

발간 등록번호

11-1541000-000520-01

광견병 항체 현장 검출용 바이오센서 개발  
(Development of potable biosensor for Rabies antibody)

(주)바이오노트

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “광견병 항체 현장 검출용 바이오센서 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010 년 8 월 일

주관연구기관명 : 주식회사 바이오노트

주관연구책임자 : 오진식

세부연구책임자 : 백세환

연구원 : 유정은

연구원 : 오연경

연구원 : 정승교

연구원 : 조일훈

연구원 : 서성민

연구원 : 전진우

연구원 : 백의환

연구원 : 김희수

# 요 약 문

## I. 제 목

광견병 항체 현장 검출용 바이오 센서 개발

## II. 연구 개발의 목적 및 필요성

- 광견병이 인수공통 전염병으로서, 사람과 동물에 감염될 경우 신경 증상을 보이며, 치사율이 매우 높은 위험한 질병임.
- 현재의 광견병 항체 분석 진단법은 실험실에서 2주 이상의 검사 소요 시간이 걸리므로, 이를 단축시킬 필요성이 있음.
- 신속하고 정확한 광견병 항체 검사를 통해서, 인수공통전염병의 효율적인 신속한 대응을 가능하게 함.
- 애완견의 건강 검진에 매우 유효하며, 광견병 근절 사업의 일환으로 본 연구 개발 제품을 이용 가능.

## III. 연구개발 내용 및 범위

광견병 바이러스에 대한 항체 검출을 동물취급 현장에서 20분내에 수행 가능하도록 하기 위하여, 농축 Rabies virus 항원을 개발하여, 이를 이용한 Potable ELISA-on-a-chip(EOC)형 바이오센서를 개발하고자 함.

## IV. 연구개발결과

- 항원 개발: 광견병 바이러스 G protein 의 Recombinant 또는 purification 항원 대신에, 전체 광견병 바이러스를 이용하여 항원을 개발하였음.
- Manual EOC 의 개발: 면역 스트립(immuno-strip)의 폭 (4mm), 시료 첨가 패드, 신호 발색 패드, 세로흐름 흡수패드의 길이를 최적화 함으로써 유속을 조절하여 스트립 상에서 원활한 항원-항체 반응이 일어나도록 EOC키트가 개발되었음.
- One-step EOC 의 개발: 사용자의 편의를 위하여, Manual EOC 내에 효소 기질 요액 공급 탱크와 기질 용액 흡수패드 연결장치를 위치시킴으로써 사용자가 단순히 시료 공급 후 버튼을 누르면 신호가 발생되도록 개발되었음.
- 현장 검사용 One- step 신호 탐지기 개발: 실험을 실시한 EOC 의 정확한 판독을 위하여,

발생된 발색 신호가 내부에 장착된 카메라 모듈과 광원에 의해 NC membrane 영상을 획득하고 특별제작한 소프트웨어를 통해 정량 분석되어지는 키트를 개발하였음.

- 효능 평가: BioRad ELISA키트 대비, 민감도 87.58%, 특이도 99.1%를 보였으며, 백신 접종 후 항체 양성율은 7일 이후부터 나타나기 시작하였음.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

민감도 87.5%, 특이도 99.1%로 우수하면서, 빠른 시간(20분내)에 광견병 항체를 검출할 수 있는 키트가 개발되었음. 추가적인 임상 실험 추진 후, 제품 등록을 추진 할 예정임. 제품이 실제 상용화 된다면, 고가의 실험 장비 없이, 빠르고 쉽게 광견병 항체 실험을 할 수 있으므로, 공항, 항만, 동물병원 내에서 바로 실험과 결과를 알 수 있으므로, 매우 유용할 것으로 사료됨.

# SUMMARY

## I. Title

Development of portable biosensor for Rabies antibody

## II. Necessity and Purpose

- Rabies is a viral zoonotic neuroinvasive disease that causes acute encephalitis (inflammation of the brain) in mammals. In non-vaccinated humans or animals, rabies is almost invariably fatal after neurological symptoms have developed, but prompt post-exposure vaccination may prevent the virus from progressing.
- Until now, the detection of rabies antibodies takes long time as about 2 weeks.
- If rapid, easy and simple Rabies antibodies detection kit is developed, it is more easy to control of the rabies disease in the world.
- The developed kit will help for health of a pet as a medical inspection program.

## III. Contents and range

This development is for a ELISA on a chip (EOC) for qualitative and quantitative of Rabies antibodies in canine serum for 15~20 minutes.

## IV. Results

- Antigen development: Antigens for membrane of the EOC is used Rabies virus concentration solution.
- Performance study: The EOC showed sensitivity is 87.58%, and specificity is 99.1% compared with BioRad ELISA Kit. and detection period after vaccination showed positive result after DPI 7.
- Antigen development : Recombinant antigens were not sufficient for antigen in EOC kits. Therefore, the whole virus was chosen for EOC kits.
- Development of manual EOC kit : Optimization of immunostrip width(4mm), sample pad, signal development pad, horizontal adsorption pad gave good liquid flow and antigen-antibody reactions.
- Development of one-step EOC kit : For user's convenience, manual EOC kit was developed to one-step EOC kits by connection with substrate storage tank and adsorption pad. Finally, only one button pressure, all signal could be detected.
- Development of point-of-care one-step signal detector: For analyze the exact signal,

special software was developed with camera which could detect the lines on the membrane.

- Performance : The performance of developed EOC kits were 87.58%, 99.1% in sensitivity and specificity respectively. And also, the rabies antibody was detected from 7 days after vaccination.

## **V. Further application plan**

It was difficult to develop recombinant rabies glycoprotein and purification antigens. Therefore, the whole rabies virus concentration solution used as membrane source. however, the sensitivity and specificity is not bad as 87.5% and 99.1%. we hope the sensitivity and specificity is better in the future adding extra study. as well as dog, cow and raccoon will test soon. If the commercial product of this development comes out, rabies antibody will test rapidly, easily and simply in airport, harbor, or local animal hospital without high price equipment.

# 목 차

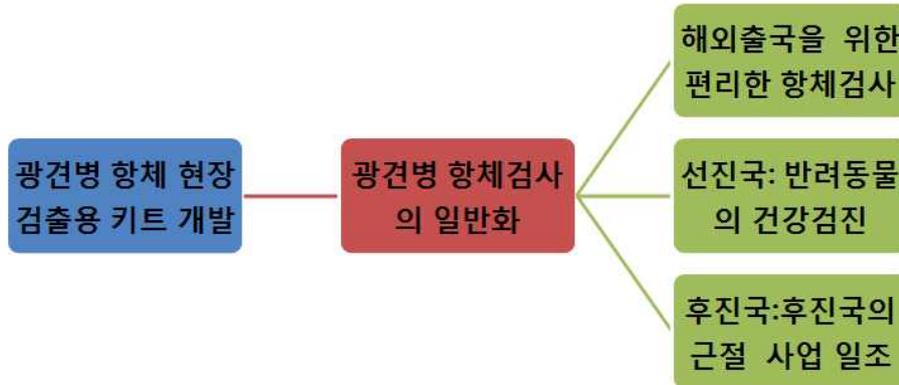
제 1 장	연구개발과제의 개요	8
제 1 절	연구 개발의 필요성	
제 2 장	국내외 기술개발 현황	11
제 1 절	국외 기술 개발	
제 2 절	국내 기술 개발	
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	13
제 1 절	광견병 항원의 개발	
제 2 절	EOC 개발	
제 3 절	EOC 성능평가	
제 4 절	추가 계획	
제 4 장	목표달성도	59
제 1 절	목표 달성도	
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	60
제 1 절	연구개발결과의 활용 성과	
제 2 절	기대 성과	
제 6 장	참고문헌	63

# CONTENTS

1. Introduction .....	8
2. The present technology .....	11
3. Contents and results of development .....	13
4. Achievement ratio .....	59
5. Further application plan .....	60
6. Reference .....	63

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 필요성



### 1. 광견병 항체 검출 연구의 필요성

- 가. 광견병은 모든 온혈동물에서 발생하는 질병이며, 감염동물로부터 교상(물리거나 핥은 상처)을 통해 동물 및 사람에게 전염되는 인수공통 전염병(zoonosis)으로 인간과 동물 모두에게 발생할 수 있어 통제가 어렵고 집단 발병의 가능성이 높으며, 발생 시 국민과 축산업 모두에 큰 피해를 주므로 효율적인 대응이 필요한 전염병임.
- 나. 감염되면 일정기간의 잠복기를 거쳐(물린 부위에 따라 1주에서 1년 이상) 신경 증상, 뇌염 등 중추신경계 병변을 일으킴.
- 다. 교상 후 적절한 후속조치를 받지 않을 경우 대부분 사망함.
- 라. 사람의 경우 제3군 법정전염병이며, 동물의 경우 제2종 법정가축전염병에 해당



그림 1. 광견병 이환견에 의한 사람의 교상 모습.

- 마. 오세아니아주, 일본, 싱가포르, 대만, 하와이, 괌, 피지제도, 영국 등을 제외한 전세계적으로 발생하고 있음.
- 바. 국내에서 1985년부터 1992년까지 8년간 발생이 없다가 1993년 강원도 철원군 동송읍 소재 사육견에서 다시 발생된 이래 현재까지 해마다 지속 발생되고 있고 특히 미국의 경우

에는 매년 7,000~9,000건의 광견병 발생이 보고될 정도로 많이 발생하고 있음.

- 사. 광견병은 국내에서 1907년 최초로 보고된 이래 지속적인 발생을 보여 왔으며 1945년까지 매년 200~800두씩 발생되었으며 그 후 점차 발생이 감소되어 1980년대까지는 매년 3~91두가 발생함.
- 아. 1993년 강원도 철원 등 휴전선 인근지역에서 개 1두가 광견병으로 다시 확인된 이래 현재까지 매년 7~61두가 발생되고 있고 1993년 이래 광견병으로 확인된 가축은 개, 소이며 야생동물의 경우에는 너구리(raccoon dog: Nyctereutes procyonoides)가 유일한 동물임.
- 자. 2005년 발생한 교상환자의 현황 분석 결과에 따르면 71.5%가 사육견에 의해 광견병이 발생
- 차. 따라서 경제적 피해, 발생빈도, 인체감염가능성이 높고 특별한 치료제가 없어 반드시 사육견의 광견병 백신 예방접종을 해야 하기 때문에, 사육견의 광견병 바이러스 항체 보유 여부 확인은 매우 중요함.
- 카. 또한, globalization에 따라, 해외 여행자수의 증가와 함께, 동반하는 애완동물수가 증가되고 있으며, 이때는 반드시, 광견병 예방접종을 실시했다는 증명서를 첨부해야 함. 하지만, 예방접종만 했다고 광견병을 예방할 수 있는 것이 아니라, 항체가 형성되었는지를 확인하는 것이 원칙임. 현재까지는 항체 형성 유무를 확인하기 위해서는 평균 2주간의 검사기간이 필요함. 따라서, 신속한 항체 검사는 국외 여행자의 편리성을 도모할 수 있음.
- 타. 광견병 항체 진단키트의 개발 시 일반 동물 병원이나, 항만, 공항 등에서 필요할 때 이용되어 질 수 있어 광견병 항체 진단의 일반화를 구축할 수 있으며, 애완동물의 광견병 백신 후, 백신의 형성 유무를 알 수 있는 건강검진에 이용될 수 있음.
- 파. 인도나 중국처럼 광견병으로 사망하는 인구가 많은 나라에서는 좀 더 쉽고 간편한 광견병항체 검사 가 필요함. 이와 같은 후진국에는 저렴한 가격으로 제품을 내놓아 나라의 광견병 근절 사업에 이용되어질 수 있도록 함

## 2. 현재 분석법 및 문제점

- 가. 광견병의 항체진단법으로는 주로 백신접종후의 항체역가 측정을 목적으로 수행되고 있음
- 나. 방법적으로는 OIE(국제수역사무국) 추천방법인 형광항체 바이러스 중화시험법(Fluorescent antibody virus neutralization test; FAVN)과 신속형광촉점억제시험(Rapid fluorescent focus inhibition test; PFFIT), 바이러스 중화 마우스 접종법, 중화효소측정법(Neutralizing peroxidase-linked assay)등이 이용됨.
- 다. 현재 국제 수역 사무국에서 광견병 표준 실험실로 지정받은 프랑스 식품 안전 위생국(AFSSA)에서 엄격한 테스트를 거쳐 국제 공인 기관으로 인증 받은 실험실만이 국제적으로 광견병 항체검사의 결과가 유효함.
- 라. 우리나라의 국립수의과학검역원과 (주) 중앙백신 연구소는 2007년에 광견병 항체 검사 국제 공인 기관으로 인증 받은 상태임
- 마. 항원진단법으로는 신경세포 내 Negri body 증명, 마우스 접종법, 형광항체법, 면역조직화학염색법, PCR등이 보고되어 있고 현재까지 가장 정확한 실험법인 바이러스 분리에 의한 진단은 포유 마우스 뇌내접종에 의한 바이러스 분리를 해야 하지만 2-3주간의 장시간이 소요되는 단점이 있음.
- 바. Negri body는 광견병에 이환된 모든 동물에서 발생하는 것은 아니므로 민감도에 문제점

을 가지고 있음.

사. 따라서, 현재의 항체 분석 진단법은 실험실에서 2주 이상의 검사 소요시간이 걸리므로, 이를 단축시킬 필요성이 있음.

### 3. 광견병 항체 현장검출용 바이오센서 연구의 산업적 중요성

가. 광견병 항체 현장검출용 바이오센서가 개발되면, 기존의 FAVN, RFFIT와 같은 복잡하고 시간이 오래 소요되는 진단 방법의 단점을 보완할 수 있음.

나. 광견병 항체 현장검출용 바이오센서의 개발은 지역 동물병원, 항만, 공항, 기업부설 연구소에서의 신속하고 정확한 항체 검사를 수행할 수 있게 하여 인수공통전염병의 효율적인 신속한 대응이 가능하게 됨.

### 4. 광견병 바이러스 항체 현장검출용 바이오센서 개발의 사회경제적 중요성

가. 여행과 이주 등의 문제로 해외로 나가는 인구가 증가하면서, 반려동물인 애완동물의 해외 출입이 점점 늘어나고 있음. 하지만, 이런 동물의 잦은 입출국은 전세계적으로 전염병을 발생시킬 수 있는 위험이 있으므로 각 국은 방역활동을 강화하고 있음.

나. 그 중, 광견병은 중요한 인수공통전염병의 하나로써, 거의 모든 포유동물에게서 전염시킬 수 있는 바이러스이며, 인간이 감염되었을 때 치명적인 바이러스임. 그러므로 개나 고양이가 해외로 나갈 때는, 광견병 백신접종 확인증 또는 광견병 바이러스 항체가 생성됨을 입증하는 확인서가 필요함.

다. 현재 광견병바이러스 항체 테스트는 정해진 기관에서만 테스트가 가능하며, 가격은 10만원이고, 2주의 시간이 소비됨. 실험 의뢰자는 많은 시간과 비용을 소비하게 되므로, 해외에 반려동물의 반입에 대하여 매우 부담스럽게 느끼고 있는 것이 현실임.

마. 광견병 바이러스 항체 현장 검출용 바이오센서가 개발 되어, 인증을 받게 된다면, 지역 동물병원, 항만, 공항 등에서 쉽고 빠르게 현장에서 직접 항체의 유무를 알게 되므로, 소비자는 시간이 절약되며, 비용 또한 매우 저렴하게 이용할 수 있을 것임.

사. 그러므로 개와 고양이가 반려동물로써 인정받고 있는 사회(선진국)에서, 백신 접종후 애완견의 건강검진에 매우 유효할 것이라 사료됨.

아. 또한 중국이나, 인도와 같이 광견병으로 매년 사망하는 인구가 많은 나라(후진국)에서는 광견병 근절 사업의 일환으로 본 제품을 이용하여, 광견병 감염의 빈도를 낮출 수 있을 것임

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1절 국외 기술개발 현황

#### 1. 기업화 단계

현재까지 개발된 ELISA법은 BioRad사와 DRG사의 진단키트가 상업화되어 있지만 그 비용이 매우 비싼 편임 (15,000원/1회 검사). 따라서, 상대적으로 저렴한 본 키트가 판매될 경우 (예상 7,500원/1회검사), 그 시장성은 더욱 확대될 것으로 기대됨.

#### 2. 제품명

가. Bio-RAD사(프랑스)

- (1) 제품명 : Platelia Rabies II kit (ELISA)
- (2) 검사 품종 : 개, 고양이, 여우
- (3) 실험 시간 : 4시간
- (4) 특징 : OIE 인증

나. DRG사 (독일)

- (1) 제품명 : Rabies IgG Ab, Rabies IgM Ab
- (2) 검사 품종 : 개
- (3) 실험시간 : 2시간 30분

### 제 2절 국내 기술 개발 현황

1. 인수공통 전염병이라는 광견병의 질병 특성상 일반 연구소, 대학 등에서는 실험을 시행하지 못하고 국립수의과학검역원 및 국립보건원에서만 광견병 street virus를 취급하고 있음.
2. 이들 기관에서는 신경세포내의 Negri body 검사, 전자현미경 검사, 바이러스 분리 등의 항원검사를 수행하고 있으며, 그 결과에 따라 치료 방법이 선택되어지고 있음.
3. 그러나 fixed virus(ERA strain)를 이용한 광견병 예방접종 프로그램은 정부지원으로 매년 2회 예방접종을 실시하고 있으며 이때 이용되는 백신은 국내의 (주)중앙백신을 비롯한 4개 업체에서 생산되고 있음.
4. 국립수의과학검역원의 연구결과를 고찰하면, 2007년까지 국내 분리주들에 대한 특성을 분석한 결과 북극주(Arctic strain) 유래의 스트레인이며, 이에 대한 검사법으로 G protein을 이용한 ELISA와 바이러스 배양액을 이용한 Sandwich ELISA를 개발하였으나, OIE standard 방법과는 약간의 차이가 있음이 확인되어 실제로 상업적으로 이용되기는 힘들 것으로 판단됨.
5. 현재, 광견병 항원 신속진단키트가 당사인 (주)바이오토틸에서 이미 개발되어 판매되고 있는 반면에 항체 진단용 키트는 기술적인 제한으로 인해 국내에서 제조 판매를 위한 상업화

가 전무한 실정임.

6. 따라서 이러한 항체 신속진단을 위한 기술적인 대안을 개발하는 것이 본 과제의 총괄 목적임.

표 1. 광견병 신속진단의 국내·외의 연구현황표

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
국립수의과학검역원	N protein을 baculovirus에 발현하여 ELISA 개발 (2006)	N protein에 대한 ELISA 방법을 개발하였으나 효능이 만족스럽지 못함
국립수의과학검역원	국내 분리주의 유전자 분석(2006)	북극 유래주(Arctic strain)와 매우 유전적으로 근접한 상태임
AFSSA, France	G protein에 대한 indirect ELISA 개발(2007)	현재 세계적으로 사용되고 있는 Bio-Rad사의 Platelia Rabies II kit에 대한 평가로서, 8~10%의 false reaction을 보임

# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 제 1절 광견병 항원 개발

### 1. 광견병 바이러스 배양

#### 가. 광견병 바이러스

광견병 바이러스 ERA strain을 녹십자수의약품(주)로부터 분양받아 바이러스 배양법을 확립하였다.

#### 나. 바이러스 접종 및 배양

바이러스를 배양하기 위한 세포는 10일령 어린 돼지의 콩팥을 trypsin으로 소화 시켜 얻은 초대배양 돼지 콩팥피질 세포(Primary Porcine Kidney cell/PK)와, Baby hamster kidney cell(BHK) 및 Black goat kidney cell(BGK)을 수원대학교 미생물학연구실에서 분양받아 사용하였다. 각각의 세포배양배지는 기본 세포배양 배지별 (a-MEM 혹은 E-MEM)로 증식성 시험을 실시하였으며 각각의 배지에 lactoalbumin 1%, Yeast extract 3%, Tryptose Phosphate Broth 10%를 첨가하였다. 세포증식용 배지는 10%의 FBS를 첨가하였고 바이러스 증식용 배지는 2%의 FBS를 첨가하여 바이러스가 가장 많이 증식되는 배지와 세포를 선정하였다.

그 결과 광견병 바이러스는 primary porcine kidney cell에서 E-MEM을 기본배지로 하여 Lactoalbumin 1%, Yeast Extract 3%, Tryptose phosphate broth 10%가 첨가된 상태에서 세포배양용 배지는 FBS가 10% 첨가되었을 때, 바이러스 배양용 배지는 FBS가 2%이상 첨가되었을 때 가장 높은 역가인  $10^{5.1}LD_{50}/0.03ml$  (마우스 뇌내 시험법),  $10^{7.3}TCID_{50}/ml$ (PLA법)을 나타내었다(표 2).

