

KAERI/RR-3312/2011

타미플루 내성 신종인플루엔자 A (H1N1) 진단 키트 개발

Development of a diagnostic kit for
Tamiflu-resistant influenza A (H1N1)

KAERI

한국원자력연구원

제 출 문

한국원자력연구원장 귀하

본 보고서를 2011 연도 “ 타미플루 내성 신종인플루엔자 A (H1N1) 진단 키트 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2012. 1. 20

과 제 명 : 타미플루 내성 신종
인플루엔자 A (H1N1) 진단 키트 개발

과제책임자 : 정일래

참 여 자 : 홍성욱

KAERI

보고서 요약서

과제고유번호	KAERI/RR-3312-2011	해 당 단 계 연구 기 간	2011.02.01- 2011.12.31	단 계 구 분	(1단계)/ (총 1 단 계)
연구사업명	중사업명				
	세부사업명	자체연구개발사업			
연구과제명	대과제명	-			
	세부과제명	타미플루 내성 신종인플루엔자 A (H1N1) 진단 키트 개발			
연구책임자	정일래	해당단계 참여 연구원수	총 : 2 명 내부 : 2 명 외부 : 명	해당단계 연구비	정부:20,000천원 기업: 천원 계 :20,000천원
		총연구기간 참여 연구원수	총 : 2 명 내부 : 2 명 외부 : 명	총연구비	정부:20,000천원 기업: 천원 계 :20,000천원
연구기관명 및 소속부서명	한국원자력연구원 원자력환경안전연구부		참여기업명	-	
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :			
위탁연구	연구기관명 :	연구책임자 :			
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서면 수	30
<p>현재 사용중인 신종플루 진단방법으로는 미국 CDC (질병관리통제센터)에서 이미 보고된 real time RT-PCR 방법이지만, 이 방법은 단지 일반적인 신종플루 H1N1 (타미플루 민감성) 감염 여부만을 확인할 수 있을 뿐, 타미플루에 내성을 보이는 신종플루 H1N1 내성 변이주의 감염 여부는 전혀 검출하지 못하는 한계점을 가지고 있다. 본 연구에서는 타미플루 내성 및 민감성 신종인플루엔자 (신종플루)를 동시에 진단할 수 있는 multiplex RT-PCR 키트를 제작하기 위해, swInfA, swH1, MP 및 NA (뉴라미니다아제neuraminidase) 프라이머 세트를 이용하여 상기 유전자들을 동시에 진단할 수 있는 복합 RT-PCR 방법을 확립하였다. 신종인플루엔자 A(H1N1) 뉴라미니다아제(neuraminidase, NA) 유전자의 총 길이는 1410bp이며, 이 중에서 823-825번째 뉴클레오티드 CAC가 H275에 해당한다. 잘 알려진 타미플루 내성 변이는 H275Y로서, 275번째 아미노산인 히스티딘(histidine)이 티로신(tyrosine)으로 돌연변이된 것이며, 정확히는 823번째 뉴클레오티드 C가 T로 바뀌어 생긴 것이다. 타미플루 내성 돌연변이 바이러스를 전기영동 겔 상에서 확인하기 위하여, 뉴라미니다아제 단백질의 275 아미노산 부위에 해당하는 염기서열이 변형된 프라이머를 제작하였다. 상기의 신규 제작된 프라이머와, swInfA, swH1, MP 프라이머 세트를 동시에 포함하고 있는 단일 분석 키트를 구성한 후 적절한 RT-PCR 방법을 시험함으로써 최종적으로 타미플루 민감성 및 내성 진단키트 구성을 완료하였다.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한글	신종인플루엔자A, H1N1, 다중 RT-PCR, 진단키트, 타미플루, 뉴라미니다아제			
	영어	swine influenza A, H1N1, multiplex RT-PCR, diagnostic kit, tamiflu, neuraminidase			

요 약 문

I. 제 목

타미플루 내성 신종인플루엔자 A (H1N1) 진단 키트 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1) 목적

전통적인 RT-PCR 방법에 의한 H1N1 신종인플루엔자 A (H1N1) 분석용 kit 의 개발

2) 필요성

신종 인플루엔자 A는 A형 인플루엔자 바이러스가 변이를 일으켜 생긴 새로운 바이러스로, 2009년 전 세계적으로 사람에게 감염을 일으키고 있는 대유행 (pandemic) 호흡기 질환이다. 이를 치료하기 위한 치료제가 개발되어 있는데, 과도하고 폭넓은 항바이러스제의 사용은 내성 바이러스주의 발현을 앞당기게 되는 치명적인 결과를 초래할 가능성이 크다. 따라서 정부로서는 현재 창궐중인 신종인플루엔자 H1N1 외의 또다른 변종 바이러스 출현을 억제하기 위해 되도록 항바이러스제의 투약을 억제하면서도 한편으로는 신속한 선제적 치료를 동시에 달성해야 하는 어려움에 봉착하고 있다. 따라서 신속한 확진검사만이 항바이러스제의 무분별한 투약을 줄여 내성변이주 발생을 완화시키는 대안이 될 수 있다. 그럼에도 불구하고, 확진판정이 가능한 전문 인력의 부족, 고가의 검사료 등으로 인해 신속한 확진검사가 매우 어려운 실정이다.

한편, 우리나라에서도 얼마 전 신종플루 내성 바이러스주 감염에 의한 사망사고가 발생하였다. 본 환자는 타미플루 처방을 받고도 사망하였는데, 그 원인은 타미플루 내성을 일으키는 H275Y 서열에 돌연변이가 일어난 변종 바이러스주에 감염되었기 때문으로 확인되었다. 따라서 신속한 감염 확진 검사 외에도 확진환자 중 내성 변이주에 감염이 되었는지를 함께 검사하는 것이 대단히 중요한데, 이러한 과정은 결국 바이러스 감염에 의한 치료효과도 높이고 내성도 줄일 수 있는 궁극적인 접근방법으로 인식되고 있다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

연구내용	연구결과	달성도(%)
1. 신종인플루엔자 VIRUS 확보	질병관리본부로부터 표준 virus 확보 완료	100 %
2. 분석방법 분석 - CDC 표준 분석방법 확보 - 국내 신종플루 검사 kit 확보 및 시험	CDC 표준 분석방법 확보 Seegen/Solgent/Introgen으로부터 kit 확보 및 시험 완료	100 %
3. RT-PCR 방법에 의한 분석방 법 개발 - primer design - PCR 시험	primer design 완료 PCR 분석방법 확립 multiplex RT-PCR 법 확립 야생형/내변종 동시 진단법 확립	100 %
4. 서열분석 방법 개발	서열 분석방법 개발 완료	100 %

IV. 연구개발결과

현재 사용중인 신종플루 진단방법으로는 미국 CDC (질병관리통제센터)에서 이미 보고된 real time RT-PCR 방법이지만, 이 방법은 단지 일반적인 신종플루 H1N1 (타미플루 민감성) 감염 여부만을 확인할 수 있을 뿐, 타미플루에 내성을 보이는 신종플루 H1N1 내성 변이주의 감염 여부는 전혀 검출하지 못하는 한계점을 가지고 있다. 본 연구에서는 타미플루 내성 및 민감성 신종인플루엔자 (신종플루)를 동시에 진단할 수 있는 multiplex RT-PCR 키트를 제작하기 위해, swInfA, swH1, MP 및 NA (뉴라미니다아제, neuraminidase) 프라이머 세트를 이용하여 상기 유전자들을 동시에 진단할 수 있는 복합 RT-PCR 방법을 확립하였다. 신종인플루엔자 A(H1N1) 뉴라미니다아제(neuraminidase, NA) 유전자의 총 길이는 1410bp이며, 이 중에서 823-825번째 뉴클레오티드 CAC가 H275에 해당한다. 잘 알려진 타미플루 내성 변이는 H275Y 로서, 275번째 아미노산인 히스티딘(histidine)이 티로신(tyrosine)으로 돌연변이된 것이며, 정확히는 823번째 뉴클레오티드 C가 T로 바뀌어 생긴 것이다. 타미플루 내성 돌연변이 바이러스를 전기영동 겔 상에서 확인하기 위하여, 뉴라미니다아제 단백질의 275 아미노산 부위에 해당하는 염기서열이 변형된 프라이머를 제작하였다. 상기의 신규 제작된 프라이머와, swInfA, swH1,

