

116096-3

보안 과제(), 일반 과제(○) / 공개(), 비공개(○) 발간등록번호(○)

발간등록번호

11-1543000-002920-01

Immuno-PCR (IPCR)방법을 이용한 고감도 구제역 진단방법 연구 및 나노 물질을 활용한 초고감도 현장 신속진단 키트의 개발

최종보고서

2019

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

Immuno-PCR (IPCR)방법을 이용한 고감도 구제역 진단방법 연구 및 나노물질을 활용한 초고감도 현장 신속진단키트의 개발 최종보고서

2019.10.18.

주관연구기관 / (주)다우진유전자연구소
협동연구기관 / 강원대학교산학협력단

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “Immuno-PCR (IPCR)방법을 이용한 고감도 구제역 진단방법 연구 및 나노물질을 활용한 초고감도 현장 신속진단키트의 개발” (개발기간 : 2016.09.05 ~ 2019.09.04)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 10. 18.

주관연구기관명 : (주)다우진유전자연구소 (대표자)

황 춘 홍 (인)

협동연구기관명 : 강원대학교산학협력단 (대표자)

윤 경 규 (인)

참여기관명 :

(대표자)

(인)

주관연구책임자 : 황 춘 홍

협동연구책임자 : 이 성 진

참여기관책임자 :

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	116096-3	해 당 단 계 연구 기 간	2016.09.05. ~ 2019.09.04	단 계 구 분	3년/3년
연구 사업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구 과제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	Immuno-PCR (IPCR)방법을 이용한 고감도 구제역 진단방법 연구 및 나노물질을 활용한 초고감도 현장 신속진단키트의 개발			
연구 책임자	황 춘 홍	해당단계 참여연구원 수	총: 9 명 내부: 9 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 336,000 천원 민간: 112,000 천원 계: 448,000 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 18 명 내부: 18 명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 864,000 천원 민간: 288,000 천원 계: 1,152,000 천원
연구기관명 및 소 속 부 서 명	(주)다우진유전자연구소 강원대학교산학협력단			참여기업명	(주)다우진유전자연구소
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위 탁 연 구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품중	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

1. 구제역 항원별 재조합 항원/항체 제작 및 획득
: A/ Asial/ O type
2. Immuno-PCR 진단 키트 개발
 - 다클론 항체-자성 나노입자 complex 제작
 - 단클론 항체-올리고머 complex 제작
 - 항체 complex와 항원을 이용하여 면역반응 최적화
 - 면역반응을 통해 획득한 template (항원-항체 complex)를 사용하여 real-time PCR 증폭 확인 및 최적화 : SYBR green 표지자 사용
3. 신속진단키트 개발
 - DNA 구조체 (Dendrimer) 제작 및 안정화
 - DNA 구조체-항체-gold nanoparticles complex 제작
 - Lateral flow assay kit에 DNA구조체-항체-gold nanoparticles complex 적용 및 최적화

보고서 면수

22 ~ 56

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 구제역 항원 진단을 위해 항체-핵산 결합물을 사용한 sandwich ELISA 방식의 진단시스템 최적화 ○ Immuno-PCR을 적용하여 기존의 방법보다 검출감도가 우수한 구제역 진단 키트 개발 ○ 항체-핵산 결합물을 적용한 신속진단 키트 개발 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 구제역 항원별 재조합 항원 제작 및 획득 ○ 구제역 다클론 항체 제작 및 획득 ○ 구제역 단클론 항체 제작 및 획득 ○ Immuno-PCR 진단 키트 개발 <ul style="list-style-type: none"> ● 항체 레이블링 <ul style="list-style-type: none"> ✓ 다클론 항체-자성입자 complex 획득 ✓ 단클론 항체-올리고머 complex 획득 ● 항원-항체 반응 최적화 : Sandwich ELISA 방식 ● Real-time PCR 증폭 반응 테스트 및 반응 조건 최적화 ○ 신속진단키트 개발 <ul style="list-style-type: none"> ● DNA 구조체(Dendrimer) 제작 및 안정화 ● DNA 구조체-항체-gold nanoparticles complex 제작 ● Lateral flow assay kit에 DNA 구조체-항체-gold nanoparticles complex 적용 및 최적화 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 구제역 발생 초기 진단에 활용하여 구제역 확산 최소화 가능 <ul style="list-style-type: none"> ● 현장에서 조기 진단 및 제어시스템으로 활용 가능 ● 기존 진단법과 비교 시 시간, 비용 절감 효과 ○ 개발 기술을 다른 동물 또는 사람의 질병의 진단에 적용하여 감염질환의 조기 진단에 활용 가능 ○ 새로운 시장 창출 : 항원-항체 면역반응 원리를 기반으로 하여 PCR 방법을 융합하여 고감도로 진단 가능한 새로운 진단 시장 개척 가능 ○ 많은 타겟을 분석 할 수 있는 다중진단, 칩(chip) 형태의 분석으로 확장 가능 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	구제역	면역중합효소 증폭반응	나노파티클	반응 증폭제	신속진단키트
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>					

< 목 차 >

제 1 장 연구개발과제의 개요	6
제 1 절 연구개발 목적	6
제 2 절 연구개발의 필요성	6
제 3 절 선행연구 내용 및 결과	14
제 4 절 연구개발 범위	16
제 2 장 국내·외 기술개발 현황	18
제 1 절 국내 기술 수준 및 시장 현황	18
제 2 절 국외 기술 수준 및 시장 현황	19
제 3 장 연구수행 내용 및 결과	22
제 1 절 실험 방법	22
제 2 절 추진 일정	29
제 3 절 연구수행 결과	30
제 4 절 향후 연구 계획	57
제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	58
제 1 절 목표달성도	58
제 2 절 관련분야 기여도	63
제 5 장 연구결과의 활용 계획	64
붙임. 참고 문헌	71

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 목적

1. 구제역 항원 진단을 위해 항체-핵산 결합물을 사용한 sandwich ELISA 방식의 진단 시스템 최적화
2. Immuno-PCR을 적용하여 기존의 방법보다 검출감도가 우수한 구제역 진단 키트 개발
3. 항체-핵산 결합물의 핵산과 결합하여 시그널을 보이는 lateral flow 방식의 신속진단 키트 개발

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 개요

가. 구제역 (Foot and Mouth Disease)이란 구제역 바이러스에 전염되는 전염성 높은 우제류가축의 급성전염병으로, 가축의 제1종 바이러스성 법정 전염병이다. 치사율이 5~55%에 달하며 특별한 치료법이 없고 조직배양 백신을 이용한 예방법이 이용되고 있다.

나. 구제역은 바이러스의 감염으로 발생하는데 바이러스의 학명은 Picornaviridae Aphthovirus, 바이러스의 크기는 약 20 nm(나노미터)이며 세계 최초로 발견된 동물 바이러스이다.

다. 구제역 바이러스는 전염성이 매우 강한데 공기를 통해 호흡기로 감염되기 때문에 무리에서 한마리가 감염되면 나머지 가축 모두에게 급속하게 감염된다. 소의 경우 잠복기는 3~8일에 불과하며 감염되면 증상이 빠르게 나타난다. 입을 통해서 동물의 몸속으로 들어간 바이러스는 인두에서 증식하여 혈액을 타고 심장으로 들어간다. 일단 감염되면 고열(40~41℃)이 있고, 거품 섞인 침을 많이 흘리고 통증을 수반하는 급성구내염과 제관(蹄冠)·지간(趾間)에 수포(물집)가 생긴다. 입안에 물집이 생기면 통증으로 인해 가축이 사료를 먹지 않게 되고, 발굽에도 물집이 생기면 걷거나 잘 일어서지 못한다. 증세가 심해지면 수포가 터져 궤양으로 진전되며 앓다가 죽게 된다.

라. 구제역에 감염된 동물이 호흡을 하면서 공기 중에 바이러스가 다른 동물의 호흡기를 통해 감염되는데 특히 우제류 동물 중에서 돼지가 내뿜는 공기에 구제역 바이러스 입자가 많아 감염의 위험이 훨씬 높다. 그리고 우제류 동물 중에서 소가 구제역 바이러스에 가장 취약하고, 염소는 강한 편이다. 구제역 바이러스가 아직까지 사람에게 감염된 사례는 없지만, 가벼운 감염 증세를 보인 경우는 있는 것으로 알려져 있다. 하지만 바이러스 변이를 통해서 감염의 가능성이 있기 때문에 주의가 필요하다.

마. 2010년 한국에서 발생한 구제역으로 인하여 직접적인 손실은 2009년 11월29일 경북 안동에서 처음 양성판정이 나온 뒤 11개 시.도의 75개 군에서 150건이 발생하여 소의 경우 15만871마리, 돼지는 331만7천 864마리, 염소 7천535마리, 사슴 3천243마리 등 6천250개 농가에서 총 347만9천513마리의 가축이 살 처분 되어 매몰 되었으며, 직접적인

손실은 전국에서 85개소의 가축시장이 폐쇄 되고, 매몰처리 및 구제역 확산을 막기 위한 막대한 인원과 장비도 투입되었다. 2010년 구제역으로 인한 경제적인 손실액은 매몰 보상비 1조8천억 원을 비롯해 3조원 가까이 추산 되었다.

바. 구제역 바이러스는 유전적 변형이 매우 쉽게 일어나기 때문에 수많은 혈청형(아형)이 생성이 될 수 있고, 혈청형이 다른 백신의 경우 변형된 바이러스에는 그 효능이 낮아 혈청형이 맞는 예방약의 사용이 중요하다. 그러나 자주 변형되는 혈청형에 따른 백신의 제조 및 생산 보급 등은 많은 시간이 소요 되므로 발생 당시 혈청형 맞춤형의 백신접종은 거의 불가능한 상태이다.

사. 따라서 구제역 예방과 진단을 위해서 구제역의 조기진단 방법 및 신속진단과 정확진단을 동시에 실시할 수 있는 고감도 키트를 개발하여 보급한다면, 구제역에 대한 예방 및 확산 방지에 최적의 방법이 될 수 있다.

아. 연구 및 개발 기술의 개요

- (1) 구제역 항체에 마그네틱 나노파티클을 부착하여 항원-항체 반응 시 비특이적인 반응물질을 제거할 수 있다.
- (2) 이차 항체에 짧은 길이의 DNA 또는 단일가닥 올리고머를 부착, PCR 증폭하여 검출 감도를 증가시킬 수 있다 (Figure 1).
- (3) DNA(또는 올리고머)를 lateral-flow assay test에 적용하고, 시그널을 증폭시켜 미량의 항원을 검출할 수 있다 (Figure 2).

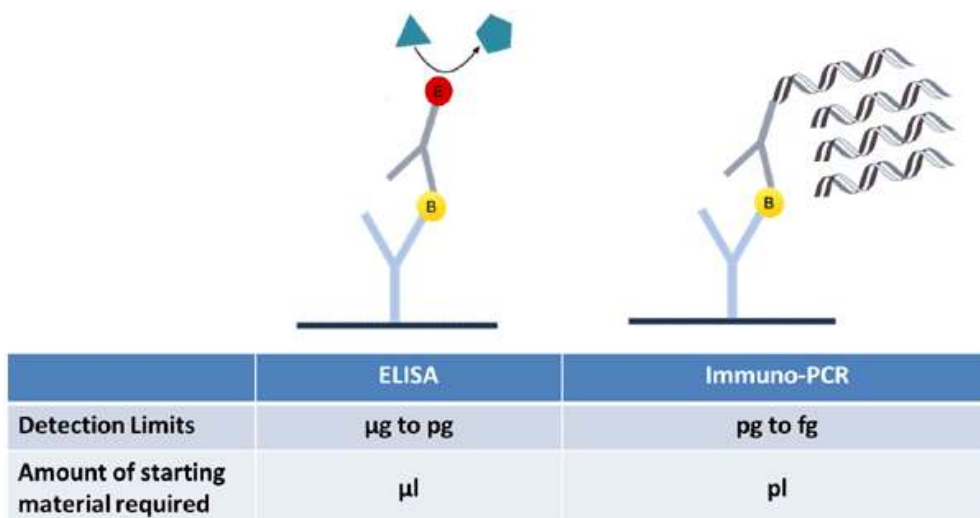


Figure 1. Immuno-PCR 키트의 모식도 및 검출 감도 비교

2. 현재의 구제역 진단 방법 및 한계

가. 구제역 진단방법의 문제점

- (1) 구제역 발생 및 확산의 원인에는 발생초기의 대응미숙, 진단방법의 한계, 진단과 판정의 시간이 과다하게 소요되는 점, 진단시료의 적절성, 방역조직체제 허술함 등을 포함하여 여러 가지 다양한 문제가 있다.

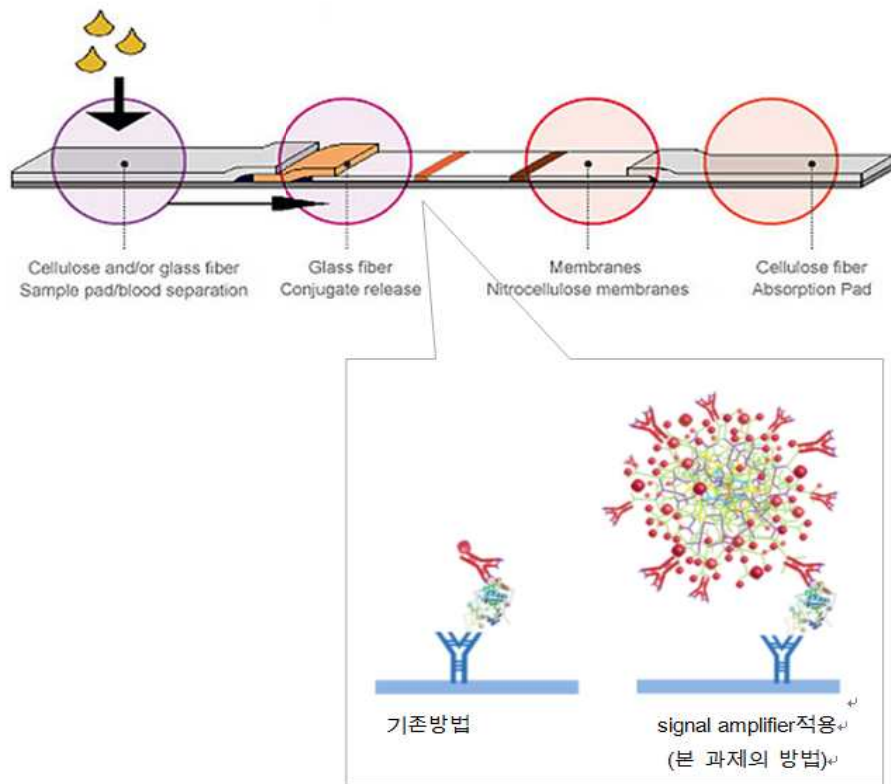


Figure 2. 초 고감도 신속진단 키트 모식도

- (2) 구제역 발생 이후의 당시의 문제점들과 더불어 구제역 조기진단을 위한 진단방법 및 구제역 관독과정에서 대응문제가 있었다.(예, 2011년 구제역 확산 당시)
- (3) 현재 우리나라에서 사용하고 있는 진단방법 및 진단키트의 경우 Merial사에 보관이 된 항원을 기초로 생산이 되거나, 비슷한 혈청형의 바이러스를 항원으로 사용하고 있다.
- (4) 구제역 바이러스는 유전적인 변형이 매우 쉽게 일어나기 때문에 수많은 혈청형(아형)이 생성이 될 수 있고, 혈청형이 다른 백신의 경우 그 효능이 낮아 혈청형이 맞는 진단키트의 사용이 중요하다. 그러나 혈청형이 맞는 진단키트의 제조 및 생산은 많은 시간이 소요되므로 발생 당시 바이러스의 혈청형에 대한 조기 진단은 거의 불가능하다.
- (5) 따라서 구제역 조기 진단을 위해, 진단 방법의 간이성과 정확한 관독을 동시에 만족할 수 있는 기술에 덧붙여 사전적인 구제역 진단관리 및 구제역 바이러스의 감염 확산 방지를 통한 구제역에 대한 예방 및 확산의 방지에 중요한 방법으로서 사용된다면, 맞춤형 조기진단 및 진단키트에 대한 요구가 증가함에 따라 잠재적 가치와 시장이 더욱 확대할 것으로 전망된다.
- (6) 구제역과 같이 전염성이 강한 질병을 현장에서 조기에 정확하게 진단하지 못하면 바이러스가 확산되고 피해가 커지게 된다. 의심 신고 후 확진까지 2-3일 소요되는 현재의 상황에서는 전염성 질환의 확산 방지에 어려움이 있다.

(7) 구제역 판정시간 과다

(가) Figure 3의 검사과정 체계도를 통해 알 수 있듯이 구제역의 원인체인 구제역 바이러스를 확진하기 위해서는 일반적으로 바이러스의 게놈(RNA)을 추출하여 RT-PCR을 통해 특정부위를 증폭시킨 후 핵산 염기서열분석 (capillary sequencing)을 실시하게 된다.

(나) 이러한 염기서열분석은 Sanger법을 기초로 하고 있으며, ddNTP를 사용하여 반응 후 다시 정제과정을 거치고 별도의 장비에서 전기영동 (electrophoresis)을 통해서 데이터를 얻는 과정이 필요하기 때문에 RT-PCR이 종료된 이후에도 통상 6 ~ 8 시간 이상 소요되는 방법이라 과정이 복잡하다고 할 수 있다. 또한 획득한 염기서열을 GenBank와 같은 염기서열 데이터베이스에서 찾는 과정을 통해 병원체의 혈청형(유전형)을 파악하게 되는데, 검체에 복수의 병원체가 섞여 있을 경우 정확한 분석결과를 얻기 어려운 문제가 있다.

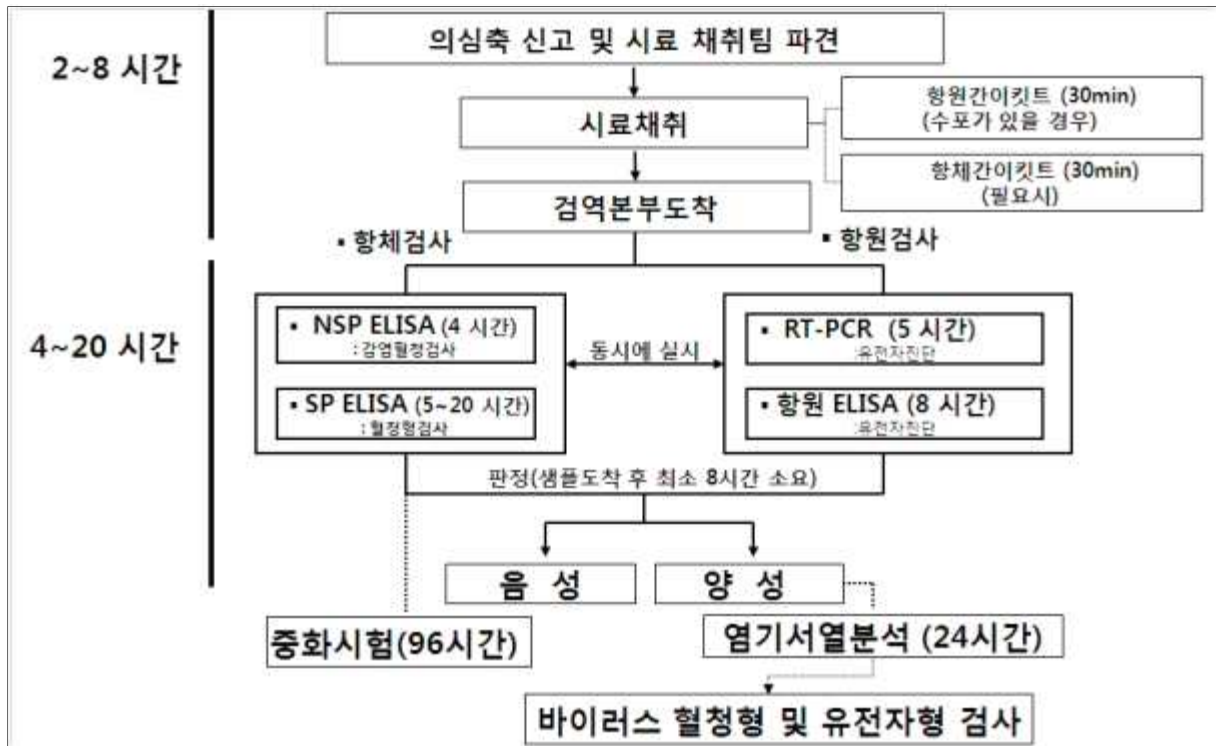


Figure 3. 구제역 검사과정

나. 현재 사용되는 검사방법의 한계 (Table 1)

(1) 간이 신속 진단 : 항원 또는 항체를 검사하기 위해 간단하게 사용할 수 있는 방법으로 시료가 lateral-flow 방식으로 전개되면서 항원-항체 반응에 따라 결합하여 발색되도록 고안된 제품으로 현장에서 신속하게 감염여부를 일차 확인하기 위한 용도로 주로 사용된다. 그러나 비특이적인 반응으로 인해 위음성, 위양성의 발생가능성이 높고, 간편한 방법이지만 발생 초기 진단 오류가 많이 발생한다.

(2) ELISA : 효소면역 측정법이라 하며, plate well 내에서 항원-항체 반응 후 항체에 부착한 효소의 반응(발광 또는 발색)을 측정하여 정성 및 정량 분석하는 방법이다. 여러

가지 시약을 사용하여 적용성을 확장시킬 수 있으나 확진을 위한 검사 시간이 많이 소요되고, 혈청형 분석을 위해 동일한 검사를 반복하여 시행해야 하는 단점이 있다.

(3) RT-PCR 및 염기서열 분석: 분자진단에서 주로 사용되는 방법이며, 대부분의 감염 질환의 최종 확진에 사용되는 방법으로 바이러스의 핵산을 추출하고 특정한 올리고를 사용하여 증폭한 후 전기영동을 통해 바이러스 감염 여부를 정성 분석하거나, 추가적인 실험으로 염기서열을 분석하면 정확한 혈청형을 알 수 있다. 그러나 ELISA 반응과 같이 분석 시간이 많이 소요되고 검사비용도 높은 편이며 유사한 혈청형 간에 PCR 반응이 비특이적으로 발생하거나 염기서열 분석이 불가능할 수 있다.

구분	간이 신속진단	ELISA	RT-PCR	Sequencing
검사방법	면역검사방법	효소면역검사방법	중합효소반응방법	염기서열분석방법
검사의 정확도	낮음	보통	보통	높음
검사판독의 전문성	일정기술 필요	전문적인 지식 필요	전문적인 지식 필요	전문적인 지식 필요
검출감도	uM	uM	100 copies	100 copies
검사시간	30분	4시간~20시간	8시간	24시간 이상
장점	<ul style="list-style-type: none"> • 간단한 검사법 • 신속성 	<ul style="list-style-type: none"> • 혈청형 구분 및 정량 검사 가능 	<ul style="list-style-type: none"> • 비교적 단시간에 검사가능 • 정량 및 혈청형 구분 가능 	<ul style="list-style-type: none"> • 정확한 혈청형 확인 가능
단점	<ul style="list-style-type: none"> • 비특이적인 반응으로 위음성, 위양성 발생 • 검출 감도 낮음 	<ul style="list-style-type: none"> • 장시간 검사 • PCR 방법에 비해 검출 감도 낮음 • 항체 생성 전에 검사할 수 없음 (window period) 	<ul style="list-style-type: none"> • 면역진단(신속진단, ELISA)과 비교하여 고비용 • 유사한 염기서열 간의 비특이적인 증폭가능성 	<ul style="list-style-type: none"> • 고비용, • 장시간 검사

Table 1. 기존 검사 방법의 특징 비교

3. 연구의 중요성

가. 현재 검사에서 사용되는 면역검사방법은 항원-항체 반응을 기반으로 하기 때문에 구제역 항체가 검출 가능한 농도로 생성되기 전에 진단하기 어렵고, 항원 진단의 경우도 검출 한계 이상 존재하지 않는 시료에서는 위음성으로 진단되기 쉽다.

나. 이러한 방법을 개선하기 위해 적용하고자 하는 것이 Immuno-PCR 방법 (Figure 4)이다. 이 방법은 항원-항체의 반응 특이성의 장점과 PCR 방법의 target 증폭이라는 장점을 융합한 것으로 기존의 면역반응으로 검출할 수 없는 농도의 항원이 존재하는 시료에서 항원-항체 반응결합물을 얻은 후 PCR을 통해 핵산을 증폭하여 극미량의 항원의 검출 가능성을 높도 검출할 수 있도록 하는 것이다.

다. Immuno-PCR을 사용한 구제역 바이러스 진단방법은 일반적으로 window period에 상

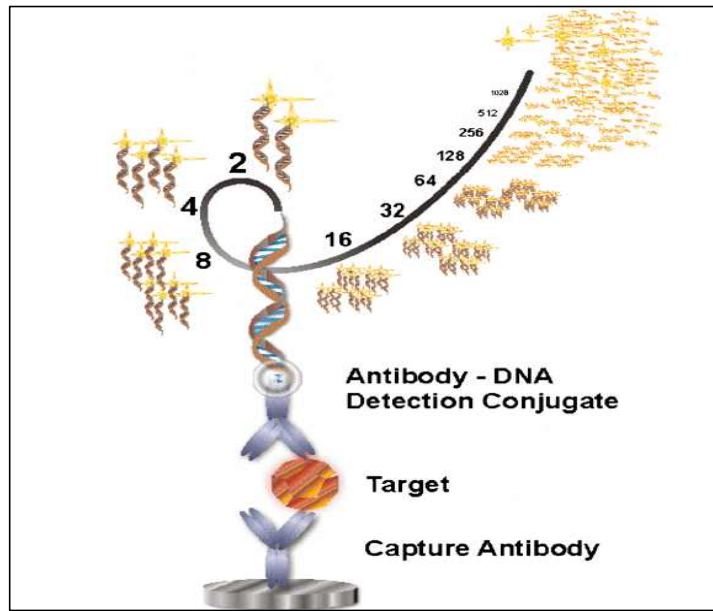


Figure 4. Immuno-PCR의 모식도

관없이 조기에 진단이 가능하고, 특히 구제역 바이러스와 같이 RNA바이러스인 경우 일반적인 DNA보다 까다로운 RNA 추출과정과 cDNA 합성과정의 불필요한 사용자 편의적인 기술이다.

- 라. 현장 검사용 신속 진단 키트에 나노기술을 적용하면 검출감도를 증가시킬 수 있다.
- (1) Immuno-PCR을 현장 신속진단 키트에 적용하면 기존의 신속진단 키트에 비해 검출 감도가 최소 10배 이상 증가한 새로운 신속진단 키트를 개발 할 수 있다.
 - (2) 이 방법은 '3DNA' 나노 DNA 기술 (Figure 5)을 사용하는 것으로 DNA가닥들이 서로 복잡한 3차원 구조물을 이루도록 디자인하여 합성하고, 각각의 DNA 가닥 말단부위에 이들을 검출 할 수 있는 발색 기질을 부착하는 방법으로 발색 signal을 최대화하는 방법을 적용하면 극미량의 항원도 신속진단키트로 검출 가능하게 된다.

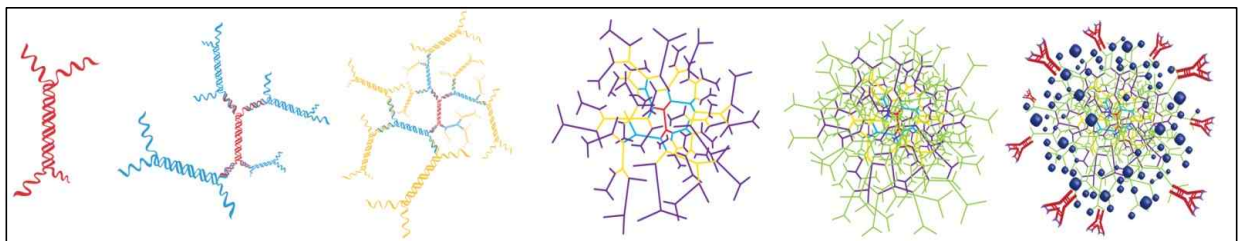


Figure 5. 3DNA signal amplifier

마. 기술적인 측면

- (1) 현장에서 조기 진단 가능한 제품개발 기술력 확보: 축산농가에서 1차 스크리닝으로 서 본 과제의 개발 제품을 검사를 선택할 경우, 현장에서의 진단 결과 확보에 기반 한

- 초동 대처 향방의 결정 및 잠복감염의 조기진단에 응용 가능하다.
- (2) 현장에서 신속정확하게 조기검진 및 제어시스템으로 활용 가능: 질병 발생 위험지역 및 도축장 등 현장에서의 신속진단에 의한 진단 결과를 확보함으로써 가축질병 확산 방지할 수 있다.
 - (3) 위험성 항원을 재료로 연구를 진행 할 경우 사용 가능한 위험성이 적은 유효 항원, 항체 선별 및 생산 기술력 확보를 통해 유사한 종류의 타 감염질환 진단제품 개발의 핵심요소 확보할 수 있다.
 - (4) 신종 감염성 질병의 유행 가능성 및 분포 지역의 확대 등의 위험성이 매년 증가함에 따라 각 국가별 관리 체계 확립과 질병의 조기 진단을 위한 모니터링 도구로서 활용 가능하다.
 - (5) 수의학 분야 뿐 아니라 사람의 질병에 대한 진단제, 치료제 및 백신개발을 위한 중요한 도구로 활용 가능하다.
 - (6) 본 과제 of 적용대상인 구제역 외 더 많은 사람 또는 동물전염병에 적용 가능한 기술의 기반으로 사용 될 것이며, 이를 기반으로 보다 많은 타겟을 분석할 수 있는 다중진단, 칩 (chip)형태의 분석으로 확장 할 수 있다.
 - (7) 향후 높은 민감도, 특이도, 재현성을 구현할 수 있는 biochip의 개발이 쉬워지며, 따라서 biochip 연구, 개발에 새로운 기술의 도입으로 차세대 biochip의 기술개발의 발판을 마련 할 것이며, bio-mems 기술을 이용한 차세대 biochip (Lab-on-a-chip) 개발에 주요 역할이 기대된다.