표 2. 세포배양법에 의한 바이러스 증식

세 포	PK	BHK	BGK	PK	BHK	BGK
기본 배지	E-MEM			a-MEM		
바이러스 역가 (LD <sub>50</sub> /0.03ml)	10 <sup>5.1</sup>	10 <sup>4.6</sup>	10 <sup>4.7</sup>	10 <sup>4.9</sup>	10 <sup>4.3</sup>	10 <sup>4.5</sup>
바이러스 역가 (TCID <sub>50</sub> /ml)	10 <sup>7.3</sup>	10 <sup>6.8</sup>	10 <sup>6.5</sup>	10 <sup>6.9</sup>	10 <sup>6.3</sup>	10 <sup>6.5</sup>

#### 다. 바이러스 농축

배양된 바이러스를 이용하여 cloning 실험에 공시하였으며, 최종 EOC 키트를 위한 항원으로서 농축(PEG)한 바이러스를 진단용 면역스트립 시험에 공시하였다.

## 2. PCR

### 가. RNA extraction

ERA strain virus 배양액에서 TRI REAGENT-LS(Molecular Research Center. Cat.NoTS-120) 사용 하여 RNA isolation하였다. RNA isolation 과정은 다음과 같다.

- (1) 배양액 250 $\mu$ l 멸균한 1.5ml tube에 rabis virus 배양액 250 $\mu$ l를 넣었다.
- (2) TRI Reagent-LS 750 $\mu$ l를 첨가하였다.
- (3) 실온에서 5분간 정치하였다.
- (4) chloroform 200 $\mu$ l 첨가한 후 15초간 vortexing하였다.
- (5) 실온에서 5분간 정치하였다.
- (6) 13000rpm에서 centrifuge 하였다.
- (7) 상청을 새로운 1.5ml tube에 옮겨주었다.
- (8) Iso-propanol 500 $\mu$ l 첨가한후 inverting repeat 5~6회하였다.
- (9) 실온에서 10분간 정치하였다.
- (10) 13000rpm에서 centrifuge 하였다.
- (11) 상청을 조심스럽게 제거한 후 70% EtOH 1ml 첨가 후 inverting repeat하였다.
- (12) 13000rpm에서 centrifuge 하였다.
- (13) pellet 이 떨어지지 않게 주의 하며 상청을 최대한 제거하였다.
- (14) clean bench에서 20분간 dry하였다.
- (15) 10 $\mu$ l의 DEPC-D.W. 로 pellet 을 용해하였다.

### 나. G protein PCR

추출한 RNA를 template로 NMLV reverse transcriptase (Mbiotech, Cat. No. 19501) 사용 하여 cDNA 합성하였다. cDNA 합성은 표 3과 같이 조성하여 42 $^{\circ}$ C 1시간동안 반응 후 70 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켜 바로 냉동보관하거나, 바로 사용하였다.

PCR을 수행하기위해 표 4의 Oligonucleotide primer 는 NCBI에서 ERA strain의 sequence를 NCBI Accession No. EF206707 참고하여 제작하였다.

표 3. G protein cDNA 합성 조건

RNA	4 $\mu$ l
5x RT buffer	4 $\mu$ l
Anti-Sense primer(100pmole/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
10mM dNTP(Each 2.5mM)	1 $\mu$ l
MMLV RTase(200u/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
RNase inhibitor	1 $\mu$ l
DEPC-D.W	8 $\mu$ l
total	20 $\mu$ l

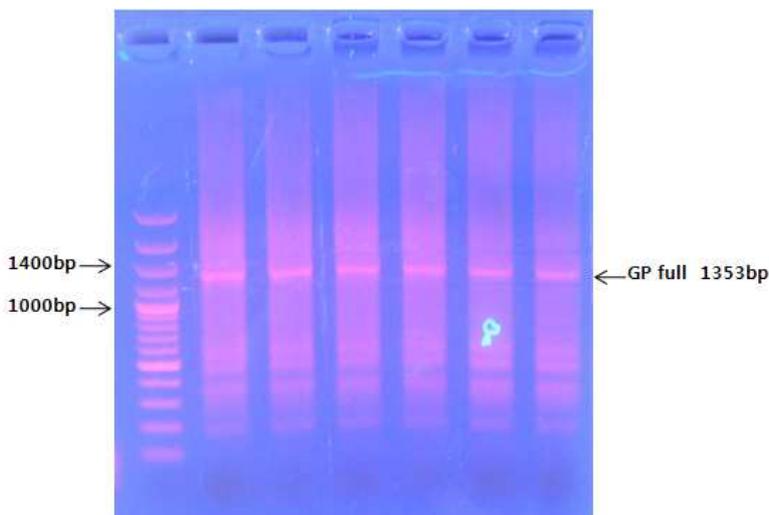
표 4. G protein 용 primer list

Abbreviation	Sequence(5'-3')	Direction	a.a position
GP full F	<b>GGATCC</b> ATG GTT CCT CAG GCT CTC	Forward	1~524a.a
GP full R	<b>GTCGAC</b> TTA TGC ACT CAG TAA TAC ATA	Reverse	
GP 103a.a F	<b>GGATCC</b> ATG CCC GAG AAT CCG AGA	Forward	198~300a.a
GP 103a.a R	<b>GTCGAC</b> TTA CTC TCT CTT CCT GAC CAA	Reverse	
GP TC3 F	<b>GGATCC</b> AAA TTC CCT ATT TAC ACG	Forward	20~55a.a
GP TC3 R	<b>GTCGAC</b> TTA GGT GCA TCC TTC GTC CTC	Reverse	
GP TC4 F	<b>GGATCC</b> GAA ACC AAA TGG TGC CCT	Forward	267~337a.a
GP TC4 R	<b>GTCGAC</b> TTA GAA TAT GGT ATA TGC TTT	Reverse	

Glycoprotein 524a.a로 구성 되어 있다. 전체 524a.a. 중 1a.a~19a.a는 secretion signal, 20a.a~465a.a는 extra cellular domain, 466a.a~ 524a.a는 anchor & cytoplasmic domain으로, 당 연구에서는 1a.a ~465a.a까지의 DNA를 PCR 하였다. GP full gene 과 GP gene 중 glycosylation site 가 없는 부분과 liner epitope 가 존재 하는 부분을 중심으로 하여 recombinant 항원 제조하기 위해 PCR을 수행하였다.

PCR 조건은 thermocycler(mycycler ; BioRad)은 94℃에서 5분간 반응 후 (94℃, 1분, 59℃ 1분, 72℃, 2분) x 28 cycles, (94℃, 1분, 60℃, 1분, 72℃, 10분) x 1 cycle로 사용하였다.

PCR 반응이 완전히 끝난 후, 1.5%의 agarose gel을 만들어 PCR product 1ul를 전기 영동 하여 항원의 size를 확인하고 GeneClean Kit (MP biochemical, #1101-400, France) 를 사용하여 증폭된 DNA를 추출하였다 (그림 2).



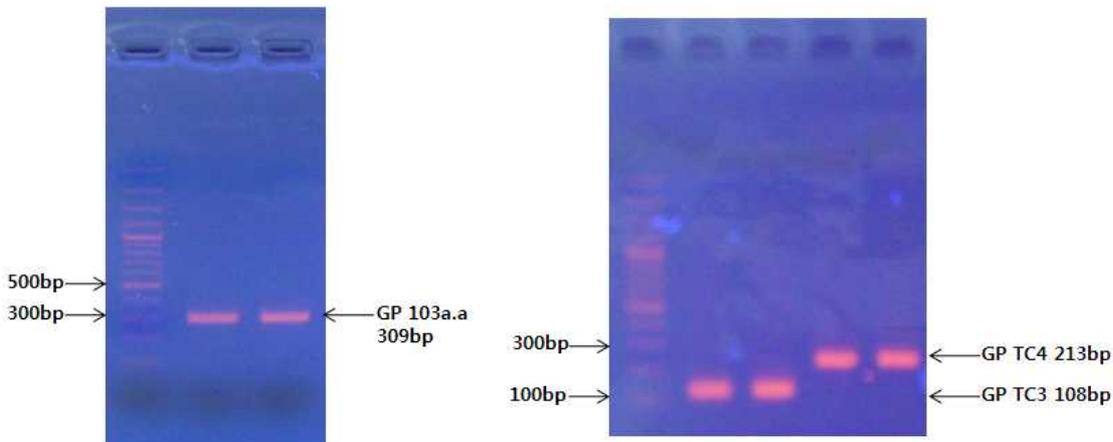


그림 2. G protein PCR 전기 영동 사진

#### 다. G protein pDrive(T-vector) cloning

PCR이 확인된 증폭 산물은 pDrive PCR cloning kit(QIAGEN, Cat. NO. 231124)에 TA-cloning하여 sequence 확인과 Expression vector cloning시에 사용하였다. 위에서 Elution한 PCR product  $2\mu\text{l}$ 와 pDrive Vector  $0.5\mu\text{l}$ , 2x Master Mix  $2.5\mu\text{l}$ 를 넣고 vortex mix하여  $16^\circ\text{C}$ 에서 1시간 ligation시킨 후 *E. coli* competent cell인 TOP10F'에 Transformation 하였다. Transformation은 heat-shock 방법을 이용하였다.  $-70^\circ\text{C}$ 에 보관된 competent cell을 꺼내 ice 위에서 해동 시킨 후 ligate 5ul를 넣고 약 3초간 조심스럽게 혼합한 후 ice에서 30분간 정치시켰다.

반응물이 혼합된 competent cell의 tube를  $42^\circ\text{C}$ 의 항온수조에 90초간 정치 시켜 heat shock을 준 후 즉시 ice에 넣어 주었다. ice에서 5분간 정치 후 항생제가 첨가되지 않은 LB 액체 배지를  $1\text{ml}$  넣어주어  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간동안 shaking incubation(180rpm)을 시킨 후 selective marker로 항생제인 Ampicillin이 첨가된 LB agar plate에  $100\mu\text{l}$ 의 균액을 도말하여 over night으로  $37^\circ\text{C}$  incubator에서 배양하였다. 배양 후 colony가 형성된 것을 확인하고, 형성된 colony는 Ampicillin이 첨가된 LB broth에 picking하여 배양하였다. 배양액은 Wizard Plus SV minipreps(Promega, Cat. No. #A1460) kit를 사용하여 Plasmid를 isolation하였다.

#### 라. G protein Sequence 확인

위에서 isolation된 Plasmid는 Sequence 분석 전문업체인 (주)제노텍에 sample을 의뢰하여, sequence분석을 하였다. 분석된 Sequence는 NCBI에 blast하여 template sequence와 비교하여 amino acid가 변환되지 않은 것을 확인하고, 이를 Expression에 사용하였다.

#### 마. N protein PCR

추출한 RNA를 template로 MMLV reverse transcriptase (Mbiotech, Cat. No. 19501) 사용하여 cDNA 합성하였다. cDNA 합성은 표 5와 같이 조성하여  $42^\circ\text{C}$  1시간동안 반응 후  $70^\circ\text{C}$ 에서 5분간 반응시켜 바로 냉동보관하거나, 바로 사용하였다.

표 5. N protein cDNA 합성 조건

RNA	4 $\mu$ l
5x RT buffer	4 $\mu$ l
Anti-Sense primer(100pmole/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
10mM dNTP(Each 2.5mM)	1 $\mu$ l
MMLV RTase(200u/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
RNase inhibitor	1 $\mu$ l
DEPC-D.W	8 $\mu$ l
total	20 $\mu$ l

PCR을 수행하기 위해 다음의 Oligonucleotide primer는 NCBI에서 ERA strain의 sequence를 NCBI Accession No. EF206707 참고하여 제작하였다(표 6).

표 6. N protein 용 primer list

Abbreviation	Sequence(5'-3')	Direction	a.a position
NP full F	<u>GGATCC</u> ATG GAT GCC GAC AAG ATT GTA	Forward	1~450a.a
NP full R	<u>CTCGAG</u> TTA TGA GTC ACT CGA ATA TGT	Reverse	
NP TC1 F	<u>GGATCC</u> ATG CCC GAG AAT CCG AGA	Forward	1~383a.a
NP TC1 R	<u>GTCGAC</u> TTA CTC TCT CTT CCT GAC CAA	Reverse	
NP TC2 F	<u>GGA TCC</u> ATG GAT GCC GAC AAG ATT	Forward	212~383a.a
NP TC2 R	<u>CTC GAG</u> TTA ATC TGC CAG TGC TAC GTC	Reverse	

Nucleo protein 451a.a 로 구성 되어 있으며, 1a.a~451a.a 전장을 PCR 하여 cloning에 사용 하였다. NP full gene 뿐만 아니라 NP gene 중 linear epitope 가 존재하는 부분을 truncation 하여 recombinant 항원을 제조하기 위하여 PCR을 수행하였다.

PCR 조건은 thermocycler(mycycler ; BioRad)은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응 후 (94 $^{\circ}$ C, 1분, 59 $^{\circ}$ C, 1분, 72 $^{\circ}$ C, 2분) x 28 cycles, (94 $^{\circ}$ C, 1분, 60 $^{\circ}$ C, 1분, 72 $^{\circ}$ C, 10분) x 1 cycle로 사용 하였다.

PCR 반응이 완전히 끝난 후, 1.5%의 agarose gel을 만들어 PCR product 1 $\mu$ l를 전기 영동하여 항원의 size를 확인하고 Geneclean Kit (MP biochemical, #1101-400, France) 를 사용하여 증폭된 DNA를 추출하였다(그림 3).

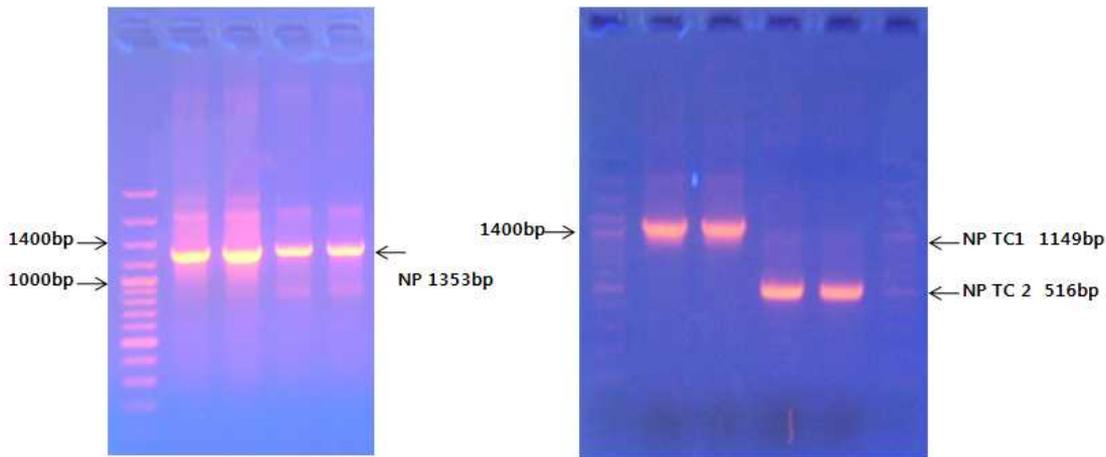


그림 3. N protein PCR 전기 영동 사진

바. N protein pDrive(T-vector) cloning

PCR이 확인된 증폭 산물은 pDrive PCR cloning kit(QIAGEN, Cat. NO. 231124)에 TA-cloning하여 sequence 확인과 Expression vector cloning시에 사용하였다. 위에서 Elution한 PCR product 2 $\mu$ l와 pDrive Vector 0.5 $\mu$ l, 2x Master Mix 2.5 $\mu$ l를 넣고 vortex mix하여 16 $^{\circ}$ C에서 1시간 ligation시킨 후 *E. coli* competent cell인 TOP10F'에 Transformation 하였다. Transformation은 heat-shock 방법을 이용하였다. -70 $^{\circ}$ C에 보관된 competent cell을 꺼내 ice 위에서 해동 시킨 후 ligate 5 $\mu$ l를 넣고 약 3초간 조심스럽게 혼합한 후 ice에서 30분간 정치시켰다.

반응물이 혼합된 competent cell의 tube를 42 $^{\circ}$ C의 항온수조에 90초간 정치 시켜 heat shock을 준 후 즉시 ice에 넣어 주었다. ice에서 5분간 정치 후 항생제가 첨가되지 않은 LB 액체 배지를 1ml 넣어주어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 shaking incubation(180rpm)을 시킨 후 selective marker로 항생제인 Ampicillin이 첨가된 LB agar plate에 100 $\mu$ l의 균액을 도말하여 over night으로 37 $^{\circ}$ C incubator에서 배양하였다. 배양 후 colony가 형성된 것을 확인하고, 형성된 colony는 Ampicillin이 첨가된 LB broth에 picking하여 배양하였다. 배양액은 Wizard Plus SV minipreps(Promega, Cat. No. #A1460) kit를 사용하여 Plasmid를 isolation하였다.

사. N protein Sequence 확인

위에서 isolation된 Plasmid는 Sequence 분석 전문업체인 (주)제노텍에 sample을 의뢰하여, sequence 분석을 하였다. 분석된 Sequence는 NCBI에 blast하여 template sequence와 비교하여 amino acid가 변환되지 않은 것을 확인하고, 이를 Expression에 사용하였다.

### 3. Cloning

가. pFastBac에 G protein 및 N protein insertion

Baculovirus Expression system을 이용하여 Rabies virus의 G protein과 N protein을 발

현하기 위하여, pFastBac HT(Intron) vector를 사용하였다. pFastBac HT(이하 pFBB)에 발현수율을 높이고, 정제에 사용하기 위하여 GST(pFBG)와 E-RNA synthetase (pFBE)를 fusion partner로 사용하였다.

각 insert가 insertion 되어있는 pDrive clone과 vector는 BamH I 과 Sal I 으로 restriction 하고, 이를 1.5% agarose gel에 전기영동하여 size를 분리하였다. 분리된 DNA는 QIAquick Gel Extraction kit(QIAGEN, Cat. No. 28704)를 사용하여 purification을 하였다. Purification이 완료된 vector와 insert는 T<sub>4</sub> DNA ligase(Roche, Cat. No. 10481220001)를 사용하여 ligation 하였다. Ligation은 Vector elute 2 $\mu$ l와 Insert elute 4.25 $\mu$ l, 10x ligation buffer 0.75 $\mu$ l, T<sub>4</sub> DNA ligase 0.5 $\mu$ l를 혼합하여 16°C에서 8시간 이상 반응시켰다. Transformation은 heat-shock 방법을 이용하였다. -70°C에 보관된 competent cell을 꺼내 ice에서 해동 시킨 후 ligate 5 $\mu$ l를 넣고 약 3초간 조심스럽게 혼합한 후 ice에서 30분간 정치시켰다.

반응물이 혼합된 competent cell의 tube를 42°C의 Heating block에 90초간 정치 시켜 heat shock을 준 후 즉시 ice에 넣어 주었다. ice에서 5분간 정치 후 항생제가 첨가되지 않은 LB 액체 배지를 1ml 넣어주어 37°C에서 1시간동안 shaking incubation(180rpm)을 시킨 후 selective marker로 항생제인 Ampicillin이 첨가된 LB agar plate에 100 $\mu$ l의 균액을 도말하여 over night으로 37°C incubator에서 배양하였다. 배양 후 colony가 형성된 것을 확인하고, 형성된 colony는 Ampicillin이 첨가된 LB broth에 picking하여 배양하였다. 배양액은 Wizard Plus SV minipreps(Promega, Cat. No. #A1460) kit를 사용하여 Plasmid를 isolation하였다. Isolation된 DNA는 cloning시 사용된 enzyme인 BamH I 과 Sal I 으로 restriction하여 vector와 insert size를 확인하였다.

#### 나. DH10Bac에 transformation (Bacmid 제조 및 extraction)

위에서 확인된 clone은 Bacmid를 제작하기 위하여 DH10Bac competent cell에 Heat shock 방법으로 transformation하였다. -70°C에 보관된 competent cell을 꺼내 ice에서 해동 시킨 후 Plasmid 1.5 $\mu$ l를 DH10Bac competent cell 100 $\mu$ l에 넣고 분주한다. 약 3초간 조심스럽게 혼합한 후 ice에서 20분간 정치시켰다. 정치가 끝나면 42°C Heating block에 1분 30초간 heat shock을 한 뒤 ice 속에서 2분간 정치하고, 항생제가 첨가되지 않은 1ml의 normal LB broth을 첨가하여 37°C에서 4시간을 Shaking incubator(180rpm)에서 배양하였다. 배양이 끝난 후 항생제가 첨가되지 않은 LB broth를 이용하여 1/2 dilution하여 원액과 함께 100 $\mu$ l를 selective marker 항생제인 Kanamycin, Gentamycin, Tetracycline 과 Blue/White selection을 위하여 X-gal과 IPTG가 첨가된 LB agar plate 배지에 도말하였다. 도말이 끝난 후 37°C incubator에서 2일간 배양한 뒤 White colony를 Kanamycin, Gentamycin, Tetracycline이 첨가된 LB broth에 picking하여 over night으로 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양액에서 Bacmid를 추출하였다. Bacmid 추출은 Wizard Plus SV minipreps(Promega, Cat. No. #A1460) kit의 solution을 사용하여 추출하였다. 배양이 끝난 배양액은 harvest하여 상청액을 완전히 제거하고 Resuspension solution 300 $\mu$ l 첨가하여 pellet이 완전히 풀릴 때까지 vortexing을 하였다. 이에 Lysis solution 300 $\mu$ l를 첨가하고 5회 invert mix한 후 Neutralization solution 300 $\mu$ l를 첨가하고 5회 invert mix하였다. Ice에서 10분간 정치한 후 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상청액과 750 $\mu$ l와

Isopropanol 750 $\mu$ l를 넣어준 뒤 5회 invert mix하였다. Ice에서 20분간 정치한 후 12,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상청액을 제거한 후 70% Et-OH 500 $\mu$ l를 첨가하고, 12,000rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상청액을 제거한 후 Clean bench에서 5분간 자연건조한 후 멸균된 D.W. 50 $\mu$ l에 녹인 후 4 $^{\circ}$ C에서 over night으로 DNA를 용해시켰다.

