

과제번호
2012K1
A3A7A
030496
13

“해물래충모니터링, 검출, 위험성 분석, 경감 방법 개발을 통한 EU-FP 참여”

미래창조과학부

보안과제(), 일반과제(O) 과제번호 2012K1A3A7A03049613

**국제화기반조성사업
(EU FRAMEWORK)**

“해산물 유래 기생충의 모니터링, 검출, 위험성 분석과 그 경감을 위한 방법 개발”을 통한 EU-FP 참여

EU-FP Consortium involvement for the “Development of method for the monitoring, detection and mitigation of seafood parasites and their risk analysis”

동아대학교

미래창조과학부

주 의
(편집순서 8)

↑
3cm
↓

(15 포인트 고딕체열)

↑
6cm
↓

제 출 문

미래창조과학부장관 귀하

이 보고서를 "EU FRAMEWORK에 관한 연구"과제(세부과제 "해산물 유래 기생충의 모니터링, 검출, 위험성 분석과 그 경감을 위한 방법 개발"을 통한 EU-FP 참여에 관한 연구)의 보고서로 제출합니다.

2013 년 9월 29 일

주관연구기관명 : 동아대학교

주관연구책임자 : 김 준 형

연 구 원 : ○ ○ ○

” : ○ ○ ○

” : ○ ○ ○

협동연구기관명 : ○ ○ ○

협동연구책임자 : ○ ○ ○

보고서 요약서

과제고유번호	2012K1A3A7A 03049613	해당 단계 연구 기간	2012 .09. 01 - 2013. 08. 31	단 계 구 분	1단계/1단계
연구 사업 명	중 사업 명	국제화기반조성사업			
	세부사업명	EU FRAMEWORK			
연구 과제 명	대 과제 명				
	세부과제명	“해산물 유래 기생충의 모니터링, 검출, 위험성 분석과 그 경감을 위한 방법 개발”을 통한 EU-FP 참여			
연구 책임자	김 준 형	해당단계 참 여	총: 1 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구 비	정부: 20,000 천원 기업: 천원 계: 천원
		연구원수			
총연구기간 참 여 연구원수	총: 명 내부: 명 외부: 명		총연구비		정부: 22,000 천원 기업: 천원 계: 22,000 천원
연구기관명 및 소속 부서 명	동아대학교 화학공학과				
국제공동연구	상대국명:				
위 탁 연 구				연구기관명:	연구책임자:
<p>상기 과제의 성공적인 수행을 위하여 아래의 연구활동을 수행함.</p> <p>▶ 학회 논문 발표</p> <p>GIM2013 (12th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms) 에 참가하여, “LABEL-FREE, HOMOGENOUS DETECTION OF HCV HELICASE AND REPLICASE USING MOULAR ALOSTERIC ATAMER SENSOR (MAAS)”을 발표하였다.</p> <p>▶ 연구책임자 (김준형)의 독일 Wolfgang Schumann 교수 방문 및 세미나</p> <p>1차 방문 (2013. 2. 15 - 2013. 3. 2., 16일간): 1회의 세미나, 다양한 실험지도, 공동연구의 구체화, 지도학생 교류 등에 관한 활동이 이루어졌다.</p> <p>2차 방문 (2013.7.30 - 2013.8.12., 14일간): 공동 Review 논문 작성, 새로운 공동 과제 도출 등의 활동 수행.</p> <p>▶ 연구책임자 (김준형)의 독일 Fridrich Alexander University 방문 및 세미나</p> <p>연구책임자는 방문기간동안 (2013. 6. 24 - 2013. 6. 30., 7일간) 독일 Erlangen 소재 Fridrich Alexander University를 초청 방문하여, PNU-FAU Symposium을 참관하고, Karl-Dieter Gruske, Andreas Paul Froba, Antonio Delgado, Stefan Will, Martin Hartmann, Rainer Buchholz, Cornelia Rauh, Christoph Lindenberger 등의 교수들과 공동연구 과제 논의, 유럽에서의 연구비 Funding system 등에 관해 논의하고, 특히 부산 소재 FAU Branch를 통한 공동연구를 논의하였다.</p> <p>▶ 독일 Wolfgang Schumann 교수 방문 및 세미나</p> <p>본 연구과제의 독일 파트너인, Wolfgang Schumann 교수가 본인을 방문하여 (2013. 7. 4 - 2013. 7. 12., 9일간) 및 세미나, 강의, 공동논문 작성, 외국인 학생 공동 지도 등의 활동을 수행하였다.</p> <p>▶ Anne Richter 교환 학생 방문, 공동 논문 지도</p> <p>Wolfgang Schumann 교수의 석사과정 지도 학생인 Anne Richter 가 본인의 실험실에서 “Studies on disulfide bond formation of proteins anchored on the outside of endospores of Bacillus subtilis” 의 주제로 공동연구 실험을 수행중이다. (2013. 6. 18 - 2013. 12. 31., 7 개월간)</p> <p>▶ Aptamer 관련 논문 작성</p> <p>“Rational design of modular allosteric aptamer sensors for viral protein detection” 논문을 작성 중이다.</p>					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	엡타머, 한-유럽 공동연구, 연구 네트워크, 바이로이트 대학, 프리드리히 알렉산더 대			
	영 어	Aptamer, Korea-EU Joint research, Research Network, Bayreuth University, Fridrich Alexander University			

요 약 문

I. 제 목 : “해산물 유래 기생충의 모니터링, 검출, 위험성 분석과 그 경감을 위한 방법 개발” 을 통한 EU-FP 참여

II. 연구개발의 목적 및 필요성

인구증가에 따른 식량 문제와 식품 공급이 전 지구적 차원으로 확대됨에 따라, 해산물 유래 기생충에 의한 질병에 노출된 인구의 규모가 기하급수적으로 늘어나게 되고, 이와 관련된 공중 보건에 관한 중요성이 대두되었다. 따라서, 해산물 유래 기생충에 의한 질병을 이해하고, 식품의 안정성을 담보할 수 있는 기술 개발이 이를 방지하고, 예방할 수 있는 효과적인 방법 개발이 필수적이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 과제는 해산물 유래 기생충 감염에 의한 질병을 감소시켜 공중보건 수준을 향상시키기 위하여, 대구, 멸치, 연어, 정어리, 참치, 송어, 고등어 등에 광범위하게 기생하는 선충의 일종인 Anisakis Simplex를 ELISA, aptamer 등을 이용한, 저비용 고효율의 진단 시스템을 완성하고, 이의 상업화, 대중화에 이바지하는 것을 목표로 한다.