MP 프라이머 셋트를 동시에 포함하고 있는 단일 분석 키트를 구성한 후 적절한 RT-PCR 방법을 시험함으로써 최종적으로 타미플루 민감성 및 내성 진단키트 구성을 완료하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획 및 건의사항

1. 활용계획

- 기존의 real-time PCR cyclers에 의한 고가의 분석방법과는 별도로 각 연구실에 널리 보급되어 있는 PCR cyclers를 이용한 저가의 분석방법 개발
- 신규 primer design으로 인한 특허권 확보
- 신규 primer를 이용한 H1N1 표준 유전자 서열 분석에 이용
- 내성 virus의 신속한 분석 및 환자별 맞춤형 치료 전략 제공
- 신규의 저가 분석 kit 개발에 응용 가능
- 내성 virus 주의 신속한 분석을 위한 중대형 실용화/사업화 연구에 적극 활용 예정
- 동남아시아 등 저개발국가, 제 3세계국가에 매출 기대
- 기술이전 추진

2. 연구결과 활용시 문제점 및 건의사항

구분	문제점 및 건의사항 등
기술적 요인	실제 병원환자를 대상으로 한 field test가 필요하나 상당한 시간과 자금이 필요하므로 관련업체에 기술을 이전하는 것이 바람직할 것임. 이를 위해 후속 마무리 연구, 전문가 자문, 기술 홍보 및 해외 Biomarket 소개 등이 필요함
시장적 요인	현재 신종플루 바이러스 진단 시장이 매우 위축되어 있으나, 향후 신종인플루엔자 창궐을 대비하여 선제적인 시장 진입을 위해 빠른 기술확립을 통한 이전 및 상용화가 필요함
환경적 요인	현재 바이러스 진단제 시장이 매우 급변하고 있는 실정이며, 본 연구에서 개발된 기술의 조기 상용화를 위해서는 후속 연구가 반드시 필요함
기타 요인	전문가 집단과의 토의를 통한 기술보완 및 검증이 필요하나 제한된 연구환경 및 연구비로 인해 기술확립에 애로가 있음
건의사항	본 과제가 목표로 했던 기술개발은 완성되었으나, 본 기술의 사업화를 위해 경제적인 kit의 구성, 기술적 검증 및 경제성 분석이 필요하여 1년간의 후속연구가 반드시 필요함

SUMMARY

(영문요약문)

I. Project Title

Development of a diagnostic kit for Tamiflu-resistant influenza A (H1N1)

II. Objective and Importance of the Project

1. Objective

Development of a diagnostic kit for conventional RT-PCR based-swine influenza A (H1N1) detection

2. Importance of the Project

Swine influenza A, which has been pandemic worldwide since 2009, is a new type virus derived from A type influenza. Although some drugs against the contagious disease, such as relenza and tamiflu, have been commercialized, those drug resistant viruses could be also followed by the wide usage of drugs. For examples, Tamiflu-resistant viruses, the mutant type viruses, can not be cured by the treatment of tamiflu anymore. Thus, a quick diagnosis for the wild type (tamiflu-sensitive) and mutant (tamiflu-resistant) virus would be essential in order to prevent the wide spread of viruses. In spite of that, unfortunately, very few studies have been conducted until now. If we could tell the differences between tamiflu-resistant and -sensitive patients using by the proper diagnostic kit, not only patient specific treatment would be possible, but also the spread of viruses would be effectively prevented.

III. Scope and Contents of Project

Contents	Scope	Results (%)
1. Obtaining of swine influenza A H1N1	Obtaining of swine influenza A H1N1 from NIH	100 %
2. Diagnosis - Obtaining of CDC methods - Obtaining of domestic diagnostic kits and test	- Obtaining of CDC methods - Obtaining of domestic diagnostic kits and test	100 %
3. Development of new RT-PCR methods - primer design - PCR test	- primer design - PCR test - multiplex RT-PCR test - Establishment of simultaneous detection methods	100 %
4. Development of sequencing methods	Development of sequencing methods	100 %

IV. Result of Project

Currently used detection methods for the swine influenza A H1N1, which were originated from CDC, USA, can not detect the tamiflu-resistant swine influenza A H1N1, but only can detect tamiflu-sensitive wine influenza A H1N1. In this study, all the primers for the detection of swInfA, swH1, MP and NA (neuraminidase) have been developed in order to detect both tamiflu-resistant and tamiflu-sensitive swine influenza A H1N1s simultaneously, and then, new multiplex RT-PCR methods has been established.

V. Proposal for Applications

1. Proposal for Applications

- Development of another low-cost detection method using by PCR cyclers which come into wide use, instead of high-cost RT-PCR cyclers
- Obtaining of patent about new primers developed
- Application on sequencing of standard swine influenza A H1N1
- Prompt analysis of tamiflu-resistant viruses and supply of a strategy for the patient specific treatment
- Application on another research projects for commercialization
- Expectation of market entry to east Asia or lower developed countries
- Licensing out of the technology

2. Problems and recommendations

Parts	Problems and recommendations
Technical parts	For Technology licensing out, follow-up research, consultation, public promotion, and introduction in oversea Biomarket need
Marketing parts	The market for swine influenza detection is now shrank, but rapid technology licensing out and commercialization would be required in order to enter market anticipatively.
Environmental Parts	Diagnostic market for the virus has been greatly changed, but follow-up studies could be essential for the earlier commercialization
Others	Consultations will be required
	It is necessary to conduct follow-up studies for the commercialization of this technology

CONTENTS

Chap. 1 Introduction	-----	11
1. Final research goals	-----	11
2. Research contents	-----	11
3. Strategies and methods	-----	11
4. R/D management systems	-----	12
5. Expectations and applications	-----	12
Chap. 2 Current R/D status	-----	13
1. Economic, social and technical importances	-----	13
2. Research achievements	-----	13
3. Weak points	-----	14
4. Prospective	-----	15
5. Doubleness and differences with other results	-----	15
Chap. 3 Research contents and Results	-----	16
1. Research contents and results	-----	16
2. Ripple and expected effects	-----	24
Chap. Achievements and Contributions	-----	25
1. Research goals and valuation basis	-----	25
2. Research goals and achievements	-----	26
Chap. 5 Application Plans	-----	27
가. Performance of results	-----	27
나. Applications of results	-----	27
다. Necessity of follow-up research	-----	28

목 차

제 1 장	서론	-----	11
1.	연구개발의 최종목표	-----	11
2.	연구개발 내용	-----	11
3.	추진전략 및 방법	-----	11
4.	연구개발 추진체계	-----	12
5.	기대성과 및 활용방안	-----	12
제 2 장	국내외 기술개발 현황	-----	13
1.	연구개발의 경제·사회·기술적 중요성	-----	13
2.	지금까지의 연구개발 실적	-----	13
3.	현 기술상태의 취약성	-----	14
4.	앞으로의 전망	-----	15
5.	국내 유사사업/과제와의 중복성·차별성 검토	-----	15
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	-----	16
1.	연구수행내용 및 결과	-----	16
2.	파급효과 및 기대효과	-----	24
제 4 장	연구개발목표 달성도 및 대외 기여도	-----	25
1.	연구개발목표 및 평가기준	-----	25
2.	연구 목표 내용 및 달성도	-----	26
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	-----	27
가.	연구개발결과의 활용실적	-----	27
나.	연구개발결과의 활용계획	-----	27
다.	차년도 계속과제 추진 필요성	-----	28