바. 경제, 사회적인 측면

- (1) 기존 진단법에 비해 시간 및 비용 절감 효과가 있다. (Table 2)

검사방법	검사시간	비용(1회 시험, 키트비용)	비고
현장 간이진단	30분	5,000원	검사비용 저렴 검사오류 가능성 높음
ELISA	~ 20시간	10,000원	혈청형 별 7회 반복시험
RT-PCR	~ 5시간	20,000원	다중증폭 시 비용 증가
Sequencing	~ 2-3일	30,000원	검사시약 단가 높음 (미국 기업 독점)
Immuno-PCR	1-2 시간	8,000원	감도증가, 반응 용량 줄임, 재료비 절감
Amplify 현장 신속진단키트	30분	3,000원	고감도, 흡착 항체량 줄임, 비용 절감

Table 2. 진단 검사 방법 비교

- (2) 새로운 시장 창출: 항원-항체 면역반응 원리를 기반으로 하여 PCR 방법을 융합, 기존의 검출 감도보다 최소 100배 이상 증가한 고감도 진단제품 이므로 새로운 진단 시장을 개척할 수 있을 것으로 기대된다.
- (3) Lateral-flow immuno assay 원리를 기반으로 한 핵산 검출형 신속진단으로 30분 이내 진단가능하고, PCR 방법보다 더 높은 정확도를 가지는 제품이므로 국내뿐만 아니라 감염율이 심각하여 니드 (needs) 많은 해외시장으로의 수출이 가능하여 수출 증대 효과를 기대 할 수 있다.
- (4) 가축질병 진단약품의 수입대체 효과 및 해외수출을 통한 국부창출이라는 이중 효과를 거둘 것으로 기대된다.
- (5) 이러한 구제역의 진단과 조기진단 판독율의 문제를 보완해 줄 수 있는 구제역 진단용 간이진단키트 및 정밀진단용 키트의 개발과 보급을 통하여 국내 축산산업 및 더 나아가 축산을 비롯한 인간의 바이러스성 질병을 억제하기 위하여 활용할 수 있는 기술을 확립함으로써 고부가가치의 생명과학 제품개발의 활성화 및 원천기술 확보에 따른 이 분야에 대한 국제 경쟁력 강화를 통한 시장선점이 기대된다.

4. 연구개발 방향

가. PCR과 나노 분자진단 기술의 확보

- (1) 나노 분자 진단 기술은 감염성질환, 약제내성, 체세포 돌연변이, 단일 염기변이 등 응용 분야가 다양할 뿐만 아니라 맞춤형 의학을 실현하는데 중요한 요소로서 글로벌 진단산업에서 각광을 받고 있으나 국내 분자 진단 시스템 시장은 현재 도입단계 수준으로 아직까지 활성화되어 있지 않은데다 소수의 바이오기업들이 경쟁하고 있는 상황에서 세계수준의 선제적 기술 확보가 중요하다.
- (2) 높은 재현성, 민감성, 분석비용의 절감 등을 바탕으로 국내 및 세계에서 기존 제품 대비 기기성능을 포함한 기능차별화 및 해외 제품과의 경쟁을 위한 가격 경쟁력을 강화하기 위하여 원천기술개발에 대한 지속적 연구가 필요하며, 국제 표준규격을 준수한 제품개발로 국내 및 해외에서 판매 가능한 키트형 제품개발이 필요하다.
- (3) 구제역 발병 가축의 침, 혈액, 소변, 조직, 척수액 등의 여러 가지 체액에서 핵산의 서열을 찾아낼 수 있으며, 일반 진단 방법보다 고감도 및 정보제공 다양화가 요구되지만, 식약처 등 관계 기관의 허가를 받은 제품의 수가 적고 인허가 및 보험가 책정 등의 문제와 사용료가 고액이기에 성장이 지체되어있는 상황이다.
- (4) 현재는 임상진단과 혈액 스크리닝 분야에 사용되는 진단시스템을 가축분야까지 확산이 시키는 것이 시급하다.

나. 현재의 구제역 검사 체계 및 방법은 구제역 바이러스의 확진을 위한 최선의 방법이라는 하나 구제역 발생 후 2-3일이 경과된 후 최종 확인이 가능한 점, 간이 진단키트 및 면역진단 방법 등이 항원, 항체가 일정량 생성 된 후 검출가능한 점은 본 연구를 통해 개발할 필요성이 있다.

다. 본 과제를 통해 이루고자 하는 개발의 목표 또한 이러한 현재의 구제역 진단 방법을 개선하여 현재의 진단 방법들 보다 더 향상된 감도로 조기 진단이 가능한 검사방법을 개발하고 제품화 하는 것이다.

제 3 절 선행연구 내용 및 결과

1. 선행연구 항목

HBV (B형 간염 바이러스)진단을 위한 새로운 방법으로 자기(마그네틱) 나노파티클을 항체에 결합하여 금속물질의 질량을 측정하는 방법으로 미량의 바이러스를 진단하는 방법에 대한 연구를 진행 (2014-2015년도)

가. 항원, 항체 적용을 위한 나노물질의 표면 개질

나. HBV 검출을 위한 항체 나노파티클 레이블링

다. 항원, nano particles labled HBV Ab 반응 최적화

라. ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer) 분석

2. 선행연구 내용

가. 바이러스 진단에 주로 사용되고 있는 기술은 항원-항체 반응 또는 PCR을 이용한 중합효소 연쇄반응에 발색화합물질이나 형광체를 결합하여 측정의 감도를 높이는 것이 대부분이며, 형광체나 발색체를 tagging한 biomarker (예를 들면 항원, 항체 또는 올리고머)를 만들어 적당한 단백질이나 핵산 등에 반응시켜 형광분석장치 또는 ELISA를 이용하여 측정하는 것이 보편화되어 있다.

나. 그러나 ELISA를 사용하는 방법은 사용가능한 발색체 또는 형광체의 종류가 다양하지 않아 다중검출이 불가능하고, 발색과 관련한 효소의 반응이 직선성 반응이 아니므로 일부 직선구간을 제외하면 측정값의 왜곡이 발생하는 문제가 있다.

다. 형광체를 사용한 chip반응이나 real-time PCR의 경우 분석비용이나 장비가 고가이며, 결과분석 측면에서도 photo bleaching 및 quenching, 형광과장의 겹침 등에 의한 위양성, 검출 한계값의 존재 등 여러 가지 측정의 제약조건들이 산재해 있어 이를 극복하고 미량의 바이러스 검출을 위한 방법으로 자기 나노파티클과 무기 이온을 측정할 수 있는 ICP-MS를 사용하였다.

라. 본 과제와 관련한 선행연구로서, 나노물질을 이용한 바이러스 진단 기술을 적용하였다.

(1) 금속이온을 사용하는 바이러스 진단방법은 국내에서 연구 진행된 사례는 없다. 금속들과 분자들의 반응에 있어서 금속의 영향을 받는 세포를 metallome이라고 하고, 이에 대한 연구를 하는 것이 metallomics라고 하는데, 이러한 metallomics의 기술이 최근 대두된 것으로 기존 분석기술로는 관찰하기 어려운 초소량의 바이오 시료에 존재하는 초미량의 금속이온을 측정하는 기술과 분석 장비가 개발되었기 때문에 연구가 가능하게 되었다.

(2) 금속이온 tagging기술의 장점은, 1) 선택할 수 있는 금속이온의 수가 많으며, 2) 금속이온을 정량적으로 측정할 수 있는 기술들이 잘 알려져 있고, 3) 다양한 금속이온들을 적용하여 동시 다중 검출이 가능하며 4) 특히, 반응이 전 구간에서 직선성을 가지기 때문에 정확하고 정밀하게 측정할 수 있다는 점이다. 결론적으로, metal tagging방법을 기존의 바이러스 진단에 이용하게 되면, 측정 선택범위가 넓어질 것으로 예상되며, 효소를 사용하는 일반적인 생물학적 반응과 비교하여 재현성 및 정확성의 크게 향상될 것으로 예상된다.

- (3) 기술적으로, 이 방법은 형광체나 기타 발색화합물 대신에 metal을 수용할 수 있는 기능성을 갖는 단백질이나 DNA에 metal을 tagging 시켜서, metal을 검출할 수 있는 유도결합 플라즈마 질량분석법으로 측정하는 것이다. 금속 metal의 종류는 주기율표에 있는 중금속 원소들 대부분이 응용 가능하기 때문에 단백질 등에 특정 element를 tagging시켜서 metal을 측정하면, 다양한 선택성(selectivity)의 기능도 부여할 수 있다.
- (4) 선행 연구는 일반적으로 바이러스 진단에 사용하는 효소면역측정 방법과 금속 나노물질을 이용한 바이오물질(바이러스 항원 또는 항체) 측정기술을 융합하여 새로운 진단방법을 개발하는 것이므로, 금속 나노물질이 부착된 항원, 항체 등의 바이오물질을 사용하여 효소면역방법의 과정을 적용할 수 있는지 여부를 우선 검증해 보고자 하였다.
- (5) 나노물질을 레이블한 항체 진단시스템이 적용가능한지 알아보기 위해 금속물질로서 gold (Au: 금)을 사용하여 pilot test를 실시하였다. 동일한 농도의 시료를 사용하여 금속 나노물질 (Au: 금)을 사용하는 방법과 일반적인 ELISA-color 발색방법을 비교한 결과 ELISA법으로 검출하지 못하는 소량의 항원의 농도에서도 금속 나노물질을 이용한 측정법으로는 진단이 가능한 것으로 확인되었다.

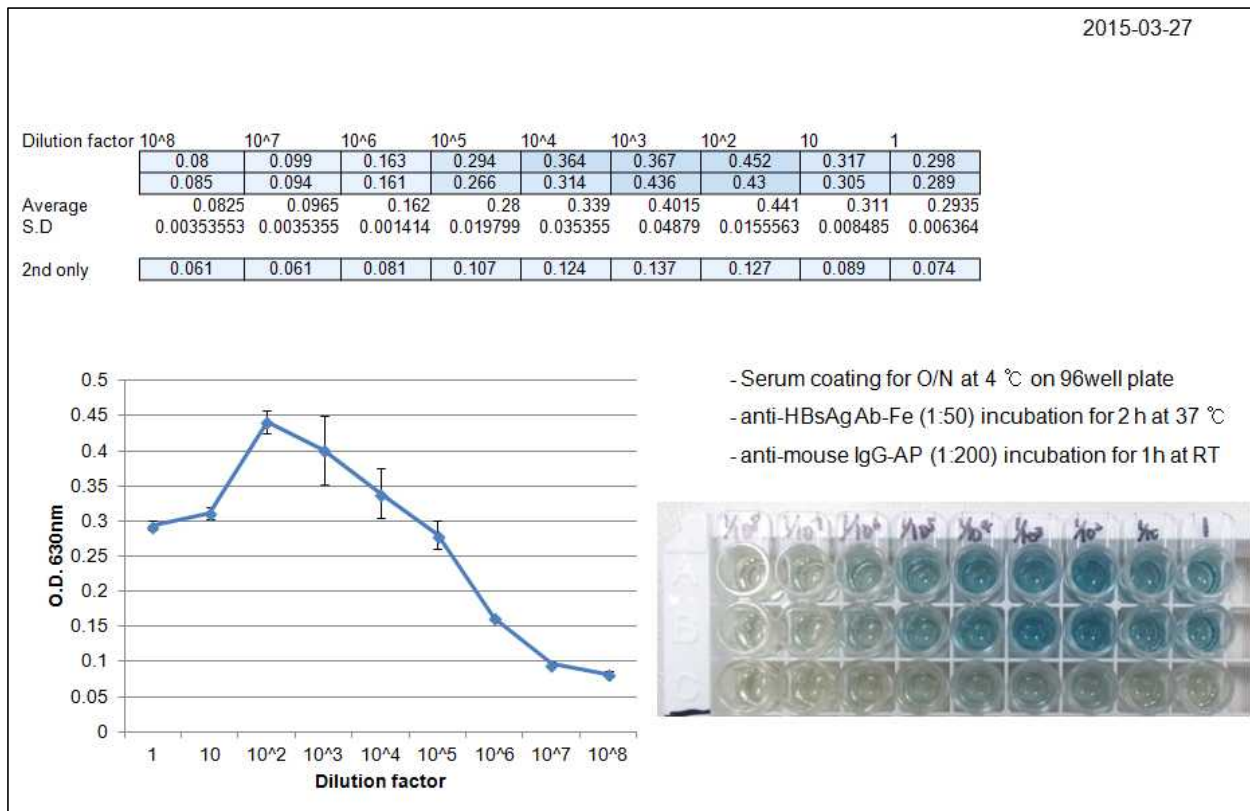


Figure 6. ELISA 검사와 나노물질 ICP-MS측정 비교, 실험대상 HBV

마. 선행연구 결과 (Table 3)

지식재산권명	출원국/출원번호
생체 분자 분석 키트 및 이를 이용한 생체 분자 분석 방법	대한민국/ 1014271460000(등록)
생체분자 분석용 미소입자 및 이의 제조 방법, 생체분자 분석용 키트, 및 이를 이용한 생체분자 분석 방법	PCT/KR2013/007636

Table 3. 항체-나노파티클을 이용한 바이러스 검출 방법 특허출원

제 4 절 연구개발 범위

1. 1차 년도

- 가. 구제역 혈청형 별 항원 제조
- 나. 다클론 항체 제작
- 다. 단클론 항체 제작
- 라. 항체의 정제
- 마. 제조 항체의 테스트 (역가 평가)

2. 2차 년도

- 가. 항체-레이블링 및 반응성 시험
- 나. 항원-항체 반응 최적화
- 다. PCR 증폭 반응 테스트 및 반응 조건 최적화
- 라. 간이키트 시그널 증폭 및 반응 최적화

3. 3차 년도

- 가. Pilot type 시작품 제조
- 나. 내부 성능 시험
- 다. 외부 성능 시험(구제역 관련 시료 취급기관)
 - (1) 내부성능 시험이 완료된 후 외부, 구제역 검사가 가능한 공인기관 또는 국가지정 검사실에 제품의 성능 시험을 의뢰한다.
 - (2) 성능 지표 : Table 4

주요 성능지표	단 위	최종 개발목표	세계최고수준 (보유국/보유기업)	객관적 측정방법
				시험규격
판독 가능한 혈청형	개수	3개 이상	(알려진 혈청형은 7개 이상 국내, 아시아 발생형은 3가지)	구제역 시료 취급 가능한 외부 위탁기관 시험 결과보고서 첨부
정확성	횟수	100%	비교대상 없음	구제역 시료 취급 가능한 외부 위탁기관 시험 결과보고서 첨부
정밀도 (검출감도)	copies, moles	10 copies 이하, nM 이하	비교대상 없음	구제역 시료 취급 가능한 외부 위탁기관 시험 결과보고서 첨부
재현성	횟수	시료 10개, 3회 반복	비교대상 없음	구제역 시료 취급 가능한 외부 위탁기관 시험 결과보고서 첨부

Table 4. 성능지표

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

제 1 절 국내 기술 수준 및 시장 현황

1. 기술 및 경쟁사 현황

- 가. 구제역 바이러스 (Foot-and-Mouth Disease virus; FMDV)는 Family Picornaviridae의 Genus Aphthovirus에 속하는 single strand positive RNA virus로써 바이러스 입자의 직경은 약 21-25 nm이다. 구제역 바이러스의 유전체 중 VP1의 coding region sequence에 따라 7가지의 serotype (O, A, Asia1, C, SAT1, SAT2, SAT3)으로 나뉘지며 80여종의 subtype으로 분류된다.
- 나. 이중에서도 O형, A형, Asia 1형은 베트남, 대만, 중국 등 우리나라 주변 국가에서 주로 발생하는 구제역 혈청형으로 보고되었다.
- 다. 구제역의 발생 시 초기진압이 중요한 만큼 정확하고 빠른 진단이 필요하나 구제역 바이러스의 여러 가지 혈청형에 대한 면역반응이 교차되지 않으며, 임상증상 또한 돼지 수포병, 수포성구내염, 수포진 등과도 구분이 어렵다. 따라서 구제역으로 의심되는 의심축의 발생 시에 실험실에서 빠르게 진단이 이루어져야 한다.
- 라. 구제역 진단에 활용되는 방법은 크게 세 가지로 나뉜다. 먼저 항원 ELISA법은 최근 Indirect sandwich ELISA법을 이용하여 구제역 바이러스의 7가지 혈청형에 대한 항체를 플레이트에 부착 한 후, 조직 유제액, 수포액 및 세포배양액과 같은 검사재료를 반응시켜 구제역 항혈청별 특이 검출항체, 효소표지항체 및 기질 순으로 반응시킴으로써 특이 항원을 검출하는 진단법으로써 구제역 확진 검사에 필수적이다.
- 마. 항체 간이 진단법은 항원 검사 시료가 없을 경우에 수행하는 혈청학적 검사로, 항원 간이 진단법은 구제역에 대한 구조단백질 (SP) 및 비구조단백질 (NSP) 항체를 장착한 항원을 검출하는 간이 진단키트로 적은 양 (약 15 μ L)의 수포액으로 15분 이내에 결과 판독이 가능하다. 하지만 항체간이진단법은 2010년 1월 경기도에서 구제역 발생 시에 초기 항체 형성에 문제가 있어 조기 진단에 효과가 없음이 보고된 바 있다.
- 바. 유전자 검사법은 최근 분자유전학의 발달과 함께 새로이 고안된 방법으로 구제역 바이러스의 유전자를 검출해 7가지 항혈청을 모두 진단 할 수 있으며 기존의 방법의 비해 진단 소요 시간이 짧고 결과의 민감도와 특이성이 높은 장점이 있다.
- 사. 현재 농림축산검역본부에서 상기 간이검사키트를 일괄 구매하여 동물위생시험소에 배부하지만, 경우에 따라서 시험소에서 직접 구매하는 경우도 있고 현재 시장규모는 연간 2억원 내외 이지만, 정밀검사 관련 키트의 시장은 제외되어 있고, 구제역이 1급 가축 전염병인 관계로 창궐하게 되면 시장 규모는 급증할 것으로 판단된다.

2. 산업 재산권 (Table 5)

- 가. 구제역 진단방법에 대해서는 다수의 발표 사례가 있으며 검체로부터 얻어진 체액의 항원제시 물질, 항체, 합텐 및 이들의 조합이 검출시약과의 복합체를 형성함으로써 키트의 외관 변화를 통해 구제역 바이러스 감염여부를 판단하는 진단키트가 보고되었다

(특허: 10-2004-0095824). 감염 의심축의 항체를 분석함으로써 진단하는 방법에는 혈청 형별로 SAT I형 구제역의 진단방법 (특허: 10-2014-0080760)과 SAT II형의 진단방법 (특허: 10-2011-0115006) Asia I형 진단방법 (특허: 10-2011-0031012)이 각각 보고되었다.

나. 현재까지 보고된 구제역 유전자검사법에는 7가지 혈청형을 분석하기 위해 디자인된 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 후에 전기영동상의 DNA size의 차이로 감별해 내는 방법과 (특허: 10-2011-003838) O형, A형, Asia I형을 대상으로 1개의 튜브에서 3가지 항혈청형을 구분할 수 있게끔 고안된 multiplex RT-PCR이 보고된 바 있다 (특허: 10-2013-0014933). 실시간 PCR을 이용하여 구제역 바이러스의 감염 여부를 진단할 수 있는 방법으로 구제역 원인 바이러스의 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 이를 포함하는 PCR칩, PCR장치 및 검출 방법에 대한 보고가 이루어진 바 있으며 (특허: 10-2013-0085227) 이에 대하여 구제역의 혈청 타입별 유전자 검출용 프라이머 세트가 공개되었다 (특허: 10-2013-0134040).

특허번호	특허개요	출원인	출원국
10-2011-0031012	Asia I형 진단방법	수의과학검역원	대한민국
10-2014-0080760	SAT I 혈청형 구제역 진단방법	수의과학검역원	대한민국
10-2011-0115006	SAT II 혈청형 구제역 진단방법	수의과학검역원	대한민국
10-2011-003838	7가지 혈청형을 분석하기 위한 PCR법	수의과학검역원	대한민국
10-2013-0014933	O형, A형, Asia I형 다중 증폭	수의과학검역원	대한민국
10-2013-0085227	실시간 PCR을 이용하여 구제역 바이러스의 감염 여부를 진단	수의과학검역원	대한민국

Table 5. 구제역 진단관련 국내 특허 현황

제 2 절 국외 기술 수준 및 시장 현황

1. 기술현황

가. 진단시스템 일반적 기술동향

(1) 2012년 미국의 Bruker Daltonics사의 단백질 질량분석법을 활용한 미생물 동정 기술 개발의 가속화로 리보솜 구성 단백질과 RNA의 종간 특이성을 활용하여 미생물별 고유질량 값을 통한 균 동정기술 개발을 성공하였다.

(2) 미국 정부 주도하에 바이오테러 대비 TaqMan Real-time PCR과 단일클론 항체 기

반의 독성검출 시스템을 조합한 M-BAND 기술개발 성공하였다.

- (3) 미국의 Cepheid사는 미세유체역학 기반 실시간 PCR 시스템인 GeneXpert system을 개발하여 결핵 및 리팜피신 내성 동시 진단제품을 개발하였고 이를 기반으로 가축 전염병 진단 키트를 제품화 단계에 이르고 있다.
- (4) 감염성 미생물 검사시장의 증가로 인한 신속, 고정확성 분자 진단기기가 시장주도하기 위하여 미국의 아이다호 테크놀러지는 바이오진단키트와 나노기술을 접목하여 27가지 병원체에 대한 동시진단이 가능한 Film Array System을 출시하여 판매하고 있다.
- (5) 유럽은 표면 플라즈마 공명 등의 검출기법, 핵산소재 개발, 나노 및 MEMS 기술을 접목한 랩-온어칩 제조, 유럽 인종에 대한 약리유전체학 등의 콘텐츠 개발을 위해 집중투자를 하고 있다.
- (6) 일본의 오사카대학교와 벤처기업 프로테인크리스털社 등의 연구그룹은 단백질 칩을 수십 회 반복해서 이용할 수 있도록 하는 신기술개발이 완성단계에 이르고 있다.
- (7) 이와 같이 나노입자 진단관련 기술 및 미세유체역학 기술의 발달로 기존 장비의 소형화 및 현장진단 장비로의 전환이 급속히 진행되어 앞으로 랩-온어칩과 분자진단기술의 조합을 통하여 가정이나 농가의 질병진단이 가능한 고속진단 페이퍼-칩 개발이 상용화될 것으로 예상되고 있다.

나. PCR 진단시스템과 구제역 상관관계 기술동향

- (1) 현재 구조단백질 항체를 검출하는 진단법으로서 국제수역사무국 (OIE)에서는 중화시험법을 표준 진단법으로 권장하고 있으나, 시험기간이 3일 정도 소요되고 고도의 생물안전차폐 실험실에서 실시해야 하는 등 대량의 시료를 검사하기에는 어려움이 있어서 이를 극복하고자, '효소결합면역측정법 (ELISA)'이 개발되었다.
- (2) Hamblin 등(1986)은 불활화 구제역 바이러스와 토끼 및 기니피그 다클론 항체를 사용한 액상블로킹 방식 (Liquid-phase blocking)의 효소결합면역측정법 (LPB ELISA)을 개발하였으나 진단항원을 생산하려면 살아있는 바이러스를 취급해야 하고, 진단용 항체로서 다클론 항체를 사용하기 때문에 생산 시마다 항체역가의 차이가 발생하는 단점이 있다.
- (3) 기존의 구제역 혈청형 감별법이 세계적으로 사용되고 있으나, 세계동물보건기구/세계식량농업기구의 국제 표준연구소인 영국 동물질병 연구소 (OIE/FAO World Reference Laboratory for FMD (WRL), Pirbright, UK)에서 개발된 프라이머는 최근의 아시아의 구제역 정보를 반영하지 못하였기 때문에 우리나라 상황에서 multiplex RT-PCR 로 진단에 활용하기는 어렵다. 또한 O, A, Asia 1 형 이외의 혈청형은 역학상 발생 가능성이 매우 낮은 기술로 판단된다.
- (4) Ding 등(2011)은 구제역의 진단에 민감도를 높일 수 있는 immuno-PCR을 소개하기 시작했고, 아직 이와 관련된 특허는 현재까지 검색되지 않고 있으며, 향후 이러한 기법을 이용한 진단키트 개발이 본 연구를 통해 완성이 된다면 기존의 키트에 비해 더 효율적으로 진단이 가능할 것으로 사료된다.

2. 국외 지적재산권 현황 (Table 6)

가. 구제역에 관한 국외 특허기술동향은 국내 특허 내용과 유사하다. 구제역 바이러스 항원을 혈청형 별로 검출할 수 있는 프라이머 세트 및 진단키트 (특허: 07732145) 또는

나. 본 과제에서 항원 대신 사용하고자 하는 펩타이드를 이용하여 항체를 생성하는 방법 (특허: 07604961)

다. 구제역 실험에서 사용되는 바이러스의 전염성에 대한 확산 위험을 방지하기 위해 핵산을 불화성화 하거나 제거한 세포주의 개발(특허:05866416) 등이 특허의 대부분을 차지하고 있으며, 본 과제와 같이 immuno-PCR 방법을 이용하거나, 핵산을 적용한 현장 신속진단과 같은 특허내용을 발견되지 않았다.

특허번호	특허개요	출원인	출원국
07732145 (2010.06.08)	일반적인 구제역 현장 신속진단 키트	Princeton Biomeditech	미국
07604961 (2009.10.20)	VP1 펩타이드로 항원을 대신하여 항체를 유도하는 방법	Liang Shu-Mei Academia Sinica	미국
05866416 (1999.02.02)	FMD 바인딩 부위를 삭제한 세포주 생산	The United States of America as represented by the Secretary of Agriculture	미국

Table 6. 구제역 진단관련 국외 특허현황

제 3 장 연구수행 내용 및 결과

제 1 절 실험 방법

1. 구제역 혈청형 별 항원 및 항체 제작

가. 구제역 혈청형 별 항원 제조

(1) VP1 유전자 합성 및 *E.coli* 발현 벡터 제작

국내에서 등록된 genbank 서열 중 A 형, Asia1 형, O1 형, O2 형으로 구분하여 선정한 후, 코돈 최적화 서열로 변환하여 유전자를 합성하였다. 합성된 VP1 유전자는 *E.coli* expression vector인 pET-28a (Novagen)의 NdeI/XhoI 제한효소 위치에 클로닝하였다.

혈청형 별로 각 epitope부위를 포함하는 3 subclone으로 벡터를 제작하였다. 발현할 부위가 짧기 때문에 발현 및 정제를 용이하게 하기 위해 GST (Glutathione S transferase) fusion 단백질로 발현되도록 하였다. 합성된 VP1 유전자를 template로 하여 각 혈청형 별 specific primer (Table 7)를 사용하여 해당 부위를 PCR 증폭한 후, GST fusion expression vector인 pGEX-4T-1 vector의 BamHI 제한효소 위치에 In-fusion cloning 방식으로 삽입하였다.

제작된 모든 벡터는 plasmid 정제 후, Big-Dye terminator sequencing을 통하여 정확한 클론을 확인하였다.

(2) FMDV VP1 재조합단백질 과발현 및 정제

pET28a-VP1 시리즈 벡터들과 pGEX-VP1 시리즈 벡터들을 이용하여 단백질을 과발현 및 정제하였다. pET28a-VP1 시리즈 벡터들은 *E.coli* strain인 BL21(DE3)에, pGEX-VP1 시리즈 벡터들은 *E.coli* strain인 TOP10에 transformation하였고, 과발현 조건 test 후 결정된 조건으로 단백질을 과발현을 유도하고 단백질 정제를 진행하였다.

