(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
G01N 33/543

(11) 공개번호 10-2004-0095824
(43) 공개일자 2004년11월16일

(21) 출원번호 10-2003-0026809
(22) 출원일자 2003년04월28일

(71) 출원인 대한민국(관리부서 : 농림부 국립수의과학검역원)
경기 안양시 만안구 안양6동 480

(주)피비엠이스트
서울특별시 강남구 역삼동 786-19 정민빌딩

프린스톤바이오메디테크코포레이션
미합중국뉴우저어지08852몬마우스정전4242유에스알티

(72) 발명자 조인수
경기도안양시동안구호계동목련마을신동아아파트902동405호

현방훈
서울특별시강동구천호3동565현대타워아파트1703호

이광녕
경기도광명시하안동주공아파트105동1510호

엄재구
서울특별시금천구독산동독산주공14단지1401동102호

계수정
서울특별시서대문구홍은동벽산아파트103동1304호

고영준
경기도군포시당동874주공아파트206동602호

구복경
경상남도진주시주약동한보은빛마을아파트105동203호

주이석
서울특별시서초구서초동1344-28서초빌리지203호

안수환
서울특별시강남구도곡동967역삼럭키아파트103동609호

김인중
서울특별시동작구사당5동삼호그린아파트101-310호

김옥경
서울특별시서초구방배동신삼호아파트마동706호

김희정
서울특별시강서구화곡3동1091대우그랜드월드아파트133동602호

장기용
경상북도포항시남구연일읍유강리청구아파트101동102호

신남규
인천광역시연수구선학동389희영무지개아파트201동704호

황서하
경기도안산시사동1243번지9호

강제모
미국,뉴저지08540,프린스톤,프로빈스라인로드4915

김창호
서울특별시광진구광장동577현대파크빌1005-304

고송우
서울특별시양천구목동신시가지아파트718-103

(74) 대리인 황이남

심사청구 : 있음

(54) 구제역 바이러스의 감염여부를 진단하는 방법 및 이를구현하기 위한 진단키트

요약

본 발명은 (1) 검체를 스트립의 로딩영역에 일정량 투입하는 단계; (2) 소정의 표지가 구비된 검출시약과 상기 검체 중의 분석물과 결합시켜 복합체를 형성하는 단계; (3) 상기 복합체를 전개막에 전개하는 단계; 및 (4) 상기 전개막 상의 소정 영역에 FMDV로부터 유래된 또는 FMDV로부터 면역반응을 통해 얻어질 수 있는 항원, 항체 또는 합텐 중에서 선택되는 적어도 하나 이상의 고정상을 갖는 반응부의 외관 변화를 관찰하여 구제역 바이러스의 감염여부를 판단하는 단계를 포함하는 구제역 바이러스 감염 진단방법을 제공한다.

또한 본 발명은 상기 진단방법을 구현하기 위한 진단 키트로서, FMDV로부터 유래된 또는 FMDV로부터 면역반응을 통해 얻어질 수 있는 항원, 항체 또는 합텐 중에서 선택되는 적어도 하나 이상의 고정상을 갖는 반응부(13) 및 정상동작여부를 판단하기 위한 대조부(14)가 전개막(9)상의 소정영역에 구비된 스트립(1); 상기 스트립(1)을 각종 오염물질로부터 보호하며, 적어도 검체를 투입하기 위한 검체투입부(2) 및 스트립상의 반응부(13)와 대조부(14)에서의 반응결과를 관찰하기 위한 표시창(4)이 구비된 하우징(20)을 포함하는 구제역 바이러스 감염 진단용 키트를 제공한다.

대표도

도 1a

명세서

도면의 간단한 설명

도 1a는 제 1측면에 따른 본 발명의 구제역 바이러스 감염진단장치(래피드 키트)의 분리사시도

도 1b는 제 2측면에 따른 본 발명의 구제역 바이러스 감염진단장치(래피드 키트)의 분리사시도

도 2는 본 발명에 따른 진단장치를 구성하는 스트립의 구조

도 3은 구제역 바이러스로부터 발현되는 폴리프로틴의 구조

도 4는 원-라인 시험키트의 검사결과 예시도

도 5는 투-라인 시험키트의 검사결과 예시도

도 6은 pBM-VP1Tw97F의 플라즈미드 맵

도 7은 pBM-2CTw97F의 플라즈미드 맵

도 8는 pBM-3ABCTw97F의 플라즈미드 맵

도 9는 pBM-3DTw97F의 플라즈미드 맵

<도면의 주요부분에 대한 부호설명>

1. 스트립(strip) 2. 검체투입부

3. 전개시약 투입부 4. 표시창

5. 하우징 커버 6. 스트립 고정부재

7. 하우징 본체 9. 전개막(wicking membrane)

10. 저장패드(reservoir pad) 11. 필터패드(filter pad)

12. 흡수패드(absorbent pad) 13. 반응부(reactivity zone)

14. 대조부(control zone)

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 구제역 바이러스(FMDV)의 감염여부를 진단하는 방법 및 이를 구현하기 위한 진단키트에 관한 것으로 보다 상세하게는, 동물체로부터 얻어지는 검체를 대상으로 하고, 이와 면역적으로 반응하는 FMDV로부터 유래된 또는 FMDV로부터 면역반응을 통해 얻어질 수 있는 항원, 항체 또는 합텐 중에서 선택되는 적어도 하나 이상의 고정상을 갖는 반응부의 외관 변화를 관찰하여 구제역 바이러스의 감염여부를 신속하게 판단하는 방법 및 진단키트에 관한 것이다.

구제역(Foot and mouth disease, FMD)은 가축에게 매우 치명적인 질병으로 국제수역사무국(Office International des Epizooties)에 A급으로 기록되어 있는 질병이다. 발굽이 갈라진 동물(cloven-hoofed animals, 소, 돼지, 양 및 염소)의 모든 종이 감염될 수 있으며, 상기 질병은 전염성이 매우 강하다. FMD의 결과로 입는 재정적 손실도 심각할 수 있다. 어린 동물들의 죽음, 우유의 손실, 고기의 감소 및 생산성의 감소로 인한 직접적인 손실들도 있다. 이를 제거하거나 또는 억제하는데 드는 비용은 매우 높을 수 있으며, 또한 무역 규제를 받음으로서 입는 간접적 손실들도 있다.

상기 질병의 원인이 되는 병원체는 피코르나비루스과(Picornaviridae family, Bittle et al., 1982 및 Fross et al., 1984)의 아프타바이러스(aphthovirus)인 구제역 바이러스(FMDV)이다. 상기 FMDV 게놈은 약 8,000개의 핵산 염기로 이루어진 단일 RNA 포지티브 가닥(single RNA positive strand)으로 구성된다. 상기 RNA는 초기에 단일폴리펩티드로 번역된 후 감염된 세포 내에서 바이러스에 의해 암호화된 프로테아제(viral-encoded protease)에 의해 연속해서 절단되어 4개의 캡시드 단백질(VP1-VP4) 및 비구조 폴리펩티드(2C, 3A, 3ABC 및 3D)를 생성한다. 상기의 구조 또는 비구조 단백질의 코딩 지역은 도 3에 개략적으로 도시되어 있다.