#### 4. Expression

##### 가. Sf9에 transfection

Extraction된 Bacmid는 발현을 위하여 Sf9 cell에 transfection 하였다. Transfection을 하기 위하여 Sf9 cell은  $9 \times 10^5$  cell/ml을 6-well plate 각 well에 2ml씩 분주하여 27 $^{\circ}$ C에서 한 시간 동안 정치하한 후 media를 제거하였다. extraction된 Bacmid 10 $\mu$ l Media 140 $\mu$ l를 mix하고, SuperFect(QIAGEN Cat. No. 301305) 10 $\mu$ l를 첨가하여 실온에서 20분 동안 정치하였다. 정치 후 Media 1ml을 첨가하여 Sf9 cell에 분주하여 27 $^{\circ}$ C에서 5시간 정치한 후 SuperFect를 제거한 후, 멸균된 PBS 4ml로 washing하였다. 이에 1x Antibiotics가 포함된 media 2ml을 첨가하여 27 $^{\circ}$ C incubator에서 5일간 배양한 후 발현 유무를 확인하였다.

##### 나. PCR 확인

PCR 발현 확인은 P1에서 시행하였다. P1에서 Baculovirus의 DNA를 Intron Viral DNA/RNA extraction kit(Cat. No. 17151)로 extraction 하였다. 배양 supernatant 150 $\mu$ l에 Lysis buffer 250 $\mu$ l을 첨가하여 15초간 vortexing하고, 실온에서 10분간 정치한 후, Binding buffer 350 $\mu$ l를 첨가하여 vortexing하였다. 이를 Column으로 옮긴 후 13,000rpm에서 1분간 원심분리 하고 여과액을 제거한 후 Washing buffer A 500 $\mu$ l를 첨가한 후 13,000rpm에서 1분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 여과액을 제거하고 Washing buffer B 500 $\mu$ l를 첨가한 후 13,000rpm에서 1분간 원심분리하고 잔여 Washing buffer를 완전히 제거하기 위해 13,000rpm에서 1분간 원심분리 하였다. DNA를 Elution을 하기 위해 Column을 새 1.5ml microcentrifuge tube에 옮긴 후 Elution buffer 40 $\mu$ l를 넣어 실온에서 1분간 정치한 후, 13,000rpm에서 1분간 원심분리하여 Extraction한 DNA를 column으로부터 추출하였다. 추출이 완료된 DNA 1 $\mu$ l를 specific primer를 이용하여 PCR을 수행하여 P1에서의 발현 여부를 확인하였다(그림 4).

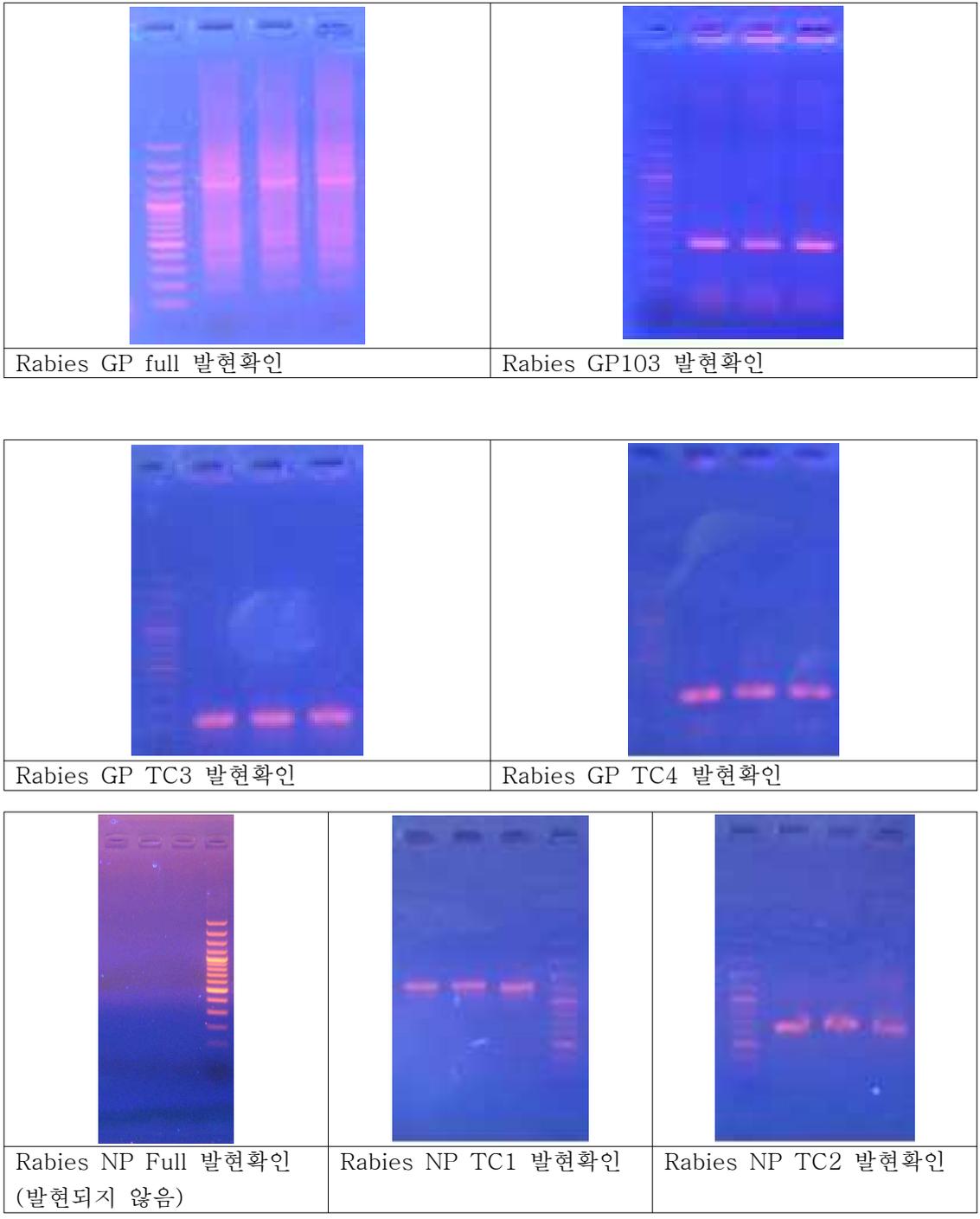


그림 4. P1에서의 G protien 및 N protein 발현 확인(PCR)

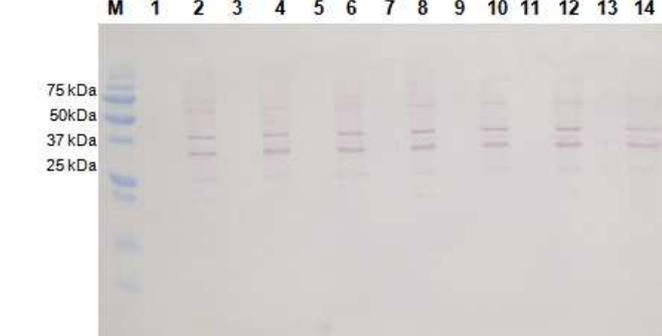
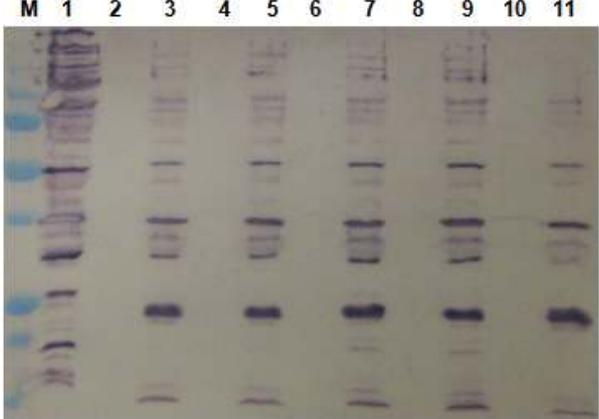
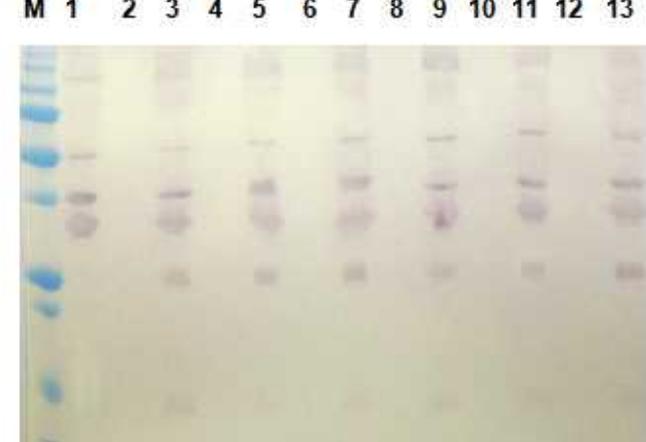
PCR 확인 결과 G protein은 GP full, GP103, TC3, TC4 모두 발현이 되고 있었으나, N protein은 NP full은 발현되지 않았고, TC1과 TC2는 발현되고 있음을 확인할 수 있었다. 발현이 확인된 6가지 항원은 P2와 P3로 virus 계대배양을 다음과 같이 진행하였다.

- (1)  $9 \times 10^5$  cell/ml을 6well plate 각 well에 2ml씩 분주하고 27°C에서 한 시간 동안 정치하였다.
- (2) Suction하여 media를 제거한 후 Virus stock 400 $\mu$ l를 첨가하고 27°C incubator에서 두 시간 동안 정치한 후 Media 2ml을 첨가하였다.
- (3) 27°C incubator에서 3일간 배양하였다.

(4) P2에서 P3로 계대할 때도 위와 동일한 방법으로 진행하였다.

다. Western blotting으로 발현 단백질 확인

단백질의 확인은 P3에서 Western blot으로 진행하였다. P3까지 계대배양한 6well plate를  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 얼리고  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 녹인 후 배양액 1.5ml을 13000rpm에서 1분간 원심분리 하였다.  $50\mu\text{l}$  PBS에 pellet을 resuspension 시키고, 상청액  $50\mu\text{l}$ 와 함께 SDS-PAGE sample loading buffer인 2x sample buffer를 첨가하여 5분간 끓인 후, 15% SDS-PAGE gel에 loading하여 running 하였다. running이 끝나면 NC membrane에 단백질을 Transfer하고, 이를 5% skim milk를 함유한 TBS buffer에 넣고 30분간 상온에서 shaking하면서 blocking하였다. blocking이 끝나면 1차 항체인 Rabies 양성 혈청을 5% skim milk/TBS buffer에 200배 희석하여 1시간동안 교반하며 상온에서 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 membrane은 washing buffer로 5분씩 3회 상온에서 shaking하면서 washing하고, 2차 항체인 Anti-Canine IgG를 1mg/ml의 농도로 1시간동안 교반하며 상온에서 반응시켰다. 2차 항체 반응이 끝난 membrane은 1차 반응이 끝났을 때와 동일하게 washing하고, 발색을 위해서 Anti-Mouse IgG(Whole molecule)-Alkaline Phosphatase(Sigma, Cat. No. A4312)을 4000배 희석하여 1시간동안 교반하며 상온에서 반응시켰다. 이를 다시 1차 반응이 끝났을 때와 동일하게 washing하고, BCIP/NBT premixed solution(Sigma, Cat. No. B6404)으로 발색하여 결과를 확인하였다.

 <p>M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14</p> <p>75 kDa 50 kDa 37 kDa 25 kDa</p>	<p>Rabies GP full Western blot</p>
 <p>M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11</p>	<p>Rabies GP103 Western blot</p>
 <p>M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13</p>	<p>Rabies GP TC3 Western blot</p>
 <p>M 1 2 3 4 5 6</p>	<p>Rabies GP TC4 Western blot</p>

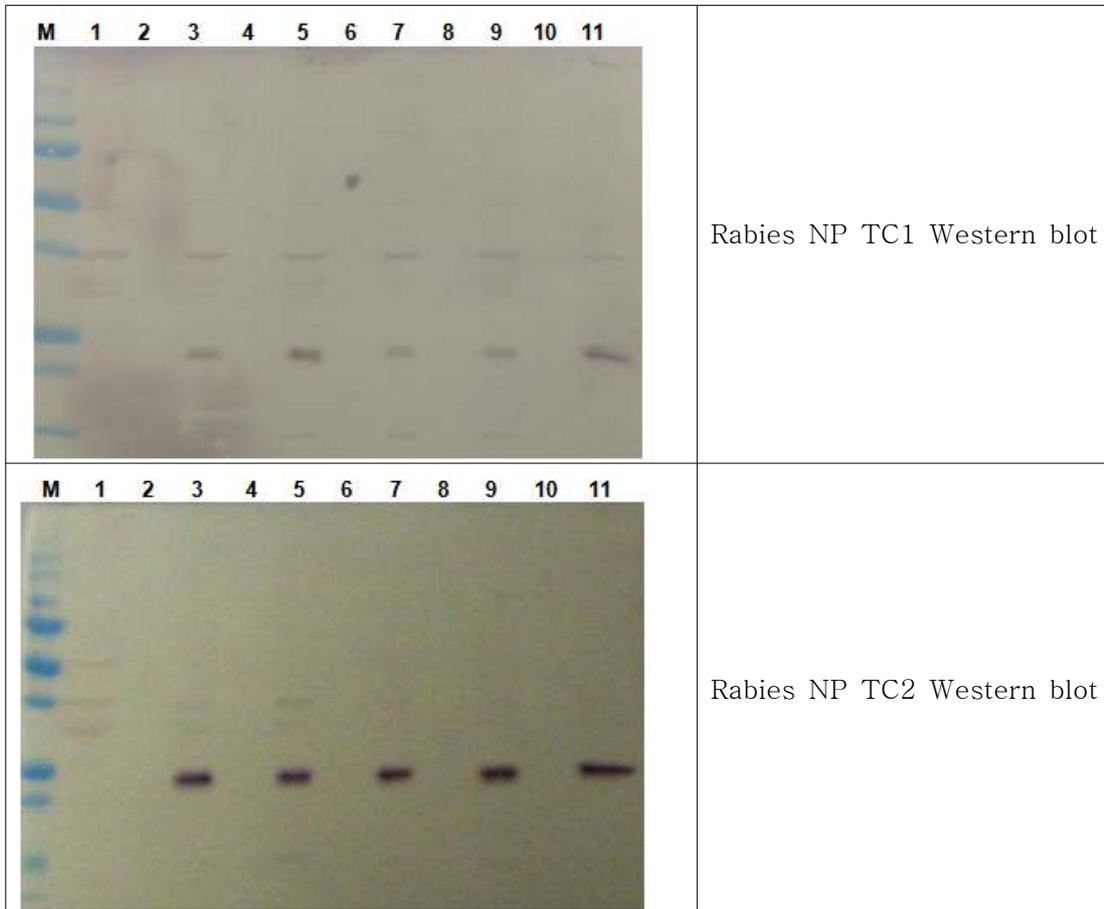


그림 5. G protein 및 N protien의 western blotting

Nucleoprotein 은 linear epitope 존재해 recombinant 항원을 재조하는데 유리한 부분 이라고 예상 되었지만 발현 량도 적고 Western blot 반응도 보이지 않았다. 때문에 linear epitope 가 존재하면서 다른 strain 과 conserve 한 gene 부분을 truncation 하여 NP TC1, TC2 recombinant 항원을 만들었다. 그러나 이들 항원도 Western blot을 진행하였으나, 반응을 보이지 않았다. 최근 Rabies의 연구 동향에서는 Nucleoprotein 보다는 Glycoprotein 부분이 연구가 많이 되고 있는 실정이다.

Rabies Glycoprotein은 gene 자체 내에 glycosylation site 가 존재 때문에 full gene 을 E.coli 발현 system으로 recombinant 항원을 만들기에는 부적합하였다. 예상대로 GP full gene 항원은 발현 역시 되지 않았다.

이런 문제를 해결 하고자 Glycoprotein 중 에서 glycosylation site 가 존재 하지 않는 부분 중 에서 epitope 가 존재 하는 부분을 중심으로 gene 을 truncation 하여 cloning 진행 하였다. 그 결과 발현은 되었으나 western 시 반응 없거나 약하게 반응을 보였다. epitope 들이 crystal 구조를 지닌 것들이 있어 western blot 반응시 확실한 반응을 보이지 않는 것으로 사료되었다.

향후 연구 계획은 Glycoprotein 의 linear epitope 중심으로 gene을 truncation 하여 recombinant 항원을 cloning 할 계획에 있으며, Virus로부터 glycoprotein을 purification하여 G protein을 얻어, EOC용 항원으로 이용할 계획이다.

## 5. Rabies virus 항원 개발 계획의 수정

향후 연구 계획은 Glycoprotein 의 linear epitope 중심으로 gene을 truncation 하여 recombinant 항원을 cloning 할 계획에 있으며, Virus로부터 glycoprotein을 purification하여 G protein을 얻어, EOC용 항원으로 이용할 계획이었으나, 모두 반응성이 없거나 약하게 반응을 보였다. 최후의 방법으로 Rabies virus를 농축하여 멤브레인의 원료로 사용하기로 계획을 변경 하였다(1년차 중간보고서에서 언급되었었음).

## 6. Rabies virus 의 농축

Strip 제조시 사용한 항원은 Rabies virus를 농축하여 사용하였다. Rabies virus는 ERA strain을 사용하였으며, virus는 투석막으로 Polyethylene glycol 6000(PEG6000)으로 투석하여 진행하였다. 준비된 Rabies virus ERA strain 800ml을 투석막(Cellu·Sep社, Cat. No. #8030-50, Nomina MWCO 6000~8000)에 넣고 50% PEG6000(Junsei社, Cat. No. 69245-1201) 용액 3ℓ에 넣어 투석하였다. 투석은 냉장상태에서 진행하였으며, 24~36시간동안 정치하였다. 투석막 내부의 virus는 PBS 30ml에 부유시켜 virus를 회수하였다. 회수된 virus는 3000rpm으로 20분간 원심분리(Hanil, Union 32R)하여 상등액을 회수하여 이를 PD-10 column으로 PBS에 투석하여 역가 측정 후 membrane에 고정화시켜 사용하였다.

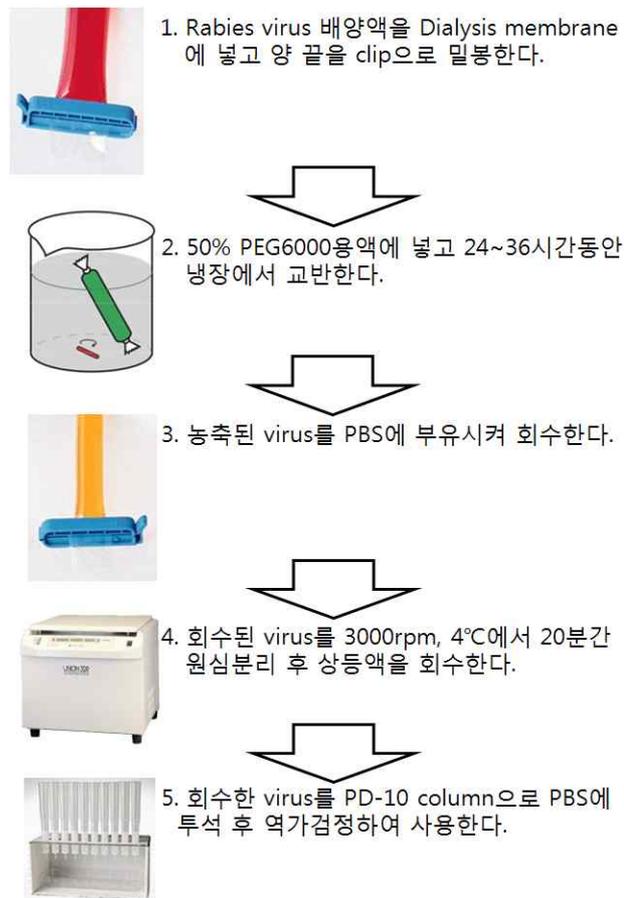


그림 6. Rabies 바이러스 농축 과정

## 제 2절 EOC 개발

### 1. Manual EOC 보완 설계

- 가. 본 연구진은 기존에 개발되어진 멤브레인-플라스틱 하이브리드 (hybrid) 칩인 EOC를 보완하기 위하여 자체 보유 특허기술인 ‘현장진단용 멤브레인 스트립 (membrane strip) 바이오센서’의 핵심 기술을 도입함으로써 전반적인 시스템의 성능 향상을 도모하였음.
- 나. 특히, 면역 스트립 (immuno-strip)의 폭 (4 mm), 시료첨가 패드, 신호발색 패드, 그리고 세로흐름 흡수패드의 길이를 최적화 함으로써 유속을 조절하여 스트립 상에서 원활한 항원-항체 반응이 일어나도록 EOC를 설계하였음.
- 다. 또한, 기질주입 시 멤브레인의 배경신호가 높아지고 불규칙해지는 문제를 해결하기 위해 기질공급 채널의 두께를 최적화하였고 신호발색이 일어나는 멤브레인 표면에 lamination film을 접착하여 배경이 낮고 재현성있는 신호를 유도하고자 하였음.
- 라. 연구과제의 핵심과제 중에 하나인 EOC 플라스틱 칩의 제조 시 일반적인 제조방법인 기계적 식각방법을 사용하여서는 재현성에 많은 문제를 가져올 수 있으므로, 상기되어진 절차를 통해 수정·보완되어진 설계에 따라 EOC를 사출 제작하였음 (그림 7 왼쪽).

