

(옆면)

(앞면)

32005
6-02

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 발간등록번호(O)
가축질병대응기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004016-01

ASF 신속 분자진단법 효율성 향상

최종보고서

2021

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

ASF 신속 분자진단법 효율성 향상

2022. 04. 15

주관연구개발기관 / 엠젠플러스(주)
공동연구개발기관 / 강원대학교산학협력단

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “ASF 신속 분자진단법 효율성 향상”(개발기간 : 2020.04.29. ~ 2021.12.31.)
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 04. 15

주관연구개발기관명 : (주)엠젠플러스 (대표자) 조상환 (인)
공동연구개발기관명 : 강원대학교 산학협력단 (대표자) 장철성 (인)
참여기업명 : (대표자) (인)



주관연구책임자 : 강 정 택
공동연구책임자 : 김 현 욱
참여기업책임자 :

국가연구개발혁신법 시행령 제33조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		가축질병대응기술개발사업				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
내역사업명 (해당 시 작성)						연구개발과제번호		116085-3
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB0710	50 %	2순위 LB0701	30 %	3순위 LC0204	20%	
	농림식품 과학기술분류	1순위 RB0201	50 %	2순위 RB0203	30 %	3순위 RB0101	20%	
총괄연구개발명 (해당 시 작성)								
연구개발과제명		ASF 신속 분자진단법 효율성 향상						
전체 연구개발기간		2020. 4. 29. - 2021. 12. 31. (1년 9개월)						
총 연구개발비		총 716,001천원 (정부지원연구개발비: 537,000천원, 기관부담연구개발비 : 179,001 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)						
연구개발단계		기초[] 응용[<input checked="" type="checkbox"/>] 개발[] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]	기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표()			
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)								
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)								
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		유전자가위 (CRISPR/CAS) 기술의 2차절단 부수효과 (collateral effect)를 활용하여 채취된 시료내 극미량의 ASFV DNA 핵산을 초고감도로 진단하는 시스템을 개발하고 ASF 검출/진단용 금나노입자 응집 기반 육안 감지 가능 및 높은 감도를 가지는 검출 플랫폼을 탑재하여 현장시료로부터 신속하고 민감한 ASFV 검출 진단기법을 개발하여 현장진단 가능 및 진단효율성 향상					
	전체 내용		1) 최신 핵산검출 기법인 HUDSON (Heating Unextracted Diagnostic Samples to Obliterate Nucleases) 기법과 최신 핵산 증폭기술인 RPA (Recombinase Polymerase Amplification) 기법을 활용하여 채취된 현장시료에서 극미량의 핵산 검출 및 초고감도 증폭기법을 정립함 2) 검출·증폭된 핵산에 CRISPR/CAS system이 가진 2차절단 부수효과 (collateral effect)를 적용하여 목표 핵산의 특성에 따라 CAS12a 단백질을 활용한 DNA 절단 시스템이 탑재된 진단 플랫폼을 개발함. 3) 개발된 플랫폼에 ASFV의 DNA가 포함된 시료를 반응시켜 형광 발현을 통한 진단 유효성을 평가하고 육안진단 시스템을 확립함. 4) ASFV 검출/진단용 금나노입자 응집 기반 육안 감지 가능 및 높은 감도를 가지는 검출 플랫폼을 개발하여 기개발된 진단시스템과 결합하여 현장적용 가능한 키트화 제조. 5) ASFV 시료 확보 및 현장시료를 통한 개발제품 유효성 평가 진행					
	1단계 (해당 시 작성)	목표						
	내용							

	n단계 (해당 시 작성)	목표	
		내용	

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유전자가위 기술의 2차절단 부수효과를 활용하여 현장에서 채취한 다양한 시료를 대상으로 ASFV를 포함한 질병을 신속하고 민감하게 검출할 수 있는 진단기법 개발 ○ 첨단기법을 활용한 진단기법 개발에 따른 논문 및 특허성과와 이를 바탕으로 진단 키트 개발이 이루어지면 사업화로까지 이어질 수 있음 ○ 사업화 계획 <ul style="list-style-type: none"> - 과제 종료 이듬해부터 인허가를 준비하고 제품허가후 국내시장에 진출하여 시장점유율 1% 예상시 연간 10억원의 매출발생 예상 - 개발종료 후 2년이 지난 시점부터 본격적으로 해외시장 개척 후 아프리카돼지열병 상재국가인 중국·베트남 등지에 영업망 확대 계획
--------	--

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 사회문화적 효과 <ul style="list-style-type: none"> - 전염성이 강한 국가재난형 바이러스성 질병에 대한 조기 예찰 및 예방이 가능해짐으로써 사회경제적 비용을 절감하고 건강한 보건의료 보장 및 양질의 사회의료 서비스를 제공할 수 있음 ○ 과학기술적 효과 <ul style="list-style-type: none"> - 본 연구로 확립되는 과학기술의 성과들은 국내외적으로 각광받고 있는 획기적인 진단시스템의 개발 및 관련 기술의 진보에 기여할 수 있으며, 전염성 질병극복의 중요한 토대가 될 것임 ○ 산업경제적 효과 <ul style="list-style-type: none"> - 국내에서 유전자가위의 부수효과를 활용한 현장 조기 진단 시스템 개발 연구는 전무한 형편으로, 본 연구를 통해 보다 선제적으로 진단시스템을 개발하고 이를 진단키트로 상품화에 성공한다면 고부가가치 창출 및 바이오 신성장 산업 육성이 기대됨
---------------------	---

연구개발성과의 비공개여부 및 사유

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	2	1										
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	아프리카 돼지 열병			등온증폭법		유전자가위		질병진단		유전자편집		
영문핵심어 (5개 이내)	ASF			Isothermal amplification		CRISPR CAS		Disease diagnostics		gene editing		

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	6
2. 연구개발과제의 수행 내용 및 결과	23
3. 목표 달성도 및 차후대책	47
4. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	52
5. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	52

제1장 연구개발과제의 개요

1절 연구개발 목적

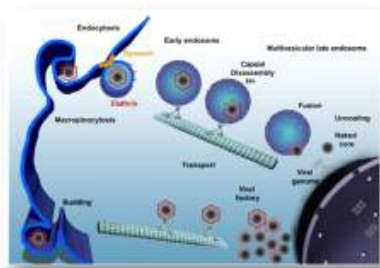
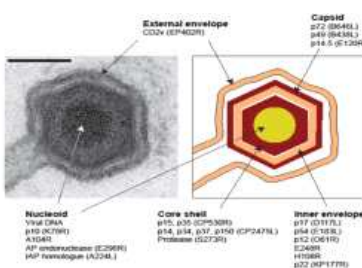
본 과제는 아프리카돼지열병 (ASF) 질환을 타겟으로 신속정확한 분자진단법을 구축하고 이의 효율성을 향상하는데 그 목표를 두고 있으며 해당 연구의 제안 배경과 용도 및 적용분야, 필요성은 다음과 같다.

1. 제안배경

가. 아프리카돼지열병 진단

○ 아프리카 돼지열병

- 아프리카 돼지열병(African Swine Fever, ASF)은 치명적인 바이러스성 출혈성 돼지 전염병이며, 이병률이 높고 급성형에 감염되면 치사율이 거의 100%에 이르기 때문에 양돈 산업에 엄청난 피해를 주는 질병임. 현재 아프리카 돼지열병에 대한 치료제도 백신도 없어 대부분 국가에서 신속한 살처분 정책을 시행하고 있는 실정임. 따라서, 이 질병이 발생하면 세계동물보건기구(OIE)에 발생 사실을 즉시 보고해야 하며 돼지와 관련된 국제 교역도 즉시 중단해야 하고, 우리나라에서는 이 질병을 가축전염병 예방법상 제1종 법정전염병으로 지정하여 관리하고 있음.
- 사람이나 다른 동물은 감염되지 않고 돼지과에 속하는 동물에만 감염되는데, 사육돼지와 유럽·아메리카 대륙의 야생멧돼지가 자연 숙주이며, 아프리카 지역의 야생돼지인 혹멧돼지(warthog), 숲돼지(giant forest hog) 또는 bushpig는 감염이 되어도 임상증상이 없어 아프리카돼지열병 바이러스의 보균숙주 역할을 하고 있음. 돼지 말고는 유일하게 Ornithodoros spp. 에 속하는 물렁 진드기(soft tick)가 이 바이러스를 보균하고 있다가 돼지나 야생멧돼지를 물어서 질병을 전파하는 역할을 하는 매개체로 작용함



[아프리카돼지열병 바이러스의 특성 및 감염된 돼지의 임상증상]

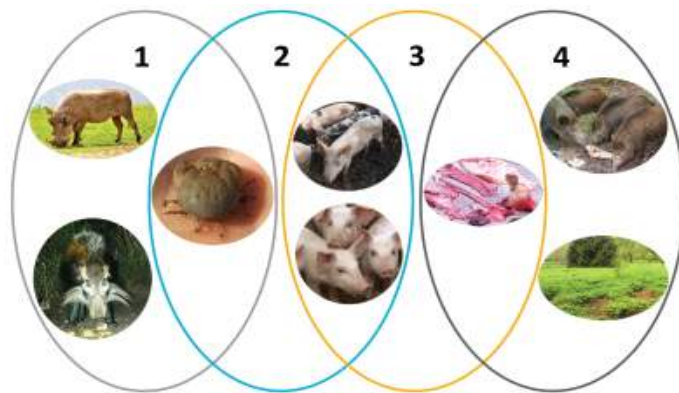
- 아프리카에서 1920년대부터 발생해왔으며 대부분의 사하라 남부 아프리카 지역에 풍토병으로 존재하고 있음. 유럽, 남아메리카 등에도 과거에 발생해서 결국엔 대부분 근절이 되었지만 스페인, 포르투갈에서는 1960년대에 풍토병으로 되어 이 질병을 완전히 근절하는

데 30년 이상이 걸렸으며, 이탈리아의 사르디니아 섬에는 1978년 이후 아직까지 풍토병으로 남아 있음.

- 2007년에 아프리카돼지열병이 조지아 공화국을 통해 유럽으로 유입된 이래 이 지역 사육 돼지와 야생멧돼지에 바이러스가 널리 전파됨으로서, 현재 다수의 동유럽 국가들에 풍토병으로 존재하며, 사육돼지와 야생돼지 집단이 널리 감염된 러시아 연방의 일부 지역에서도 풍토병으로 존재하고 있음
- 2018년 1월~5월까지 세계동물보건기구(OIE)에 보고된 총 14개 발생국 중 10개국이 유럽 국가들이고, 나머지 4개국이 아프리카 국가들임

○ 바이러스 전파 경로

- 돼지 열병바이러스의 주요 감염 요인은 감염된 동물과의 직접 접촉, 오염된 차량이나 사료를 매개로 하는 감접 접촉, 아프리카 돼지 열병에 감염된 진드기 등을 통한 매개체 전파, 보균종인 멧돼지와 접촉 등을 통해 이루어 질 수 있음.



[아프리카 돼지 열병의 주요 전파 경로]

- 아프리카 돼지 열병은 감염된 동물과의 직접 접촉 시 발생함. 감염성이 있는 침, 호흡기 분비물, 오줌과 분변에 바이러스가 대량 존재하기 때문에 이러한 물질과 접촉하면 효과적으로 전파될 수 있음. 돼지들끼리 싸우는 중에 흘린 피, 혈액이 섞인 설사 등으로 인해 환경에 바이러스가 대량으로 오염될 수 있음.
- 아프리카 돼지 열병 바이러스는 얼린 고기에서 1000일 동안 살아 있기 때문에 사료가 아닌 음식물 잔반을 먹일 경우 병을 옮길 가능성이 높아짐. 과거에 비발생 지역으로 바이러스가 유입된 경로는, 특히 공항에서, 열처리 되지 않은 돼지고기 잔반을 돼지에 급여하여 발생한 경우가 많았음.
- 실제로 중국에서 발병한 돼지열병 44%가 잔반사육농가에서 나온 것이 확인됨. 잔반사료는 80도에서 30분간 가열해야하지만 현장에선 제대로 지켜지지 않고 있음. 사일리지, 건초 같은 가열하지 않은 사료, 옥수수 같은 건조된 사료용 곡물에 바이러스가 생존 가능함으로 발생국에서 유래된 원료가 섞이지 않았는지 확인이 필요함.
- 아프리카 돼지열병 바이러스를 보균하고 있는 물렁 진드기(soft tick)가 돼지나 야생멧돼지를 물어서 질병을 전파하는 역할을 하는 매개체로 작용하기도 함.

○ 아프리카돼지열병 바이러스의 국내유입

- 2018년 8월에 중국으로부터 유입되어 중국과 국경을 맞대고 있는 베트남, 라오스, 태국 등 아시아 여러 국가의 양돈 산업에 위협을 초래. 특히, 최근 발표된 논문에 따르면 중국과 한국의 국경지역에서 아프리카돼지열병 바이러스가 보고되어 국내유입의 위험성이 보고되었고 국내에서도 2019년도부터 지금까지 지속적으로 발생하고 있음.
- 최근 베트남에서 아프리카돼지열병(ASF) 발생이 처음으로 확인되면서 ASF가 발생하지 않았던 동남아시아에까지 병이 상륙하면서 아시아 전역으로 확산되는 양상이 나타나고 있으며 아시아 국가의 아프리카돼지열병 발생 현황을 보면 베트남 211건, 중국 115건, 몽골 11건, 캄보디아 1건 등이며 이는 점차 확대되고 있는 추세임.

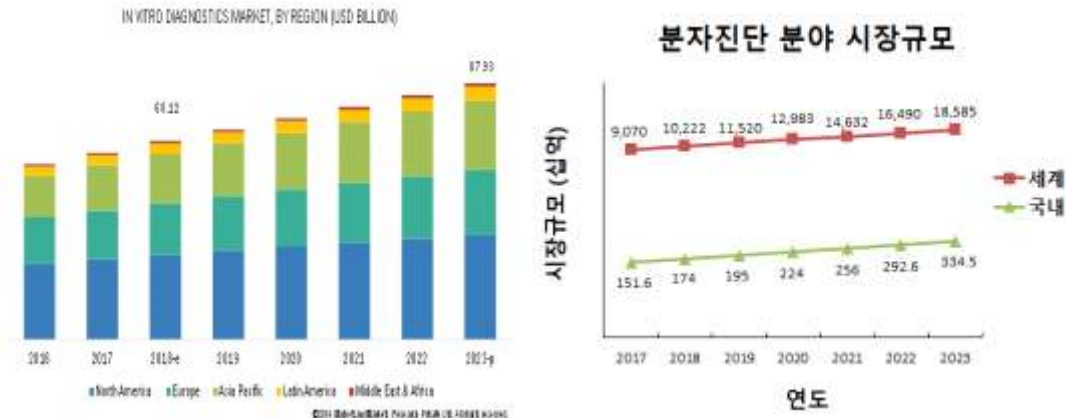
○ 아프리카돼지열병의 진단법

- 아프리카돼지열병의 실험실적 진단법으로는 혈액 및 내부 장기에서 바이러스를 검출하는 방법과 감염돈의 혈청에서 항체를 검출하는 방법이 있음. 바이러스 검출법으로는 중합효소연쇄반응(PCR)을 비롯하여 직접면역형광법(DIFT), 항원검출 ELISA가 있음. 또한, 가검물에서 직접 바이러스를 분리하여, 혈구흡착검사를 통해 ASFV의 존재여부를 확인할 수 있음.
- 바이러스 분리를 위한 혈액은 초기 발열 증상이 있을 때 채혈한 검체가 이상적이며, 비장 및 림프절과 같은 장기는 냉장상태로 실험실에 의뢰하면 됨. 감염돈의 혈청을 이용한 항체검출법은 OIE-ELISA(간접법)와 상용화된 항체검출용 ELISA를 이용하여 1차 선별검사를 진행하고 면역탁본법(IB), 면역과산화효소시험(IPT), 간접형광항체법(IFA)을 통해 최종 평가할 수 있음.
- 항체 검사용 혈청은 감염 후 8~21일 이내의 회복기 돼지 검체가 좋으며, 용혈된 검체는 위양성 반응을 나타낼 수 있으므로 판독에 주의해야 함. ASF는 질병의 진행 단계가 빠르고 다양하며 불현성 감염된 돼지도 존재할 수 있으므로 실험실에서는 반드시 항원 및 항체검사를 함께 수행하여 정확하게 감염여부를 파악해야 함.

나. 체외 진단기기 개발 개요

- 사람이나 동물로부터 혈액, 조직, 침, 콧물, 분변 등의 시료를 채취하여 검사 목적에 따라 체외에서 신속하게 진단해내는 기술 분야를 체외진단이라고 하며, 면역화학적 진단, 자가 측정, 현장진단, 분자진단 기술이 핵심 기술 분야라고 할 수 있음.
- 인구의 고령화 진행 및 지속적인 만성 감염질환의 유행으로 인해 체외진단 기기시장이 커질 것으로 예상되며, 소량의 검사 대상물을 이용하여 비교적 간단한 과정을 통해 정확한 진단을 할 수 있는 진단방법 및 기기 개발들에 대한 요구가 커지고 있음.
- 세계 체외진단기기 시장은 2018년 기준으로 약 681억 달러에서 2023년 879억 달러로 연평균 5.2%의 성장을 할 것으로 예상되고, 지역별로는 북미에서 가장 큰 시장을 형성하고 있고 유럽과 아시아 태평양 지역도 큰 규모를 형성하고 있음. 국내 체외진단 시장은 2018년 9,713억 원에서 2023년까지 1조 4,094억원으로 성장할 것으로 추정됨.

- 특히, 분자진단 분야의 세계시장은 2017년 약 90억 달러 규모로 추산되며, 2023년에는 약 186억 달러(연평균 12.7%성장) 규모의 시장을 형성할 것으로 예상되고, 국내의 경우 1,516억 (2017년) 규모에서 연평균 12.7%씩 성장하여 2023년에는 3,345억원의 시장이 형성될 것으로 추정됨.



세계 제외진단기기 시장규모(좌), 분자진단 분야 시장규모(우)
(출처: In vitro diagnostics market, MarketsandMarkets Analysis, 2018)

- 감염성 질환은 전 세계 분자진단 시장에서 2017년 기준 60%로 가장 큰 점유율을 차지하고 있으며, 가장 크게 성장할 것으로 예상되고 있음.



그림. 분자진단 분야 어플리케이션에 따른 시장규모 및 전망
(출처: fortune business insights; molecular-diagnostics-market 2019)

→ 치료중심에서 예방중심으로 보건의료분야 트렌드가 변화하면서 제외진단기기 시장이 주목받고 있는 가운데 특히 분자진단기기 시장이 급성장을 거듭할 것으로 예상됨

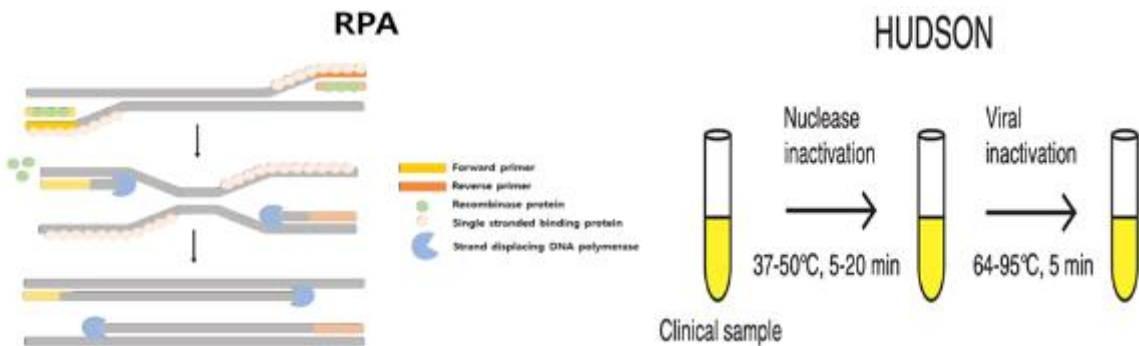
○ 분자진단 중요성

- 분자진단은 DNA와 RNA 등의 핵산을 분석해 질병을 찾아내는 것으로, 혈액, 소변, 조직, 척수액 등 여러 체액시료에서 핵산 서열을 찾아낼 수 있으며, 기존의 일반 진단 방법보다 감도가 뛰어나고 감염병, 유전병 및 암 진단은 물론 질병의 특성에 관련된 여러 정보를 제공할 수 있는 분야임.
- 신종 바이러스 출현은 관련 시장의 성장기회 요인이 되고 있고, 차세대 염기서열 분석 및 유전자편집 기술 등 기타 독창적인 유전체 분석기술의 적용으로 고속성장이 기대되는 분야임.

