛, 인간 혈청에서 항체반응 정도와 그 항체들의 isotype, 인플루엔자 strain 인식 범위 등을 확인하였다.



<그림 6-4 인플루엔자 HA 검출 용 protein microarray 결과>

5. Rapid molecular haemagglutinin subtyping of avian influenza isolates by specific real-time RT-PCR tests. *J Virol Methods*. 2014 Feb;196:71-81. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.10.031. Epub 2013 Oct 31 Elizalde M1, Agüero M2, Buitrago D2, Yuste M1, Arias ML1, Muñoz MJ1, Lelli D3, Pérez-Ramírez E1, Moreno-Martin AM3, Fernández-Pinero J4.

조류 인플루엔자 바이러스 haemagglutinin(HA) 단백질의 subtype은 현재까지 16가지로 알려져 있으며, 빠른 subtype 판별은 조류 인플루엔자 바이러스의 공중보건학적 중요성을 고려하였을 때 매우 중요하다. 이 논문에서는 H5와 H9을 제외한 14가지 subtype 구분을 위한 14가지 특정 real-time RT-PCR 방법이 개발되고 평가되었다. Eurasian lineage를 주요 목표로 설정하여 각각의 subtype에 대한 프라이머와 프로브가 작성되었다. 복수의 실험실에서 16가지 subtype을 모두 포함하는 110가지 조류 인플루엔자 바이러스에 대하여 새로운 real-time RT-PCR 방법을 시험하였다. 그 결과 임상시료에 직접적으로 HA subtype을 구분할 수 있으며, 높은 특이도와 적절한 민감도를 가지는 것으로 평가되었다.

**Table 4**  
Analytical specificity of the AIV HA-subtype specific real-time RT-PCR methods using the 16 AIV HA-subtypes reference collection.

AIV reference strain	RNA copy no. <sup>a</sup>	Recommended EU M-gene real-time RT-PCR <sup>b</sup>	H1 real-time RT-PCR	H2 real-time RT-PCR	H3 real-time RT-PCR	H4 real-time RT-PCR	H6 real-time RT-PCR	H7 real-time RT-PCR	H8 real-time RT-PCR	H10 real-time RT-PCR	H11 real-time RT-PCR	H12 real-time RT-PCR	H13 real-time RT-PCR	H14 real-time RT-PCR	H15 real-time RT-PCR	H16 real-time RT-PCR
A/Duck/Alb/35/76 H1N1	6.7 × 10 <sup>7</sup>	24.17	21.47	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt
A/Dk/Germ/1215/73 H2N3	7.9 × 10 <sup>6</sup>	28.36	NoCt	26.47	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt
A/Turkey/Eng/69 H3N2	5.2 × 10 <sup>7</sup>	24.58	NoCt	NoCt	20.55	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt
A/Dk/Czech/56 H4N6	2.7 × 10 <sup>7</sup>	24.49	NoCt	NoCt	NoCt	22.81	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt
A/Ost/Den/72420/96 H5N2	8.3 × 10 <sup>6</sup>	28.77	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt
A/Ost/RSA/946/98 H6N8	8.3 × 10 <sup>6</sup>	22.46	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	17.82	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt
A/Tky/Eng/647/77 H7N7	3.7 × 10 <sup>6</sup>	29.7	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	29.76	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt
A/Turk/Ont/6118/68 H8N4	5.1 × 10 <sup>7</sup>	24.93	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	22.12	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt
A/Tky/Wise/1/66 H9N2	4.3 × 10 <sup>7</sup>	24.89	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt
A/RSA/Eg/Goose/238/98 H10N9	1.3 × 10 <sup>7</sup>	27.14	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	26.91	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt
A/Dk/Eng/Eng/56 H11N6	1.6 × 10 <sup>7</sup>	26.41	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	25.44	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt
A/Duck/Alb/60/76 H12N5	7.7 × 10 <sup>7</sup>	23.17	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	20.4	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt
A/Gull/Maryland/704/77 H13N6	6 × 10 <sup>6</sup>	29.57	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	29.89	NoCt	NoCt	NoCt
A/Mal/1/Curj/244/82 H14N6	2.9 × 10 <sup>6</sup>	30.18	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	27.92	NoCt	NoCt
A/SheerW/WA/2576/79 H15N6	3.3 × 10 <sup>7</sup>	25.72	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	24.45	NoCt
A/Gull/Dk/68110/02 H16N3	1.9 × 10 <sup>7</sup>	26.44	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	22.87

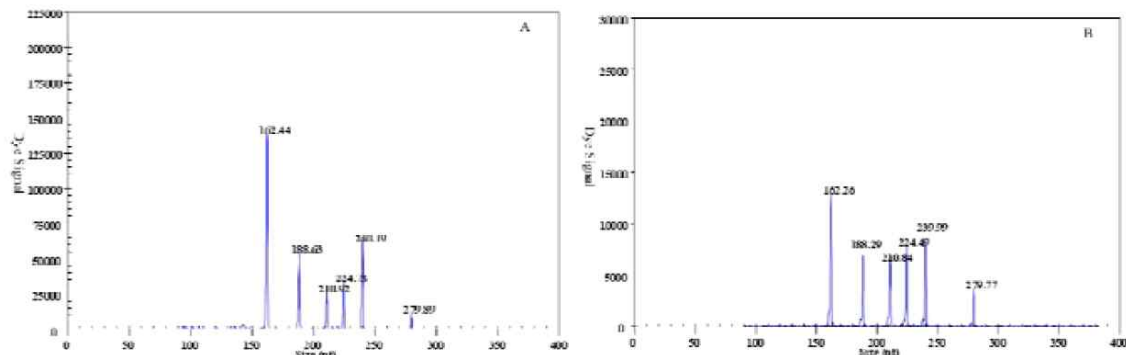
M. Etzold et al. / Journal of Virological Methods 196 (2014) 71–81

AIV reference strains collection was acquired from the European Union Reference Laboratory for AI, Animal Health and Veterinary Laboratories Agency (AHVLA-Weybridge, Addlestone, Surrey, UK).  
<sup>a</sup> Viral RNA obtained from each AIV strain was quantified using a tenfold dilution series generated from the *in vitro* transcribed AIV M-gene RNA standard (1 × 10<sup>8</sup> copies/μl) provided by the European Union Reference Laboratory for AI and the EU recommended AIV M-gene real-time RT-PCR technique (Spackman et al., 2002).  
<sup>b</sup> Ct values obtained from a 10<sup>-1</sup> dilution of each viral RNA running in parallel to HA-subtype specific real-time RT-PCR tests developed in this study and the EU recommended AIV M-gene real-time RT-PCR technique (Spackman et al., 2002) are shown.