제 1 장 서론

1. 연구개발의 최종목표

- 타미플루 민감성/내성을 동시에 진단할 수 있는 multiplex RT-PCR법 개발
- 국내특허출원

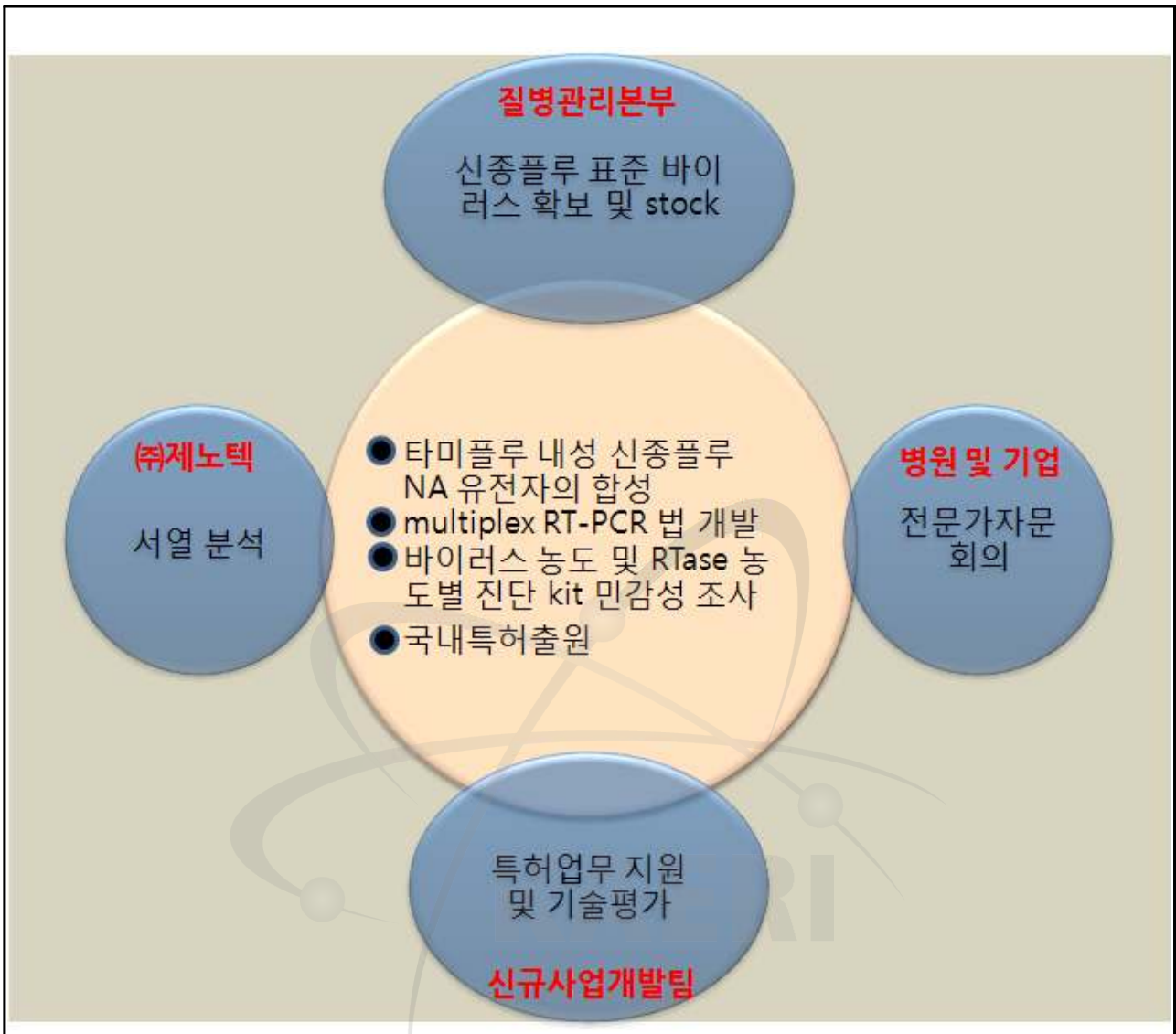
2. 연구개발 내용

- 신종플루 표준 바이러스 확보 및 stock
- 뉴라미니다아제 (NA) 유전자 중 내변종 서열 분석
- 타미플루 내성 신종플루 NA 유전자의 합성 (PCR 증폭기술 이용)
- MP, HA, NA 유전자의 동시적 multiplex RT-PCR 법 개발
- 정상 NA 및 변이 NA 유전자의 동시적 진단법 (multiplex RT-PCR) 개발
- 바이러스 농도 및 RTase 농도별 진단 kit의 민감성 조사
- 국내특허출원 및 기술평가 의뢰 및 분석
- 기술이전 시도

3. 추진전략 및 방법

- 미국 CDC 질병관리센터에서 내변종 바이러스 DB 검색 및 분석 (web search)
- 기존의 정상 신종플루 검사법 현황 조사 (kit 판매회사 대상)
- 진단 kit 시장 현황 및 유전자 분석 방법에 대한 자문회의 개최 (진단회사 및 병원)
- 내변종 진단에 필수적인 primer design 및 시험을 통한 multiplex RT-PCR 방법 확립

4. 연구개발 추진체계



5. 기대성과 및 활용방안

- 세계 유일의 신종플루 내성 진단키트 개발 원천기술 확보
- 관련 기술의 특허 및 기술이전 타당성 검토
- 시장성은 신종플루 발병에 연동되어 있어 현재로서는 정확한 예측이 어려우나 작년 한 해 동안 국내 신종플루 진단 kit (RT-PCR 법) 관련 순수 시장은 약 80억원으로 추산됨
- 국내 및 해외 시장 독점 및 신규 시장 창출
- 중국, 미국, 일본, 유럽 등 해외 시장 선도
- 신속한 진단을 통한 내성 변종 신종플루의 확진 및 환자 맞춤형 치료방법 제시
- 상용화 가능시, real time RT-PCR 방법 개발에 적극 활용 가능

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 연구개발의 경제·사회·기술적 중요성

- 현재 사용중인 신종플루 진단방법으로는 미국 CDC (질병관리통제센터)에서 이미 보고된 real time RT-PCR 방법임
- 이 방법은 현재 전세계에서 사용중이며, 한국에서는 (주)바이오니아 등에서 kit를 제작/판매 중에 있음
- 그 외에 기존의 전통적인 RT-PCR 방법 (conventional RT-PCR)을 이용하여 전기영동상에서 확인할 수 있는 kit를 (주)씨젠, (주)인트론바이오테크놀로지, LG 생명과학 등에서 판매 중에 있음
- 그러나 이들의 방법은 각각 약 11만원 (real time RT-PCR)에서 5만원 (conventional RT-PCR)까지의 고비용으로 판매되고 있음
- 상기 방법은 단지 일반적인 신종플루 H1N1 (타미플루 민감성) 감염 여부만을 확인할 수 있을 뿐, 타미플루에 내성을 보이는 신종플루 H1N1 내성 변이주의 감염 여부는 전혀 검출하지 못하는 한계점을 가지고 있음
- 따라서 기존의 방법으로는 신종플루 내성변이주를 초기에 진단 할 수 없어서 내성 변이주에 감염된 환자의 치료시기를 놓침으로써 환자의 생명을 위태롭게 함은 물론 해당 내성 변이주의 전파를 저지하는데 커다란 애로점을 가지고 있음
- 현재, 우리나라를 비롯한 전세계에서는 신종플루 증상시 선제적으로 타미플루 처방을 하는데 그치고 있으며, 확진검사 역시 내변종 여부를 가리지 않고 단지 바이러스 자체에 감염되었다는 사실만을 확인하는 수준에 머물러 있음. 따라서 확진환자라도 일반적인 타미플루 민감성 바이러스에 감염되었는지, 타미플루를 처방하여도 치료되지 않는 내성 바이러스주에 감염되었는지를 전혀 알지 못하고 있는 실정임.
- 신종플루 진단시에 타미플루 내성 바이러스 감염여부를 초기에 확진가능하다면, 타미플루 외에 리렌자 등 환자 맞춤형 치료를 함으로써 환자의 생존율을 크게 증진시킬 수 있을 것으로 사료됨
- 따라서 타미플루 내성 및 민감성 여부를 동시에 확진할 수 있는 새로운 개념의 multiplex RT-PCR 법이 개발된다면, 기존의 확진검사 방법을 대체함으로써 기술적으로도 중요하고, 경제적으로 막대한 부를 창출할 수 있음은 물론, 공중보건학적인 측면에서도 막대한 효과를 볼 수 있을 것으로 판단되어 개발의 시급성이 요구됨