- 최근 헬스케어 시장은 빠른 진단과 그 결과에 따른 치료를 요구하고 있는 추세로 현장 진단 분야는 특히 빠른 검사결과가 필요한 검사종목들을 비롯해 숙련된 인력이 아닌 일반 검사자가 수행해도 오류가 없도록 기술을 개발, 다른 종목으로 확대되는 추세임.

○ 분자진단 방법

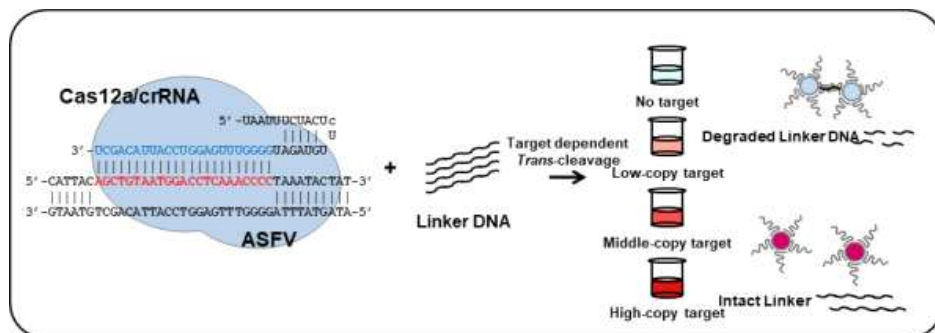
- 체외진단은 기술적 분류에 따라 크게 현장에서 즉시 검사하여 결과를 확인할 수 있는 Rapid kit, 항원-항체 반응을 이용한 ELISA와 같은 면역학적 진단, 사람이나 동물 또는 감염병 원인체의 유전정보가 담긴 핵산(RNA, DNA)을 이용하여 질병 감염 여부나 병적인 상태를 구분할 수 있게 하는 분자진단(ex,PCR) 등으로 나뉨.
- 분자진단의 대표적인 기술 분야는 중합효소연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction, PCR), 실시간 PCR (Realtime PCR), 유전자 염기서열검사 (DNA sequencing), 마이크로 어레이 (Microarray)가 있음. 핵산증폭 기술 (Nucleic acid amplification technology) 은 소량의 핵산을 검출하고 분석하는 방법을 일컬으며 PCR 기술은 주형이 되는 DNA 혹은 RNA로부터 Taq polymerase 를 이용하여 원하는 타겟 유전자만을 연속하여 증폭시키는 기술로, 민감도가 좋아 소량의 핵산에 대해서도 검출할 수 있는 대표적인 분자진단법으로 전염병, 유전 질환 등을 검출하고 동정하기 위해 널리 사용되고 있음.
- 이러한 고전적인 기술들에 대한 대안으로 최근 떠오른 것이 등온증폭법이며, 등온증폭법은 반응 온도를 변화시킬 필요 없이, 단일 온도 (상온 또는 65 °C 이하의 고온)에서 표적 유전물질의 증폭이 가능하므로 고가의 온도조절장치를 필요로 하지 않으며 일반적 PCR에서는 구현이 어려운 현장진단에 용이하다는 장점이 있음.
- 등온증폭법의 일종인 RPA (Recombinase polymerase amplification) 기법은, Primer와 재조합효소(recombinase) 로 이루어진 복합체가 DNA 이중가닥에 결합하면서 만들어진 틈으로 DNA 가닥 치환활성이 있는 중합효소가 새로운 DNA 가닥을 합성함. 25°C에서 42°C까지의 비교적 낮은 온도에서 20분 내의 짧은 반응 시간 동안 표적 유전 물질의 양을 1011 배까지 증폭할 수 있으나 반응 조건이 까다로운 단점이 있음.
- HUDSON (heating unextracted diagnostic samples to obliterate nucleases) 기법은, 소변, 타액 등 현장시료에 존재하는 바이러스 입자를 직접 용해, 일반적으로 많이 존재하는 RNase를 열, 화학적 환원을 이용하여 불활성화하는 기법으로, 시료에서 핵산을 추출할 필요 없이 직접 바이러스의 진단이 가능함.



최신핵산증폭 RPA 기법 (좌), 최신핵산검출 HUDSON 기법 (우)

○ 유전자가위의 2차절단 부수효과

- 최근 각광받고 있는 크리스퍼-카스 (CRISPR-CAS) 유전자가위 기술은 제한효소 메커니즘을 응용하여 특정 유전자의 DNA를 잘라 유전자 기능을 교정하는, 유전체 교정분야에 있어서 획기적인 기술로 개발되어 다양한 분야에서 사용되고 있음. 크리스퍼-카스 (CRISPR-CAS) 시스템은 guide RNA 와 카스 단백질의 복합체로 구성되어 있으며, 짧은 염기서열을 지닌 guide RNA가 특정 DNA 시퀀스에 결합하게 되면 카스 단백질이 결합된 부위를 절단하는 방식으로 작동하게 됨. 이러한 절단 기법을 활용하면 원하는 유전자를 결손 (knock-out) 하거나 원하는 위치에 유전자를 삽입 (knock-in) 하는 자유로운 유전체 편집이 가능함.
- CRISPR-CAS system 부수효과 (collateral effect) : CRISPR과 복합체를 이루는 CAS 단백질은 여러 종류가 있는데 그중 CAS12a 와 CAS13a 는 CRISPR 가 결합된 시퀀스를 절단할 뿐만 아니라 주변에 존재하는 DNA 나 RNA 형태의 핵산을 무작위적이며 비특이적으로 절단하는 2차절단 부수효과 (collateral cleavage activity effect)를 가지고 있음. 이러한 부수효과를 유도할 목적으로 CRISPR-CAS 복합체를 반응시킬 때 reporter를 DNA나 RNA 형태로 같이 넣어주게 되면 부수효과에 의해 주변의 reporter 까지 절단되게 됨. 이러한 reporter 제작시 형광물질을 탑재하여 reporter 가 절단될 때 형광이 발현되게끔 하면 부수효과에 의해 외부에서 육안적으로 형광발현을 확인할 수 있게 됨.



<유전자가위 2차부수절단효과를 이용한 타겟검출 원리>

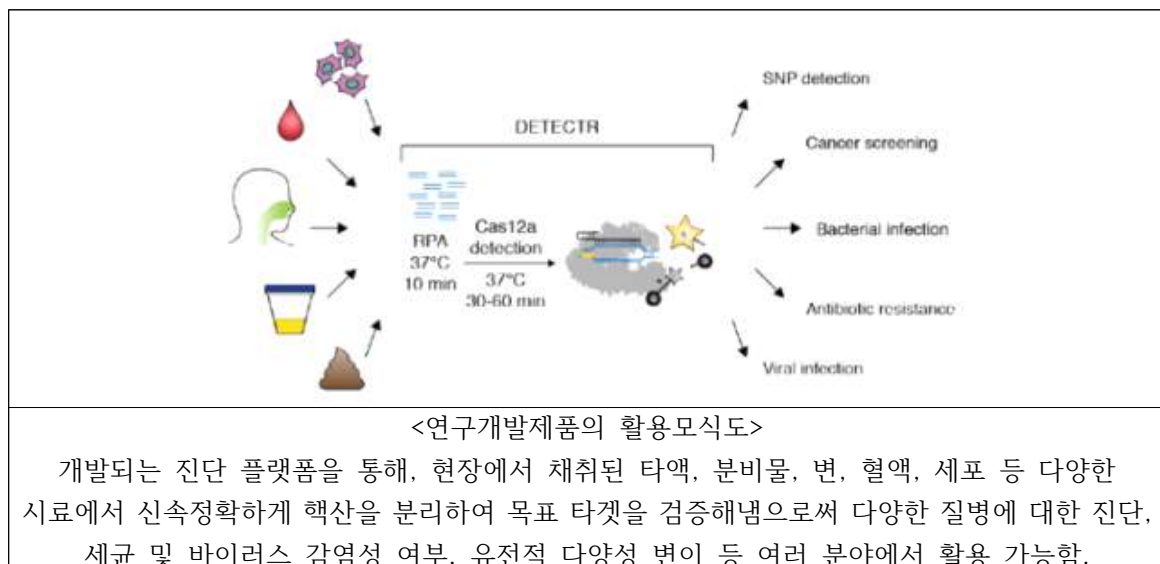
○ 연구의 가설

- 본 연구과제는 크리스퍼-카스 (CRISPR/CAS12) 유전자가위 시스템이 가진 2차절단 부수효과를 활용하여 타겟바이러스 (ASFV) 의 DNA 진단 시스템을 개발하는 과제로서, 현장에서 채취한 생체시료내 극미량의 핵산을 가지고도 신속정확하게 진단하고 높은 민감도 및 특이도를 보이는 혁신적인 진단법을 개발코자 함
- 구체적으로는, ASFV 에 특이적인 CRISPR/CAS12 유전자가위를 제작하고 시료내에 reporter 역할의 Linker DNA 와 함께 반응시킴. 제작된 유전자가위는 ASFV의 특정 DNA sequence 를 인식한뒤 절단하고 동시에 주변에 존재하는 Linker DNA 도 같이 절단하게 됨 (2차부수 절단효과). 절단된 Linker DNA 는 절단되는 동시에 시약내 첨가된 금나노입자와의 프로브 결합을 통해 나노입자 응집을 유도하고 응집된 나노입자는 발색을 보이며 ASFV DNA 진단의 시각화를 이룸.

- 이를 위해서는 시료에서 진단의 기반이 될 수 있는 핵산을 정밀하고 초순도로 추출해내는 작업이 선행되어야 하며, 유전자가위 제작효율 향상 및 활용도를 높이는 방향으로 연구가 진행되어야 함. 이러한 플랫폼이 개발되면 이의 검증을 위해 in-vitro 및 in-vivo 생체에서 검증을 진행하면서 시스템의 민감도를 측정해야하며, 다양한 질환 및 시료를 통해 시스템의 적응증을 확대해야함.

다. 연구의 필요성 및 중요성

- 1) 인간 게놈상의 특정 유전자부위에서 발생하는 시퀀스의 변이는 암이나 질병으로 이행될 수 있는 주요원인으로 대두되고 있으며 조기에 이러한 변이를 발견할 경우 암으로의 진행이나 질병 이환을 조기에 예방할 수 있는 선제적인 예방법이 될수 있음. 이러한 특정 유전자부위의 시퀀스 변이를 극미량의 샘플에서도 신속 정확하고 간단하게 감지해낸다면 질병 진단 및 예방에 상당한 도움이 될 것으로 예상됨.
- 2) 바이러스성 질병의 경우 채취된 시료내에 원인 바이러스가 극미량으로 포함되어 확인이 쉽지 않기 때문에, 질병으로 이환되기 직전에 바이러스 감염여부를 감지해낸다면 조기에 질병을 예방하고 예찰할 수 있는 근거가 될 수 있음.
- 3) 구제역, 고병원성 조류인플루엔자 등 축산업에 막대한 피해를 끼치는 질병은 바이러스에 의해 야기되는 질병으로서, 최근까지 문제화된 아프리카돼지열병 또한 질병바이러스가 원인이 되어 발병하고 있음. 이러한 국가재난형 전염성 질병의 발병은 해외는 물론이고 국내 축산업에 막대한 피해를 끼치면서 현대사회를 위협하고 있음. 이러한 가축전염병은 예방 중심으로 방역체계를 전환해야 하며, 농장내 바이러스 유입을 차단하고 극미량의 바이러스를 빠르고 정확하게 탐지해내는 것이 관건임. 실제 발병축의 의심소견 발생 및 신고 후에도 현장진단법의 부재 및 확진까지 1~2주일이 넘게 소요되는 기간으로 말미암아 질병 확산속도를 따라잡기 어려운 실정임. 현장에서 신속하게 확인가능한 조기 진단법의 개발 및 진단키트 제작은 이러한 국가재난형 질병을 조기에 예찰하고 질병의 확산을 막는 효과적인 방법으로 여겨짐.



라. 아프리카 돼지열병 검출/진단용 금나노입자 응집 기반 육안 검출 프로브 개발

- 1) 국내의 경우 축산 농가의 규모화, 집단화, 밀집화에 따라 전염성질환의 발생 시 피해가 급증하는 특징을 가지고 있으며, 국제적으로 개방 및 교류확대로 환경유해물질에 의한 질환이 증가하고 있음. 따라서 축산농가의 가축질환 발생의 최소화 및 청정화 도약을 위해서는 지속적인 모니터링을 통한 적극적인 사전 대처가 필수적임.
- 2) 현재 조기 검출 및 진단을 위해서는 높은 민감도와 신뢰도를 지닌 검출 기술이 요구되나 기존 검출 기술의 경우 면역학적 진단 기술에 의한 낮은 안정성과 장시간의 분석 문제, 그리고 비생물학적 물질 검출에 필요한 고가의 분석 장비 및 비용으로 인하여 아프리카 돼지열병의 검출을 위한 현장성이 떨어져 조기 대처가 어려운 단점을 가지고 있음. 특히, 병원성 미생물 또는 바이러스 등에 의한 가축 질환 진단법은 혈청학적 응집반응을 이용하거나, 가축의 타액, 분변, 혈액 등에서 병원성 인자를 동정하여 진단하는데, 본 방법은 시간 소요가 길고, 판단의 모호성이 있어서 새로운 검출법이 요구되고 있는 실정임.
- 3) 최근, 정확하고 빠른 진단을 위해서 항원-항체 반응을 이용한 검출법과 DNA/RNA 등의 핵산 분자를 이용한 검출 기법들이 개발되고 있으며, 최근들어 나노입자를 활용한 진단법의 개발도 활성화되고 있음. 특히 금나노입자 응집 현상 기반의 검출 방법은 병원성 인자의 배양을 통한 동정 등의 문제점을 극복하며, 고민감성 및 고특이성을 가지고 표적물질에 결합함으로써 결과를 안정적으로 제공하는 특징이 있어 각광받고 있음.
- 4) 아프리카 돼지열병 검출/진단용 금나노입자 응집 기반 프로브는 세포나 복합 시료 내에서도 목적 물질을 특이적으로 검출할 수 있으며, 특별한 고가의 분석 장비 없이 신속한 물질 진단이 가능한 장점이 있음. DNA/RNA probe 바이오센서는 대량생산 및 구조화학적 변화가 용이하여 DNA chip이나 단백질 chip에 비하여 진단 센서에 고집적 시키는 것이 용이하며 대량 샘플 처리에도 단시간 내에 진단할 수 있는 장점을 가짐.
- 5) 이처럼 아프리카 돼지열병 검출/진단용 금나노입자 응집 기반 프로브는 세포나 복합 시료 내에서도 목적 물질에 대하여 민감하고 정확하게 검출이 가능하며 빠르고 저비용으로 분석이 가능하기 때문에 스크린용 센서 개발 연구가 선진국을 비롯한 각국에서 활발히 이뤄지고 있음. 따라서 본 연구에서는 아프리카 돼지열병 검출/진단용 금나노입자 응집 기반 프로브를 도입하여 안정적이며 신속하게 아프리카 돼지열병 검출 기술을 개발하고자 함.

1-2. 개발기술의 독창성 및 차별성

- 체외진단 분야에서 PCR은 제일 높은 민감도와 정확도를 보여주지만, 휴대가 어려워 현장 진단이 어렵다는 한계를 가지고 있음. 또한 Rapid kit 는 현장에서 신속한 진단이 가능하지만, 높은 위음성률을 보이는 단점이 있음. 본 개발기술에서 확립한 등온유전자 증폭법을 이용하면 핵산추출 시간 및 환자 검체속에 감염성 바이러스 존재 유무를 1시간 이내 가능함. 기존검사시간보다 5~6배 단축시킴. 기존 감염성 바이러스 검출에 사용되는 기법은 실시간유전자 증폭기술이 사용되는데 이러한 기술은 바이러스 검출에 평균 6시간 가

량 소요되며, 고가의 장비를 필요로 하는데다 검체 운반 등에 따른 위험성이 우려돼 특수한 시설을 갖춘 대형병원의 중앙검사실 등에서만 진단확인이 가능한게 현실임. 또한 기존 바이러스 검출은 숙련된 전문가만 수행할 수 있어 전염병 바이러스의 주발생지역인 저개발 국가에서는 활용이 쉽지 않다는 한계점이 있음.

구분	PCR	ELISA	CRISPR-CAS system
특징	DNA 와 RNA등의 핵산을 분석하는 중합효소연쇄반응	항원-항체 반응을 통한 진단방법	최신 유전자가위 기술인 CRISPR-Cas 시스템 활용
장점	현재 분자진단기법 중 정확도가 가장 높은 편 Conventional PCR, Rapid PCR, Real-time PCR, Digital PCR 방식이 존재 여러 선진국에서 비싸지만 정확도가 가장 높은 Real-time PCR 방식을 주로 사용함 (정확도가 99% 이상)	정확도가 비교적 높고 빠른 결과를 얻을 수 있음. PCR방법보다 비용이 저렴하고 특정 실험장비 없이 단시간에 샘플을 대규모로 테스트 할 수 있음.	1~2시간 이내 아토몰(10-18M) 수준의 초고감도로 표적만을 선택적으로 검출 가능 Paper strip 의 검출방식을 사용하여 전문 지식, 기술, 보조 장비, 전원 등을 필요로 하지 않아 현장에서 다양한 시료에 저렴한 비용으로 적용 가능
단점	민감하고 명확한 진단 결과를 제공하지만, 검출하는데 있어 다소 시간적인 소모가 요구됨 (5~6시간 소요) 특정 장비와 전문 스킬이 요구됨.	다른 방법보다 민감도가 떨어짐. 항원 특이적인 항체 개발이 선행되어야함.	초고감도의 핵산 진단을 위해 적절한 신호 증폭방법 (ex, RPA) 이 결합되어야 함.

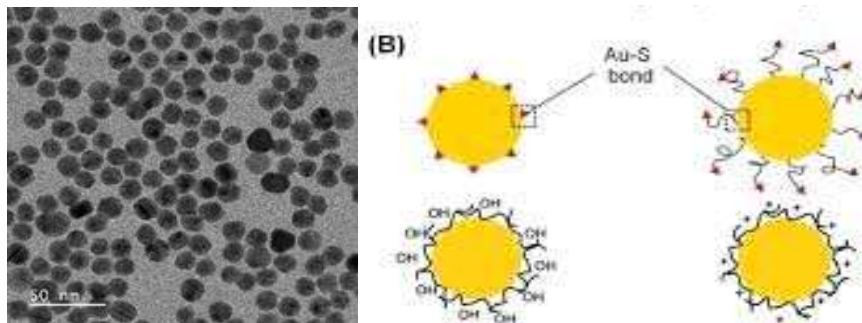
<표, 체외 분자진단법의 비교>

- 연구팀이 개발한 신기술을 활용하면 시료별 개별검사가 가능해 현재처럼 시료를 모아 한꺼번에 기계를 작동하지 않아도 됨. 또 대형 고가장비 없이 62도를 유지할 수 있는 등온 장치만 있으면 가능한 것도 장점임. 전문가가 아니어도 바이러스를 검출할 수 있을 정도로 방법이 간단해 경제성, 편의성 측면에서도 여러 장점을 갖춰 앞으로 활용도가 높을 것으로 전망됨.