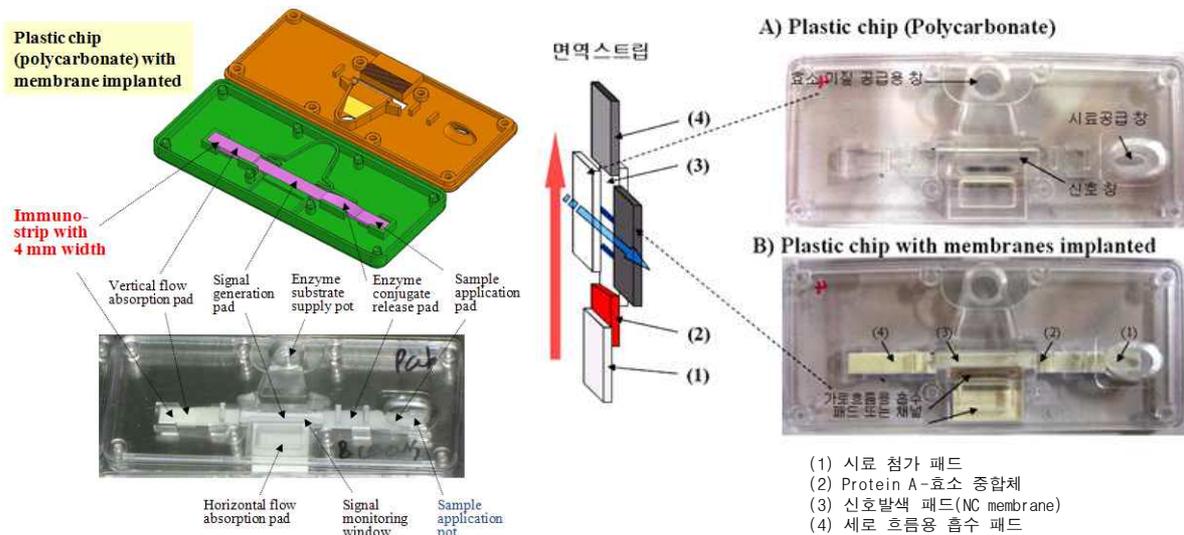


그림 7. 수정·보완되어 사출되어진 EOC (왼쪽)와 면역스트립이 내장된 Manual EOC 칩 (오른쪽).

- 마. 본 연구과제에서 추구하는 목표는 크기가 작고 정교한 면역센서 키트의 개발이므로 사출 성형 시 우선 기계적 식각을 통해 제조된 플라스틱 칩을 기본으로 하여 마스터를 제작하고 사출속도나 양을 조절하여 최적 조건을 확립하였음.
- 바. 최적화된 사출성형 공정을 통해 제작된 EOC 플라스틱 칩은 면역스트립과의 결합을 통해 신속·간편한 면역센서를 구축하게 되어 최종적으로 제작되는 광견병 항체 신속탐지용 면역센서의 재현성은 물론 측정 민감도에 중요한 부분을 차지할 것으로 판단됨.

### 2. 혈구 분리 모듈 개발

- 가. 현장에서의 광견병 신속 진단을 위해서는 전혈 (고형 성분인 혈구(45%)와 액체 성분인

혈장(55%))을 사용하여야 하므로 원심분리와 같은 추가적인 혈구분리 공정을 배제하고 멤브레인 상에서 이루어지도록 하기 위해 혈구 분리모듈이 요구되어짐.

- 나. 혈구 중 적혈구의 지름은 약 8  $\mu\text{m}$ , 백혈구 약 12~25  $\mu\text{m}$ , 혈소판 2  $\mu\text{m}$ 이기 때문에 적정 크기의 pore size를 지닌 혈구 분리패드를 선별하여 혈구와 혈장을 분리시킬 수 있도록 조건을 최적화하였음 (그림 7 참조).
- 다. 시험 결과, CytoSep사 제품의 경우 membrane 종류에 관계없이 혈청의 여과속도가 너무 느려 분석시간이 지체되었고, 그로 인해 혈액이 응고되어 분석을 제대로 수행할 수 없었음 (그림 7a, CytoSep).
- 라. 다른 상업화된 제품인 NC나 polyether sulfone (PES) membrane을 사용한 경우에도 여과속도가 빠르지 않았으며 혈구의 제거가 완전하지 않아 부분적으로 혈구가 membrane 상부로 이동하는 문제가 발생되었음 (그림 7a, NC).
- 마. 반면, Ahlstrom 사 제품인 Grade 111, 141, 142 사용할 경우 여과속도 및 여과 효율이 상대적으로 만족스러운 결과를 나타내었으며 그 중 특히 Grade 141이 최적인 것으로 나타났음 (그림 7b).
- 바. 추가로, red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*)에서 얻어진 lectin (분자 당 2개 이상의 탄수화물 결합부위를 가지고 있으며 당단백질과 세포 등을 응집시키는 작용을 함)을 혈구제거패드에 5 mg/mL 농도로 10  $\mu\text{L}$ 씩 분주하여 혈구 분리효과를 향상시켰음 (그림 8c).

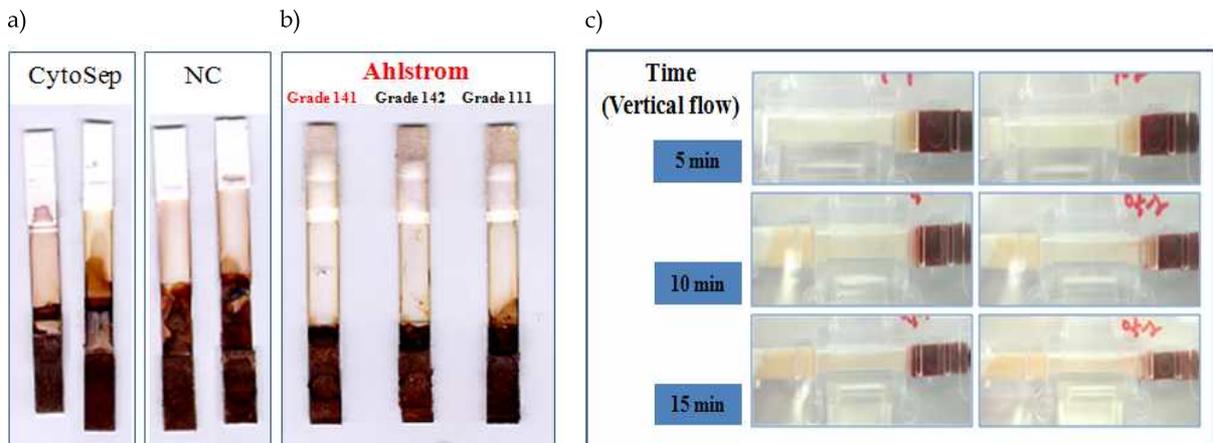


그림 8. 혈구 분리패드에 대한 혈구분리 시험(왼쪽) 및 lectin 사용 시 혈구분리 실험결과(오른쪽).

### 3. 바이러스 항체 진단용 면역스트립 제작

#### 가. 항원특성화

- (1) 본 과제에서는 개의 혈청 내 광견병 바이러스에 대한 항체를 측정하는 바이오센서를 개발하고자 하며, 이를 위해서는 특이 인식물질로서 그 바이러스 항원이 생산되어야 하는데, 그 후보물질로서 표면항원이 glycoprotein과 glycoprotein peptide 및 비활성화시킨 바이러스(ERA vaccine strain)를 선정하였음.
- (2) 바이러스 표면항원인 glycoprotein의 경우, 탈이온화 detergent인 Triton X-100을 이용

하여 바이러스로부터 추출한 후, 겔 여과 크로마토그래피를 통한 정제를 주관기관인 바이오노트에서 수행하였으나 정제 수율이 매우 낮아 고정 항원으로 사용하기 부적합하였음.

- (3) Glycoprotein peptide (Anaspec, USA)의 경우, 분자량(molecular weight 3266.7)이 매우 낮기 때문에 운반단백질로서 BSA와 bifunctional linker인 SMCC (succinimidyl-trans-4-(N-maleimidylmethyl)cyclohexane-1-carboxylate)를 이용하여 중합하였으나 그 glycoprotein peptide-BSA 중합체의 면역 반응성이 낮아 고정 항원으로 사용하기 부적합하였음.
- (4) 따라서 여타 후보항원들보다 반응성이 우수하고 공급이 용이한 비활성 바이러스(ERA vaccine strain, 녹십자수의약품, 한국)를 이용하여 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 연구를 수행하였음 (그림 9 참조).

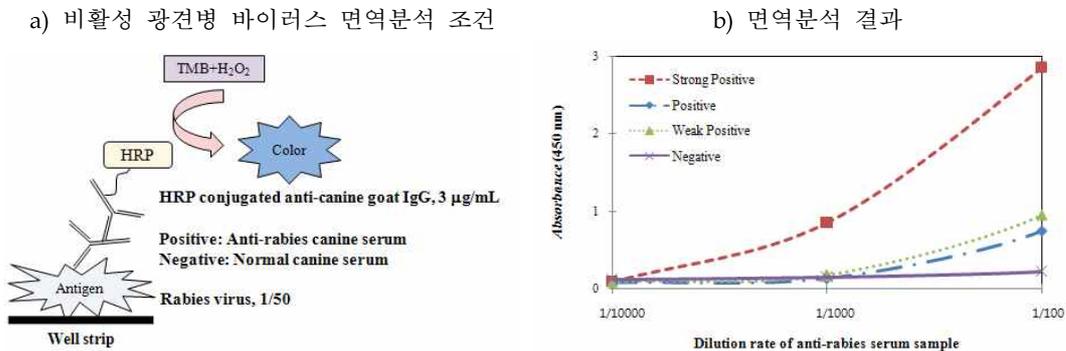


그림 9. 비활성 광견병 바이러스에 대한 ELISA 분석조건(a) 및 다른 개 혈청에 대한 분석결과(B). BioRad사 키트제품을 이용하여 항체 존재에 대해 강한 양성, 양성, 약한 양성 및 음성 을 나타내는 혈청을 분석한 결과 동일한 패턴을 나타내었음.

- (5) 비활성 광견병 바이러스의 경우, 50배 희석시킨 항원을 microwell에 고정화 시킨 후 개에서 생산된 양성, 음성 혈청을 순차적으로 희석시켜 반응시켰으며, 2차항체로서 항 개 염소 면역글로불린 (anti-canine IgG)을 HRP(horseradish peroxidase)와 중합시킨 중합체를 이용하여 최종 반응성을 확인하였음 (그림 8a).
- (6) 양성 혈청의 경우 100배 희석시킨 혈청을 반응시켰을 시 가장 좋은 반응성을 보였고, 음성 혈청의 경우 100배 희석시킨 혈청까지는 비특이 반응이 없는 것으로 확인되었음 (그림 8b).
- (7) 추가적인 항원 특성화를 위하여 비활성 광견병 바이러스 항원에 대해 SDS-PAGE 분석을 수행하였음 (그림 9). 각 항원에 대해서 두 가지의 sample 처리조건을 달리하여 분석하였음 (환원제로서 mercaptoethanol의 유·무에 따라 non-reducing과 denaturing condition으로 각각 구분함).

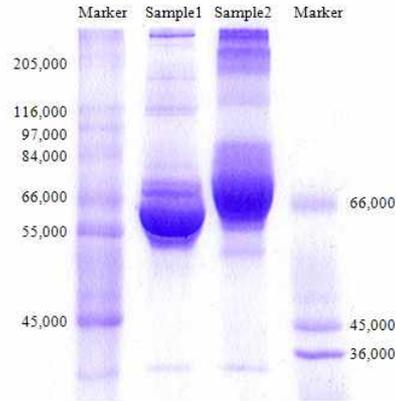


그림 10. 비활성 광견병 바이러스에 대한 SDS-PAGE 특성화. Sample 1: non-reducing condition, sample 2: denaturing condition.

- (8) 비활성 광견병 바이러스의 경우 non-reducing 조건에서는 57kDa~62kDa에서 가장 많은 분포를 보였으며, denaturing 조건에서는 non-reducing 조건에서 보다 조금 더 높은 62kDa~66kDa에서 많은 분포를 보였음 (그림10, 참조).
- (9) 이를 통해, 광견병 바이러스의 경우 여러 가지 단백질이 존재하는 바이러스이기 때문에 정확한 target 단백질의 분자량을 파악할 수가 없었으며, 더군다나 Western blotting 상에서 면역반응이 일어나지 않는 현상을 발견하였음.
- (10) 비활성 광견병 바이러스가 Western blotting 상에서 아무런 반응이 없는 것은 정제되지 않은 바이러스 자체를 이용함으로써 생기는 문제로 첫째, 전기영동 시 첨가되는 SDS, glycine 등의 영향으로 바이러스가 변성되어 면역반응을 방해하는 경우와 둘째로, 약 30~50 nm이상의 큰 바이러스의 크기 때문에 멤브레인 고정 시 그 효율이 떨어지는 경우로 생각할 수 있음.

나. 2차항체-HRP 중합체 제조

- (1) 골드 중합체를 사용할 경우 분석 민감도가 낮은 경향이 있으므로, 이를 향상시키기 위해 HRP 효소를 도입하여 항원-HRP 중합체를 제조 한 후 본 연구진의 핵심 기술인 EOC를 통해 분석민감도를 높이고자 하였음.
- (2) 2차항체는 주관기관인 바이오노트에서 제공한 항 개 쥐 면역글로블린(CG3, Lot: RC9001)을 사용하였함.
- (3) 2차항체와 HRP의 중합비는 1:10 (molar ratio)으로 하였으며, 2차항체과 HRP를 연결시키기 위해 SMCC (Succinimidyl-trans-4-(N-maleimidylmethyl)cyclohexane-1-carboxylate)를 linker로 사용하였음 (HRP와 SMCC는 1:20로 중합조건 설정).

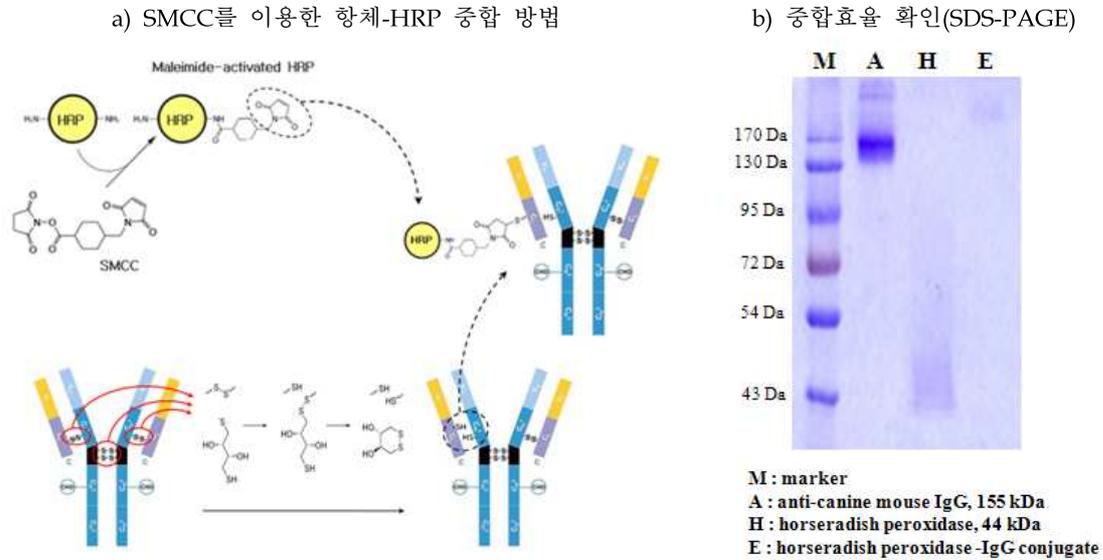


그림 11. 2차항체-HRP 중합 방법 및 합성된 중합체에 대한 PAGE 분석결과.

- (4) SMCC의 경우 succinimide 작용기를 가지고 있어  $\text{NH}_2$  (amine)기를 가지고 있는 HRP와 반응시킬 경우 서로 결합하여 HRP-SMCC 중간체를 형성함 ( $4^\circ\text{C}$ 에서 2시간 반응; 그림 11a 참조).
- (5) 2차항체에 환원제인 DTT (dithiothreitol) 처리를 하게 되면 heavy chain의 Fc hinge 부분과 light chain의 Fc부분의 sulfhydryl기가 활성화 되고 ( $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간 반응), 순차적으로 HRP-SMCC 중간체를 첨가할 경우 중간체에 남아있는 maleimide기와 항체의 sulfhydryl기가 반응함으로서 2차항체-HRP 중합체가 합성됨 (상온에서 2시간 반응; 그림 11a 참조).
- (6) 2차항체는 SDS-PAGE를 통해 중합효율을 확인하였음 (그림 11b 참조). 중합 전 155 kDa의 분자량을 지니는 항체와 44 kDa의 분자량을 지니는 HRP가 중합될 경우 약 200 kDa의 분자량을 지니는 것으로 보아 중합이 원활하게 이루어졌으며, 중합체 밴드가 비교적 좁게 형성된 것을 보아 중합효율이 우수한 것을 확인하였음.
- (7) 그 후 ELISA를 통한 면역반응성을 확인한 결과, 대상 항체의 반응성이 우수한 것으로 확인되었고, 이 중합체를 광견병 바이러스 항체 진단용 ELISA 시스템에 적용시킬 수 있었음 (그 결과 예시로서 그림 9b 참조).

#### 다. 바이러스 고정을 위한 NC 멤브레인 제조

- (1) 광견병 바이러스는 NC 멤브레인에 물리흡착을 통해 고정화를 실시할 경우, 그 효율이 낮기 때문에 고정화 효율을 높이기 위한 방안으로 멤브레인에 homo-bifunctional linker 인 glutaraldehyde를 이용한 화학적 표면 처리를 하였음 (그림 12).
- (2) Glutaraldehyde는 aldehyde ( $-\text{CHO}$ ) 작용기를 양쪽에 가지고 있어 작용기의 한쪽은 NC 멤브레인에 표면에 부착되고 다른 한쪽은 바이러스 내 표면 단백질의  $\text{NH}_2$  기와 화학적으로 반응하여  $\text{C}=\text{N}$  결합을 형성함으로써 NC 표면에 고정화가 이루어짐.

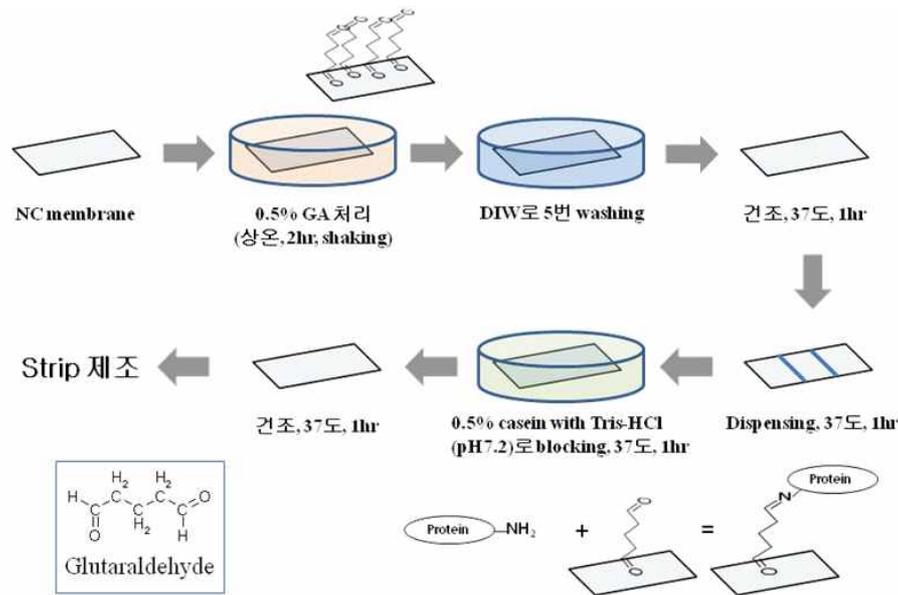


그림 12. Glutaraldehyde를 이용하여 화학적으로 표면을 처리한 NC 멤브레인 제조과정.