<그림 6-5 HA subtype 구분 용 real-time PCR>

6. Simultaneous detection of four different neuraminidase types of avian influenza A H5 viruses by multiplex reverse transcription-PCR using a GeXP analyser. Influenza Other Respir Viruses. 2015 Dec 17. doi: 10.1111/irv.12370. Li M1, Xie Z1, Xie Z1, Liu J1, Xie L 1, Deng X1, Luo S1, Fan Q1, Huang L1, Huang J1, Zhang Y1, Zen T1, Feng J2.

H5N1, H5N2, H5N6, H5N8 등의 H5 subtype에 속하는 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스는 세계 양계산업에 막대한 경제적 피해를 입히며 인수공통전염병으로 발전 가능해 공중보건학적 중요성이 크다. 조류 인플루엔자 바이러스에 감염된 가금류의 조속한 진단을 위해 H5, N1, N2, N6 subtype의 특정 시퀀스에 대해 6벌의 프라이머를 제작하였고, 조류 인플루엔자 바이러스 단독 또는 타 조류 병원체와 혼합한 cDNA/DNA를 대상으로 GeXP 분석기를 이용해 그 특이도를 조사하였다. 또한 GeXP 분석법은 180개 임상 시료를 이용해 real-time RT-PCR 방법과 비교하였다. Multiplex PCR 방법은 뛰어난 특이도를 나타냈고, 알려진 조류 인플루엔자 바이러스의 유전체를 포함하는 혼합된 ssRNA 샘플을 이용했을 때 진단 한계는 10<sup>2</sup>copies/ul로 확인되었다.



<그림 6-6 주요 조류 인플루엔자 subtype 감별 용 multiplex PCR 결과>

7. Development of reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for avian influenza H5N1 HA gene detection. J Virol Methods. 2015 Oct;223:45-9. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.07.011. Epub 2015 Jul 28 Yehia N1, Arafa AS2, Abd El Wahed A 3, El-Sanousi AA4, Weidmann M5, Shalaby MA4

H5N1 조류 인플루엔자 바이러스는 2006년 이집트에서 발생해 막대한 경제적 피해를 유발했다. H5 바이러스의 빠른 진단을 위해 hemagglutinin 유전자를 탐지하는 RT-RPA(reverse transcription recombinase polymerase amplification) 방법을 개발하여 real-time RT-PCR 방법과 비교하였다. RPA는 DNA denaturation을 위한 최초 가열 단계를 생략한 등온 DNA 증폭 방법으로, 대신 recombinase 효소 UvsX를 이용하여 DNA의 이중 나선 내로 들어간다. 이후 Exonuclease 3으로 exo-probe를 절단하여 형광 신호를 발생시킨다. 개발된 H5 RT-RPA 방법은 7분 이내에 RNA를 탐지할 수 있었고, real-time RT-PCR은 최소 90분이 필요했다. 30개의 임상 시료를 이용했을 때, H5 RT-RPA와 real-time RT-PCR 모두 100%의 민감도를 나타냈다.

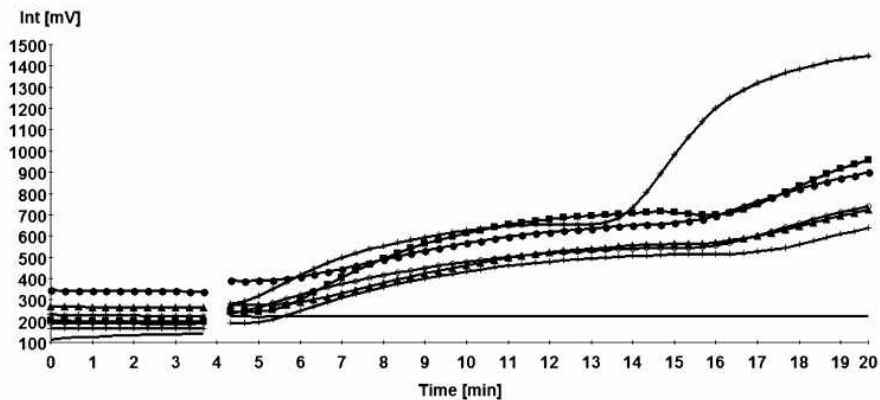


Fig. 1. Sensitivity of H5 RT-RPA assay using *in vitro* transcription molecular standard of a dilution range from  $10^5$  to one molecule of RNA. F3+R1+exo-probe detected down to one RNA molecule represented by dot;  $10^4$ , triangular;  $10^3$ , box;  $10^2$ , star;  $10^1$ , cross;  $10^0$ , circle; negative control, line. After 3 min, a mixing step is used to increase the assay sensitivity. This interrupts reading of the fluorescence signal.

<그림 6-7 H5 RT-RPA 의 H5 gene 에 대한 민감도 분석 결과>

8. Simultaneous detection of novel H7N9 and other influenza A viruses in poultry by multiplex real-time RT-PCR. Virol J. 2015 Apr 30;12:69. doi: 10.1186/s12985-015-0300-x Xu X1, Bao H2, Ma Y3, Sun J4, Zhao Y5, Wang Y6, Shi J7, Zeng X8, Li Y9, Wang X 10, Chen H11

2013-2014년 중국에서 H7N9 조류 인플루엔자 바이러스는 숙주 장벽을 넘어 가금류 뿐만 아니라 인체 감염 사례까지 보고되었다. H7N9 바이러스의 조속한 진단을 위해 H7N9을 포함한 다른 조류 인플루엔자 바이러스까지 탐지할 수 있는 multiplex real-time RT-PCR 방법을 개발했다. 여러 인플루엔자 A 바이러스 및 다른 조류 호흡기 바이러스를 포함하는 1,070가지 시료를 이용해 개발된 방법을 평가하였다. H7과 N9 형광 신호는 H7과 N9 subtype에서만 특이적으로 관찰되었고, 진단 한계는 56 copies/reaction이었다.