2. 지금까지의 연구개발 실적

- 치료제인 타미플루에 내성을 가짐으로써 치료효과를 무색하게 하여 사망에 이르게 하는 신종플루 내성변이주의 99% 이상은 바이러스 내에 존재하는 유전자 중, 뉴라미니다아제 (NA) 유전자의 275번째 아미노산에서 일어난 H275Y 변종이라고 널리 알려져 있음
- 즉, NA 유전자의 823-825번째 nucleotide에 해당하는 CAC 가 TAC로 바뀌어 일어나는데, 이는 275번째 아미노산인 histidine이 tyrosine으로 바뀌어 타미플루에 내성을 보이게 되는 돌연 변이 내성주임
- 이러한 내성 변이주 H275Y를 검사하기 위해서는 유전자를 분리/증폭한 후, 증폭 산물의 추출 및 서열검사 (sequencing)라고 하는 부가적인 시간을 필요로 하여, 환자의 치료시기를 늦춘은 물론 경제적으로나 노동적으로도 문제가 있으며, 환자가 사망한 이후에야 비로소 분석을 하는 실정임
- 내성변이주의 확인이 이처럼 중요한데도, 병원 현장에서 내성변이주 확인을 하지 못하는 가장 큰 이유는 신종플루 바이러스 자체 검사법과 내성검사법을 동시에 진행하지 못한다는 점, 간편한 내성 검사법 자체가 개발되지 못하였다는 점, 비용이 증가한다는 점 등이 있음
- 상기에 기술한 바와 같이 우리나라를 비롯한 전세계적으로도 정상의 신종플루 바이러스 (타미플루 민감성, 즉 타미플루를 처방하면 치료가 되는 바이러스)와 신종플루 내변종 바이러스 (타미플루 내성, 타미플루를 처방하여도 치료되지 못함)을 동시에 진단할 수 있는 방법은 아직 전혀 개발되어 있지 못함
- 한국원자력연구원에서는 지난 10 여년간의 방사선생물학 연구과정 중 요소기술로 확립한 분자생물학적 기술 및 유전체 기술을 이용하여 정상의 신종플루 바이러스와 신종플루 내변종 바이러스를 동시에 진단할 수 있는 기반기술을 확보하여 오고 있음

3. 현기술상태의 취약성

- 현재 국내외적으로 RT-PCR 방법이 개발되어 실제 병원 현장에서 사용되고 있으나 내변종 동시진단 키트는 전무한 실정이어서 비교대상이 없음

4. 앞으로의 전망

- 바이러스의 특성 중 가장 문제가 되는 것이 생존을 위해 수시로 자신의 유전자를 바꿈으로써 변종을 생성하게 되는 것임. 신종플루 역시 예외가 아니어서 타미플루 처방이 이미 만연되어 있는 현 상태에서 타미플루에 내성을 보이는 신종플루의 변종 출현 가능성이 상당히 높을 것으로 사료됨
- 따라서 앞으로는 일반적인 신종플루 진단 방법 외에 타미플루 내성 (변종) 진단 방법이 필수적으로 요구될 것으로 사료됨

5. 국내 유사사업/과제와의 중복성 · 차별성 검토

기관명	과제명(연구책임자)	유사성	차별성
(주) 바이오니아	자체과제	RT-PCR 법	변종 분석 불가능
(주) 씨젠	자체과제	RT-PCR 법	변종 분석 불가능
(주) 인트론바이오테크놀로지	자체과제	RT-PCR 법	변종 분석 불가능
(주) 바이오니아 /충남대/생명공학연구원*	신종인플루엔자 A(H1N1) 변종 및 타미플루 내성 바이러스 감염 검사 키트 및 시스템 개발	기밀사항으로, 상세한 과제내용 파악 불가 (연구내용으로는 신종플루 변종 및 내성균 추적 모니터링 시스템 구축, 변종 발생시 이를 포함한 진단키트 개발, 타미플루 내성균 진단키트 개발 등임)	

(참고) 현재 상용중인 신종플루 진단 kit 개발 과제는 이미 미국에서 보고되어 공개된 내용을 기반으로 각 기업에서 일부 기능을 변경하여 개발한 것이 전부임

* 연구비 국비 11억 / 연구기간 2009.09-2011.02 (17개월)

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 연구수행내용 및 결과

1) 타미플루 민감 신종인플루엔자 A(H1N1)의 검출을 위한 복합 (multiplex) RT-PCR

swInfA, swH1 및 MP 프라이머 세트를 이용하여 타미플루 민감 신종인플루엔자 H1N1 바이러스를 검출하기 위하여, 복합 RT-PCR을 수행하였다. 구체적으로, 복합 RT-PCR은 Qiagen one step RT-PCR 키트(cat.no. 210212)를 이용하여 하기 [표 1]에서 나타낸 바와 같이 수행하였다.

【표 1】

성분	부피/반응	최종 농도
주형 RNA 또는 DNA	1 ul	- 바이러스 RNA의 경우 1×10^4 게놈 카피 - DNA의 경우 1ng
Qiagen 효소 혼합물	1 ul	-
Qiagen 버퍼	5 ul	1X
dNTP 혼합물	1 ul	각 dNTP 400 uM
프라이머 세트		
정방향 프라이머	변동	2- 10 pmol
역방향 프라이머	변동	2- 10 pmol
DW로 총 부피 25 ul가 되도록 맞춤.		

RT-PCR은 55°C에서 30분간 역전사를 수행하고, 95°C에서 15분간 초기 PCR 활성화 단계를 거친 후 94°C, 1분 변성, 60°C 1.5분 어닐링, 72°C 1분 신장의 사이클을 45 사이클 수행한 다음, 72°C에서 10분 동안 최종 신장하는 단계를 거쳐 수행되었다. 주형으로는 신종인플루엔자 A(H1N1) 바이러스(질병관리본부 병원체 관리번호 NCCP7005)의 RNA 1 ul(1×10^4 게놈 카피)를 이용하였다. 프라이머는 각각 정방향/역방향 프라이머로 구성된 Sw infA 프라이머 세트(서열번호 1 및 2), Sw H1 프라이머 세트(서열번호 3 및 4) 및 MP 프라이머 세트(서열번호 5 및 6)를 이용하였고, 각 프라이머는 100 uM 농도로 (주)제노텍에서 합성주문한 것을 10배 희석하여 10 uM의 농도를 스탁 용액(stock solution)으로 사용하였으며, 1종 또는 다수의 서로 다른 프라이머 세트를 한 튜브(tube)에 섞어 사용하였다. PCR 산물은 2% 아가로스 겔에서 전기영동하여 확인하였다.

그 결과, swInfA, swH1 및 MP 프라이머 세트를 이용하여 각각의 유전자가 검출됨을 확인하였으며, 또한 세 가지 프라이머를 동시에 섞은 경우, 한 번에 세 가지 유전자를 검출할 수 있음을 확인하였다(그림 1).