FMDV는 항원적으로 불균질하여, O,A,C, ASIA1, SAT1, SAT 2 및 SAT3(SAT=Southern African Territories)의 7개의 특이 혈청형(serotypes)이 알려져 있다. FMDV의 각각의 혈청형은 다른 6개의 혈청형과는 항원적으로 구별된다. 혈청형 A 바이러스가 제일 가변적이며 30개 이상의 아형(subtypes)을 갖는다. 또한, 각각의 혈청형은 항원이 다른 다수의 아형으로 세분될 수 있다. FMDV의 혈청형들은 본래 동물들에서의 교차-면역 실험(cross-immunity expe

riments)에 의해 확인된다. 동물이 동일한 혈청형에 저항성을 가진 하나의 혈청형으로 감염에서 회복되었을지라도, 또 다른 혈청형에 의해서 감염될 수 있다. 이런 FMDV의 여러 혈청형은 각기 다른 지질학적 분포를 갖는다. 아시아에서는, 혈청형 A, O 및 Asia가 가장 일반적이고, 유럽 및 남아프리카에서는, 혈청형 A, O 및 C가 발견된다. 아프리카에서는, 혈청형 A, O 및 SAT가 우세하다. 아프리카, 아시아 및 남아프리카의 몇몇 국가들은 풍토병적 발생 지역이다.

구제역의 주요한 진단법에는 일반적으로 감염된 동물에서 나타나는 전형적인 임상 증상의 인지가 포함된다. 구제역의 임상 증상은 그 고통은 매우 다양하게 나타날 수 있으나, 본질적으로는 모든 종에서 유사하다. 주된 증상으로는 타액분비와 절뚝거림으로 입 및 발에 액포가 형성되어 발열을 일으키는 것이다. 혈청학 상의 진단법으로는 감염이 의심되는 동물내에 FMDV-특이적 항원 또는 항체의 존재여부에 따라 결정되며 또한 일반적으로는 ELISA 및 바이러스 중화시험(Virus neutralisation test)에 의해 진단이 행해질 수 있다. 동물이 FMDV에 감염된 후에는, 구조적 단백질(SPs) 및 비구조적 단백질(NSPs)에 대응하는 특이적 항체들이 나타나기 시작하고 그 역가(titers)가 증가하며 오랜기간 유지된다. 또한, 혈청 샘플 내에서 특정 FMD 바이러스 항체가 존재한다는 것은 상기 샘플이 채취된 동물이 FMDV 또는 항원에 노출 및 접촉했었다는 것을 시사한다.

혈청 내에서 FMDV에 대한 항체의 검출은 몇몇의 유용성을 갖는다. 상기 항체 검출은 수포성 물질을 이용할 수 없는 동물들이 이전에 감염되었거나 현재 잠복 감염되어있다는 증거가 된다. 임상 증상에 의한 구제역의 진단법은 특히 양이나 염소 에게는 어려울 수 있고, 그 증상들도 종종 미미한 것들이다(Barnett, P.V et al., 1999 및 Callens, M., K. et al., 1998). 또한, 돼지 수포병(Swine vesicular disease, SVD) 바이러스 및 수포성 구내염(vesicular stomatitis) 바이러스 등에 감염되는 것을 포함하여 일부 다른 수포성 바이러스에의 감염은 임상적 관찰만으로는 FMDV의 감염과 구별할 수가 없다. FMDV는 반추동물 내에서 긴 잠복기 또는 보유기를 가질 수 있으며, 그 시기에 그들은 구제역의 증상을 보이지 않는다. 그러한 보균자(carrier animal)는 상기 질병의 새로운 발생원이 될 수 있다. 이러한 문제들로 인하여, 감염된 및/또는 무징후의 보균자를 구분하고 백신 접종된 동물로부터 그들을 판별해내는 신속한 혈청학상의 방법이 필요로 된다. 이러한 항체 검출법은 또한 전염병학의 조사 및 백신 접종의 효능을 측정하는데 사용될 수 있다.

백신 접종 및 감염 모두 구조적 캡시드 단백질에 대한 항체를 유도한다. 따라서, 상기 캡시드 단백질만을 진단법에 사용한다면, 구조적 단백질에 대한 항체의 검출에 기초하여 백신이 접종된 동물과 감염된 동물 모두를 구별하지 않고 검출할 것이다. 이러한 이유로, 구조 단백질에 대한 항체 시험은 미국이나 또는 영국과 같은 백신을 사용하지 않은 지역에서만 사용될 수 있고, 백신의 사용이 정착된 지역에서는 사용하기에 적합하지 않다. 그러나, 동물에 백신접종을 한 지역에서도 구제역은 빈번하게 발생한다. 그러한 지역에서는 백신이 접종된 것들 중에서 감염된 것들을 감별할 수 있는 진단법이 요구된다. 바이러스의 하나 이상의 비구조적 단백질에 대한 항체 검출법에 기초하여, 2C 및 3ABC 같은 FMDV의 비구조 단백질을 사용하여 FMDV에 감염된 동물들을 감별해내는 것에 대한 몇몇 연구는 발표되었다(Rodriguez A et al, Mackey Dk et al., Sorensen KJ et al.).

FMDV를 검출하는 또 다른 방법은 PCR(Polymerase chain reaction)이다. FMDV로부터 특정 RNA 염기서열을 검출하기 위한, RT-PCR(역전사-중합효소 연쇄반응)법이 또한 개발되었다(Munesz et al.). 이 기술은 특이하며 높은 감수성을 제공할 수 있으므로, 조직 배양에서 감염을 개시하기에 충분한 바이러스가 존재하지 않는 열악한 상태의 샘플에서도 구제역 바이러스성 RNA를 검출할 수 있다. 그러나 이 방법은 PCR 및 전기영동을 위한 장비가 요구되어, 현장에서의 진단법으로는 실행하기가 어려우며, PCR 반응을 억제하는 물질이 몇몇 샘플에 존재한다면, 그러한 샘플들은 바이러스 또는 바이러스 유전자를 함유할지라도 PCR에 의해 양성결과가 얻어지지 않을 것이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 상기한 종래 기술의 한계를 극복하기 위해 안출된 것으로, 그 목적은 동물체로부터 얻어진 검체를 대상으로 구제역 바이러스에 대한 감염여부를 간편하고 신속하게 확인할 수 있는 구제역 바이러스 감염진단방법을 제공한다.

또한 본 발명의 다른 목적은 상기 구제역 바이러스 감염 진단방법을 구현하기 위한 진단 키트를 제공함에 있다.

발명의 구성 및 작용

상기한 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 (1) 검체를 스트립의 로딩영역에 일정량 투입하는 단계; (2) 소정의 표지가 구비된 검출시약과 상기 검체 중의 분석물과 결합시켜 복합체를 형성하는 단계; (3) 상기 복합체를 전개막에 전개하는 단계; 및 (4) 상기 전개막 상의 소정 영역에 FMDV로부터 유래된 또는 FMDV로부터 면역반응을 통해 얻어질 수 있는 항원, 항체 또는 합텐 중에서 선택되는 적어도 하나 이상의 고정상을 갖는 반응부의 외관 변화를 관찰하여 구제역 바이러스의 감염여부를 판단하는 단계를 포함하는 구제역 바이러스 감염 진단방법을 제공한다

상기 본 발명의 진단방법은 샌드위치법(sandwich assay) 또는 경쟁법(competition assay)을 포함한다.

또한 본 발명은 상기 진단방법을 구현하기 위한 진단 키트로서,

FMDV로부터 유래된 또는 FMDV로부터 면역반응을 통해 얻어질 수 있는 항원, 항체 또는 합텐 중에서 선택되는 적어도 하나 이상의 고정상을 갖는 반응부(13) 및 정상동작여부를 판단하기 위한 대조부(14)가 전개막(9)상의 소정영역에 구비된 스트립(1); 상기 스트립(1)을 각종 오염물질로부터 보호하며, 적어도 검체를 투입하기 위한 검체투입부(2) 및 스트립상의 반응부(13)와 대조부(14)에서의 반응결과를 관찰하기 위한 표시창(4)이 구비된 하우징(20)을 포함하는 구제역 바이러스 감염 진단용 키트를 제공한다.

상기에서 검체는 바람직하게는 체외로 분비되는 체액으로서, 혈액, 혈청, 혈장, 소변, 눈물, 침, 젖 등을 포함한다.