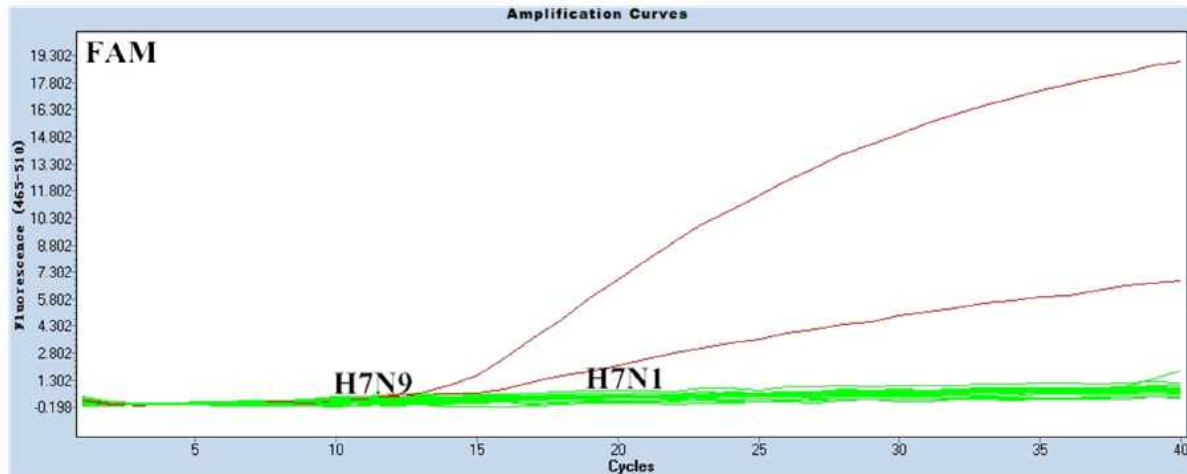


Figure 1 Specificity results of the rRT-PCR assay for the detection of the H7 gene. In the FAM channel, only the two H7 subtype viruses yielded positive curves.

<그림 6-8 H7 및 N9 유전자 검출 용 real-time PCR의 특이도 확인 시험 결과>

9. Development of a diagnostic system for novel influenza A(H7N9) virus using a real-time RT-PCR assay in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2015;68(2):113-8. doi: 10.7883/yoken.JJID.2014.136. Epub 2014 Nov 25 Takayama I1, Takahashi H, Nakauchi M, Nagata S, Tashiro M, Kageyama T

2013년, 중국에서 최초로 H7N9 조류 인플루엔자 바이러스의 인체 감염 사례가 발견된 이후로 확인된 사례는 중국 한정으로 지속적으로 증가하고 있다. H7N9 바이러스를 진단하기 위한 real-time RT-PCR 방법을 개발했고, 높은 특이성과 Eurasian lineage의 다양한 H7 바이러스에 대한 높은 민감도를 나타냈다. 이 방법은 H7N9으로 의심되는 인체 감염 사례의 진단과 조류 및 사람 인플루엔자 바이러스의 감시에도 유용하게 쓰일 수 있다. 이 진단 방법은 일본 74개 행정구역의 16개 검역 본부에서 사용될 수 있다.

10. Influenza A/B virus detection and influenza A virus subtyping with emphasis on the novel H7N9 virus by using multiplex real-time RT-PCR. *J Virol Methods.* 2014 Nov;208:41-6. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.07.020. Epub 2014 Jul 24. Kuo RL1, Yang SL2, Liu YC3, Chen LT3, Mok CK4, Kuo SM4, Shih SR5, Tsao KC6.

H7N9 조류 인플루엔자 바이러스를 감별 진단하기 위해 H7 및 N9 유전자를 목표로 multiplex 및 단독 real-time RT-PCR 방법을 개발하여 평가했다. 또한 pandemic H1N1, H3, H5 진단을 위해 이전까지 개발된 multiplex real-time PCR과 병합해 추가적인 multiplex 방법을 개발했다. 호흡기 감염 사례에서의 임상 시료로 평가한 결과, 100개의 시료 중 23개에서 pandemic H1N1과 H3가 확인되었다.

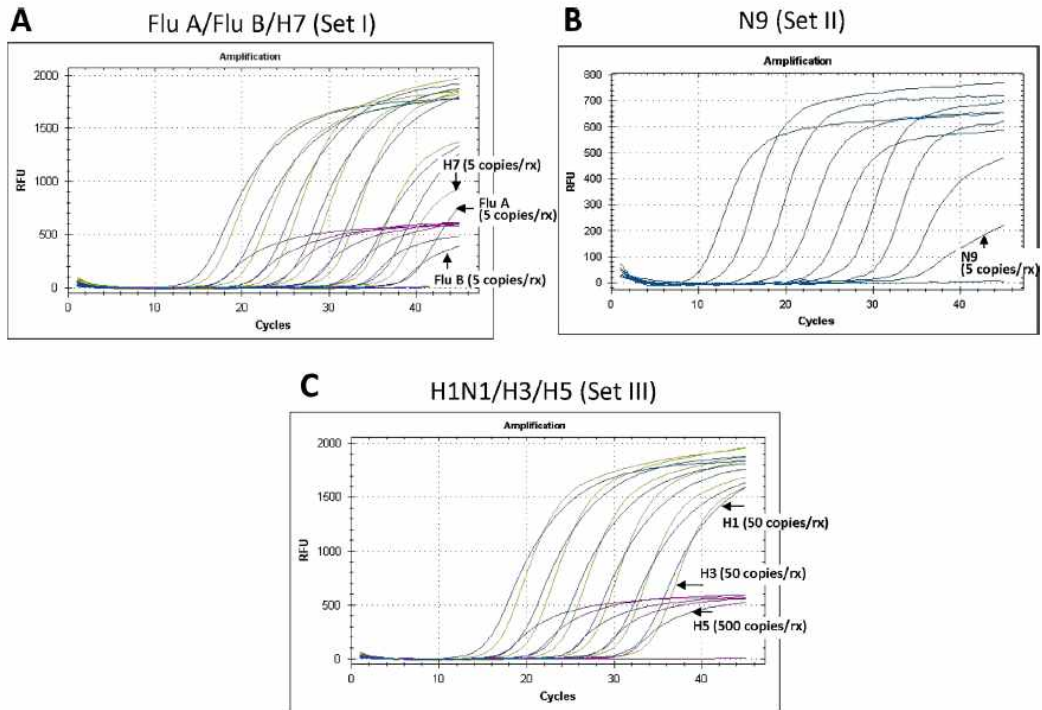


Fig. 2. Plasmid-based dilution rows for (A) Set I (influenza A, influenza B, and H7), ranging from  $5 \times 10^6$  copies/rx to 5 copies/rx of targets; (B) Set II (N9), ranging from  $5 \times 10^8$  copies/rx to 5 copies/rx of target; and (C) Set III (pandemic H1N1, H3, and H5), ranging from  $5 \times 10^6$  copies/rx to 5 copies/rx of targets. rx, reaction.