IV. 연구개발결과

본 과제를 통하여 독일 파트너인 바이로이트 대학의 **Wolfgang Schumann** 교수를 2 회 방문하여 세미나, 공동연구의 구체화, 교환학생 공동 논문 지도 등의 논의가 이루어졌고, Wolfgang Schumann 교수도 본인을 방문하여 공동연구를 논의하였다. 이의 결과물로, **Anne Richter** 학생이 관련 실험을 위하여 7개월 동안 본인의 실험실에서 **석사학위 논문 실험을 수행중**이다. 또한, 독일 Erlangen 소재의 **Fridrich Alexander University**를 초청 방문하여, **Rainer Buchholz** 교수를 비롯한 새로운 국제 공동연구 인적 네트워크를 확립하였고, 부산에 위치하는 Fridrich Alexander University Branch를 통한 구체적인 국제협력 연구를 시도하고 있다. **GIM2013**에 참가하여, “**LABEL-FREE, HOMOGENOUS DETECTION OF HCV HELICASE AND REPLICASE USING MOULAR ALOSTERIC ATAMER SENSOR (MAAS)**”을 발표하였으며, **Aptamer 관련 논문** “**Rational design of modular allosteric aptamer sensors for viral protein detection**” 논문을 작성 중이다.

V. 연구개발결과의 활용계획

지난 1년간의 공동 연구 및 교류의 결과를 계속 이어 나갈 것이며, 특히 유럽 과학자들과의 연구 네트워크를 지속 발전시켜, 향후 더욱 성공적인 한국-EU 국제공동연구에 이바지하고자 한다.

S U M M A R Y

I. Title: EU–FP Consortium involvement for the “Development of method for the monitoring, detection and mitigation of seafood parasites and their risk analysis”

II. Purpose

Demographic changes and globalisation of the food supply chain have led to an expansion of the population at risk of seafood–borne parasitic disease and consequently increased the recognition of its public health significance. Therefore, the objective of this topic is to further develop the understanding of food safety and quality aspects related to parasites of public health importance in seafood.

III. Contents of Research

To further develop the understanding of food safety and quality aspects related to parasites of public health importance in seafood, ELISA or aptameric method will be developed for the development of low–cost, highly efficient detection of *Anisakis Simplex*.

IV. Results

Through this project, PI (Prof. Junehyung Kim) visited Prof. **Wolfgang Schumann 2 times, and Prof. Wolfgang Schumann** visited PI also to discuss **joint–research, seminar presentation, student exchange. Anne Richter**, under the supervision of Prof. Wolfgang Schumann, is doing her master degree experiments in PI’s laboratory, Busan, Korea.

PI also visited **Fridrich Alexander University, Erlangen, Germany, and expanded new international research network including Prof. Rainer Buchholz, and are trying new joint research through** Fridrich Alexander University Branch in Busan. PI also attended **GIM2013, and presented** “LABEL–FREE, HOMOGENOUS DETECTION OF HCV HELICASE AND REPLICASE USING MOULAR ALOSTERIC ATAMER SENSOR (MAAS)“, and are preparing aptamer related research paper, “Rational design of modular allosteric aptamer sensors for viral protein detection”.

V. Future research plan

The future plan for this project would be maintenance and expansion of research network for the successful Korea–EU international joint research.

C O N T E N T S

Chapter 1. Background and outline of research	8
Chapter 2. Current state-of-art in surface display field	10
Chapter 3. Result	17
Chapter 4. Achievement of object and contribution to related subject	21
Chapter 5. Future research plan	22
Chapter 6. Additional information obtained in this research	23
Chapter 7. Research facilities	24
Chapter 8. References	24

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	8
제 2 장 국내외 기술개발 현황	10
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	17
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	21
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	22
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	23
제 7 장 연구시설·장비 현황	24
제 8 장 참고문헌	24

제 1 장 연구개발과제의 개요

1.1. 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

인구증가에 따른 식량 문제와 식품 공급이 전 지구적 차원으로 확대됨에 따라, 해산물 유래 기생충에 의한 질병에 노출된 인구의 규모가 기하급수적으로 늘어나게 되고, 이와 관련된 공중 보건에 관한 중요성이 대두되었다. 따라서, 해산물 유래 기생충에 의한 질병을 이해하고, 식품의 안정성을 담보할 수 있는 기술 개발이 이를 방지하고, 예방할 수 있는 효과적인 방법 개발이 필수적이다. 구체적으로, 위험요소 분석과 위험요소 모니터링, 위험요소 검출과 위험요인 경감을 위한 기술적 방법이 이러한 생물학적인 위험이 공중 보건에 미치는 영향을 이해하기 위해서 개발되어야 한다. 또한, 위의 방법을 통해 얻어진 분명하고, 효과적인 정보들이 해산물 유래 질병들이 야기하는 위험성을 최소화하기 위해, 정책담당자들, 식품 제조업자, 대중들에게도 전달되어야 할 것이다. 또한, 유럽에서 소비되는 해산물의 많은 부분이 아시아 지역에서 수입되기 때문에, 이 과제의 성공적인 수행을 위해서는 아시아 지역 과학자와의 공동연구가 필수적이다. 이는 아래 EU-FP7 Call에서 제기된 것을 요약한 것이다.

KBBE.2012.2.4-02: Food safety and quality issues related to parasites in seafood

Call: FP7-KBBE-2012-6 - single stage

Demographic changes and globalisation of the food supply chain have led to an expansion of the population at risk of seafood-borne parasitic disease and consequently increased the recognition of its public health significance. Therefore, the objective of this topic is to further develop the understanding of food safety and quality aspects related to parasites of public health importance in seafood. Further understanding of the public health impacts of these biological hazards should be developed, together with tools for risk analysis and methods of monitoring, detection and mitigation. To reduce the risks of human seafood-borne diseases, clear and practical information should be disseminated to policy makers, food producers and the general public.

Expected impact: The European added value lies in offering safe, high-quality seafood to consumers, as well as in strengthening the competitiveness of European food producers. The expected project results should clearly be of interest and potential benefit to food-producing SMEs, and involving those SMEs in the project itself should help contribute to achieving this. Scientific evidence will be provided to serve as a basis for further development of common food safety and public health policies. The project will contribute to food safety policy by addressing the research needs identified in the EFSA scientific opinion on risk assessment of parasites in fishery products. **Given that a large percentage of the seafood consumed in the EU is**

imported from Asia, the project should integrate relevant partners from Asian countries. The participation of partners from those countries is important to achieve the expected impact of the research to be undertaken.