M: DNA 사이즈 마커(구입처 : 대한민국 (주) 바이오니아 100bp DNA ladder),

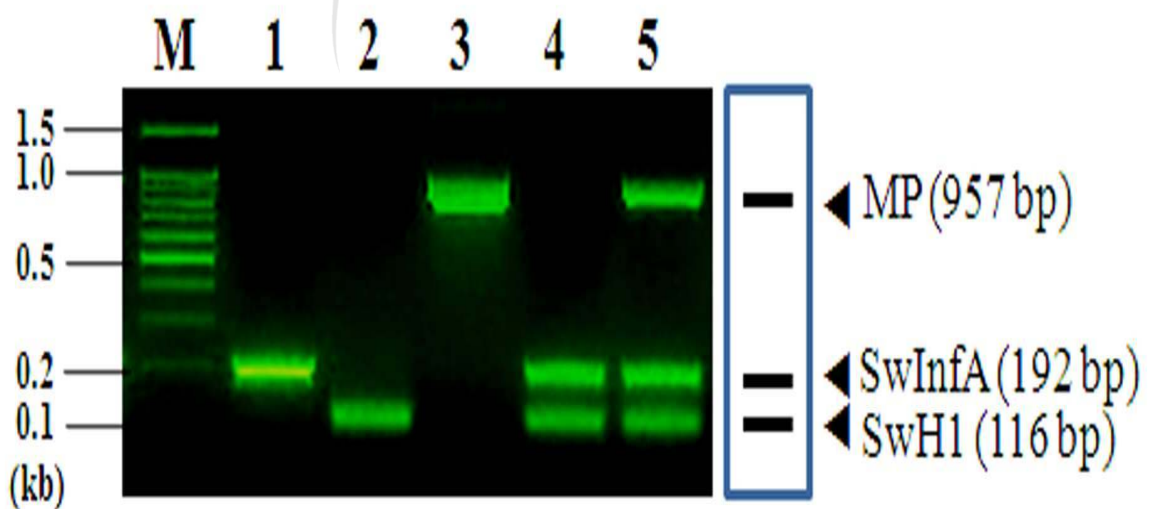
레인 1: Sw infA 프라이머 쌍을 사용한 RT-PCR,

레인 2: Sw H1 프라이머 쌍을 사용한 RT-PCR,

레인 3: MP 프라이머 쌍을 사용한 RT-PCR,

레인 4: Sw infA 프라이머 쌍 + Sw H1 프라이머 쌍을 사용한 RT-PCR

레인 5: Sw infA/ + Sw H1/ + MP 프라이머 쌍을 사용한 RT-PCR



<그림 1>

이 방법은 기존의 일반적인 전통적 RT-PCR 방법과 유사한 방법이지만, 단가적인 측면에서 상당히 저렴한 방법이며, 또한 코딩 서열을 완전히 포함하고 있는 MP 유전자를 증폭시킬 수 있어, MP 프라이머 세트를 사용하여 MP 유전자를 전체 sequencing할 수 있다. 실제 이 방법을 통하여 서열분석이 가능함으로 sequencing을 수행하여 검증하였다.

2) 타미플루 민감성 및 내성 유전자 검출을 위한 신종인플루엔자 A(H1N1) 뉴라미니다아제 (neuraminidase) 유전자 서열을 이용한 프라이머 제작

신종인플루엔자 A(H1N1) 뉴라미니다아제(neuraminidase, NA) 유전자의 총 길이는 1410bp이며, 이 중에서 823-825번째 뉴클레오티드 CAC가 H275에 해당한다. 잘 알려진 타미플루 내성 변이는 H275Y로서, 275번째 아미노산인 히스티딘(histidine)이 티로신(tyrosine)으로 돌연변이된 것이며, 정확히는 823번째 뉴클레오티드 C가 T로 바뀌어 생긴 것이다. 타미플루 내성 돌연변이 바이러스를 전기영동 겔상에서 확인하기 위하여, 뉴라미니다아제 단백질의 274-275 아미노산 부위에 해당하는 염기서열이 변형된 프라이머를 제작하였다.

Amino acids	→	G	K	I	V	K	S	V	E	M	N	A	P	N	Y	H275
ORFs	→	GGAAAG	ATA	GTC	AAA	TCA	GTC	GAA	ATG	AAT	GCC	CCTAAT	TAT	CAC		
NAnor (temp)	→	-----	-----	-----	-----	-----	-----	C	GAA	ATG	AAT	GCC	CCTAAT	TAT	CAC	
NAres (temp)	→	-----	-----	-----	-----	-----	-----	C	GAA	ATG	AAT	GCC	CCTAAT	TAT	TAC	
NAnor2-F	→	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
NAres2-F	→	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
NAnor4-F	→	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
NAres4-F	→	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
NAnor5-F	→	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
NAres5-F	→	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
NAnor6-F	→	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
NAres6-F	→	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

프라이머 서열의 C-말단 부위의 염기서열은 주형에의 부착성을 결정짓는 중요한 부위로, 이 C-말단 염기서열을 조작함으로써 정상의 타미플루 민감 바이러스 및 타미플루 내성 돌연변이 바이러스주에 대해 특정 프라이머만이 붙거나 붙지 않도록 제작하였으며, 프라이머 서열의 변형은 상기 그림에서와 같은 방법으로 수행되었다.

상기 그림에서 temp라고 명기된 것은, 타미플루 민감성 및 내성 돌연변이 NA 유전자 주형을 제작하기 위해 사용된 프라이머를 의미하고, Nor이라고 명기된 것은 타미플루 민감성을 갖는 정상(Normal)의 신종인플루엔자를 의미하며, res는 타미플루 내성(resistant)을 갖는 내성 돌연변이 신종인플루엔자를 의미한다. 그 결과, 정상의 타미플루 민감 바이러

스 특이적 정방향 프라이머 5개 및, 돌연변이의 타미플루 내성 바이러스 특이적 정방향 프라이머 5개를 제작하였으며, 이를 하기 [표 2]에 나타내었다.

【표 2】

프라이머	서열	서열 번호
swInfA-F	GGCACGGTCAGCACT	1
swInfA-R	GACCAAATGAAAACCCAGC	2
swH1-F	GTGCTATAAACACCAGCCT	3
swH1-R	ACAGGATTGAGGAATGTCCCG	4
MP-F	ATGAGTCTTCTAACCGAGGTC	5
MP-R	ACCATCGTCAACATCCACAG	6
NA-F	GCAAAAAGCAGGAGTTTAAAATG	7
NA-R	TGACCAGTAGAAACAAGGAGTTT	8
HA-F	AGCAAAAAGCAGGGGAAAATA	9
HA-R	CAAGGGTGTTTTCTCATGC	10
NAnor-F (temp)	CGAAATGAATGCCCCTAATTATCAC	11
NAres-F (temp)	CGAAATGAATGCCCCTAATTATTAC	12
NAnor2-F	AATGAATGCCCCTAATTGCC	13
NAres2-F	AATGAATGCCCCTAATTGCT	14
NAnor3-F	AATGAATGCCCCTAATTGAC	15
NAres3-F	AATGAATGCCCCTAATTGAT	16
NAnor4-F	AATGAATGCCCCTAATTAGC	17
NAres4-F	AATGAATGCCCCTAATTAGT	18
NAnor5-F	AATGAATGCCCCTAATTGTC	19
NAres5-F	AATGAATGCCCCTAATTGTT	20
Na-M	TGTCCTATTGGTGAAGTTCCTC	21

3) 신종인플루엔자 A(H1N1) 뉴라미니다아제(neuraminidase) 유전자에서 유래된 타미플루 민감성 및 내성 프라이머의 확인을 위한 PCR 주형의 증폭

상기에서 제작된 신종인플루엔자 A(H1N1)의 NA 유전자에서 유래된 타미플루 민감성 및 내성 프라이머의 선택적 결합 여부를 확인하기 위하여 PCR 주형을 증폭하였다.

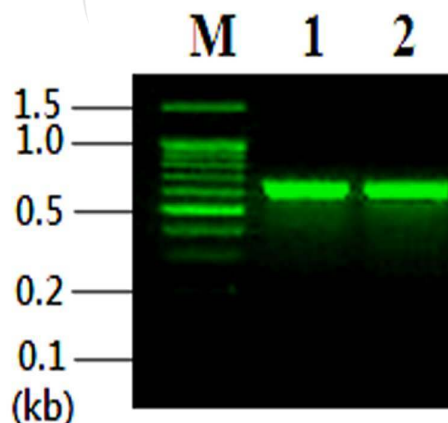
구체적으로, NAnor-F(temp), NAres-F(temp)를 정방향 프라이머로, NA-R(서열번호 8) 프라이머를 역방향 프라이머로 하여, 각 프라이머를 0.4 uM의 농도로 처리하여, 상기에 기재된 방법으로 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, NA 정상 주형 및 NA 내성 주형이 각 프라이머를 통해 증폭되었음을 확인하였다(그림 2).