<그림 6-8 인체 감염형 인플루엔자 바이러스 검출 용 multiplex PCR>

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

해당 없음

## 제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

- 모든 병원체는 건국대학교 생물안전 위원회의 ‘실험실 생물 안전관리 지침’에 따라 Biosafety cabinet 안에서 안전하게 실험을 진행함.
- 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스의 경우 신규 분리한 바이러스는 농림축산검역본부에 분리 신고를 하였으며, 산업통산자원부에 ‘생물작용제등 제조변경신고서’를 제출한 후 BSL-3 실험실에서 건국대학교 SOP에 따라 Biosafety cabinet을 이용하여 안전하게 실험을 진행 함.
- 모든 연구수행자는 건국대학교에서 진행하는 동물윤리교육 및 생물안전교육 이수 후 실험을 진행함.
- 본 실험실은 LMO 관리 실험실로 등록이 되어 있으며 건국대학교 생물안전위원회에서 제공하는 ‘생물 및 유전자변형생물체 연구시설 설치·운영·관리 점검표’를 기준으로 매일 점검을 실시함.
- 연구수행 중 발생한 모든 감염성 폐기물은 건국대학교 생물안전위원회에서 제공하는 ‘감염성 폐기물 지침서’에 따라 감염성 폐기물 전문 처리 업체인 (주)부국크린에 양도하여 안전하게 처리함.
- 이외 모든 사항은 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」에 따른 연구실 안전조치를 성실히 이행하였으며, 「건국대학교 생물안전위원회 표준작업지침서」에 따라 모든 연구를 수행함.

## 제 9 장 참고문헌

1. Sonnberg, S., R.J. Webby, and R.G. Webster Natural history of highly pathogenic avian influenza H5N1. *Virus research* 178:63-77. 2013.
2. Lee, Y.J., H.M. Kang, E.K. Lee, B.M. Song, J. Jeong, Y.K. Kwon, H.R. Kim, K.J. Lee, M.S. Hong, I. Jang, K.S. Choi, J.Y. Kim, H.J. Lee, M.S. Kang, O.M. Jeong, J.H. Baek, Y.S. Joo, Y.H. Park, and H.S. Lee Novel reassortant influenza A(H5N8) viruses, South Korea, 2014. *Emerging infectious diseases* 20:1087-1089. 2014.
3. Hanna, A., J. Banks, D.A. Marston, R.J. Ellis, S.M. Brookes, and I.H. Brown Genetic Characterization of Highly Pathogenic Avian Influenza (H5N8) Virus from Domestic Ducks, England, November 2014. *Emerging infectious diseases* 21:879-882. 2015.
4. Harder, T., S. Maurer-Stroh, A. Pohlmann, E. Starick, D. Horeth-Bontgen, K. Albrecht, G. Pannwitz, J. Teifke, V. Gunalan, R.T. Lee, C. Sauter-Louis, T. Homeier, C. Staubach, C. Wolf, G. Strebelow, D. Hoper, C. Grund, F.J. Conraths, T.C. Mettenleiter, and M. Beer Influenza A(H5N8) Virus Similar to Strain in Korea Causing Highly Pathogenic Avian Influenza in Germany. *Emerging infectious diseases* 21:860-863. 2015.
5. Lee, D.H., M.K. Torchetti, K. Winker, H.S. Ip, C.S. Song, and D.E. Swayne Intercontinental Spread of Asian-Origin H5N8 to North America through Beringia by Migratory Birds. *Journal of virology* 89:6521-6524. 2015.
6. Swayne, D.E., G. Pavade, K. Hamilton, B. Vallat, and K. Miyagishima Assessment of national strategies for control of high-pathogenicity avian influenza and low-pathogenicity notifiable avian influenza in poultry, with emphasis on vaccines and vaccination. *Revue scientifique et technique* 30:839-870. 2011.
7. Spackman, E., D.A. Senne, L.L. Bulaga, T.J. Myers, M.L. Perdue, L.P. Garber, K. Lohman, L.T. Daum, and D.L. Suarez Development of real-time RT-PCR for the detection of avian influenza virus. *Avian diseases* 47:1079-1082. 2003.
8. Yoo, S.M., J.H. Choi, S.Y. Lee, and N.C. Yoo Applications of DNA microarray in disease diagnostics. *Journal of microbiology and biotechnology* 19:635-646. 2009.
9. Dawson, E.D., C.L. Moore, D.M. Dankbar, M. Mehlmann, M.B. Townsend, J.A. Smagala, C.B. Smith, N.J. Cox, R.D. Kuchta, and K.L. Rowlen Identification of A/H5N1 influenza viruses using a single gene diagnostic microarray. *Analytical chemistry* 79:378-384. 2007.
10. Lee, D.H., I.H. Chung, M.R. Roh, H.J. Lee, Y.J. Lee, J.W. Jung, J.B. Lee, S.Y. Park, I.S. Choi, Y.H. In, S.Y. Hwang, and C.S. Song A Diagnostic Microarray for Subtyping and Pathotyping Avian Influenza Virus. *Biochip J* 3:57-64. 2009.
11. Townsend, M.B., E.D. Dawson, M. Mehlmann, J.A. Smagala, D.M. Dankbar, C.L. Moore, C.B. Smith, N.J. Cox, R.D. Kuchta, and K.L. Rowlen Experimental evaluation of the FluChip diagnostic microarray for influenza virus surveillance. *Journal of clinical microbiology* 44:2863-2871. 2006.