본 과제는 해산물 유래 기생충 감염에 의한 질병을 감소시켜 공중보건 수준을 향상시키기 위하여, 대구, 멸치, 연어, 정어리, 참치, 송어, 고등어 등에 광범위하게 기생하는 선충의 일종인 Anisakis Simplex를 ELISA, aptamer 등을 이용한, 저비용 고효율의 진단 시스템을 완성하고, 이의 상업화, 대중화에 이바지하는 것을 목표로 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

2.1. 기술 개관

본인이 본 Consortium에서 기여하려고 하는 분야는 항체 기반의 ELISA 검출 시스템을 대체할 수 있는, Anisakis Simplex 에 대한 **aptamer 기반의 검출 시스템**을 구축하는 것이다.

DNA, RNA 앵타머 (Nucleic Acid Aptamer)는 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) 과정을 통해서 얻어지는 단일 가닥 형태의 3차원적 구조를 가지는 핵산이다. 아래 그림에서 보는 바와 같이 특정 Target 물질 (예: 트롬빈) 에 대한 강한 affinity 를 가지고 있다.

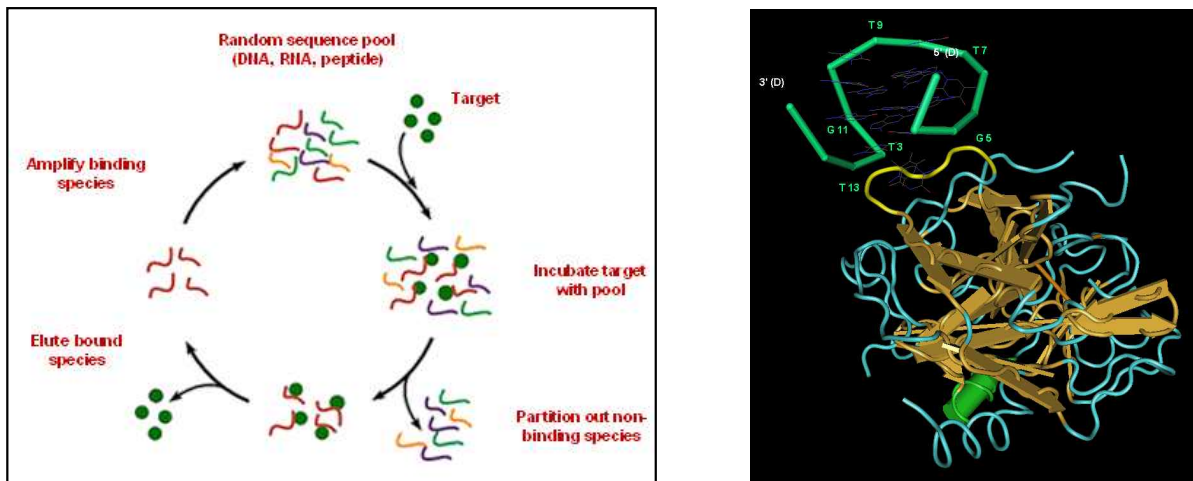


그림. Aptamer를 발굴하기 위한 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) (좌)와 Thrombin 에 대한 DNA aptamer 구조

현재까지 다양한 종류의 Biomolecule (단백질, 금속이온, 탄수화물, 유기 분자)에 대한 앵타머가 개발되었고, 그 수는 이미 수십 가지에 이르고 있다. 특히, 앵타머는 sub-nanomol 이하의 분리상수 (Kd) 를 가지며, 분자의 구조에 따라 매우 뛰어난 specificity 를 가질 수 있다.

예를 들어, methyl 기 하나만이 다른 caffeine 과 theophyllin 을 10,000 배 정도의 차이로 분간해 낼 수 있으며, L-arginine 과 D-arginine 에 대해서는 12,000 배의 affinity 를 가지는 aptamer 가 이미 보고되어 있다.

많은 경우, 앵타머는 항체 (antibody) 와 비교되는데, 그 특성을 간단히 정리하면, 항체에 비해 신규 앵타머의 개발 기간이 짧고, 일반적인 방법의 화학적 변이가 쉬우며, 안정성 및 보관성이 용이하며, 핵산 합성을 통한 대량 생산이 가능하고, immunogenicity 및 독성이 없는 장점이 있다.

이러한, 핵산 앵타머의 특성을 완전히 이해하기 위해서는 앵타머의 서열에서부터 결정되어지는 3차원적 구조에 대한 완벽한 이해가 필요하며, 이를 기반으로 앵타머-target 간의 상호작용에 대한 세부적인 연구가 가능하다.

핵산 앵타머의 구조는 각 nucleotide 간의 수소결합과 steric hindrance 에 의해 많은 영향을 받으며, 이는 용액상의 염의 농도, 온도 등의 몇가지 변수에 의해 결정되므로, 단백질에 비해 그 구조예측 및 해석이 용이하다.

아래는 항체와 비교한 aptamer 의 장단점을 정리한 표이다.

Features	Aptamer	Antibody
Production	< 8 weeks (automated, in vitro)	> 10 weeks (in vivo)
Specificity and affinity	High K_d : pico-nanomolar	High K_d : pico-nanomolar
Inhibitory potential	High	Low, 1 out of 200
Molecular weight	5-25 kDa	150 kDa
Immunogenicity and toxicity	None observed	Immune reaction observed
Target space	Extra, intracellular protein	Extracellular protein
Convenient chemical modification	Yes	No
Physicochemical stability	Stable	Labile
Shelf-life	Unlimited	Limited
Activity	Uniform activity	Vary from batch to batch
Screening	Iterative rounds	Time consuming and expensive
Temperature condition	Conformationally resilient	Undergo irreversible denaturation

Drugplus international, 2003
Annu. Rev. Med., 2005, 56,555–583

2.2. 국외 기술 현황

핵산 앵타머는 목적 단백질에 결합하여, 그 저해제로 작용가능하기 때문에, 이미 2006년에 노인성 안과질환 (Age-related macular degeneration) 에 대한 약으로서 FDA 의 승인을 받아 현재 Macugen 이라는 상품명으로 판매가 되고 있는 실정이다.

아래와 같은 aptamer 에 기반한 세계적인 치료용 의약품 개발 회사도 존재하고 있다.

The screenshot shows the Archemix website in a Microsoft Internet Explorer browser window. The address bar displays <http://www.archemix.com/thera.html>. The website header includes the Archemix logo and the tagline "The Aptamer Therapeutics Company™".