Insoluble한 His-VP1 inclusion body를 정제하기 위해 세포를 50 mL TEN buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA)로 현탁하고 lysozyme을 1 mg/ml 까지 첨가한 후 4°C에서 30분간 lysis 시켰다. 초음파 분쇄기로 세포를 충분히 분쇄하고 20,000 xg로 20분간 원심분리하여 inclusion body를 침강시킨 후, 50 mL TENC buffer (0.5% deoxycholate in TEN buffer)로 inclusion body를 현탁하고 다시 초음파 분쇄 후 원심분리하였다. TENC buffer 세척을 2회 더 반복하여 획득한 순수한 inclusion body를 30 mL His DN binding buffer (20 mM Tris, pH 7.9, 500 mM NaCl, 8 mM Urea)로 4°C에서 4시간 rotation 시켜서 충분히 녹인 후 0.45 um filter로 filtration하였다. Denatured VP1 단백질은 metal chelating affinity chromatography 방법으로 정제과정을 수행하였다. 시료를 5 mL Histrap HP column에 단백질을 결합시킨 후 His DN elution buffer (20 mM Tris, pH 7.9, 500 mM NaCl, 8 mM Urea, 300 mM imidazole)로 0-100%까지 gradient elution으로 denatured VP1 단백질을 일차적으로 정제하였다. 정제된 단백질에 최종 1% SDS를 첨가하고 Sephacryl S-200

혈청형	Constructs	Primer name	Primer sequence	Region (aa)
A	pGEX-VP1A 1-80	A1-80-F	GGTCCGCGTGGATCCACCACCGCGACCGGTGAA	1-80
		A1-80-R	GGAATCCGGGGATCCTTAAACAACAATTCTAAATC	
	pGEX-VP1A 70-168	A70-168-F	GGTCCGCGTGGATCCACTTATTATTTCTCTGAT	70-168
		A70-168-R	GGAATCCGGGGATCCTTATGCACGAACAGCGCCGTA	
	pGEX-VP1A 158-212	A158-212-F	GGTCCGCGTGGATCCCCAGCTTCTTTAACTAC	158-212
		A158-212-R	GGAATCCGGGGATCCTTACAGCAGCTGTTTAGC	
Asia1	pGEX-VP1Asia1 1-80	As1-80-F	GGTCCGCGTGGATCCACCACCACCACCGGTGAG	1-80
		As1-80-R	GGAATCCGGGGATCCTTACAGCGCAACTTCTAAATC	
	pGEX-VP1Asia1 70-168	As70-168-F	GGTCCGCGTGGATCCACTTACTTTTCTGAT	70-168
		As70-168-R	GGAATCCGGGGATCCTTAAGCTTTAACCGCACCATA	
	pGEX-VP1Asia1 158-211	As158-211-F	GGTCCGCGTGGATCCCCGACCTCTTTCAACTAT	158-211
		As158-211-R	GGAATCCGGGGATCCTTACAGGGTCTGTTTTTC	
O1	pGEX-VP1O1 1-80	OI1-80-F	GGTCCGCGTGGATCCACCACCTCTACCGGTGAA	1-80
		OI1-80-R	GGAATCCGGGGATCCTTAAACAGCAACTCCAGATC	
	pGEX-VP1O1 70-170	OI70-170-F	GGTCCGCGTGGATCCACCTACTACTTCGCTGAT	70-170
		OI70-170-R	GGAATCCGGGGATCCTTATGCTTTAATCGCGCCATA	
	pGEX-VP1O1 160-213	OI160-213-F	GGTCCGCGTGGATCCCCAACCTCTTTAATTAT	160-213
		OI160-213-R	GGAATCCGGGGATCCTTACAGCAGCTGTTAAC	
O2	pGEX-VP1O2 1-80	OII1-80-F	GGTCCGCGTGGATCCACCACCAGCACCAGGTGAA	1-80
		OII1-80-R	GGAATCCGGGGATCCTTAAACTGCAACTTCTAAATC	
	pGEX-VP1O2 70-176	OII70-170-F	GGTCCGCGTGGATCCACTTACTATTTCTGCTGAT	70-176
		OII70-170-R	GGAATCCGGGGATCCTTAAGCTTTAATAGCGCCATA	
	pGEX-VP1O2 160-213	OIII160-213-F	GGTCCGCGTGGATCCCCGACCTCTTTAACTAT	160-213
		OIII160-213-R	GGAATCCGGGGATCCTTACAGAGACTGTTAAC	

Table 7. GST fusion VP1 partial fragment subcloning용 primer

26/60 column에 단백질을 로딩한 후 TENS buffer (25 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% SDS)로 size exclusion chromatography를 실시하여 refolding 과정을 수행하였다. 정제된 단백질은 4°C에서 2시간 정치시켜 과도한 SDS를 결정화 시키고, 20,000 xg로 30분간 원심분리하여 SDS 침전물을 제거하였다.

GST fusion 단백질은 30 mL PBS buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4)로 현탁하고 1 mg/mL lysozyme을 첨가하여 4°C에서 30분간 lysis 시켰다. 초음파 분쇄기로 세포를 충분히 분쇄한 후 20,000 xg로 20분간 원심분리하여 cell debris를 제거하였다. 상층액을 1 ml GSTrap HP column에 결합시키고, 15 mL PBS buffer로 wash한 후, 5 mL GST Elution buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 10 mM Reduced Glutathione)로 elution하였다.

정제된 His-VP1 단백질은 15% SDS-PAGE 및 coomassie blue staining으로 순도를

확인하였고, GST-VP1 단백질은 15% SDS-PAGE 및 western blot으로 순도를 확인하였다.

Western blot은 다음과 같이 수행하였다. 15% SDS-PAGE 전개한 후 nitrocellulose membrane에 transfer하였고, Membrane을 TBST buffer (20 mM Tris, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20)로 wash하고, blocking buffer (5% skim milk in TBST buffer)에서 1시간 blocking 하였다. Anti-GST mouse monoclonal antibody를 1:2,000으로 2시간 결합시킨 후 TBST buffer로 5분씩 3회 wash하였고, Anti-mouse IgG Fc-HRP 1:5,000으로 30분간 결합시킨 후 TBST buffer로 5분씩 3회 wash하였다. 마지막으로 Chemiluminescence Detection reagent로 반응한 후 X-ray film에서 노출하여 현상하였다.

나. Polyclonal antibody 제작

FMDV VP1 단백질에 대한 polyclonal antibody를 제작하였다. 정제된 각각의 혈청형 His-VP1 단백질을 2마리의 토끼에 각각 500 µg 단백질로 immunization 하였다. 4주 후 300 µg 단백질로 1차 boosting하고 이 후 2주 간격으로 2차, 3차 boosting을 실시하였다.

다. Monoclonal antibody 제작

FMDV VP1 단백질에 대한 monoclonal antibody를 제작하였다. 다수의 monoclonal antibody clone을 확보하기 위하여 MANI Method로 항체 제작을 진행하였다. 항원을 생쥐 (BALB/c)에 adjuvant (sigma)와 혼합하여 주사하고 생쥐의 혈액을 채취하여 항체 생성 여부를 ELISA법으로 확인하였다. 2회 면역 후 항체의 역가 (1:5,000)가 적정하게 증가하면 면역된 생쥐에서 비장을 떼어내어 B 림프구를 분리한 다음, 배양한 myeloma 세포 (sp2/0)와 융합시키고, 융합된 세포를 hypoxanthin, aminopterin, thymidine이 첨가되어 있는 배지 (HAT medium)에서 배양하여 myeloma와 B 림프구만이 융합된 세포 (hybridoma)를 선택적으로 선별하여 배양하였다. 얻어진 hybridoma 세포 중에서 항원과 반응하는 항체를 생산하는 세포를 ELISA법을 이용하여 확인하고, ELISA 양성반응인 세포를 한계희석법 (limiting dilution method)를 이용하여 양성세포와 음성세포를 분리하는 과정 (cloning)을 반복하여 항원에 반응하는 항체를 생산하는 단일클론세포 (hybridoma)를 생산하였다. cloning 과정은 4회 수행하였으며, 생산된 hybridoma cell을 Freezing (1X10⁶cell/ml)하여 보관하였다. final cell을 thawing 하여 항원을 이용하여 indirect ELISA를 수행하였다.

라. 항체의 정제

획득한 clone별 항체를 정제하기 위해 serum (polyclonal antibody) 또는 복수 (monoclonal antibody)를 filter로 여과한 후, 1X PBS로 희석하여 준비하였다. 준비된 항체를 Protein A/G resin에 binding 시킨 후 1X PBS로 wash하였다. Glycine buffer (0.1 M glycine-HCl, pH 3.0)로 elution 후, Tris buffer (1 M Tris-HCl, pH 8.8)로 중성화를 수행하였다. 정제된 항체는 2X PBS로 투석 및 농축하여 최종으로 clone별 항체를 획득하였다. 최종 획득한 항체는 12% SDS-PAGE를 통해 순도를 확인하였으며 nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 280 nm에서 농도를 측정하고 평균을 산출하였다.

마. 제조 항체의 테스트

(1) 역가 평가

항체의 역가는 western blot 및 ELISA로 확인하였다. ELISA는 High bind 96-well plate에 well당 200 ng 씩 각각의 항원을 coating하고, 혈청을 1:100-100,000까지 단계 희석하여 결합시킨 후 anti-rabbit IgG-HRP를 1:10,000으로 결합하였다. TMB substrate (Sigma)로 발색한 후 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. Western blot은 혈청을 1:3,000으로 희석하여 결합시킨 후 anti-rabbit IgG-HRP를 1:5,000으로 결합하여 수행하였다.

(2) 제조 항원, 항체 비교

PRIONICS 사의 PrioCHECK® FMDV type A/ type Asia1/ type O의 타입별 제품을 사용하여 제조한 항체의 반응성을 확인하였다. 두 가지 방법으로 확인하였으며 첫 번째는 kit의의 프로토콜로 수행하였고, 두 번째 방법은 키트의 conjugate 대신 1/10,000으로 희석된 anti-mouse IgG-HRP (또는 anti-rabbit IgG-HRP)를 사용하여 ELISA를 수행하였으며, 이 때 각 kit의 reference serum 및 control은 반응에서 제외하였다.

2. 항체-레이블링 및 반응성 시험

가. Silicon wrapping

나노입자의 표면에 실리카 코팅층을 형성하기 위해 100% 에탄올과 암모니아용액을 첨가하고 초음파기와 vortex를 이용해 나노입자들을 계속 분산시키면서 TEOS(silica)를 넣어 microwave에서 40°C, 30분 반응 후, 70°C, 60분간 반응하였다. 실리카 코팅층을 가진 나노입자를 toluene으로 세척하고, DMF (dimethylformamide)와 toluene을 넣어 상기의 방법과 동일하게 초음파 기기와 vortex를 사용하여 멍치지 않게 분산시키면서 3-APTES (3-Aminopropyltriethoxysilane)를 넣고, microwave에서 80°C, 3시간 반응하였다. 이 때, 30 분마다 vortex해 주면서 계속 반응시켰다. 반응이 끝난 나노입자는 toluene과 에탄올로 세척 후 에탄올에 보관하여 사용하였다.

나. Antibody-magnetic particles 레이블링

Amine group으로 코팅된 magnetic nanoparticles를 washing solution에 완전히 분산시킨 후, 1.5 mL의 washing solution (0.1 M PBS, pH 7.4) 을 첨가하여 resuspension 시킨 후 magnetic stand에 30초 방치 후 상층액을 제거하는 세척 과정을 2회 실시하였다. Magnetic nanoparticle에 glutaraldehyde solution (8% Glutaraldehyde, 0.1 M PBS, pH 7.4) 1 mL을 첨가하고 계속 부드럽게 섞어주면서 실온(22±3°C)에서 2시간 incubation하고, 2회 세척하였다. 그리고 0.4-0.5 mg/mL의 농도로 준비된 antibody 1 mL을 magnetic nanoparticle pellet에 첨가하여 완전히 혼합해주고, 부드럽게 계속 섞어주면서 실온(22±3°C)에서 4시간 incubation 후, 세척하였다. 다음으로 1 mL의 quencher solution (35 mM ethanolamine, 0.1 M PBS, pH 7.4) 을 첨가하여 혼합해준 후, 부드럽게 계속 섞어주면서 실온(22±3°C)에서 30 분 incubation 후, magnetic stand에 30초 방치 후, 상층액을 제거하였으며, 바로 blocking solution (1% BSA, 0.1 M PBS, pH 7.4) 1 mL을 첨가하여 혼합한 후

quencher solution 단계와 동일하게 30분 incubation 실시 후 세척과정을 2회 수행하였다. 상층액이 제거된 magnetic nanoparticle을 1 mL의 storage solution (1% BSA, 5% glycerol, 0.1 M PBS, pH 7.4) 으로 완전히 resuspension시킨 후 사용하기 전까지 4°C 에서 보관하였다. 획득한 conjugate는 ELISA 반응을 통해 확인하였다.

다. Antibody-oligomer 레이블링

1 mg/mL의 타입별 monoclonal antibody와 60-100 μ M의 5'aminated oligomer를 준비하였고, Thunder-Link[®] PLUS Oligo Conjugation System (Expedeon)을 사용하여 레이블링 반응을 수행하였다. 준비한 oligomer와 antibody를 각각 activation 시킨 후, activated oligomer와 antibody를 몰수비 1:10-15의 비율로 첨가하여 레이블링 반응을 실온 ($22 \pm 3^\circ\text{C}$)에서 overnight 진행하였다. 이렇게 획득한 conjugate는 free oligomer를 제거하기 위해 Conjugate Clean Up Reagent를 사용하여 정제 과정을 수행하였고, conjugate 생성은 4-15% gradient SDS-PAGE 및 3% agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

3. Immuno-PCR

가. 항원-항체 반응 최적화

96-well plate (flat bottom)의 각 well에 MP conjugate (antibody-magnetic particles conjugate)를 50 μ L 분주한 후, 확인하고자 하는 시료 (또는 항원)을 50 μ L 분주하고 실온($22 \pm 3^\circ\text{C}$)에서 1시간 incubation 하였다. Plate를 magnetic 96-well seperator에 고정시킨 채 1분 방치한 후, well 안의 solution을 털어 제거하고, washing buffer (PBST buffer - 1X PBS, 0.05% Tween-20, pH 7.4)를 250 μ L씩 분주한 후, 바로 털어버리는 세척 과정을 5회 실시하고, 마지막 washing 후 plate를 paper towel 위에 여러 번 쳐서 solution을 완전히 제거하였다. 이 때, 96-well plate는 magnetic 96-well seperator에 고정시킨 채 수행하였다.

Oligo conjugate (antibody-oligomer conjugate)를 각 well 100 μ L씩 분주하고, 실온 ($22 \pm 3^\circ\text{C}$)에서 1시간 incubation 후, 5회의 세척을 수행하였고, washing solution을 완전히 제거한 후, 각 well에 DNase&RNase free water를 100 μ L씩 분주하였다.

나. PCR 증폭반응 테스트 및 반응조건 최적화

항원-항체 반응을 진행한 sample을 template로 사용하여 Real-time PCR (ABI 7500, USA)을 수행하였다. SYBR Premix Ex Taq[™] (Takara, Japan)를 사용하여 SYBR green 형광을 표지자로 결과를 확인하였다. PCR 조건은 초기에는 95°C 에서 30초를 진행한 후, 95°C 에서 5초, 65°C 에서 20초로 40 cycle을 반복하였다. 최적화 진행 후, 최종 Real-time PCR 수행 조건은 다음과 같다. 95°C 에서 30초 반응 후, 95°C 에서 5초, 58°C 에서 15초로 25 cycle 수행하였다.

4. 간이키트 시그널 증폭 및 반응 최적화

가. DNA 구조체 제작 실험

3가지 종류의 DNA set를 디자인하여 합성(M1, M2, M3 sets)하였으며, 이 때 각 set의 reverse strand는 5'말단 부위에 biotinylation되어 있는 oligomer로 합성하였다 (Table 8).

oligomer name	Sequence	Modification
M1-F	5'-ATGCATGCATGCATATTCTTCATCCTTCATTTCTT CATCCTTCATATGCATGCATGCATA-3' (60 mer)	
M1-R	5'-ATACGTACGTACGTAATGAAGGATGAAGAAATGA AGGATGAAGAAATACGTACGTACGTA-3' (60 mer)	5'-end Biotin
M2-F	5'-TATGCATCGATGCATTGCATCGATGCATGCATGC ATGCATGCACATATGCATCGATGCAT-3' (60 mer)	
M2-R	5'-TACGTAGCTACGTATTGTGCATGCATGCATGCAT GCATGCATGCATACGTAGCTACGTAT-3' (60 mer)	5'-end Biotin
M3-F	5'-ATGCATGCATGCATAAACATCAATGCACCATTGC AACACGCACAATGCATGCATGCATA-3' (59 mer)	
M3-R	5'-ATACGTACGTACGTATGTGCGTGTTGCAATGGTG AATTGATGTTATACGTACGTACGTA-3' (59 mer)	5'-end Biotin
abC	5'-TATGCATGCATGCAT-3' (15 mer)	3'-end Amino modifier

Table 8. DNA 구조체 제작에 사용된 oligomer 서열

각각의 올리고머를 annealing buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA)에 녹여서 준비한 후, 올리고머 M1, M2, M3 sets을 각각 동량으로 50 mM 싹 튜브에 넣고, thermal cycler에서 95°C, 5분간 가열한 후 상온에서 서서히 1시간 동안 cool down 하였다. 반응이 끝난 annealing products는 40°C에 보관하였다. Dendrimer 형성은 동일한 Annealing buffer를 사용하여 전 단계에서 annealing 된 각 DNA set를 혼합하여 50°C에서 10분간 반응시킨 후 상온에서 1시간 cool down 시키는 과정을 반복하여 수행하였으며, 결과는 agarose gel 전기영동으로 확인하였다. 획득한 산물은 MOPS buffer (10 mM, pH 8.1)에 1시간 방치한 후 다시 heating, annealing을 반복하여 반응하지 못한 올리고머를 제거하였다.

나. Biotinylated DNA complex 적용

3' aminated oligomer (Table 8, abC)를 항체와 conjugation할 oligomer로 합성하였고, Thunder-Link® PLUS Oligo Conjugation System (Innova Biosciences)을 사용하여 antibody:oligomer 비율을 1:10으로 conjugation을 수행하였다. 최종 산물은 dendrimer DNA complex와 oligo-conjugated antibody를 혼합한 후, 50°C에서 1시간 반응시킨 후 상온에서 cool down 시킨다.

다. Lateral flow assay kit

항체가 결합된 Biotinylated DNA complex를 streptavidin-gold particles (~10 nm)

(Sigma-Aldrich)와 반응시키고 1% BSA로 blocking 한 후, 산물 2.5 mL을 1.5 cm x 1.5 cm filter에 골고루 떨어뜨리고 건조시킨 뒤, filter를 잘라서 0.3 cm x 0.3 cm filter 25개를 만든다. Nitrocellulose membrane 뒷면에 플라스틱 필름을 부착하여 membrane을 고정시킨 후, control line 부위에 Anti-mouse IgG 1 µg, test line 부위에 구제역 monoclonal antibody 1µg을 적용하고 건조시킨다. 이후 항체가 적용된 nitrocellulose membrane이 고정되어 있는 플라스틱 지지대, DNA-gold particles complex filter, 흡수패드, 시료 점적부 패드를 조립하여 strip을 제작하였다.

제작한 strip의 시료 점적부에 시료 (또는 항원)을 점적하여 test line과 control line에 나타나는 반응으로 결과를 분석하였다.

5. Immuno-PCR kit 성능 시험

가. 내부성능시험 진행 및 외부성능시험 의뢰

- (1) 판독 가능한 혈청형 : 타입별 96-well plate에 항원 시료 반응을 확인하여 혈청형의 구분이 가능한지 확인하였다.
- (2) 정확성 : 타입별 96-well plate에 단일 시료로 10회 수행하여 결과를 확인하였다.
- (3) 정밀도(검출감도) : 1 ng/ml - 10,000 ng/ml 의 시료를 사용하여 타입별 96-well plate의의 최저한계를 확인하였다.
- (4) 재현성 : 타입별 96-well plate에 미지의 시료 10개를 3회 처리하는 실험을 다른 연구원이 수행하여 동일한 결과를 나타내는지 확인하였다.

제 2 절 추진 일정

차수	세부 개발내용	기술개발 기간 (2016년09월05일 ~ 2019년09월04일)											
		09	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07	08
1차 년도	구제역 혈청형 별 항원 제조	■	■	■	■								
	제조합 항원의 정제				■	■	■						
	Polyclonal antibody 제작							■	■	■	■		
	Monoclonal antibody 제작												■
	제조 항체의 테스트										■	■	
2차 년도	Monoclonal antibody 제작	■	■	■									
	제조 항체의 테스트		■	■									
	제조 항원, 항체 비교												
	나노물질 표면 개질			■	■								
	항체-나노물질 레이블링 및 최적화					■	■						
	항체-핵산 레이블링 및 최적화					■	■	■					
	plate 포맷 적용 분석 조건 set-up							■	■	■	■	■	■
	Immuno-PCR 조건 테스트								■	■	■	■	■
3차 년도	Immuno-PCR 조건 테스트	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	DNA 구조체 제작				■	■	■						
	Biotinylated DNA complex 합성 및 시험 적용				■	■	■						
	Membrane strip 테스트 (항체-DNA complex)							■	■	■			
	POCT 제작 및 조건 테스트										■		
	시작품 제조									■	■		
	내부성능 평가											■	■
	외부성능 평가												■

제 3 절 연구수행 결과

1. 구제역 혈청형 별 항원 및 항체 제작

가. 구제역 혈청형 별 항원 제조

구제역바이러스 (Foot and Mouth Disease Virus, FMDV)의 주항원 단백질은 바이러스 구조단백질중의 하나인 VP1 단백질로서, 현재 serotype specific neutralizing antibody의 target 단백질로 알려져 있다. 이러한 이유로 VP1 단백질은 백신 개발의 target 될 수 있을 뿐만 아니라 진단 마커로 활용이 가능하다. 본 개발에서는 일차적으로 한국형 구제역바이러스의 VP1 항원의 대표서열을 우선 선정하고자 하였다. 국내에서 등록된 genbank 서열 총 66개의 서열을 단백질 수준에서 염기서열 비교를 하여 혈청형 및 빈도에 따라 각각 A 형 (GU441855.1), Asia1 형 (FJ785259.1), O1 형 (AH012984.2), O2 형 (JQ070321.1)으로 구분하여 선정하였고 (Figure 7), 선정된 한국형 구제역바이러스 VP1 단백질 유전자는 *E.coli*에서 과발현을 유도하기 위하여 Figure 8-11과 같이 *E.coli* 코돈 최적화 서열로 변환하여 합성하였다.

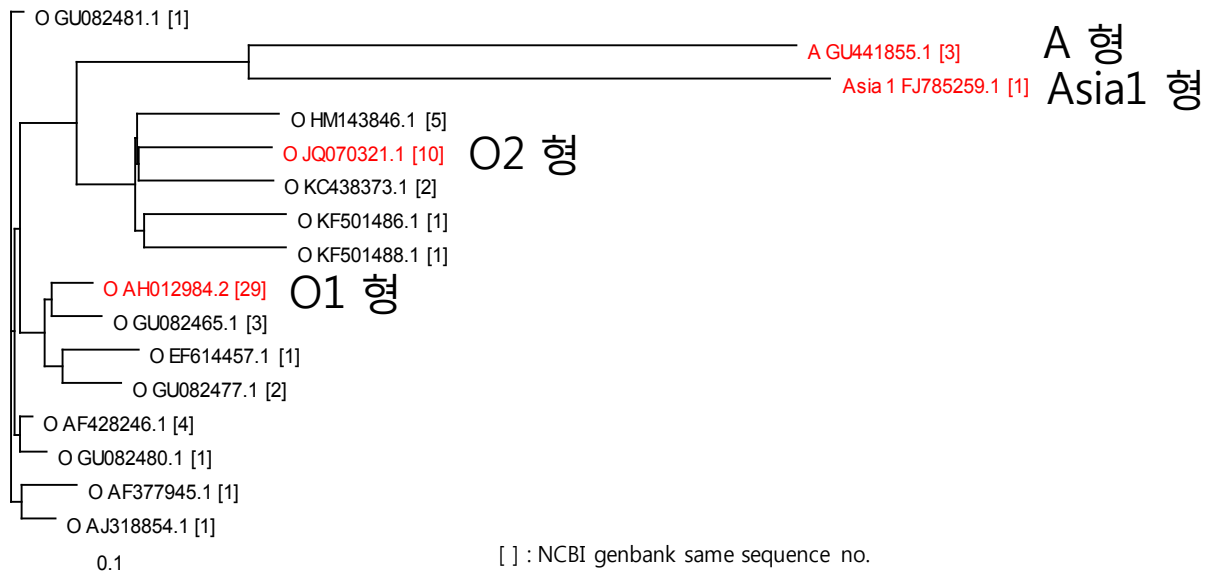


Figure 7. 한국형 구제역 바이러스 VP1 단백질 계통분석

A 형

```

Protein      M T T A T G E S A D P V T T T V E N Y G G E T Q V Q R R H H
Original 1  ATGACCACCGCCACCGGGAATCAGCAGACCCCGTCACAACCACCGTCGAGAACTACGGTGGTGAGACACAAGTGCAGCGACGCCACCAC
Optimized   ATGACCACC GCGACC GGTGAATCTGCTGATCCGGTACT ACCACTGTTGAA AACTATGGTGGT GAAACCCAGGTT CAGCGTCGTCAT CAC
Protein      T D V S F I M D R F V Q I K P V S P T H V I D L M Q T H Q H
Original 91  ACCGACGTCAGCTTTATAATGGACAGGTTTGTGCAGATCAAGCCTGTGAGCCCCACACATGTCATTGACCTCATGCAAACACACCAACAC
Optimized   ACTGATGTTTCTTTTCATC ATGGATCGTTTCGTT CAGATTAACCAGTTTCACCAACTCAGTA ATTGATCTGATGCAGACTCATCAGCAT
Protein      G L V G A M L R A A T Y Y F S D L E I V V N H T G R L T W V
Original 181 GGGCTGGTAGCGCTATGTTGCGCGCGGCACCTACTACTTTTCTGATCTTGAGATTGTGGTGAACCACACAGGTCGCCTAACGTGGGTA
Optimized   GGTTTAGTT GGCGCGATGTTACGTGCTGCTACTTATTATTC TCTGAT TTAGAAATTGTTGTTAATCATACC GGTGTTTTAACC TGGGTT
Protein      P N G A P E A A L D N T S N P T A Y H K A P F T R L A L P Y
Original 271 CCCAATGGAGCACCAGAGGCAGCACTGGATAACACGAGCAACCCCACTGCTTACCACAAGCACCGTTCACAAGGCTTGCACCTCCCTTAC
Optimized   CCGAACGGC GCACCGGAAGCGGCG CTGGATAAC ACTTCT AACCCGACCGCG TACCACAAA GCTCCGTTTACTCGTTTAGCTCTGCCATAT
Protein      T A P H R V L A T V Y N G T S R Y S A P A T R R G D L G S L
Original 361 ACCGCGCCACACCGCGTGTGGCAACCGTGTACAACGGGACTAGCAGGTACTCTGCGCCTGCAACACGGCGAGGTGACTTGGGGTCTCTC
Optimized   ACTGCGCCGACCCGTTCTG GCAACCGTG TATAACGGTACCTCTCGTTAT TCTGCG CCGGCTACTCGCCGCGCGATCTGGGTAGCCTG
Protein      A A R L A A Q L P A S F N Y G A V R A T E I Q E L L V R M K
Original 451 GCGGCGAGGCTCGCCGACAGCTTCTGCCTCCTTCAACTACGGCGGGTTCGAGCCACGGAGATCCAAGAATCCTCGTGCCGATGAAG
Optimized   GCAGCACGCTGGCTGCT CAGCTGCCAGCTTCTTTT AACTACGGC GCTGTT CGTGCAACCGAA ATCCAGGAA TTTATGATGCGTATGAAA
Protein      R A E L Y C P R P L L A V E V T S Q D R H K Q K I I A P A K
Original 541 CGCGCCGAGCTCTACTGCCAGGCCACTGCTGGCGGTGGAGGTGACGTCAAGAAGCAGACACAAGCAGAAAATCATTGCCCTGCAAG
Optimized   CGTGCAAACTGTAT TGC CCGCTCCG CTGCTGCTGTTGAA GTGACCTCTCAGGATCGT CACAACAAA AAAATTATCGCACCCGCTAAA
Protein      Q L L *
Original 631 CAACTCCTGTGA
Optimized   CAGCTGCTGTAA
  
```

Figure 8. FMDV VP1 서열 codon optimization - A 형

Asia1 형

```

Protein      M T T T T G E S A D P V T T T V E N Y G G E T Q T A R R L H
Original 1  ATGACTACCACCACTGGCGAGTCCGCGGACCCAGTCAACCACCGTTGAGAACTACGGAGGAGAGACCCAGACGGCCCGACGGCTTCAC
Optimized   ATGACCACCACC ACCGGT GAGTCCGCGGAC CCGGTCAACCACC ACCGTT GAAAACTAC GGGGTGAA ACCCAG ACCGCCGTCGCTG CAC
Protein      T D V A F V L D R F V K L T Q P K S T Q T L D L M Q I P S H
Original 91  ACTGATGTCGCTTTCGTTCTCGACAGGTTTCGTGAAACTCACCCAGCCAGACCCAGACCCTTGATCTCATGCAGATCCCCCTCACAC
Optimized   ACCGACGTTGCA TTCGTT CTGGACCGCTTCTTAAACTGACCCAG CCAAAA AGCACCCAGACC CTGGACTGATGCAGAT CCGAGC CAC
Protein      T L V G A L L R S A T Y Y F S D L E V A L V H T G P V T W V
Original 181 ACACTGGTCGGGCGCTTCTCCGGTCTGCGACGTACTACTTTTACAGACCTGGAGGTTGCGCTCGTCCACACAGGACCGGTCACGTGGGTG
Optimized   ACCCTGGTTGGTGTCTGCTGCGT TCTGCAACTTAT TACTTT TCTGATTTAGAA GTTGCG CTGGTT CACACTGGT CCGGTTACT TGGGTT
Protein      P N G A P K T A L D N H T N P T A Y Q K Q P I T R L A L P Y
Original 271 CCCAACGGTGCGCCTAAGACCGCCTTGACAAACCACACCAACCCGACTGCCTACCAGAAGCAACCTATCACCCGCTTGGCACTCCCCTAC
Optimized   CCTAATGGT GCTCCGAAAAC TGCAC TGGATAAT CACACCAACCCG ACCGCT TACC AAAAAACAGCCGATT ACCCGTCTG GCACTGCCGTAT
Protein      T A P H R V L S T V Y N G K T T Y G G E P P R R G D L A A L
Original 361 ACCGCTCCCCACCGTGTGCTGTCAACAGTGTACAACGGGAAGACAACGTACGGAGGAGAACCCCGCGGCGCGGTGATCTGCGCCCTC
Optimized   ACTGCACCCGAT CGT GTTCTGAGCACTGTTTAT AACGGTAAACCCTTATGGTGGT GAA CCGCCGCTCGTGGT GATCTGGCAGCGTTA
Protein      A R R V S N R L P T S F N Y G A V K A D T I T E L L I R M K
Original 451 GCACGACAGTGTAGCAACCGGCTGCCACTTCTTCAACTACGGCGCTGTGAAGGCCGACACCATCACGGAGCTGTTGATCCGCATGAAG
Optimized   GCACGTGCTGTT AGCAAC CGTCTG CCGACCTCT TTCAAC TATGGTGGGTTAAAGCTGATACTATTACCGAATTACTGATTCGT ATGAAA
Protein      R A E T Y C P R P L L A L D T T Q D R R K Q E I I A P E K Q
Original 541 CGTGCGGAAACATACTGCCCCAGGCCCTTGTGGCTCTTGACACCACACAAGACCCGCTAAACAGGAGATCATTGCACCTGAGAAACAG
Optimized   CGTGCTGAAAACCTATTGTCGGCTCCGCTG CTGGCACTGGAT ACC ACCCAGGATCGT CGTAAACAG GAAATCATCGCCCGGAA AAACAG
Protein      T L *
Original 631 ACTTTGTGA
Optimized   ACCCTGTAA
  