구분	Biospy	Hudson
내용	시료 속에 존재하는 바이러스 입자의 핵산을 직접적으로 추출 현장에서 신속하게 진단해야하는 경우 감염성에 취약함 검체에 존재하는 미량의 목표핵산을 검출해야 하는 생검은 소량의 시료에서 검출이 어려워 민감도가 떨어지는 문제 존재	시료(소변, 타액 등)에 존재하는 바이러스 입자를 직접 용해시키고 이들 속에 일반적으로 많이 존재하는 RNase 를 열과 화학적 환원으로 이용하여 불활성화 시킴 시료에서 핵산을 추출할 필요없이 직접 바이러스의 진단이 가능

<표, 체외 핵산검출 방법 비교>

- 현재까지 국내에서 CRISPR-CAS system 의 부수효과를 활용하여 암과 같은 질병관련 계놈상의 시퀀스 변이나 전염성 질병의 원인바이러스의 조기 검출과 같은 진단 기술이 확립된 사례는 없으며, 특별히 외부에 공개된 연구진행상황도 없는 형편임. 최신 개발되고 있는 분자생물학적 기법을 활용한 연구를 진단법 개발에 접목시켜 조기 진단시스템이 개발되어야 함.
- 현장 진단키트를 위한 금나노입자 개요 및 ASF 적용
 - 다양한 나노입자 중에서 바이오진단에 가장 널리 사용되고 있는 선두주자는 금나노입자가 있으며, 금나노입자는 크기와 모양에 따라 가시광선 영역에서 뚜렷한 흡광과 산란에 의한 표면 전자기 공명 밴드 현상이 일어남
 - 금나노입자는 환원전위가 높아 다른 금속 및 금속 산화물보다 상대적으로 이온 형태로 존재할 가능성이 적어 생체적합성이 높으며, 다른 나노입자에 비해 표면 개질이 용이함.
 - 금나노입자의 육안관찰 용이성, 높은 생체적합성 및 용이한 표면 개질 등의 장점을 활용하여 현장진단기기 개발에 적합한 나노입자로 채택함



금나노입자 TEM 사진 (좌), 금나노입자 표면 개질 (우)

1-3. 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- 농림축산검역본부를 중심으로 동식물의 전염병 모니터링 및 감시, 진단방법들이 연구되고 있음. 국가과학기술지식정보서비스(NTIS) 검색결과 2012년부터 현재까지 총 23개의 연구과제가 정부 R&D사업으로는 현재까지 23개 과제에 15.2억원이 투자되었으며, 국공립연구소와 대학을 중심으로 과제 추진되었음.
- 최근 고려대학교와 한국생명공학연구원에서 연구팀에서는 ASFV 분리주에 대한 유전정보 및 특성분석이 주도적으로 이뤄지고 있으며 (Emerg. Infect. Dis. 논문 게재) 또한 농림축산검역본부에서도 아프리카돼지열병(ASF) 바이러스 유전자가 우리나라로 입국한 한 중국인 여행객의 휴대품에서 검출하여 Emerg. Infect. Dis. 논문 게재하였음.

- 아프리카돼지열병(ASF)이 중국 전역으로 확산하며 국내 전파 우려가 점차 커지는 가운데, 아프리카돼지열병 바이러스(ASFV) 실시간 유전자 진단키트가 개발되었음. (주)메디안디노스틱은 ASFV 실시간 유전자 진단키트 VDx® 개발에 성공하였고 최근 검역본부로부터 품목허가를 취득하였음.

	농림축산검역본부	아람바이오시스템	고려대학교, 한국생명공학연구원	(주)메디안디노스틱
현 황	<ul style="list-style-type: none"> • 바이러스 단클론 항체(등록번호: 1016639630000) • 항체 검출용 p12단백질 (등록번호: 1003872800000)에 대한 특허등록 	<ul style="list-style-type: none"> • ASF 유전자 진단키트(제품명: Palm PCRTM ASFV Fast PCR Kit, 사진) , 농림축산검역본부 제조품목허가 (제229-004호) 취득 • 본키트는 기존 자사 제품인 초고속 유전자 증폭장치와 함께 사용할 경우 25분 이내 초고속 진단이 가능 • 기존 유전자 추출시약을 사용하면 DNA 추출과정이 15분 이내 간단한 전처리로 대체돼 검체에서 진단결과 도출까지 40분 이내 가능. 	<ul style="list-style-type: none"> • ASFV 분리주 유전정보 및 특성 분석 • ASF 조기검출 항체진단 키트 개발 : 휴벳바이오로 기술이전 	<ul style="list-style-type: none"> • ASFV 실시간 유전자 진단키트 VDx® 개발 성공 (검역본부 품목허가 취득) -위 키트를 이용하여 베트남에서 최초 보고된 아프리카 돼지열병 발생 확인이 이루어짐 -ASFV의 p72 유전자를 target으로 분자진단 primer 및 prove 제작 -다양한 임상시료를 활용한 유효성 평가 진행
비 고	<ul style="list-style-type: none"> • 바이러스 단클론 항체 등록번호: 1016639630000 • 항체 검출용 p12단백질 등록번호: 1003872800000 			

- Scopus 분석결과 2000년도 이후 ASFV 관련 논문은 전 세계적으로 1,800편이며, 이중 일부 논문에 한국인 저자가 포함된 것을 분석됨. 또한, 농림축산검역본부에서 ASFV에 대한 진단용 항원 및 항체 개발에 대한 특허출원 및 등록이 분석됨
- 국내 동물약품 업체인 '코미팜'에서 유전자 재조합 단백질 항원을 이용한 시험백신을 제작하여 적용 시험을 실시할 계획인 것으로 알려졌으나 유전자 재조합 백신의 효능과 안전성은 아직 확보 되지 않았음.
- 진단키트 개발업체인 '(주)메디안디노스틱'이 ASFV 실시간 유전자 진단키트 VDx® 개발에 성공, 최근 농림축산검역본부로부터 품목허가를 취득함으로써 국산화에 성공하였음. 개발된 본 키트를 이용하여 베트남에서 아프리카 돼지열병 발생 확인을 최초로 보고함.

- 국내·외 기술현황 및 연구, 지적재산권의 현황을 분석한 결과, 국내의 아프리카 돼지 열병 검출 및 대응에 대한 연구는 매우 초기단계임을 확인 할 수 있었음. 선진국들의 경우 축산업의 활성화 및 경제성 향상을 위하여 가축 환경 위해요소에 대한 연구와 행정적 재정적 지원이 이루어지고 있었음. 그러나 국내의 경우 아프리카 돼지 열병에 대한 연구와 지적재산권이 전무하였다. 경쟁력 향상에 대한 관심이 고조되고 있는 만큼, 아프리카 돼지열병 검출/진단용 금나노입자 응집 기반 프로브 개발이 필요함.

○ 시장현황

- 국내 체외진단규모는 글로벌 시장의 1.5%를 점유하고 있고, 식품의약품안전처에 따르면 2015년 기준 국내체외진단기기 시장규모는 8000억원으로 현재 제조업 136개, 수입업 149개 업체가 등록되어 있음. 주요 업체로는 나노엔텍, 에스디, 씨젠, 바디텍, 엑세스바이오, 랩지노믹스, 파나진 등이 있음 (표1, 체외진단시장-연구개발특구기술 글로벌 시장 동향 보고서 2017)

업체	동향
SK텔레콤/ 나노엔텍	○ SK텔레콤은 투자전략을 기반으로 현장진단과 분자진단에 경쟁력을 갖추고 있으며, 나노엔텍에 전략적으로 제휴 투자를 하고 있음 ○ 나노엔텍은 체외진단키트 부문에서 기술력을 보유하고 있으며, 랩오어칩 기술기반의 생명공학 연구기기와 현장진단 의료기기를 개발하였음
에스디	○ 각종 진단 시약 100여 개를 개발하였음
씨젠	○ 분자진단 전문기업으로 Real-Time PCR을 보완한 원천기술을 확보하고 있고, 진단시약 제품도 시장에 내놓고 있음
인포비아	○ 혈액진단을 통한 질병 조기예방 및 관리 제품군을 구축하였음
바디텍	○ 약 25종의 검체 진단이 가능한 진단시약 제품을 확보하고 있음
엑세스바이오	○ 현장에서 즉시 질병을 진단하는 바이오센서 및 분자진단 등의 제품을 연구 개발 하였음
랩지노믹스	○ 국내 대형병원과 공동사업으로 진행하고 있으며, 특히 산부인과 질병에 특화된 연구개발에 주력하고 있음
파나진	○ 중앙유전자/검사시약 및 진단기기/부가제품을 주력으로 개발하고 있음
메디센서	○ 면역진단 제품을 주력으로 개발하고 있음

표1. 국내 체외진단 주요업체 및 동향

○ 경쟁기관현황

경쟁사명	제품명	판매가격 (천원)	연 판매액 (천원)
애니벳	진단용 키트	10회사용 20만원	23억6850만원('18)
바이오노트	진단용 ELISA 키트	10회사용 20만원	200억원('16)
인트론	진단용 시약	10회사용 20만원	1조9,000억원('15)

○ 지식재산권현황

- 수행기관 자체적으로 특허정보넷 키프리스(www.kipris.or.kr)에 “CRISPR 진단 시스템”을 입력하여 관련 지식재산권을 검색한 결과 총 499건의 특허가 출원되었고, 총 29건의

특허가 등록되었음. 등록된 특허 중 비교적 관련성이 높은 국내특허 5건을 아래의 표로 정리함.

지식재산권명	지식재산권출원인	출원국/출원번호
CRISP/Cas 시스템에 사용하기 위한 융합 단백질, 그를 포함하는 복합체 및 그의 용도	한국과학기술연구원	대한민국/1020170131637
표적 특이적 뉴클레아제를 이용한 표적 DNA의 민감한 검출 방법	주식회사 틀젠기초과학연구원	대한민국/1018156950000
불활성화된 표적 특이적 뉴클레아제를 이용한 표적 DNA의 분리 방법	주식회사 틀젠기초과학연구원	대한민국/1018863810000
Cas9 단백질, 가이드 RNA 및 양친매성 펩타이드를 포함하는 나노복합체 및 이의 용도	동국대학교 산학협력단	대한민국/1020074570000
dCas9 단백질 및 표적 핵산 서열에 결합하는 gRNA를 이용한 핵산 검출의 민감도 및 특이도 향상용 조성물 및 방법	울산대학교 산학협력단 재단법인 아산사회복지재단	대한민국/1019647460000

- 특허내용을 보면 크리스퍼-카스 유전자가위를 이용한 기술을 사용하고 있으나, 구체적으로 살펴보면 타겟유전자에 대한 민감도를 높이거나 유전자가위의 생체 내 전달 효율을 높이는 내용 등으로 본 기술과 차이가 있고 동일한 기술의 특허는 존재하지 않음.
- 전문기관을 활용하여 관련 특허정보조사를 통해 기존특허 기술과의 기술적 회피 및 특허 침해 여부를 판단하는 특허전략을 수립하고자 함. 이를 위해 연구기간 (1차년도 및 2차년도) 동안 각각 특허정보 조사 및 특허전략 수립에 관해 연구비를 산정하고 지출함으로써 (연구활동비로 계상), 보다 적극적인 지적재산권 확보에 나설 예정임.

- 표준화현황
해당사항 없음

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

- 기술현황
 - 2018년 미국 연구진에 의해, SHERLOCK (specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking) 이라 불리는 RNA 바이러스를 진단하는 CRISPR-CAS 유전자가위 제작연구가 시도되었고 (Gootenberg JS et al., 2018), 특정 DNA를 타겟으로 한 후, 비특이적으로 DNA를 절단해내는 CRISPR-CAS system을 발견한 내용의 연구 (Chen JS et al., 2018) 가 각각 SCIENCE 저널에 소개되었음. 이들 연구에서는 채취된 시료에서 극미량의 핵산으로도 2시간이내에 지카바이러스와 같은 RNA type 바이러스 진단에

성공하거나, DNA 타겟 주변에 위치한 다른 DNA들을 비특이적으로 절단하는 효과를 나타냄을 밝힘.

- 앞선 연구를 통해, Cas13a (C2c2) 를 활용하여 RNA의 변이된 시퀀스나 외부 RNA를 절단함으로써 진단이 가능하다는 사실이 일반화되었고 (East-Seletsky et al. 2016) , Cas12a (Cpf1) 단백질을 활용하여 주변 DNA절단 효과를 통해 DNA 시퀀스의 변이도 검증가능하다는 사실이 확인됨 (Li et al. 2018).
- 미국 MIT 연구팀은 CRISPR-CAS system을 통해 특정 병원체를 매우 정밀하고 정확하게 먼서도 값싸게 탐지해 낼 수 있음을 증명함. 이들은 CRISPR-CAS system이 DNA 분자를 밀리(10분의1), 마이크로(100만분의1), 나노(10억분의1), 피코(1조분의1) 단위는 물론이고 펨토(10의 -15승, 1천조분) 보다도 적은 초극미량인 10의 마이너스 18승인 아토 (Atto) 단위까지 탐지해낼 수 있음을 입증했음.

○ 어레이카드 기반 패널 검사법

- 어레이카드 기반 패널 검사법을 이용한 감염병의 진단은 2010년대에 들어서면서 기술개발이 본격화되어 연구 성과들이 발표되고 있음
- 대표적인 연구성과로 곤잘레스 등(Molecular and Cellular Probes, 2011)의 장출혈성 대장균(E.coli O157)의 감염여부, 병원성타입(virulotype), 아형(subtype)을 동시진단하기 위한 어레이패널 개발, 슬링거 등(Infectious Diseases, 2012)의 사람 호흡기감염병 원인체 33개의 동시진단을 위한 어레이패널 개발, 그리고렌코 등(The Journal of Molecular Diagnostics, 2014)의 혈액감염 바이러스, 세균, 기생충의 동시진단을 위한 어레이패널 개발 등이 있음
- 해당 연구는 단일 실시간중합효소연쇄반응법으로 수행시 많은 시간, 비용, 인력이 소모되는 점을 어레이패널 개발을 통해 해결하고자 하였으며, 연구 결과 같은 분석민감도(100-2 copies/uL)와 분석특이도, 진단정확성 등으로 기존 문제점을 해결할 수 있음을 보여줌

○ 체외진단 기법

- 체외진단(in vitro diagnostic: IVD)은 질병 진단, 병인 확인, 치료 방향 결정 및 치료 효과의 추적관찰, 질병 경과 판단, 질병 조기진단 및 예방, 환자 예후 판정 등을 목적으로 혈액, 뇨, 타액 등 인체에서 유래하는 시료를 검체로 하여 특정 지표 물질을 검출하거나 정량 분석하는 검사임
- 면역분석에 기반한 감염질환 진단은 사용법이 상대적으로 단순하고 진단결과를 빠르게 알 수 있는 등 상업성이 뛰어나기 때문에 Lateral flow assay 타입의 디바이스와 페이퍼 기반의 Dipstick이 다양한 질환 진단을 위해 상용화 되어 있음
- 하지만, 면역분석에 기반한 감염질환 체외진단 기술은 바이오마커의 높은 특이성에 의존적이기 때문에 분자진단에 비해 정확도는 떨어지고 특히 감염초기 진단에 취약함
- 최근에는 면역진단의 민감도를 높이기 위해 형광기반의 면역분석법이 대두되어 여러 기업들이 제품화를 서두르고 있는 상황임

- 한편, 분자진단법을 이용할 경우 유전자 증폭을 통해 높은 정확도의 검지가 가능하나 핵산추출까지의 전처리가 복잡하고 유전자 증폭을 위한 시약이 추가적으로 투입되어야 하며 또한, PCR을 위한 정밀한 온도조절 구현을 위한 고가의 분자진단기기가 필요함
- 시장의 요구에 따라, 여러 종류의 시약 적용과 다단계의 복잡한 생화학적 반응이 가능한 디바이스 개발을 통해 사용자 편의성이 확보된 분자진단 기술개발이 활발히 진행되어옴
- 현재 분자진단기기 시장을 석권하고 있는 Cepheid사의 GeneXpert 시스템은 독특한 구조의 카트리지를 이용하여 분자진단을 밀폐된 공간에서 전자동으로 최대 6가지의 multiplexed assay 를 수행하기 때문에 전염성 검체의 확산에 매우 안전하고 효율적인 기기이며, 최근 출시된 GeneXpert Omni 모델은 현장에서의 신속진단이 가능하도록 소형화된 모델로서 무선통신을 통해 진단결과를 모바일기기로 전송해주는 기능을 갖추고 있음
- 하지만, GeneXpert 시스템에서 사용되는 카트리지의 가격이 고가일 뿐 아니라 상당한 양의 시약이 여전히 요구되며 전처리와 PCR 반응을 위해 4가지 시약을 사용자가 일일이 카트리지에 주입해야 하는 등, Dipstick과 Lateral flow assay에 견줄만한 사용자 편의성은 아직 갖추지 못한 상황임
- 최근 cobas 사에서 출시한 Liat (Lab-in-a-tube) 제품은 Tube 형태에서 분자진단을 진행 할 수 있는 디바이스를 개발하여 현재 상용화에 있음. Tube에 외부에서 전처리한 검체를 주입한 뒤 진단 장비에 Tube를 투입하여 각 반응 단계별 필요한 물질을 압력 인가를 통해 유체가 흐를 수 있도록 하여 반응 후 분자 진단을 통해 질병을 진단함



그림. Cepheid 사의 GeneXpert Omni



Sample
Add your patient sample to the cobas[®] Liat System assay tube with provided transfer pipette.



Scan
Scan assay tube using built-in barcode reader.



Start
Insert assay tube into the cobas[®] Liat Analyzer. Results are generated in 20 minutes or less.

그림. cobas사의 Liat

○ 시장현황

- 체외 진단시장은 상위 4개 기업인 로슈(Roche), 지멘스(Siemens), 다나허(Danaher), 에보트(Abbott)가 전체 시장규모의 약 48.5%(2014년 기준)를 차지하고 있음. 그 중 분자진단기기 분야는 지적재산권과 전문기술 등이 필요해 진입장벽이 높지만 체외진단 분야 중 정확도가 가장 높아 향후 가장 높은 성장률을 보일 것으로 예상되고 있음.
- ASF 진단법 관련해서는 Qiagen, IDEXX, ID-VET, SVANOVA, INGENASA 등의 동물용 진단전문업체가 관련 제품을 출시하고 있음.

	<i>Qiagen</i>	<i>IDEXX</i>	<i>ID-VET</i>	<i>SVANOVA</i>	<i>INGENASA</i>
현 황	<ul style="list-style-type: none"> • 분자진단 primer 및 probe 제작 • 혈액 및 조직 임상시료를 활용한 효능 분석 • 아프리카돼지열병바이러스 실시간유전자진단키트 개발 • (제품명: virotype® ASFV PCR Kit) • Sensitivity(민감도) : 100% • specificity(특이도) : 100% 	<ul style="list-style-type: none"> • ASFV의 검출을 위한 분자진단 primer 및 probe 제작 • 혈액 및 조직 임상시료를 활용한 효능 분석 • 아프리카돼지열병바이러스 실시간유전자진단키트 개발 • (제품명: IDEXX RealPCR ASFV Mix) 	<ul style="list-style-type: none"> • p72 유전자 타겟의 분자진단 primer 및 probe 제작 • domestic pigs, wild boars, warthogs에서 유래된 oral fluids의 임상시료를 활용한 효능 분석 • 아프리카돼지열병바이러스 항체 검출용 ELISA 키트 개발 (제품명: ID Screen® ASF Oral Fluids, ID Screen® African Swine Fever Competition) • 아프리카 돼지열병 바이러스 실시간 유전자 진단키트 개발 (제품명: ID Gene™ African Swine Fever Duplex) 	<ul style="list-style-type: none"> • ASFV의 p30 유전자를 타겟으로 재조합 단백질을 생산 및 정제 • Indirect ELISA 기법 개발 • 아프리카돼지열병바이러스 항체 검출용 ELISA 키트 개발(제품명: SV ANOVIR® ASFV–Ab) 	<ul style="list-style-type: none"> • ASFV의 p72 유전자를 타겟으로 재조합 단백질을 생산 후 p72 특이적 항체 개발 • Competition ELISA 시스템 구축 및 효능 분석 • 아프리카돼지열병바이러스 항체 검출용 ELISA 키트 개발 (제품명: INgezim PPA Compac) • Sensitivity (민감도) : 67.86% • specificity (특이도) : 97.98% • Kappa value(CI) : 95%
비 고					

○ 경쟁기관현황

- 체외 진단시장 중 분자진단기기 분야는 지적재산권과 전문기술 등이 필요해 진입장벽이 높지만 체외진단 분야 중 정확도가 가장 높아 향후 가장 높은 성장률을 보일 것으로 예상되고 있으며 특히 동물진단시장은 빠르게 성장하고 있는 분야임.
- 특히, 바이오 및 IT 등의 기술력이 뒷받침되면 상용화까지 필요한 자본력과 기간이 상대적으로 짧아 중소 및 벤처기업이 가능하다는 것이 장점임. 일반적으로 신약개발을 위해 10~15년의 기간과 1조원의 비용이 필요하지만 의료기기에는 5~10년의 기간과 250~1000억원 정도의 비용이 들어 투자대비 성과가 급진적으로 증가할 수 있다는 특징이 있음 (KOTRA, 의료기기산업동향과 투자유치방안, 2017).

○ 지식재산권현황

- 수행기관 자체적으로 특허정보넷 키프리스(www.kipris.or.kr)에 “CRISPR 진단 시스템”

을 입력하여 관련 지식재산권을 검색한 결과 총 499건의 특허가 출원되었고, 총 29건의 특허가 등록되었음. 등록된 특허 중 비교적 관련성이 높고 국외에서 출원된 특허 2건을 아래의 표로 정리함.