The main content area is divided into several sections:

- Navigation Menu:**
 - COMPANY
 - THERAPEUTICS
 - TECHNOLOGY
 - CAREERS
 - CONTACT INFORMATION
- Therapeutic Properties:**
 - Therapeutic Properties
 - Pharmacologic Properties
 - Production Properties
 - Chimeric Aptamers
 - Aptamers vs. Antibodies
 - Examples
- THERAPEUTICS:**

Aptamers are oligonucleotides that bind to molecular targets in a manner conceptually similar to antibodies. Through the [SELEX process](#), aptamers have been identified against numerous target types including growth factors, enzymes, immunoglobulins, receptors, viral proteins and others. The Archemix preclinical portfolio includes aptamers directed to a wide range of validated therapeutic targets ([see Examples](#)). Aptamers are similar to therapeutic antibodies, and as such, have a number of desirable characteristics for use as therapeutics, including biological efficacy, high specificity and affinity, and excellent pharmacokinetic properties. In addition, they offer specific competitive advantages such as:

 - aptamers are produced by an entirely *in vitro* process, which allows for the generation of initial therapeutic leads in as little as two weeks. *In vitro* selection allows the specificity and affinity of the aptamer to be tightly controlled, including selection against both toxic and non-immunogenic targets.
 - aptamers are able to disrupt protein-protein
- APTAMERS:**

Aptamers are a new class of therapeutic molecules with substantial advantages over existing protein therapeutics.



[Click to see larger image.](#)

2.3. 국내 기술 현황

해산물 유래 기생충 관련 질환 검출에 대한 효소면역학적 방법 (ELIA) 혹은 aptamer를 이용한 방법은 별로 연구된 바가 없음. 특히, 연구 이후의 실용화 검증 면역학적 방법의 스케일-업, 업계 수준의 우수성, 안정성 입증, 기술의 보급과 활용 정보통신교육, 홈페이지, 훈련, 다국적 활용, 상업 및 주주 참여 등 본 “Shrimp Consortium” 이 계획하는 수준의 복합적인 연구는 수행된 바가 없음.

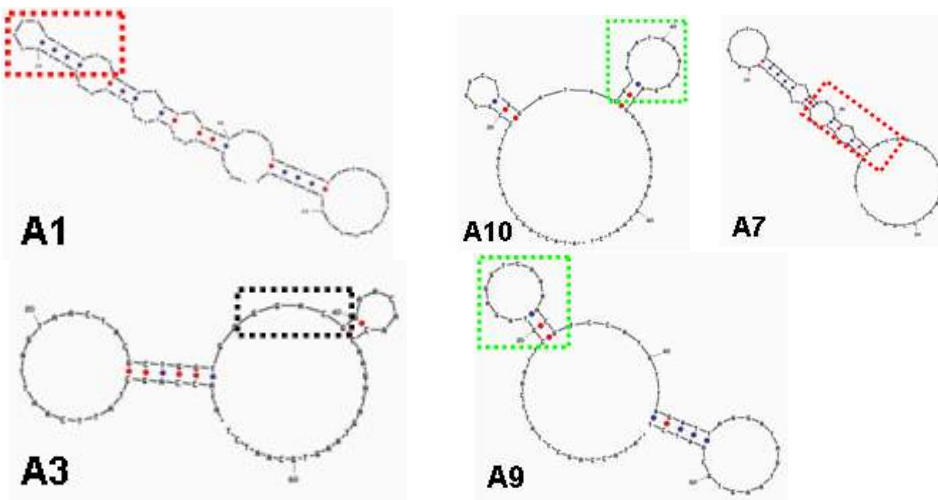
해산물 기생충 유래 질병에 대한 고전적인 수준의 연구가 지속된다고 사료됨.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용 현황
단국대학교 (이성욱 교수)	다양한 항원에 대한 의료용 aptamer 개발	
Ellington, Szostak	최초의 aptamer 개발 논문 (Nature)	
Tuerk, Gold	최초의 aptamer 개발 논문 (Science)	
Shin, Pierce	DNA를 이용한 nano device 개발	
Seeman, Rothmund	핵산의 자가 조립을 통한 미세구조 형성 (Nature)	

2.4. 연구개발 현황

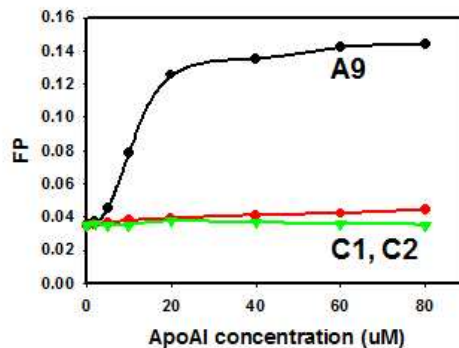
아래는 본인이 개발한 바 있는 고지혈증 (Hyperlipidemia)과 동맥경화증 (Arteriosclerosis)경감에 관여하는 HDL-C (High Density Lipoprotein Cholesterol)의 주요 구성 단백질인 Apo-AI 에 대한 DNA 앵타머를 개발하고, 이의 구조를 기존에 상용화된 프로그램으로 해석한 것이다.

A1 AACAGGTTAACGGAAGAGGGGTTCCGATTG
 A7 GGATATTTTTGCAATTTAAACAGGTGGACG
 A9 CGTAGAGGTCAAACGTCCATGTTAGATTA
 A10 CCGCGGCTTGGATACGTAGATGAAAGGACG
 A3 AGTAACTACGCTGGTGCGGACGGAACAACC



위에서 개발된 A9 aptamer를 이용하여, 형광편광 분석법 (Fluorescence Polarization assay)을 이용하여, ApoAI 에 대한 흡착력을 검증하였다.