```

Figure 9. FMDV VP1 서열 codon optimization - Asia1 형

O1 형

```
Protein      M T T S T G E S A D P V T A T V E N Y G G E T Q V Q R R Q H
Original 1   ATGACCACCTCCACAGGTGAGTCGGCTGACCCCGTGACTGCCACCGTTGAGAACTACGGTGGTGAGACACAGGTCCAGAGACGCCAACAC
Optimized   ATGACCACCTCTACCGGTGAAAGCGCTGATCCGGTTACCGCT ACCGTTGAAAACTATGGTGGTGAAACCCAGGTTCAGCGTCGTCAGCAC
Protein      T D V S F I L D R F V K V T P K D Q I N V L D L M Q I P A H
Original 91  ACGGATGTCTCGTTCATACTAGACAGATTTGTGAAAGTAACACCAAAGACCAAATTAATGTGTTGGACCTGATGCAAAATCCCTGCACAC
Optimized   ACCGATGTTTCTTTCATTCTGGATCGT TTTGTTAAAGTTACCCCGAAGATCAGATTAACGTTCTGGATTTA ATGCAGATCCCGGCTCAT
Protein      T L V G A L L R T A T Y Y F A D L E V A V K H E G N L T W V
Original 181 ACTTTGGTAGGCGCGCTCCTCCGTACTGCCACCTACTACTTCGCAGATCTGGAAGTGGCAGTGAAACACAGGGGAACTCACCTGGGTC
Optimized   ACCTTGGTTGGTGTCTGTGCTG CGTACCGCGACCTACTACTTC GCTGATCTGGAA GTTGCTGTT AAACACGAAGGTAACTTAACTTGGTT
Protein      P N G A P E A A L D N T T N P T A Y H K A P L T R L A L P Y
Original 271  CCGAACGGTGCACCGGAA GCAGCACTGGAT AACACC ACTAACCCGACCGCT TATCATAAAGCGCCGCTGACTCGTCTGGCT CTGCCGTAT
Optimized   T A P H R V L A T V Y N G N C K Y G E S P V T N L R G D L Q
Protein      T A P H R V L A T V Y N G N C K Y G E S P V T N L R G D L Q
Original 361  ACGGCACCACACCGTGTCTTGGCTACTGTTTACAACGGGAACTGCAAGTATGGCGAGAGCCCGTGACCAATCTGAGAGGTGACCTGCAA
Optimized   ACCGCGCCGAT CGTGTTTTAGCTACTGTT TATAACGGTAATTGTAATACGGTGAATCTCCGGTT ACCAACTGCGTGGTGATCTGCAG
Protein      V L T Q K A A R T L P T S F N Y G A I K A T R V T E L L Y R
Original 451  GTGTTGACCCAGAAGGCGGCAAGAACGCTGCCTACCTCCTTCAATTACGGTGCATCAAAGCCACTCGGGTACTGAACTGCTTTACCGC
Optimized   GTTCTGACT CAGAAAGCGGCTCGTACC CTGCCAACCTCTTTTAAT TATGGCGGATT AAAGCAACCCGTTACTGAACTGCTGTATCGT
Protein      M K R A E T Y C P R P L L A I H P S E A R H K Q K I V A P V
Original 541  ATGAAGAGGGCCGAAACATACTGCCCCCGCCTCTTTGGCTATTACCCCGAGCGAAGCTAGACACAAACAAAAGATTGTGGCGCCTGTG
Optimized   ATGAAACGTGCT GAAACCTATTGC CCGCGTCCGCTGCTG GCTATCCACCG TCTGAAGCGGTCAT AAACCAGAAAATCGTTGCTCCGGTT
Protein      K Q L L *
Original 631  AAACAGCTGTTGTGA
Optimized   AAACAGCTGCTGTAA
```

Figure 10. FMDV VP1 서열 codon optimization - O1 형

O2 형

```
Protein      M T T S T G E S A D P V T A T V E N Y G G E T Q V Q R R H H
Original 1   ATGACCACCTTCGACAGCGAGTCGGCTGACCCCGTGACTGCCACCGTTGAGAATTACGGCGCGAGACACAGGTCCAGAGCGCCACCAC
Optimized   ATGACCACCGAGCACCGGTGAATCTGCGGATCCGGTTACCGCG ACCGTTGAAAACTACGTTGGTGAAACCCAGGTTCAGCGTCGTCACCAT
Protein      T D V S F I L D R F V K V T P K D S I N V L D L M Q T P S H
Original 91  ACAGACGTCATCATATTGGACAGATTTGTGAAAGTACACCAAAGACTCAATAAATGTATTGGACCTGATGCAGACCCCTCCAC
Optimized   ACCGATGTTAGCTTTATCCTGGATCGTTTCGTT AAGTTACTCCAAAAGATTCTATTACGTTCTGGAT CTGATGCAGACTCCGCTCAT
Protein      T L V G A L L R T A T Y Y F A D L E V A V K H E G D L T W V
Original 181 ACCCTAGTAGGGCGCTCCTCCGACTGCTACTTACTATTTCGCTGATTTAGAGGTGGCAGTGAAACACAGGGGGACCTTACCTGGGTG
Optimized   ACCTTAGTTGGTGTCTGTCTGCTACCGCA ACTTACTATTTCGCTGATTTA GAAGTTGCAGGTTAAACATGAAGGTGATCTG ACCTGGTT
Protein      P N G A P E A A L D N T T N P T A Y H K A P L T R L A L P Y
Original 271  CCAAATGGAGCACCTGAAGCAGCCTTGGACAACACCACCAACCCAAACGGCGTACCATAAGGCGCCGCTTACCCGGCTCGCATTGCCCTAC
Optimized   CCGAACGGTGTCTCCG GAAGCAGGTTTAGAT AACACCACTAACCCGACCGATATCACAAGCA CCGCTGACCGTTTAGCTCTGCCGAT
Protein      T A P H R V L A T V Y N G N C K Y A G G S L P N V R G D L Q
Original 361  ACGGCACCACACCGTGTTTTGGCCACCGTTTACAACGGGAACTGCAAATACGGCGGGGCTCACTGCCAACGTGAGAGGCGATCTCCAA
Optimized   ACCGCTCCGAT CGTGTTCTGGCTACCGTTTATAACGGCAACTGTAAATACGCAGGTGGTAGC CTGCCGAACGTTCTGGTGATCTGCAG
Protein      V L A Q K A A R P L P T S F N Y G A I K A T R V T E L L Y R
Original 451  GTGCTGGCTCAGAAGGCAGCGAGCGCGCTGCCTACTTCTTCACTACGGTGCATCAAAGCCACTCGGGTACAGAACTGCTGTACCGC
Optimized   GTGCTGGCTCAG AAAGCTGCTCGT CCGCTGCCGACCTCTTTTAACTATGGCGCTATT AAAGCTACCCGTTTACC GAACTGCTGTATCGT
Protein      M K R A E T Y C P R P L L A V H P S A A R H K Q K I V A P V
Original 541  ATGAAGAGGGCCGAGACGTACTGCTCCGCCCTCTTGGCTGTTCACCCAGTGCGGCCAGACACAAACAGAAAAATAGTGGCACCTGTA
Optimized   ATGAAACGTGCTGAAACCTATTGCCCGCTCCGCTGTTA GCTGTTCATCCGTCTGCTGCACGTAT AAACAGAAAATCGTTGCGCCGGTT
Protein      K Q S L *
Original 631  AAGCAGTCTTATGA
Optimized   AAACAGTCTCTGTAA
```

Figure 11. FMDV VP1 서열 codon optimization - O2 형

VP1 단백질에 대한 항체를 제작을 위한 항원 단백질을 준비하기 위해 합성된 타입별 VP1 유전자를 이용하여 정제가 용이할 수 있게 6 x histidine이 tagging 된 VP1 단백질을 발현할 수 있도록 클로닝하였다 (Figure 13(A)). 또한 VP1 단백질에 대해 제작된 각각의 항체에 대한 major epitope mapping을 위해 VP1 단백질을 부위별로 발현할 수 있는 벡터를 제작하였다. VP1 단백질에는 세 부위의 major antigenic site가 있는 것으로 보고되었으며 (Figure 12), 각 epitope부위를 포함하는 3 subclone으로 벡터를 제작하였다. 발현할 부위가 짧기 때문에 발현 및 정제를 용이하게 하기 위해 GST (Glutathione S transferase) fusion 단백질로 발현되도록 클로닝하였다 (Figure 13(B)). 모든 제작된 벡터는 Big-Dye terminator sequencing을 통하여 정확한 클론임을 확인하였다.

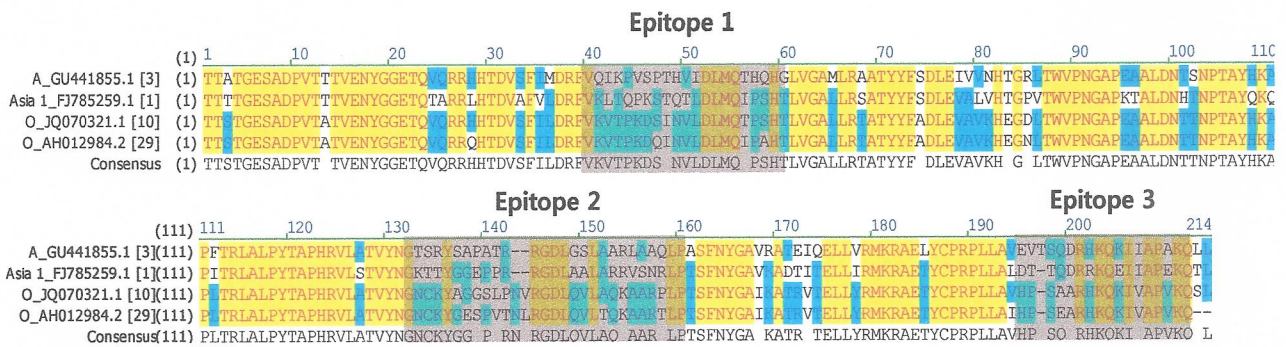


Figure 12. FMDV VP1 3 major antigenic site

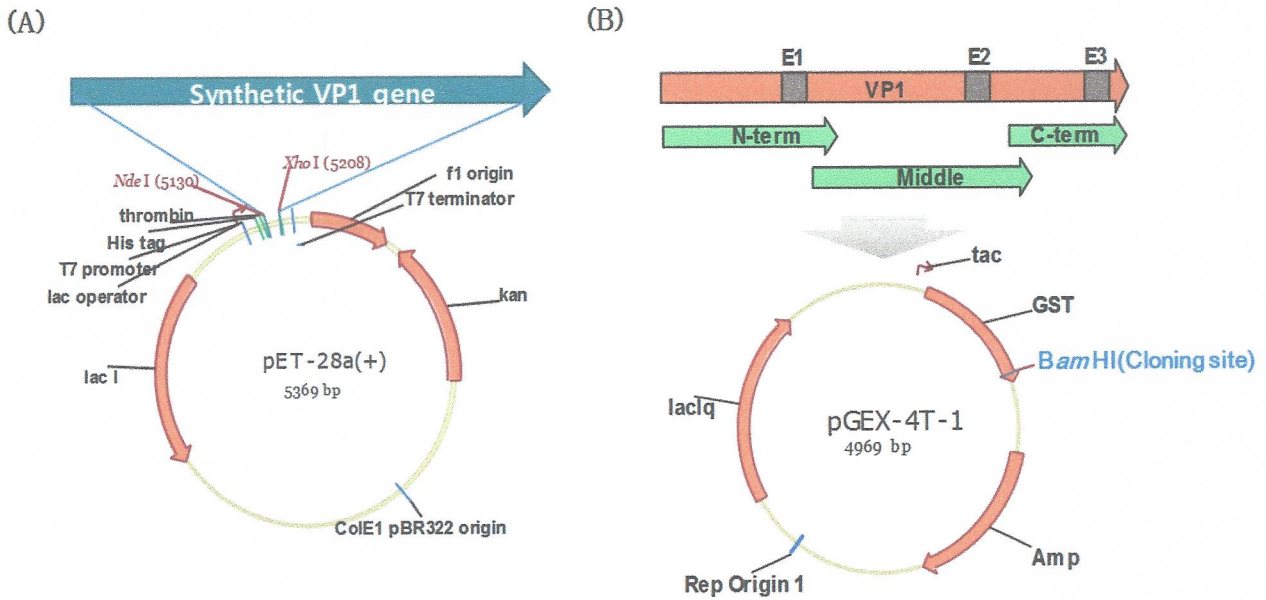


그림 13. (A) FMDV VP1 full protein expression vector
(B) FMDV VP1 partial fragment expression vector

타입별 His tagged VP1 full protein 및 Epitope mapping에 필요한 VP1 partial protein을 과발현 및 정제하여 순수한 타입별 합성 항원을 획득하였다. (Figure 14, 15). VP1 partial protein은 western blot을 수행한 결과, 모두 GST fusion 형태로 정제된 것을 확인하였다 (Figure 15). 획득한 VP1 단백질은 antibody 제작에서 항원으로 사용하였다.

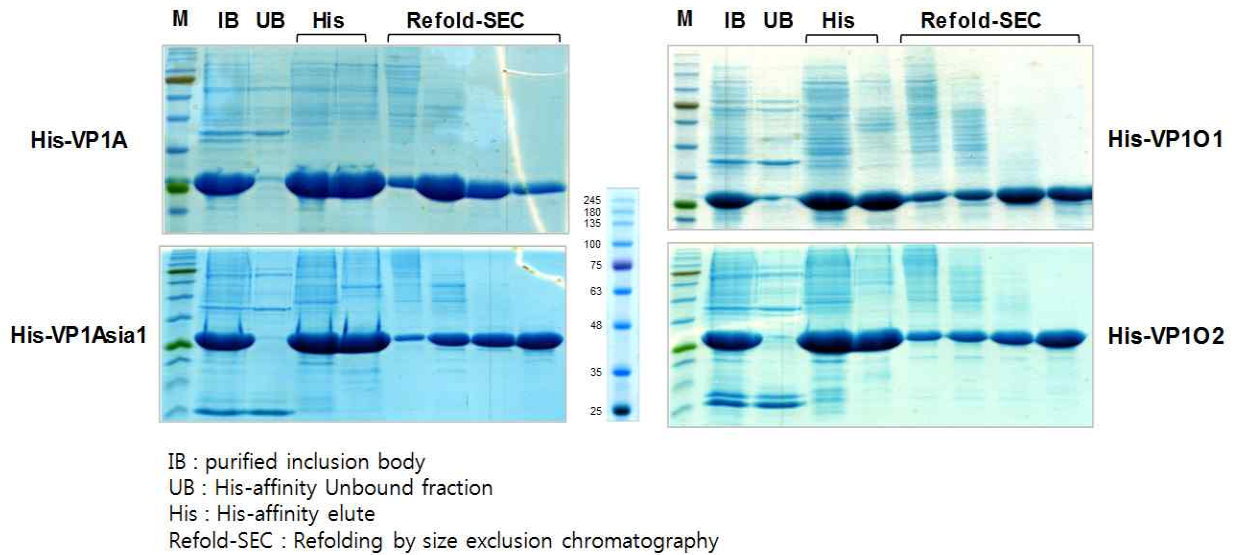


Figure 14. His tagged VP1 full protein 정제 단계별 SDS-PAGE

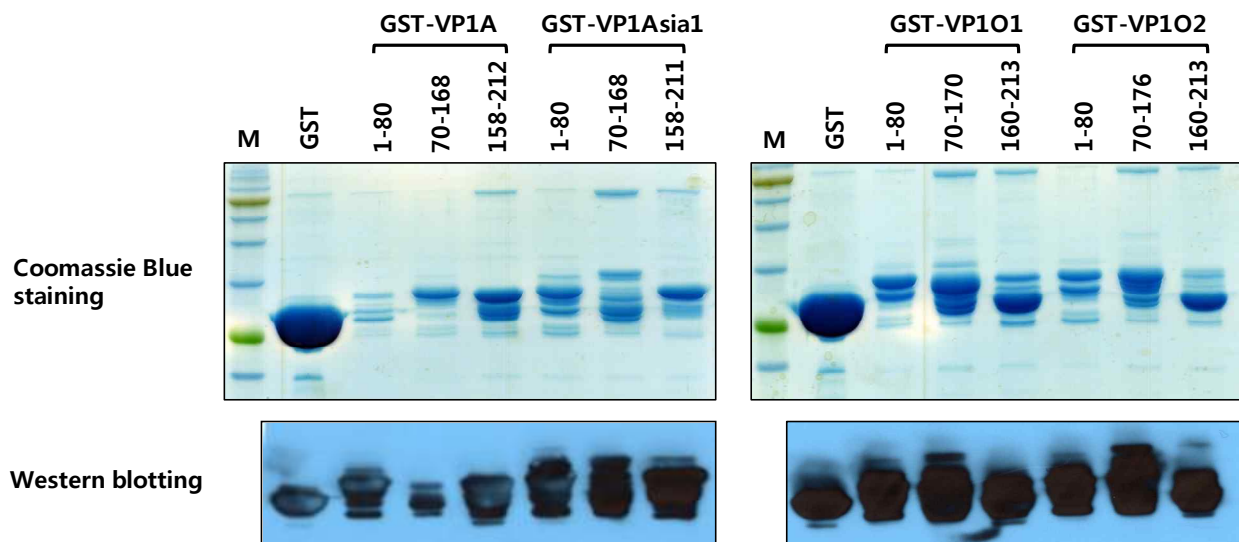


Figure 15. GST fusion VP1 partial protein 정제 및 western blot

나. Polyclonal antibody 제작

FMDV VP1 단백질에 대한 polyclonal 항체를 제작하여 western blot을 수행하여 항체의 반응성을 확인하였고, 모든 VP1 항혈청은 FMDV 혈청형별 VP1에 무관하게 모두 반응하였다 (Figure 16). 각 혈청형 VP1 단백질의 GST fusion partial fragment VP1 단백질을 사용하여 VP1 단백질에서 epitope 반응성을 확인한 결과, A type 항체는 N-term (1-80)에 가장 강한 반응을 보이고, Asia1 type은 전체적으로 강한 반응을 보였다. O1 type의 경우 N-term (1-80), Middle part (70-170)에 강한 반응을 보이고, O2 type의 경우 Middle part에 가장 강한 반응성을 보였다 (Figure 17). 항체의 역가를 확인하기 위해 ELISA 수행한 결과 제작된 모든 항체들은 1:50,000 이상의 높은 ELISA 역가를 보였다 (Figure 18).

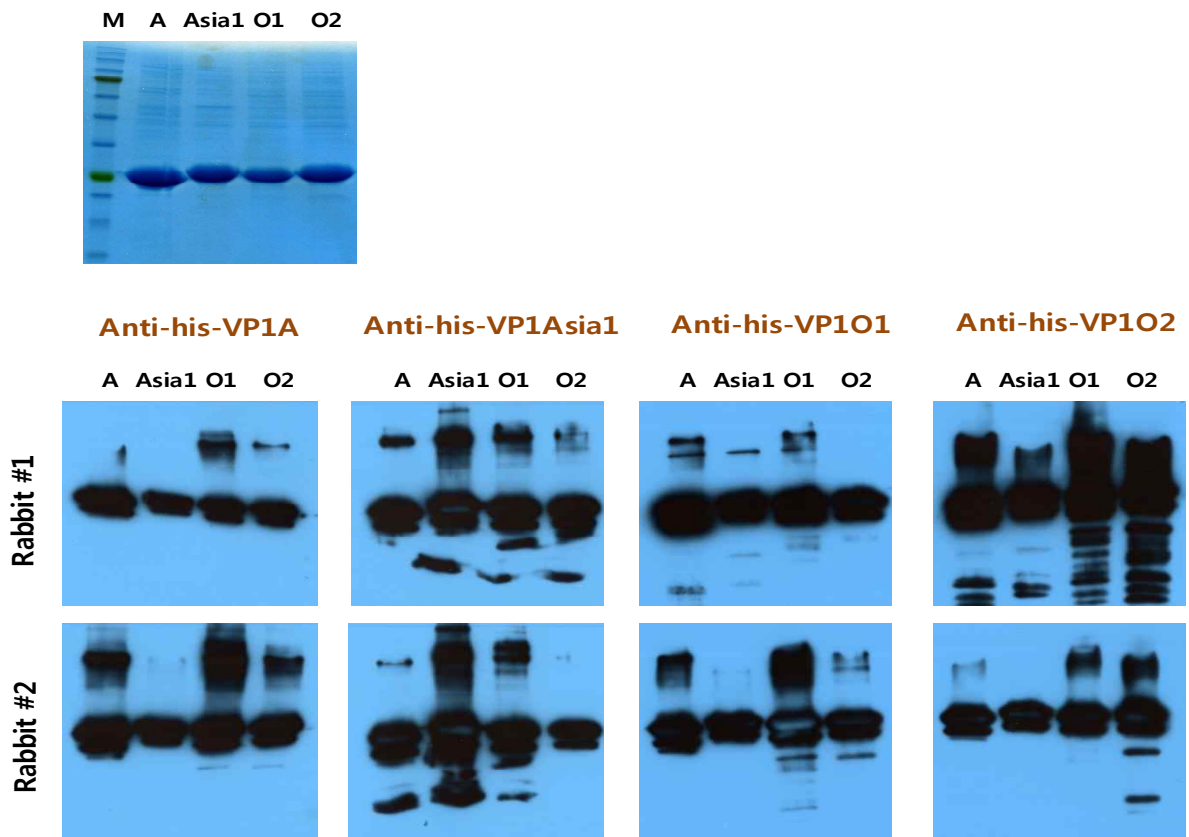


그림 16. FMDV VP1 rabbit polyclonal antibody를 사용한 western blot

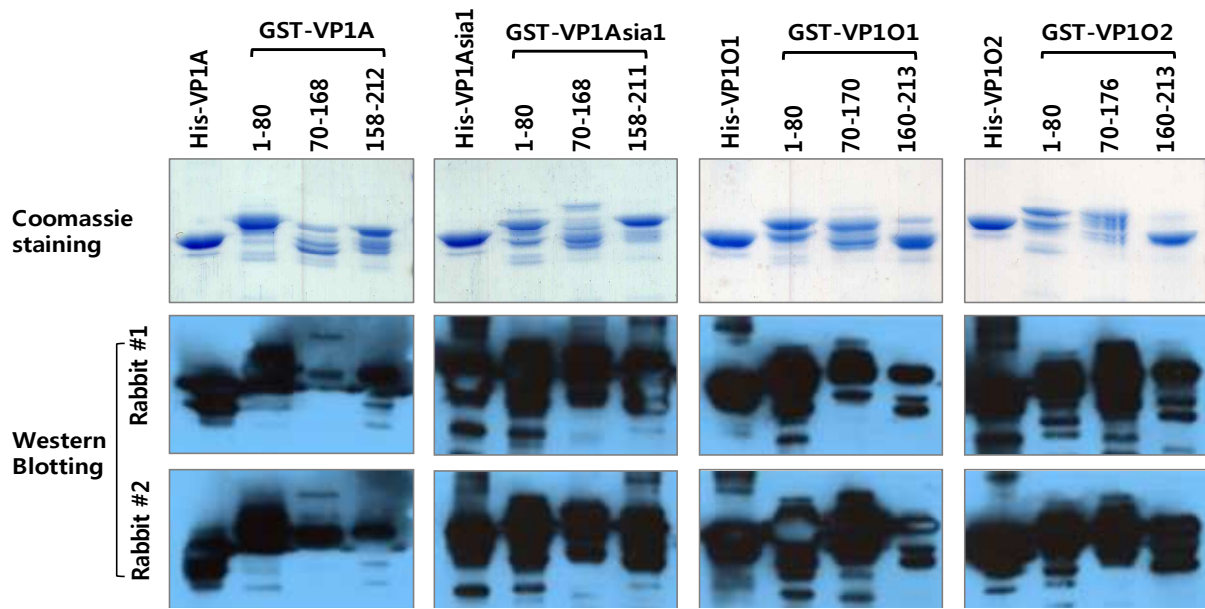


그림 17. FMDV VP1 rabbit polyclonal 항체의 VP1 부위별 반응성

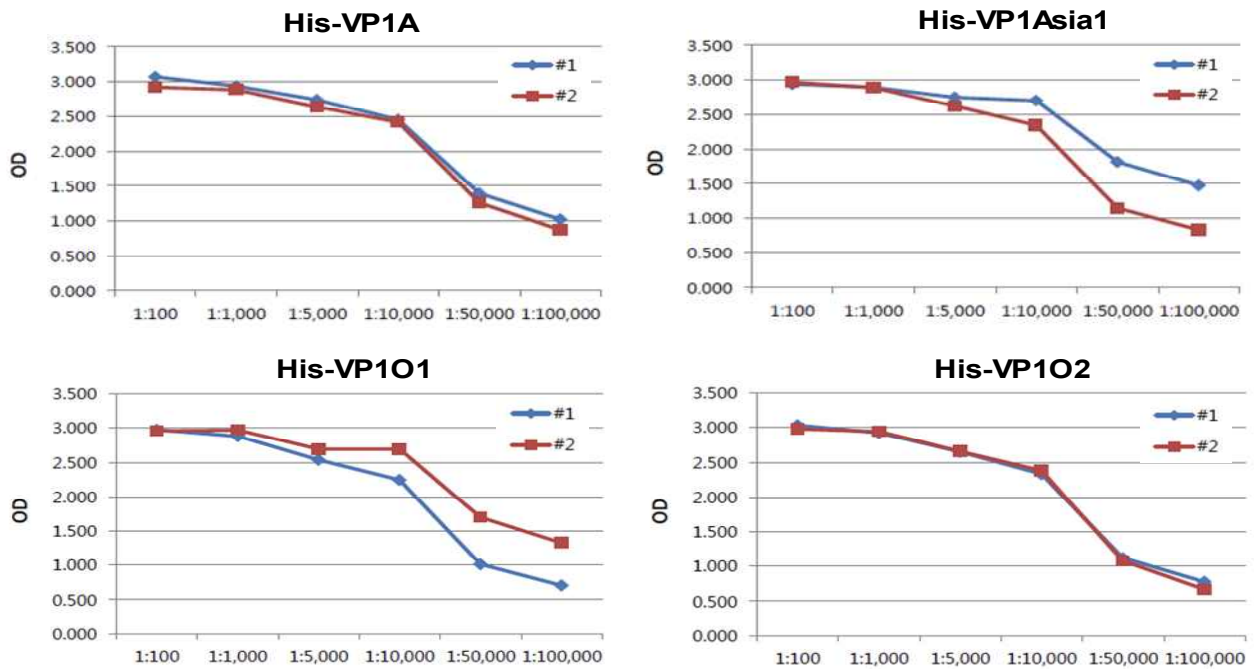


Figure 18. FMDV rabbit polyclonal antibody를 사용한 ELISA

다. Monoclonal antibody 제작

FMDV VP1 단백질에 대한 monoclonal antibody를 제작하였다. 다수의 monoclonal antibody clone을 확보하기 위하여 MANI Method로 항체 제작을 진행하였다. 각 혈청형별 7-10개의 clone을 생성하여 항원을 100 ng으로 coating한 후 indirect ELISA를 수행하여 반응성을 확인한 후 대량 생산할 clone을 선정하였다. Table 9는 선정된 clone의 ELISA 결과를 나타낸 것으로 모든 clone이 동일한 타입의 혈청형에 대해 2 이상의 흡광도를 보였으며, O1 type과 O2 type의 항체의 경우 모든 O type의 항원에 type의 구분 없이 모두 높은 반응성을 보였다.

Type	Clone No.	OD ₄₅₀			
		His-VP1 A	His-VP1 Aisa1	His-VP1 O1	His-VP1 O2
A	3H7	2.891	2.768	2.737	2.842
	6A12	2.788	2.474	2.408	2.562
	6C11	2.657	1.094	0.455	0.706
Asia1	5H4	0.133	2.201	0.061	0.131
	2H7	0.168	2.063	0.061	0.114
	3F7	0.147	2.061	0.050	0.099
O1	17D12	2.385	1.934	2.397	2.625
	16B12	2.694	0.925	2.619	2.643
	17G4	2.276	1.588	2.321	2.625
O2	12B10	2.303	0.845	2.358	2.324
	1F1	0.316	0.065	1.158	1.799
	14B11	2.298	0.250	2.129	2.229

Table 9. Final cell의 ELISA 결과

라. 항체의 정제

항체의 대량생산을 위해 in vivo로 항체를 생산하고, IgG 정제를 진행하였다. 정제 전 획득한 복수로 ELISA를 수행하였고, A type clone #6C11가 1:10,000 이상의 역가를 보였으며, 이 외에 모든 clone은 1:500,000 이상의 높은 역가를 보였다 (Figure 19). 복수로부터 항체를 정제하여 투석 및 농축 과정을 통해 최종 monoclonal antibody를 획득하였으며, 최종 획득한 항체는 SDS-PAGE를 수행하여 순수한 항체를 획득하였음을 확인하였다 (Figure 20).