지식재산권명	지식재산권출원인	출원국/출원번호
3-성분 CRISPR/CAS 복합체 시스템 및 그 용도	더 잭슨 래보라토리	미국/62/132,644 대한민국/1020040760000
핵산-표적화 핵산의 조성물 및 방법	카리부 바이오사이언시스 인코포레이티드	미국/61/906,335 대한민국/1017808850000

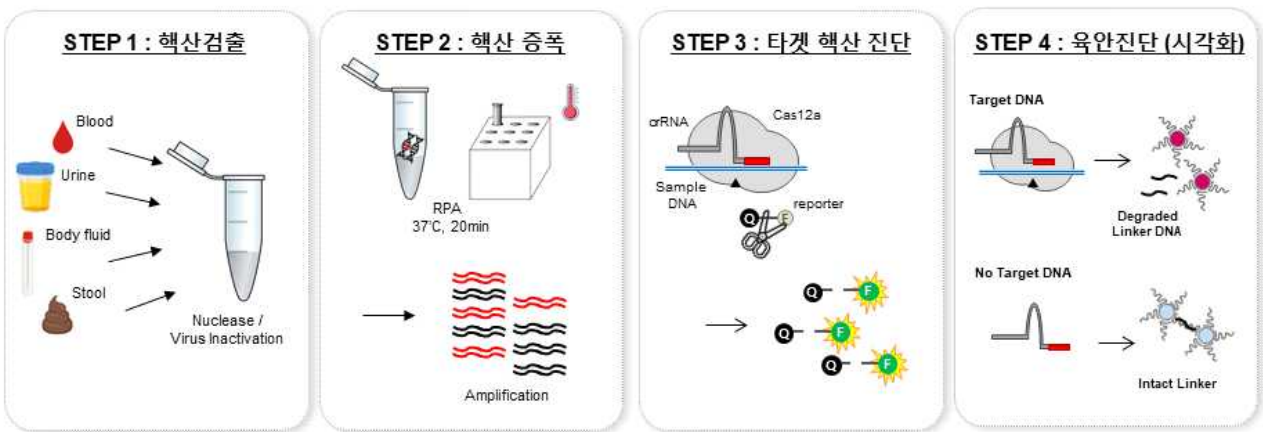
○ 표준화현황 : 해당사항 없음

제2장 연구개발과제의 수행 내용 및 결과

2-1. 연구개발의 목표 및 내용

가. 최종목표

- 유전자가위 (크리스퍼-카스 (CRISPR/CAS)) 기술의 2차절단 부수효과 (collateral effect)를 활용하여 채취된 시료내 극미량의 ASFV DNA 핵산을 초고감도로 진단하는 시스템 개발
- ASF 검출/진단용 금나노입자 응집 기반 육안 감지 가능 및 높은 감도를 가지는 검출 플랫폼 개발
- 현장의 다양한 시료, 대량 검사시료 및 양돈장 내부의 환경 시료 등에서 개발제품의 기능성 평가로 신속하고 민감한 ASFV 검출 진단기법 개발하여 현장진단 및 진단효율 향상



<연구모식도>

- ① 채취된 시료에서 HUDSON 기법으로 ASF 바이러스 핵산 추출 (ASFV DNA) →
- ② RPA 기법을 통해 목표 핵산 대량 증폭 → ③ CRISPR-Cas system을 반응시켜 목표 핵산 절단 → ④ 목표핵산 절단시 2차적으로 형광물질이 탑재된 reporter 절단을 통해 signal reporting → ⑤ 응집기반 금나노입자 반응시스템 결합으로 형광 육안 진단

나. 세부목표

- ◇ 최신 핵산검출 기법인 HUDSON (Heating Unextracted Diagnostic Samples to Obliterate Nucleases) 기법과 최신 핵산증폭기술인 RPA (Recombinase Polymerase Amplification) 기법을 활용하여 채취된 현장시료에서 극미량의 핵산 검출 및 초고감도 증폭기법 정립
- ◇ 검출·증폭된 핵산에 CRISPR/CAS system이 가진 2차절단 부수효과 (collateral effect)를 적용하여 목표 핵산의 특성에 따라 CAS12a 단백질을 활용한 DNA 절단 시스템이 탑재된 진단 플랫폼 개발
- ◇ 개발된 플랫폼에 ASFV의 DNA가 포함된 시료를 반응시켜 형광 발현을 통한 육안진단 시스템 확립
- ◇ ASF 검출/진단용 금나노입자 응집 기반 육안 감지 가능 및 높은 감도를 가지는 검출 플랫폼을 개발하여 현장적용 가능한 키트화 제조.

◇ ASFV 시료 확보 및 돼지시료를 통한 개발제품 유효성 평가

다. 연차별 개발내용

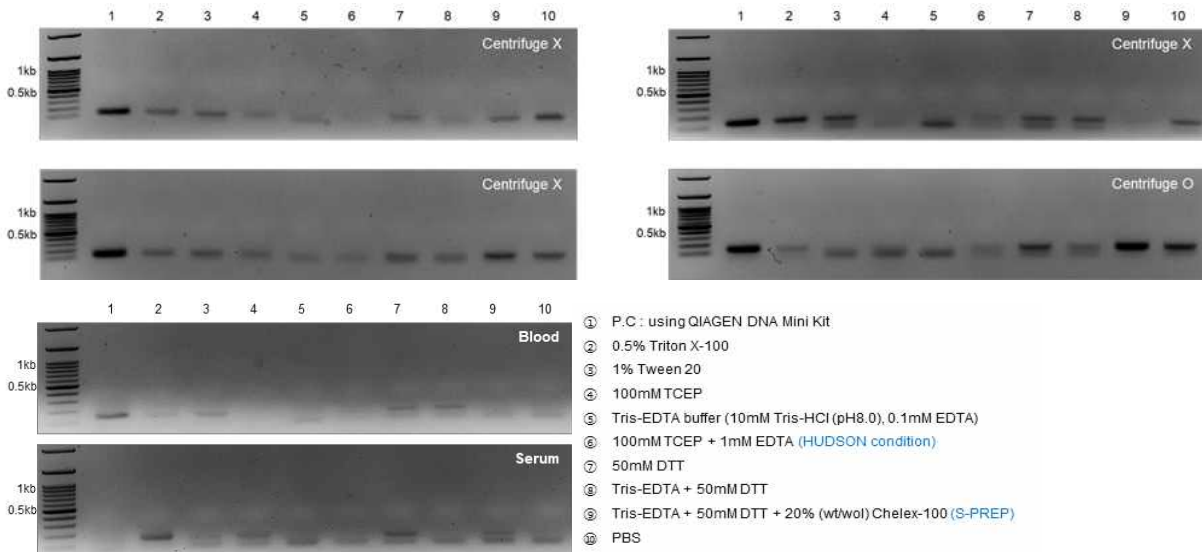
가) 표적 핵산 추출

1. 현장 생체시료 (전혈, 혈청, 혈장, 세포부산물 등) 에서 lysis buffer 별로 추출 방식을 달리하여 핵산추출 진행

1) lysis buffer (10가지 방법) : 1) 상용화된 DNA 추출 키트사용 (control군), 2) 0.5% Triton X-100, 3) 1% Tween-20, 4) 100mM TECP, 5) 10mM Tris + 0.1mM EDTA, 6) 100mM TCEP + 1mM EDTA, 7) 50mM DTT, 8) Tris-EDTA + 50mM DTT, 9) Tris-EDTA + 50mM DTT + 20% Chelex-100 (S-PREP), 10) PBS

2) 반응시간 : Heating condition : nuclease inactivation (95°C, 10min)

3) 시료 : 동물의 생체시료 (전혈, 혈청, 혈장)

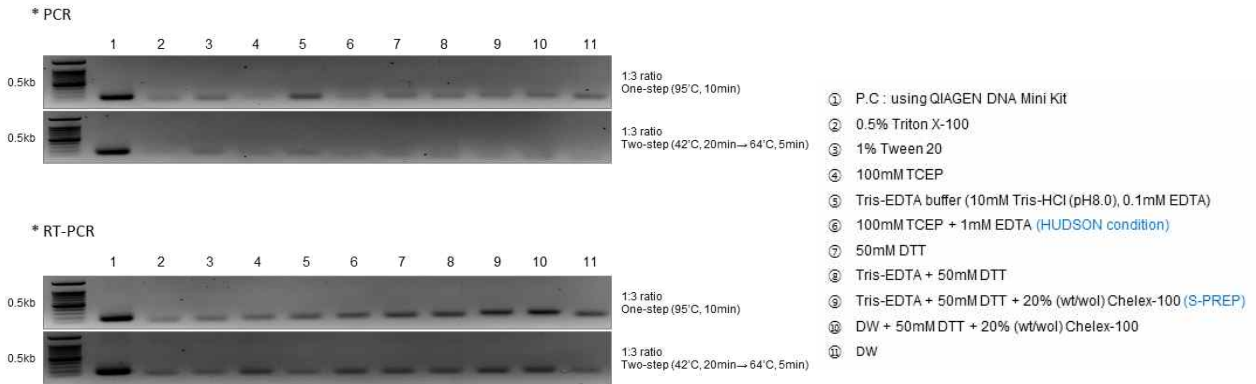


▷ Lysis buffer 별 10가지 방법으로 핵산추출 시도하여 kit 방법과 유사하게 추출됨

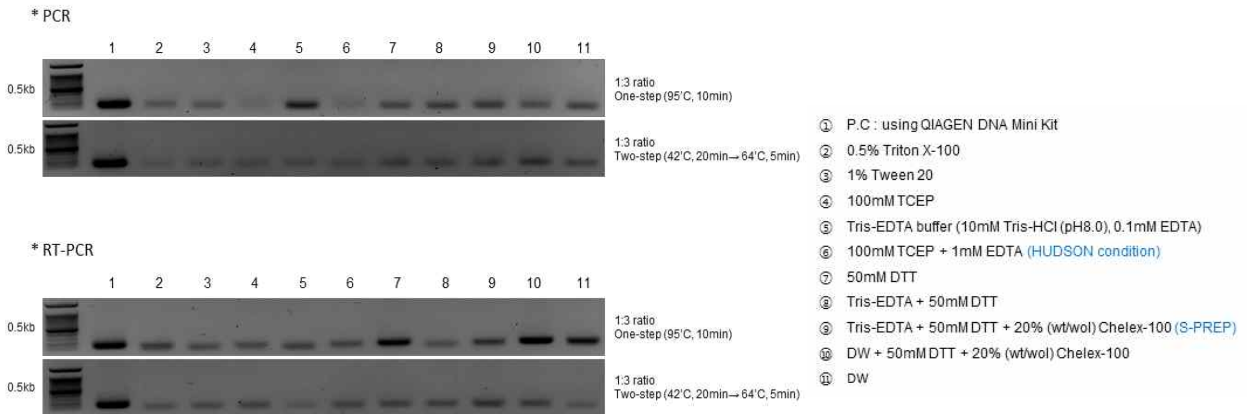
▷ 생체시료 (전혈, 혈청)에서도 각각 핵산 추출 성공, 혈장은 시료내 핵산농도가 낮아 유의미한 추출이 안됨.

4) 반응물의 기반이 되는 DW 와 PBS 차이에 따른 핵산 검출정도 검증 : DNA 와 RNA 모두 DW base 환경하에서 검출 정도가 향상됨

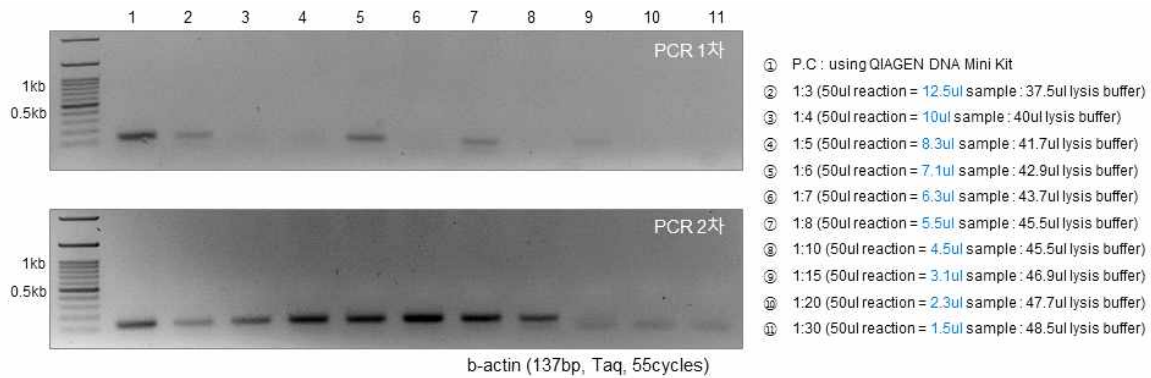
▷ DW base



▷ PBS base



2. 검출 최소시료량 선정을 위해 희석농도에 따른 핵산추출 진행

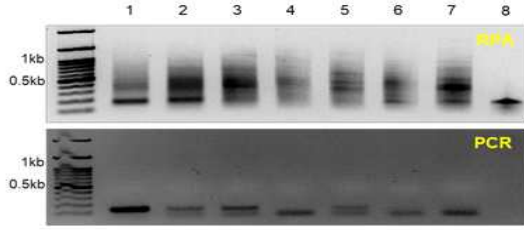


▷ sample dilution ratio 별로 비교 : Tris-EDTA+50mM DTT+20%(wt/wol) Chelex-100 (S-PREP) 방법을 기준으로 하여 전혈 샘플을 단계적으로 희석하여 핵산추출 시도

▷ 전 sample에서 핵산추출 가능 (전혈 1ul 까지 추출가능)

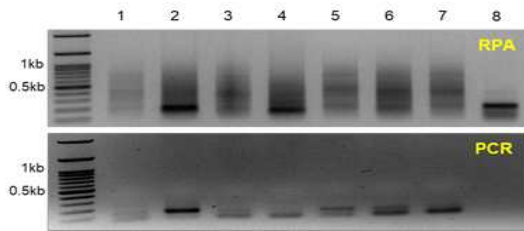
3. 현장 생체시료 (전혈, 혈청, 혈장)에서 핵산추출 진행후 증폭효과 검증

Blood

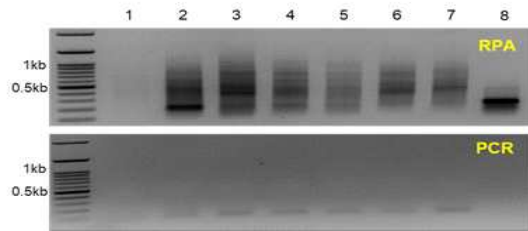


- ① QIAGEN DNA Mini Kit
- ② 0.5% Triton X-100
- ③ 1% Tween 20
- ④ Tris-EDTA buffer (10mM Tris-HCl (pH8.0), 0.1mM EDTA)
- ⑤ 50mM DTT
- ⑥ Tris-EDTA + 50mM DTT + 20% (wt/wol) Chelex-100 (S-PREP)
- ⑦ PBS
- ⑧ P.C : TwistAmp Basic kit contains positive control

Serum

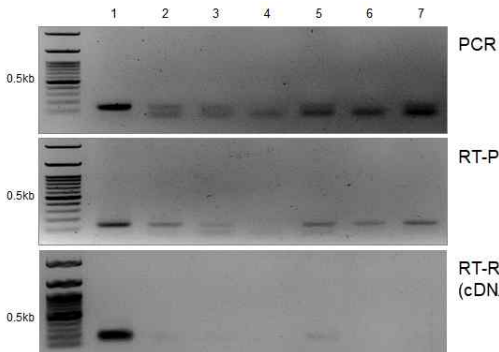


Plasma



- ▷ 1차 시도했던 10가지 핵산추출법 중 추출효과가 좋은 7가지 추출법을 사용하여 핵산을 추출하고 추출여부를 확인하고자 등온증폭 (RPA) 및 PCR 방법으로 생체시료 (전혈, 혈청, 혈장)에서 핵산추출 효과를 검증함
- ▷ 전혈, 혈청, 혈장 등에서 유의미한 증폭 효과를 검증함

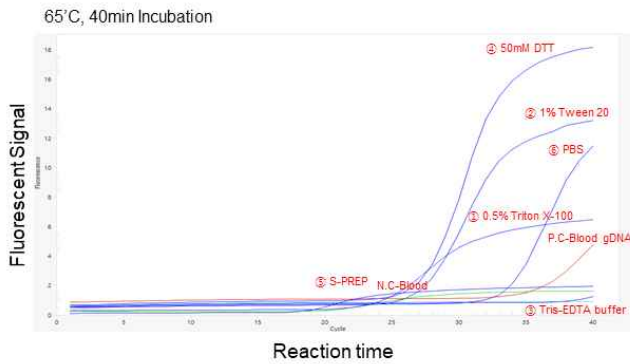
4. 현장 생체시료 (전혈, 혈청, 혈장)에서 RNA 핵산추출 진행후 증폭효과 검증



- ① QIAGEN RNA Kit (fibroblasts)
- ② 0.5% Triton X-100
- ③ 1% Tween 20
- ④ Tris-EDTA buffer (10mM Tris-HCl (pH8.0), 0.1mM EDTA)
- ⑤ 50mM DTT
- ⑥ Tris-EDTA + 50mM DTT + 20% (wt/wol) Chelex-100 (S-PREP)
- ⑦ PBS

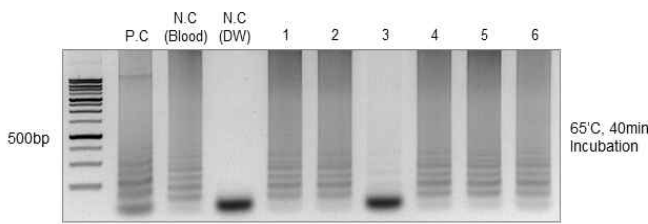
- ▷ 목표핵산 중 RNA의 추출여부를 확인코자 7가지 방법을 사용하여 핵산을 추출하고 RNA 추출여부를 검증함
- ▷ RT-PCR 그룹에서 RT-RPA 그룹보다 유의미한 추출이 확인됨

5. 동물 전혈시료에서 핵산추출 진행후 LAMP 증폭효과 검증



Time to Results

	actin
P.C-gDNA	34min
N.C-Blood	22min
N.C-DW	- min
① 0.5% Triton X-100	23min
② 1% Tween 20	25min
③ Tris-EDTA buffer	38min
④ 50mM DTT	25min
⑤ S-PREP	19min
⑥ PBS	32min



	actin
P.C-gDNA	34min
N.C-Blood	22min
N.C-DW	- min
① 0.5% Triton X-100	23min
② 1% Tween 20	25min
③ Tris-EDTA buffer	38min
④ 50mM DTT	25min
⑤ S-PREP	19min
⑥ PBS	32min

▷ 등온증폭법 중 LAMP 기법의 효용성을 검증하고자 핵산추출 후 LAMP 기법을 적용하여 핵산 증폭 검증

▷ 전 샘플군에서 LAMP 증폭 효과 확인

6. 현장 적용을 위한 생체샘플 처리 방법에 따른 핵산 검출능 검증

▷ 실제 현장에서 채취된 생체시료 (전혈)의 경우, 현장적용능을 향상시키기 위해 현장(축산농가, 농장 등)에서 적용가능한 방식으로 전혈에서 핵산 검출능을 검증함

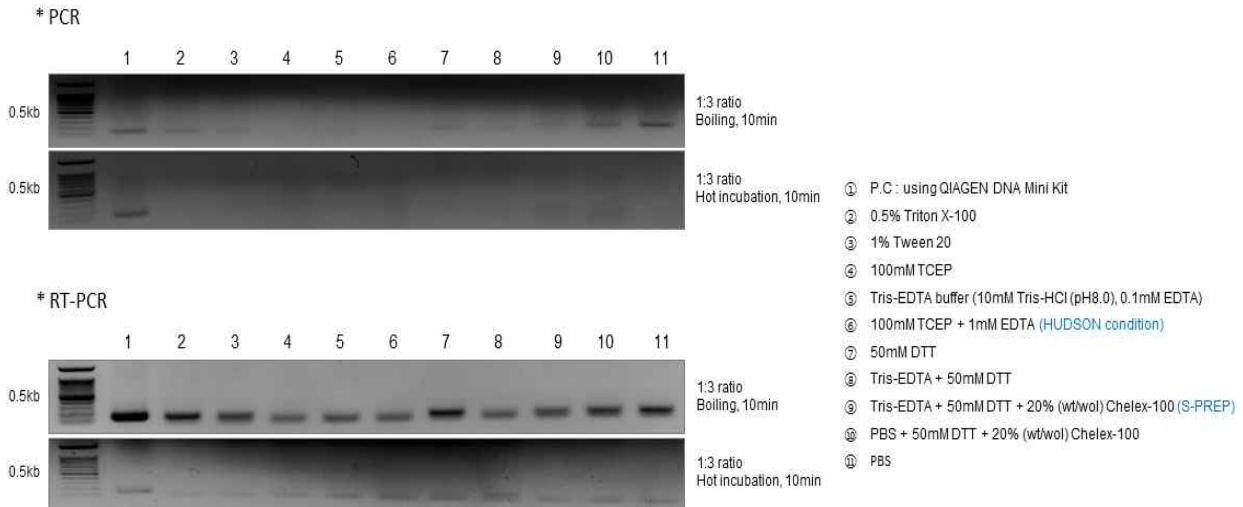
▷ 채취한 생체시료 (전혈)을 끓는물에 10분간 넣고나서 핵산검출을 시도하는 것과 채취한 생체시료를 뜨거운 물에 10분간 정치하고 나서 핵산검출을 시도하는 방식을 비교함.