또한 상기 검체에 포함되어 분석의 대상이 되는 분석물(analyte)은 자연적으로 형성된 또는 인위적으로 부여될 수 있는 특이 결합부재를 가지는 어떠한 물질도 포함하며, 예를 들면, 항원제시 물질, 항체(단일클론 또는 폴리클론 항체를 포함), 합텐, 및 이들의 조합을 포함한다.

또한 고정상(또는, 포획시약(capture reagent))은 상기 분석물 또는, 지시시약, 보조적 특이결합부재 등에 특이적으로 결합하여 상기 분석물을 포획하는 표지되지 않은 특이결합부재로서, 직접 또는 간접적으로 스트립상의 전개막에 고정된다.

검출시약은 확산 또는 비확산적으로 패드에 결합될 수 있으며, 이에는 표지 시약(labeled reagent), 보조적 특이결합부재, 및/또는 신호발생시스템의 성분 등을 포함한다. 신호발생 시스템은 적어도 활성부재(catalytic member) 및 용질(solute)을 포함한다. 용질은 활성부재에 촉매되어 반응을 일으키고, 막의 표면 또는 내부에서 인식가능한 신호를 발생시킨다. 활성부재는 효소 또는 비효소일 수 있으며, 용질은 활성부재에 의해 촉매되는 반응을 수행할 수 있고 이러한 반응은 직접 또는 간접적으로 검출가능한 신호발생 화합물을 양산한다. 이들 성분에 의해 검출가능한 신호로는 스펙트로포토메트릭, 가시신호(visible signal), 전기화학신호, 기타 전기적으로 검출가능한 신호를 포함한다.

이하 본 발명의 내용을 도면 등을 참조하여 보다 상세히 설명하고자 한다.

도 1a 및 1b는 본 발명에 사용되는 바람직한 실시형태로서 예시된 진단 키트 의 분리 사시도를 나타낸다.

상기 진단 키트는 스트립(1)과 하우징을 포함한다. 하우징은 검체투입부(2), 전개시약 투입부(3){검체를 필터패드(또는 다이패드: 검출시약을 함유하는 패드를 말한다)에 스폿(spot)하는 경우에 필요하다.}, 테스트 결과를 보여주기 위한 표시창(4)을 포함하는 커버(5)와, 스트립(1)을 적소에 고정배치하는 스트립 고정부재(6)가 구비된 본체(7)를 포함한다.

상기 커버(5) 및 본체(7)는 결합부재(8)를 매개하여 상호 결합되고, 스트립(1)을 고정하고 반응부와의 접촉 또는 오염을 방지하기 위해 요구되며, 시험에 사용되는 어떠한 시약과도 반응하지 않는 비반응성 물질(예를 들면, 플라스틱 등)로 함이 바람직하다.

본 발명의 제 1측면에 따른 도 1a 의 구성에서와 같이, 검체를 투입구(2)를 통해 필터패드(염료패드를 겸함)(11)상에 스폿하는 경우에는 별도의 전개시약 투입구(3)가 요구되며, 전개시약 투입구(3)는 바람직하게는 컵모양으로 만곡부를 두어 일정량의 전개시약을 수용할 수 있도록 하며, 하단부는 저장패드(10)와 밀착시켜 전개시약이 장치내 다른 곳으로 유출되지 않도록 함이 좋다.

상기 도 1a의 구성과는 달리, 본 발명의 제 2측면에 따른 도 1b의 구성과 같이 검체투입부(2')가 스트립을 구성하는 저장패드(10')의 직상부에 위치하여 검체를 저장패드에 바로 투입시키는 경우(이 경우 저장패드는 후술하는 실시예에서와 같이 필터패드의 역할을 겸할 수 있으며, 이 경우 별도의 전개시약 투입부는 필요없다), 상기 검체투입부는 바람직하게는 컵모양으로 만곡부를 두어 일정량의 검체량을 수용할 수 있도록 하며, 하단부는 저장패드와 밀착시켜 검체가 장치내 다른 곳으로 유출되지 않도록 함이 좋다. 이 경우 패드 11'은 검출시약을 함유하는 염료패드이거나, 제 2의 필터패드일 수 있으며, 생략될 수도 있다.

표시창(4)은 스트립(1)을 구성하는 전개막(9) 상의 반응부(13) 및 대조부(14)에서 일어나는 변화를 외부에서 관찰하기 위한 것으로, 상기 전개막 상의 반응부 및 대조부의 직상부에 위치하도록 하우징 커버(5)에 구비된다.

또한 하우징 커버(5)에는 검사날짜, 검사대상, 검체투입부, 전개시약 투입부, 검사결과 표시창 등을 외형적으로 구분할 수 있도록 소정의 식별기호, 예를 들면 검사날짜는 'Date', 검사체는 'ID 0000', 대조부는 'C'(Control), 반응부는 'T'(Test), 검체투입구는 'S'(Sample), 전개시약 투입부는 'D'(Developing reagent)의 형태로 간략하게 부여될 수 있

다. 상기 식별기호는 위와는 다른 글자, 숫자, 아이콘 등의 어떠한 형태로도 표현이 가능하며, 이들의 조합일 수도 있다.

이하 바람직한 실시예로서 본 발명 진단장치를 구성하는 스트립의 구조를 도 1a,b 및 도 2를 참조하여 설명한다.

도 1a는 제 1측면에 따른 실시예로서, 본 발명의 스트립(1)은 전개막(9), 저장패드(10), 필터패드(염료패드를 겸함)(11), 흡수패드(12), 및 전개막에 구비되는 반응부(13) 및 대조부(14)를 포함한다. 또한 스트립(1)의 저면에는 하우징 본체(7)의 고정부재(6)에 상기 스트립을 고정시키기 위한 기저부재(15)가 부착되며, 기저부재는 바람직하게는 플라스틱 또는 유리재질의 플레이트이다.

도 1b는 제 2측면에 따른 실시예로서, 스트립(1')은 저장패드(10'), 필터패드(11':염료패드를 겸할 수 있다)를 포함하며, 그 외 구성은 상기 제 1측면에 따른 스트립(1)과 동일하다. 이하 각 구성에 대한 상세한 설명은 제 1측면에 따른 스트립 구조를 위주로 하며, 제 2측면에 따른 스트립은 그 차이점에 대해서만 언급하기로 한다.

필터패드(11)는 크로마토그래피를 위한 전개막(9)의 하단부에 접촉되어 전개막으로의 유체흐름을 위한 연결통로를 형성하며, 필터패드의 하단부에는 저장패드(10)가 접촉되어 저장패드와 필터패드가 유체흐름을 위한 하나의 연결통로를 형성하고 있다. 흡수패드(12)는 전개막의 상단부에 부착되어 있다. 검출하고자 하는 분석물(analyte), 표지 시약 또는 보조적 특이결합부재 등과 특이적으로 결합하는 적어도 하나 이상의 고정상을 구비하는 반응부(13) 및 키트의 정상적인 동작여부를 판별하기 위한 대조부(14)는 전개막의 소정 영역에 이격하여 설치된다.

저장패드(10)는 검체 혹은 다른 검사에 필요한 용액(예를 들면, 전개시약 등)등을 흡수하며, 필터패드 또는 전개막으로 분석물을 전달하도록 모세막을 구비한다. 상기 저장패드는 검체 혹은 전개시약 등을 수용하기에 충분한 공극 및 용적을 구비할 것이 요구된다. 이러한 저장패드가 될 수 있는 물질로는 바람직하게는 저분자 단백질 결합물질로서, 셀룰로오스, 폴리에스테르, 폴리우레탄, 공극 0.45 60㎛인 유리섬유 등이 있다.