- (3) 부가하여, glutaraldehyde로 표면 처리된 멤브레인의 경우 목표 단백질과 상이한 단백질의 NH<sub>2</sub> 기와 비특이 반응을 유발할 수 있으므로 바이러스 분주 이후에는 0.5% casein과 Tris buffer를 이용하여 작용기를 비활성 시켰음.
- (4) 실험 결과, glutaraldehyde가 표면 처리된 멤브레인의 경우 면역반응이 원활하게 일어났으며 적절한 blocking을 통해 항원 외의 부분에서 비특이 반응이 일어나는 것을 방지할 수 있었음 (그림 13).

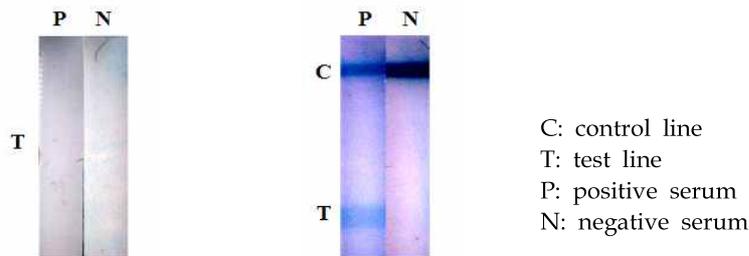


그림 13. Glutaraldehyde 처리를 하지 않거나(왼쪽) 처리한(오른쪽) 경우의 면역스트립을 이용한 교차호름 기반의 분석 결과.

#### 4. 광견병 바이러스 항체 진단용 EOC 분석조건 최적화

가. 화학처리된 NC 멤브레인을 이용한 EOC 검사

- (1) 본 연구진의 독자적 기술로 제작하는 면역 스트립은 샘플 주입패드, 중합체 패드, NC 멤브레인을 사용하는 신호발생 패드, 샘플흡수 패드, 신호발생을 위해 기질흐름을 유도하는 기질흡수 패드로 구성 되어 있으며 면역 스트립의 폭은 4 mm로 결정하여 상용화 되어진 면역 스트립보다 현저히 그 크기를 축소하였음.
- (2) 예비실험 결과를 통해 광견병 바이러스를 물리흡착을 통해 NC 멤브레인에 고정화할

- 경우 그 효율이 낮았으며, 이를 극복하기 위한 방안으로 NC 멤브레인에 homobifunctional linker인 glutaraldehyde를 이용하여 화학적으로 표면을 처리하였음.
- (3) Test line의 경우, 비활성 광견병 바이러스를 50배 희석 분주하여 고정화 하였고 그 후 양성 혈청내의 광견병 항체와 반응시켰고, 세척 후 2차항체인 항 개 염소 면역글로블린 (anti-canine goat IgG)-HRP 중합체와 반응 시켰으며, 마지막으로 효소기질(TMB; 200  $\mu$ L)을 기질 주입구를 통하여 첨가하여 발색신호가 나타나도록 시스템을 구성하였음 (그림 13a).
- (4) Control line의 경우, normal mouse IgG를 0.1 mg/mL를 분주하여 고정화 하였고 항 쥐 염소 면역 글로블린 (anti-mouse goat IgG) 중합체를 추가로 넣어 반응을 유도함으로써 test line과는 별개로 발색이 발생하도록 시스템을 구성하였음 (그림 13b 참조).
- (5) 교차흐름 원리를 이용하여 EOC 분석을 수행하였으며 (그림 13c) 분석결과, 혈청을 10 배 희석할 경우 양성(P)과 음성(N)이 뚜렷하게 비교되는 결과를 확인할 수 있었고, 양성시료의 경우 신호 값이 두 개 (T 및 C) 생기고, 음성의 경우의 신호 값이 한 개(C)가 생기도록 설계하였음 (그림 14d).

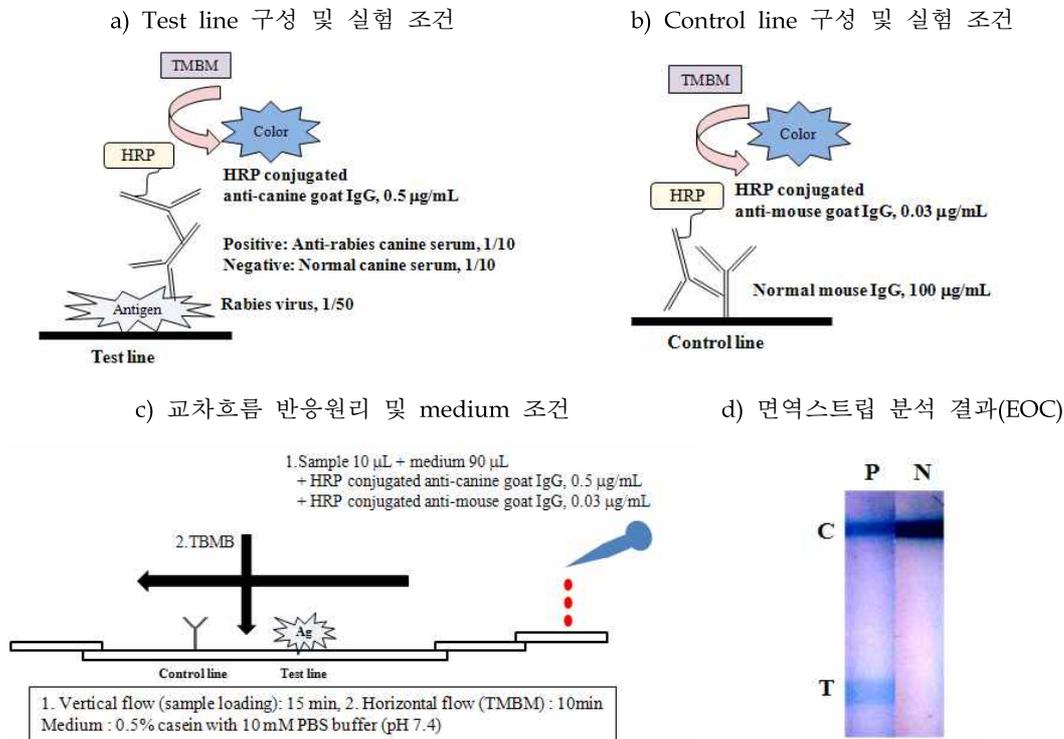


그림 14. Glutaraldehyde로 표면 처리한 NC 멤브레인을 이용한 EOC 검사. 자세한 설명은 본문 참조.

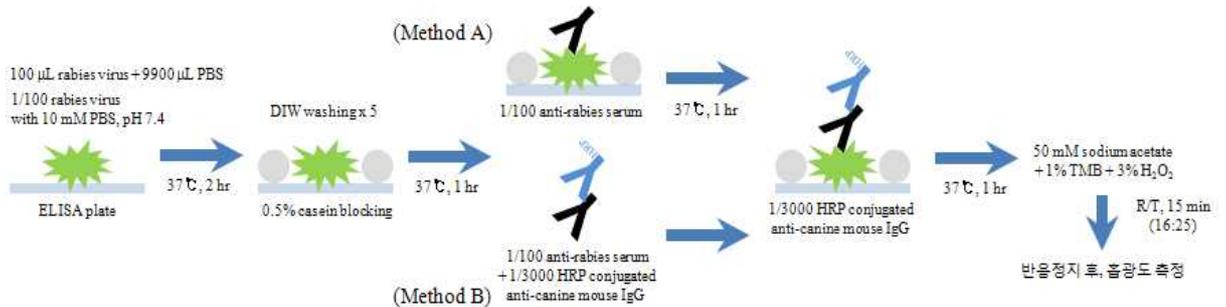
나. 시료와 효소 중합체의 순차적 반응이 도입된 EOC 검사

- (1) 기존 EOC의 경우 외부에서 혈청시료와 2차항체-HRP 중합체를 액상 반응시킨 후 이를 면역스트립 내에 첨가하여 NC 멤브레인에 고정된 광견병 바이러스에 의해 포획하는 분석과정을 사용하여 왔음 (그림 15a, Method B).
- (2) 하지만, 위와 같은 경우 효소 중합체가 혈청 내에 존재하는 과량의 비특이 항체들과 우선적으로 반응하기 때문에 광견병 바이러스 특이항체와의 반응 확률이 매우 낮아지게

되므로 이를 보완하고자 시료와 중합체를 순차적으로 고정 항원과 반응시키는 순차적 반응 방법을 채택하고자 하였음 (그림 15a, Method A).

- (3) 이와 같은 가설을 증명하고자 바이러스 항원이 고정된 microtiter plate를 이용한 예비 실험을 구상하였으며, 이를 통해 순차적 반응 유도방법의 EOC에 도입 여부를 결정하고자 하였음.

a) 순차적 반응 및 동시 반응을 통한 면역분석 과정 비교



b) 순차적 흐름 방법의 도입 유무에 따른 면역분석 결과 비교

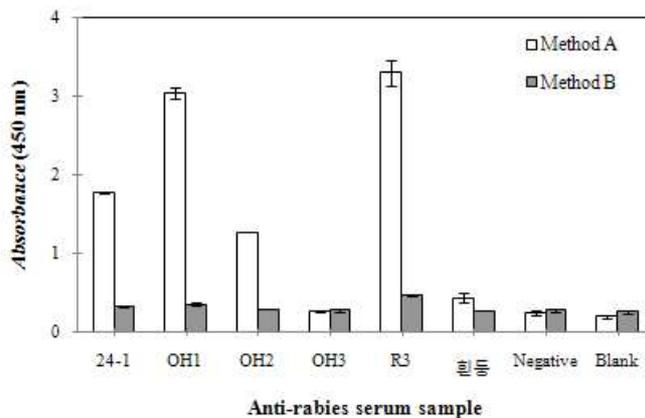
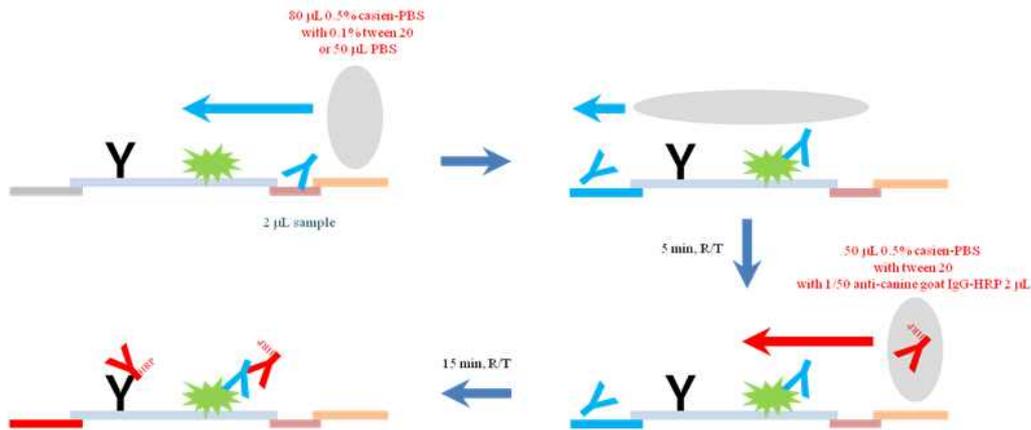


그림 15. 바이러스 항원이 고정된 microtiter plate를 이용한 순차적 흐름 및 동시 반응 방식 기반의 면역분석 과정 (a) 및 그 분석결과 비교 (b). 자세한 사항은 본문 참조.

- (4) Method A의 경우, 100배 희석시킨 광견병 바이러스를 microwell에 고정시킨 후 개 혈청시료와 제2항체-HRP 중합체를 순차적으로 반응시켜 반응성을 확인하였으며 그리고 Method B의 경우, 혈청시료와 중합체를 외부에서 반응시킨 후 microwell에 분주하여 반응을 유도하였음 (그림 15a).
- (5) 실험결과 순차적인 반응을 유도한 Method A의 경우 양성혈청과 음성혈청의 구분이 뚜렷이 나타난 반면에 Method B의 경우 양성과 음성 혈청 간의 차이가 미약하였으므로 이는 위에서 설정한 가설과 일치한 결과이었음.
- (6) 따라서, EOC 분석 시 민감하게 양성과 음성 혈청을 구분 짓기 위해서는 순차적 반응 유도가 가능하도록 EOC 분석시스템의 운영이 필요하게 되었음.

a) 순차적 반응 기반의 EOC 분석과정



b) 순차적 반응 기반의 EOC 분석결과 비교

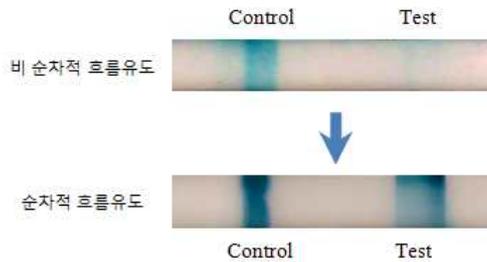


그림 16. 시료 및 중합체의 순차적 반응 방식을 이용한 광견병 바이러스항체 EOC 분석과정 (a) 및 분석결과 비교.

(7) 그림 10a에서와 같이, 순차적 반응을 유도하기 위해 2 mL의 혈청시료를 EOC에 분주한 후 50 mL의 medium을 첨가하여 시료 내의 특이항체가 NC 멤브레인 상에 고정된 광견병 바이러스와 반응하도록 우선 유도하였고, 중합체를 형성하지 못한 비특이항체의 경우 흡수패드로 이동시켜 제거하였음. 그 후 효소 중합체 2 mL를 분주하고 연이어 50 mL의 medium을 다시 첨가하여 항원-항체 샌드위치 결합체가 순차적으로 형성되도록 하였음 (그림 16a).

(8) ELISA 상에서의 결과와 마찬가지로, 비순차적으로 유도된 EOC 분석 신호값과 비교하여 순차적 반응이 유도된 EOC 분석 신호값이 현저히 상승하였으므로, 순차적 반응 공정을 표준 분석방법으로 채택하였음.

## 5. One-step EOC 설계 및 칩 사출 제작

### 가. One-step EOC 카트리지 설계

(1) 1차년도에 제작한 Manual EOC 분석시스템 개발을 통해 광견병 바이러스 항체 탐지능력 및 제품화 가능성을 확인하였는데 최종 현장 검사용으로 쓰이기 위해서는 1차 세로흐름에 의한 항원-항체 반응 후 2차로 가로흐름용 흡수패드를 연결시킨 후 효소기질용액을 넣어주어야 하는 불편함을 제거해야 하였음.

(2) 이러한 불편한 점을 간소화하기 위해 플라스틱 EOC 내에 효소기질용액 공급탱크와 기질용액 흡수패드 연결 장치를 위치시킴으로써 사용자는 단순히 시료공급 후 버튼을 누

르면 신호가 발생되도록 one-step EOC 카트리지를 4가지 type으로 설계하였음 (그림 17).

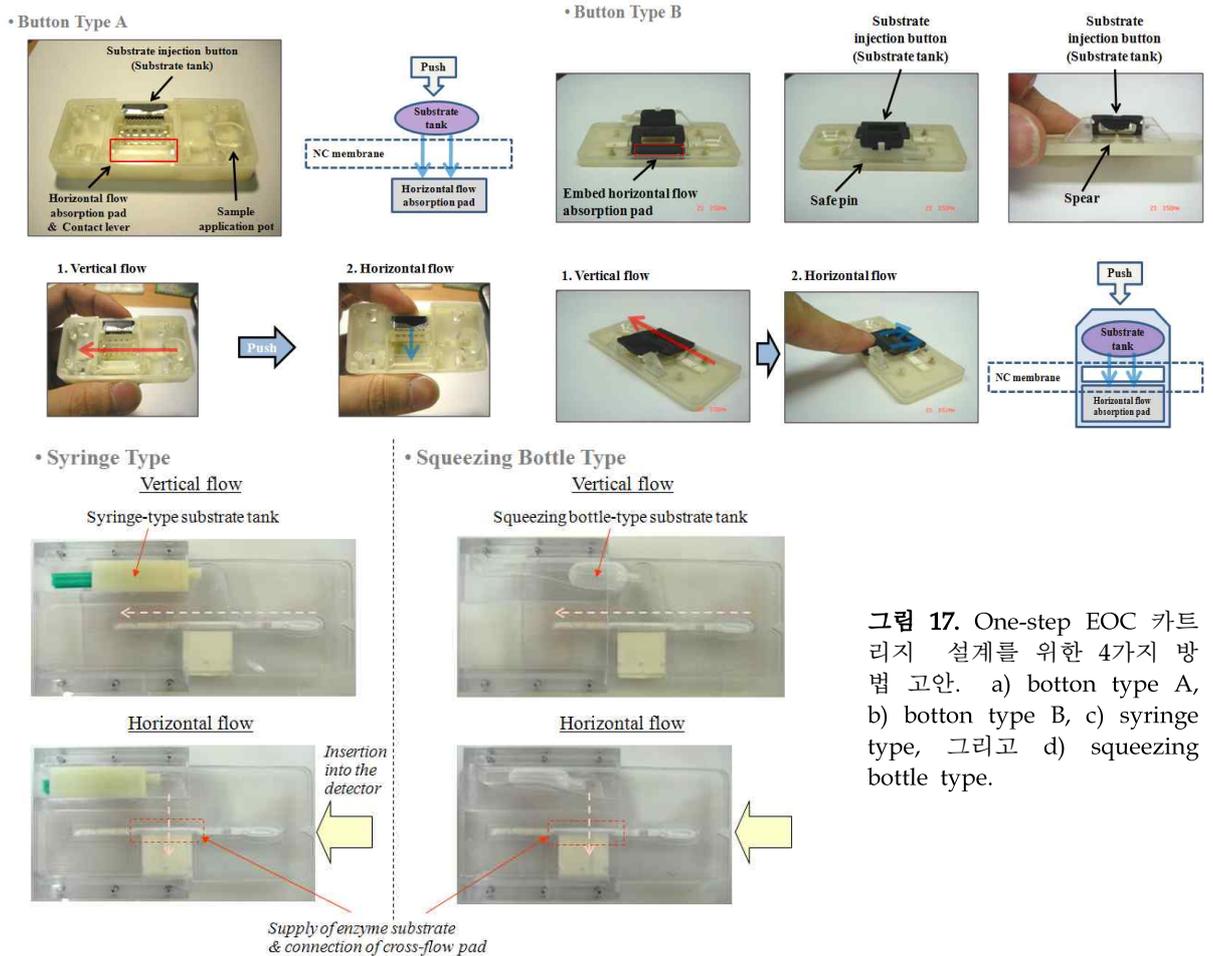


그림 17. One-step EOC 카트리지를 위한 4가지 방법 고안. a) button type A, b) button type B, c) syringe type, 그리고 d) squeezing bottle type.

- (3) 그림 17a의 Button type A의 경우, sample 반응이 이루어진 후 (vertical flow) 기질 공급을 위해 플라스틱 EOC 옆에 위치한 기질공급탱크 (substrate tank)를 손으로 눌러 터뜨려 기질이 NC membrane을 거쳐 기질흡수패드(horizontal flow absorption pad)로 흘러갈 수 있도록 설계하였음.
- (4) 그림 17b의 Button type B의 경우에는 플라스틱 EOC 위에 덮개를 설치하여 vertical flow 후 기질공급을 위해 위에서 덮개를 누를 시 기질공급탱크(substrate tank)가 터지면서 기질이 NC membrane으로 유입되고 동시에 덮개에 의해서 눌러진 기질흡수패드(horizontal flow absorption pad)가 자연스럽게 NC membrane에 연결되어 그 가로흐름을 유지시키도록 설계하였음.
- (5) 그림 17c와 d에서는 앞 두 방법과 같은 추가적인 조작방법을 배제시키기 위하여 일정 시간 경과 후 기질이 자동으로 공급되어질 수 있도록 설계하였음. 이 두 방법은 샘플을 주입한 후 발색신호 측정장치(colorimetric detector)에 삽입하면 일정 시간 후 기질공급이 자동으로 이루어져 별도의 절차 없이 분석이 이루어지는 장점이 있음.
- (6) 그림 17c에서는 기질 공급 시 기존의 기질공급탱크를 변형한 주사기 형태의 기질공급탱크 (syringe-type substrate tank)를 이용하며 detector에 EOC를 삽입하게 되면 기질

흡수패드가 NC membrane에 자동으로 연결되고 또한 주사기로부터 기질이 자동 공급되어 가로흐름이 이루어지게 됨.