▷ 양 방법중 끓는물에 10분간 넣고나서 핵산검출시 DNA/RNA 모두 warming 기계를 사용하는 방식에 준하는 수준의 핵산이 검출됨.

▷ boiling vs hot-incubation 방식 비교



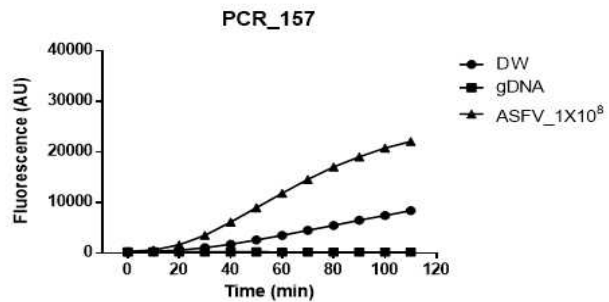
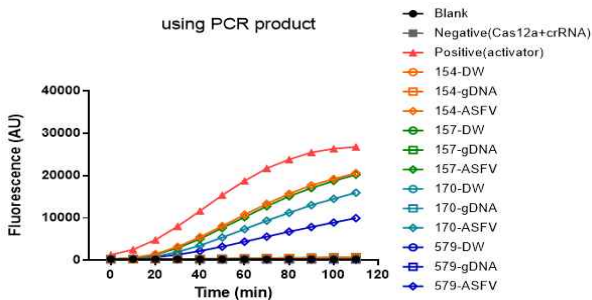
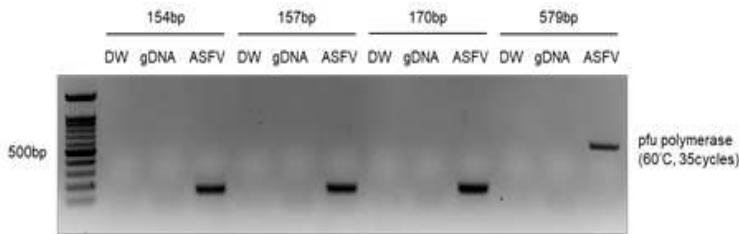
(좌, boiling vs 우, hot incubation)



나) 표적 핵산 증폭

1. 표적 product amplification size 에 따른 측정도 변화

sample : ASFV (아프리카 돼지열병 바이러스, 재조합 DNA)



▷ PCR방식으로 size 별 (154bp, 157bp, 170bp, 579bp) 핵산증폭

▷ Negative : LbCas12a/crRNA complex + ssDNA-FQ

Positive : LbCas12a/crRNA complex + activator+ ssDNA-FQ

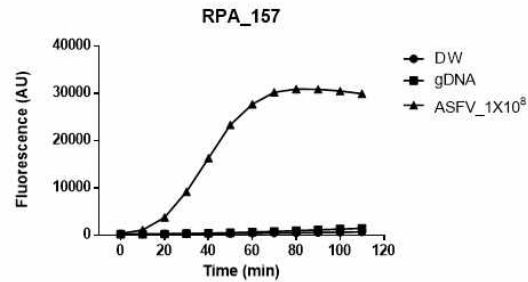
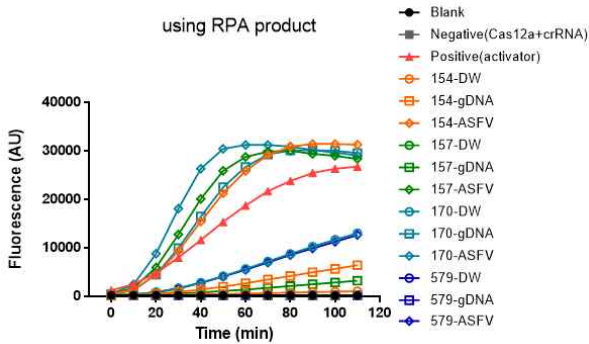
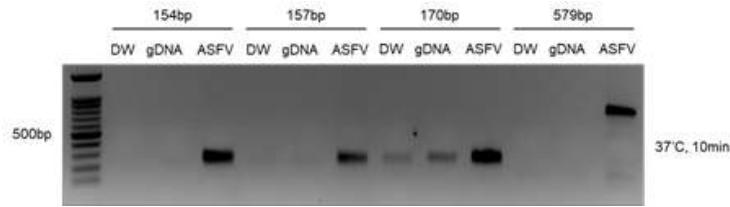
PCR 154bp - LbCas12a/crRNA complex+ASFV fragment 154bp amplicon+ssDNA-FQ

PCR 157bp - LbCas12a/crRNA complex+ASFV fragment 157bp amplicon+ssDNA-FQ

PCR 170bp - LbCas12a/crRNA complex+ASFV fragment 170bp amplicon+ssDNA-FQ

PCR 579bp - LbCas12a/crRNA complex+ASFV fragment 579bp amplicon+ssDNA-FQ

▷ fragment 157bp 증폭군에서 최대형광치 발현



▷ RPA 방식으로 검증

▷ Negative : LbCas12a/crRNA complex + ssDNA-FQ

Positive : LbCas12a/crRNA complex + activator+ ssDNA-FQ

RPA 154bp - LbCas12a/crRNA complex+ASFV fragment 154bp amplicon+ssDNA-FQ

RPA 157bp - LbCas12a/crRNA complex+ASFV fragment 157bp amplicon+ssDNA-FQ

RPA 170bp - LbCas12a/crRNA complex+ASFV fragment 170bp amplicon+ssDNA-FQ

RPA 579bp - LbCas12a/crRNA complex+ASFV fragment 579bp amplicon+ssDNA-FQ

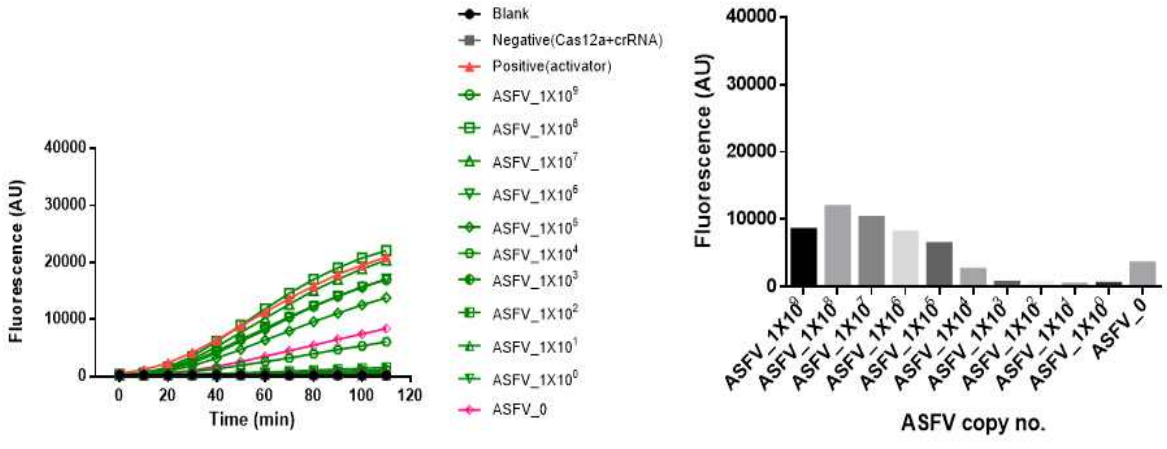
▷ fragment 157bp 증폭군에서 최대형광치 발현

▷ 본 실험을 통해 RPA 효과를 극대화하기 위해서는 100~200bp size에서 증폭시 효과가 좋으며 specificity 가 높은 primer 구성이 중요 (아토몰 수준까지 민감도를 끌어올려야함). PCR product 보다 RPA product에서 형광발현양상이 빠르고 세게 일어남

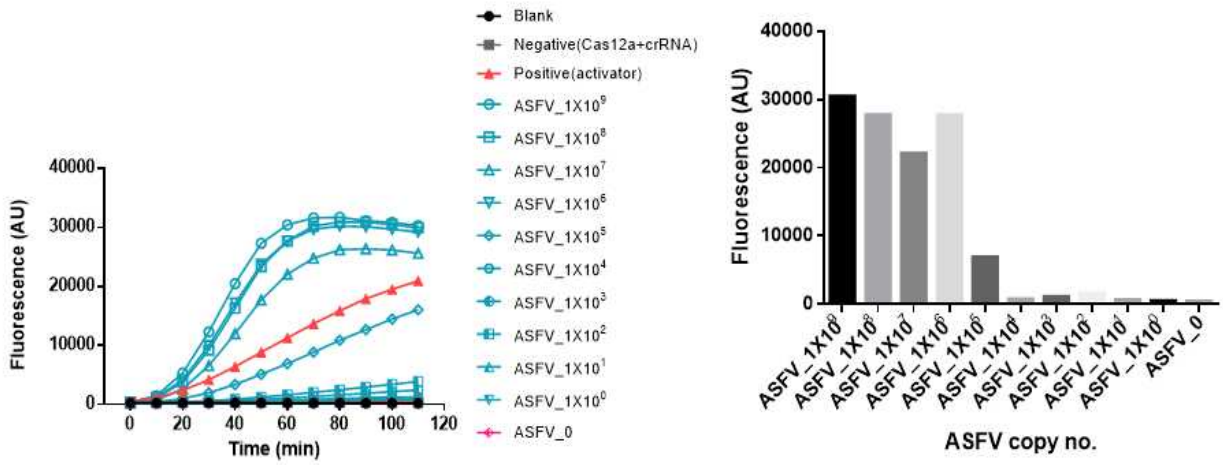
2. 시료 농도별 측정도 변화

▷ 사용된 ASFV fragment 1,783bp (copy no. 1.89×10^8 copies = 1ng) 의 경우, ASFV fragment 1ng 농도시 1nM (1나노몰) 농도를 가짐

▷ 10배씩 희석시, 1.89×10^6 copies (1피코몰), 1.89×10^3 copies (1펨토몰), 1.89×10^0 copies (1아토몰) 로 산정

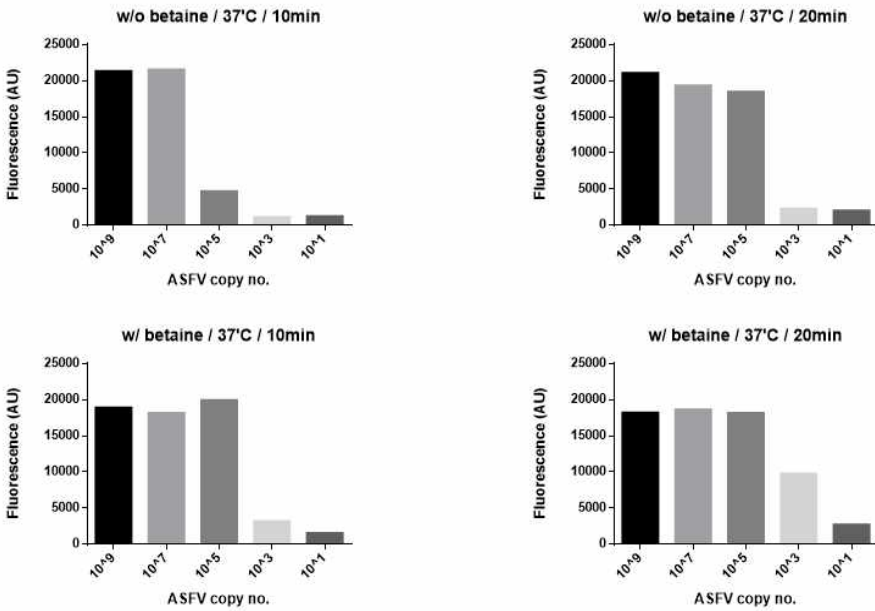


- ▷ ASFV 시료를 10배씩 희석해서 PCR 증폭후 형광발현 측정
- ▷ 10 펨토몰 단위까지 측정가능



- ▷ ASFV 시료를 10배씩 희석해서 RPA 증폭후 형광발현 측정
- ▷ 100 펨토몰 단위까지 측정 가능
- ▷ 157bp target RPA 진행 결과, 아직 aM (atto-mole, 아토몰) 수준까지는 amplification이 진행되지 못함. RPA sensitivity을 증가시킬 필요 있음.

3. RPA 증폭기능 향상을 위해 betaine 첨가



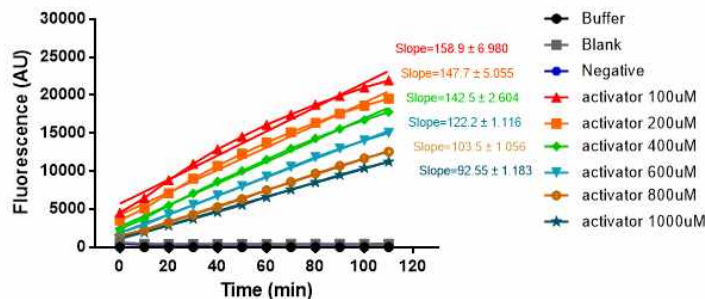
- ▷ betaine 은 이전 연구에서 핵산증폭 과정에 유의미한 효과가 있는 것으로 알려져 있어 RPA기법을 확립하고 효율성을 높이는 차원에서 반응물에 첨가하여 효과를 검증함.
- ▷ betaine 첨가후 37도 20분 반응시 증폭율이 향상되는 결과를 보임.

다) ASFV 표적 핵산 진단

1. ASFV 진단 (DNA형 바이러스 진단)

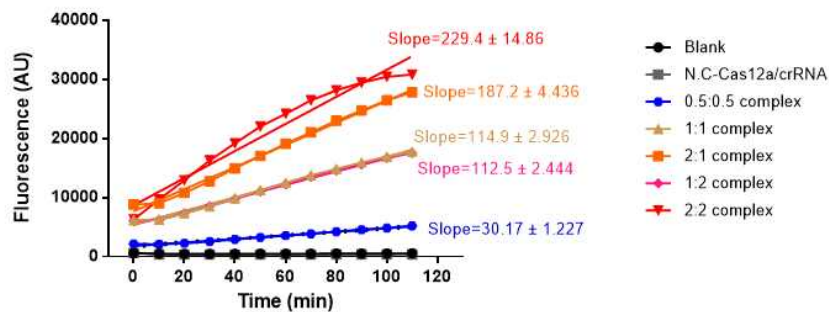
- 반응방법 : activator (실험시료, 표적핵산 분자) + Cas12/crispr guideRNA (유전자가위: 표적에 붙는 가이드RNA, 표적 및 주변핵산(DNA)을 절단하는 CAS 단백질) + ssDNA-FQ reporter (핵산프루브)
- 이후 형광리더기(Fluorescence plate reader; Tecan Spark)로 형광정도 측정
- 타겟 바이러스의 핵산 존재시, 표적특이적으로 제작된 가이드 RNA가 1차적으로 표적에 달라붙어 CAS12 단백질이 표적핵산을 절단하고 부수효과로 주변에 존재하는 핵산 DNA입자들을 2차절단하게 됨. 주변에 존재하는 핵산은 형광입자가 탑재된 FQ (Flourescence Quencher) reporter 가 달려있어 핵산절단시 형광을 발현하고 이를 측정하여 진단에 활용

1) activator 농도별 발광도 측정



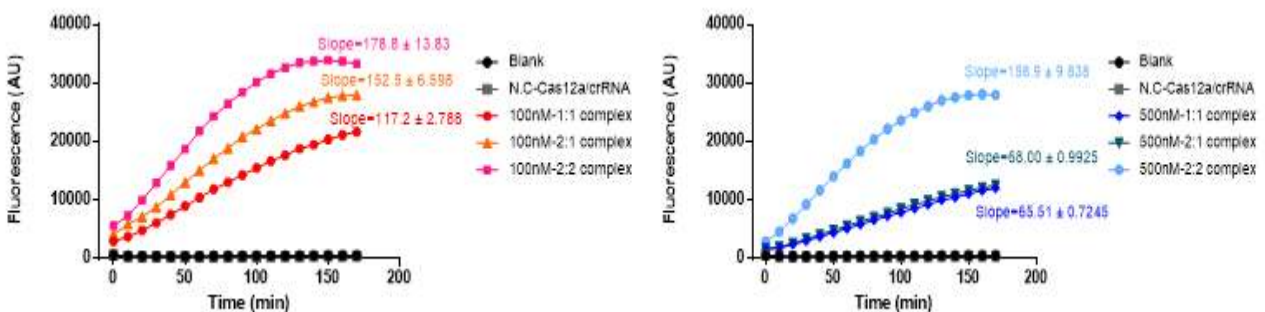
- ▷ Activator 100nM : LbCas12a/crRNA complex + 100nM activator + ssDNA-FQ
- Activator 200nM : LbCas12a/crRNA complex + 200nM activator + ssDNA-FQ
- Activator 400nM : LbCas12a/crRNA complex + 400nM activator + ssDNA-FQ
- Activator 600nM : LbCas12a/crRNA complex + 600nM activator + ssDNA-FQ
- Activator 800nM : LbCas12a/crRNA complex + 800nM activator + ssDNA-FQ
- Activator 1,000nM : LbCas12a/crRNA complex + 1000nM activator + ssDNA-FQ
- ▷ activator (바이러스 샘플) 농도에 따른 형광세기를 측정 한 결과, 대체적으로 형광세기가 증가 하였지만, 농도 100uM 과 200uM, 400uM에서 증가율이 증대됨. (slope 값 참조)
- ▷ 바이러스 샘플량이 늘어난다고 해서 형광세기가 높아지는 것은 아니고 적당한 샘플 농도에서 최대 증가폭을 보임

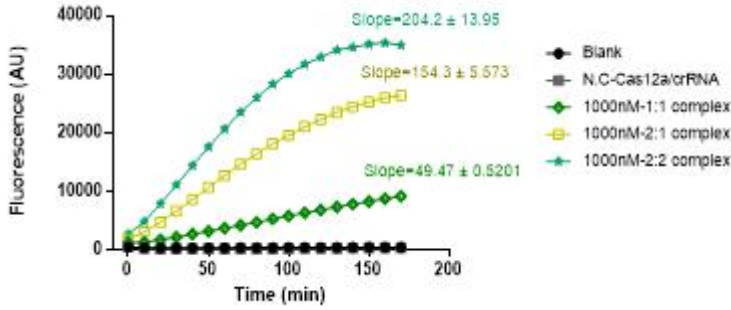
2) 반응조건별 발광도 측정 (Cas12/Crispr RNA 의 농도비율)



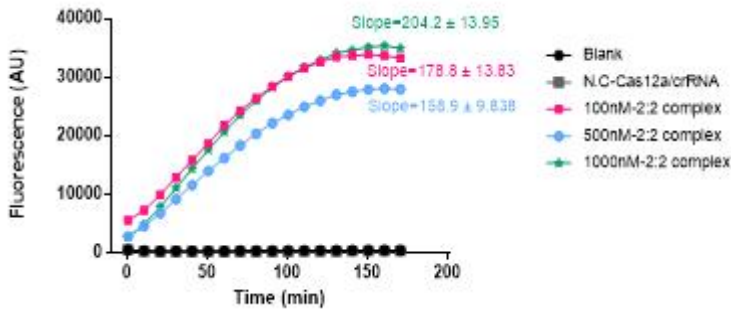
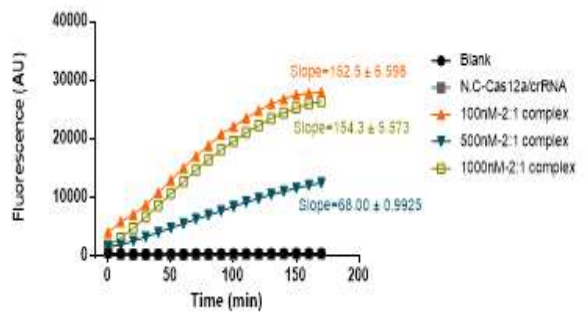
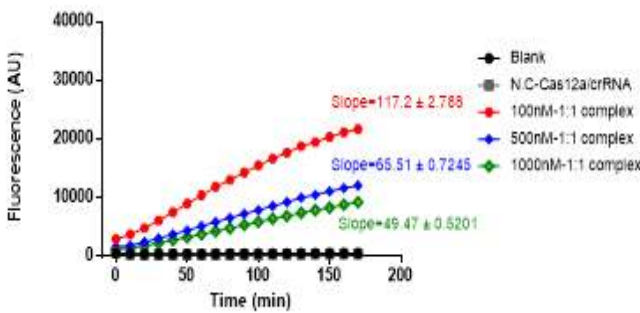
- ▷ 0.5 : 0.5 complex : 50nM LbCas12a/50nM crRNA complex + activator + ssDNA-FQ
- 1 : 1 complex : 100nM LbCas12a/100nM crRNA complex + activator + ssDNA-FQ
- 2 : 1 complex : 200nM LbCas12a/100nM crRNA complex + activator + ssDNA-FQ
- 1 : 2 complex : 100nM LbCas12a/200nM crRNA complex + activator + ssDNA-FQ
- 2 : 2 complex : 200nM LbCas12a/200nM crRNA complex + activator + ssDNA-FQ
- ▷ 반응조건 (crRNA와 CAS 단백질 농도변화)을 달리하여 형광세기를 측정 한 결과, 2:2 조건 (200nM 농도)에서 최대 증가치를 보임.