A9 : FAM ATACCAGCTTATTC AATTCGTAGAGGTCAAACGTCCATGTTAGATTAAGATAGTAAGTGC AATCT

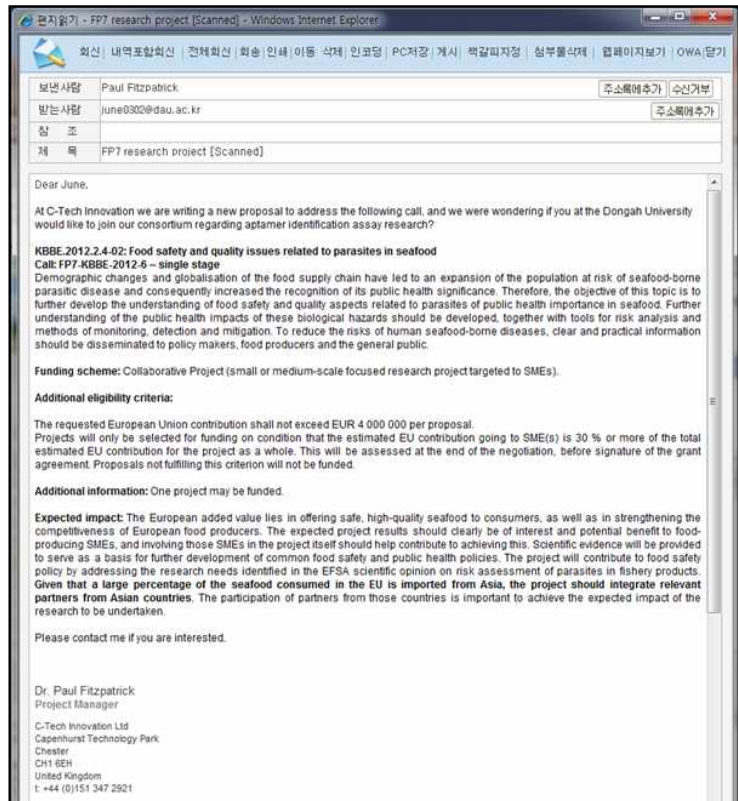


C1 : FAM ATACCAGCTTATTC AATTTGCTACGTTGGTGGTGGAGATTACAAACAAGATAGTAAGTGC AATCT

C2 : FAM ATACCAGCTTATTC AATTTGGACTGTGGTTTCCACATGTTCCGTGCTTGAGATAGTAAGTGC AATCT

상기의 본인 연구를 바탕으로, “2009 Korea-EU Joint Workshop, March 18th, 2009” 행사에서 본인의 전문분야를 등록하였고, 이를 바탕으로 현재 “Shrimp Consortium” 의 project leader 인 Paul Fitzpatrick 박사로부터 아래와 같은 consortium 구성에 참여에 대한 초청 메일을 받았다. (우측, 2011-10-19)

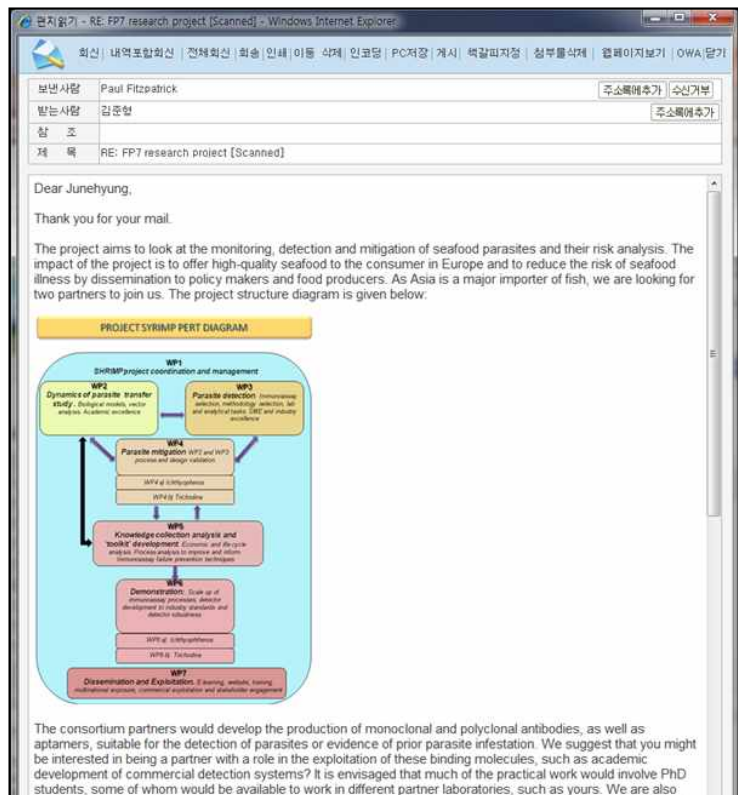
메일에서는 EU-FP7 에서의 참여 가능 call 에 대한 정보와 consortium partner 로서 본인에 대한 필요성 등이 간략하게 정리가 되어 있었고, 이에 본 연구자는 참여 수락 답장을 발송하였다. (2011-10-20)



본인의 답장 후, Paul Fitzpatrick 박사는 Consortium 전체 과제 구성의 Pert Diagram 과 함께, consortium 내에서 본인이 기여할 수 있는, 아래와 같은 항목에 대한 자세한 설명이 담긴 내용으로 회신하였다. (우측, 2011-10-21)

- antibody production
- aptamer production
- detection system development
- student exchange program
- model system development
- A. simplex parasitized fish
- A. simplex 숙주대상 어류

이에 본인은 본인의 소속기관 정보와 본인이 기여할 수 있는 항목에 관한 정보를 발송하였다. (2011-10-23)



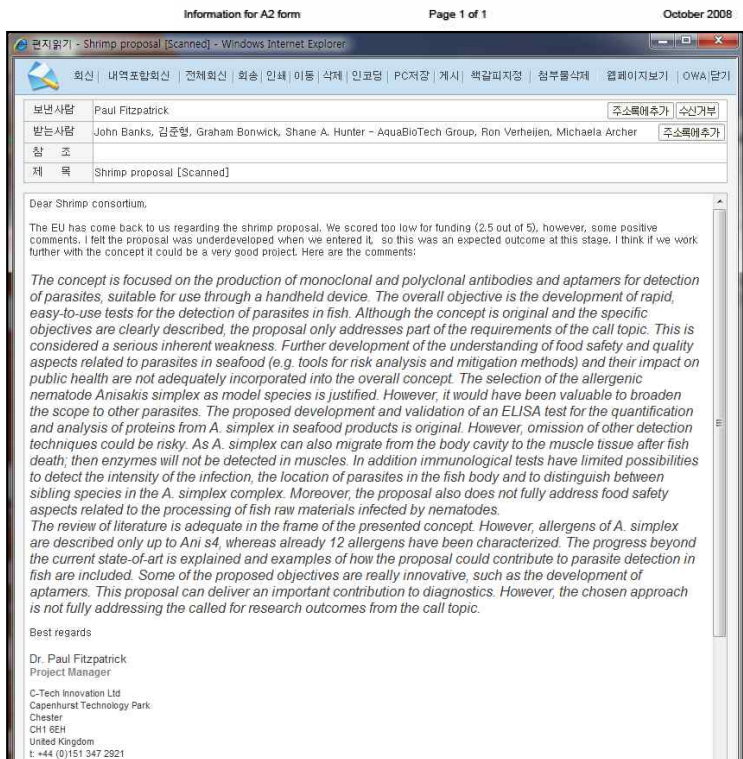
과제 참여를 위한 본인 및 소속 기관의 정보를 담은 A2_Information 작성요청 메일에 대해 (2011-11-09) 아래와 같은 A2_Information 회신 (2011-11-15)