12. Vasin, A.V., N.T. Sandybaev, M.A. Plotnikova, S.A. Klotchenko, O.V. Cherviakova, V.M. Stochkov, E.T. Tailakova, O.A. Temkina, A.V. Brodskaia, A. Zabrodskaia Ia, K.P. Nikulenkov, V.V. Egorov, K. Koshemetov Zh, A.R. Sancyzbai, and O.I. Kiselev [Universal diagnostic oligonucleotide microarray for subtyping of human and animal influenza A viruses]. *Voprosy virusologii* 58:32–37. 2013.
13. Lee, D.H., J.H. Kim, Y.N. Lee, J.K. Park, S.S. Yuk, J.W. Jung, S.Y. Hwang, Y.J. Lee, H.M. Kang, J.G. Choi, J.B. Lee, S.Y. Park, I.S. Choi, and C.S. Song Simultaneous subtyping and pathotyping of the 2010–2011 South Korean HPAI outbreak strain by using a diagnostic microarray. *Biochip J* 5:369–374. 2011.
14. Lee, D.H., J.H. Kim, S.S. Yuk, J.H. Kwon, H. Cho, S.Y. Hwang, H.M. Kang, Y.J. Lee, S.W. Lee, I.S. Choi, and C.S. Song Rapid hemagglutinin subtyping of novel avian-origin influenza A (H7N9) virus using a diagnostic microarray. *Biochip J* 8:55–59. 2014.
15. Hoffmann, E., J. Stech, Y. Guan, R.G. Webster, and D.R. Perez Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of virology* 146:2275–2289. 2001.
16. Gu, M., W. Liu, Y. Cao, D. Peng, X. Wang, H. Wan, G. Zhao, Q. Xu, W. Zhang, Q. Song, Y. Li, and X. Liu Novel reassortant highly pathogenic avian influenza (H5N5) viruses in domestic ducks, China. *Emerging infectious diseases* 17:1060–1063. 2011.
17. Zhao, G., X. Gu, X. Lu, J. Pan, Z. Duan, K. Zhao, M. Gu, Q. Liu, L. He, J. Chen, S. Ge, Y. Wang, S. Chen, X. Wang, D. Peng, H. Wan, and X. Liu Novel reassortant highly pathogenic H5N2 avian influenza viruses in poultry in China. *PloS one* 7:e46183. 2012.
18. Zhao, K., M. Gu, L. Zhong, Z. Duan, Y. Zhang, Y. Zhu, G. Zhao, M. Zhao, Z. Chen, S. Hu, W. Liu, X. Liu, D. Peng, and X. Liu Characterization of three H5N5 and one H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses in China. *Veterinary microbiology* 163:351–357. 2013.
19. Conraths, F.J., C. Sauter-Louis, A. Globig, K. Dietze, G. Pannwitz, K. Albrecht, D. Horeth-Bontgen, M. Beer, C. Staubach, and T. Homeier-Bachmann Highly Pathogenic Avian Influenza H5N8 in Germany: Outbreak Investigations. *Transboundary and emerging diseases*. 2015.
20. Jhung, M.A., D.I. Nelson, C. Centers for Disease, and Prevention Outbreaks of avian influenza A (H5N2), (H5N8), and (H5N1) among birds--United States, December 2014–January 2015. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 64:111. 2015.

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

## 특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

<b>신청과제명</b>	유전자칩 및 real-time PCR을 이용한 검역용 신속 조류인플루엔자 검출시스템 개발		
<b>주관연구책임자</b>	<b>최 인 수</b>	<b>주관기관</b>	건국대학교

### 1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
조류인플루엔자 신속진단	미국	50	50	100	
진단용 유전자칩	미국	50	50	100	

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
- 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
- 4) 부가설명이 필요한 경우 비교란에 작성

### 2. 특허분석

#### 가. 특허분석범위

본 분석에서는 연구 성과의 파급효과 및 연구의 필요성을 고려하여 신청 기술인 [조류 인플루엔자 신속진단]과 관련되며, ~ 2015년 12월까지 공개된 주요 출원국(한국, 일본, 미국, 국제특허)에 출원된 특허를 분석 대상으로 하였음

#### 1. 검색 DB

[표 1-2] 분석에 사용된 특허 검색 DB의 종류

자료 구분	국 가	검색 DB	분석구간	검색범위
공개·등록특허 (공개·등록일 기준)	한국 (KIPO)	WINTELIPS DB	~ 현재(2015년 12월)	특허공개 및 등록 요약, 전체청구항
	미국 (USPTO)	WINTELIPS DB		특허공개 및 등록 요약, 전체청구항
	일본 (JPO)	WINTELIPS DB		특허공개, 특허공개(공표), 특허공개(재공표) 요약, 전체청구항
	국제특허 (WIPO)	WINTELIPS DB		특허공개 및 요약, 전체청구항

### 3. 검색식

[표 1-3] 조류인플루엔자 백신 / 조류인플루엔자 진단 기술에 대한 검색식

기술명	검색식
조류인플루엔자 진단 기술	(조류인플루엔자 조류독감 ((조류* 닭 오리* 칠면조* 가금* avian* chicken* duck* turke* poultr*) adj (인플루엔자* 바이러스* influenz* virus*))) and (진단 키트 탐색 diagnos* kit* detect*)

### 4. 기술분류

[표 1-4] 조류인플루엔자 백신 / 조류인플루엔자 진단 기술에 대한 기술분류

기술명	코드	Raw Data				Real Data			
		한국	일본	미국	국제	한국	일본	미국	국제
조류인플루엔자 진단 기술	A	80	105	177	56	27	29	43	26