3) activator 농도별 vs 반응조건별 형광도 측정





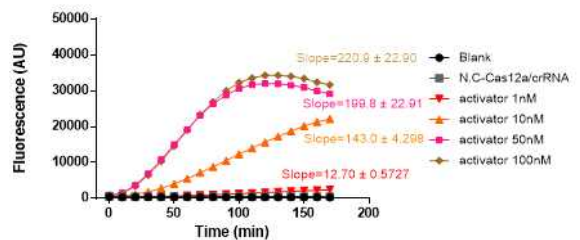
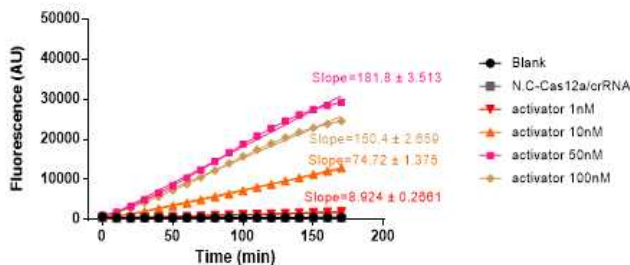
▷ activator 농도를 100nM, 500nM, 1000nM 변화를 주면서 반응조건을 달리 했을때의 형광도 측정



▷ 반응조건을 1:1, 2:1, 2:2 로 변화를 주면서 activator 농도를 달리했을때의 형광도 측정

▷ activator 농도에 상관없이 반응조건은 2:2 (200nM 농도) 로 해야함

4) 샘플 incubation 유무에 따른 형광도 측정



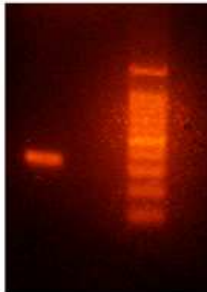
<그림, pre-incubation(좌측) vs non-pre-incubation(우측)>

▷ crRNA/CAS 의 반응력을 높이기 위해 반응전 pre-incubation (37°C, 30분) 효과 검증

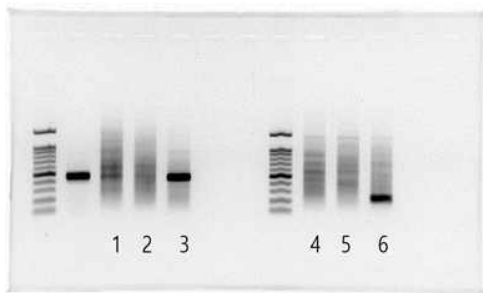
2) ASFV 양성 DNA 샘플 확보 및 nested PCR을 활용한 전기영동
 ASFV 양성 DNA PCR sample Confirm

ASFV DNA SAMPLE

- ASFV DNA SAMPLE
 - 농도 : 42ng/ul
 - 샘플 양 : 30ul
- ASFV p72 PCR SAMPLE
 - 샘플 양 : 50ul
 - PCR primer(p72)
 - Forward : GGT TGG TAT TCC TCC CGT G (nt261-279)
 - Reverse : GAT TGG CAC AAG TTC GGA C (nt568-586)
 - Reference : Liu, Yun, et al. "Development of an isothermal PCR assay for detection of African swine fever virus." *Archives of Virology* 162.7 (2017): 161-168.
 - 전기영동(size) : 326bp (우측 결과 참조)



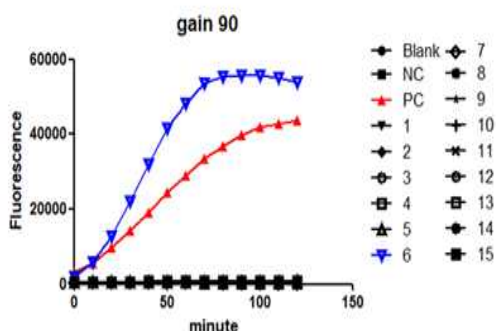
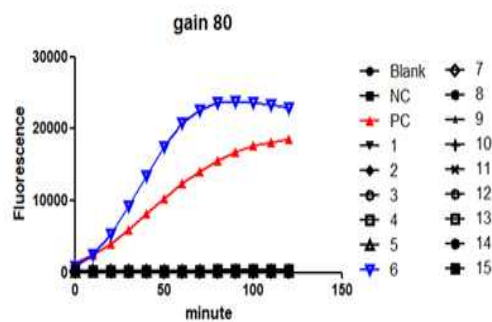
3) RPA 기법을 통한 Sample 증폭 및 전기영동을 통한 Primer 및 ASFV DNA sample 검증



	프라이머	샘플
1		DW
2	1번 Primer	음성 ASFV
3		양성 ASFV
4		DW
5	2번 Primer	음성 ASFV
6		양성 ASFV

4) ASFV 현장진단키트 개발을 위한 RPA-CRISPR/Cas-Based Biosensing System을 이용,
 Biosensing system 결과값을 통한 Validation 확인(Fluorescence)

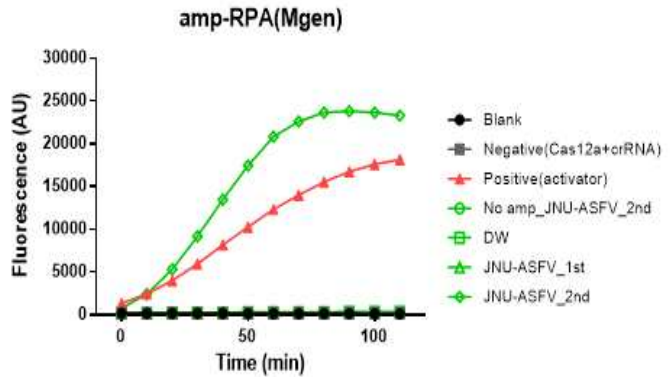
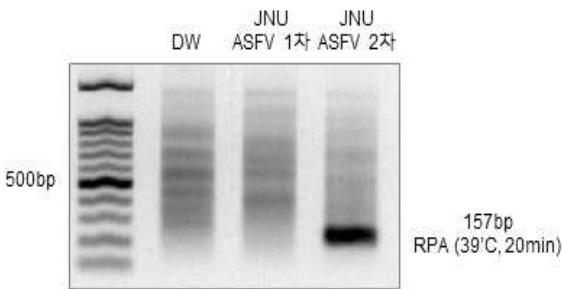
- RPA-CRISPR/Cas-Based Biosensing System을 통한 ASFV specific RPA-Primer 검증 및
 실험방법 최적화



번호	증폭법	Sample	반응시약
Blank		Blank	Blank
NC		Blank	Cas12a / crRNA
PC		activator	
1	RPA	DW (1번 프라이머 증폭)	
2		음성 ASFV (1번 프라이머 증폭)	
3		양성 ASFV (1번 프라이머 증폭)	
4		DW (2번 프라이머 증폭)	
5		음성 ASFV (2번 프라이머 증폭)	
6		양성 ASFV (2번 프라이머 증폭)	
7	X	음성 ASFV	
8	PCR	음성 ASFV	
9		음성2 ASFV	
10		Human Adenovirus	
11		Canine Distemper virus	
12		Human Herpes Simplex Virus2	
13		Porcine Circo Virus	
14		Canine Adenovirus	
15		Bovine Herpes	

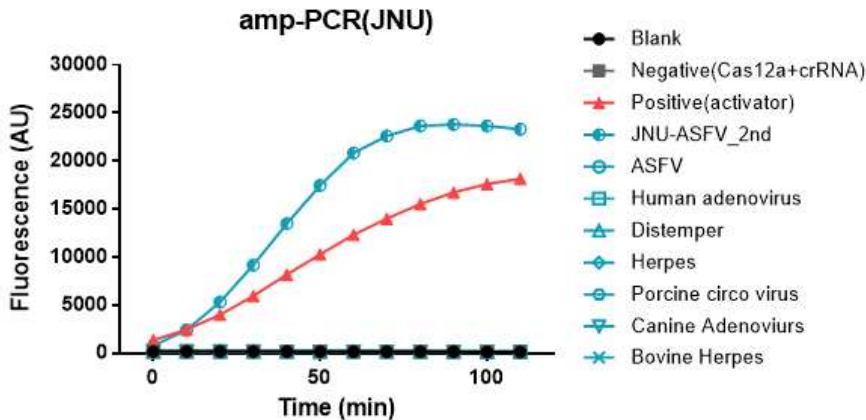
5) 조건이 확립된 임상샘플에서의 진단시스템 검증

Mgen primer (157bp)



- ▷ 7종의 DNA virus 의 핵산을 시료샘플로 하여 본 진단시스템의 특이도 검증
 사용된 virus 샘플 : 1) ASFV 2) Human Adenovirus 3) Canine Distemper 4) Porcine Circo Virus 5) Canine Adenovirus 6) Bovine Herpes

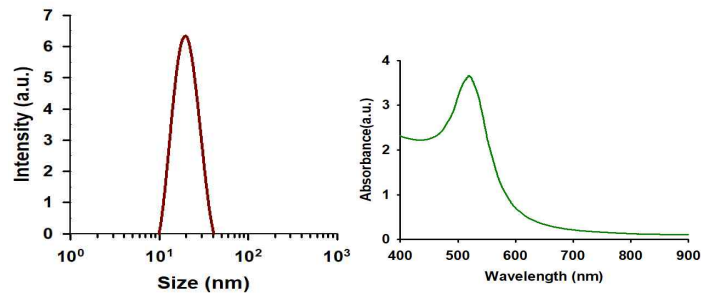
- ▷ positive sample (합성 ASFV DNA) 와 실제 ASFV에서 추출한 DNA sample 에서만 형광이 측정되었고, 타 시료에서는 측정이 안됨. (특이도 검증)



※ 최종결과

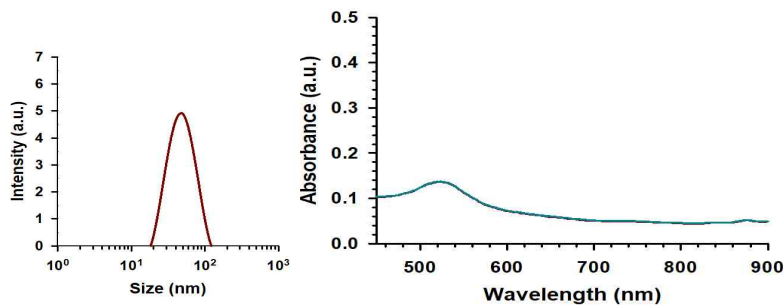
1. 핵산검출 (DNA)을 위해 HUDSON 기법 (lysis buffer : 100mM TECP+1mM EDTA, 반응조건 : 95°C, 10분)을 비롯하여 다양한 방법 (lysis buffer 10가지 사용)으로 생체시료에서 핵산검출에 성공함.
2. 핵산증폭 (DNA)을 위해 등온증폭법의 일종인 RPA 기법을 확립 (등온 PCR조건 및 specific primer 제작 등) 하여 기존의 PCR방식과 다른 등온증폭법인 LAMP 기법과의 증폭상태를 비교 검증하고 펩토몰단위까지 효과적인 목표핵산 증폭에 성공함.
3. CRISPR-CAS system 의 부수효과를 유도하여 핵산변이 및 질병바이러스 진단 플랫폼을 구성하고 1종의 DNA시료샘플 (아프리카돼지열병 바이러스) 에서 유효성을 검증하고 7종의 다른 바이러스와의 진단특이도 검증을 통해 진단시스템을 확립함.

○ NP (Gold Nanoparticle) 제작



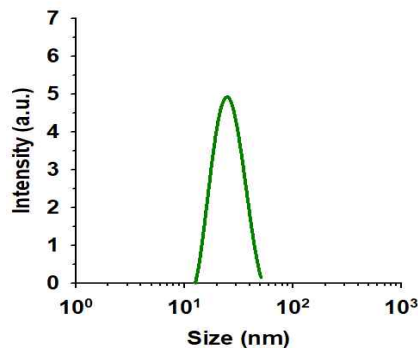
- 1% HAuCl₄ solution, 1% Sodium citrate solution
- GNP 제조 시, 정확한 반응을 위해 silicon oil을 비커 속 용액보다 높이 올라오게 설정하여 진행하였음.
- 제작된 금나노입자의 평균 크기는 26.06 nm이며 표준오차는 3.62임. 흡광도는 522 nm를 나타냄. 최종 용액의 색상은 레드 와인 색을 띠었음.
- 따라서, GNP (Gold Nanoparticle)이 형성됨을 확인하였음.

○ GNP 제조 및 흡광도 변화 확인



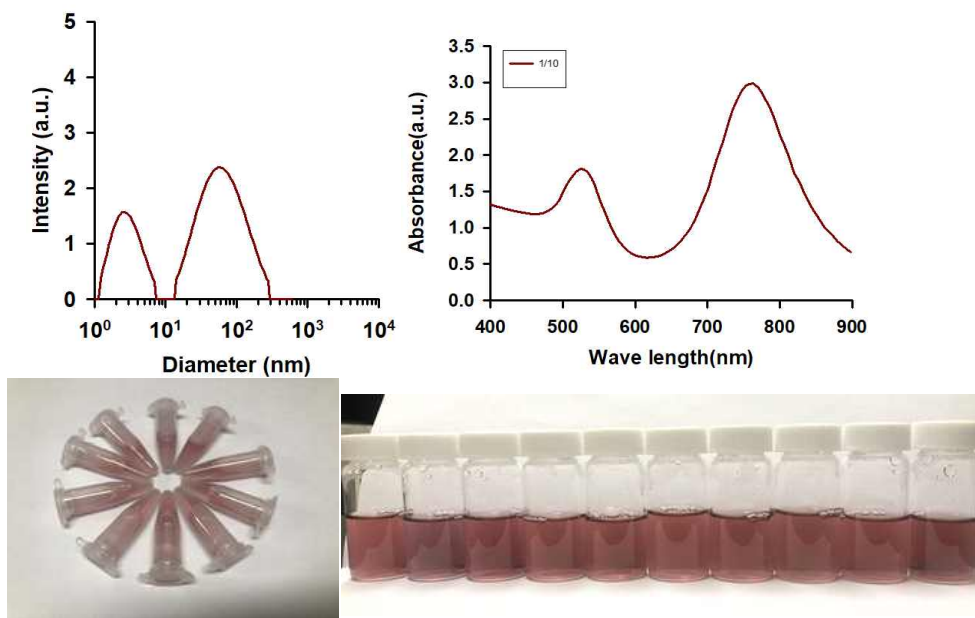
- 1 mM HAuCl₄ solution, 38.8 mM sodium citrate
- Amicon tube를 이용하여 정제 및 농축 후, DW에 분산 후 냉장 보관. 이후 3시간 마다 흡광도 확인.
- 본 실험에서 제작된 금나노입자는 평균 입자 크기가 52.09 nm이고, 표준오차가 0.37로 나타남, 흡광도도 520 nm로 일치함에 따라 GNP 제조 및 흡광도 변화를 확인하였음.

○ GNP 제조



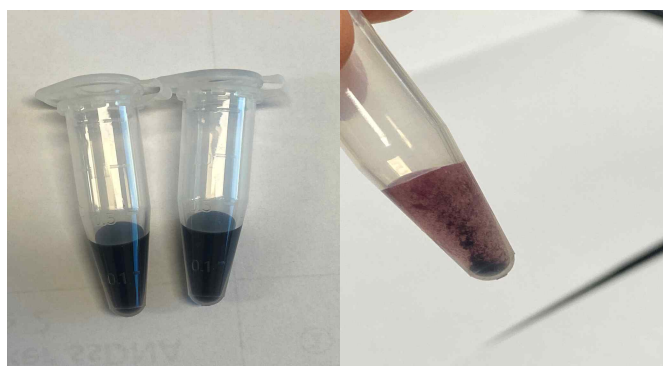
- 1 mM HAuCl₄ solution, 38.8 mM sodium citrate
- Amicon tube를 이용하여 정제 및 농축 후, DW에 분산 후 냉장 보관. 이후 3시간 마다 흡광도 확인.
- 본 실험에서 금나노입자의 크기 변화를 위해 선행 실험에서 최적화 된 조건을 이용하여 제작함. 문제가 되었던 1st peak 는 ghost peak로 data 상에서 문제 없음을 확인하였음.

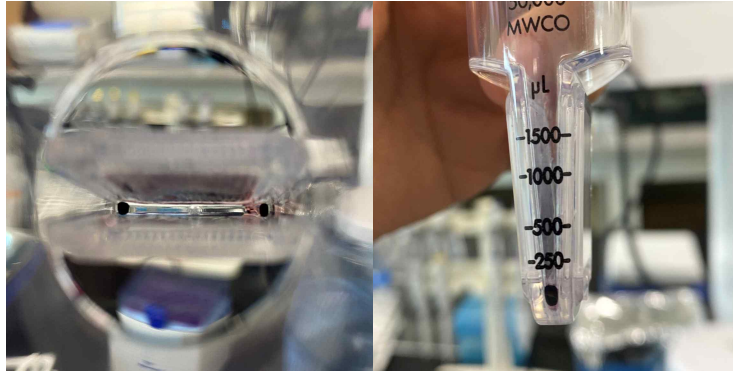
○ GNR (Gold Nanorod) 제작



- CTAB solution, HAuCl₄ solution, AgNO₃ solution, AA solution, seed solution.
- 제작된 금나노로드의 크기는 2.1 nm와 63.4 nm이며 흡광도는 524 nm, 761 nm를 나타냄.
- 최종 용액의 색상은 빨간색과 갈색이 섞인 색을 띠었음.
- 따라서, GNR (Gold nanorod)이 형성됨을 확인하였음.

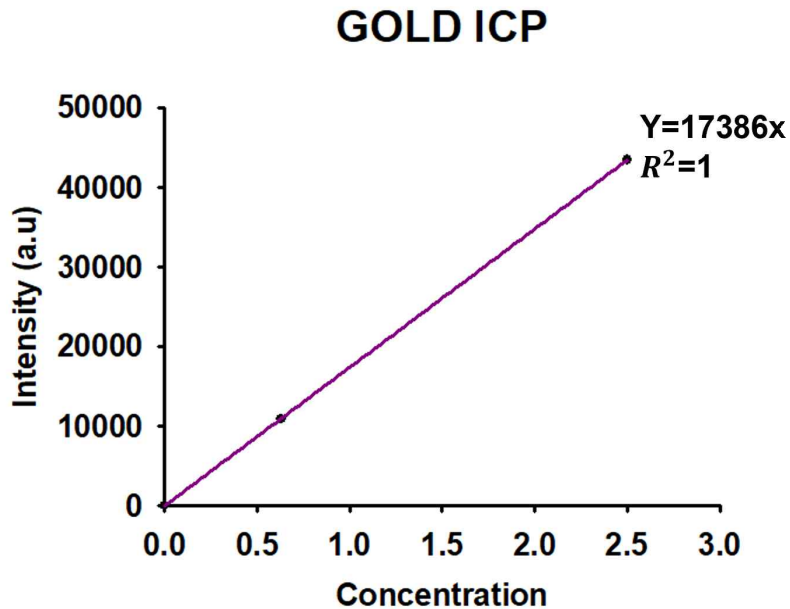
○ GNP 제조 및 응집





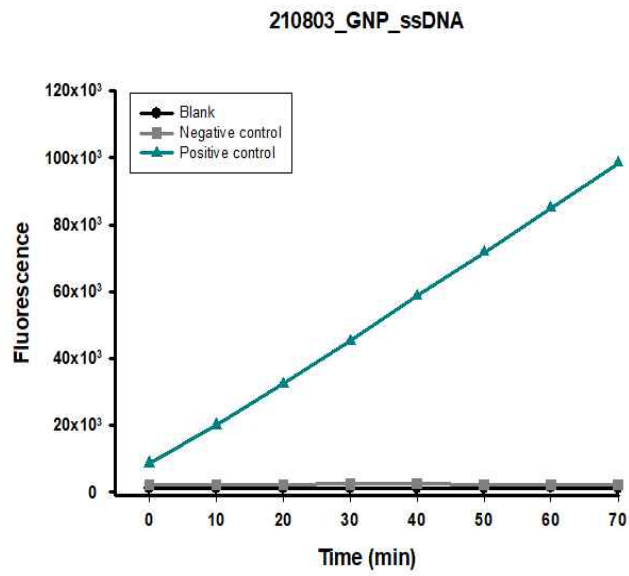
- 1 mM HAuCl₄ solution ,38.8 mM sodium citrate
- Amicon tube를 이용하여 정제 및 농축 후, DW에 분산 후 냉장 보관
- GNP와 DNA Probe 부착 후 washing 3회 진행하였음
- GNP와 DNA Probe 부착 및 washing 과정에서 금나노입자 응집이 진행되어 눈으로 입자들이 뭉친 것이 보임을 확인하였음.