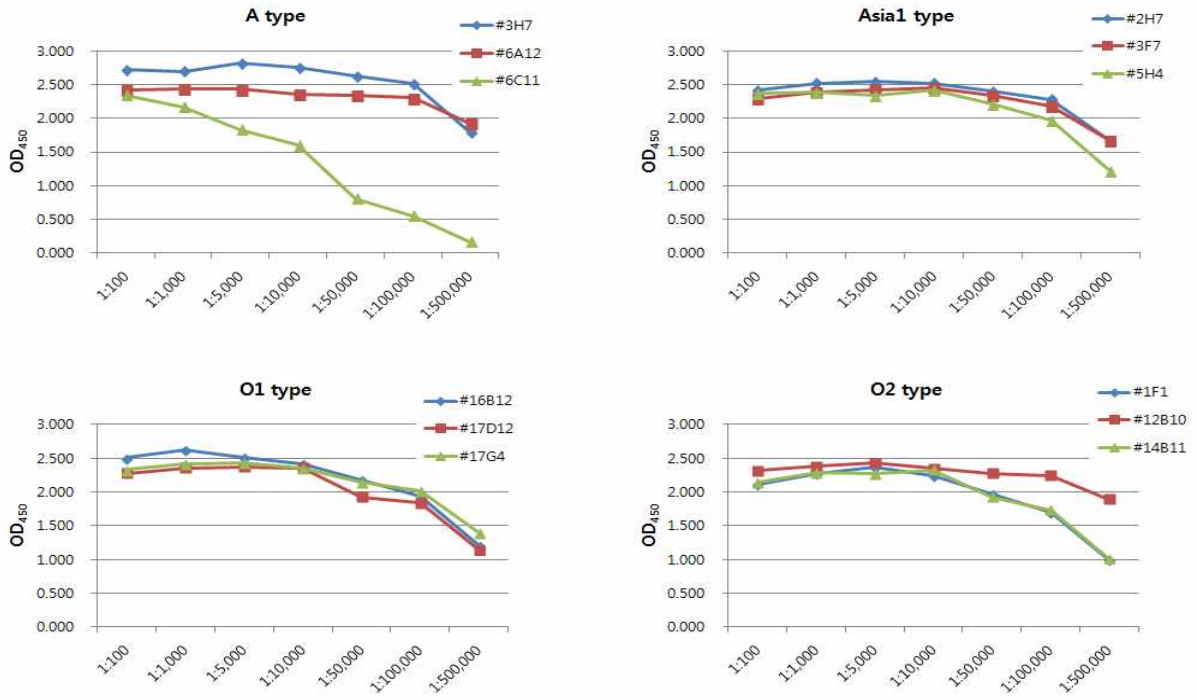


Figure 19. 타입별 획득한 복수의 ELISA 결과

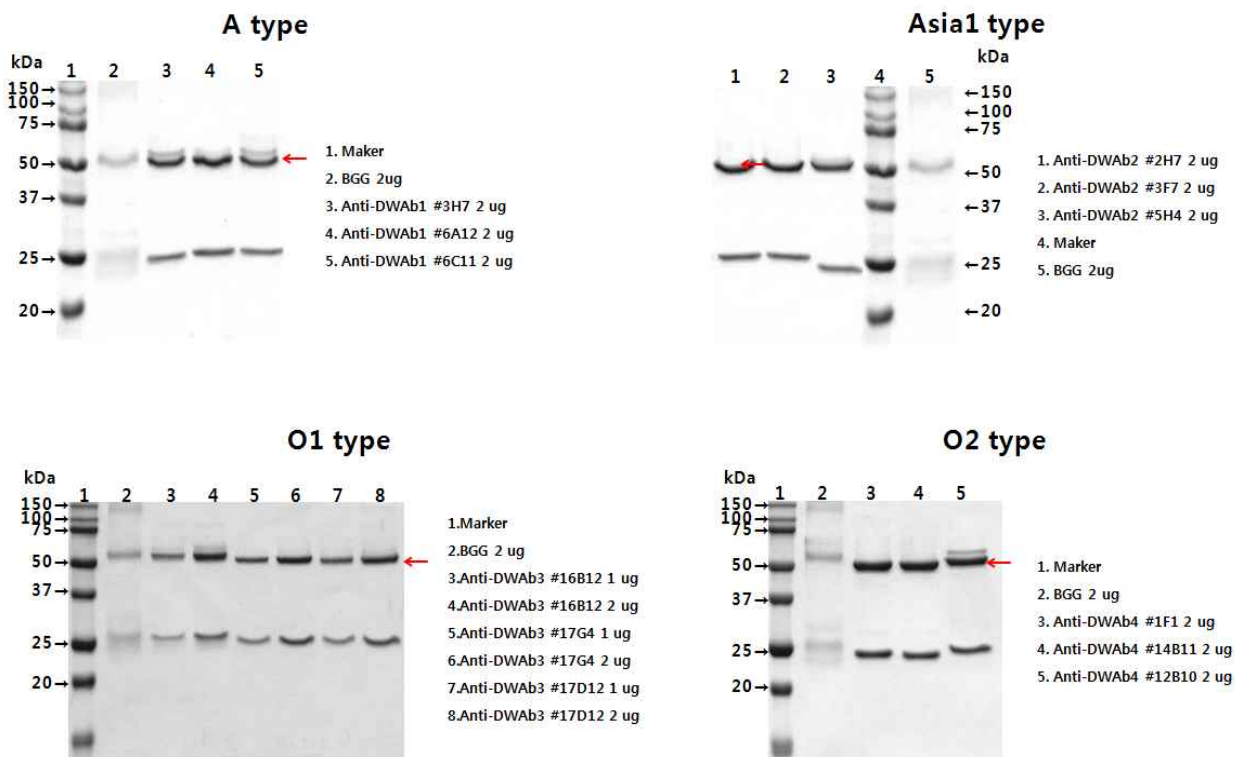


Figure 20. IgG purification SDS-PAGE 확인

마. 제조 항원, 항체 비교

제조된 항원과 항체의 반응성을 확인하기 위해 구제역 바이러스를 사용하여 직접 테스트를 수행할 수 없으므로, 간접적인 방법의 하나로 기존에 판매되는 항원이 코팅되어 시료 내 항체가 있는지 확인할 수 ELISA Kit를 사용하여 비교 실험을 실시하였다. A type의 항체가 있는 지 확인 가능한 type A 키트의 경우, 동일 타입의 항체인 polyclonal antibody A #1,2와 monoclonal antibody A #3H7에 반응하였으며, polyclonal antibody O1 #1에도 반응을 나타냈다. Type Asia1 키트는 동일 타입인 polyclonal antibody Asia1 #1,2, monoclonal antibody Asia1 #2H7, #3F7의 항체가 양성 반응을 보였으며, 추가적으로 polyclonal antibody A #1,2와 O1 rabbit #1, monoclonal antibody A #3H7에서도 양성 반응을 보였다. Type O 키트에서는 polyclonal antibody Asia1 #2 항체를 제외한 모든 polyclonal antibody가 양성 반응을 나타냈으며, 동일 타입의 monoclonal antibody O1 #16B12와 O2 #14B11과

(A)				(B)				(C)					
Name		OD ₄₅₀	PI (%)	판정	Name		OD ₄₅₀	Name		OD ₄₅₀			
Negative Control		0.529	85.235	음성	A type		#1	2.514	A type		#1	2.737	
		0.542	84.867	음성			#2	1.566			#2	2.528	
Weak Positive Control		3.336	6.863	양성	Asia1 type		#1	1.047	Asia1 type		#1	2.113	
		3.350	6.478	양성			#2	1.817			#2	2.209	
Positive Control		3.556	0.722	양성	O1 type		#1	1.823	O1 type		#1	3.123	
		3.608	-0.722	양성			#2	1.835			#2	3.036	
Polyclonal Antibody	A type	#1	3.823	-6.729	양성	O2 type		#1	1.468	O2 type		#1	2.569
			3.818	-6.581	양성			#2	1.677			#2	2.547
	#2	3.106	13.306	양성	A type		#3H7	1.529	A type		#3H7	2.387	
		3.248	9.334	양성			#6A12	0.862			#6A12	2.100	
	Asia1 type	#1	1.027	71.319	음성	#6C11		0.77	Asia1 type		#6A12	2.037	
			0.984	72.528	음성			0.513			#6C11	2.317	
	#2	0.725	79.766	음성	Asia1 type		#2H7	0.275	Asia1 type		#6A12	1.931	
		0.747	79.135	음성			#3F7	0.579			#6C11	1.725	
	O1 type	#1	1.813	49.388	양성	O1 type		#17D12	0.267	O1 type		#5H4	0.348
			1.769	50.608	양성			#16B12	0.329			#2H7	0.601
	#2	1.155	67.768	음성	O2 type		#17G4	0.462	O2 type		#3F7	0.687	
		1.177	67.154	음성			#12B10	0.249			#3F7	0.654	
O2 type	#1	0.260	92.745	음성	O2 type		#1F1	0.42	O2 type		#17D12	1.647	
		0.258	92.800	음성			#14B11	0.465			#17D12	1.517	
#2	0.522	85.433	음성	empty well		0.048	empty well		#16B12	1.908			
	0.569	84.107	음성			#17G4			1.718				
Monoclonal Antibody	A type	#3H7	2.085	41.806	양성	A type		#5H4	0.346	A type		#17D12	1.785
			2.099	41.396	양성			#6A12	0.348			#17D12	1.697
	#6A12	0.226	93.699	음성	Asia1 type		#2H7	0.601	Asia1 type		#1F1	1.486	
		0.228	93.641	음성			#3F7	0.597			#14B11	1.891	
	#6C11	0.205	94.277	음성	O1 type		#17G4	0.687	O1 type		#12B10	1.737	
		0.195	94.570	음성			#12B10	0.249			#12B10	1.697	
	Asia1 type	#5H4	0.230	93.568	음성	O2 type		#1F1	0.42	O2 type		#1F1	1.555
			0.227	93.663	음성			#14B11	0.465			#14B11	1.887
	#2H7	0.184	94.852	음성	empty well		0.048	empty well		0.055			
		0.186	94.816	음성									
	#3F7	0.198	94.461	음성	A type		#3H7	1.529	A type		#3H7	2.194	
		0.204	94.305	음성			#6A12	0.862			#6A12	2.037	
#17D12	0.198	94.481	음성	Asia1 type		#2H7	0.275	Asia1 type		#6A12	1.931		
	0.213	94.054	음성			#3F7	0.579			#6C11	1.725		
#16B12	0.196	94.537	음성	O1 type		#17D12	0.267	O1 type		#5H4	0.348		
	0.221	93.833	음성			#16B12	0.329			#2H7	0.601		
#17G4	0.248	93.080	음성	O2 type		#17G4	0.462	O2 type		#3F7	0.687		
	0.232	93.512	음성			#12B10	0.249			#3F7	0.654		
O2 type	#12B10	0.203	94.327	음성	O2 type		#1F1	0.42	O2 type		#17D12	1.647	
		0.204	94.300	음성			#14B11	0.465			#17D12	1.517	
#1F1	0.233	93.498	음성	empty well		0.048	empty well		#16B12	1.908			
	0.240	93.311	음성			#17G4			1.718				
#14B11	0.207	94.227	음성	A type		#5H4	0.348	A type		#17D12	1.785		
	0.231	93.554	음성			#6A12	0.862			#17D12	1.697		

Figure 21. 제조 항원, 항체 비교 - A type

(A) PrioCHECK[®] FMDV A type 결과

(B) 타사 구제역 진단 키트 (rioCHECK[®] FMDV A type) 를 이용한 ELISA 결과

(C) 제조 항원을 이용한 ELISA 결과

monoclonal A #3H7의 양성반응을 확인하였다 (Figure 21(A), 22(A), 23(A)).

사용된 키트의 원리는 conjugate가 plate에 코팅된 항원에 결합하는 항체로 HRP가 레이블링 되어 있기 때문에 검사시료 내에 항원에 반응하는 항체가 있을 경우 색의 변화가 나타나지 않으며 (양성 반응), 항체가 없을 경우 파란색으로 변하게 된다 (음성 반응). 따라서 검사 시료 내 항체의 양이 항원보다 적다면 결합이 이루어지지 않은 항원에 conjugate가 결합하게 되고, 음성의 발색 반응을 보이게 되므로 우리가 제작한 항체가 항원에 대해 반응을 하지 않는다고 단정 지을 수 없다. 이를 보완하기 위해 키트의 conjugate 대신 1/10000으로 희석된 anti-mouse IgG-HRP와 anti-rabbit IgG-HRP를 사용하여 ELISA를 수행하였으며, 이 때 각 kit의 reference serum 및 control은 반응에서 제외하였다. 이 실험은 HRP conjugate가 시료 내 항체에 결합하여 발색 반응을 나타내므로, 발색반응이 kit와 반대로 나타나게 된다. 즉, 검사시료 내에 항원에 반응하는 항체가 있을 경우 파란색으로 변하여 양성 반응을

(A)				(B)				(C)					
Name		OD ₄₅₀	PI (%)	판정	Name		OD ₄₅₀	Name		OD ₄₅₀			
Negative Control		0.196	90.486	음성	A type		#1	1.805	A type		#1	3.389	
		0.185	91.030	음성			#2	1.385			#2	3.291	
Weak Positive Control		1.615	21.471	양성	Asia1 type		#1	1.873	Asia1 type		#1	3.553	
		1.721	16.318	양성			#2	2.547			#2	3.356	
Positive Control		2.102	-2.176	양성	O1 type		#1	1.645	O1 type		#1	3.297	
		2.012	2.176	양성			#2	1.484			#2	3.402	
Polyclonal Antibody	A type	#1	1.236	39.921	양성	O2 type		#1	1.301	O2 type		#1	3.191
			1.145	44.355	양성			#2	1.679			#2	3.055
	#2	2.922	-42.036	양성	A type		#3H7	2.577	A type		#3H7	2.585	
		3.140	-52.658	양성				#6A12				1.227	#6A12
	#1	3.676	-78.701	양성	Asia1 type		#2H7		2.355	Asia1 type		#2H7	
		3.552	-72.683	양성				#3F7	2.286				#6C11
	#2	1.874	8.909	양성	O1 type		#17D12		0.342	O1 type		#17D12	
		1.900	7.650	양성				#16B12	0.548				#16B12
	O1 type	#1	1.829	11.082	양성	O2 type			#17G4	0.496	O2 type		
			1.830	11.028	양성			#1F1		0.575			#1F1
	#2	0.840	59.182	음성	empty well		0.048		empty well		0.053		
		0.876	57.393	음성									
O2 type	#1	0.356	82.688	음성	Asia1 type		#5H4	0.712	Asia1 type		#5H4	2.558	
		0.360	82.503	음성				#2H7				2.355	#6C11
#2	0.495	75.930	음성	O1 type		#16B12	0.548		O1 type		#16B12	0.569	
	0.534	74.044	음성				#17G4	0.496				#17G4	1.878
A type	#3H7	1.659	19.361	양성	O2 type			#1F1	0.575	O2 type			#1F1
		1.692	17.762	양성			#14B11		0.827			#14B11	
#6A12	0.193	90.617	음성	empty well		0.048		empty well		0.053			
	0.191	90.700	음성										
#6C11	0.164	92.017	음성	Asia1 type		#5H4	0.712	Asia1 type		#5H4	2.558		
	0.175	91.512	음성				#2H7				2.355	#6C11	0.440
Asia1 type	#5H4	0.194	90.554	음성	O1 type			#16B12	0.548	O1 type			#16B12
		3.184	-54.807	양성			#17G4		0.496			#17G4	
#2H7	3.533	-71.769	양성	O2 type		#1F1		0.575	O2 type		#1F1		0.905
	3.392	-64.914	양성				#14B11	0.827				#14B11	0.588
#3F7	3.518	-71.045	양성	empty well		0.048		empty well		0.053			
	0.163	92.095	음성										
#17D12	0.166	91.930	음성	Asia1 type		#5H4	0.712	Asia1 type		#5H4	2.558		
	0.167	91.881	음성				#2H7				2.355	#6C11	0.440
#16B12	0.174	91.546	음성	O1 type		#16B12		0.548	O1 type		#16B12		0.569
	0.201	90.223	음성				#17G4	0.496				#17G4	1.878
#17G4	0.193	90.603	음성	O2 type		#1F1		0.575	O2 type		#1F1		0.905
	0.172	91.628	음성				#14B11	0.827				#14B11	0.588
#12B10	0.181	91.181	음성	empty well		0.048		empty well		0.053			
	0.196	90.462	음성										
#1F1	0.207	89.917	음성	Asia1 type		#5H4	0.712	Asia1 type		#5H4	2.558		
	0.193	90.641	음성				#2H7				2.355	#6C11	0.440
#14B11	0.185	91.026	음성	O1 type		#16B12		0.548	O1 type		#16B12		0.569
							#17G4	0.496				#17G4	1.878

Figure 22. 제조 항원, 항체 비교 - Asia1 type

(A) PrioCHECK[®] FMDV Asia1 type 결과

(B) 타사 구제역 진단 키트 (PrioCHECK[®] FMDV Asia1 type) 를 이용한 ELISA 결과

(C) 제조 항원을 이용한 ELISA 결과

나타내며, 항체가 없을 경우 색의 변화가 나타나지 않는 음성 반응을 나타낸다. 그 결과, 빈 well의 흡광도 결과가 0.048이었으며 모든 항체는 타사의 타입별 항원에 대해 모두 0.2 이상의 흡광도를 나타내었으며, 그 중 A type과 Asia1 type의 경우, 동일한 타입의 항원과 항체는 흡광도 값이 대부분 0.7 이상이고, O type의 경우 O1 type #17D12를 제외하고 거의 0.7 이상의 흡광도 값을 확인하였다. 또한 타사 구제역 진단키트 결과(Figure 21(A), 22(A), 23(A))와 비교하였을 때, 패턴이 유사하다고 판단할 수 있다 (Figure 21(B), 22(B), 23(B)). 마지막으로 보유하고 있는 제조항원에 대한 항체의 반응성을 확인하기 위해 well에 제조항원을 코팅한 후, ELISA를 수행하였다. 타사 구제역 진단 키트를 이용한 ELISA 결과와 유사하지는 않았으나, 동일 타입의 항원/항체 반응이 다른 타입의 반응보다 흡광도 값이 더 높았다 (Figure 21(C), 22(C), 23(C)). 이를 토대로 항체가 타입별로 제대로 제작되었다고 판단하였으며, 세 가지 비교 결과를 종합하여 다음 단계의 실험에서 사용할 antibody를 각 타입별 polyclonal antibody clone #1, monoclonal antibody A #6C11, Asia1 #3F7, O1 #16D12, O2 #14B11를 선정하였다.

(A)					(B)			(C)									
Name		OD ₄₅₀	Corrected OD ₄₅₀	PI(%)	판정	Name		OD ₄₅₀	Name		OD ₄₅₀						
									O1	O2							
Reference 1			3.986	3.750	-0.469	양성	A type		#1	3.838	A type		#1	3.052	2.787		
			3.951	3.715	0.469	양성			#2	3.794			#1	2.885	2.716		
		Reference 2			3.664	3.428	8.159	양성	Asia1 type		#1	3.464	Asia1 type		#1	2.834	2.686
					3.598	3.362	9.917	양성			#2	2.356			#2	2.884	2.761
Reference 3			1.657	1.420	61.948	음성	O1 type		#1	3.888	O1 type		#1	3.639	3.384		
			1.604	1.367	63.368	음성			#2	3.700			#2	2.939	2.380		
Reference 4			0.229	-0.007	100.193	음성	O2 type		#1	3.837	O2 type		#1	3.717	3.663		
			0.244	0.007	99.807	음성			#2	3.549			#2	3.688	3.555		
Polyclonal Antibody	A type	#1	3.555	3.319	11.072	양성	A type		#3H7	3.819	A type		#1	3.530	3.169		
		#2	3.603	3.367	9.786	양성			#6A12	2.106			#2	3.557	3.348		
	Asia1 type	#1	3.923	3.686	1.222	양성	Asia1 type		#6C11	1.915	Asia1 type		#1	2.900	2.847		
		#2	3.943	3.706	0.694	양성			#5H4	1.151			#2	2.947	2.720		
	O1 type	#1	3.372	3.135	15.989	양성	O1 type		#2H7	0.410	O1 type		#1	2.812	2.683		
		#2	3.342	3.106	16.774	양성			#3F7	1.198			#2	2.846	2.782		
	O2 type	#1	0.569	0.332	91.091	음성	O2 type		#17D12	0.434	O2 type		#1	1.714	1.447		
		#2	0.596	0.360	90.362	음성			#16B12	1.774			#2	1.714	1.447		
	Monoclonal Antibody	A type	#1	3.854	3.617	3.079	양성	A type		#12B10	0.841	A type		#1	1.201	1.015	
			#2	3.782	3.546	4.987	양성			#17G4	1.080			#2	1.275	0.975	
		Asia1 type	#1	3.716	3.480	6.758	양성	Asia1 type		#3F7	1.198	Asia1 type		#1	0.402	0.316	
			#2	3.727	3.490	6.482	양성			#17D12	0.434			#2	0.376	0.323	
O1 type		#1	3.742	3.505	6.080	양성	O1 type		#16B12	1.774	O1 type		#1	0.331	0.296		
		#2	3.657	3.420	8.349	양성			#17G4	1.080			#2	0.369	0.299		
O2 type		#1	2.505	2.268	39.220	양성	O2 type		#12B10	0.841	O2 type		#1	0.384	0.376		
		#2	2.461	2.224	40.394	양성			#1F1	0.675			#2	0.351	0.351		
empty well		A type	#3H7	3.630	3.393	9.076	양성	A type		#12B10	0.841	A type		#1	0.400	0.405	
			#6A12	3.631	3.394	9.049	양성			#17D12	0.434			#2	1.828	1.861	
		Asia1 type	#6A12	0.310	0.073	98.033	음성	Asia1 type		#16B12	1.774	Asia1 type		#1	1.753	1.825	
			#6C11	0.298	0.062	98.344	음성			#17D12	0.434			#2	2.094	1.960	
	O1 type	#6C11	0.265	0.029	99.228	음성	O1 type		#16B12	1.774	O1 type		#1	2.188	1.926		
		#5H4	0.277	0.041	98.909	음성			#17G4	1.080			#2	1.812	1.858		
	Asia1 type	#5H4	0.292	0.055	98.524	음성	Asia1 type		#12B10	0.841	Asia1 type		#1	1.715	1.814		
		#2H7	0.301	0.065	98.258	음성			#1F1	0.675			#2	1.890	1.793		
	O1 type	#2H7	0.257	0.020	99.453	음성	O1 type		#12B10	0.841	O1 type		#1	1.941	1.762		
		#3F7	0.239	0.003	99.930	음성			#14B11	1.553			#2	1.545	1.524		
	O2 type	#3F7	0.258	0.022	99.413	음성	O2 type		#12B10	0.841	O2 type		#1	1.585	1.511		
		#17D12	0.253	0.016	99.566	음성			#14B11	1.553			#2	2.254	1.944		
O1 type	#17D12	0.981	0.744	80.051	음성	O1 type		#14B11	1.553	O1 type		#1	2.346	2.011			
	#6C11	0.895	0.658	82.361	음성			empty well	0.048			#2	0.060	0.055			
O2 type	#16B12	3.201	2.965	20.565	양성	O2 type		empty well	0.048	O2 type		#1	0.060	0.055			
	#17G4	3.144	2.908	22.082	양성												
O1 type	#17G4	1.026	0.789	78.856	음성	O1 type				O1 type		#1	0.060	0.055			
	#934	0.934	0.697	81.313	음성												
O2 type	#12B10	1.817	1.580	57.663	음성	O2 type				O2 type		#1	0.060	0.055			
	#1F1	1.808	1.572	57.880	음성												
O1 type	#1F1	0.409	0.172	95.389	음성	O1 type				O1 type		#1	0.060	0.055			
	#14B11	0.409	0.172	95.380	음성												
O2 type	#2413	2.413	2.176	41.680	양성	O2 type				O2 type		#1	0.060	0.055			
	#14B11	2.350	2.114	43.363	양성												

Figure 23. 제조 항원, 항체 비교 - O (O1, O2) type

(A) PrioCHECK® FMDV O type 결과

(B) 타사 구제역 진단 키트 (PrioCHECK® FMDV O type) 를 이용한 ELISA 결과

(C) 제조 항원 (O1, O2)을 이용한 ELISA 결과

2. 항체 레이블링 및 반응성 시험

본 과제에 극미량의 항원을 검출하기 위해 사용한 immuno-PCR 방법에서 비특이적인 불순물, 불확실한 결합물 및 잔여 항체 등을 효율적으로 제거하고 반응의 정확성을 높이기 위한 방법으로 magnetic particles를 적용하였다. Magnetic particles는 immuno-PCR 반응 시 항원-항체 반응 첨가물들이 PCR 반응에서 비특이적인 산물을 만들어내지 않도록 최종 PCR 전단계에서 항원-항체 complex 외 다른 물질은 전부 제거하는 역할을 한다.

본 실험에 사용할 Magnetic particles는 일반적으로 시판되는 10 nm 직경의 철-나노입자를 사용하여 나노입자의 표면을 실리콘을 코팅하고, 아민기를 부착하는 과정을 수행하였다. 나노입자의 표면을 개질함으로써 장기간 안정적인 보관이 가능하고, 표면에 항체를 부착하기 용이해졌다. 본 실험의 표면 개질 과정은 이미 발표된 다양한 논문을 참조하였고, 대표적으로 Padavettan (Ismail Ab Rahman and Vejayakumaran Padavettan, 2012) 방법을 주로 참고하였다. (Figure 24).

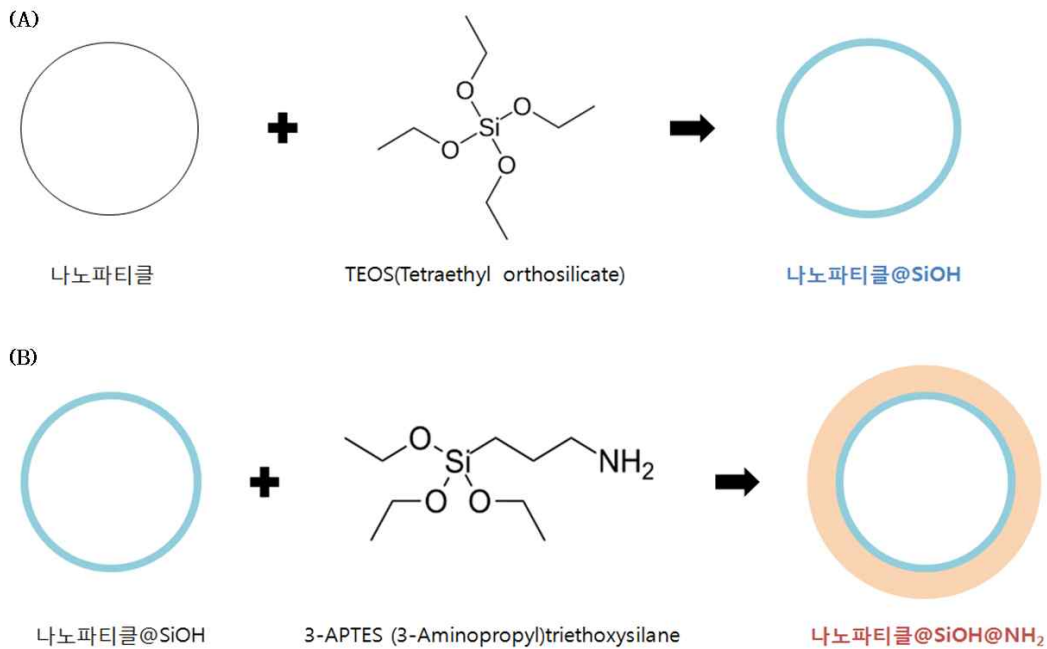


Figure 24. (A) 나노파티클 실리콘 코팅 과정

(B) 실리카 나노파티클에 amine group을 코팅하는 과정

나노입자 표면에 실리카가 코팅되었는지 확인하기 위해 전자주사현미경과 투과전자현미경(울산대학교 공동장비)을 이용하여 관찰하였고, Figure 25의 (A) 나노파티클, (B) 나노파티클@SiOH, (C) 나노파티클@SiOH@NH₂를 나타낸다. (A) 에서 나노물질의 입자는 9.91 nm (+/-2.07 nm)이며 최종적으로 amine group이 코팅된 나노입자 (Figure 25 (C))는 19.05 nm (+/-3.04 nm)로 확인되었다. 또한, 투과전자현미경을 통해 관찰한 사진 (Figure 26)에서 (A) 처음 나노입자만 있을 때와 (B) 실리카 코팅이 존재할 때의 차이를 관찰할 수 있었다.