필터패드(11)는 검체내 불필요한 성분을 여과하며, 검출시약을 포함할 수 있다(이 경우 필터패드는 바람직하게는 염료패드를 겸한다). 검출시약을 필터패드내에 포함하는 경우 검사를 위해 검출시약을 검체에 미리 혼합해 주어야 하는 단계를 줄일 수 있는 장점이 있다. 이러한 필터패드(11)가 될 수 있는 물질의 예로는 폴리에스터, 폴리우레탄, 폴리아세테이트, 셀룰로오스, 유리섬유, 공극 0.45 60㎛인 나일론 등이다. 경우에 따라서는 상기 저장패드(10)와 필터패드(11)는 동일 물질일 수 있으며, 이 경우 한 개의 긴 필터패드(11)의 밑면에 검출 시약을 포함할 수 있다.

검출시약은 검사하고자 하는 분석물(analyte)의 존재를 육안 또는 기타 기구를 통해 외부에서 식별이 가능하도록 해주는 소정의 표지 시약(labeled reagent), 보조적 특이결합부재, 및/또는 신호발생 시스템의 구성성분이 구비된다. 표지된 검출시약은 이미 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 잘 알려 져 있다. 이러한 표지의 예는 촉매, 효소(예를 들어, 포스퍼타제, 퍼옥시다제 등으로서, 보다 구체적인 예로는 효소 기질과 결합하여 함께 사용되는 염기성 포스퍼타제와 양고추 퍼옥시다제 등), 효소기질(예를 들어, 니트로블루테트라졸리움, 3,5',5,5'-테트라니트로벤지딘, 4-메톡시1나프톨, 4클로로1나프톨, 5브로모4클로로3인돌일포스페이트, 화학발광 효소기질로는 디옥세탄, 및 유도페와 이들의 유사체), 형광화합물(예를 들면, 플로우레세인(fluorescein), 피코빌리프로틴(phycobiliprotein), 로다민(rhodamine) 등과 이들 유도체 및 유사체), 화학발광화합물, 방사성 원소 등이 있으며, 이 이외에도 US 5,728,587호에 개시된 바와 같이 금속졸(Metal sol), 염료졸(Dye sol), 미립자 라텍스(Particulate latex), 칼라인디케이터(Color Indicator), 리포좀에 포함된 색재료(Color matter), 탄소졸 및 셀레늄과 같은 비금속졸 등이 있다. 또한 상기 문헌 컬럼 8 10에는 본 발명 진단방법에 사용가능한 표지로서 면역화학적 표지의 예가 상당수 개시되어 있다.

상기 표지 시약들은 검사하고자 하는 분석물(analyte)과 쉽게 결합하는 성질을 가진 소정의 보조적 특이결합부재와 결합체(Conjugate)를 형성할 수 있다. 보조적 특이결합부재의 예로는 특별한 한정을 요하는 것은 아니며, 항원, 항체 또는 합텐 등을 포함하며, 예를 들면, 분석물이 항체인 경우 항체에 쉽게 결합하는 물질로 알려진 단백질 G, 단백질 A, 단백질 G/A, 및 기타 항체 IgG 및 IgM 등에 잘 결합하는 것으로 알려진 각종 항체일 수 있다. 이들 물질은 현재 시그마사 등에서 재조합하여 시판되고 있는 상태의 것을 그대로 이용할 수도 있다.

상기에서 검출시약은 반드시 필터패드(11)에 포함되어야 하는 것은 아니다. 검출시약은 검출결과가 나타나는 전개막상의 반응부(13)와 검체투입부와의 사이의 임의의 지점에 구비될 수도 있다. 이러한 검출시약은 필터패드(11) 또는 전개막(9) 상의 임의의 지점의 상부 또는 내부에 건조 상태 또는 동결건조 상태로 투입된다. 이때 필요에 따라 검사에 대한 민감도, 반응성 등을 높이기 위해 각종 보조제, 예를 들면, 버퍼, 세제, 항응고보존액 등이 첨가될 수 있다.

또한 스트립(1)은 키트가 정상적으로 작동되는 지를 판단하기 위해 소정의 대조시약을 더 포함할 수 있다. 대조시약도 검출시약에서와 마찬가지로 필터패드(11) 또는 전개막(9)상의 반응부(13)와 검체투입부와의 사이의 임의의 지점에 구비될 수 있다. 대조시약은 전개막상의 대조부(또는 대조밴드)를 형성하는 고정상(단백질, 항원 또는 항체 등)과 특이적으로 결합하는 표지된 단백질, 항원, 항체 등으로부터 선택되어질 수 있다. 이러한 고정상 및 대조시약은 이미

본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 잘 알려져 있다. 대조시약에 포함될 수 있는 표지 시약은 위 검출시약에서의 그것을 동일하게 적용할 수 있다. 보조적 특이결합부재의 예로는 특별한 한정을 요하는 것은 아니나, 예를 들면, 아비딘, 바이오틴, FITC, 항FITC 항체, 마우스 면역 글로불린, 항마우스 면역 글로불린항체에서 선택되는 1종이 있다.

전개막(9)은 충분한 공극을 가지고, 필터패드(11)를 통과한 검체의 상당부분을 흡수할 수 있어야 한다. 이러한 전개막이 될 수 있는 물질의 예로는 나일론, 폴리에스터, 셀룰로오스, 폴리설폰, 폴리비닐리덴디플루오라이드, 셀룰로오스아세테이트, 폴리우레탄, 유리섬유, 니트로셀룰로오스 등에서 선택되는 적어도 하나 이상의 물질이 있다.

전개시약(Developing reagent)을 사용하는 경우 전개시약이 될 수 있는 것의 예로는 인산염 완충액, 식염수, 트리스-HCl, 물 등이다. 상기 전개시약은 검체투입부(2)가 필터패드(11)의 직상부에 위치하여 검체를 스폿(spot)처리하고자 하는 경우에 요구된다. 따라서 도 1b의 제 2측면에 따른 실시예에서와 같이 검체투입부(2')가 저장패드(10')상에 위치하여 저장패드로 일정량의 검체를 로딩하고자 하는 경우에는 특별히 요구되지는 않는다.

검출시약에 의해 표지된 복합체(Complex)가 검출하고자 하는 분석물을 함유하고 있는 경우 전개막(9) 상의 반응부(13)에 위치한 고정상과 결합하여 외관으로 식별가능한 소정의 변화를 일으킨다. 이러한 고정상으로 사용될 수 있는 물질로는 구제역 바이러스를 구성하는 또는 이들로부터 면역반응을 통해 유도될 수 있는 항원, 항체 또는 합텐 중에서 선택되는 적어도 하나 이상을 포함할 수 있다.

상기에서 항원으로 될 수 있는 물질은 비구조적 단백질 또는/및 구조적 단백 질을 포함한다. 구조적 단백질은 불활화된 FMDV 파쇄물이나 그 구성 요소인 VP1 VP4의 폴리펩타이드가 있으며, 비구조적 단백질은 리더펩타이드(Lb), 2B, 2C, 3A, 3D, 3AB, 3ABC 에서 선택되는 적어도 하나 이상의 폴리펩타이드가 여기에 포함될 수 있다. 상기 구조적 및 비구조적 단백질을 포함하는 폴리프로틴(Polyprotein) 전구체의 지도가 도 3에 도시되어 있다.

구조적 단백질은 동일한 명칭을 사용하더라도 FMDV의 혈청학적 분류에 따라서 그 구성 아미노산에는 다소의 차이가 있다. 본 발명에 사용가능한 구조적 단백질은 바람직하게는 모든 혈청형에 대하여 형성되는 항체와 특이적으로 반응이 가능한 것인 한 특별히 한정되지는 아니한다. 이러한 구조적 단백질의 예로 서열 번호 118로 표시되는 VP1이 있으며, 본 발명에 사용가능한 예는 이것에 한정되지는 않는다.