- (7) 그림 17d에서는 연결형태의 플라스틱을 이용한 기질공급탱크를 이용하는데, EOC 삽입이 이루어지게 되면 이 기질공급탱크가 이동하면서 눌러지게 되어 탱크 안에 있던 기질이 유출되어 가로흐름을 유발하게 됨.

나. 플라스틱 칩 사출 제작

- (1) 상기한 4가지의 one-step EOC 카트리지 설계 중 자동 기질공급이 가능한 EOC 설계 (그림 10c, d)를 수정·보완하여 개선된 플라스틱 칩을 사출하였음 (그림 18, 왼쪽).
- (2) One-step EOC 플라스틱 칩은 시료를 공급하는 sample application pot, 기질의 가로흐름을 원활하게 하는 horizontal flow absorption pad, 밀폐된 공간에 기질을 보관하는 substrate tank, 그리고 substrate tank 막을 천공하여 기질공급을 유발시키는 substrate injection button으로 구성되어짐.



그림 18. One-step EOC 플라스틱 칩 구성(왼쪽)과 교차흐름에 의한 분석원리(오른쪽). 1. 항원-항체 반응을 유도하는 세로흐름 및 2. 효소반응을 통한 신호발생을 유도하는 가로흐름.

- (3) 분석과정에서 첫째로, 혈청시료를 첨가하여 세로흐름을 통해 항원-항체 반응을 유도한 후 (그림 18, 오른쪽: 1. Vertical flow) 둘째로, 기질공급을 위해 끝 부분이 날카롭게 형성된 substrate injection button을 밀어 기질탱크 막을 천공하게 되면 기질이 흘러나와 가로흐름을 유발하게 됨 (2. Horizontal flow).
- (4) 이와 같은 EOC 설계로부터, 사용자는 면역스트립이 포함된 EOC 카트리지에 시료를 공급한 뒤 수직흐름이 진행되는 동안 기다린 후 효소기질용액의 가로흐름을 기계적으로 유도하면 효소반응을 통해 눈으로 발색신호 발생을 확인할 수 있어 별도의 조작 없이 one-step으로 전 분석공정을 수행할 수 있게 됨.

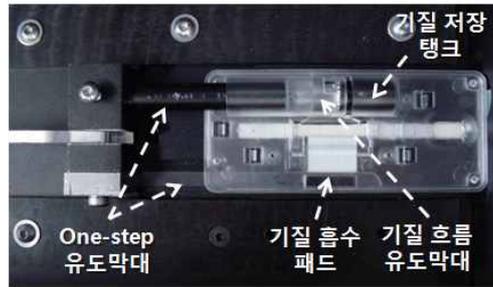
6. 현장검사용 One-step 신호탐지기 개발

가. EOC 면역분석의 경우 효소를 신호발생원으로 사용함으로써 효소기질 첨가를 위한 추가적인 수행단계가 요구되므로 시료 첨가만으로 탐지 여부를 알 수 있었던 골드기반의 신속진단법에 비해 사용상의 불편함을 느끼게 되었고, 이에 칩 내부에 기질공급 탱크를 내장시키고 (그림 18 참조) 기질공급을 유도하는 장치를 탐지기 내부에 장착시켜 one-step 분석이 가능하도록 하였음 (그림 19).

a) 탐지기 내부모습 및 구성



b) One-step EOC 구동부



c) 카메라 모듈 및 광원부의 구조

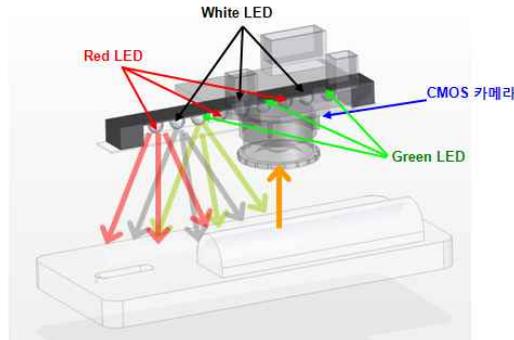
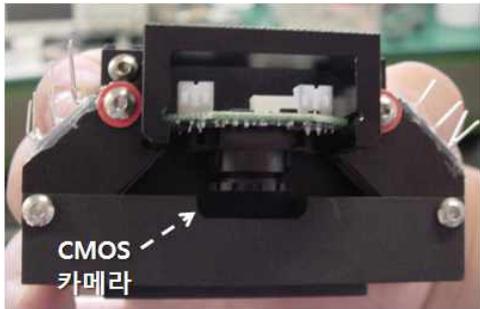


그림 19. One-step용 EOC 탐지기 내부모습 및 구성. 자세한 내용은 본문 참조.

- 나. One-step 구동이 가능하도록 하기 위해 칩이 삽입되는 반대방향에 “ㄷ”형태의 one-step 유도막대를 설치하였고 중단부에 스크류 타입의 모터를 장착하므로써 기질흡수패드의 삽입과 기질저장탱크 개봉이 동시에 이루어지도록 하였음 (그림 19a).
- 다. One-step EOC 탐지기의 구동원리는 아래와 같은 3가지 단계로 이루어짐. 1단계로, 탐지기 중앙에 위치한 EOC 투입구에 시료와 중합체가 순차적으로 첨가된 칩을 장착하고 밀대로 밀어 넣어 탐지기 내부에 EOC를 위치시킴. 2단계로, 탐지기 중앙으로 이동된 EOC 상에서는 일정 시간 동안(예: 10분) 세로흐름이 진행됨. 3단계로, 설정된 시간이 되면 내부에 설치된 모터가 작동하여 one-step 유도 막대를 이동시킴 (그림 19b). 이때 유도막대 하단에 인접된 기질흡수패드가 EOC 내부에 정위치 되고 기질저장탱크 막이 천공되어 가로흐름이 유발됨.
- 라. 분석결과로서 발생된 발색신호는 내부에 장착된 카메라 모듈과 광원에 의해 NC membrane 영상을 획득하고 아래에서 설명될 소프트웨어를 통해 정량 분석됨.
- 마. 사실 위와 같은 one-step EOC 구동용 하드웨어 및 분석결과로 얻어진 영상 그리고 정량 분석은 전적으로 컴퓨터와 연동된 소프트웨어를 통해 자동으로 제어되고 분석 됨.
- 바. 소프트웨어의 구성은 카메라 이미지 출력부 (그림 20, 왼쪽 상단), 발색신호 이미지의 색조밀도 그래프 (오른쪽 상단), 광원 파장 선택 및 EOC 자동구동 제어부 (왼쪽 하단), 그리고 표준곡선 출력부 (오른쪽 하단)로 이루어짐.



그림 20. One-step용 EOC 탐지기 소프트웨어 구성.

- 사. 위에서 EOC 1단계 구동 시 EOC가 탐지기 중앙에 인접한지 여부는 CMOS 카메라를 통해 프로그램 상단 왼쪽에 있는 카메라 이미지 출력부로 확인 가능하며, 2단계에서의 시간 제어와 3단계 구동 시 기질흡수패드 삽입과 기질흐름탱크 개봉을 위한 one-step 유도 막대의 이동은 EOC 자동구동 제어부로 조절 가능함.
- 아. 이와 같이 one-step EOC 구동에 필요한 하드웨어 및 소프트웨어가 집적된 현장검사용 EOC 신호탐지기의 제원과 사양을 그림 21에 정리하였음.



Item	Description	Specification	
Hardware	EOC reader	Light source	White/Red/Green LED
		Sensor	VGA CMOS Camera
		Video resolution	VGA(640x480)
		Data format	RGB24
		Sample holder	33mm x 76mm x 13mm
		Communications	USB 2.0
		Dimension	140mm x 208mm x 116mm
Software	EOC reader	<b>Microsoft EXCEL 2003(XP) 설치 必</b>	
Accessories	USB cable	A-mini B	
	Adapter	AC 100~240V, 5V 2Aa	

그림 21. 현장검사용 EOC 신호탐지기 전체 모습 및 사양.

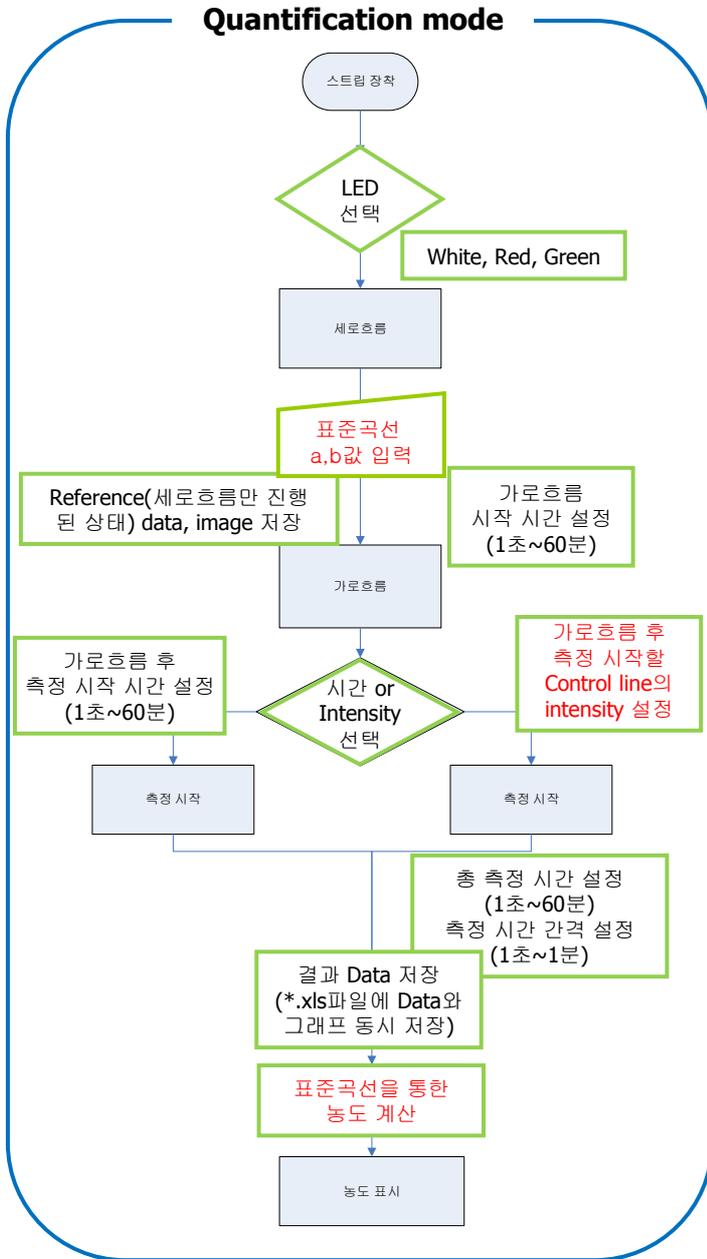


그림 22. 현장검사용 EOC 소프트웨어 모식도

### 제 3절 EOC 성능 평가

#### 1. 실험실 내 간이 민감도 및 특이도 실험

- 가. 현장에서 채혈한 실제 개 혈청을 사용하여 빠른 시간 내에 광견병 바이러스 항체 검사가 가능한 One-step EOC 분석시스템을 개발하는 것이 본 과제의 목적이므로, 이를 위해 실제시료를 이용한 분석시스템의 성능평가를 통해 그 유용성을 입증하고자 함.
- 나. 실제시료 검사에 사용될 혈청시료들은 주관기관인 바이오노트에서 제공 받았고, 이 혈청들에 대해 Bio-Rad사의 ELISA 키트와 자체 제조한 바이러스 고정 microtiter plate 분석 키트를 통해 면역분석을 수행하여 바이러스와의 반응성 유무 확인을 통한 양성 및 음성 시료 판별을 실시하였음.
- 다. 면역분석을 상기한 바와 같은 최적조건 하에서 수행한 결과, Bio-Rad사의 키트의 경우 설정된 cut-off 값을 기준으로 12개의 양성반응 혈청과 7개의 음성반응 혈청을 선별하였고, 본 연구실에서 제조한 키트의 경우 11개의 양성 혈청과 7개의 음성 혈청 그리고 cut-off border line (Gray zone)에 존재하는 1개 혈청을 선별하였음 (그림 22).

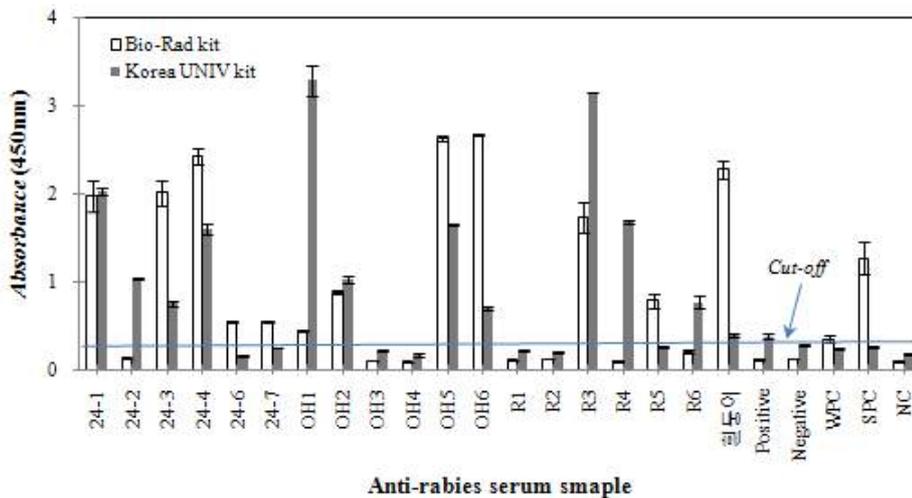


그림 23. 개 혈청들에 대한 Bio-Rad ELISA 키트와 자체 제조 면역분석 키트를 이용한 양성 및 음성 시료 판별.

- 라. 양성 및 음성 혈청의 판별에 있어서 약간의 차이가 있었는데, 이것은 Bio-Rad사의 ELISA 키트의 경우 바이러스 표면항원인 glycoprotein을 추출하여 고정항원으로 사용한 반면에 자체 제조한 키트의 경우에는 백신접종에 사용되는 ERA vaccine strain을 농축 후 고정항원으로 사용하였기 때문에 생기는 문제로 판단됨.
- 마. 예를 들어, 24-2 혈청의 경우 Bio-Rad사의 ELISA 키트에서는 음성을 나타내지만 자체 제조한 ELISA에서는 양성을 나타냈는데, 이와 같은 혈청의 경우 바이러스 표면항원인 glycoprotein에 대한 반응성이 낮은 반면에 그 외 항원인 membrane protein이나 RNA-binding protein, phosphoprotein 등에 대한 반응성이 높아 양성 신호 값을 나타내는 것으로 추측함.

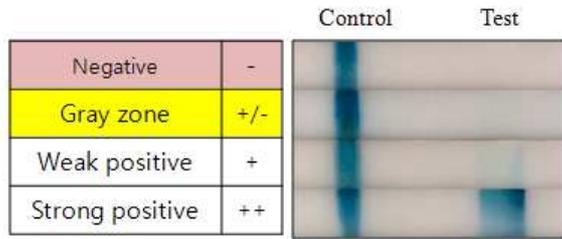


그림 24. [신호 세기에 따른 시료 판별]

## 2. 민감도 및 특이도

가. Rabies Ab Rapid kit에 특이도 및 민감도 검사를 하기 위하여 Rabies Ab 음성 112검체, 양성 153검체를 각 지역 동물병원으로부터 입수하였으며 검체로는 혈청을 사용하였다. 양성 검체는 백신을 접종한 후 최소한 2주 이상 경과된 개체였다. 음성 검체는 백신 접종 유무가 확인이 불명확하거나, 백신 접종이 없었던 개들이었다.



그림 25. EOC 키트의 외부 모형

나. 실험방법은 다음과 같이 최종적으로 setting된 방법으로 실시하였다.

- (1) 조립된 Kit에 혈청 검체  $2\mu\text{l}$ 를 ‘<1>’에 넣고 ‘<2>’에 assay buffer를  $50\mu\text{l}$  넣는다.
- (2) sample이 전개되기까지 5분을 상온에서 정치 후 HRP가 conjugation 되어있는 Anti-Canine IgG Monoclonal Antibody를 ‘<1>’에  $2\mu\text{l}$ 를, ‘<2>’에 assay buffer를  $50\mu\text{l}$  넣는다.
- (3) 2차 항체가 검체가 반응하도록 15분간 상온에서 정치 후 ‘<4>’에 흡습pad를 넣는다.
- (4) 흡습pad가 membrane의 기질액을 흡수할 수 있도록 밀어 넣고 TMB 발색 기질액을 ‘<3>’에  $150\mu\text{l}$  넣고 5분간 반응시킨 후 EOC reader 기기에서 signal 값을 측정하였다.

다. gold standard검사

Gold standard검사는 Bio-RAD社의 PLATELIA™ RABIES II Kit(Cat No. 355 1180)의 결과를 가지고 실시하였다.

라. 특이도 검사

특이도 검사를 위해서는 Bio-RAD社의 결과가  $0.125\text{EU/ml}$  이하인 검체로 검사를 시행하였다. EOC kit의 검사 판정은 test line 수치가 60 미만일 경우 음성으로, 60 이상인 경우를 양성으로 판독하였다. 특이도 총 112검체를 검사하였다. Bio-RAD社의 ELISA Kit에서는 모두 음성이었으나, EOC kit에서는 양성인 경우는 112 검체 중 1검체로, 특이도는 99.1%를 나타냈다.

표 7. 특이도 검사 결과

Sample No.	BioRad ELISA kit		Rabies EOC Kit		
	EU/ml	Decision	Control line	Test line	Decision
1	검 체<0.125EU/ml	Negative	223.90667	47.29467	Negative
2	검 체<0.125EU/ml	Negative	235.78933	46.52933	Negative
3	검 체<0.125EU/ml	Negative	252.31200	50.71733	Negative
4	검 체<0.125EU/ml	Negative	225.54267	52.86933	Negative
5	검 체<0.125EU/ml	Negative	222.69600	50.81600	Negative
6	검 체<0.125EU/ml	Negative	240.01467	46.71067	Negative
7	검 체<0.125EU/ml	Negative	243.65200	50.77867	Negative
8	검 체<0.125EU/ml	Negative	234.18800	50.80133	Negative
9	검 체<0.125EU/ml	Negative	221.97600	50.54533	Negative
10	검 체<0.125EU/ml	Negative	251.62133	50.87867	Negative
11	검 체<0.125EU/ml	Negative	233.70000	49.97067	Negative
12	검 체<0.125EU/ml	Negative	240.63867	46.40400	Negative
13	검 체<0.125EU/ml	Negative	245.72933	50.94800	Negative
14	검 체<0.125EU/ml	Negative	221.87733	50.82533	Negative
15	검 체<0.125EU/ml	Negative	239.68133	49.96933	Negative
16	검 체<0.125EU/ml	Negative	240.49067	48.75867	Negative
17	검 체<0.125EU/ml	Negative	233.01067	50.76133	Negative
18	검 체<0.125EU/ml	Negative	235.06000	49.70133	Negative
19	검 체<0.125EU/ml	Negative	239.01333	50.60533	Negative
20	검 체<0.125EU/ml	Negative	231.78800	108.39467	Positive
21	검 체<0.125EU/ml	Negative	227.47733	46.21600	Negative
22	검 체<0.125EU/ml	Negative	223.38400	50.64000	Negative
23	검 체<0.125EU/ml	Negative	239.69467	46.54133	Negative
24	검 체<0.125EU/ml	Negative	237.88400	48.66667	Negative
25	검 체<0.125EU/ml	Negative	252.06133	50.57200	Negative
26	검 체<0.125EU/ml	Negative	232.74933	50.97067	Negative
27	검 체<0.125EU/ml	Negative	228.10933	50.57733	Negative
28	검 체<0.125EU/ml	Negative	239.80667	50.66000	Negative

Sample No.	BioRad ELISA kit		Rabies EOC Kit		
	EU/ml	Decision	Control line	Test line	Decision
29	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	238.62000	50.45867	Negative
30	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	252.08533	49.98933	Negative
31	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	222.08400	50.76000	Negative
32	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	240.50267	49.97467	Negative
33	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	231.49867	47.14000	Negative
34	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	226.68933	51.47600	Negative
35	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	230.49200	50.66800	Negative
36	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	232.28400	50.44400	Negative
37	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	229.78000	49.71333	Negative
38	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	229.36667	46.39733	Negative
39	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	225.23600	48.67867	Negative
40	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	222.73600	50.88000	Negative
41	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	234.14000	48.67333	Negative
42	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	231.32800	50.60133	Negative
43	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	244.94533	51.39067	Negative
44	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	242.70400	50.68267	Negative
45	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	236.56133	50.42000	Negative
46	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	243.86800	50.96933	Negative
47	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	252.90400	46.21733	Negative
48	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	231.47600	50.56400	Negative
49	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	230.91733	51.50933	Negative
50	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	235.14267	52.86400	Negative
51	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	228.19733	46.60667	Negative
52	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	231.56533	53.09867	Negative
53	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	246.42267	50.84667	Negative
54	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	239.07733	52.21333	Negative
55	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	222.63733	50.88000	Negative
56	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	238.40933	50.56667	Negative