SHRIMP		FP7 Cooperation Work Programme	
Main Contact Point		Notes	
First name; family name	JUNEHYUNG		
Title	KIM		
Sex	MALE		
Position in Organisation	Professor		
Department/faculty/institute/laboratory name/..	Dept. Chem. Eng. Dong-A Univ.		
Contact Address	37 Nakdong-Daero 550beon-gil saha-gu, Busan, Korea 604-714		Include Post Code/Cedex and country
Phone 1	+82-51-200-7719		
Phone 2	+82-10-6414-1554		
Fax	+82-51-200-7728		
Email address	june0302@dau.ac.kr		
Organisational Information			
Organisation legal name	DONG-A University		
Participant Identification Code (PIC)			Only if already registered for FP7
Organisation Legal Address	Dong-A University, 37 Nakdong-Daero 550beon-gil saha-gu, Busan, Korea		If different from contact point address
Main Area of Activity / NACE Code	University		If known
Website	www.donga.ac.kr		
Non-profit organisation?	YES		
Public Body?	YES		
Research organisation?	YES		
Higher or secondary education establishment?	YES		
Fewer than 250 employees	NO		Full-time equivalent
Is your annual turnover > €50M?	YES/NO		
Annual balance sheet total < €43M?	YES/NO		
Are you an autonomous legal entity?	YES/NO		
Are there dependencies between yourself and other organisations in this proposal?	YES/NO		
If YES, which?			
Nature of dependence.			e.g. subsidiary..

Paul Fitzpatrick 박사가 제안서를 제출한 후, 제안서에 대한 EU 로부터의 Comment 를 전달 (2012-03-13). 현재의 제안서는 2.5/5 의 점수로 funding 되기에는 모자람. ① 해산물 유래 기생충에 의한 공중 보건위 위해 수준, ② Anisakis Simplex 이외의 기생충에 대한 검출 방법 ③ ELISA 이외의 검출 방법의 필요성, ④ 가공해산물에 대한 기생충 검출 관련 등의 문제점에 대한 개선책이 필요하다는 comment를 접수.



향후, 과제를 개선하기 위한 지속적인 협력 과정을 모색하기로 함.



제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

▶ 관련 학회 논문 발표

GIM2013 (12th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms) 에 참가하여, “LABEL-FREE, HOMOGENOUS DETECTION OF HCV HELICASE AND REPLICASE USING MOULAR ALOSTERIC ATAMER SENSOR (MAAS)”을 발표하였다.

LABEL-FREE, HOMOGENOUS DETECTION OF HCV HELICASE AND REPLICASE USING MOULAR ALOSTERIC ATAMER SENSOR (MAAS)

Junehyung Kim
 Department of Chemical Engineering, Dong-A University, Busan, South Korea
 Contact: *****
 Key words: Aptamer, Sensor, Label-free

Introduction. We report a new label-free, homogenous detection of HCV helicase and replicase using rationally-designed Modular Allosteric Aptamer Sensor (MAAS), which is composed of three parts. The first part, the malachite green (MG) binding aptamer as signaling domain was fused to the second part, each HCV helicase or replicase binding aptamer as recognition domain and the third part, inducing arm was added to make a conformational change of MAAS. Only three energy states, corresponding to each free aptamer sensor, target bound sensor, and both target and dye bound sensor were starting point for our rational design, and the energy difference between each state was the main driving force for sensor activation. Constructed MAAS could selectively detect HCV helicase and replicase, and activation of sensor was proportional to the amount of target protein present [1, 2]

Methods.

Modular allosteric aptamer sensor (MAAS)
 Connection of two aptamers, HCV protein aptamer and MG aptamer. We added 'inducing arm' to the 5' end of MG aptamer to complete our MAAS construction. Target protein binding makes conformational change of MAAS to release the inhibitory effect of inducing arm, which blocks MG binding to MAAS before target binding. Malachite green dye emits enhanced fluorescence (2,600 folds) upon binding to its target aptamer due to the reduced vibrational de-excitation, which makes 'label free' and 'homogeneous' detection of target protein.

Results.
 Measurement of HCV helicase concentration.

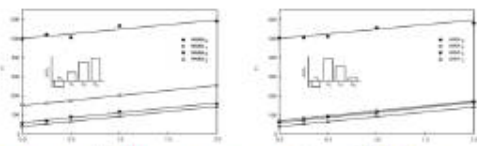


Fig.2 Measurement of HCV helicase concentration. (Left: Variation in module size, Right: Variation in inducing arm size).

1. We focused on the fluorescence intensity at zero helicase concentration, F_{I_0} .
2. HAMA0, which has inverted energy state with $\Delta\Delta G_1$ of -1.5 kcal/mol, showed the highest background emission, as was expected due to the easy binding of MG to MAAS.
3. HAMA3, which has the most stable state of StateA ($\Delta\Delta G_1 = 5.9$ kcal/mol), showed the lowest background fluorescence emission.
4. HAMA₂ ($\Delta\Delta G_1 = 4.9$ kcal/mol) and HAMA3 ($\Delta\Delta G_1 = 2.2$ kcal/mol) showed gradual increase in background emission according to their relative instability of StateA.

Conclusions. 'Label-free' and 'homogeneous' protein detection system can eliminate many time and labor consuming experimental step such as immobilization, washing, separation of any component. And it gave additional cost saving in nucleic acid sensor preparation without covalent attachment of any fluorophores or any functional group. For this purpose, allosteric behavior of nucleic acid sensor was considered. Target binding induces allosteric conformational change of MAAS, to which structure signaling fluorescent dye, malachite green (MG), can bind. These sensors were modulated by recognition of target protein and showed good and sufficient responses for sensor application in simple, sensitive and selective modes.

Acknowledgements. This study was supported by research funds from Dong-A University and NRF (2012049613, 2012043375).

References.

1. Cho S, Kim J, Lee B, Kim J, Kim B. (2005). *Nucleic Acids Res.* 33(20):e177.
2. Bang G et al. (2005). *Biosens Bioelectron.* 21:863-870.

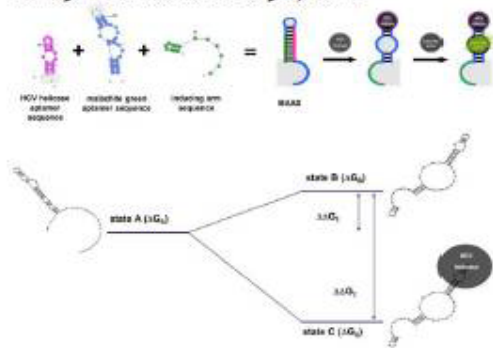


Fig.1 Design and allosteric regulation of modular allosteric aptamer sensor (MAAS)

▶ 연구책임자 (김준형)의 독일 Wolfgang Schumann 교수 방문 및 세미나

연구책임자는 연구기간중 2 차례의 독일 방문 활동을 수행하였다.

1차 방문 (2013. 2. 15 - 2013. 3. 2., 16일간): 1차 방문에서는 1회의 세미나, 다양한 실험지도, 공동연구의 구체화, 지도학생 교류 등에 관한 활동이 이루어졌다.