아래 그림 2는 신종인플루엔자 A(H1N1) 뉴라미니다아제(neuraminidase) 유전자에서 유래된 타미플루 민감성 및 내성 프라이머의 확인을 위해 PCR 주형을 증폭한 후, 그 결과를 확인한 아가로스 겔 사진이다. 이 때 질병관리본부로부터 분양받은 정상인플루엔자 A (H1N1) RNA를 주형으로 사용하였으며, 민감성 및 내성 뉴라미니다아제를 증폭시키기 위해 각각 NAnor-F(temp)/NA-R 프라이머 쌍 및 NAres-F(temp)/NA-R 프라이머 쌍을 프라이머로 사용하였다. 이 때 각 primer는 각각 10 pmol을 사용하였다

M: DNA 사이즈 마커(구입처 : 대한민국 (주) 바이오니아 100bp DNA ladder),

레인 1: NAnor-F(temp)/NA-R 프라이머 쌍을 사용한 RT-PCR 결과물인 NA 정상 주형 (634 bp)

레인 2: NAres-F(temp)/NA-R 프라이머 쌍을 사용한 RT-PCR 결과물인 NA 내성(변이) 주형 (634 bp).



<그림 2>

4) 타미플루 민감성 및 내성 신종인플루엔자 A(H1N1) 바이러스주에 대한 신규 제작 프라이머의 선택적 결합 여부 확인

타미플루 민감성 및 내성 신종인플루엔자 A(H1N1) 바이러스주에 대해 상기에서 제작된 신규 프라이머가 선택적으로 결합하는지의 여부를 확인하기 위하여, 상기에서 증폭된 NA 정상 주형 및 NA 내성 주형을 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 즉, 상기에서 증폭된 NA 정상 유전자 및 NA 내성 유전자를 주형으로 1 ng 처리하고, 상기에서 제작된 NAnor2F/NA-R, NAnor4F/NA-R, NAnor5F/NA-R, NAres2F/NA-R, NAres4F/NA-R 및 NAres5F/NA-R 프라이머 쌍을, 각 프라이머의 농도를 10 pmol로 처리하여, 상기에 기재된 방법에서 PCR 사이클을 20 사이클로 변형한 조건으로 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, nor 프라이머는 타미플루 민감성을 보이는 주형에만 결합하고, Res 프라이머는 타미플루 내성을 보이는 H275Y 변이 주형에만 결합하였다(그림 3). 특히, NAnor5F 및 NAres5F 정방향 프라이머를 이용한 경우, 가장 진하게 밴드가 검출되어, NAnor5F 및 NAres5F 정방향 프라이머가 타미플루 민감성 및 내성 신종인플루엔자 A(H1N1) 바이러스의 진단에 가장 유용함을 알 수 있었다 (그림 3).

M: DNA 사이즈 마커(구입처 : 대한민국 (주) 바이오니아 100bp DNA ladder),

레인 1: NA 유전자 정상 주형 / NAnor2F-NAR 프라이머 쌍을 이용한 RT-PCR,

레인 2: NA 유전자 내성(변이) 주형 / NAnor2F-NAR 프라이머 쌍을 이용한 RT-PCR

레인 3: NA 유전자 정상 주형 / NAnor4F-NAR 프라이머 쌍을 이용한 RT-PCR

레인 4: NA 유전자 내성(변이) 주형 / NAnor4F-NAR 프라이머 쌍을 이용한 RT-PCR

레인 5: NA 유전자 정상 주형 / NAnor5F-NAR 프라이머 쌍을 이용한 RT-PCR

레인 6: NA 유전자 내성(변이) 주형 / NAnor5F-NAR 프라이머 쌍을 이용한 RT-PCR

레인 7: NA 유전자 정상 주형 / NAres2F-NAR 프라이머 쌍을 이용한 RT-PCR

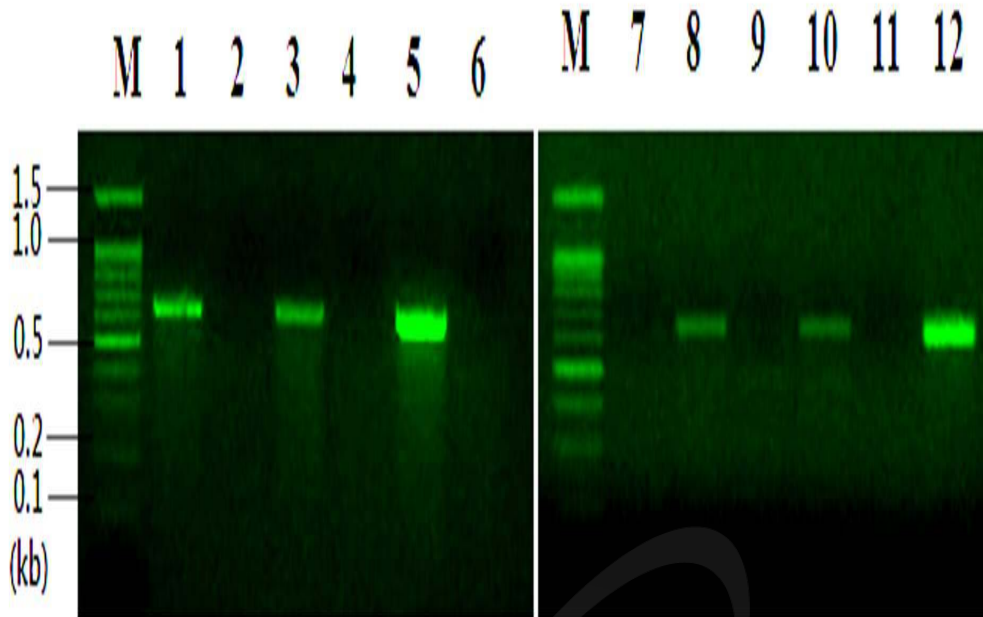
레인 8: NA 유전자 내성(변이) 주형 / NAres2F-NAR 프라이머 쌍을 이용한 RT-PCR

레인 9: NA 유전자 정상 주형 / NAres4F-NAR 프라이머 쌍을 이용한 RT-PCR

레인 10: NA 유전자 내성(변이) 주형 / NAres4F-NAR 프라이머 쌍을 이용한 RT-PCR

레인 11: NA 유전자 정상 주형 / NAres5F-NAR 프라이머 쌍을 이용한 RT-PCR

레인 12: NA 유전자 내성(변이) 주형 / NAres5F-NAR 프라이머 쌍을 이용한 RT-PCR



<그림 3>

이를 통해, 본 발명에서 제작된 신규 프라이머는 타미플루 민감성 및 내성 신종인플루엔자 A(H1N1) 바이러스주에 대해 선택적으로 결합함을 확인하였다.

5) 타미플루 민감성 및 내성 신종인플루엔자 A(H1N1) 동시 진단을 위한 키트 제작 및 이의 확인

타미플루 민감성 및 내성 신종인플루엔자 A(H1N1)를 동시에 진단할 수 있는 키트를 제작하기 위하여 다양한 조합의 프라이머 쌍을 이용한 RT-PCR을 수행하였다.

이를 위해 타미플루에 민감한 NA 유전자 정상 신종인플루엔자를 진단할 수 있는 MP/swInfA/swH1 프라이머 세트를 0.16 uM로 처리함을 기본으로 하고, NAnor2F/NA-R, NAres2F/NA-R, NAnor4F/NA-R, NAres4F/NA-R, NAnor5F/NA-R 및 NAres5F/NA-R 프라이머 세트를 10 pmol 농도로 각각 처리하고, NA 유전자 정상 신종인플루엔자 A(H1N1) 바이러스 RNA를 주형으로 하여, 상기의 방법으로 RT-PCR을 수행하였다.