하지만 상기 구조적 단백질만을 고정상으로 하여 진단키트로 제작하는 경우에도 백신접종을 하지 않은 소에 대해서는 구제역 감염여부를 정확하게 진단하는 것이 가능하나, 백신이 접종된 소에 대해서는 감염축과의 정확한 구별이 어려운 경우가 있다. 이러한 백신제조시 사용되는 항원의 예는 구조적 단백질 외에도 비구조적 단백질인 3D가 있다. 따라서 비구조적 단백질인 3D를 고정상으로 하는 경우에도 위와 같은 동일한 한계를 지니게 된다. 상기 비구조적 단백질인 3D의 예가 서열번호 121에 나타나 있다.

비구조적 단백질(3D는 제외)은 종래 백신제조에는 사용되지 않던 단백질로 이들에 대한 항체는 감염축에서만 관찰이 가능하다. 따라서 이들 단백질을 고정상으로 적용하는 경우에는 감염축에 대한 정확한 진단이 가능할 것이다. 이러한 비구조적 단백질도 FMDV의 각 혈청형마다 그 구성 아미노산에는 다소의 차이가 있다. 본 발명에 사용가능한 비구조적 단백질은 바람직하게는 모든 혈청형에 대하여 형성되는 항체와 특이적으로 반응이 가능한 것인 한 특별히 한정되지는 아니한다. 이러한 비구조적 단백질의 예로 서열 번호 119로 표시되는 2C, 서열번호 120으로 표시되는 3ABC가 있다.

비구조적 단백질을 단일 고정상으로 적용한 예가 도 4에 도시되어 있다. T는 현재까지 백신제작시 도입된 바 없는 비구조적 단백질(2C 또는 3ABC)이 고정된 반응부이며, C는 대조부이다. 먼저 T, C 모두가 변색된 키트 (a)는 감염축을 나타내며, C만이 변색된 키트 (b)는 백신접종 전의 음성축 또는 백신접종축임을 나타낸다. 만일 어떤 경우라도 C가 변색되지 않은 경우라면 키트가 정상적으로 동작되는 것이 아니라는 것을 의미하므로 결과를 신뢰하여서는 아니된다.

상기와 같은 비구조적 단백질만을 고정상으로 이용하는 경우에는 어떠한 경우에도 백신접종 전의 음성축과 백신접종축을 구별하는 것이 어려우므로 본 발명의 가장 바람직한 실시예는 FMDV에의 감염축 뿐만 아니라 백신접종축을 구별하는 것이 가능한 진단방법 및 진단키트를 제공한다. 이를 위해서는 현재까지 알려진 백신제 조시 사용가능한 항원을 고정상으로 하여 전개막상의 특정 위치에 고정시킨 제 1반응부와, 현재까지 백신제조시 사용된 바 없는 것으로 알려진 비구조적 단백질을 고정상으로 상기 제 1반응부와는 다른 위치에 이격시켜 고정시킨 제 2반응부를 두는 것이 바람직하다. 이들 제 1반응부 및 제 2반응부가 표지된 복합체와 결합하여 일으키는 외관변화를 통해 백신접종축, 감염축, 백신접종 전의 음성축의 여부 등이 진단될 수 있다.

대조시약과 결합되는 고정상은 상기 반응부와는 다른 이격된 위치에서 대조부를 형성한다. 이들은 통상적으로 현재 시판되는 타 진단키트에 적용된 각종 시약 및 고정상이 이용될 수 있으므로 이에 대한 상세한 설명은 후술하는 실시예를 참조하는 것으로 한다.

이하 상기 구성의 키트를 이용한 FMDV 감염진단방법을 바람직한 실시예로서 설명하기로 한다. 동물혈청(또는 플라즈마, 전혈)과 같은 검체는 하우징 커버에 형성된 검체투입부(2)에 스폿된다. 검체투입부의 하단에는 스트립을 구성하는 필터패드(10)가 위치한다. 필터패드에는 또한 검출시약으로 단백질G-금의 결합체가 함유되어 있다. 단백질G-금 결합체는 검체내에 존재하는 모든 항체와 복합체를 형성할 수 있다. 하단에 스트립을 구성하는 저장패드(10)가 위치한 전개시약 투입부(3)에 전개시약을 소정량 로딩한다. 전개시약의 투입으로 상기 표지된 결합체와 검체내 항체가 복합체를 형성하고, 이러한 복합체는 전개막(9:바람직하게는 니트로셀룰로 오스막)의 세로축을 따라 크로마토그래피된다. 전개막상의 반응부(13)에는 미리 도포된 FMDV 재조합 항원(이들의 제작과정은 후술하는 실시예에서 상세히 설명될 것이다)이 고정되어 있어, 만일 복합체가 재조합 항원에 대한 특이 항체를 함유하는 경우 붉은 라인으로 변색되는 반응을 일으키게 된다.

재조합 항원이 구조적 단백질과 비구조적 단백질을 모두 포함하는 경우의 예를 들어 백신접종축, 감염축, 백신접종 전의 음성축의 여부 등을 진단하는 방법을 설명하면 다음과 같다.

이러한 예가 도 5에 도시되어 있다. T1은 현재까지 백신제작시 도입된 항원(구조적 단백질 또는 비구조적 단백질 3D)이 고정된 라인이며, T2는 현재까지 백신제작시 도입된 바 없는 비구조적 단백질(2C 또는 3ABC)이 고정된 라인을 나타낸다. C는 대조라인이다. 먼저 T1, T2, C 모두가 변색된 키트 (a)는 감염축을 나타내며, T1과 C만이 변색된 키트(b)는 백신접종축임을 나타낸다. 마지막으로 키트 (c)는 C만이 변색된 것으로 보아 백신접종 전의 음성축임을 의미한다. 만일 어떤 경우라도 C가 변색되지 않은 경우라면 키트가 정상적으로 동작되는 것이 아니라는 것을 의미하므로 결과를 신뢰하여서는 아니된다.

이상과 같이, 본 발명에 사용가능한 진단장치는 US 5,728,587호에 개시되어진 바와 같이 다양한 구성과 그 개변이 가능하며, 이러한 개별 장치에 포함되는 스트립의 구성(패드의 배열)의 구체적인 내용은 본 발명의 본질을 구성하지는 아니한 다. 따라서, 패드의 배열은 상기 설명된 것에 한하지 않으며, 저장패드/제1필터패드/제2필터패드/전개막/흡수패드 등의 배열도 고려될 수 있다. 이 경우 제 1필터패드 또는 제 2필터패드는 혈액에서 혈구를 여과 분리하거나 검체의 검사에 불필요한 이물질을 여과 제거하는 기능을 수행한다.

또한 본 발명은 반응부에 포함되는 고정상으로 구제역 바이러스를 구성하는 단백질인 구조적 및 비구조적 단백질을 예를 들어 편의상 설명하고 있으나, 본 발명의 기술적 사상은 본원 발명의 출원 당시에 이미 백신제조용 항원으로 제공되거나, 장래에 제공될 수 있는 물질 및 이러한 물질로는 제공되지는 않지만 In Vivo 상태에서 항체를 유도할 수 있는 어떠한 물질(합텐을 포함한다) 또는, FMDV로부터 면역반응을 통해 얻어질 수 있는 각종 항체가 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

이하 본 발명의 내용을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명하기로 한다. 다만 이들 실시예는 본 발명의 내용을 이해하기 위해 제시되는 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 이들 실시예에 한정되어지는 것으로 해석되어져서는 아니된다.

<실시예 1>

원료

유전자 구성 및 서열분석을 위한 올리고뉴클레오타이드는 ResGen(Research Genetics, Huntsville, AL)에서 합성되어졌다. 달리 표시되지 않는 한, DNA 서열분 석 또한 ResGen에서 행해졌다.