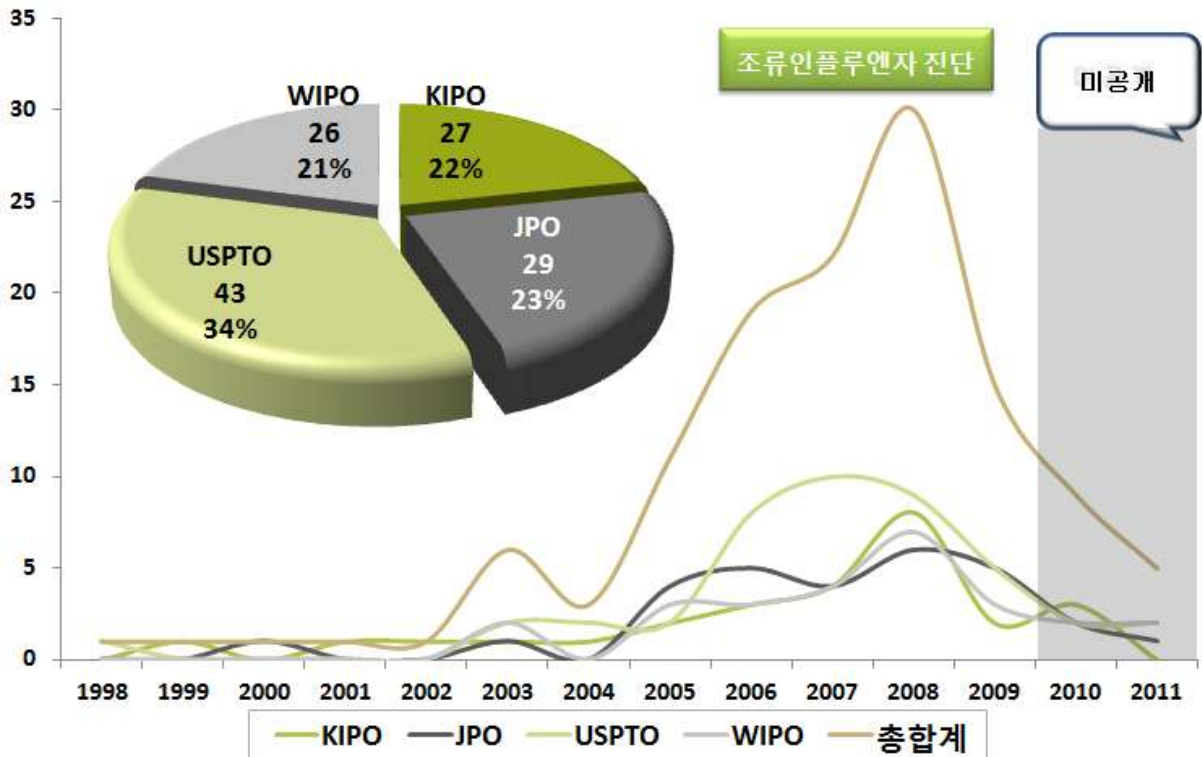
### 5. 공동출원 특허 권리 배분 기준

공동출원의 경우, 공동출원인에서 기여분을 고려하여 제 1출원인을 기준으로 가산하였음



## 나. 특허동향

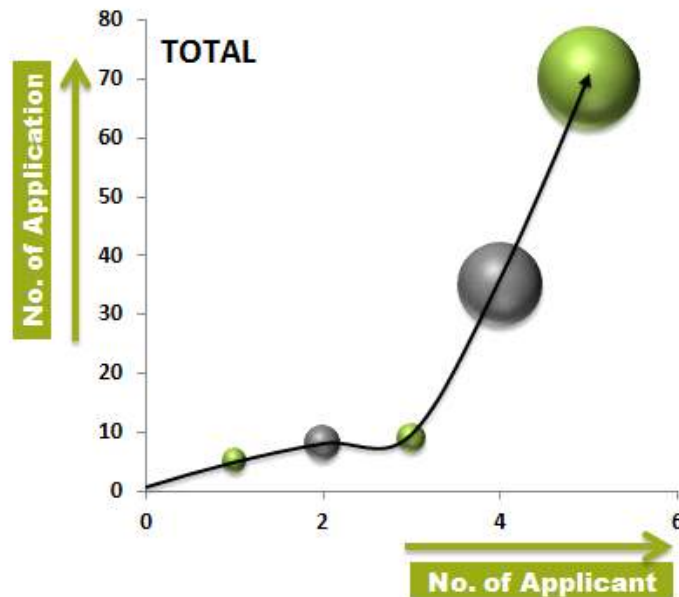
### 1. 전체 특허 동향



[그림] 조류인플루엔자 진단 기술에 대한 연도 구간별 기술동향

- 조류인플루엔자 진단 기술은 1998년부터 출원되기 시작하였으며, 2008년에 최대 출원량을 보이고 있으며, 조류인플루엔자를 진단할 수 있는 항원을 포함하는 진단 키트 등에 기술이 출원되고 있음
- 조류인플루엔자 진단 기술분야의 국가별 출원동향에서는 미국 34%로 가장 많은 비중을 차지하였고, 그 다음으로는 일본 23%, 한국 22%, 국제특허 21% 순으로 출원되고 있는 것으로 확인되었음

## 2. 기술시장 성장단계 파악

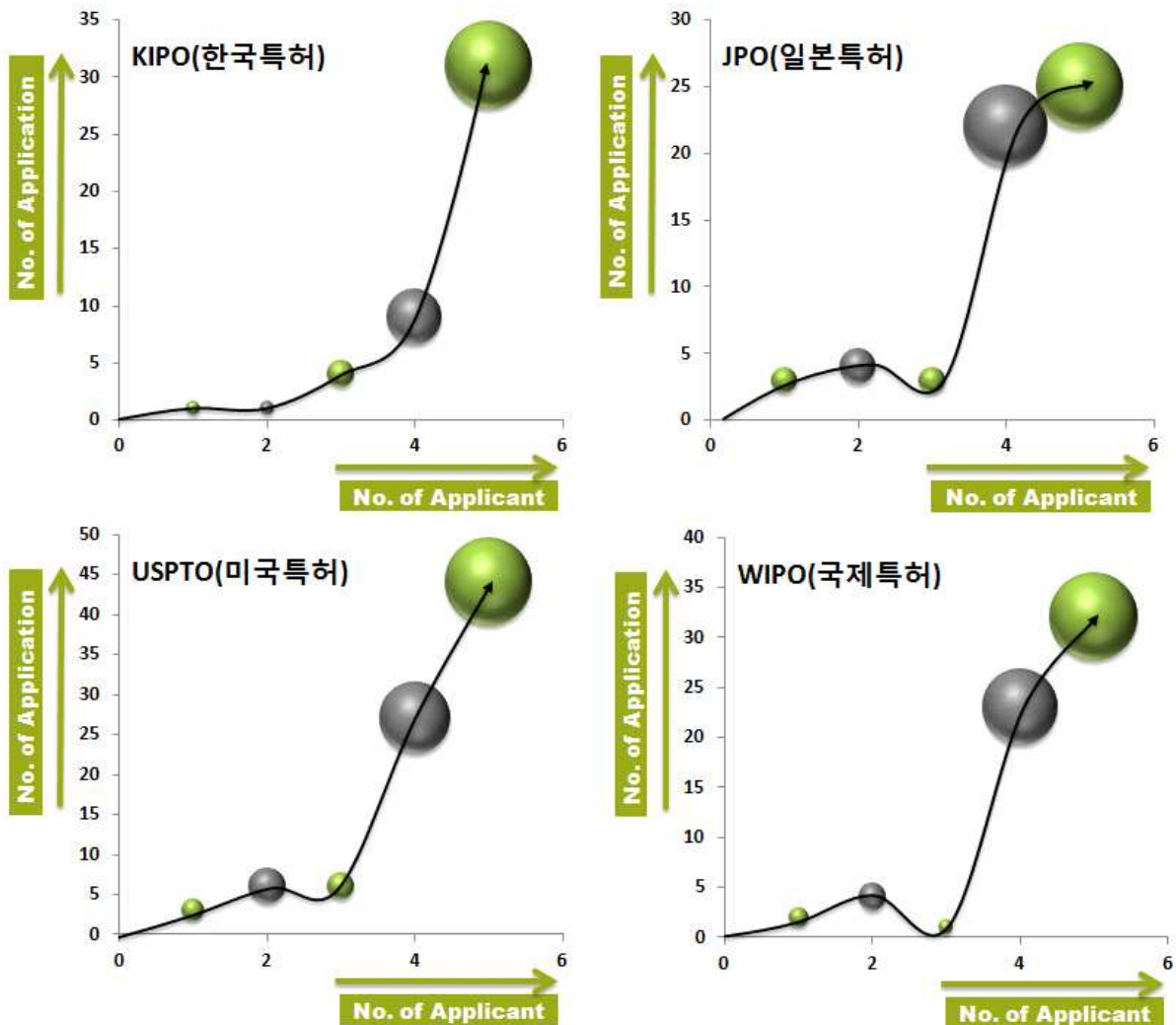


[그림] 기술시장 성장단계

(기술구간 : 1구간(1991~1994), 2구간(1995~1998), 3구간(1999~2002), 4구간(2003~2006), 5구간(2007~2010))