그 결과, Nor 프라이머 계열은 NA 유전자가 정상인 타미플루 민감성 신종인플루엔자 A(H1N1)만을 증폭시키고, res 프라이머는 NA 유전자 정상인 신종인플루엔자 A(H1N1)은 검출하지 못하였다(그림 4). 이 때 질병관리본부로부터 분양받은 influenza A (H1N1) viral RNA를 주형으로 사용하였다. 사진에서 별표는 서열분석을 의뢰하여 (주문처 : 대한민국 (주) 제노텍) 확인되었음을 의미한다. 또한 이 때 primer는 MP/SwinfA/SwH1 primer set의 경우 4 pmol, NA 계열의 경우 10 pmol의 농도를 사용하였다.

M: DNA 사이즈 마커(구입처 : 대한민국 (주) 바이오니아 100bp DNA ladder),

레인 1: Sw infA 프라이머 쌍 + Sw H1 프라이머 쌍 + MP 프라이머 쌍 + NAnor2F/NA-R 프라이머 쌍을 사용한 RT-PCR

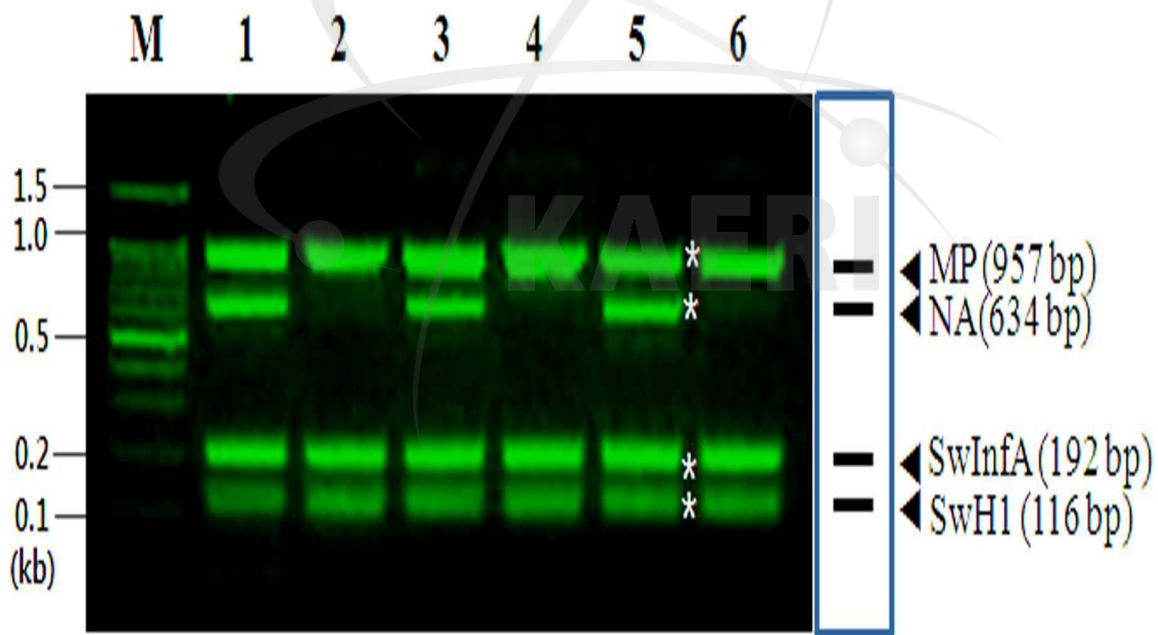
레인 2: Sw infA 프라이머 쌍 + Sw H1 프라이머 쌍 + MP 프라이머 쌍 + NAres2F/NA-R 프라이머 쌍을 사용한 RT-PCR

레인 3: Sw infA 프라이머 쌍 + Sw H1 프라이머 쌍 + MP 프라이머 쌍 + NAnor4F/NA-R 프라이머 쌍을 사용한 RT-PCR

레인 4: Sw infA 프라이머 쌍 + Sw H1 프라이머 쌍 + MP 프라이머 쌍 + NAres4F/NA-R 프라이머 쌍을 사용한 RT-PCR

레인 5: Sw infA 프라이머 쌍 + Sw H1 프라이머 쌍 + MP 프라이머 쌍 + NAnor5F/NA-R 프라이머 쌍을 사용한 RT-PCR

레인 6: Sw infA 프라이머 쌍 + Sw H1 프라이머 쌍 + MP 프라이머 쌍 + NAres5F/NA-R 프라이머 쌍을 사용한 RT-PCR



<그림 4>

따라서, MP/Sw infA/Sw H1 프라이머 세트에 nor 프라이머/res 프라이머를 포함하여 타미플루 민감성 및 내성 신종인플루엔자 A(H1N1) 동시 진단 키트를 제작할 수 있고, 상기 제작된 키트는 타미플루 민감성 및 내성 신종인플루엔자 A(H1N1)를 동시에 선택적으로 진단할 수 있음을 확인하였다.

2. 파급효과 및 기대효과

- 신종플루 내성 진단키트 개발 원천기술 확보
- 현재 병원에서 실제 사용중인 kit와 방법 및 장비사용이 동일하여 즉시 현장 적용 가능
- 국내 및 해외 시장 (저개발 및 개발도상국) 독점 및 신규 시장 창출
- 중국, 미국, 일본, 유럽 등 해외 시장 선도
- 신속한 진단을 통한 내성 변종 신종플루의 확산 및 환자 맞춤형 치료 방법 제시 -> 국민 보건 증대
- 기업체 기술 이전 및 향후 관련 기술 upgrade에 적극 활용



제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도

1. 연구개발목표 및 평가기준

연구개발 성과목표	세부목표 (연구개발 내용 및 범위)		평가지표 (핵심스펙)	과제평가서 평가기준 (검증방법)	가중치 (%)
1. RT-PCR법 개발	1-1	NA 유전자 변이 확인	유전자 변이 위치 확인	서열 변이 그림	60
	1-2	primer design 및 RT-PCR 증폭	primer가 제작되고 증폭조건이 확립되 었는가	primer 서열 및 검사 결과 제시	
	1-3	multiplex RT-PCR kit 개발	정상 및 내변종을 동시에 진단할 수 있는 확진검사법이 개발되었는가	검사 결과 제시	
2. 특허출원	2-1	특허 출원	특허가 출원되었는 가	특허번호	20
3. 기술성 검토	3-1	기술평가 실시	외부기관에 의뢰한 기술평가가 이루어 졌는가	기술평가서	20
	3-2	기술이전 시도	기술이전 타당성이 검증되었는가	보고서	
합 계					100

2. 연구 목표 내용 및 달성도

연구목표	연구결과	달성도(%)
1. 신종인플루엔자 VIRUS 확보	질병관리본부로부터 표준 virus 확보 완료	100 %
2. 분석방법 분석 - CDC 표준 분석방법 확보 - 국내 신종플루 검사 kit 확보 및 시험	CDC 표준 분석방법 확보 Seegen/Solgent/Introgen으로부터 kit 확보 및 시험 완료	100 %
3. RT-PCR 방법에 의한 분석방법 개발 - primer design - PCR 시험	primer design 완료 PCR 분석방법 확립 multiplex RT-PCR 법 확립 야생형/내변종 동시 진단법 확립	100 %
4. 서열분석 방법 개발	서열 분석방법 개발 완료	100 %

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

가. 연구개발결과의 활용실적

산업적 활용	후속연구 연계	기 타
<input type="checkbox"/> 사업화추진 () <input type="checkbox"/> 기술이전 및 지도 추진(0) <input type="checkbox"/> 산업적 활용 가능()	<input type="checkbox"/> 결과물(관련 DB등)제공() <input type="checkbox"/> 후속연구추진(0) <input type="checkbox"/> 교육 및 연구목적으로 활용()	<input type="checkbox"/> 기타 (직접입력) <input type="checkbox"/> 활용계획 없음()
기술이전 추진중 후속연구 추진중		