중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 위해서, Vent DNA 중합효소 및 완충제는 뉴잉글랜드 바이오랩스사(비버리, MA)로부터 구매하였고, dNTP들의 혼합물은 아머샴-파마시아(피스캐터웨이, NJ)로부터 구매하였으며, 별 다른 표시가 없는 한, 제조자의 설명서에 따라서 사용하였다. PCR 증폭은 퍼킨 엘머사(포스터시, CA)의 GeneAmp 2400 증폭기(thermal cycler)에서 수행하였다. PCR 산물은 제조자의 권유에 따라 Qiagen PCR 스핀 컬럼(Qiagen사 제조, 캐츠워스, CA)을 사용하여 정제하였다. 달리 표시되지 않는 한, 제한 효소는 뉴잉글랜드 바이오랩스사에서 구매하였고 DNA 단편들은 아가로우스(시그마-알드리치)젤에서 분리된 후 제한효소로 처리되어 클로닝에 사용된다.

소정의 단편을 절단하였고 DNA는 제조자의 추천에 따라 QIAEX II 젤 추출키트로 추출하였다. DNA를 제조자의 추천에 따라 H_2O 또는 TE(1mM의 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA; pH 8.0; 시그마-알드리치), 10mM의 트리스(히드록시메틸)아미노메탄-하이드로클로라이드(Tris-HCl; pH 8.0; 시그마-알드리치))에 재부유하였다. 연결도 제조자의 추천에 따라 DNA 연결효소(DNA 리가아제; 베링거만하임, 인디아나폴리스, IN)로 행하였다. 연결반응은 16°C로 밤새동안 배양되어 이루어졌다. 박테리아의 형질전환은 *E.coli* XL1-Blue 능력세포(conpetent cells)를 사용하여 행하였다. 달리 표시되지 않는 한, 형질전환 및 박테리아의 재획선배양(restreaks)은 100μg/㎖의 앰피실린이 추가된 LB 아가(Lennox) 배지에 평판배양하였다. 모든 박테리 아의 배양(배지 또는 액상 배양)은 37°C에서 밤새(16시간) 행하였다.

바람직한 클론을 구별하기 위한 형질전환체의 선별법(screening)은 미니프랩 DNA의 제한효소 분해에 의해 및/또는 콜로니 PCR에 의해 수행되었다. 미니프랩 DNA는 달리 표시되지 않는 한, 분자 클로닝(실험 매뉴얼)에 따라 준비하였다. 바람직한 클론들을 함유한 콜로니들은 변환배지(transfer plate)로부터 번식되거나 또는 70℃의 글리세롤에 축적되었다.

항원의 형성(Antigen Production)

<실시예 1>

재조합 FMDV VP1 항원의 준비

A. FMDV VP1 발현 벡터의 제조

(i) 합성 VP1 유전자의 제조

구제역 바이러스의 VP1 단백질은 97년 O형 대만주 염기서열을 이용하였는데 NCBI 유전자은행(NCBI GenBank data)으로부터 가져왔으며, 합성 유전자의 올리고뉴클레오티드는 ResGen(Huntsville, AL.)에서 합성하였다. 합성 올리고뉴클레오티드에서, 기존의 FMDV 코돈을 대장균내의 재조합 단백질의 발현 수준을 높이기 위한 노력으로 대장균 코돈 바이어스에 적합하게 하기 위하여 변경하였다. 이와 같은 예는, M. Gouy 및 C. Gautier, Nucleic Acids Research 10:7055 (1982); H. Grosjean 및 W. Fiers, Gene 18:199 (1982); J. Watson 등(eds.), Molecular Biology of the Gene, 4th Ed., Benjamina Kumming Publichsing Co., pp. 440 (1987)에 나타나 있 다. 순환 PCR법(recursive PCR method)은 올리고뉴클레오티드를 조합하여 완전한 VP1 유전자로 만드는데 사용된다. 상기 유전자의 제조 방법은 상보적 말단과 오버랩 되는 일련의 올리고뉴클레오티드를 합성하는 것을 포함한다. 가열냉각시에, 상기 말단은 상보적 가닥의 증폭을 위한 프라이머로 사용된다. 그 후, 상기 단편들은 여분의 외부 프라이머들에 의해 증대된다.

올리고뉴클레오티드는 발현 벡타 pGEX-4T-1로 클로닝하기 위한 BamHI 제한부위를 함유하는 것으로 제조되었다.

역방향 올리고뉴클레오티드는 번역 중지 코돈(TAA)와 EcoRI 제한 부위를 함유한다. 외부 프라이머 TW97-1(SEQ ID NO: 1) 및 TW97-16(SEQ ID NO:16)가 사용되었을 때, 전체 VP1(213 아미노산) 유전자가 합성되었다.(SEQ ID NO: 118)

순환 PCR의 이러한 단계들을 하기에 상세하게 기재하였다.

PCR 반응(100ul volume)은 하기와 같이 설정하였다.

Vent DNA 중합효소(1U) 및 1X 버퍼, 더불어 25uM씩 각각의 dNTP(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP), 50pmol씩 각각의 올리고뉴클레오티드 TW97-1(SEQ ID NO:1)와 TW97-16(SEQ ID NO:16) 및 0.25pmol씩 각각의 올리고뉴클레오티드 TW97-2(SEQ ID NO:2)부터 TW97-15(SEQ ID NO:15).

상기 반응은 95℃에서 5분간 배양된 후, 95℃에서 15초, 58℃에서 15초 및 70℃에서 60초씩을 30번 순환하여 증폭시킨 후, 72℃에서 5분간 배양하였다. PCR-산물은 Qiagen PCR 스핀 컬럼을 사용하여 정제하였다.

(ii) PCR 산물의 클로닝

상기에 언급된 대로 증폭된 PCR 산물은 제한 핵산 내부가수분해효소(restriction endonucleases) Bam HI+Eco RI로 분해되고 겔-분리되어진 벡터 pGEX-4T-1로 연결된다. 상기 결합 산물은 XL-1 Blue 능력세포들을 전환하는데 사용된다. 상기 전환된 세포들은 100μg/㎖의 앰피실린이 첨가된 LB 배지에 배양하였다. 미니프랩을 위한 DNA들은 콜로니 배지로부터 밤새 배양되어 얻어지며 Bam HI+Eco RI로 분해하여 소정의 클론들을 선별하였다. 정확하게 삽입된 상기 클론은 pBM-VP1Tw97F라 명명하였다. (도 6)

상기 pBM-VP1Tw97F 클론은 올리고뉴클레오티드 프라이머 pGEX5(SEQ ID NO: 116) 및 pGEX3(SEQ ID NO: 117)으로 서열분석되었다.

B. VP1 플라스미드를 갖는 대장균 균주의 성장 및 발현 유도

각 대장균 클론의 종균들을 100μg/㎖의 앰피실린이 첨가된 500㎖의 살균 LB에서 밤새 제조하여, 37℃의 진탕배양기(shaking orbital incubator)에 보관하였다. 50㎖의 접종물을 종균으로부터 100μg/㎖의 앰피실린이 첨가된 0.5 리터의 무균 LB를 함유한 플래스크로 옮겨서, 이들이 중-대수증식할때까지 37℃로 배양하고, 1mM ITPG(isopropylthio

galactoside)로 37℃에서 3시간 동안 유도하였다. 상기 유도기 후에, 세포들을 원심분리기에서 펠렛화하고 표준 절차에 따라 수거하였다. 펠렛화된 세포들은 다음 단계까지 -70℃에서 보관하였다.