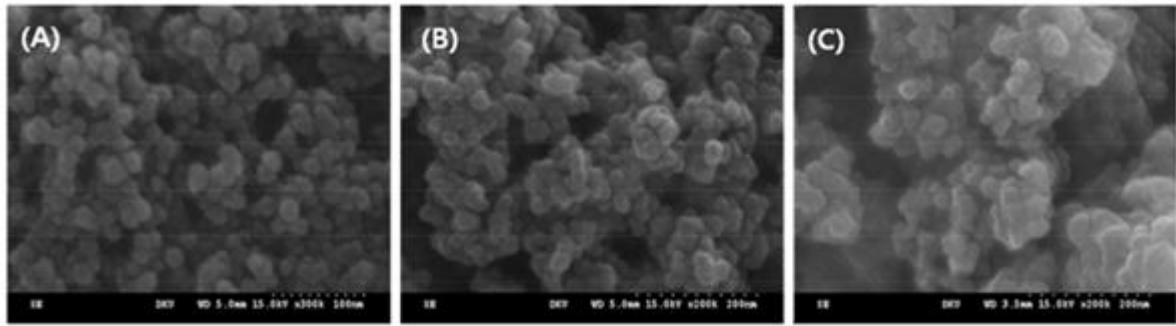


Figure 25. 실리카, amine group을 코팅한 나노입자의 주사전자현미경 사진

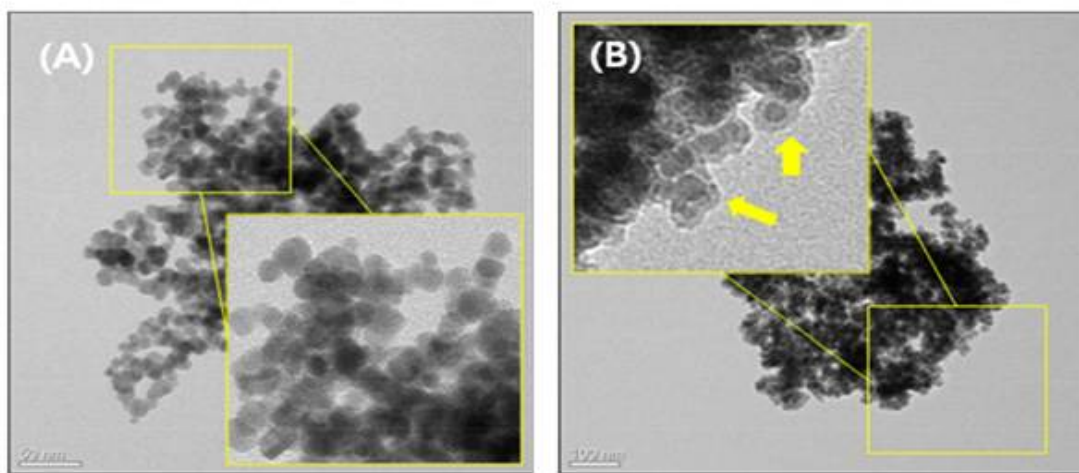


Figure 26. 실리카 나노파티클에 amine group을 코팅한 나노입자의 투과전자현미경 사진

기존의 immuno-PCR 방법에서 반응에 참가한 plate에 부착된 항체 (또는 항원)에 결합한 oligomer를 효소 처리 또는 열처리를 통해 분리하여 PCR 단계의 template로서 사용한다. 본 과제에서는 magnetic nanoparticles가 결합된 antibody를 사용하여 이 과정을 생략하고, 면역 반응에 참여한 항원-항체 complex를 바로 PCR 증폭 과정에 적용할 수 있도록 하여 면역 반응 과정에서 생기는 비특이적인 불순물 및 잔여 항체 등을 효율적으로 제거할 뿐만 아니라 중간 단계를 생략함으로써 시간적인 면에서 효율성을 획득하였다.

MP conjugate가 제대로 형성되었는지, 항체의 활성이 유지되는지 확인하기 위해 ELISA 후 발색반응으로 확인하였다. 항원이 첨가되지 않은 음성대조군은 발색반응을 나타내지 않았으며, 항원을 처리한 well에서는 발색반응이 일어났다 (Figure 27). 이것은 magnetic particles가 결합된 항체가 항원과 반응한 후, 항원에 반응하는 항체를 반응시키고, 이 항체에 detection antibody가 부착되어 발색반응을 나타냈다는 것을 의미한다. 따라서 제작한 MP conjugate는 항체로서 반응성이 유지되며, washing 과정에서도 씻겨나가지 않았으므로 항체에 magnetic particles가 제대로 부착되었다는 것을 확인 할 수 있다.

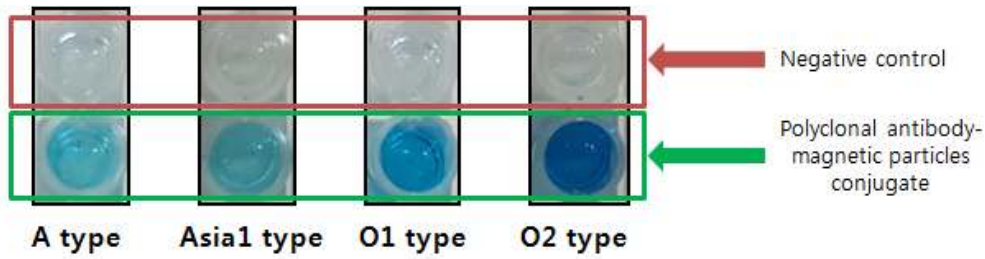


Figure 27. Polyclonal antibody-magnetic particles conjugate 확인

다음 단계로 Sandwich ELISA 방식의 항원-항체 반응 후 PCR 증폭 시 template로 적용될 oligomer를 항체에 레이블링 하였다. 먼저 논문에서 구제역 또는 구제역 바이러스와 관련이 없을만한 oligomer의 서열을 서치하여 합성하였으며 (Sreeja Gopal, et al., 2017; Jessie A. G. L. van Buggenum et al., 2016; Longyan Chen, et al., 2009), oligo-1의 경우 추후 real-time PCR 조건 최적화에서 적당하지 않아서 제외하였다 (Table 10).

Name	Sequence		
Oligo-1	5'-/5AmMC6/dA15 TTCAT CGCCC TTGGA CTACG ACTCT GACTG ATCGC TAAAT CGTG-3' (59mer)		
	Primer	Forward	5'-CATCGCCCTTGACTACGA-3'
		Reverse	5'-CACGATTTAGCGATCAGTCAGAG-3'
Oligo-2	5'-/5AmMC6/AATGA TACGG CGACC ACCGA GATCT ACACT CTTTC CCTAC ACGAC GCTCT TCCGA TCTNN NNNNN CGACG AATCA GTCAA CAGAT AAGCG AGCAA GATCG GAAGA GCACA CGTCT GAACT CCAGT CAC-3' (128mer)		
	Primer	Forward	5'-AATGA TACGG CGACC ACCGA-3'
		Reverse	5'-GTGAC TGGAG TTCAG ACGTG-3'
Oligo-5	5'-/5AmMC6/CTACC ATGGA CTGAC ACCGT TCATA GCCCA TCTTA CACTG TGGAA AAGCT TTTGG AGTCG TTTCC TAGTC GGATG TCAGT-3' (80mer)		
	Primer	Forward	5'- CTACC ATGGA CTGAC ACCGT TCA -3'
		Reverse	5'- CTGAC ATCCG ACTAG GAAAC G -3'

Table 10. Oligomer 서열

3. Immuno-PCR

제조한 타입별 MP conjugate와 Oligo conjugate, 항원을 사용하여 immuno-PCR을 수행하였다. Real-time PCR 결과 면역 반응을 한 sample과 negative control 모두 증폭 반응

이 일어났으나 C_T 값에서 차이가 있었다. Sample은 보통 C_T 값의 범위가 16-20 이었으며, negative control은 25-30을 나타내었다 (Figure 28). Oligo conjugate 처리 후, 항원이 없는 well은 oligo conjugate가 항원에 결합하지 않았기 때문에 free oligo conjugate로서 solution에 존재한다. 이후, washing을 해주면서 free oligo conjugate가 완전히 제거되어야 하나 그러지 못하여 미량의 free oligo conjugate가 남게 되고, 이로 인해 음성대조군 (negative control)에서도 증폭이 일어난 것이라 볼 수 있다. 따라서, 발색반응에 비해 PCR의 검출 감도가 높아서 negative control에서는 발색반응이 나타나지 않았으나, real-time PCR 에서는 증폭곡선이 나타난 것을 확인할 수 있다.

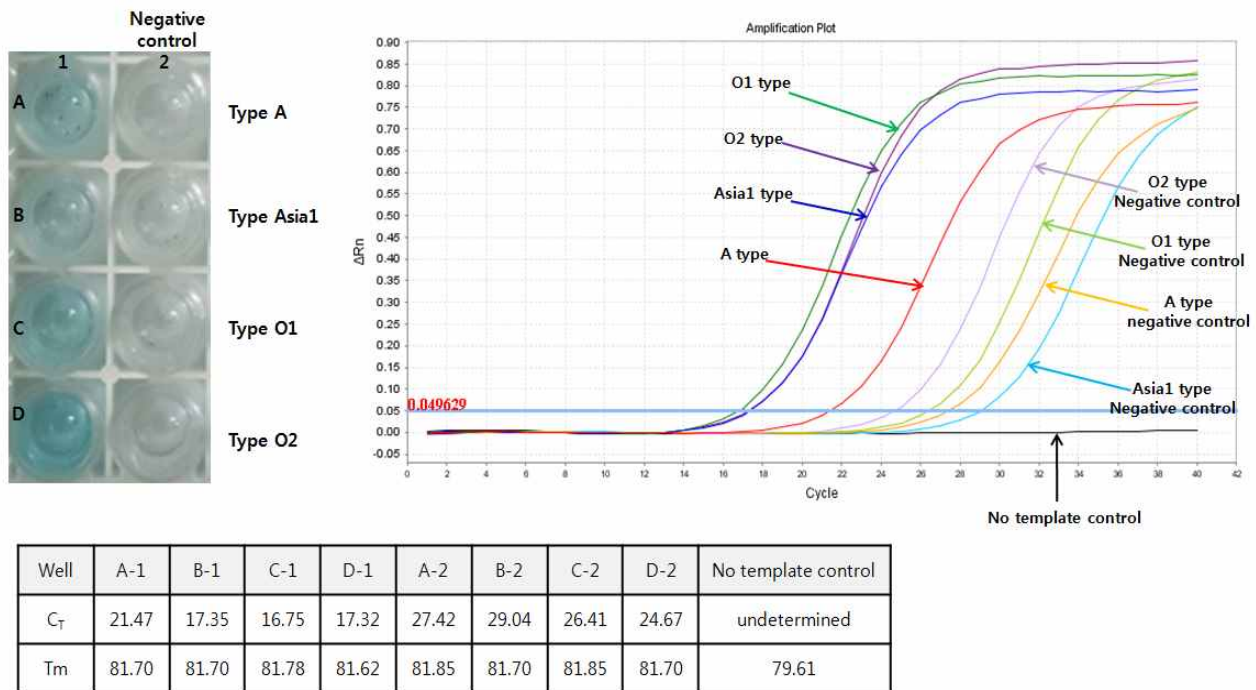


Figure 28. 초기 조건의 Immuno-PCR 수행 결과

Immuno-PCR을 최적화하기 위해 immune reaction 단계의 최적화를 진행하여 MP conjugate, Oligo conjugate 농도 및 분주량, washing buffer 조성 및 washing 횟수를 결정하였다. 또한, real-time PCR 증폭단계의 최적화를 위해, primer 및 template의 농도와 첨가량, PCR 증폭 조건을 조절하였다. Washing buffer의 경우 초기에 비해 buffer 내 detergent 함량을 증가시켰으며 (Figure 29), washing 횟수는 5회로 결정하였다. Real-time PCR의 경우, 비특이적인 증폭을 억제하기 위해 primer 농도를 500 nM에서 150 nM로 감소시켰으며, PCR 증폭 조건에서 annealing temperature를 최적화 하고, 반응시간과 cycle 수를 줄였다. 최종 결정된 조건으로 immuno-PCR을 수행한 결과는 Figure 30과 같다. 최적화된 조건으로 immuno-PCR을 수행할 경우, 음성대조군의 C_T 값은 undetermined로 나타나며, 항원이 첨가되는 경우 18-20 사이의 C_T 값을 가진다. 이로써 PCR 증폭 여부를 통해 항원 존재 여부를 확인할 수 있다.

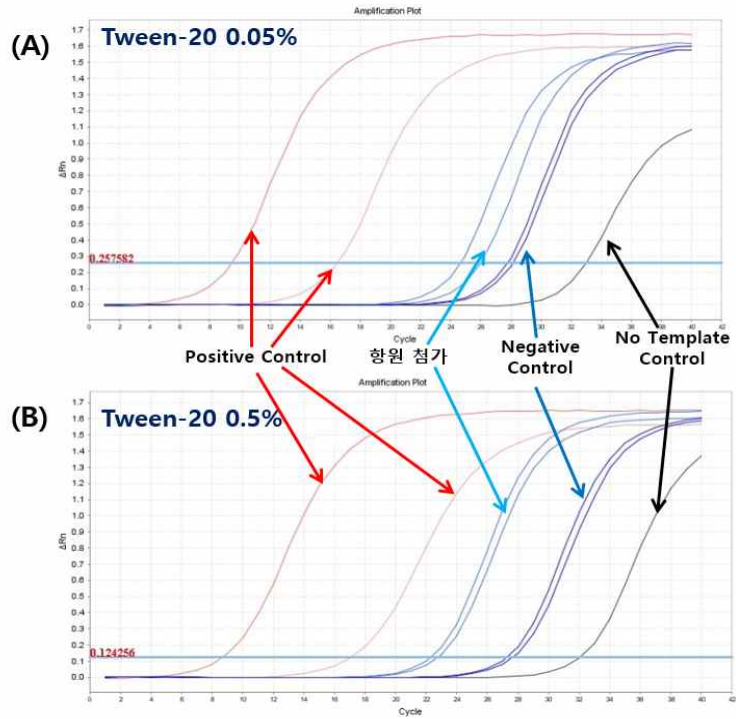
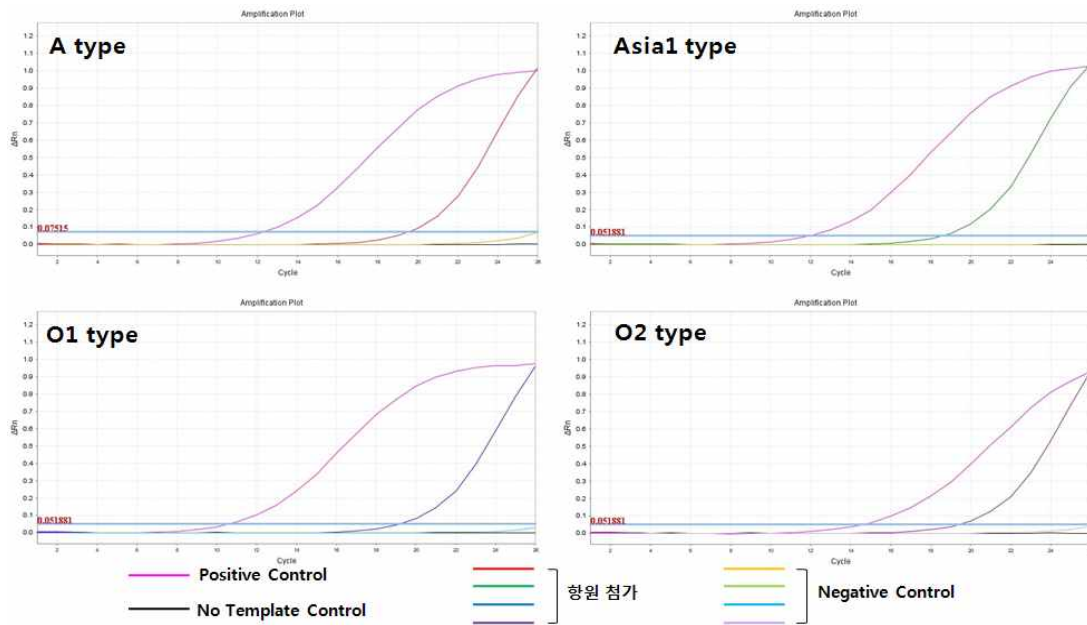


Figure 29. Immuno-PCR washing buffer 내 detergent 함량 변경



	C_T			
	A type	Asia1 type	O1 type	O2 type
Positive Control	12.406	12.009	10.678	19.528
항원	19.668	18.718	19.664	14.667
Negative Control	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined
No Template Control	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined

Figure 30. 최적화된 조건의 Immuno-PCR 수행 결과

4. 간이키트 시그널 증폭 및 반응 최적화

3차원의 DNA 구조체를 구성하여 표지자를 부착할 수 있는 노출된 잔기를 많이 확보하여 항체 외의 기타 detector를 적용함으로써 일반적으로 사용하는 항원-항체 반응보다 감도를 증가시키고자 하였다. 이 방법은 '나노 DNA 구조 기술 (Figure 31)'을 사용하는 것으로 DNA 가닥들이 서로 복잡한 3차원 구조물을 이루도록 디자인하여 합성하고, 각각의 DNA 가닥 말단부위에 이들을 검출할 수 있는 발색 기질을 부착하는 방법으로 발색 signal을 최대화하는 방법을 적용하면 극미량의 항원도 검출할 수 있게 된다. 일반적인 lateral-flow 신속진단 키트와의 차이는 Figure 32과 같다.

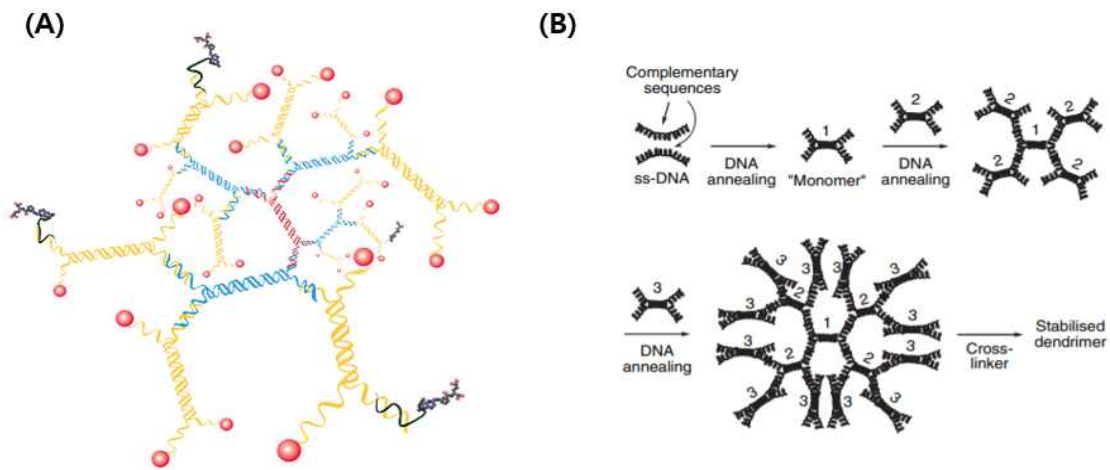
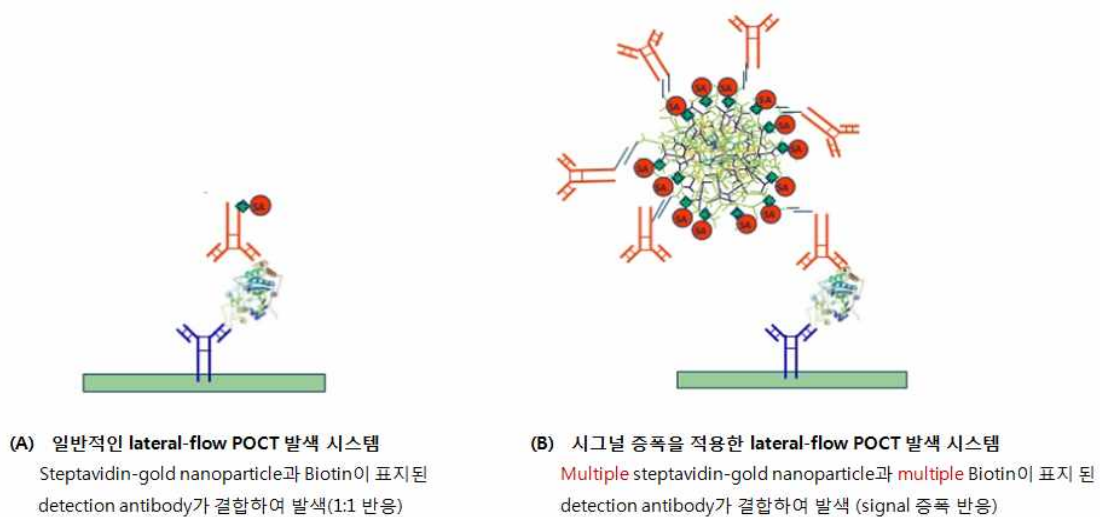


Figure 31. (A) DNA 구조체(Dendrimer) 모식도
(B) Dendrimer 형성 과정



(A) 일반적인 lateral-flow POCT 발색 시스템
Streptavidin-gold nanoparticle과 Biotin이 표지된
detection antibody가 결합하여 발색(1:1 반응)

(B) 시그널 증폭을 적용한 lateral-flow POCT 발색 시스템
Multiple streptavidin-gold nanoparticle과 multiple Biotin이 표지된
detection antibody가 결합하여 발색 (signal 증폭 반응)

Figure 32. 일반적인 lateral-flow POCT 발색 시스템과
시그널 증폭을 적용한 lateral-flow POCT 발색 시스템의 비교

Dendrimer를 형성하기 위한 DNA oligomer는 6개의 single strand를 준비하여 2개의 가닥의 30mer는 상보적으로 결합하고, 양쪽 말단부위는 15mer씩 상보적이지 않은 염기서열을 배열하여 서로 결합하지 않고 두 번째 monomer와 세 번째 monomer의 말단부위와 결합할 수 있도록 디자인하였다. Monomer들의 순차적인 annealing으로 DNA 구조체가 계획대로 구성이 되는지 여부는 전기영동을 통해 DNA 크기가 늘어나는 것으로 간접적인 확인이 가능하다 (Figure 33). Monomer 형성을 위한 annealing 후 전기영동 결과에서 M1C, M2C, M3C는 annealing 전, M1A, M2A, M3A는 annealing 후를 나타내며 annealing 후 size가 증가한 것을 확인할 수 있었다 (Figure 33(A)). 3번의 annealing 과정을 동일하게 3회 진행하였고, 그 결과 3회 모두 동일하게 size가 증가하였으며 MA3와 MA3-1을 동일한 sample을 loading하였다. (Figure 33(B)).

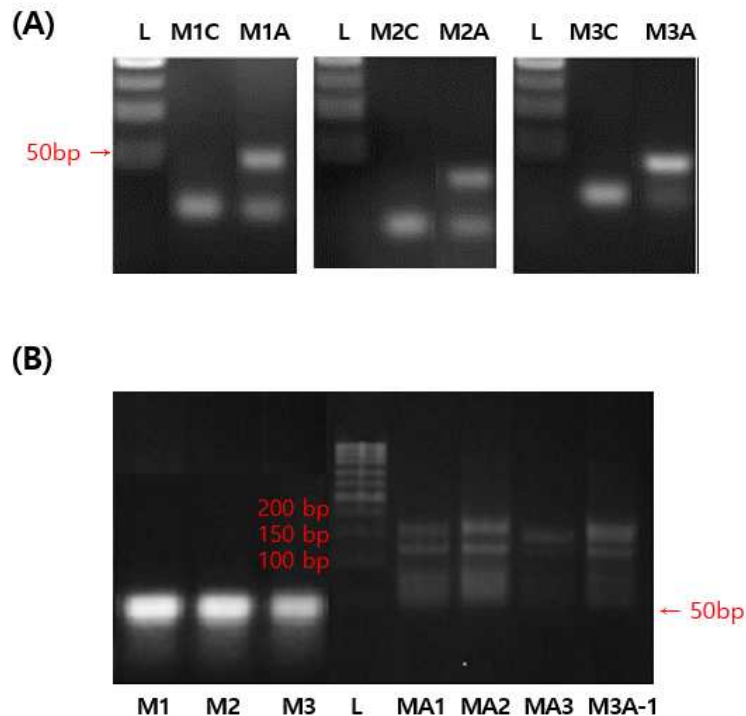


Figure 33. (A) Monomer 형성 결과
(B) Dendrimer 형성 결과

형성된 dendrimer DNA 구조체를 안정화시키기 위해 MOPS 완충액을 사용하는 방법과 UV-cross link 방법을 사용하여 비교하였다. 첫 번째로 MOPS 완충액을 사용한 결과, 완전한 구조 (monomers 의 불완전한 결합체, 또는 single stranded DNA의 부분 결합체)는 MOPS 버퍼 방치 후 다시 heating / annealing 을 반복했을 때 어느 정도 제거되고, 비교적 안정적인 구조체만 남아있는 것으로 추정할 수 있다 (Figure 34(A)). UV-crosslink는 전통적인 DNA fixing 방법으로 dendrimer 시료에 UV를 10분 동안 조사한 후 heating / annealing 을 반복한 결과 MOPS method에 비해 DNA가 비특이적으로 잘려서 band가 번져 보이는 현상을 나타내었다 (Figure 34(B)). 결론적으로 UV crosslink method는 안정화

방법으로 적절하지 않다고 판단하였으며, DNA 구조체는 MOPS method를 이용하여 안정화시켰다. Dendrimer DNA 구조체는 3차원적인 투사구조까지 확인하지는 못하였으나 각 monomer들의 구조체가 만들어지고, 안정적으로 유지되는 부분은 간접적인 실험의 결과들을 통해 확인하였다. monomer complex인 dendrimer 구조체는 여전히 반응에 참여할 수 있는 비결합 상태의 single stranded oligo 부분이 노출되어 있는 상태이고, 여기에 구조역 각 혈청형별 항체와 biotin을 레이블하여 lateral flow assay 적용 시 gold-particle과 결합할 수 있도록 하였다.

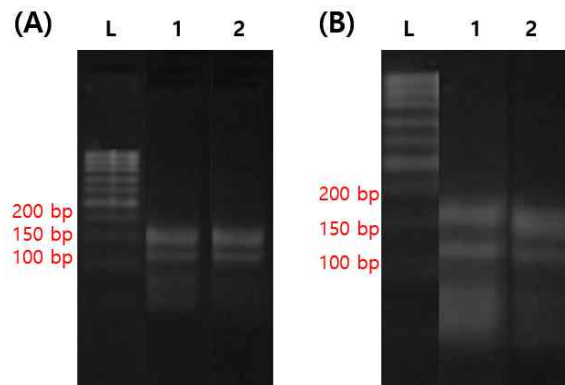


Figure 34. DNA 구조체 안정화 방법 비교

- (A) MOPS method : L-ladder, 1-MOPS buffer 처리한 dendrimer
2-MOPS buffer 처리 후 heating annealing test
- (B) UV-crosslink method : L-ladder, 1-dendrimer,
2-UV 조사 후 heating-annealing test

dendrimer DNA 구조체와 결합할 수 있도록 dendrimer의 비결합 상태의 single strand oligo 부분과 상보적인 oligomer를 항체에 레이블링하였다. oligomer와 항체의 레이블링은 immuno-PCR에서 제작한 Oligo conjugate와 동일한 방법으로 수행하여 oligo-conjugated antibody를 획득하였다. 획득한 oligo-conjugated antibody와 Biotin dendrimer complex와 hybridization하여 최종 DNA 구조체를 생성하였다.

생성한 DNA 구조체의 biotin과 streptavidin-gold particles의 biotin-avidin 결합으로 dendrimer-gold particles complex를 제작하였으며, 간이키트에 적용하여 최적화 과정을 진행하였다. 일반적인 POCT strip 구조에서 dendrimer-gold particles complex의 전개 정도를 테스트하기 위해 streptavidin-gold particles를 filter에 도포하였고, 이 complex가 최종 흡수패드까지 전개가 되는지 확인한 결과, Gold particles pad에서 흡수패드까지 전개 방향 및 gold particles 양에 이상이 없음을 확인하였다 (Figure 35). 항체 1 μg 에 대한 Gold particles의 농도 및 양을 최적화하기 위해 0.3 cm x 0.3 cm filter 당 250 μL ~ 1000 μL 까지 테스트한 결과 dendrimer-gold particles complex의 양과 감도에 차이가 거의 없는 것으로 확인되었으며, 이것은 250 μL 도 거의 포화량으로 추정할 수 있다 (Figure 36).

Dendrimer-gold particles complex를 사용하여 POCT 키트를 제작하였고 (Figure

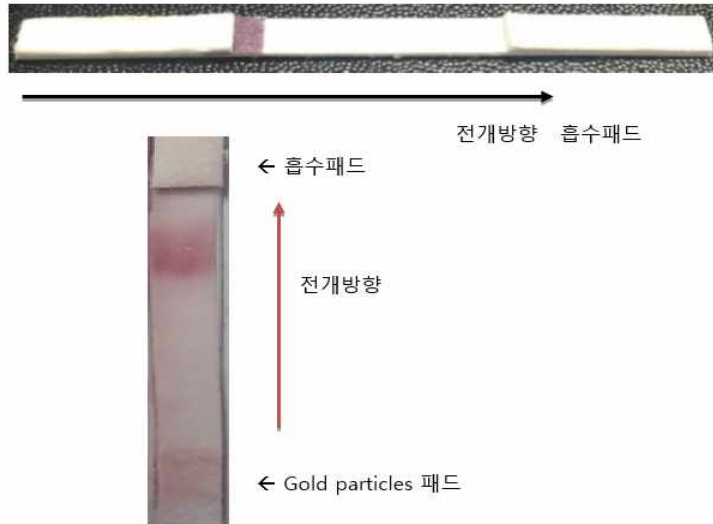


Figure 35. dendrimer-gold particles complex의 적용

37), 합성항원 4가지 타입에 대해 제작한 POCT 키트를 테스트 하였다. 그 결과 제조항원의 검출은 각 혈청형 별 키트에 양성 반응을 나타내었다 (Figure 38).