2차 방문 (2013.7.30 - 2013.8.12., 14일간):

1. 한국-독일 국제 공동 연구 논의
2. 현재 본인의 실험실에서 연구수행중인 독일 연구원 Anne Richter 공동 지도 논의
3. EU-FRAMEWORK 국제공동 과제 신청 논의
4. Bacillus Spore display 에 관한 공동 논문 작성
5. 독일 정부 및 EU-FP Funding 구조 논의

▶ 독일 Wolfgang Schumann 교수 방문 및 세미나

본 연구과제의 독일 파트너인, Wolfgang Schumann 교수가 본인을 방문하여 (2013. 7. 4 - 2013. 7. 12., 9일간) 및 세미나, 강의, 공동논문 작성, 외국인 학생 공동 지도 등의 활동을 수행하였다.

▶ Anne Richter 교환 학생 방문, 공동 논문 지도

Wolfgang Schumann 교수의 석사과정 지도 학생인 Anne Richter 가 본인의 실험실에서 “Studies on disulfide bond formation of proteins anchored on the outside of endospores of Bacillus subtilis” 의 주제로 공동연구 실험을 수행중이다. (2013. 6. 18 - 2013. 12. 31., 7 개월간)

▶ Aptamer 관련 논문 작성

“Rational design of modular allosteric aptamer sensors for viral protein detection” 논문을 작성 중이다. (참고자료)

▶ 연구책임자 (김준형)의 독일 Fridrich Alexander University 방문 및 세미나

연구책임자는 방문기간동안 (2013. 6. 24 - 2013. 6. 30., 7일간) 독일 Erlangen 소재 **Fridrich Alexander University**를 초청 방문하여, PNU-FAU Symposium을 참관하고, Karl-Dieter Gruske, Andreas Paul Froba, Antonio Delgado, Stefan Will, Martin Hartmann, Rainer Buchholz, Cornelia Rauh, Christoph Lindenberger 등의 교수들과 공동연구 과제 논의, 유럽에서의 연구비 Funding system 등에 관해 논의하고, 특히 부산 소재 FAU Branch를 통한 공동연구를 논의하였다.



LS für Bioverfahrenstechnik • Paul-Gordan-Str. 3 • 91052 Erlangen

Dong-A University
Department of Chemical Engineering
Professor June-Hyung Kim
37 Nakdong-Daero
550beon-gil saha-gu
Busan
Republic of Korea

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

Department für Chemie- und
Bioingenieurwesen
Prof. Dr. Rainer Buchholz

Erlangen, den 05.05.2013

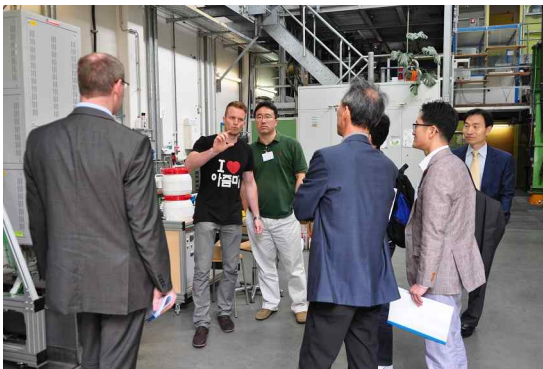
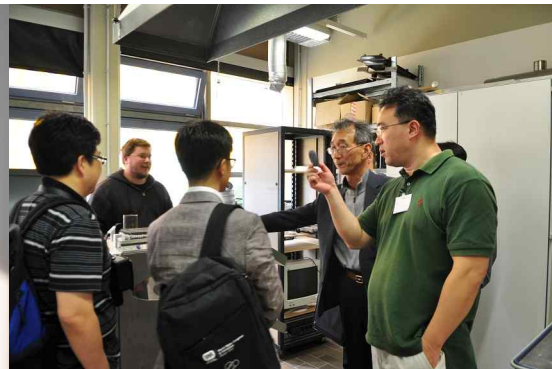
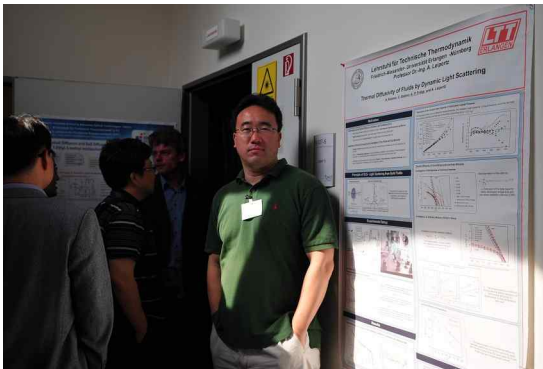
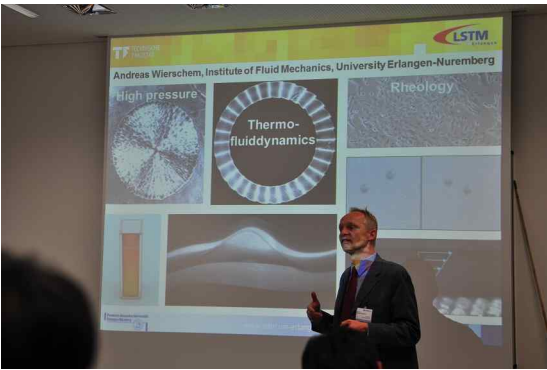
Letter of invitation

Dear Professor Kim,

On Thursday 27th 2013 the Faculty of Engineering of the Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg will hold the "PNU-FAU Joint-Symposium Future Technology in Chemical and Biological Engineering". We would like to give selected scientists of both the PNU and the FAU the opportunity to exchange ideas and positions concerning current research in both institutions. With this symposium we continue an scientific exchange started in Korea which hopefully will prove as a solid basis for the establishment of a fruitful collaboration in science and teaching. Moreover this invitation and activity will help Korea-Germany partnership in mutual research in EU FRAMEWORK PROGRAM in future.

On behalf of Prof. Dr. Dieter Gruske, President of the FAU, I would like to invite you to take part in this symposium and to give a talk of your current research activities. We intend to offer three sessions dealing with Fluid Dynamics, Biochemicals and Materials, each session containing five talks. The tentative agenda is attached to this mail. Our additional programme still has to be organized. But as far as we can see, we will offer the following additional events.