- 조류 인플루엔자와 관련된 기술분야의 기술의 위치를 포트폴리오로 나타낸 전체 출원년도에서 최근부터 20년을 5개의 구간으로 나누어 각각의 구간별 특허 출원인수 및 출원건수를 나타내어 특허 출원 동향을 통한 기술의 위치를 살펴볼 수 있음. 각 구간은 1구간(1991~1994), 2구간(1995~1998), 3구간(1999~2002), 4구간(2003~2006), 5구간(2007~2010)으로 나누었음
- 포트폴리오로 나타낸 전체특허의 기술위치는 출원건수와 출원인수가 증가하는 발전기의 단계에 있으며, 특히 3구간(1999~2002)과 4구간(2003~2006) 사이에서 급

격한 발전을 보이고 있는 것으로 보아, 최근의 관련 기술의 발달이 급격히 이뤄지고 있는 것으로 파악됨

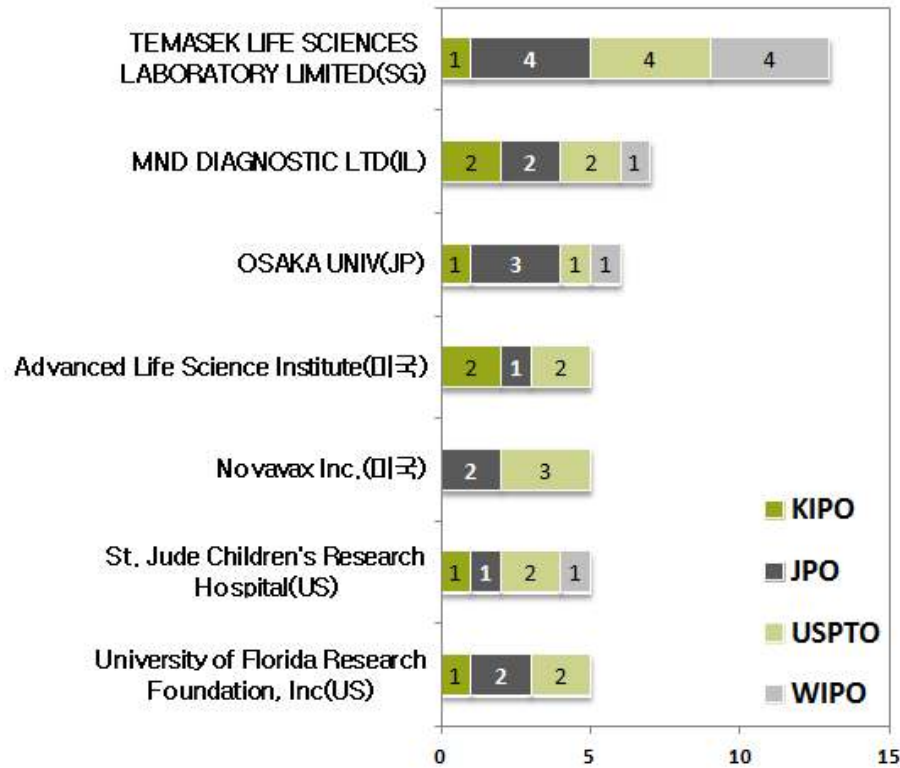


[그림 2-70] 각 국가별 기술시장의 성장단계  
(기술구간 : 1991~1994, 1995~1998, 1999~2002, 2003~2006, 2007~2010)

- 한국의 경우, 출원인수와 출원건수가 증가하는 발전기의 단계인 것으로 나타났으며, 특히 4구간(2003~2006)과 5구간(2007~2010)사이에서 급격하게 증가하는 경향을 보이는 것으로 보아, 한국은 다른 국가의 비해 조류인플루엔자 기술연구 늦게 확산된 것으로 판단됨
- 일본, 미국, 국제특허의 경우, 2구간(1995~1998)과 3구간(1999~2002)사이의 다소 감소하는 경향을 보이다가, 3구간(1999~2002)과 4구간(2003~2006)사이의 급격한 증가는 경향을 보이고 있음

### 3. 기술동향

#### 조류인플루엔자 진단



[그림] 조류인플루엔자 진단 기술에 대한 다출원인의 기술별 특허동향

- 조류인플루엔자 진단 기술에서 주요경쟁자별 출원 현황을 살펴보면, 싱가포르 국적의 TEMASEK LIFE SCIENCES LABORATORY LIMITED가 13건으로 가장 다수의 출원을 보이고 있으며, 출원국가에서는 일본(JPO), 미국(USPTO), 국제특허(WIPO)에 동일한 비율로 출원하고 있는 것으로 파악되었음
- 이스라엘 국적의 MND DIAGNOSTIC LTD은 총 7건의 특허를 출원하고 있으며, 한국(KIPO), 일본(JPO), 미국(USPTO)에 동일한 비율로 출원하고 있는 것으로 파악되었음
- 일본 국적의 OSAKA UNIV는 한국, 일본, 미국, 국제특허 모두 고르게 출원을 보이고 있으며, 특히 자국인 일본에 가장 많은 특허 출원 비율을 보이고 있는 것으로 파악되었음
- 그 외의 출원으로 미국 국적의 Advanced Life Science Institute, Novavax Inc, St. Jude Children's Research Hospital, University of Florida Research Foundation, INC가 있으며, 모두 자국인 미국의 출원비율이 높은 것으로 확인되었음