Sample No.	BioRad ELISA kit		Rabies EOC Kit		
	EU/ml	Decision	Control line	Test line	Decision
57	검 체<0.125EU/ml	Negative	235.47333	50.52267	Negative
58	검 체<0.125EU/ml	Negative	233.60667	51.14000	Negative
59	검 체<0.125EU/ml	Negative	245.57067	50.54667	Negative
60	검 체<0.125EU/ml	Negative	228.36000	50.45467	Negative
61	검 체<0.125EU/ml	Negative	232.08933	51.39067	Negative
62	검 체<0.125EU/ml	Negative	252.46400	53.37333	Negative
63	검 체<0.125EU/ml	Negative	221.82400	50.98800	Negative
64	검 체<0.125EU/ml	Negative	230.09200	49.70533	Negative
65	검 체<0.125EU/ml	Negative	251.59733	46.50267	Negative
66	검 체<0.125EU/ml	Negative	234.87867	52.41600	Negative
67	검 체<0.125EU/ml	Negative	240.46667	50.78133	Negative
68	검 체<0.125EU/ml	Negative	246.33467	53.00133	Negative
69	검 체<0.125EU/ml	Negative	245.27867	49.95733	Negative
70	검 체<0.125EU/ml	Negative	236.78800	46.26400	Negative
71	검 체<0.125EU/ml	Negative	235.12000	52.54667	Negative
72	검 체<0.125EU/ml	Negative	228.12800	50.46267	Negative
73	검 체<0.125EU/ml	Negative	241.54667	50.58267	Negative
74	검 체<0.125EU/ml	Negative	246.28000	53.23867	Negative
75	검 체<0.125EU/ml	Negative	237.62933	49.63333	Negative
76	검 체<0.125EU/ml	Negative	227.86267	46.30000	Negative
77	검 체<0.125EU/ml	Negative	252.34267	52.42533	Negative
78	검 체<0.125EU/ml	Negative	237.23333	49.68800	Negative
79	검 체<0.125EU/ml	Negative	245.54800	46.10000	Negative
80	검 체<0.125EU/ml	Negative	245.49067	48.83333	Negative
81	검 체<0.125EU/ml	Negative	235.92267	50.38800	Negative
82	검 체<0.125EU/ml	Negative	233.15067	52.68000	Negative
83	검 체<0.125EU/ml	Negative	240.01867	49.68667	Negative
84	검 체<0.125EU/ml	Negative	244.51600	46.08933	Negative

Sample No.	BioRad ELISA kit		Rabies EOC Kit		
	EU/ml	Decision	Control line	Test line	Decision
85	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	239.67067	48.86133	Negative
86	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	251.58267	52.15467	Negative
87	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	242.81067	48.82267	Negative
88	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	238.52267	46.15067	Negative
89	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	245.72133	50.42800	Negative
90	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	235.15067	46.37600	Negative
91	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	222.55733	51.83200	Negative
92	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	245.51867	50.33867	Negative
93	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	223.17067	46.39333	Negative
94	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	234.82800	50.42933	Negative
95	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	221.57067	46.17200	Negative
96	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	223.06133	52.20667	Negative
97	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	245.45467	46.31467	Negative
98	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	238.71733	51.38933	Negative
99	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	228.53333	46.64267	Negative
100	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	237.27467	52.24133	Negative
101	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	251.79733	46.41467	Negative
102	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	233.09600	48.68267	Negative
103	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	237.14533	46.42533	Negative
104	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	235.65733	51.83867	Negative
105	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	221.24133	51.47467	Negative
106	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	239.16400	49.61733	Negative
107	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	245.21333	46.47067	Negative
108	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	222.00667	51.92800	Negative
109	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	237.18933	46.16133	Negative
110	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	221.12133	52.28267	Negative
111	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	235.87733	50.52400	Negative
112	검 체 < 0.125EU/ml	Negative	245.92667	52.09200	Negative

마. 민감도 검사

민감도 검사는 Bio-RAD社의 PLATELIA™ RABIES II Kit(Cat No. 355 1180)로 0.5EU/ml 이상인 검체로 검사를 시행하였다. Rapid kit의 검사 판정은 특이도 검사와 동일하게 test line의 수치로 판독하였다. 민감도 검체는 Bio-Rad社 ELISA 양성 153 검체를 시행하여 Rapid kit 결과는 134 검체가 양성으로 판독되어, 민감도는 87.58%를 나타냈다.

표 8. 민감도 검사 결과

Sample No.	BioRad ELISA kit		Rabies EOC Kit		
	EU/ml	Decision	Control line	Test line	Decision
1	4EU/ml < 검체	Positive	229.36267	171.89600	Positive
2	4EU/ml < 검체	Positive	230.82800	183.07600	Positive
3	0.5EU/ml < 검체 < 1EU/ml	Positive	231.63733	45.43467	Negative
4	4EU/ml < 검체	Positive	228.01600	167.21867	Positive
5	0.5EU/ml < 검체 < 1EU/ml	Positive	225.48400	154.84133	Positive
6	4EU/ml < 검체	Positive	247.21200	196.31200	Positive
7	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	207.27600	133.82533	Positive
8	4EU/ml < 검체	Positive	246.17867	196.11333	Positive
9	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	228.06533	167.47600	Positive
10	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	231.83600	43.44000	Negative
11	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	250.72400	156.40400	Positive
12	4EU/ml < 검체	Positive	232.38667	204.20133	Positive
13	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	226.67600	133.28133	Positive
14	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	227.43467	166.37600	Positive
15	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	247.48767	49.26133	Negative
16	4EU/ml < 검체	Positive	251.59733	191.16800	Positive
17	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	196.38667	130.08000	Positive
18	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	227.39600	161.69067	Positive
19	4EU/ml < 검체	Positive	229.28933	195.59333	Positive
20	4EU/ml < 검체	Positive	251.62133	186.47333	Positive
21	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	227.25733	160.81067	Positive
22	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	252.31200	188.63067	Positive
23	4EU/ml < 검체	Positive	239.07733	190.17067	Positive
24	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	240.67067	156.32533	Positive
25	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	229.36267	94.99333	Positive
26	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	247.27467	162.30400	Positive

Sample No.	BioRad ELISA kit		Rabies EOC Kit		
	EU/ml	Decision	Control line	Test line	Decision
27	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	242.46400	47.57467	Negative
28	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	233.15333	207.10133	Positive
29	4EU/ml < 검체	Positive	232.73733	206.46000	Positive
30	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	249.32000	162.91200	Positive
31	4EU/ml < 검체	Positive	252.06133	195.50000	Positive
32	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	239.28667	199.83733	Positive
33	0.5EU/ml < 검체 < 1EU/ml	Positive	249.70800	163.00800	Positive
34	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	229.16133	169.83733	Positive
35	4EU/ml < 검체	Positive	233.20667	207.23867	Positive
36	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	230.86267	176.80933	Positive
37	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	237.64133	156.30400	Positive
38	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	231.76467	44.16800	Negative
39	4EU/ml < 검체	Positive	234.94933	208.93200	Positive
40	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	243.85200	156.44133	Positive
41	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	231.58133	101.26267	Positive
42	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	227.39600	85.73067	Positive
43	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	237.85733	48.33333	Negative
44	4EU/ml < 검체	Positive	226.59467	83.21733	Positive
45	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	227.59467	201.50133	Positive
46	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	227.25733	89.32267	Positive
47	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	229.73200	98.28933	Positive
48	4EU/ml < 검체	Positive	234.63200	208.87867	Positive
49	4EU/ml < 검체	Positive	234.03733	208.23600	Positive
50	4EU/ml < 검체	Positive	231.97033	50.40667	Negative
51	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	232.01467	102.39467	Positive
52	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	231.58133	178.46400	Positive

Sample No.	BioRad ELISA kit		Rabies EOC Kit		
	EU/ml	Decision	Control line	Test line	Decision
53	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	230.86267	100.78533	Positive
54	4EU/ml<검체	Positive	235.02400	209.09333	Positive
55	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	197.39333	127.15600	Positive
56	4EU/ml<검체	Positive	230.17867	176.63200	Positive
57	4EU/ml<검체	Positive	229.73200	173.94400	Positive
58	4EU/ml<검체	Positive	229.24400	201.87333	Positive
59	4EU/ml<검체	Positive	230.17867	99.16400	Positive
60	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	226.17867	82.45867	Positive
61	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	223.39333	81.23600	Positive
62	4EU/ml<검체	Positive	232.01467	180.94133	Positive
63	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	228.06533	91.82800	Positive
64	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	228.01600	85.10800	Positive
65	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	220.46267	80.54667	Positive
66	4EU/ml<검체	Positive	230.57600	202.46000	Positive
67	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	228.47733	93.75067	Positive
68	4EU/ml<검체	Positive	231.83867	179.59733	Positive
69	0.5EU/ml < 검체 < 1EU/ml	Positive	225.48400	81.68933	Positive
70	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	246.80000	147.27467	Positive
71	4EU/ml<검체	Positive	217.68933	101.89867	Positive
72	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	237.07733	48.39067	Negative
73	4EU/ml<검체	Positive	231.83867	101.63733	Positive
74	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	217.68933	151.08933	Positive
75	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	223.39333	154.03600	Positive
76	4EU/ml<검체	Positive	222.17867	49.95600	Negative
77	4EU/ml<검체	Positive	226.17867	156.34800	Positive
78	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	227.43467	94.63600	Positive

Sample No.	BioRad ELISA kit		Rabies EOC Kit		
	EU/ml	Decision	Control line	Test line	Decision
79	4EU/ml < 검체	Positive	220.46267	152.27067	Positive
80	4EU/ml < 검체	Positive	251.23867	195.88667	Positive
81	4EU/ml < 검체	Positive	231.29333	178.46400	Positive
82	4EU/ml < 검체	Positive	237.03867	176.80933	Positive
83	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	226.59467	168.77600	Positive
84	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	228.47733	159.88533	Positive
85	4EU/ml < 검체	Positive	232.66533	205.10000	Positive
86	0.5EU/ml < 검체 < 1EU/ml	Positive	210.91600	77.82800	Positive
87	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	215.51333	147.58400	Positive
88	4EU/ml < 검체	Positive	227.34933	50.87067	Negative
89	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	235.51333	177.00400	Positive
90	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	233.23333	138.97600	Positive
91	4EU/ml < 검체	Positive	223.20133	198.93600	Positive
92	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	226.02533	197.88533	Positive
93	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	241.45630	99.53433	Positive
94	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	246.23435	101.73247	Positive
95	4EU/ml < 검체	Positive	233.20800	207.98933	Positive
96	4EU/ml < 검체	Positive	239.45780	193.31200	Positive
97	4EU/ml < 검체	Positive	247.34334	147.13352	Positive
98	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	229.16133	90.25333	Positive
99	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	248.23767	50.12667	Negative
100	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	235.02400	137.88000	Positive
101	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	224.94933	96.04400	Positive
102	0.5EU/ml < 검체 < 1EU/ml	Positive	243.62133	47.36533	Negative
103	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	234.63200	99.55733	Positive
104	4EU/ml < 검체	Positive	252.90400	195.82133	Positive

Sample No.	BioRad ELISA kit		Rabies EOC Kit		
	EU/ml	Decision	Control line	Test line	Decision
105	4EU/ml<검체	Positive	227.34933	187.92267	Positive
106	4EU/ml<검체	Positive	231.46433	179.59733	Positive
107	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	224.09333	49.24000	Negative
108	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	248.43570	192.15312	Positive
109	4EU/ml<검체	Positive	231.42000	203.92133	Positive
110	4EU/ml<검체	Positive	238.97477	180.94132	Positive
111	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	241.78967	140.94178	Positive
112	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	234.03733	96.72533	Positive
113	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	251.79733	195.16267	Positive
114	0.5EU/ml < 검체 < 1EU/ml	Positive	233.20800	92.75067	Positive
115	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	231.39437	166.37600	Positive
116	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	233.20667	160.86533	Positive
117	4EU/ml<검체	Positive	250.51733	192.70267	Positive
118	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	251.26267	159.88533	Positive
119	4EU/ml<검체	Positive	251.32147	50.24933	Negative
120	4EU/ml<검체	Positive	231.42600	176.63200	Positive
121	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	250.71767	49.22800	Negative
122	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	252.43434	160.81067	Positive
123	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	240.32427	154.03600	Positive
124	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	236.54647	96.72533	Positive
125	4EU/ml<검체	Positive	247.09373	186.21867	Positive
126	0.5EU/ml < 검체 < 1EU/ml	Positive	252.26250	156.34800	Positive
127	4EU/ml<검체	Positive	251.03453	154.84133	Positive
128	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	239.24545	83.53333	Positive
129	4EU/ml<검체	Positive	251.41600	195.78133	Positive
130	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	247.34200	147.58400	Positive

Sample No.	BioRad ELISA kit		Rabies EOC Kit		
	EU/ml	Decision	Control line	Test line	Decision
131	4EU/ml < 검체	Positive	233.15333	189.00667	Positive
132	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	245.37800	48.14133	Negative
133	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	246.42357	146.07067	Positive
134	4EU/ml < 검체	Positive	246.50933	193.94400	Positive
135	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	243.78545	134.42243	Positive
136	4EU/ml < 검체	Positive	246.33067	200.89600	Positive
137	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	239.78657	141.16400	Positive
138	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	249.92340	151.08933	Positive
139	4EU/ml < 검체	Positive	236.09467	46.25600	Negative
140	4EU/ml < 검체	Positive	232.06667	182.19200	Positive
141	4EU/ml < 검체	Positive	219.16523	172.99600	Positive
142	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	237.01433	142.40400	Positive
143	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	244.37732	88.51333	Positive
144	4EU/ml < 검체	Positive	245.58377	43.49467	Negative
145	4EU/ml < 검체	Positive	238.62933	178.77600	Positive
146	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	242.34352	141.74643	Positive
147	4EU/ml < 검체	Positive	234.90400	181.69067	Positive
148	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	245.25237	152.27067	Positive
149	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	239.76200	136.48667	Positive
150	4EU/ml < 검체	Positive	243.37200	45.75067	Negative
151	0.5EU/ml < 검체 < 1EU/ml	Positive	215.51333	89.35600	Positive
152	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	243.58793	138.02933	Positive
153	4EU/ml < 검체	Positive	248.15200	197.47600	Positive

바. EOC 키트의 분석 신뢰도

특이도, 민감도를 바탕으로 한 분석 신뢰도는 다음과 같이 계산되어 개발된 EOC 키트가 진단키트로서의 신뢰도가 있음을 확인할 수 있었다.

(1) 특이도 : 99.1% (95% CI : 95~100%)

- (2) 민감도 : 87.6% (95% CI : 81~92%)
- (3) k value : 0.85 (95% CI : 0.18~1.00)
- (4) Equivalence : 92.5% (95% CI : 89~95)
- (5) Positive predictive value : 99.3%
- (6) Negative predictive value : 85.4%

3. 검출 시기 시험

가. 4 마리의 6개월령 비글견에 광견병 백신 주사(ERA strain, 녹십자수의약품)를 근육으로 접종한뒤, 3일, 7일, 10일, 14일, 21일, 28일 후에 광견병 항체 검사를 BioRad ELISA kit 및 개발한 Rabies EOC Kit를 동시 실험한 결과, 7일 이전까지는 모두 음성을 나타냈었고, 접종 7일 이후부터 미약하게 양성을 보여, BioRad ELISA키트와 동등 또는 그 이상의 검출 기간을 비교할 수 있었다.

표 9. 백신 접종후 검출시기 시험- Dog 1

DPI	BioRad ELISA kit		Rabies EOC kit		
	Dog No. 1				
	EU/ml	Decision	Control line	Test line	Decision
DPI 3	검체<0.125EU/ml	Negative	232.15646	43.12348	Negative
DPI 7	0.5EU/ml < 검체 < 1EU/ml	Positive	251.10347	96.54632	Positive
DPI 10	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	246.04561	154.15675	Positive
DPI 14	4EU/ml<검체	Positive	243.14654	201.87946	Positive
DPI 21	4EU/ml<검체	Positive	245.54651	198.45641	Positive
DPI 28	4EU/ml<검체	Positive	239.97975	197.45641	Positive

표 10. 백신 접종후 검출시기 시험- Dog 2

DPI	BioRad ELISA kit		Rabies EOC kit		
	Dog No. 2				
	EU/ml	Decision	Control line	Test line	Decision
DPI 3	검체<0.125EU/ml	Negative	223.56533	44.92267	Negative
DPI 7	0.5EU/ml < 검체 < 1EU/ml	Positive	239.69467	98.99600	Positive
DPI 10	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	240.46667	163.46133	Positive
DPI 14	4EU/ml<검체	Positive	247.42256	203.20667	Positive
DPI 21	4EU/ml<검체	Positive	208.68933	202.14000	Positive
DPI 28	4EU/ml<검체	Positive	238.52267	198.82933	Positive

표 11. 백신 접종후 검출시기 시험- Dog 3

DPI	BioRad ELISA kit		Rabies EOC kit		
	Dog No. 3				
	EU/ml	Decision	Control line	Test line	Decision
DPI 3	검체<0.125EU/ml	Negative	233.60667	43.21200	Negative
DPI 7	0.5EU/ml < 검체 < 1EU/ml	Positive	231.47600	111.77200	Positive
DPI 10	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	228.10933	159.15200	Positive
DPI 14	4EU/ml<검체	Positive	209.87333	203.26000	Positive
DPI 21	4EU/ml<검체	Positive	222.06667	203.68267	Positive
DPI 28	4EU/ml<검체	Positive	225.50800	199.68133	Positive

표 12. 백신 접종후 검출시기 시험- Dog 4

DPI	BioRad ELISA kit		Rabies EOC kit		
	Dog No. 4				
	EU/ml	Decision	Control line	Test line	Decision
DPI 3	검체<0.125EU/ml	Negative	229.57733	43.59600	Negative
DPI 7	0.5EU/ml < 검체 < 1EU/ml	Positive	221.87600	86.27867	Positive
DPI 10	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	250.51333	178.40400	Positive
DPI 14	4EU/ml<검체	Positive	246.80933	215.06910	Positive
DPI 21	4EU/ml<검체	Positive	243.21200	216.07200	Positive
DPI 28	4EU/ml<검체	Positive	247.99067	208.57867	Positive

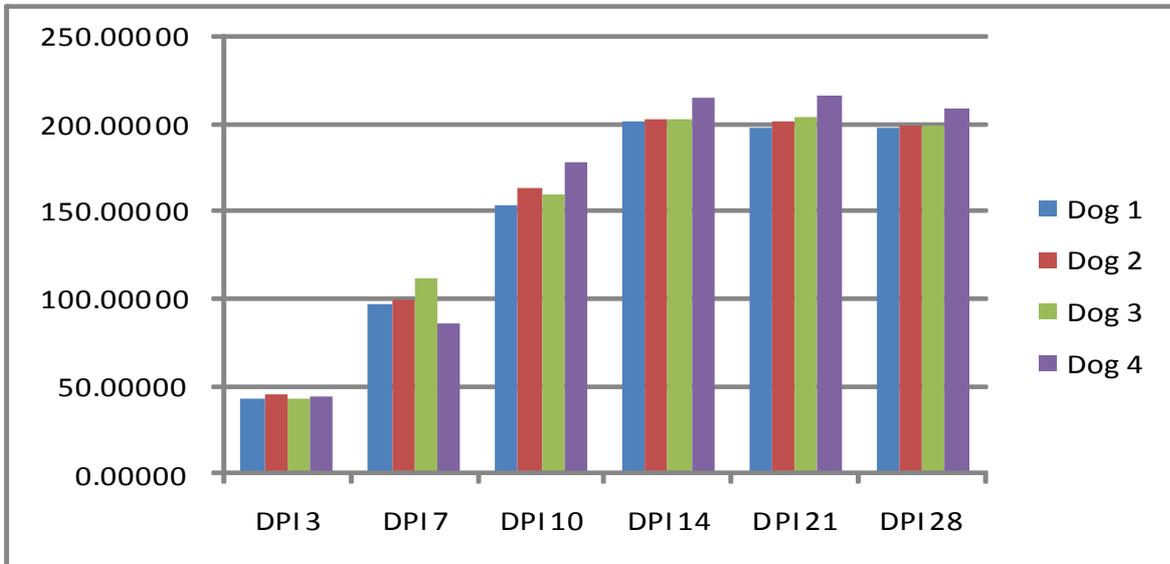


그림 26. 검출시기 시험 (양성 cut off 는 60을 기준으로 정하였다).