On Wednesday 26th 2013 we would like to offer a Franconia tour. After breakfast in your hotel we could leave via bus for Würzburg. This more than 1300 years old town is famous for its residence (UNESCO World Cultural Heritage), its fortress, its university and its famous vineyard, the Würzburger Stein. This trip is about 100 km and we will need some 80-90 minutes. In Würzburg we might have a guided tour and have lunch in an interesting historic location. After lunch we could leave for Nordheim, a small town at the river Main. This would be a tour of 36 km or half an hour. In Nordheim we could offer a wine tasting at the local award-winning cooperative. We will be in a core region of Franconian wine production and you could learn



제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	년도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 척도
1차년도	2012	EU-FP 성공 사례 조사	5 %	조사 완료
		유럽 과학자 방문	30 %	방문
		EU-FP/Aptamer 관련 국제학회 참가	20 %	발표
		기생충/aptamer 관련 국내학회 참가	10 %	참가
		기생충관련 전문가 자문	5 %	자문
		관련질병 발생기작 조사	5 %	조사
		관련 경제적/산업적 효과	5 %	조사
		Aptamer 진단 특허 조사	10 %	특허 조사
		Aptamer 관련 전문가 자문	5 %	자문
		Aptamer 관련 회사 방문	10 %	방문

상기에 계획된 연구활동을 모두 성공적으로 수행하였으며,

Aptamer 관련 자문: KAIST 조병관 교수, 조수형 박사, 연세대학교 신종식 교수, ETRI 방경숙 박사

기생충, 해산물 관련 자문: 부경대 김성구 교수, 국립수산물연구원 김명석 박사, 한양대학교 김동욱 교수

EU-FP 국제공동연구 자문: 부경대학교 유 준 교수

등을 통하여 수행하였다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

5.1. 연구개발결과의 활용방안

- 본 과제의 성공적인 실험적 결과물들은, 향후 7th EU-FP를 비롯한 국제적 대형 연구과제의 참여 등, 다양한 공동 연구 활동에 적극 이용될 것임

5.2. 기대성과

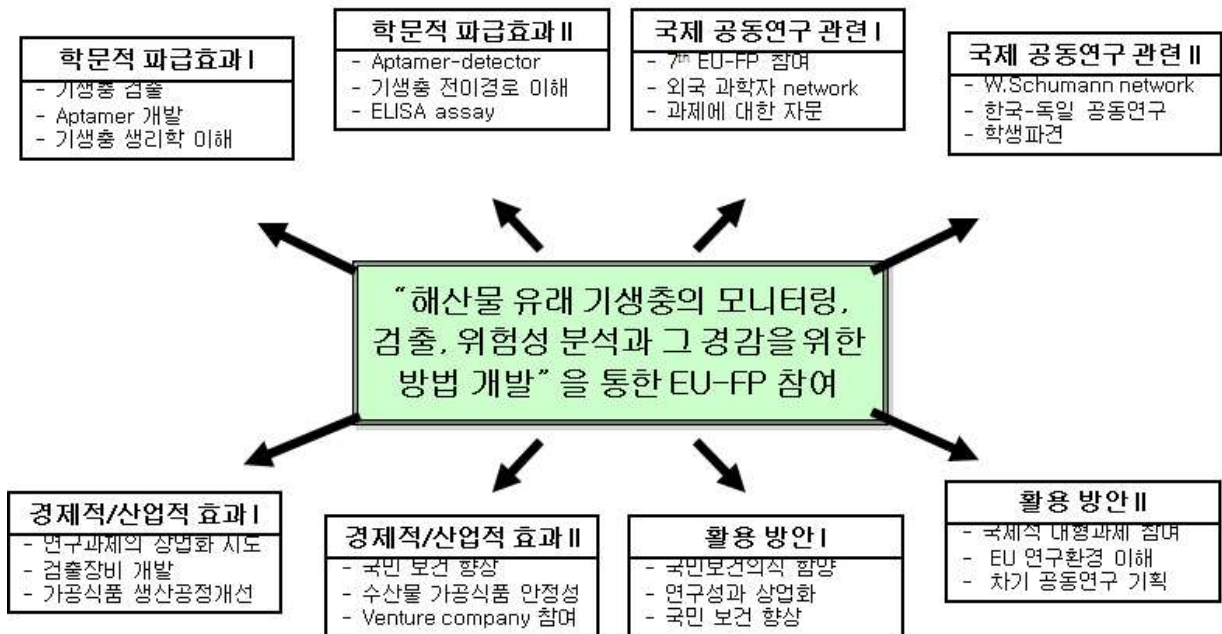
국제 공동 연구 관련 기대 효과

- 7th EU-FP 사업에 컨소시엄으로 참여
- 지난 5년 이상 지속된 W. Schumann 교수의 공동 연구 체제의 공고화.
- 다양한 유로 연합의 과학자들의 연구 동향 파악 및 연구결과의 발표 가능성
- 공동연구에 대한 국내외적 인적, 물적 네트워크 형성에 이바지.

경제적, 산업적 기대효과

- aptamer를 이용한 검출 시스템의 상업화 가능성 제고
- 국민 보건에 기여할 수 있는 수산물 유래 식품 안정성 제고

활용방안 및 기대효과



제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

독일 Bayreuth 대학과 한국 강원대학교 간의 국제공동 연구 성공 사례 자료 (TERRECO Project)

Proposal for the Phase II International Research Training Group (GRK1565)

Complex Terrain and Ecological Heterogeneity (TERRECO): Evaluating ecosystem services in production versus water yield and water quality in mountainous landscapes

Ökologische Heterogenität in komplexem Gelände:
Ökosystemare Produktivität, Wasserverfügbarkeit und
Wasserqualität in Bergregionen



**UNIVERSITÄT
BAYREUTH**

Bayceer
Bayreuth Center of Ecology
and Environmental Research

Bayreuth Center of Ecology and Environmental Research (BayCEER)
Faculty of Biology, Chemistry and Geosciences
University of Bayreuth (UBT), Germany

Speaker: Prof. Dr. John Tenhunen
Co-Speaker: Prof. Dr. Bernd Huwe

and



**KANGWON NATIONAL
UNIVERSITY**



**KOREA FOREST
RESEARCH INSTITUTE**

Faculty of Environmental Sciences
Kangwon National University (KNU), Chuncheon, South Korea

Speaker: Prof. Dr. Bomchul Kim

Cooperatively with the Korean Forest Research Institute
(KFRI), Seoul, Korea

And contributions from Ewha Women's University,
Hanshin University, Jeju National University,
Konkuk University, and Seoul National University

Anticipated Duration: 9 Years March 1, 2009 until February 28, 2018

Proposal Period: 4.5 Years September 1, 2013 until February 28, 2018

Submitted: October 1, 2012

제 7 장 연구시설·장비 현황

특이할 만한 연구시설·장비 현황이 없습니다.

제 8 장 참고문헌

주 의

1. 이 보고서는 미래창조과학부에서 시행한 국제화기반조성사업 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 미래창조과학부에서 시행한 국제화기반조성사업 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표하거나 공개하여서는 아니됩니다.