○ GNP ICP 측정



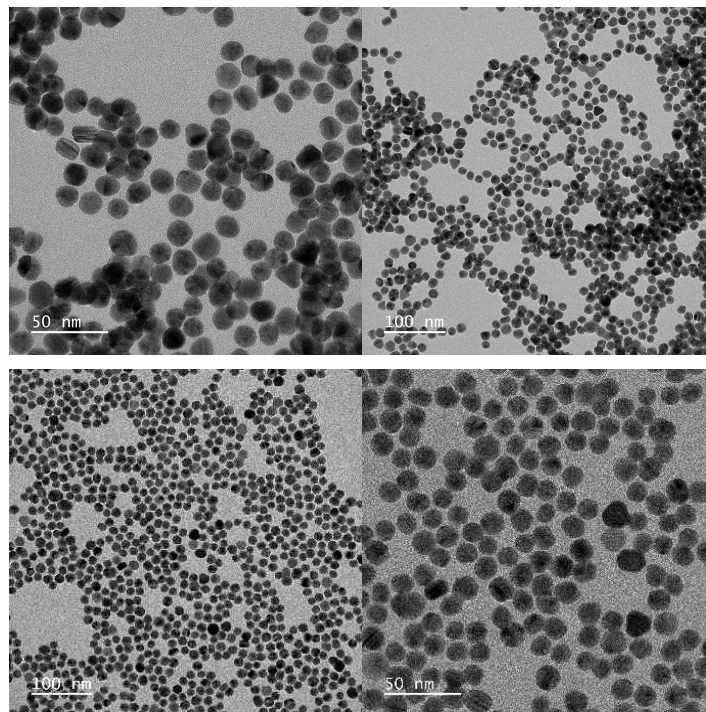
- 1 mM HAuCl₄ solution ,38.8 mM sodium citrate
- Amicon tube를 이용하여 정제 및 농축 후, DW에 분산 후 냉장 보관 한 GNP 용액을 희석 후 ICP 측정.
- ICP를 통해 Calibration curve를 정리함. 이 후 금나노입자 용액 제조 시 농도를 확인 하였음.

○ GNP CRISPR 관련 형광 실험



- Cas12a, crRNA, ASFV Fragment, ssDNA-FQ, 10X NEB
- Ex: 485 nm, Em : 535 nm에 맞춰 형광 확인을 하였음.
- Positive control이 시간에 따라 형광이 증가함을 확인하였음.

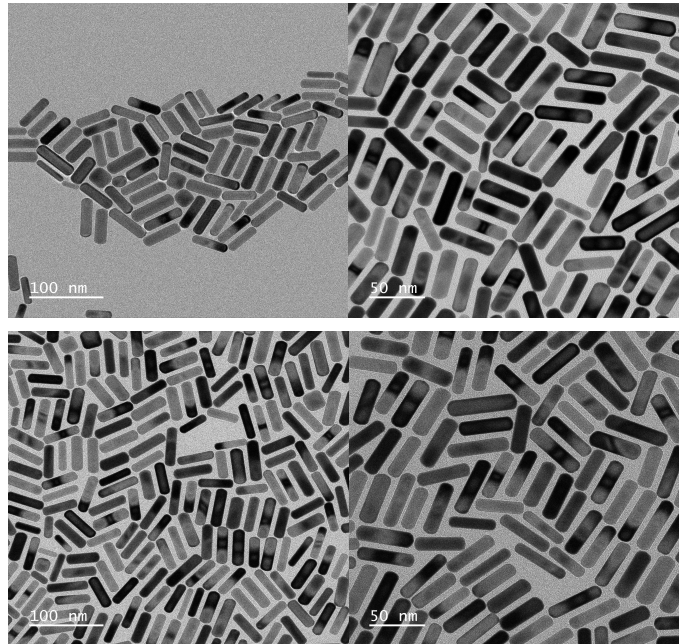
○ GNP TEM image 확인



- 1 mM HAuCl₄ solution , 38.8 mM sodium citrate

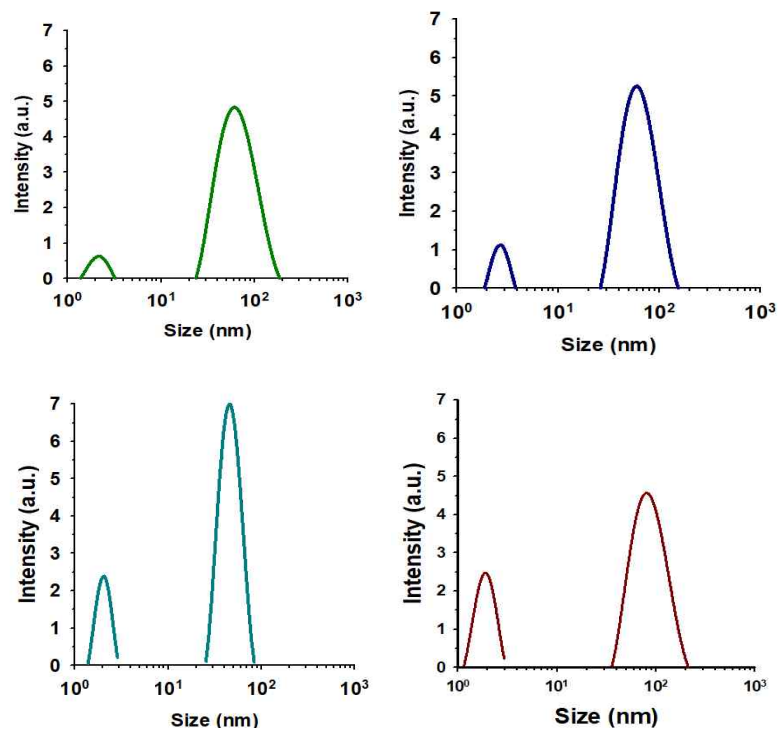
- Amicon tube를 이용하여 정제 및 농축 후, DW에 분산 후 냉장 보관 후 TEM image 촬영 하였음.
- TEM image를 통해 GNP의 형성 image를 확인하였음.

○ GNR TEM image 확인



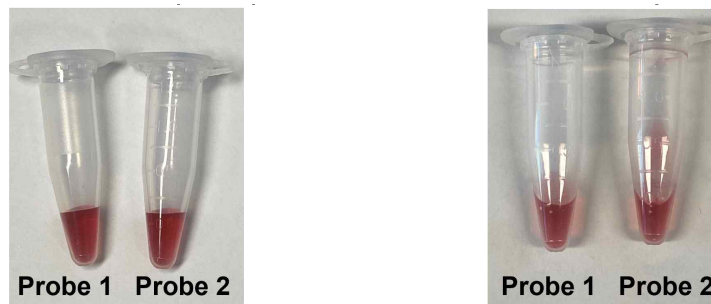
- CTAB solution, HAuCl₄ solution, AgNO₃ solution, AA solution, seed solution
- DDW 희석 후 TEM image를 통해 GNR의 형성 image를 확인하였음.

○ GNP DNA 부착실험



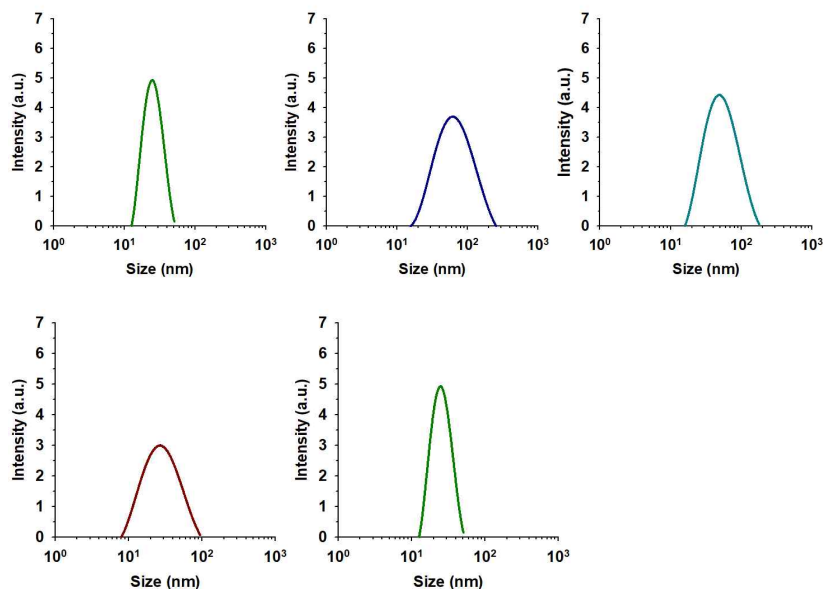
- 1 mM HAuCl₄ solution , 38.8 mM sodium citrate
- Amicon tube를 이용하여 정제 및 농축 후 GNP 용액과 DNA Probe 1, DNA Probe 2 를 부착 후, Linker ssDNA 부착 한 뒤 입자의 크기를 확인하였음.
- GNP와 DNA Probe가 부착 된 후 Linker ssDNA를 첨가하여 size 변화를 알아보기 위한 실험임.
- 왼쪽부터 각각 GNP+DNA Probe 1, GNP+DNA Probe 2, GNP+DNA Probe 1+ DNA Probe 2, GNP+DNA Probe 1+ DNA Probe 2+ Linker ssDNA이며 각각의 입자 평균크기는 64.43, 158.78, 56.49, 339.98이며 표준오차는 각각 3.41, 140.65, 3.66, 356.98로 나타남.

○ GNP DNA 부착 비색 변화



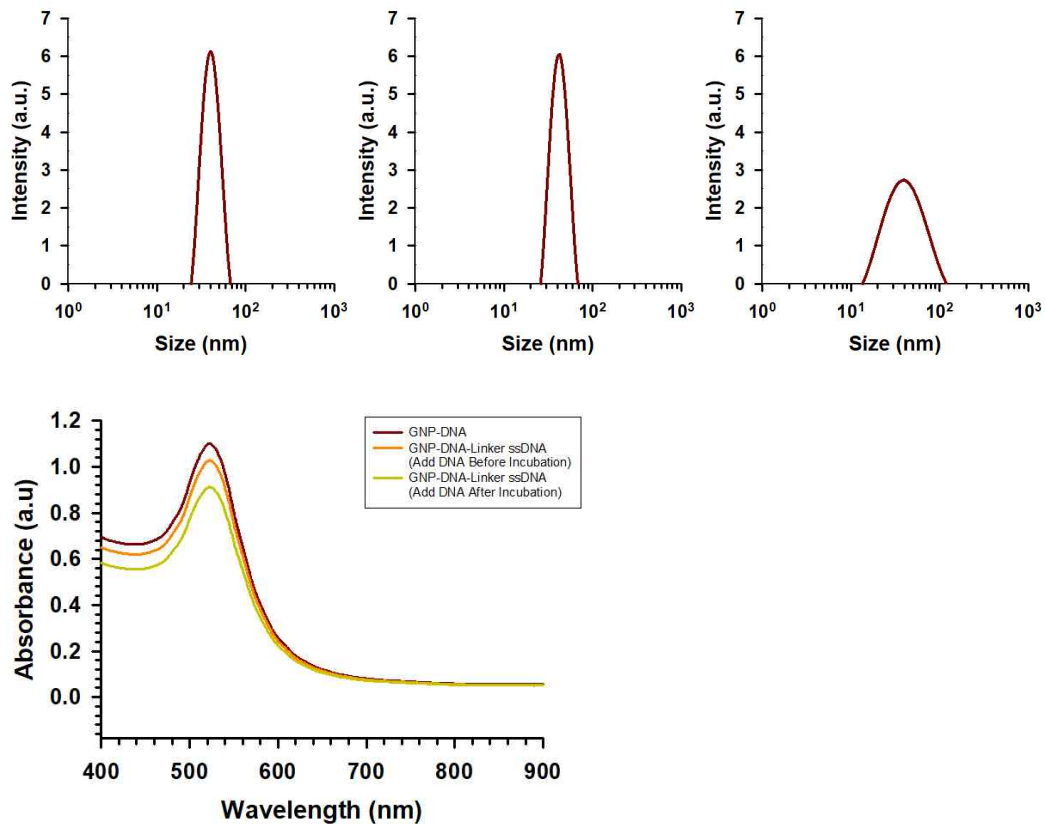
- 1 mM HAuCl₄ solution, 38.8 mM sodium citrate Amicon tube를 이용하여 (7000g, 15 min)정제 및 농축 후, DW에 분산 후 냉장 보관
- GNP와 DNA Probe를 incubation 진행 전후 입자의 비색변화를 확인하였음.

○ GNP - DNA, Linker ssDNA 부착실험 진행



- 1 mM H₂AuCl₄ solution, 38.8 mM sodium citrate
- Amicon tube를 이용하여 정제 및 농축 후, DW에 분산 후 냉장 보관
- GNP 용액과 DNA Probe 1, DNA Probe 2를 부착 후, incubation 진행하였음. 이 후 DLS 및 흡광도 측정.
- GNP와 DNA Probe가 부착 된 후 입자 크기 변화를 확인함. 맨 위 왼쪽부터 각각 Bare GNP, GNP+DNA Probe 1, GNP+DNA Probe 2,이며 입자의 평균 크기는 각각 27.12, 81.40, 67.81 nm 이며, 표준오차는 0.79, 4.67, 6.21을 나타냄. 아래 두 데이터는 Amicon tube 정제 전 후이며 입자의 크기가 좀 더 고르게 변함을 확인하였음.

○ GNP Probe 1, 2 및 Linker ssDNA 부착과 흡광도 측정

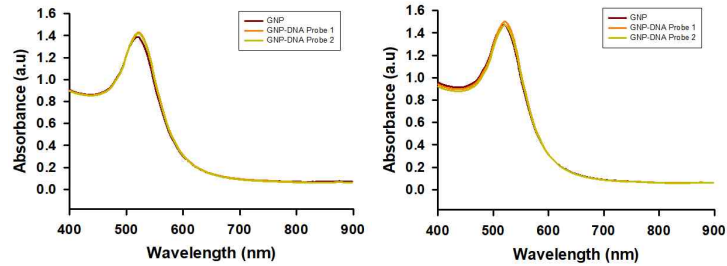


- 1mM H₂AuCl₄ solution, 38.8 mM sodium citrate
- Amicon tube를 이용하여 정제 및 농축 후, DW에 분산 후 냉장 보관
- GNP 용액과 DNA Probe 1, DNA Probe 2를 부착 후, incubation 진행하였음. 이 후 DLS 및 흡광도 측정.
- GNP와 DNA Probe가 부착 된 후 Linker ssDNA를 첨가하여 size 변화를 알아보기 위한 실험. 왼쪽부터 각각 GNP+DNA Probe 1+DNA Probe 2, GNP- DNA Probe 1- Probe 2 +Linker ssDNA Mix (before incubation), GNP- DNA Probe 1- Probe 2

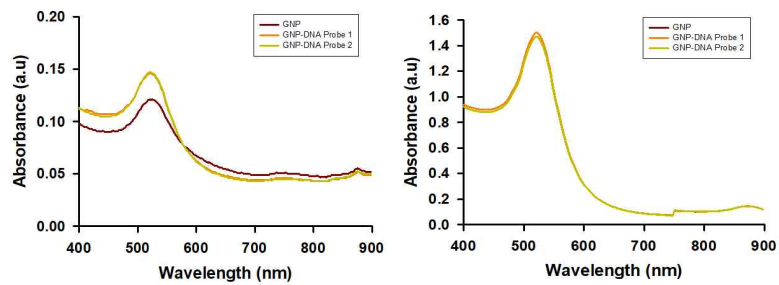
+Linker ssDNA Mix (after incubation)이며, 각각의 입자 평균크기는 45.35, 45.04, 41.92 nm 이며 표준오차는 각각 4.84, 2.48, 1.05으로 나타남. sample에 따라 농도 차이는 보이지만 흡광도는 모두 522 nm로 동일함을 확인하였음.

○ GNP Probe 1, 2 부착과 흡광도 측정

GNP , GNP-DNA Probe 1, GNP-DNA Probe 2의 흡광도

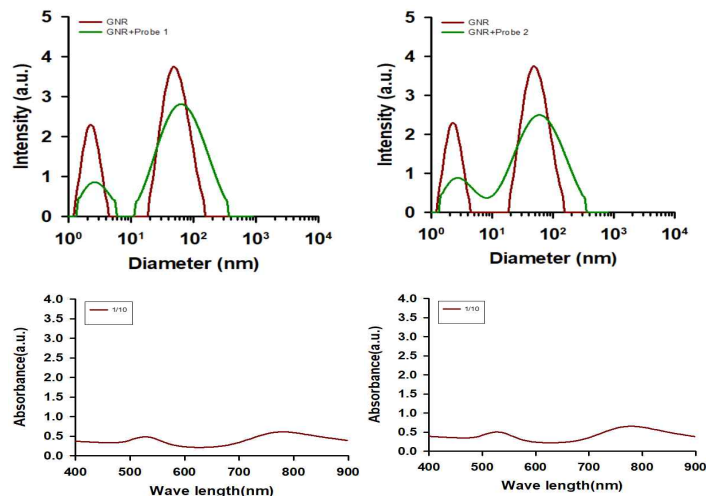


incubation 후 흡광도



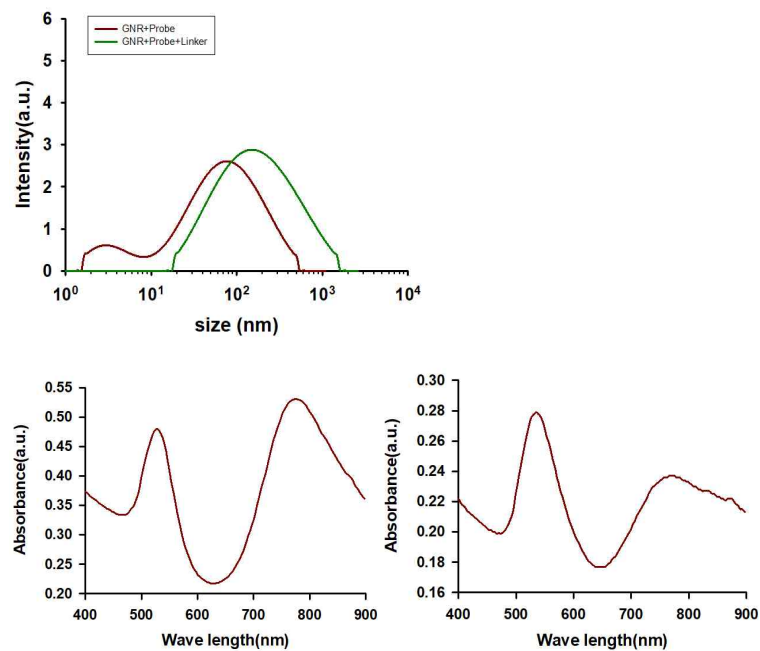
- 1mM HAuCl₄ solution, 38.8 mM sodium citrate
- Amicon tube를 이용하여 정제 및 농축 후, DW에 분산 후 냉장 보관
- GNP 용액과 DNA Probe 1, DNA Probe 2를 부착 후, incubation 진행하였음. 이 후 DLS 및 흡광도 측정.
- DNA의 가닥을 liner 형태로 만들어 입자의 크기, 흡광도 차이를 본 후 Linker ssDNA의 부착을 최적화 하기 위한 실험임.