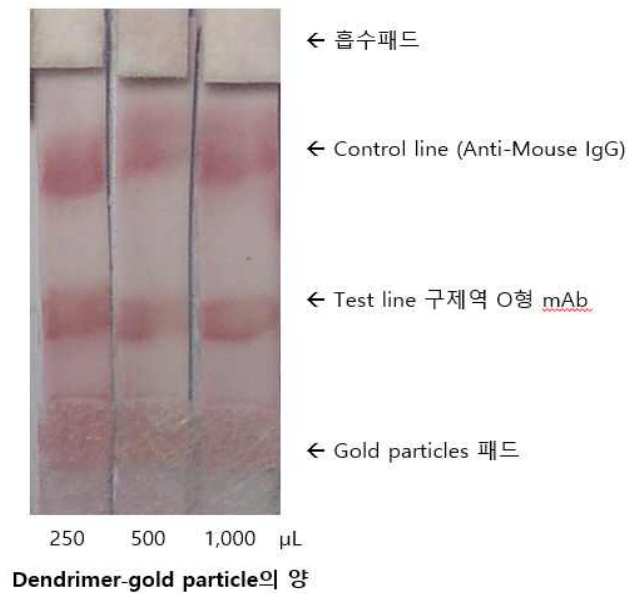


Figure 36. Dendrimer-gold particles complex 최적화

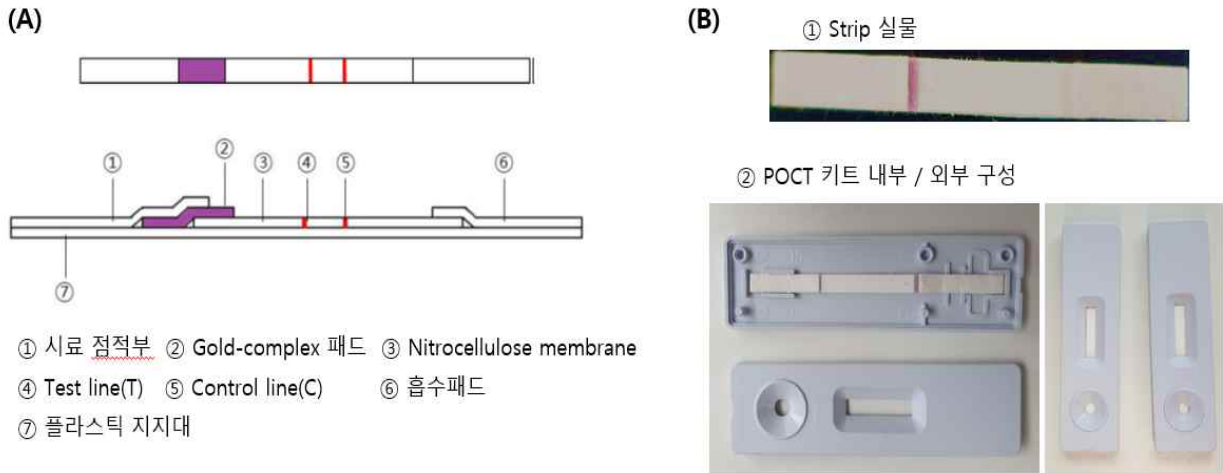


Figure 37. (A) POCT 키트 모식도, (B) POCT 키트 실물



Figure 38. 합성항원에 대한 POCT 키트 반응성

5. Immuno-PCR kit 성능 시험

최종 개발목표의 성능을 충족하는지 확인하기 위하여 자체 내부성능시험 및 외부 성능시험을 진행하였다. 시험 결과 내부성능시험 결과와 외부성능시험 결과가 크게 다르지 않았다.

가. 판독 가능한 혈청형 : 타입별 96-well plate에 항원 시료 반응을 확인하여 혈청형의 구분이 가능한지 확인하였다. 동일한 농도의 4가지 항원을 반응시켰을 때, 동일 타입의 항원과 다른 타입의 항원의 C_T 값이 1이상 차이를 확인할 수 있었으며, 판독이 가

능하다고 볼 수 있다. 다만, O1 type와 O2 type의 Kit의 경우, A type과 Asia1 type의 항원에 대하여 C_T 값 차이로 인한 판독은 가능하지만, O1 type과 O2 type의 항원의 C_T 값이 1미만으로 판독이 불가능한 것으로 판단된다. 결론적으로 A type, Asia1 type, O(O1+O2) type의 각 type별 kit를 통해 A type, Asia1 type, O(O1+O2) type 항원의 판별이 가능한 것으로 판단된다.

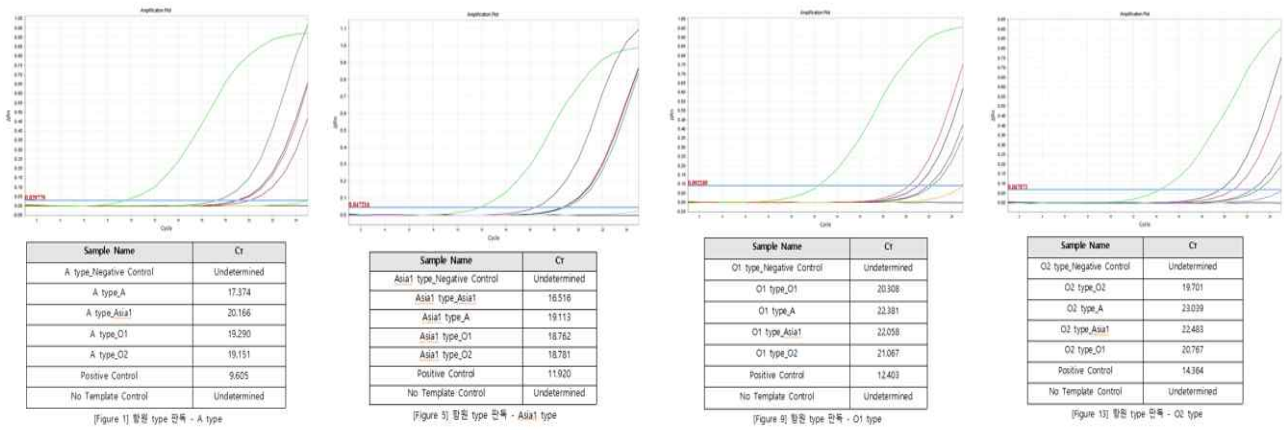


Figure 39. 내부성능시험 - 판독 가능한 혈청형

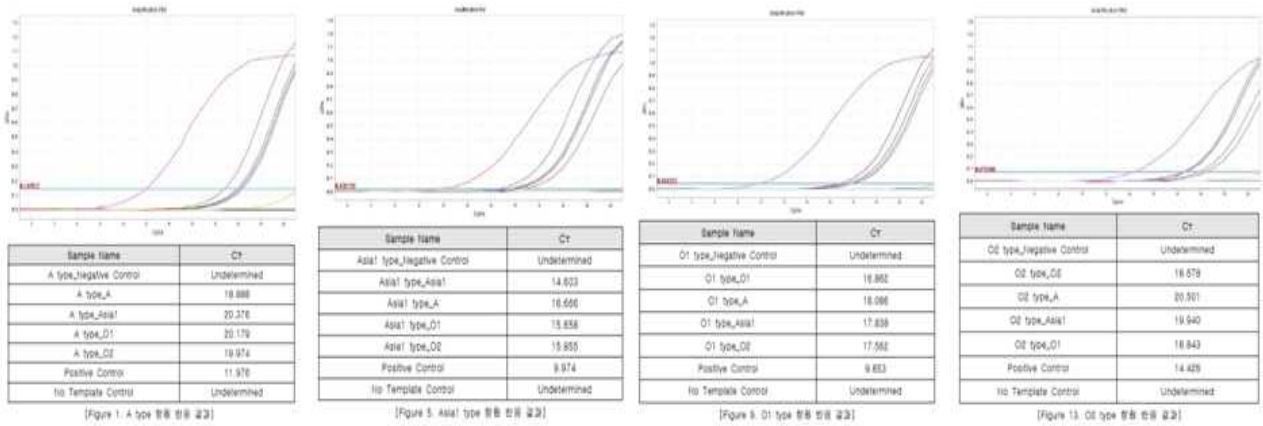


Figure 40. 외부성능시험 - 판독 가능한 혈청형

나. 정확성 : 타입별 96-well plate에 단일 시료로 10회 수행하여 결과를 확인하였다. 동일한 시료를 10개의 well에 항원으로서 반응 시킨 결과 4 type의 Kit 모두 C_T 값의 차이가 “중간값 ± 0.5 “ 이내의 결과로 분석되었으며, 이는 각 type 별 kit의 정확성이 확보된 것으로 판단된다.

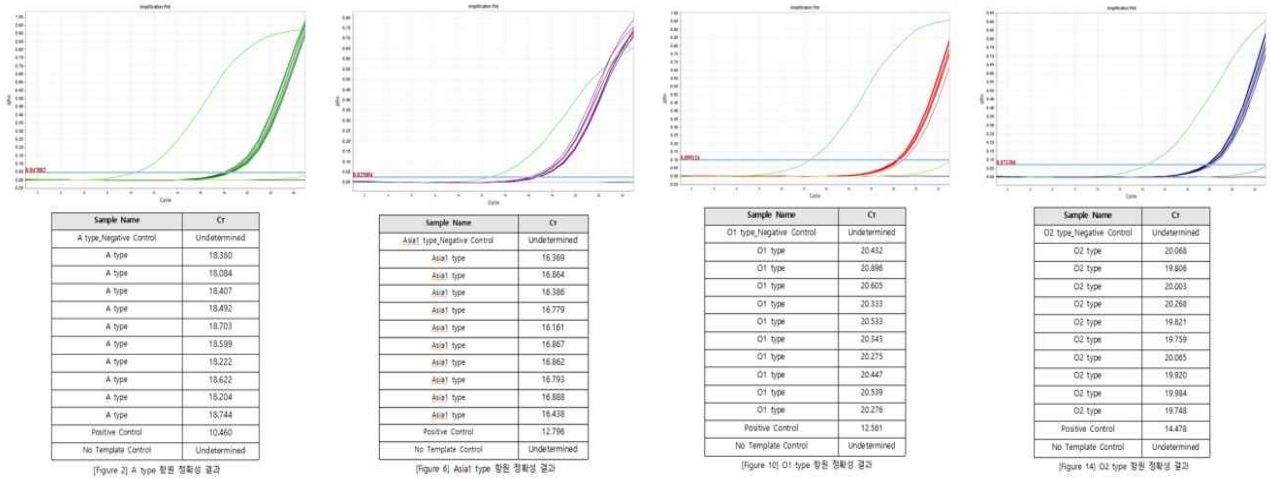


Figure 41. 내부성능시험 - 정확성

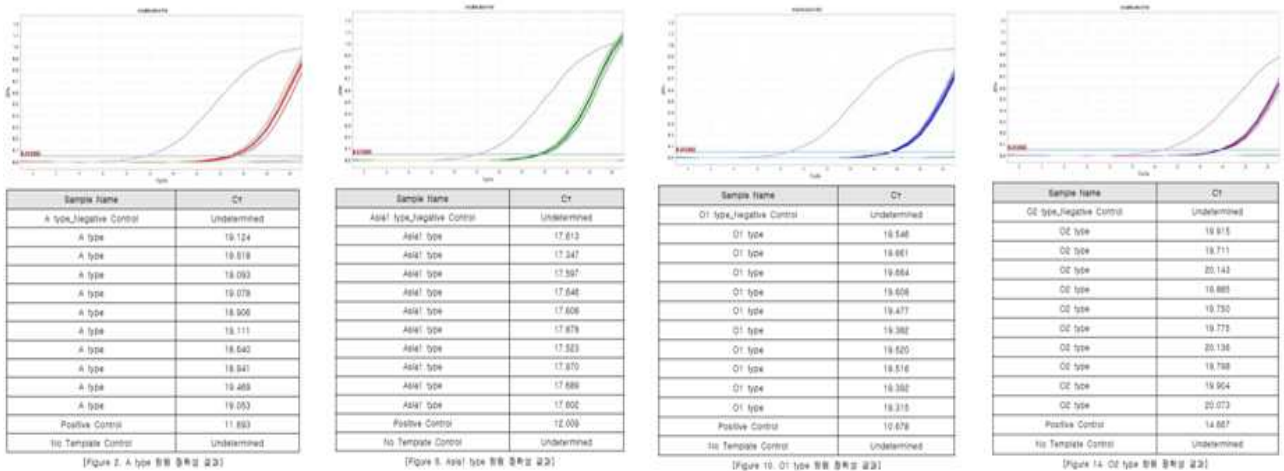


Figure 42. 외부성능시험 - 정확성

다. 정밀도(검출감도) : 1 ng/mL - 10,000 ng/mL 의 시료를 사용하여 타입별 96-well plate 의의 최저한계를 확인하였다. 최저한계를 판단하기 위하여 1 ng/mL, 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 500 ng/mL, 1,000 ng/mL, 5,000 ng/mL, 10,000 ng/mL의 농도로 시험을 진행한 결과 type에 따라서 약간씩 달랐으나 25 ng/mL에서 100 ng/mL사이에서 최저검출감도를 나타내었다. 따라서 최소 1 nM (25 ng/mL)에서 최대 4nM 사이의 농도만으로도 유의미한 검출 및 분석이 가능하므로, 미량 검체로도 분석이 가능하다고 판단된다.

- (1) A type : 25 ng/mL (약 1 nM)
- (2) Asial type : 25 ng/mL (약 1 nM)
- (3) O1 type : 25 ng/mL (약 1 nM, 내부), 50 ng/mL (약 2 nM, 외부)
- (4) O2 type : 100 ng/mL (약 4 nM)

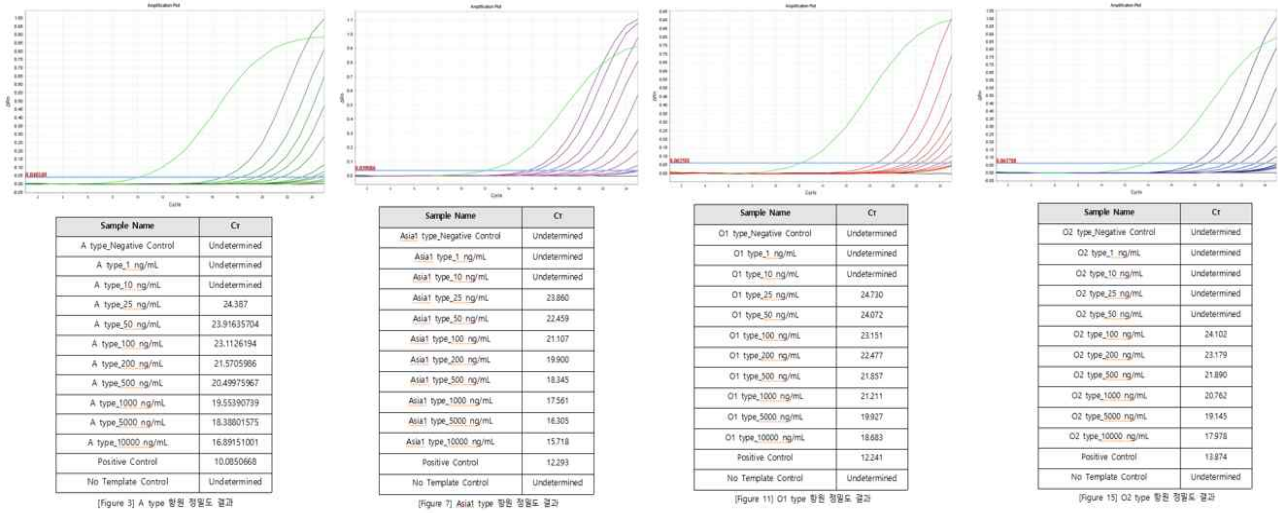


Figure 43. 내부성능시험 - 정밀도

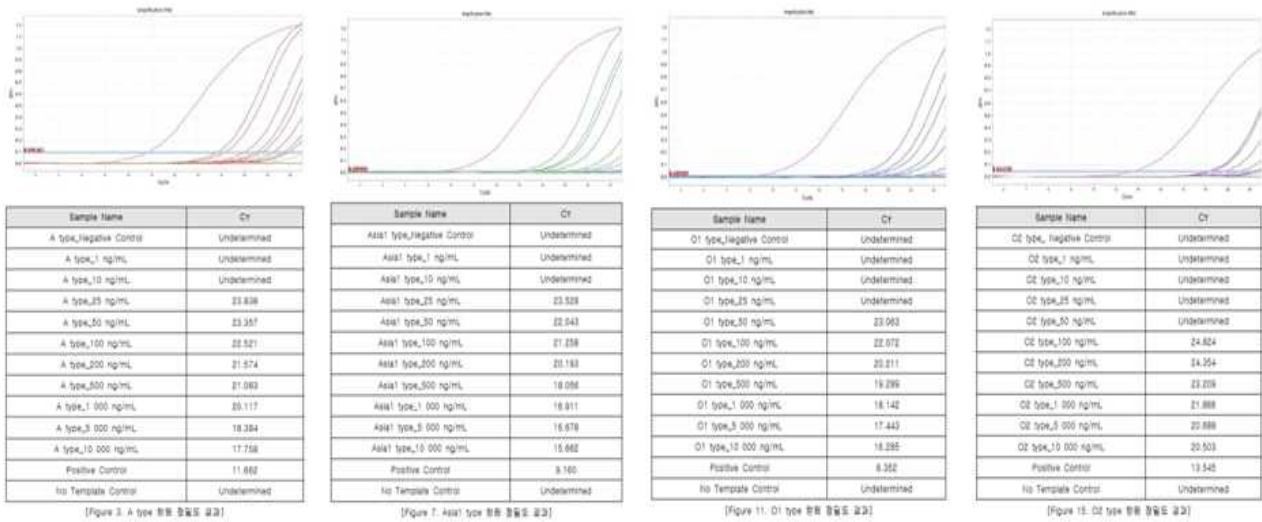


Figure 44. 외부성능시험 - 정밀도

라. 재현성 : 타입별 96-well plate에 미지의 시료 10개를 3회 처리하는 실험을 다른 연구원이 수행하여 동일한 결과를 나타내는지 확인하였다. 각 type의 Kit에 10개의 시료를 3회 반복 실험을 진행한 결과, Ct 값의 차이가 “중간값 ± 0.5” 범위를 만족하고, 모두 동일한 증폭 패턴을 나타내는 것이 확인되었다. 재현성의 경우 모든 sample이 같은 패턴을 나타냄을 확인하는 것이므로 3회 수행시 동일한 패턴을 나타낸 것으로 볼 때 재현성이 확보되었다고 판단된다.

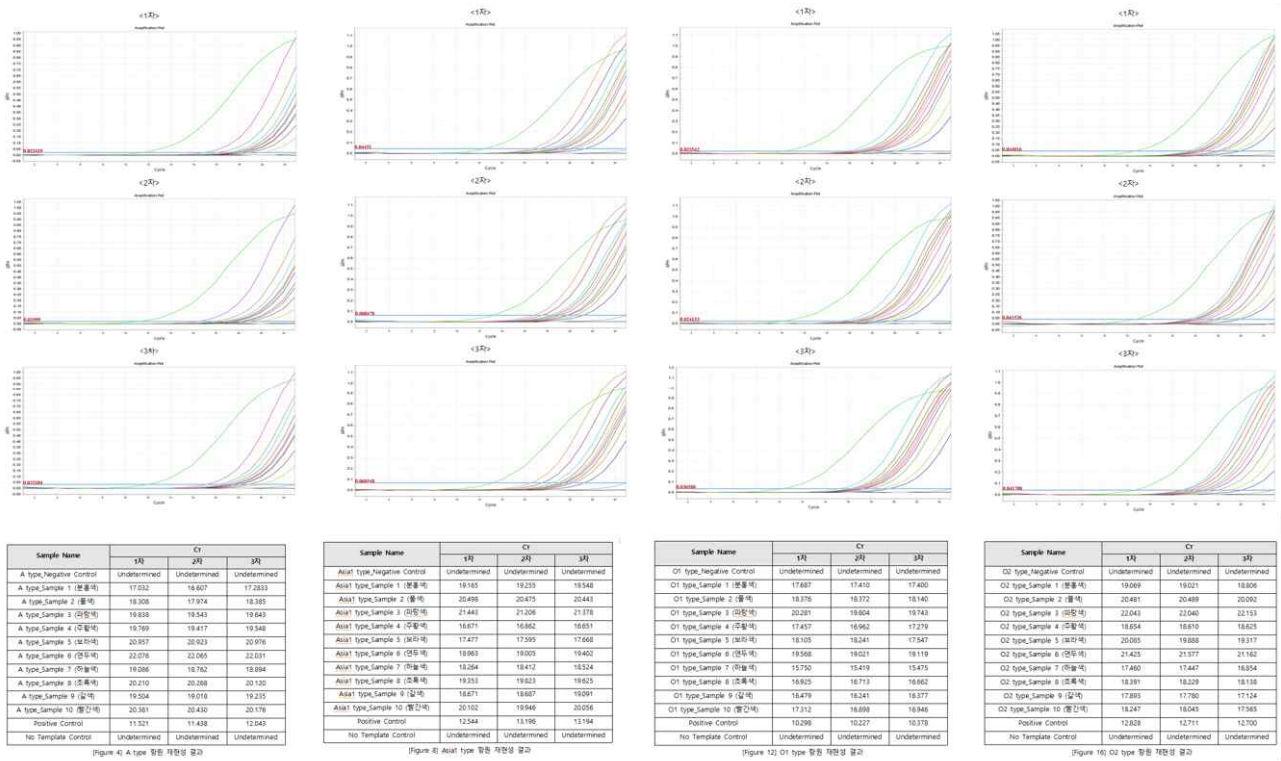


Figure 45. 내부성능시험 - 재현성

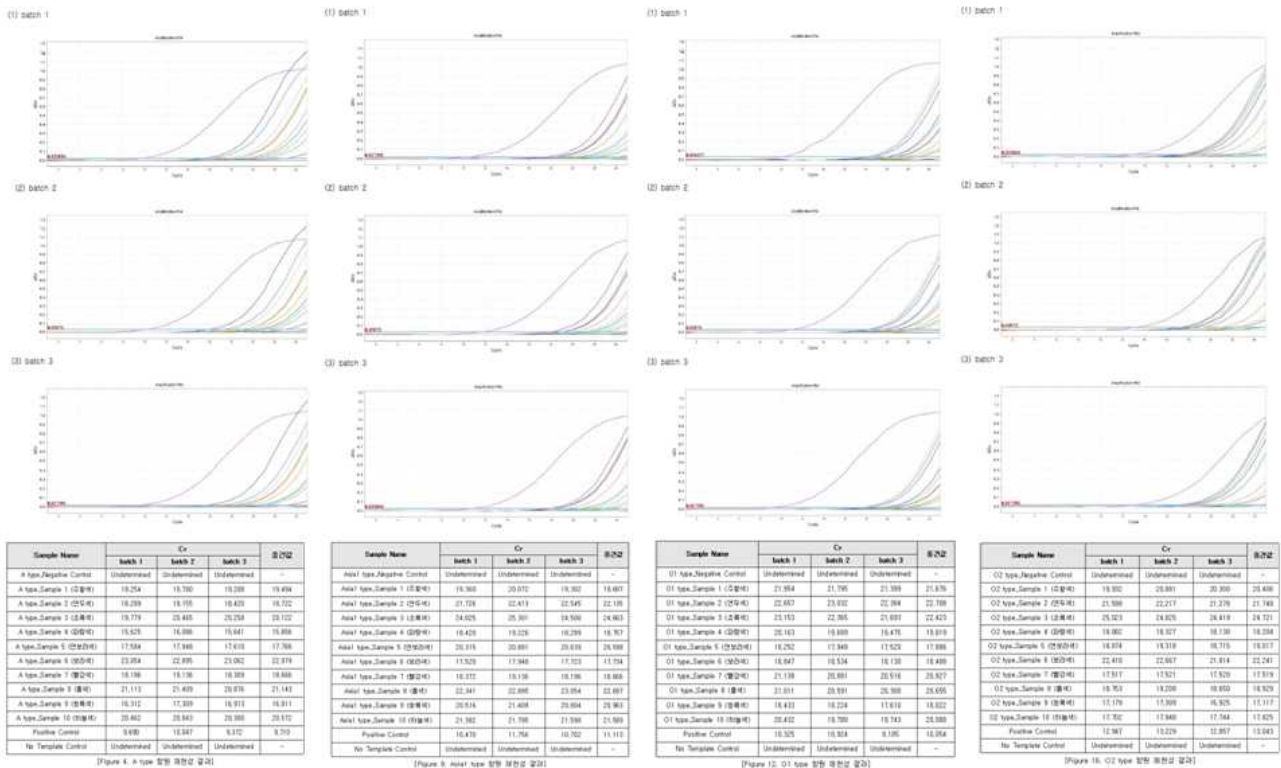


Figure 46. 외부성능시험 - 재현성

주요 성능지표	단 위	최종 개발목표	성능평가 결과	달성도 (%)
판독 가능한 혈청형	개수	3개 이상	3개	100
정확성	횟수	100%	100%	100
정밀도 (검출감도)	copies, moles	10 copies 이하, nM 이하	1-4 nM	100
재현성	횟수	시료 10개, 3회 반복	시료 10개, 3회 반복 시 동일 패턴 나타남	100

제 4 절 향후 연구 계획

1. Immuno-PCR 정밀 최적화

가. Immuno-PCR 혈청형 판독능 증가

- (1) 항체 재선별 또는 재제작 : 타입별 항원에 더 특이성이 있는 항체 획득 가능
- (2) 특이성이 증가한 항체 이용하여 immuno-PCR 최적화 진행 시 혈청형 판독능은 증가할 것으로 예상

나. Immuno-PCR 검출감도 증가

- (1) Antibody conjugate 농도 및 분주량의 미세 조정
- (2) 단계별 최적의 반응 시간 조정

다. Washing 단계 효율 증가

- (1) 비특이적인 증폭 감소
- (2) washing 단계에서 시료 내 미량 항원의 손실 감소

2. 시제품 제작 및 성능시험

가. 내부 성능시험

- (1) 보유 재조합 항원으로 외부성능시험과 항원 외 기준 동일하게 하여 자체 내부 성능 시험 진행
- (2) 상업화된 키트와 비교 실험

나. 외부 성능시험 : 구제역 바이러스 취급 가능한 기관과 협의 후 의뢰

제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제 1 절 목표달성도

1. 최종 성과목표 및 평가 방법

가. Immuno-PCR 최적화 : Antibody-magnetic particles conjugate, antibody-oligo conjugate를 이용하여 immuno-PCR 기술에 적용, immune reaction 최적화, real-time PCR 최적화

나. Immuno-PCR을 적용한 구제역 진단 키트 개발 : 최적화된 immuno-PCR 조건으로 구제역 진단 키트 개발 및 최적화, Immuno-PCR 키트 시제품 제작

다. 항체-핵산 결합물을 적용한 lateral flow 방식 신속진단키트 개발 : DNA 구조체 제작, DNA 구조체-항체-gold particles complex 형성, DNA 구조체-항체-gold particles complex를 적용한 POCT 키트 최적화, POCT 키트 시제품 제작

2. 연차별 성과 목표 달성도

구분 (연도)	세부 과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1차 년도 (2017)	세부 과제 구분 없음	구제역 혈청형 별 항원 제조	• 구제역 항원별 재조합 항원 제조	100
		재조합 항원의 정제	• 단항체 /다항체 제조를 위한 재조합 항원의 과발현 및 정제 수행	100
		다클론 항체 제작	• rabbit polyclonal Ab 제작	100
		단클론 항체 제작	• mouse monoclonal Ab 제작	100
		제조항체의 테스트 (역가 평가)	• epitope mapping 및 항체 역가 테스트	100
2차 년도 (2018)	세부 과제 구분 없음	항체 레이블링 및 반응성 시험	• 다클론 항체에 마그네틱 파티클 레이블링	100
			• Immuno-PCR 적용을 위해 단클론항체에 핵산 레이블링	100
		항원-항체 반응 최적화	• 항원-항체 농도, 양 설정	100
			• plate 포맷 테스트	80
		PCR증폭 반응 테스트 및 반응조건 최적화	• 증폭 테스트	100
			• PCR mixture 및 증폭 조건 최적화	90
		간이키트 시그널 증폭 및 반응 최적화	• DNA 구조체 제작 및 DNA 구조체-항체-gold particles complex 제작	100
• POCT 타입 포맷 테스트	100			
• POCT 키트 조건 최적화	90			
3차 년도 (2019)	세부 과제 구분 없음	Pilot type 시작품 제조	• 96-well plate Immuno-PCR kit	100
			• POCT 타입 키트	100
		내부 성능 시험	• 성능지표를 기준으로 시험	100
		외부 성능 시험	• 구제역 검사가 가능한 공인기관 또는 국가지정 검사실에 제품의 성능 시험 의뢰	70

3. 진단 키트 시작품 제작

가. FMDV Ag I-PCR 진단 키트 : Immuno-PCR 기술 적용

번호	명칭	세부 구성	용량	수량
1	96-well plate	1. 8wells*12 strip/장 2. 무색 평면 바닥 형태의 Polysterene plate		1
2	10X 세척액 (10X Washing Buffer)		120 mL	1
3	희석액 (Dilution Buffer)		100 mL	1
4	MP Conjugate Solution (10X)	Antibody-Magnetic particles Conjugate	0.5 mL	1
5	Oligo Conjugate Solution (10X)	Antibody-Oligo Conjugate	1 mL	1
6	양성대조액 (Positive Control)		0.5 mL	1
7	음성대조액 (Negative Control)		0.5 mL	1
8	DNase&RNase Free Water	500/7500 Fast Real-Time PCR System	15 mL	2
9	IP PreMix Taq (2X)	SYBR green	1 mL	1
10	ROX Reference Dye		50 μ L	1
11	Primer Mix	5 μ M	100 μ L	1
12	8-Strip PCR tube&Cap	8wells*15 strip		1
13	Plate 밀봉 테이프	무색 투명한 Polyester 접착 테이프		2

나. FMDV Ag Rapid Kit : DNA 구조체 적용 POCT

번호	명칭	용량	수량
1	FMDV Ag 검사 디바이스		10
2	희석액 (Dilution Buffer)	10 mL	1
3	Test tube		10
4	검체 채취용 면봉		10
5	드롭퍼 (Dropper)		10



4. Immuno-PCR 진단 키트 외부 성능평가 완료

가. 성능 평가 기관 : (주)크라운진

나. 시험 목적 : FMDV I-PCR Kit 제품평가

주요 성능지표	단 위	최종 개발목표	성능평가 결과	달성도 (%)
판독 가능한 혈청형	개수	3개 이상	3개	100
정확성	횟수	100%	100%	100
정밀도 (검출감도)	copies, moles	10 copies 이하, nM 이하	1-4 nM	100
재현성	횟수	시료 10개, 3회 반복	시료 10개, 3회 반복 시 동일 패턴 나타남	100

제품평가 시험성적서

작성일 : 2019년 04월 22일

	출	작성	검토	승인
시험명	[한국과학기술연구원(국립) - 동북대학교 시험성적서]	발사일자	2019. 04. 05. ~ 2019. 04. 18.	
시험대상	FMDV 1-PCR kit	의 료 기	(국립)중앙동물위생연구소	
시험목적	(FMDV)신종형질감염주조사용 FMDV 1-PCR kit의 정확도평가			
결 과	시험항목	단위	결과내용	
	양성률 (%)	26%	(FMDV 19-946) 26/26 (100%) 양성 시료 26건 확인	
	정확도 (%)	100%	(FMDV 19-946) 26/26 (100%) 26건 시료 100% 양성	
	검출 한도	1.0E+07	1 ng/mL ~ 10000 ng/mL 의 시료에 (FMDV 19-946) 100% 검출(100% 민감도) 확인 (1 ng/mL, 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 500 ng/mL, 1000 ng/mL, 5000 ng/mL, 10000 ng/mL)	
참 조 내 역	시험항목	단위	결과내용	
	양성률 (%)	0%	(FMDV 19-946) 0/0 (0%) 0건 시료 0% 양성	
	정확도 (%)	100%	(FMDV 19-946) 0/0 (100%) 0건 시료 0% 양성	
	검출 한도	1.0E+07	(FMDV 19-946) 0/0 (100%) 0건 시료 0% 양성	

국립 중앙 동물 위생 연구소 제품평가 시험성적서

크 라 음 진

제 K1529호 (1/1)

국제공인시험기관인증서

기 관 명 : (주)케이엘지
 사업 장소 개 설 : 서울특별시 강남구 테헤란로 24, 13층 (100047우산동)
 법인 등록 번호 : 110411-043423
 사업자등록번호 : 11184048179
 최초 인증 일자 : 2012년 7월 17일
 유효 기 간 : 2019년 7월 17일 ~ 2020년 7월 16일
 인증분야 및 범위 : 정밀 검사

상기 시험기관을 국가표준기관법 제23조 및 KS-Q ISO/IEC 17025 인증요건에 따라 국제공인시험기관으로 인정합니다. 또한 ISO-ILAC-IAP 공동인증(ILAC)에 인증된 바우 같이 인정된 분야 및 범위에 대한 기술적 능력과 시험기관 품질경영시스템이 적절함을 인정합니다.