### 3) 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		조류인플루엔자 유전자 진단	조류인플루엔자 <i>Real-time PCR</i>
Keyword		조류인플루엔자, 진단, 유전자	Avian influenza, real-time PCR
검색건수		122	15
유효특허건수		4	1
핵심특허 및 관련성	특허명	A KIT FOR DETECTING NON-PATHOGENIC OR PATHOGENIC INFLUENZA A SUBTYPE H5 VIRUS	뉴캐슬병 바이러스 검출 및 병원성 진단용 프라이머 및 상기 프라이머를 포함하는 뉴캐슬병 바이러스 검출 및 병원성 진단용 키트
	보유국	홍콩	대한민국
	등록년도	2010	2004
	관련성(%)	70	50
	유사점	조류인플루엔자 바이러스의 유전자를 추출하고 증폭하여 H5 아형의 바이러스를 진단함	real-time PCR을 이용한 조류 RNA 바이러스의 신속진단 기술임
	차이점	대상 아형 (H5, H7, H9)이 다르며, 본 특허는 NASBA 기술을 기반으로 하여 ECL검출법으로 진단하는 반면, 연구사업에 사용될 기술은 보다 실용적인 Real-time PCR 및 Biochip을 이용하는 기술임.	본 특허는 제1종가축전염병인 뉴캐슬병의 신속 진단을 위한 진단용 primer 및 kit를 개발한 기술로 사용하고자 하는 기술은 유사하나 대상 바이러스가 상이함.

### 3. 논문분석

#### 가. 논문분석 범위

(예시)

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

#### 나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		조류인플루엔자 유전자 진단	조류인플루엔자 <i>Real-time PCR</i>
Keyword		avian influenza, diagnosis, microarray	avian influenza, real-time pcr, diagnosis
검색건수		32	123
유효논문건수		13	15
핵심논문 및 관련성	논문명	Rapid haemagglutinin subtyping and pathotyping of avian influenza viruses by a DNA microarray	Rapid diagnosis of avian influenza virus in wild birds: use of a portable rRT-PCR and freeze-dried reagents in the field.
	학술지명	J Virol Methods.	J Vis Exp.
	저자	Gall A등	Takekawa JY등
	게재년도	2009	2011
	관련성(%)	70	70
	유사점	DNA microarray 기술을 이용하여 조류인플루엔자 바이러스의 혈청형 감별을 하는 기술임	현장형 조류인플루엔자 진단용 real-time PCR 기술 및 키트를 개발함.
차이점	현장형 진단장비가 아닌 전문 실험실내에서 고가의 장비를 이용해야 함	야생조류를 대상으로 개발된 기술로, 본 과제에서 연구하고자 하는 공항·항만 검역용 진단기술과는 상이함.	

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효논문건수는 검색한 논문 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 논문을 의미
- 3) 핵심논문은 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 논문을 기준으로 분석

#### 4. 제품 및 시장 분석(최신의 자료로 작성하되, 반드시 출처 명시)

##### 가. 생산 및 시장현황

- 수의면역진단제품의 국내시장규모는 2007년 기준, 약 19억원이고 국외시장의 경우에는 아시아 시장 중 가장 큰 시장인 중국과 인도네시아 면역진단제품시장의 규모는, 2004년 기준으로 약 28억원 규모임을 감안하여 세계 수의면역진단시장의 연평균성장률(%CAGR = 4.9%)로 2007년 기준 환산 시 약 34.8억원 규모이다.

▶ 출처

- 국내: 한국동물약품협회, 국립농산물품질관리원 농업정보통계 '07.09
- 국외: 통계청 자료 2004, VETERINARY VACCINES - Global Industry Analysts, Inc. 2007

##### 나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

###### 1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- 국가재난형 동물전염성 질병인 고병원성조류인플루엔자의 검역·검출에 필요한 신속하고 user-friendly한 유전자칩을 제작하여 산업화를 이루는 것이 연구개발의 방향이다.

- 본 개발기술 제품의 특징은 최신 분자생명 기술인 real-time PCR 및 유전자칩을 사용하여 공항·항만에서 가장 문제시 되고 있는 밀반입 동물 및 육류제품을 대상으로 하는 현장성 및 실용성 있는 검역·검출 가이드라인 및 kit제품을 상품화하고자 한다.

- 비전문가도 쉽게 실험을 수행하고 결과를 판독할 수 있는 전용 장비 및 프로그램을 개발하여 보급하여 국내·외 산업재산권 출원을 목표로 한다.

###### 2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목	산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과				1,000	2,000	3,000	6,000
경제적 파급효과					550,000*	550,000	1,100,000
부가가치 창출액							
합 계				1,000	552,000	553,000	1,106,000

\*2008년 고병원성조류인플루엔자 살처분 보상금 추정액

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

## 5. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

### 가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

#### 1) 특허분석 측면

- Real-time PCR을 이용한 조류 인플루엔자 진단기술과 관련된 특허 검색 결과, 국내에는 뉴겟슬병에 대한 Real-time PCR기술 및 키트에 관한 특허 이외에 조류인플루엔자 바이러스 진단 real-time PCR 기술은 검색되지 않았다. 향후 본 사업단의 참여기업과의 협력을 통해 현장형 real-time PCR 가이드라인의 국내 특허를 출원할 계획이다.
- 유전자칩 기술을 이용한 조류인플루엔자 신속진단 기술에 관한 특허는 국내에는 전무한 실정이다. 본 연구과제에서는 본 연구팀의 유전자칩 선행연구기술을 바탕으로 감도가 높은 현장형 조류인플루엔자 유전자칩 산업화를 목표로 하고 이에 관한 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획이다.

#### 2) 논문분석 측면

- 기존 진단 유전자칩 논문은 인간 인플루엔자 바이러스 진단 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 조류인플루엔자 검역용 유전자칩 개발을 방향으로 연구를 추진하여 논문 등을 Journal of clinical microbiology학술지 등에 게재할 계획임.
- 기존 현장형 real-time PCR에 관련된 논문은 철새 예찰을 대상으로 한 연구에 치우쳐 있으므로, 본 연구과제에서는 공항 및 항만 등에서 실용성 있는 밀반입 조류, 수정란, 휴대육 등에 적합한 검출법을 연구하여 Journal of virological methods학술지에 게재할 계획임.

#### 3) 제품 및 시장분석 측면

- 국내 및 국외시장 분석결과 조류인플루엔자 항원rapid 진단키트 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 현재 연구목적으로의 사용으로만 사용되고 있으며 검출한계 등에 개선이 요구되고 있으므로, 본 연구과제에서는 최신 분자생물학적 기법을 도입하는 동시에 현장성 있는 제품의 개발을 방향으로 연구를 추진하여 공항·항만 등의 현장 요구형 유전자칩 및 real-time PCR kit제품을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임.



## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축 질병대응기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.