#### 4. 검출 한계 시험

가. Rabies 고양이성 혈청(4EU/ml < 검체) 을 2진 희석하여, BioRad ELISA kit 와 개발한 Rabies EOC kit에 각각 실험한 결과, BioRad ELISA kit 는 2<sup>3</sup>까지, 본사 개발 Rabies EOC kit는 2<sup>5</sup>까지 검출하였으므로, BioRad ELISA키트보다 약 4배 정도 검출한계가 높은 것으로 보였다.

표 13. 타사 키트 비교 검출 한계 시험

	BioRad ELISA kit		Rabies EOC kit		
	EU/ml	Decision	Control line	Test line	Decision
양성혈청 원액	4EU/ml < 검체	Positive	251.01067	200.17467	Positive
양성혈청2 <sup>-1</sup>	2EU/ml < 검체 < 4EU/ml	Positive	245.23467	168.64133	Positive
양성혈청2 <sup>-2</sup>	1EU/ml < 검체 < 2EU/ml	Positive	242.23867	136.47867	Positive
양성혈청2 <sup>-3</sup>	0.5EU/ml < 검체 < 1EU/ml	Positive	249.68667	107.36933	Positive
양성혈청2 <sup>-4</sup>	0.25EU/ml < 검체 < 0.5EU/ml	Gray zone	240.07200	82.05733	Positive
양성혈청2 <sup>-5</sup>	0.125EU/ml < 검체 < 0.25EU/ml	Gray zone	248.10800	69.09200	Positive
양성혈청2 <sup>-6</sup>	검체 < 0.125EU/ml	Negative	235.16400	50.56667	Negative
양성혈청2 <sup>-7</sup>	검체 < 0.125EU/ml	Negative	250.17467	51.91067	Negative

#### 5. 교차 반응성 실험

개발된 광견병 항체 EOC Kit를 Canine Distemper virus, Canine Parvovirus, Canine

Parainfluenza virus, Canine adenovirus (ICH) 고항체 혈청과 교차 반응성을 실험한 결과, Canine Rabies 양성 혈청에서만 양성 결과를 나타냈으며, 나머지 혈청에서는 모두 음성을 나타내어 광견병 항체 이외 항체와는 교차 반응성을 보이지 않았다.

표 14. 교차 반응성 실험

바이러스	항체 역가	Rabies Rapid Kit		
		Control line	Test line	Decision
Canine Distemper virus	1:256 (SN)	245.23467	0	Negative
Canine Parvovirus	1:1280(HI)	249.68667	0	Negative
Canine Parainfluenza virus	1:128(SN)	240.07200	0	Negative
Canine adenovirus (ICH)	1:256(SN)	235.16400	0	Negative
Rabies virus	4EU/ml < 검체	221.87600	208.57867	Positive

#### 6. 외부 임상 평가 의뢰

개발된 광견병 항체 EOC kit는 현재 OIE Reference lab 에 의뢰중이다.

#### 7. 제조 허가 서류 제출

개발된 광견병 항체 EOC Kit는 국립수의과학검역원에 품목 허가를 준비 중이다.

## 제 4절 추가 계획

### 1. 다중 측정 면역센서 시스템

가) 다중 측정 면역센서 시스템은 위와 같은 성능의 단일 면역센서 시스템 검출 기술에서 한 단계 더 발전시키고, 신속진단법 중 동시 다중 진단이 가능한 real time PCR 기법에 대응하는 차세대 면역센서로 발전시키고자 한다.

나) 최적 분석 조건을 반영한 다중 측정 면역센서 카트리리지 구현. 일단, 다중 측정이 가능한 면역센서를 구현하기 위해서는, 동일한 면역스트립의 제한된 영역 상에 포획항체들을 배열하여 EOC 면역센서를 제조할 수 있음. 하지만, 이를 이용하여 면역분석 수행 시 각 균에 대한 포획항체와 HRP-탐지항체 중합체들 간에 교차반응 발생 가능성이 매우 높고 이 문제를 해결하기 위해 지대한 노력이 필요할 것으로 예측됨. 그래서, 이 문제를 해결하기 위한 여러 다른 방안들이 있을 수 있겠지만, 아래 제시한 두 설계 안의 장점과 단점들을 보완하고 이것을 바탕으로 새로운 근본적인 해결책을 개발하여 다중 측정 면역센서 카트리지를 연구하고자 한다.

#### 다) 첫째 설계 안

사용자 편의성이 고려된 가장 바람직한 설계 안으로, 동일 면역스트립 상에 각각의 포획항체를 ladder bar 형식으로 공간적으로 분리하여 배열하는 것인데 (그림 27) 이 방안은 분석 시 포획항체와 탐지항체 간의 교차반응으로 인하여 분석특이성과 민감성을 유지하여 제조하기에 가장 어려움.

##### (1) 장점

- ① 소량의 시료를 한 번에 주입하여 다중 식중독 균을 동시에 분석할 수 있음
- ② 신호발생을 위한 효소기질의 가로흐름이 각 포획항체 자리에 대해 독립적으로 구현됨
- ③ 면역센서 카트리지의 크기가 소형화 됨

##### (2) 단점

- ① 교차반응성의 잠재적인 가능성이 내재됨

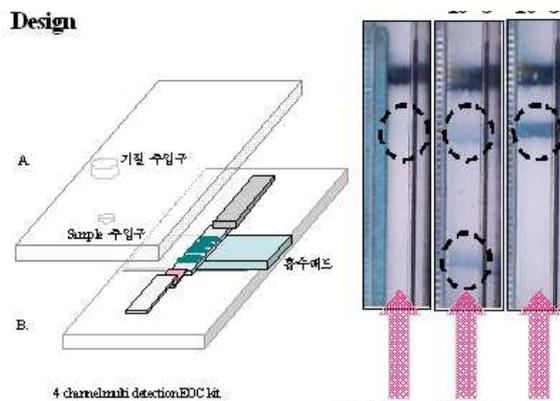


그림 27. ladder bar 형식의 다중 측정 면역센서 카트리리지.

라) 둘째 설계 안

단일측정으로부터 결정된 분석특이도와 민감도를 동시 다중분석 시에도 독립적으로 유지시킬 수 있는 설계 안으로, 각 단일측정 시 제조한 면역스트립을 병렬로 배열하고 효소기질용액의 가로흐름을 스트립 간 채널로 연결하는 것인데 (그림 28) 이 방안은 제조에 있어 가장 용이하지만 시료 량과 제조원가가 분석물질 수에 비례하여 증가함.

(1) 장점

- ① 단일측정 시에서와 같이 여러 타겟 대한 면역분석이 독립적으로 유지됨.
- ② 이론적으로, 단일측정 시 구한 분석특이도와 민감도가 그대로 재연될 수 있겠음.

(2) 단점

- ① 효소기질용액 공급 시 가로흐름이 각 면역스트립을 거쳐 반복하여 진행되므로 신호발생 간섭현상이 우려됨.
- ② 또한 가로흐름 시간이 길어져 발색기질인 TMB의 공기산화에 의한 background 발생 가능성이 있음.
- ③ 분석물질 수에 비례하여 시료 량과 재료비가 증가됨.

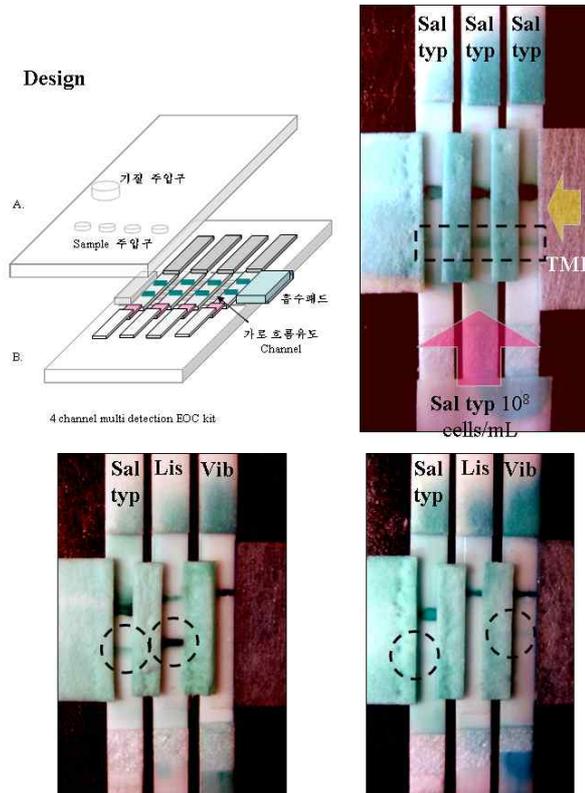


그림 28. 병렬 형식의 다중 측정 면역센서 카트리지

## 제 4 장 목표달성도

### 1 절 목표 달성도

연구기관	주요연구내용	목표 달성율 (%)
바이오노트 (주관기관)	○ 광견병 바이러스 배양	100
	○ PCR	100
	○ Cloning	100
	○ Expression	100
	○ 광견병 바이러스 농축	100
	○ 진단적 민감도, 특이도 검사	100
	○ 검출한계 측정	100
	○ 교차 반응 측정	100
	○ 백신 접종 후 검출시기 측정	100
	○ 외부 임상 평가	100
	○ 제조 허가 서류 제출	95
(협동기관) 고려대학교	○ 플라스틱 칩 보완 설계 및 사출 제작	100
	○ 혈구 분리 모듈 개발	100
	○ Protein A-HRP 중합체 패드 및 재조합 항원 고정 NC membrane 제작	100
	○ 효소 기질 흐름 조절을 통한 EOC 기반 분석 최적 조건 결정	100
	○ 분석 성능 특성화	100
	○ One step EOC 플라스틱 칩 설계	100
	○ 플라스틱 칩 사출 및 보완	100
	○ One-step용 탐지기 하드 웨어 및 소프트웨어 제작	100
	○ 현장 검사용 신호탐지기 개발	100
	○ EOC 시스템 분석 성능 최적화	100

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1절 연구개발결과의 활용방안

현재 SYSTEM	EOC 개발후
<ul style="list-style-type: none"> <li>• OIE 인증 실험실만이 항체 검사 가능</li> <li>• 특별한 이유에 한정되어 검사: 해외출국등</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 국가 검역기관</li> <li>• 항만, 공항</li> <li>• 일반 동물병원</li> <li>• 반려동물의 건강 검진</li> <li>• 광견병 근절 사업</li> </ul>

그림 29. 현재 System 과 EOC 개발 후 상황 비교

1. 현재 국제 수역 사무국에서 광견병 표준 실험실로 지정받은 프랑스 식품 안전 위생국 (AFSSA) 에서 엄격한 테스트를 거쳐 국제 공인 기관으로 인증 받은 실험실만이 국제적으로 광견병 항체 검사의 결과가 유효함. 우리나라의 국립수의과학검역원은 2007년 7월에 광견병 항체 검사 국제 공인 기관으로 인증 받은 상태임. 현재 OIE에서 인정한 광견병 항체 검사 방법으로는 Fluroescent antibody virus neutralisation test (FAVN), the Rapid fluroescent focus inhibition test (RFFIT), Enzyme -linked immunosorbent assay (ELISA) 임
2. 하지만, 광견병 항체 EOC 진단키트가 개발되면, 기존의 FAVN, RFFIT와 같은 복잡하고 시간이 오래 소요되는 진단 방법의 단점을 보완하고, 동물 병원이나, 방역 기관에서 1차적으로 실험을 한 뒤, 국제 공인 기관에서 최종 확진을 하는 시스템을 활성화한다면, 실험의뢰인은 정확하고 신속한 결과를 얻게 될 것임

### 제 2절 기대성과



그림 30. 기존 실험 방법과 광견병 항체 현장 검출용 바이오 센서와의 비교

## 1. 기술적 측면

가. 기존 OIE 유효 검사법: FAVN 약 2주 소요

REEIT 약 1주 소요

ELISA 약 4시간 소요(수행이 실험실 내로 국한)

나. 광견병 항체 검출을 위한 EOC 바이오센서 시스템

(1) 광견병 항체를 동물병원, 방역기관 등 현장에서 20분 내 속성으로 1단계 수행으로 검사할 수 있음

(2) 분석민감도가 기존 colloidal gold 기반의 육안 판독 크로마토그래피 원리를 이용한 진단키트보다 10-100배 이상 높으므로, 현재 OIE에서 인증 받은 국제공인기관에서 행하는 FAVN, RFEIT, ELISA 등의 기존 진단법의 단점을 보완하여 빠르고 정확하게 광견병 항체 여부를 검사할 수 있음

## 2. 경제적 · 산업적 측면

가. 국내에서 해외로 반려동물을 데리고 나가기 위해서는 광견병 백신이 필수적이어서 백신이 제대로 효력을 발휘하는지 알기 위해서는 광견병 바이러스의 항체 검사가 필요함. 광견병 바이러스 항체 검사는 국립수의과학검역원과 (주)중앙백신연구소가 광견병 항체 검사기관으로 인증 받은 상태. 현재는 주로 중앙백신 연구소에서 항체 검사를 실시하고 있으나, 복잡하고 많은 시간이 소요됨.

나. 항체가 생기지 않았을 경우에는 다시 백신을 주사한 뒤, 몇 주 후에 항체 검사를 해야 하므로 실험의뢰자는 소비되는 시간이 많아지게 됨. 광견병 항체 검출을 위한 EOC 진단키트는 간단한 장비가 있는 지역 동물병원이나 실험실에서 1차적으로 광견병 항체 실험을 할 수 있다면 복잡한 과정과 오래 소요되는 시간을 줄일 수 있을 것으로 판단됨.

다. 또한 광견병 항체 검출을 위한 EOC 바이오센서가 국제적으로 인증 받는다면, 현재 OIE에서 인증 받은 기관에서만 광견병 항체 실험을 할 수 있는 패러다임 자체가 바뀌어 광견병 항체진단 시스템을 새로 구축할 수 있을 뿐만 아니라 진단시장을 리드하는 효과가 있을 것으로 기대됨.

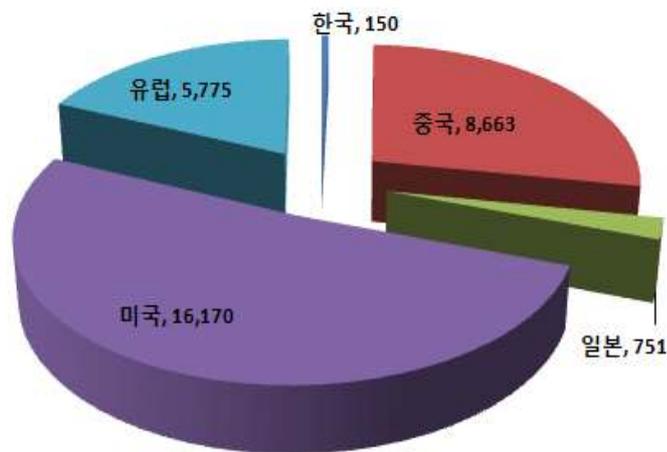
## 3. 수요 조사 계획

가. 현재 시장 조사

(1) 현재까지 광견병항체에 대한 정확한 시장성 분석 data는 없는 상황임. 다만, 여러 가지 data를 종합하여 애완견에 대한 것만 추론하면 (2005년 국내 애완견수 2,600,000마리, 출국한 애완견수 : 20,000마리, 0.77%, 2005년 국립수의과학검역원 자료), 전세계적으로는 연간 315억원의 현재 시장이 있음을 확인할 수 있음.

[애완견에 대한 광견병 항체 진단 키트 시장 규모]

국가	애완견 사육수	입출국 마리수 (전체 마리수 X 0.77%)	시장성 (입출국마리수 X 7,500원)
한국	2,600,000	20,020	150,150,000
중국	150,000,000	1,155,000	8,662,500,000
일본	13,000,000	100,100	750,750,000
미국	280,000,000	2,156,000	16,170,000,000
유럽	100,000,000	770,000	5,775,000,000
합계	545,600,000	4,201,120	31,508,400,000



#### 나) 신규 시장 조사

- (1) 현재까지는 해외 출국하는 개체에 한정해서 검사를 실시하는 것이 광견병 항체진단의 시장이었음. 이는 광견병 항체 진단이 어렵고, 비용이 많이 소모되기 때문이었음. 그러나, 본 키트의 개발로 신규시장(일반 동물병원, 공항, 항만, 기업부설 연구소)이 개척될 수 있으므로 전체 애완동물의 2% 정도가 추가로 시장이 형성될 것으로 예측되며, 이는 2010년에 204억, 2014년에 818억원의 신규시장이 있을 것으로 추정됨.

#### 다) 추가적인 수요 조사

- (1) 시장조사는 이론적인 실험견 마리수를 추정하였으나, 각 관련 기관에 전화문의나, 설문조사를 통하여 개발한 광견병 항체 EOC 키트에 대한 수요조사를 할 예정이다.

## 제 6 장 참고문헌

1. Bernhard dietzschold, James H, Cox, Lothar G, Schneider, Tadeusz J, Wiktor and hiliary koprowski, Isolation and Purification of a Polymeric Form of the Glycoprotein of Rabies, Virus J. gen. Virol. 40:131-139. 1978.
2. Monica Grandien, Evaluation of Tests for Rabies Antibody and Analysis of Serum Responses After Administration of Three Different Types of Rabies Vaccines, J. Clinical Microbiology. 36:263-267, 1977.
3. Kader Muhamuda, Shampur Narayan Madhusudana, Vasanthapuram Ravi, Development and evaluation of a competitive ELISA for estimation of rabies neutralizing antibodies after post-exposure rabies vaccination in humans, International Journal of Infectious Diseases 11:441-445, 2007.
4. Simone Niederhäuser, Dorothy Bruegger, Marie-Luise Zahno, Hans-Rudolf Vogt, Ernst Peterhans, Reto Zanoni, Giuseppe Bertoni, A synthetic peptide encompassing the G5 antigenic region of the rabies virus induces high avidity but poorly neutralizing antibody in immunized animals, Vaccine 26: 6749-6753. 2008.
5. A. Servat, M. Feysaguet, I. Blanchard, J.L. Morize, J.L. Schereffer, F. Boue, F. Cliquet, A quantitative indirect ELISA to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic and wild carnivores, Journal of Immunological Methods 318:1 - 10. 2007.
6. Se-Hwan Paek Seung-Hwa Lee, Joung-Hwan Cho, and Young-Sang Kim, Development of Rapid One-Step Immunochromatographic Assay, Methods 22:53-60. 2000.
7. Joung-Hwan Cho, Eui-Hwan Paek, Il-Hoon Cho, and Se-Hwan Paek, An Enzyme Immunoanalytical System Based on Sequential Cross-Flow Chromatography, Anal. Chem. 77:4091-4097. 2005.
8. Joung-Hwan Cho, Seung-Mok Han, Eui-Hwan Paek, Il-Hoon Cho, and Se-Hwan Paek, Plastic ELISA-on-a-Chip Based on Sequential Cross-Flow Chromatography, Anal. Chem. 78:793-800. 2006.
9. Seung-Mok Hana, Joung-Hwan Chob, Il-Hoon Choa, Eui-Hwan Paek, Hee-Bok Ohc, Bong-Su Kimc, Chunsun Ryuc, Kyunghee Lee c, Young-Kee Kimd, Se-Hwan Paek, Plastic enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)-on-a-chip biosensor for botulinum

neurotoxin A, *Analytica Chimica Acta* 587: 1-8. 2007.

10. Il-Hoon Choa, Eui-Hwan Paekb, Young-Kee Kimc, Joo-Ho Kimd, Se-Hwan Paeka, Chemiluminometric enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)-on-a-chip biosensor based on cross-flow chromatography, *Analytica Chimica Acta* 632:247 - 255. 2009.
11. Simone Niederhäuser, Dorothy Bruegger, Marie-Luise Zahno, Hans-Rudolf Vogt, Ernst Peterhans, Reto Zanoni<sup>1</sup>, Giuseppe Bertoni. A synthetic peptide encompassing the G5 antigenic region of the rabies virus induces high avidity but poorly neutralizing antibody in immunized animals. *Vaccine*, 52:6749-6753. 2008.
12. Ênio J. Bassi, Javier Vernal, Camila Zanluca, Hernán Terenzi, Carlos R. Zanetti. Expression, purification and immunodetection of a recombinant fragment (residues 179 - 281) of the G protein from rabies virus ERA strain. *Protein Expr Purif* 59(2):309-313. 2008.
13. A. Servat , M. Feyssaguet, I. Blanchard, J.L. Morize, J.L. Schereffer, F. Boue, F. Cliquet. A quantitative indirect ELISA to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic and wild carnivores. *J Immunol Methods*. 318(1-2):1-10. 2007.
14. Y. He, D. Gao, M. Zhang. Expression of the nucleoprotein gene of rabies virus for use as a diagnostic reagent. *J Virol Methods*. 138(1-2):147-51. 2006.
15. N. Johnson, K. L. Mansfield and A. R. Fooks. Canine vaccine recipients recognize an immunodominant region of the rabies virus glycoprotein. *J Gen Virol*. 83:2663-2669. 2002.