○ GNR (Gold Nanorod) + DNA probe 부착



- GNR과 DNA probe를 혼합한 후 500mM의 citrate-HCl buffer를 추가하고, incubation하여 GNR과 DNA probe를 부착하였음.
- DNA probe 부착 전 GNR의 크기는 2.4 nm, 56.4 nm로 나타남.
- 부착된 GNR과 DNA probe1의 크기는 2.9 nm와 84.5 nm이며 흡광도는 530 nm, 778 nm로 나타남.
- 부착된 GNR과 DNA probe2의 크기는 3.4 nm와 78.2 nm이며 흡광도는 528 nm, 778 nm로 나타남.
- 따라서, GNR과 DNA probe가 부착됨을 확인하였음.

○ GNR (Gold Nanorod)+DNA probe 1+DNA probe 2+Linker ssDNA 부착 실험

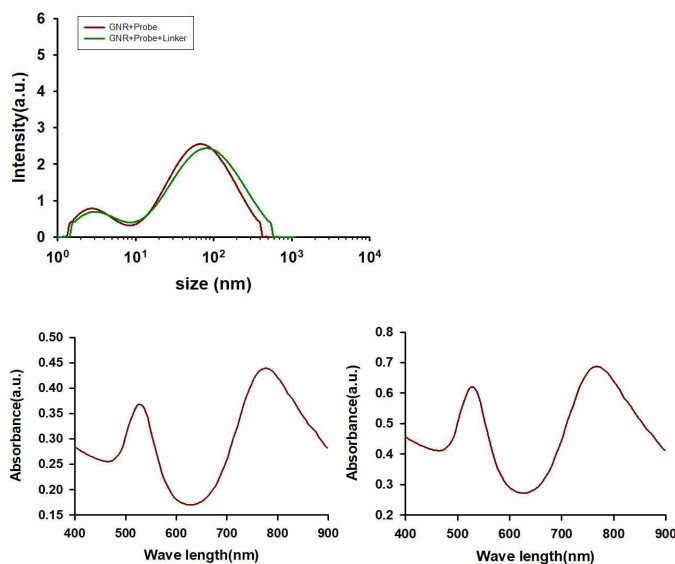


- GNR+Probe 1, GNR+Probe 2, nuclease free water, Linker ssDNA를 혼합하여 가열하고 ice에 보관하여 GNR과 DNA probe가 부착된 용액에 Linker ssDNA를 부착하였음.
- GNR, DNA probe1, DNA probe 2가 부착된 용액의 크기는 4.5 nm, 107 nm이며 흡광도는 527 nm, 773 nm로 나타남.
- GNR, DNA probe1, DNA probe2, Linker ssDNA가 부착된 용액의 크기는 257 nm이며 흡광도는 524 nm, 767 nm로 나타남.
- 흡광을 측정하였을 때 결합 후에 장측에서 데이터가 명확하게 나오지 않고 wavelength가 6nm 짧아졌지만, 단측과 장측이 존재하는 것으로 보아 입자는 안정하게 유지되었음을 확인하였음.
- Linker를 붙인 후 DLS를 측정하였을 때 사이즈가 커지고, peak 가 1개만 생성되었음을 확인하였음.

- 응집이 되었는지 확인하기 위해 0.2um syringe filter에 결합 전과 후의 용액을 필터에 걸러보았음.
- Linker가 결합한 용액의 경우 응집이 되어 입자가 필터에 걸러졌으며, 원심분리를 해 보았을 때 응집된 입자의 경우 빠르게 가라앉아 투명한 색이 나왔음을 확인하였음.
- Linker가 결합하지 않은 용액의 경우 응집된 입자가 없으므로 필터에 아무것도 걸러지지 않았으며, 원심분리 후 상등액이 붉은색을 띠는 것을 확인하였음.



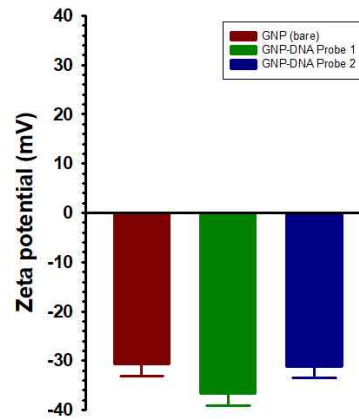
○ GNR (Gold Nanorod)+DNA probe 1+DNA probe 2+Linker ssDNA 부착 실험



- GNR+Probe1, GNR+Probe2, nuclease free water, Linker ssDNA를 혼합하여 가열하고 ice에 보관하여 GNR과 DNA probe가 부착된 용액에 Linker ssDNA를 부착하였음.
- GNR, DNA probe1, DNA probe2가 부착된 용액의 크기는 3.4 nm, 92.4 nm이며 흡광도는 525 nm, 775 nm로 나타남.
- GNR, DNA probe1, DNA probe2, Linker ssDNA가 부착된 용액의 크기는 4.8 nm, 116.1 nm이며 흡광도는 523 nm, 765 nm로 나타남.

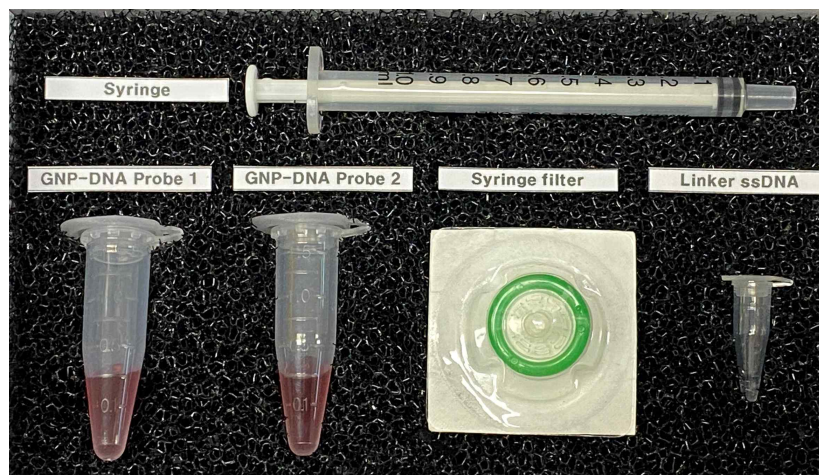
- 흡광을 측정하였을 때 결합 후에 장축의 길이가 10 nm 짧아졌으며 단축과 장축이 존재하는 것으로 보아 입자는 안정하게 유지되었음을 확인하였음.
- Linker ssDNA 부착 후 전체적으로 크기가 커졌음을 확인하였음.

○ GNP , GNP-DNA Probe 1, GNP-DNA Probe 2 Zeta potential 측정



- 1mM HAuCl₄ solution, 38.8 mM sodium citrate
- Amicon tube를 이용하여 정제 및 농축 후, DW에 분산 후 냉장 보관
- GNP 용액과 DNA Probe 1, DNA Probe 2를 부착 및 incubation 진행 후, 희석하여 zeta potential 측정하였음,
- bare GNP가 -30.7, GNP-DNA Probe 1이 -36.6, GNP-DNA Probe 2가 -31.1 mV의 값을 나타냄을 확인하였음.

○ 금나노입자 기반 응집을 통한 현장 진단 키트 시제품 개발



- GNP+Probe 1, GNP+Probe 2, Linker ssDNA, syringe filter, syringe
- 금나노입자의 응집 후, 입자 크기 변화로 syringe filtering을 통해 용액의 색상이 달라지게 됨을 확인하였음.

제3장 연구개발과제의 목표 달성도 및 차후대책

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

(과학적 성과)

- 종래의 ASFV 진단방식 (PCR 방식)보다 진단 효율은 우수하면서 측정시간의 용이성 및 현장적 용이 우수한 진단방식을 새롭게 구현함.

- 타 바이러스 (7종)와의 진단 특이도를 확인한 결과, ASFV 에서만 특이적으로 진단이 되는 우수한 성적을 보여주었고, 감별진단에도 이용할 수 있음이 확인됨.

- DNA 유래 바이러스 뿐만 아니라 RNA 유래 바이러스에도 적용가능함을 확인

(기술적 성과)

1) 신규 유전자가위 (Cas12, Cas13) 을 활용한 바이러스 진단 기술 확보

2) 현장진단을 위한 샘플에서의 핵산 채취 및 증폭 기술 확보

1) 현장시료 (전혈, 혈청 등)에서의 핵산 채취 기술 확보

2) 등온조건에서의 채취된 핵산의 증폭 기술 확보

3) 미량의 샘플에서도 채취 가능, 소량의 핵산 증폭 가능

RPA방식은 종래의 PCR방식과 비교해도 증폭율 차이가 없음.

(경제적 성과)

1) 진단 효율성 재고 및 현장진단 적용으로 진단 비용 절감 효과

2) 현장진단의 국산화를 통한 수입대체 효과 및 수출증대 가능

(사회적 성과)

- 진단시간 및 기간의 단축으로 예찰적 방역시스템 구성에 효과적

- 전염성 및 치사율이 높은 아프리카돼지열병의 조기 진단으로 추가 피해확산 방지

(인프라 성과)

- ASFV 현장진단용 시제품 개발 공정 확립

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

(과학적 성과) 국내 학술발표 2건, 국외 학술지 논문발표 2건

(기술적 성과) 진단법 개발 특허 출원 1건(한국)

(경제적 성과) 고용창출(신규) 3명

(사회적 성과) 인력양성 1명

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도		1단계 (2020~2021)	n단계 (YYYY~YYYY)	계	가중치 (%)
	목표(단계별)	실적(누적)				
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	논문	목표(단계별)				
		실적(누적)	2		2	
	특허	목표(단계별)				
		실적(누적)	1		1	
학술발표	목표(단계별)					
	실적(누적)	2		2		
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	고용창출	목표(단계별)				
		실적(누적)	3		3	
	인력양성	목표(단계별)				
		실적(누적)	1		1	
계						

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○핵산검출을 위한 HUDSON 기법 정립	○ 생체시료 (전혈, 혈청)에서 핵산 검출 성공 전혈 1ul 정도의 시료에서도 검출 성공 목표 핵산 (DNA/RNA) 검출 성공	○ 100
○핵산증폭을 위한 RPA 기법 정립	○ 종래의 PCR 방식보다 빠르고 반응력이 좋은 RPA방식 정립 타겟핵산의 펩토몰 단위까지 RPA 증폭 성공	○ 100
○CRISPR-CAS12 system 의 2차절단 부수효과 유도	○ 반응농도, 반응조건 (crRNA,Cas12), pre-incubation 효과 등 진단시스템 조건 최적화	○ 100
○ASFV DNA 시료샘플에서 진단시스템 검증	○ ASFV 임상샘플에서 진단 성공	○ 100
○ 아프리카 돼지열병 검출/진단용 금나노입자 응집 기반 육안 검출 플랫폼 개발 및 검출	○ 타바이러스(7종) 와의 특이도 검증 ○ 크기와 흡광도를 통한 DNA probe 및 Linker ssDNA 부착 확인	○ 100
○ 금나노입자 기반으로 하여 응집 현상을 이용한 육안 검출 플랫폼 개발	○ Linker ssDNA 부착 전/후 필터링을 통한 비색변화 확인	○ 100
○ 아프리카 돼지열병 검출/진단용 금나노입자 응집 현상 최적화	○ Linker ssDNA 결합 안정성을 위한 조건 최적화	○ 100
○ 금나노입자 기반으로 하여 응집 현상을 이용한 육안 검출 최적화	○ 원심분리 및 필터링을 통한 육안 검출 조건 최적화	○ 100

3) 목표 미달 시 원인분석

가) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 연구종료시점에 시제품제작, 인허가기술문서 작성, 인증절차 진행을 목표로 했으나, 현재 연구개발을 완료하고 본 완료된 시스템의 외부 수행기관 (중국, 실제 임상샘플 대상)에서의 특이도, 민감도 테스트가 진행중에 있음.
- 아프리카돼지열병이라는 1종 법정전염병을 대상으로 개발되는 기술이라는 특수성 때문에 국내에서 원활하게 검증 테스트 진행이 어려운 측면이 있어 해외협력기관을 활용하여 진단시스템 개발에 필수요소인 실제 임상샘플에서의 유효성 평가를 진행키로 함.
- 본 외부테스트 완료후 검증 보고서가 수령되는 대로 시제품제작에 착수할 예정이며, 제작된 시제품을 대상으로 관계기관인 농림축산검역본부와 협의하여 인허가 및 인증절차를 진행할 예정이며 개발종료후 1년인 2022년 상반기에 완료할 예정임.

나) 자체 보완활동

본 연구개발제품의 필수요소인 실제 아프리카돼지열병 바이러스가 포함된 임상샘플에서의 유효성 평가가 진행되어야 하며, 현재 중국에서 수행중에 있으며 상반기내에 국내 농림축산검역본부와의 사전협의를 통해 제품인허가 절차를 진행할 예정임.

다) 연구개발 과정의 성실성

본 연구목표를 달성하기 위해 각 기관별 (주관, 공동, 위탁기관)로 해당 연구내용을 성실하게 이행하였으며 그 결과 목표달성도 100%를 기록함.

4) 차후대책

- 시장진입을 위한 제품 인허가 계획

(1) 동물용 의료기기(체외진단시약) 제조업 허가 신청

: 동물용 의료기기업 허가 절차는 신청서 작성, 접수, 서류검토, 현지 실사, 결재, 허가증 발송으로 이루어지며, 처리기간은 10일

시설	시설기준
제조작업을 행하는 작업소	<ul style="list-style-type: none"> • 쥐·해충·먼지 등을 막을 수 있는 시설을 할 것 • 멸균을 요하는 제품을 제조하는 작업소의 천정은 먼지가 떨어질 우려가 없도록 마무리 되어야 하고, 바닥과 벽은 매끄럽게 하여 먼지나 오물을 쉽게 제거할 수 있게 하여야 하며, 천정·바닥·벽의 표면은 소독액의 분무 세척에 견딜 수 있도록 되어 있을 것 • 작업소에는 작업대를 두고, 멸균을 요하는 제품을 제조하는 경우에 멸균시설을 둘 것
원료, 자재 및 제품의 품질관리를 행하는 시험실	위탁하는 경우는 제외
원료, 자재 및 제품을 보관하는 보관소	• 보관소는 원료, 자재 및 제품을 위생적이고 안전하게 보관할 수 있도록 설비할 것
제조 및 품질관리에 필요한 시설 및 기구	<ul style="list-style-type: none"> • 당해 제품을 제조 및 품질관리에 필요한 시험시설 및 기구 • 다른 동물용의료기기 제조업자와 「동물용의약품등 취급규칙」 제51조의3에 따라 농림축산식품부 장관이 지정한 동물용의료기기 시험검사기관 등에 위탁하는 경우 제조시설 및 기구를 갖추지 아니할 수 있음

<표, 아래와 같은 동물용 의료기기 제조소 시설 기준>

(2) 동물 감염병(ASF) 체외진단키트 기술문서 작성

- 대상 제품명 및 형명

① 제품명 (등급) : 고위험성동물전염병면역화학검사시약[3등급]

② 형명 (모델명) : ASFV DNA rapid kit

- 작용원리 : 아프리카돼지열병 바이러스의 핵산을 검출하는 체외진단용 면역검사시약으로 유전자기위기반 분자진단법을 사용함

- 제출자료

1. 개발경위, 측정원리방법 및 국내외 사용현황에 관한 자료
2. 원재료 및 제조방법에 관한 자료 - 원재료의 성분 또는 분량 근거 자료, 제조공정
3. 사용목적에 관한 자료 - 검사대상, 검체종류, 검사항목, 측정원리 및 정성 또는 정량에 관한 자료
4. 저장방법과 사용기한에 관한 자료
5. 성능에 관한 자료 - 분석적 성능시험, 임상적 성능시험, 완제품 품질관리 시험성적서, 분석적 성능에 사용된 표준물질, 검체 보관 및 취급상 조건설정
6. 시약의 취급자 안전에 관한 자료

(3) 개발제품의 성능평가

- 분석적 성능평가 및 임상적 성능평가 진행

가. 분석적 성능시험은 민감도(판정기준, 최소검출한계, 측정범위 등)와 특이도(교차반응, 간섭), 정밀도(반복성, 재현성 등), 정확도, 자료

나. 임상적 성능시험은 임상적 민감도와 특이도 자료

- 주요 성능평가 항목 지표 마련

번호	성능항목	평가방법
1	정밀도(반복성)	양성검체 0종, 음성검체 0종을 사용하여 개발시제품 Lot간 비교 확인 통해 반복성 유효평가
2	정밀도(재현성)	양성검체 0종, 음성검체 0종을 사용하여 개발시제품 LOT간 비교 확인 통해 재현성 (장소, 온도등) 유효평가
3	임상적 특이도	임상적 음성검체 중 00두 음성으로 00.0% 특이도 검증
4	임상적 민감도	임상적 양성검체 중 00두 양성으로 00.0% 민감도 검증
5	분석적 민감도(검출한계)	최저 검출한계 기준으로 기존 상용화 제품대비 검출한계 검증
6	분석적 특이도(교차반응)	최저 검출한계 기준으로 기존 상용화 제품대비 교차반응 검증

제4장 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 첨단생명공학기술인 유전자가위기술의 국내화를 통해 혁신적인 진단시스템의 개발 및 관련 기술의 진보에 기여, 질병 극복의 중요한 토대가 됨
- 효율 높은 유전자가위기술을 활용하고, 유전자가위의 2차절단 부수효과를 진단기술 및 의료산업에 적용하여 다양한 질병진단에 이용이 가능함.
- 전염성 동물질병진단 뿐만 아니라 인체 암, 질병 진단에 활용이 가능함
- 상업화를 통한 고부가가치 창출 및 바이오 신성장 산업육성을 기대할 수 있음
- 질병 조기 진단을 통해 기존 개선 및 미래지향적 의료산업으로 고수익 매출 확보가 예상됨
- 전염성이 강한 국가재난형 바이러스성 질병에 대한 조기에찰 및 예방으로 광범위한 방역대책 및 의심축 매몰에 따른 사회경제적 비용 절감하고, 주요 가축전염병 발생을 예방하여 농가 소득 증대에 기여가 가능함
- 건강한 산업보건의료 보장 및 양질의 산업의료 서비스 제공이 가능함
- 보건의료 측면에서 질병진단은 사회문제화 질병으로부터의 고통을 해결할 대안이 될 수 있음

제5장 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

1. 본 과제에서 확립된 아프리카돼지열병 체외진단법의 개발은 축산현장에서 손쉽게 활용할 수 있는 진단키트 형태로 제품화하여 인허가과정을 거쳐 국내시장에 출시되며, 국내에서의 활용 실적을 바탕으로 글로벌 시장 진출의 토대를 마련할 계획임. 이는 질병진단을 기반으로 하는 첨단의료기술의 국산화 및 글로벌화를 통해 기업의 이윤증대 및 국민건강지표 향상에 기여할 것이며 나아가 내수 및 수출을 통해 경제성장 실적달성이 가능해질 것으로 보임.
2. 본 과제에서 확립된 신속한 핵산검출법 (HUDSON 기법 등) 및 핵산증폭법 (RPA 기법) 등은 아프리카돼지열병 진단뿐만 아니라 여타의 전염성 바이러스 (지카바이러스, 황열, 웨스트나일 질병등과 같은 인체 바이러스성 질병, 구제역, 고병원성조류독감, 돼지콜레라 등 축산피해가 막심한 동물 바이러스성 질병 등) 에 대한 진단법을 확립하는데 적용이 가능하며 이는 바이러스 진단 연구 및 체외진단시약 개발 등에 활용될 수 있음.
3. 본 과제에서 확립된 유전자가위 (CRISPR/Cas12) 시스템을 기반으로 하는 체외 분자진단법의 개발은 전염성이 강한 여타의 바이러스성 질병의 원인체를 체외에서 신속정확하게 규명하는데 활용도가 클 것으로 예상되며, 관련 기술력 향상에 기여할 것임.
4. 본 과제에서 확보한 금나노입자 응집기반 발색변화 기술의 경우, 효과적인 육안 시각화 기술로서 정립될 경우, 바이러스성 입자 분석 및 질병 진단의 육안감지 기술로서 활용 가능할 뿐만 아니라, 비색변화를 통한 육안진단의 필요성이 높은 분야에서 활용도가 많을 것으로 예상됨.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업 연구개발과제 최종보고서입니다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원)에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.