C. VP1 항원의 제조

실시예 B로부터 얻어진 결빙 세포들을 1mM의 PMSF를 함유한 PBS에 재부유하였다. 상기 세포들은 초음파처리(Ultrasonication, Branson)에 의해 분쇄되었다. 봉입체들(inclusion bodies)은 원심분리를 통해 가용성 단백질로부터 분리하였다. 펠렛화된 봉입체들을 PBS와 물로 순차적으로 세척하여 다시 짧은 초음파 처리를 하면서 PBS와 5M의 요소용액에 재부유하였다. 이후 다시 한 번 원심분리로 펠렛화된 봉입체를 분리한 후에 이들 봉입체들을 7M의 구아니딘-염화수소(Guanidine-HCl) 내에서 완전히 용해시켰다. 상기 용해된 재조합 항원들을 원심분리에 의해 정제하고 0.2um 필터를 통과시켰다.

구아니딘-염화수소에 용해된 융합 단백질을 물에 희석하여 변성시키고, 상기 변성된 단백질은 원심분리에 의해 침전시켰다. 펠렛들은 물로 수세한 후 물에 부유시켰다. 2M의 수산화나트륨 용액을 첨가하여 변성된 단백질을 완전히 용해한 후, 계속적으로 첨가하여 단백질 용액의 pH를 중화하였다.

<실시예 2>

재조합 FMDV 2C 항원의 준비

A. FMDV 2C 발현 벡터의 제조

FMDV 2C 단백질의 게놈 서열은 NCBI GenBank data(GI: 5921457, O Strain Chu-Pei)로 부터 얻었으며 전체 2C 유전자의 합성 및 서열분석을 위한 올리고뉴클레오티드는 ResGen(Huntsville, AL.)에서 합성되었다. 해독된 DNA 염기서열은 954개의 핵산 길이(nucleotides long)로, 이는 318개의 아미노산으로 암호화되어 있다. (SEQ ID NO:119)

(i) 합성 전장 2C 유전자의 제조

FMD 바이러스의 2C 유전자를 얻기 위하여, 각각 상보적 말단으로 24개의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 ResGen에서 합성하였다.

순환 PCR 법을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 조합함으로서 완전한 2C 유전자를 만들었다. 상기 유전자의 제조 방법은 상보적 말단과 오버랩 되는 일련의 올리고뉴클레오티드를 합성하는 것을 포함한다. 가열냉각시에, 상기 말단은 상보적 가닥의 증폭을 위해 프라이머(Primers)로 사용된다. 그 후, 상기 단편들은 과량의 외부 프라이머들에 의해 증폭된다. 합성되는 2C 유전자의 사이즈가 크기 때문에, 올리고뉴클레오티드를 3개의 그룹으로 분할하였으며, 각각 순환 PCR법을 행하였다. 제조된 DNA들을 각각 A,B 및 C 단편이라 명명하였다. B 및 C 단편은 PCR에 의해 결합되며, 결합된 B-C 단편은 다시 PCR에 의해 A 단편과 결합하여 완전한 2C 유전자가 생성되었다. 상기 올리고뉴클레오티드들 중 하나는 발현 벡터 pGEX-4T-1로 클로닝하기 위한 BamHI 제한부위를 함유하는 것으로 하였다.

상기 반응은 95℃에서 5분간 배양된 후, 95℃에서 30초, 53℃에서 30초 및 73℃에서 100초씩 35번 순환하여 증폭시킨 후, 73℃에서 5분간 배양하였다. 반응 혼합물은 아가로우스의 미니-겔에서 전기영동에 의해 분석되었다.

(ii) PCR 산물의 클로닝

상기에 언급된 대로 증폭된 PCR 산물은 제한 핵산내부가수분해효소 Bam HI+Hind III로 분해되며 먼저 Bam HI+Hind III로 분해되어진 벡터 pGEX-4T-1로 연결된다. 상기 결합 산물은 *E. Coli* XL-1 Blue 능력세포들을 전환하는데 사용된다. 상기 전환된 세포들을 100μg/㎖의 앰피실린이 첨가된 LB 배지에서 배양하였다. 미 니프랩 DNA들은 QIAprep 플라스미드 DNA 미니-제조 키트를 사용하여 형질전환된 콜로니 배지로부터 밤새 제조하고 Bam HI+Hind III로 분해하여 소정의 클론들을 선별하였다. 정확하게 삽입된 클론은 pBM-2CTw97F라 명명하였다. (도 7)

상기 pBM-2CTw97F 클론은 올리고뉴클레오티드 프라이머 pGEX5(SEQ ID NO:116), pGEX3(SEQ ID NO:117), 2C-25(SEQ ID NO:41) 및 2C-26(SEQ ID NO:42)로 서열분석되었다.

B. 2C 플라즈미드를 갖는 대장균주의 성장 및 발현유도

pBM-2CTw97F의 종균들을 100μg/㎖의 앰피실린이 첨가된 500㎖의 멸균 LB에서 밤새 제조하고, 37℃의 진탕배양기(shaking orbital incubator)에 보관하였다. 50㎖의 접종물을 100μg/㎖의 앰피실린이 첨가된 0.5 리터의 무균 LB

를 함유한 플래스크로 옮겨두었다. 배양주들을 중-대수증식할때까지 37℃로 배양하고, 1mM ITPG(isopropylthiogalactoside)로 37℃에서 3시간 동안 유도하였다. 상기 유도기 후에, 세포들을 원심분리에 의해 펠렛화하고 표준 절차에 따라 수득하였다. 펠렛화된 세포들은 다음 단계까지 -70℃에서 보관하였다.

C. FMDV 2C 항원의 제조

실시예 2B로부터 얻어진 결빙 세포들을 1mM의 PMSF 및 Triton X-100 세제를 함유한 PBS에 재부유한 후, 초음파처리(Ultrasonication, Branson)에 의해 분쇄하였다. 봉입체들(inclusion bodies)은 원심분리를 통해 가용성 단백질로부터 분리하였다. 3 4차례에 걸쳐 오염물을 수세하여 제거하고 세포의 용해질 펠렛을 요소 또는 구아니딘-염화수소(Guanidine-HCl) 내에서 용해하여 2C로 집적된 단백질을 얻었 다. 재조합 2C는 변성조건(5N GuHCl, PBS(pH 7.4)) 하에서 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography, FPLC, Sephacryl S 200 HR)을 통해 정제하고 2C를 함유하는 용출부분은 SDS-PAGE에 의해 확인되었으며 이어 20mM의 인산 버퍼(pH 9.0)로 투석하였다. 단백질 수용액은 소디움 아지드를 0.05%까지 첨가한 후 냉장보관하였다. 장기간 보관하기 위하여(1달 이상), 단백질 수용액을 분주하여 -70℃로 냉각하였다.

<실시예 3>

재조합 FMDV 3ABC 항원의 제조

A. FMDV 3ABC 발현 벡터의 제조

FMDV 3ABC의 게놈 서열분석은 NCBI GenBank data(GI: 5921457, O strain Chu-Pei)로 부터 얻었으며, 완전한 3ABC 유전자의 합성 및 서열분석을 위한 올리고뉴클레오티드는 ResGen(Huntsville, AL.)에서 합성하였다. 해독된 DNA 염기서열은 1281개의 핵산길이로, 이는 427개의 아미노산으로 암호화 되어있다. (SEQ ID NO:120)

(i) 합성 전장 3ABC 유전자의 제조

FMD 바이러스의 3ABC 유전자를 얻기 위하여, 각각 상보적 말단으로 33개의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 ResGen에서 합성하였다.

순환 PCR 법을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 조합함으로서 완전한 3ABC 유전자를 만들었다. 상기 유전자의 제조방법은 상보적 말단과 오버랩 되는 일련의 올리고뉴클레오티드를 합성하는 것을 포함한다. 가열냉각시에, 상기 말단은 상보적 가닥의 증폭을 위해 프라이머(Primers)로 사용된다. 그 후, 상기 단편들은 과량의 외부 프라이머들에 의해 증대된다. 합성되는 3ABC 유전자의 사이즈가 크기 때문에, 올리고뉴클레오티드를 4개의 그룹으로 분할하였으며, 각각 순환 PCR법을 행하였다. 제조된 DNA들을 각각 A,B, C 및 D 단편이라 명명하였다. PCR에 의해 A 및 B 단편이 결합되고, C 및 D 단편이 결합된다. 결합된 A-B 단편은 C-D 단편과 결합되어 완전한 3ABC 유전자가 생성된다.