나. 연구개발결과의 활용계획

산업적 활용	후속연구 연계	기 타
<input type="checkbox"/> 사업화추진 () <input type="checkbox"/> 기술이전 및 지도 추진(0) <input type="checkbox"/> 산업적 활용 가능()	<input type="checkbox"/> 결과물(관련 DB등)제공() <input type="checkbox"/> 후속연구추진(0) <input type="checkbox"/> 교육 및 연구목적으로 활용()	<input type="checkbox"/> 기타 (직접입력) <input type="checkbox"/> 활용계획 없음()
향후 연구개발 결과의 활용계획 (현재 ~ 과제 종료후 5년까지)		
가. 활용개요	관련기술 기업체이전 추진	
나. 활용일정	2012년 이후	
다. 활용방법	국내외 제약관련/분자진단 회사에 기술이전 실시	
라. 기대효과	연구소 자체 바이러스 진단제 보유기술을 이용한 기술이전을 통해 신규시장 창출, 국민보건 증대/ 연구소 위상 증대에 기여	
마. 기타	후속연구 추진/국외 발표/언론 홍보에 활용	

다. 차년도 계속과제 추진 필요성

- 1) 2011년 8월에 3개 기업을 대상으로 한 소규모 설명회를 가짐. 기업에서 특허공개를 요청하였으나 기술 유출의 위험성으로 인해 내부적으로 특허공개를 거절함. 이를 계기로 2011년 9월에 우선심사 요청하여 2012년 상반기에 특허 등록이 기대
- 2) 기술이전을 위해 신속한 특허권 획득과 특허의 보정 및 의견에 대한 대처가 요구됨
- 3) 본 기술은 전세계적인 issue로서, 국내 뿐 아니라 해외 바이오대전 (Bioconference) 등에 참가하여 개발결과를 발표할 필요성이 있음. 특히 중국 등 동남아시아를 대상으로 한 기술소개 등이 필요함
- 4) 본 개발 kit의 민감도 및 제조 단가를 고려하기 위한 후속연구 필요 (감염된 바이러스 수 대비 kit의 민감도 및 kit 구성품을 이루는 성분의 비율을 고려한 최적의 경제적인 kit 구성에 관한 연구 필요)
- 5) 기술이전을 위해 개발된 kit의 반복성 (reproducibility) 시험 필요
- 6) 기술이전시 이전업체에서 요구하는 스펙을 고려하여 기술의 upgrade 및 신규 버전의 공동연구가 필요할 수 있을 것으로 예상됨
- 7) 기술이전 대상 업체 또는 관련기술 개발 업체를 대상으로 한 회의, 설명회 등이 필요함
- 8) 상기와 관련된 유사 기술을 보유한 국내 전문가 등으로부터 기술의 가치에 대한 자문이 필요함
- 9) 급변하는 국내외 기술현황 파악을 위한 자료 수집 필요
- 10) 명확한 단가 산정 등 경제성 분석 필요
- 11) 대외 홍보를 통한 관심기업 확보가 요구됨

서 지 정 보 양 식

수행기관보고서번호	위탁기관보고서번호	표준보고서번호	INIS 주제코드
KAERI/RR-3312/2011			
제목 / 부제			
타미플루 내성 신종인플루엔자 A (H1N1) 진단 키트 개발			
연구책임자 및 부서명	정일래/원자력환경안전연구부		
연구자 및 부서명	홍성욱/원자력기술사업부		
출판지	대전	발행기관	한국원자력연구원
페이지	30 p.	도표	있음(0), 없음()
참고사항			
공개여부	공개(0), 비공개()	보고서종류	연구보고서 (RR)
비밀여부	대외비 (), ___ 급비밀		
연구위탁기관		계약 번호	
초록 (15-20줄내외)	<p>현재 사용중인 신종플루 진단방법으로는 미국 CDC (질병관리통제센터)에서 이미 보고된 real time RT-PCR 방법이지만, 이 방법은 단지 일반적인 신종플루 H1N1 (타미플루 민감성) 감염 여부만을 확인할 수 있을 뿐, 타미플루에 내성을 보이는 신종플루 H1N1 내성 변이주의 감염 여부는 전혀 검출하지 못하는 한계점을 가지고 있다. 본 연구에서는 타미플루 내성 및 민감성 신종인플루엔자 (신종플루)를 동시에 진단할 수 있는 multiplex RT-PCR 키트를 제작하기 위해, swInfA, swH1, MP 및 NA (뉴라미니다아제neuraminidase) 프라이머 세트를 이용하여 상기 유전자들을 동시에 진단할 수 있는 복합 RT-PCR 방법을 확립하였다. 신종인플루엔자 A(H1N1) 뉴라미니다아제(neuraminidase, NA) 유전자의 총 길이는 1410bp이며, 이 중에서 823-825번째 뉴클레오티드 CAC가 H275에 해당한다. 잘 알려진 타미플루 내성 변이는 H275Y로서, 275번째 아미노산인 히스티딘(histidine)이 티로신(tyrosine)으로 돌연변이된 것이며, 정확히는 823번째 뉴클레오티드 C가 T로 바뀌어 생긴 것이다. 타미플루 내성 돌연변이 바이러스를 전기영동 겔 상에서 확인하기 위하여, 뉴라미니다아제 단백질의 275 아미노산 부위에 해당하는 염기서열이 변형된 프라이머를 제작하였다. 상기의 신규 제작된 프라이머와, swInfA, swH1, MP 프라이머 세트를 동시에 포함하고 있는 단일 분석 키트를 구성한 후 적절한 RT-PCR 방법을 시험함으로써 최종적으로 타미플루 민감성 및 내성 진단키트 구성을 완료하였다.</p>		
주제명키워드 (10단어내외)	신종인플루엔자A, H1N1, 다중 RT-PCR, 진단키트, 타미플루, 뉴라미니다아제		

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION SHEET

Performing Org. Report No.	Sponsoring Org. Report No.	Standard Report No.	INIS Subject Code
KAERI/RR-3312/2011			
Title / Subtitle			
Development of a diagnostic kit for Tamiflu-resistant influenza A (H1N1)			
Project Manager and Department		I. L. JUNG/Dept. Atomic Environmental Safety Research	
Researcher and Department		S, W. Hong/Dept. Atomic Technical Business	
Publication Place	Daejeon	Publisher	Korea Atomic Research Institute
Page	30 p.	Ill. & Tab.	Yes(0), No (-)
Note		Publication Date	2012
Open	Open(0), Closed(-)	Report Type	Research Report (RR)
Classified	Restricted(), ___Class Document		
Sponsoring Org.		Contract No.	
Abstract (15-20 Lines)			
<p>Swine influenza A, which has been pandemic worldwide since 2009, is a new type virus derived from A type influenza. Although some drugs against the contagious disease, such as relenza and tamiflu, have been commercialized, those drug resistant viruses could be also followed by the wide usage of drugs. For examples, Tamiflu-resistant viruses, the mutant type viruses, can not be cured by the treatment of tamiflu anymore. Thus, a quick diagnosis for the wild type (tamiflu-sensitive) and mutant (tamiflu-resistant) virus would be essential in order to prevent the wide spread of viruses. In spite of that, unfortunately, very few studies have been conducted until now. If we could tell the differences between tamiflu-resistant and -sensitive patients using by the proper diagnostic kit, not only patient spedific treatment would be possible, but also the spread of viruses would be effectively prevented.</p> <p>Currently used detection methods for the swine influenza A H1N1, which were originated from CDC, USA, can not detect the tamiflu-resistant swine influenza A H1N1, but only can detect tamiflu-sensitive wine influenza A H1N1. In this study, all the primers for the detection of swInfA, swH1, MP and NA (neuraminidase) have been developed in order to detect both tamiflu-resistant and tamiflu-sensitive swine influenza A H1N1s simultaneously, and then, new multiplex RT-PCR methods has been established.</p>			
Subject Keywords (About 10 words)		swine influenza A, H1N1, multiplex RT-PCR, diagnostic kit, tamiflu, neuraminidase	