2019년 04월 22일

한국인정기구

5. 특허 출원

가. 이유노 중합효소연쇄반응 기법을 이용한 구제역 바이러스 진단법 및 진단키트 (특허 출원번호 : 10-2019-0123148)

나. DNA 구조체를 적용한 간이 키트 (특허 출원번호 : 10-2019-0130169)

관인생략
출원번호통지서

출원 일자 2019.10.04
 특허사실 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2019-0123148 (출원번호 1-1-2019-1013984-17)
 출원인명칭 주식회사 (주)중앙동물위생연구소(1-2014-002593-6)
 대리인명칭 특허법인대동(9-2008-100001-5)
 발명자명칭 황승훈 이경민
 발명의명칭 이유노 중합효소연쇄반응 기법을 이용한 구제역 바이러스 진단법 및 진단키트

특 허 청 장

<<안내>>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 0131(가정번호) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허청국민청문장변경(경청), 변경신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허청(patent.go.kr) 검색 - 민원서비스도움말 - 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내 출원일을 외국에서 인정받으려는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 제도 정보 : <http://www.kipo.go.kr/특허/외국PCT/외국제도>
 ※ 우선권 포기기간 : 특허 출원일로부터 12개월, 상표 디자인은 6개월 이내
 ※ 외국특허상호인정 : 상호인정 기조로 우리나라에 우선권주장할 수 시, 상호인정 기조가 없더라도, 우선권일로부터 18개월 이내에 외국특허청으로부터 [전자특허청문장(PCT/ISB)]을 제출하거나 우리나라에 우선권주장 서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 어떤과 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 ※ 특허출원 10-2016-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 출원인이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제63조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

관인생략
출원번호통지서

출원 일자 2019.10.18
 특허사실 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2019-0130169 (출원번호 1-1-2019-1067142-61)
 출원인명칭 주식회사 다우진위생연구원(1-2014-002593-6)
 대리인명칭 특허법인대동(9-2008-100001-5)
 발명자명칭 황승훈 이경민
 발명의명칭 DNA 구조체를 적용한 간이 키트

특 허 청 장

<<안내>>

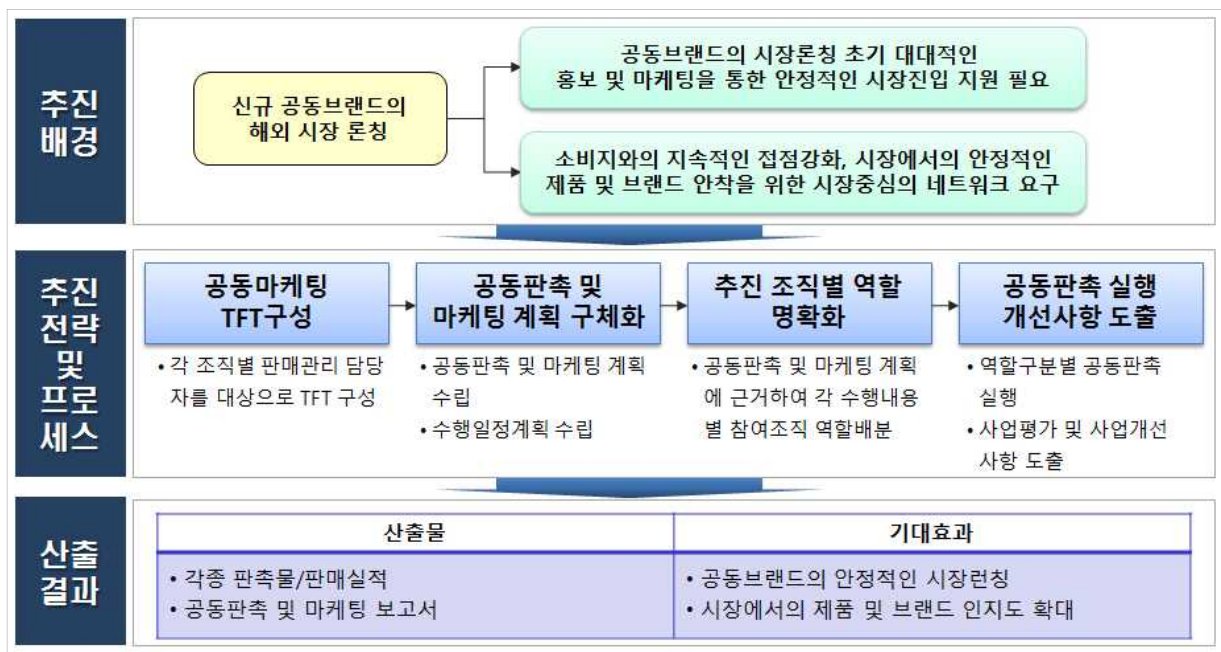
1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 0131(가정번호) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허청국민청문장변경(경청), 변경신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허청(patent.go.kr) 검색 - 민원서비스도움말 - 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받으려는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 제도 정보 : <http://www.kipo.go.kr/특허/외국PCT/외국제도>
 ※ 우선권 포기기간 : 특허 출원일로부터 12개월, 상표 디자인은 6개월 이내
 ※ 외국특허상호인정 : 상호인정 기조로 우리나라에 우선권주장할 수 시, 상호인정 기조가 없더라도, 우선권일로부터 18개월 이내에 외국특허청으로부터 [전자특허청문장(PCT/ISB)]을 제출하거나 우리나라에 우선권주장 서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 어떤과 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 ※ 특허출원 10-2016-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 출원인이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제63조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

제 2 절 관련분야 기여도

1. 나노기술을 접목한 신속진단 키트의 개발이 성공적으로 완료되면 축산농가에서 손쉽게 저렴한 가격으로 의심축 검사가 가능해지고, 정확한 조기진단이 가능하게 되므로 구제역과 같은 전염성 바이러스의 확산을 방지하는 요소기술로 활용 가능
2. 본 연구 과정에서 활용할 기술은 면역, 분자진단에 나노기술이 접목된 것으로 BT와 NT가 융합된 연구의 좋은 예가 될 것임
3. 향후 높은 민감도, 특이도, 재현성을 구현할 수 있는 biochip의 개발이 쉬워지며, 따라서 biochip 연구, 개발에 새로운 기술의 도입으로 차세대 biochip의 기술개발의 발판을 마련할 것이며, bio-mems 기술을 이용한 차세대 biochip (Lab-on-a-chip) 개발에 주요 역할 가능
4. 새로운 시장 창출: 항원-항체 면역반응 원리를 기반으로 하여 PCR 방법을 융합, 기존의 검출 감도보다 증가한 고감도 진단제품이므로 새로운 진단시장 개척 가능

제 5 장 연구결과의 활용 계획

1. 효소면역검사와 중합효소연쇄반응의 장점을 활용한 Immuno-PCR방법을 감염성 바이러스 진단에 적용하기 위한 본 과제 목적이 성공하게 되면 AI나 기타 전염성 동물 질환 및 암 진단 등에도 본 과제의 고감도 진단 방법을 적용하여 조기진단에 활용 가능
 - 가. 바이러스 조기 검출 및 고감도 검출 성능 확인한 후, 특허출원 및 등록 진행 예정
 - 나. 보유 기술을 사용한 진단키트 제품화
 - (1) 구제역 바이러스 진단 키트 제품화
 - (가) 혈청형별 Immuno-PCR 진단 키트
 - (나) 혈청형별 DNA 구조체 적용 POCT 간이 신속진단 키트
 - (2) 조기 진단이 필요한 바이러스성 질병 적용 및 진단 키트 제품화
 - (가) 미량 시료 검출 가능
 - (나) 조기 진단을 통해 질병의 확산 방지
 - (3) 암 진단 적용 및 진단 키트 제품화
 - (가) 혈액 속에서 암을 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 기술로 개발하여 암의 조기진단 및 개인별 맞춤 치료에 활용가능
 - (나) 미량의 암세포 조기 발견에 의한 암 진단 및 치료 효과 상승
 - (4) 산업화를 위해 제품 출시 후 국내 동물약품회사를 통하여 농가에 보급될 수 있도록 추진할 계획
 - 다. 특허 출원 등 개발기술의 독창성을 인정받아 독점 개발권을 보유하고 부가가치를 높여 매출증대 예정
 - 라. 국내뿐만 아니라 구제역 발생이 빈번한 중국, 베트남 등 해외 수출 판매 추진






2. 사업화 전략

가. 제품홍보전략

- (1) 제품브랜드의 시장 론칭 초기 온라인 및 오프라인 홍보 및 마케팅을 통해 안정적인 시장 진입
- (2) 지속적인 홍보와 마케팅을 통해 개발제품과 브랜드 시장 인식 강화
- (3) TFT 구성을 통해 영업 조직 역량 강화 및 홍보관측 실행
- (4) 제품 홍보 및 마케팅은 학회, BIO 박람회 및 해외박람회 참가 등 다양한 방법을 통해 실행하고, 외부 전문 마케팅기관과 협업을 통한 제품마케팅 강화

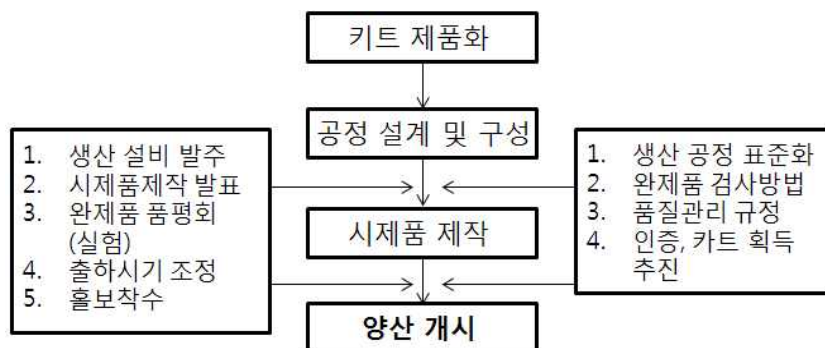
나. 신뢰성 (Reliability) 인증 확보 계획

- (1) 특허보호 및 차기제품의 연속적인 개발을 통해 지적 재산을 확보함으로써 다음 개발품이 나올 때까지 법적인 안전망 안에서 시장 주도적인 역할을 함과 동시에 국내 시판을 위해 동물 질병진단 제품 허가를 진행 할 예정이며, 이와 관련하여 GMP/ISO13485 인증을 병행하여 제조공정 및 제품 품질관리에 대한 scheme을 구축하고 체계적인 제품 품질관리 방안을 마련할 것임.
- (2) 국내인증 및 해외인증 확보

<ul style="list-style-type: none"> ■ ISO13485 - 의료기기 및 관련서비스를 제공하는 조직의 시스템에 대한 요구사항을 적용 함으로서, 조직의 신뢰성이나 능력을 평가 받음. 	
<ul style="list-style-type: none"> ■ GMP - 의료기기의 설계, 개발, 생산, 설치 및 서비스를 제공함에 있어 적용되는 품질경영시스템의 요구사항을 적용 	
<ul style="list-style-type: none"> ■ 국외 성능 인증 마크 취득 - 제품 또는 제조자가 EC 이사회관련 규정 및 관련되는 모든 지침에 부합 심사 - 안전, 건강 그리고 소비자의 보호와 관련된 규정 준수 	

다. 제품화 이후의 양산 계획

- (1) 구제역 고감도 진단이 가능한 정밀진단키트 (Immuno-PCR kit)의 기본 기술 개발을 완료 후 제품화 작업, 제품 상용화 단계를 동시 진행 할 예정
- (2) 제품에 대한 외부 검증기관의 민감성, 안정성, 재현성, 정확도 등 성능확인을 거친



후 제품 양산 추진 예정

- (3) 특허 출원 등 개발기술의 독창성을 인정받아 독점 개발권을 보유하고 부가가치를 높여 매출 증대 계획

라. 제품의 마케팅

- (1) 특허 출원 등 개발기술의 독창성을 인정받아 독점 개발권을 보유하고 부가가치를 높여 매출 증대 효과 기대
- (2) 다우진 유전자연구소는 KOLAS 국제공인 시험기관 인정과 14년 연속 보건복지부 산하 한국유전자검사평가원으로부터 A등급 검사기관 인정을 받은 국내최고의 유전자 감식관련 검사 기관
- (3) ISO 17025 시험품질 경영 시스템을 도입하여 시험업무의 품질 정도관리에 선도적인 기업
- (4) 또한 2006년부터 경찰청 유전자감식 위탁기관 및 국방부 유전자감식 위탁기관, 법원 유전자감정 촉탁 기관 등 선정되어 유전자감식 관련 검사서비스를 수행하고 있으며, 온라인 및 오프라인 네트워크를 구성하여 제품판매 및 유전자검사 서비스 업무를 수행 중
- (5) 이러한 제품판매 및 유전자검사 서비스 시스템을 활용하여 제품개발 완료시 기존의 on-off line의 영업망을 활용하여 제품판매를 확대할 것이며, 국내 및 해외시장 마케팅을 병행하여 제품의 매출 증대 기대
- (6) 국내에서 개발, 상용 중인 구제역 진단키트는 RT-PCR kit, ELISA kit, 현장 간이 신속진단 키트가 있음. 이들 제품은 종래의 일반적인 진단방법을 적용한 제품들이므로 본 과제가 성공적으로 수행되어 기존의 제품 대비 100~1,000배 향상된 감도의 진단제품이 출시된다면 국가기관과 관련업계에서의 수요는 폭발적일 것으로 확신하며, 해외 수출도 가능하여 매출증대 효과가 높을 것으로 기대함.
- (7) 본사는 2019년 몽골 바이오 전문제품 판매사인 Happy Pharm LLC사와 제품판매를 위한 대리점 계약을 체결하여 구제역진단 키트 생산 시 몽골 및 중국 등 해외 수출을 위한 영업망을 확보함.
- (8) 해당 제품의 인지도를 높이기 위해 제품의 최종 수요처인 시도 보건환경 연구원, 검역본부 등에 제품의 평가를 의뢰함과 동시에 동물 진단 관련 학회, 세미나 발표를 통해 개발 제품의 신뢰성을 강화함.

마. 제품 사업화 계획

단계	시기	추진계획	세부내용
1단계	2019.06~2019.12	시제품 개발완료	- 공정 정립
2단계	2020.01~2020.06	생산 공정 구축	- 샘플제작에 사용될 생산 공정 확보
3단계	2020.06~2021.06	1차 사업화	- 샘플제작 - 각 규격별 성능검사
4단계	2021.06~2022.06	2차 사업화	- 시제품에 대한 기술적 보완 - 양산 체계 구축

3. 사업화를 위한 비즈니스 모델

가. BM 목표 및 핵심경쟁요인

(1) BM 목표

- (가) 1차적 목표 : 구제역 진단시스템산업은 크게 조기 질병진단 할 수 있는 민감성이 매우 뛰어난 구제역진단시스템기술과 발달하는 의·약학 정보를 빠르게 구제역 질병진단에 적용하기 위한 구제역진단 키트 제품화
- (나) 2차적 목표 : 일상생활에서도 상시 진단 가능한 시스템 개발과 신속 정확한 측정 기술이 중요하여 질병에 대한 사후 대처 전 요구기술을 만족하는 키트 제품화
- (다) 3차적 목표 : 질환이나 질병 원인이 되는 것을 정확히 진단하는 것은 예방과 치료에 큰 도움이 되며, 각종 암 진단 기술, 감염질환 원인을 보다 정확하고 신속하게 진단하여 조기발견에 의한 완치와 적절한 치료 대응 가능한 진단방법과 키트 제품화

(2) 타 사업과의 연계성과 핵심 경쟁요인 분석

- (가) 면역화학적 진단은 표지자 검출을 위한 시약의 개발, 장치와 제어 시스템 융합, 데이터 처리 전산 시스템 개발 시장이 주를 이루고 있으며, 유용한 표지자 연구개발, 소프트웨어개발, 하드웨어개발 및 제어장치, 검출시스템개발의 전방산업으로 확장 가능

[면역화학적 진단 중심의 산업구조]

후방산업	면역화학적 진단	전방산업
대량 생산기술 시스템 유지관리 개선기술 타 산업분야와의 기술 융합	표지자 검출을 위한 시약의 개발 장치와 제어시스템 융합 데이터처리 전산시스템 개발	유용한 표지자 연구개발 소프트웨어 개발 하드웨어개발 및 제어장치 검출시스템 개발

[면역화학적 진단 중심의 SWOT 분석]

강점(Strength)	약점(Weakness)
<ul style="list-style-type: none"> - 진단검사시스템의 근간을 이룸 - 검사 민감도 및 특이도 - 검증된 진단기법 및 다양한 응용 	<ul style="list-style-type: none"> - 국외 대형업체 기술시장선점 - 후발 개발자로서의 낮은 인지도 및 경쟁력 - 융합기술개발 의욕 및 연구기반 취약
기회요인(Opportunity)	위협요인(Threat)
<ul style="list-style-type: none"> - 지속적인 수요 예상 기대 - BT, IT 등 기반기술력 및 연구인력 보유 - 소규모 내수에 비해, 대규모 수출시장 존재 	<ul style="list-style-type: none"> - 급격한 의료시장 기술의 변화 - 관련 산업의 짧은 제품 수명주기 - 저가의 외국 경쟁제품 출현 가능성

나. 비즈니스 목표 시장 구조

(1) 경쟁기업 현황

- (가) 감염성 미생물 검사시장의 증가로 인한 신속, 고정확성 분자 진단기기가 시장을 주도함.
- (나) 미국의 아이다호 테크놀러지는 바이오칩과 나노기술을 접목하여 27가지 병원체에 대한 동시진단이 가능한 Film Array System을 출시하여 시장을 잠식하고 있는 상황임.
- (다) 글로벌 주요 분자 진단 기업들로는 Roche Diagnostics, Qiagen, Gen-Probe, Abbott Diagnostics, Cepheid 등이 있으며, 고유 원천기술을 보유 중임.
- (라) 국내 유전자 활용 분자 진단 관련 장비 및 진단시스템에 참여하는 대기업은 삼성 테크윈이 있으며, 이외에 바이오니아, 나노바이오시스가 장비 내 모듈, 부품, 제품 생산에 참여하여 유전자진단키트, 융합바이오센서, DNA자동화분석기, 유전자 추출기 등 관련 진단시스템으로 진입 시도 중.
- (마) 국내 경쟁기관현황으로는 메디안디노스틱 (구 제노바이오텍), 바이오노트 등 2곳 존재. 메디안디노스틱의 VDPro FMDV NSP 엘리자' 는 세계 3번째로 상용화한 국내 기술 제품으로 구제역 바이러스의 혈청형에 무관하게 항체검사를 할 수 있고, 약 80.7%의 특이도를 나타냄.
- (바) 지노믹트리, 랩지노믹스, 씨젠, 진메트릭스와 같은 분자진단키트 관련 업체는 효소 및 시약, 제품을 생산하는데 주력하고 있으며, 이외에 굿젠, 지노책, 마크로젠은 DNA칩 생산 및 분석서비스를 위한 개발에 주력하고 있으며, 분자 진단 내 분석기술과 DNA칩 어레이어에 관련한 업체는 아직 부족한 상황임. 따라서 국내 분자진단 전문기업은 당사로서 Immuno-PCR 원천기술을 확보한 유일한 기업임.

(2) 경쟁구조

- (가) Roche Diagnostics는 자가혈당진단 및 분자 진단 분야에 Lab on chip과 nano plasmonic 기술을 이용한 immunoassay관련 시스템을 개발하는 기업으로 당사 개발품과 소분류 기술에서 차이 있음으로 경쟁상황이 발생되지 않음.
- (나) Affymetrix, Inxyte Genomics, Nanogen 등 선두 바이오칩 제조회사에서 DNA칩 분석시스템 개발 분야 연구 집중 개발하고 있으나 기초적인 접근 방식이 다름.
- (다) Illumina는 DNA 및 단백질을 빠른 시간 안에 검출해 내는 VeraCode 기술을 개발을 하여 디지털 홀로그래픽 코드를 도입, 24비트로 인코딩할 수 있는 유리 마이크로 입자를 이용해 생체물질을 다중 검출고속으로 진행하고 있으나 증폭방식이 다름으로 경쟁이 아니라고 할 수 있음.
- (라) 독일의 Siemens AG사 연구팀은 하부 전극으로 금과 마이크로전극을 이용한 전기화학적 검출방식을 채택하여 바이러스 및 병원균 (Pathogen)진단용 DNA 전기화학적 칩 방식으로 개발함으로 증폭방식에 차이가 있음으로 경쟁구조에 포함되지 않음.

다. 수익 확보 전략

- (1) 주요 고객군 : 본 과제가 성공적으로 수행되어 기존의 제품 대비 100~1,000배 향상된 감도의 진단제품이 출시된다면 국가기관과 관련 업계에서의 수요는 폭발적일 것으로 확신하며, 해외 수출도 가능하여 매출증대 효과가 높을 것으로 예측됨.

[주요 예상 매출처]

구분	주요매출처
국가기관	농림축산검역본부
시,도 지자체 연구기관	동물위생시험소
수요자	축산농가
해외	검역 관련 기관, 축산연구소 등

[판매 경로]

매출 유형	품 목	판매 경로
제 품	구제역 Immuno-PCR Kit rapid FMDV Kit	영업사원/ 공공기관 입찰/ 전국 네트워크 동물 진단제품 유통업체

(2) BM의 수익창출 방안

- (가) (주)다우진유전자연구소는 KOLAS 국제공인 시험기관 인정과 14년 연속 보건복지부 산하 한국유전자검사평가원으로부터 A등급 검사기관 인정을 받은 국내최고의 유전자감식관련 검사 기관으로 유전자감식 관련 검사서비스를 수행하고 있으며, 온라인 및 오프라인 네트워크를 구성하여 제품판매 및 유전자검사 서비스 업무를 수행하고 있음.
- (나) 이러한 제품판매 및 유전자검사 서비스 시스템을 활용하여 제품개발 완료시 기존의 on-off line의 영업망을 활용하여 제품판매를 확대할 것이며, 국내 및 해외 시장 마케팅을 병행하여 제품의 매출 증대를 일으킬 것임.

[해외시장 또는 고객발굴을 위한 정보수집 활동 계획]

구분	활동 계획
사전 정보 수집	<ul style="list-style-type: none"> - 회사 및 기업 정보 파악 - 타겟 국가 설정
해외마케팅 컨설팅	<ul style="list-style-type: none"> - 해외마케팅 관련 해외현지 시장조사 - 바이어 발굴 (바이어 신용조사, 무역전문가 검증) - 법률자문 등을 통하여 정보 수집
유효 인콰이어리 발굴	<ul style="list-style-type: none"> - 인콰이어리 접수 - 유효성 검사
바이어 상담회, 해외전시회참가	<ul style="list-style-type: none"> - 국제 전시회 참가
자율마케팅 프로그램	<ul style="list-style-type: none"> - 제품 및 기업 홍보를 위한 세미나 및 컨퍼런스 - 마케팅 관련 행사 개최

붙임. 참고문헌

Fry EE, Stuart DI, Rowlands DJ. The structure of foot-and-mouth disease virus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;288:71-101

박종현, 이광녕, 김수미, 초가기, 김래형, 이여주, 박정남, 신연경, 고영준, 이향심, 서민구, & 김병한 (2012). 구제역 바이러스 OManisa를 이용한 재조합 구제역 백신 바이러스.

Jamal, Syed M., and Graham J. Belsham. "Foot-and-mouth disease: past, present and future." *Veterinary research* 44.1 (2013): 116.

Wang, Jeng-Hwan, et al. "Induction of immunity in swine by purified recombinant VP1 of foot-and-mouth disease virus." *Vaccine* 21.25 (2003): 3721-3729.

Xin, Aiguo, et al. "Whole genome sequencing of a candidate strain for FMDV vaccine: genomic structure and genetic variation." *Molecular Pathogens* 2 (2011).

Vangrysperre W, De Clercq K. Rapid and sensitive polymerase chain reaction based detection and typing of foot-and-mouth disease virus in clinical samples and cell culture isolates, combined with a simultaneous differentiation with other genomically and/or symptomatically related viruses. *Arch Virol.* 1996;141(2):331-44

Reid SM, Hutchings GH, Ferris NP, De Clercq K (1999) Diagnosis of foot-and-mouth disease by RT-PCR: evaluation of primers for serotypic characterisation of viral RNA in clinical samples. *J Virol Methods* 83: 113-123.

Reid SM, Ferris NP, Hutchings GH, De Clercq K, Newman BJ, Knowles NJ et al. (2001) Diagnosis of foot-and-mouth disease by RT-PCR: use of phylogenetic data to evaluate primers for the typing of viral RNA in clinical samples. *Arch Virol* 146: 2421-2434.

H.W. Choi, K.H. Lee, N.H. Hur, H.B. Lim. Cerium oxide-deposited mesoporous silica nanoparticles for the determination of carcinoembryonic antigen in serum using inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta.* (2014). Oct 17;847:10-5

Ismail Ab Rahman and Vejayakumaran Padavettan. Synthesis of Silica Nanoparticles by Sol-Gel: size-Dependent Properties, Surface Modification, and Applications in Silica-Polymer Nanocomposites - A Review. *Journal of Nanomaterials.* (2012). 1-15.

Jaswinder Sharma, Rahul Chhabra, Yan Liu, Yonggang Ke and Hao Yan. DNA-templated

self-assembly of two-dimensional and periodical gold nanoparticle arrays. *Angew Chem Int Ed Engl.* (2006). Jan 23;45(5):730-5

Jessie A. G. L. van Buggenum, Jan P. Gerlach, Selma Eising, Lise Schoonen, Roderick A. P. M. van Eijl, Sabine E. J. Tanis, Mark Hogeweg, Nina C. Hubner, Jan C. van Hest, Kimberly M. Bonger and Klaas W. Mulder. A covalent and cleavable antibody-DNA 레이블링 strategy for sensitive protein detection via immuo-PCR. *Sci Rep.* (2016). Mar 7;6:22675.

Ki Tae Nam, Dong-Wan Kim, Pil J. Yoo, Chung-Yi Chiang, Nonglak Meethong, Paula T. Hammond, Yet-Ming Chiang and Angela M. Belcher. Virus-Enabled Synthesis and Assembly of Nanowires for Lithium Ion Battery Electrodes, *Science.* May 12;312(5775):885-8

Longyan Chen, Hongping Wei, Yongchao Guo, Zongqiang Cui, Zhiping Zhang and Xian-En Zhang. Gold nanoparticle enhanced immuno-PCR for ultrasensitive detection of Hantaan virus nucleocapsid protein. *Journal of immunological methods.* (2009). 346:64-70.

Sreeja Gopal, Shobha Purushothama, Alvydas Mikulskis and Lauren Stevenson. Development of a plug and play ImmunoPCR technique for the analysis of biomolecules. *Bioanalysis.* (2017). Sep;9(17):1293-1303.

Yan Liu, Chenxiang Lin, Hanying Li and Hao Yan. Aptamer-directed self-assembly of protein arrays on a DNA nanostructure, *Angew Chem Int Ed Engl.* (2005). Jul 11;44(28):4333-8

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술 개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.