올리고뉴클레오티드 중 하나는 발현 벡터 pGEX-4T-1로 클로닝하기 위한 BamHI 제한부위를 함유하는 것으로 하였다. 상기 역방향 올리고뉴클레오티드는 번역 중지 코돈(TAA) 및 EcoRI 제한 부위를 갖는다. N- 및 C-말단 프라이머인 3ABC-1(SEQ ID NO: 43) 및 3ABC-33(SEQ ID NO: 75)가 각각 사용되었을 때, 완전한 3ABC(427 아미노산) 유전자가 합성되었다.

PCR 반응(100ul volume)은 하기와 같이 설정하였다.

Vent DNA 중합효소(1U) 및 1X 버퍼, 더불어 25uM씩 각각의 dNTP(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP), 4ul의 100 nM $MgSO_4$, 및 100pmol씩 각각의 올리고뉴클레오티드. 주형은 상기에 언급한 A-B 단편 및 C-D 단편의 혼합물이었다.

상기 반응은 95℃에서 5분간 배양한 후, 95℃에서 30초, 60℃에서 30초 및 73℃에서 120초씩 35번 순환하여 증폭시킨 후, 73℃에서 5분간 배양하였다. PCR-산물은 아가로우스 겔에서 행하였고, DNA 밴드는 Qiagen 겔 추출 키트를 사용하여 겔 로부터 제거용출하였다.

(ii) PCR 산물의 클로닝

상기에 언급된 대로 증폭된 PCR 산물을 제한 핵산내부가수분해효소 Bam HI+Hind III로 분해하여 먼저 Bam HI+Hind III로 분해되어진 벡터 pGEX-4T-1에 연결하였다. 상기 결합 산물은 *E. Coli* XL-1 Blue 능력세포들을 전환하는데 사용된다. 상기 전환된 세포들을 100μg/㎖의 앰피실린이 첨가된 LB 배지에서 배양하였다. 미니프랩 DNA들은 QIAprep 플라스미드 DNA 미니-제조 키트를 사용하여 형질전환된 콜로니 배지로부터 밤새 배양하여 얻었고 Bam HI+

Hind III로 분해하여 소정의 클론들을 선별하였다. 정확하게 삽입된 클론은 pBM-3ABCTw97F라 명명하였다. (도 8)

상기 pBM-3ABCTw97F 클론은 올리고뉴클레오티드 프라이머 pGEX5(SEQ ID NO:116), pGEX3(SEQ ID NO:117), 3ABC-36(SEQ ID NO:78) 및 3ABC-37(SEQ ID NO:79)로 서열분석되었다.

B. 3ABC 플라즈미드를 갖는 대장균주의 성장 및 발현유도

pBM-3ABCTw97F의 종균들을 100μg/㎖의 앰피실린이 첨가된 500㎖의 살균 LB에서 밤새 제조하고, 37℃의 진탕 배양기(shaking orbital incubator)에 보관하였다. 50㎖의 접종물을 100μg/㎖의 앰피실린이 첨가된 0.5 리터의 무균 LB를 함유한 플래스크로 옮겨두었다. 배양주들을 중-대수증식할때까지 37℃로 배양하고, 1mM ITPG(isopropylthio galactoside)로 37℃에서 3시간 동안 유도하였다. 상기 유도기 후에, 세포들을 원심분리에 의해 펠렛화하고 표준 절차에 따라 수거하였다. 펠렛화된 세포들은 다음 단계까지 -70℃에서 보관하였다.

C. FMDV 3ABC 항원의 제조

실시예 3B로부터 얻어진 결빙 세포들을 1mM의 PMSF 및 Triton X-100 세제를 함유한 PBS에 재부유한 후, 초음파처리(Ultrasonication, Branson)에 의해 분쇄하였다. 봉입체들(inclusion bodies)은 원심분리를 통해 가용성 단백질로부터 분리하였다. 3 4차례에 걸쳐 오염물을 세척하여 제거하고 세포의 펠렛을 요소 내에서 용해하여 3ABC가 집적된 단백질을 얻었다. 재조합 3ABC는 변성조건(8M 요소, 10mM DTT, 20mM 인산칼륨, pH 7.0) 하에서 이온교환 크로마토그래피(ion-exchange chromatography, FPLC, Q-Sepharose FF)을 통해 정제하고 NaCl 구배(gradient)에 의해 용출하였다. 용출된 단편은 20mM의 인산 버퍼(pH 9.0)로 투석하였다. Bradford법에 의해 단백질 농도를 측정하고 소디움 아지드를 0.05%까지 첨가한 후, 단백질 수용액을 냉장보관하였다. 장기간 보관하기 위하여(1달 이상), 단백질 수용액을 분주하여 -70℃로 냉각하였다.

<실시예 4>

재조합 FMDV 3D 항원의 제조

A. FMDV 3D 발현 벡터의 제조

(i) 합성 전장 3D 유전자의 제조

FMD 바이러스의 3D 유전자를 얻기 위하여, 각각 상보적 말단으로 36개의 올리고뉴클레오티드를 ResGen에서 합성하였다. 순환 PCR 법을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 조합함으로서 완전한 3D 유전자를 만들었다. (SEQ ID NO: 121)

상기 유전자의 제조 방법은 상보적 말단과 오버랩 되는 일련의 올리고뉴클레오티드를 합성하는 것을 포함한다. 가열냉각시에, 상기 말단은 상보적 가닥의 증폭을 위해 프라이머(Primers)로 사용된다. 그 후, 상기 단편들은 과량의 외부 프라이머들에 의해 증폭된다. 합성되는 3D 유전자의 사이즈가 크기 때문에, 올리고뉴클레오티드를 3개의 그룹으로 분할하였으며, 각각 순환 PCR법을 행하였다. 제조된 DNA들을 각각 A,B 및 C 단편이라 명명하였다. PCR에 의해 B 및 C 단편이 결합되고, 상기 B-C 단편에 A 단편이 결합되어 완전한 3D 유전자가 생성된다.

올리고뉴클레오티드는 발현 벡터 pGEX-4T-1로 클로닝하기 위한 BamHI 제한부위를 함유하는 것으로 하였다. 상기 역방향 올리고뉴클레오티드는 번역 중지 코돈(TAA) 및 EcoRI 제한 부위를 갖는다. N- 및 C-말단 프라이머, 3d-1A (SEQ ID NO: 80) 및 3d-36A(SEQ ID NO: 115)가 각각 사용되었을 때, 완전한 3D(470 아미노산) 유전자가 합성되었다.

이것의 단계는 아래와 같다.

1. 3DA 단편 PCR

PCR 반응(100ul volume)은 다음과 같이 설정하였다.

Vent DNA 중합효소(1U) 및 1X 버퍼, 더불어 25uM씩 각각의 dNTP(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP), 4ul의 100mM $MgSO_4$, 및 100pmol씩 각각의 올리고뉴클레오티드 3d-1A(SEQ ID NO: 80) 및 3d-14(SEQ ID NO: 93). 주형은 0.83pmole씩의 올리고뉴클레오티드 3d-1A 3d-14의 혼합물로 하였다.

상기 반응은 95℃에서 5분간 배양하고, 95℃에서 30초, 53℃에서 30초 및 73℃에서 100초씩 35번 순환하여 증폭시킨 후, 뒤이어 73℃에서 5분간 배양하였다. 상기 반응 혼합물은 아가로우스 미니-겔에서의 전기영동에 의해 분석하였다.

2. 3DB 단편 PCR

PCR 반응(100ul volume)은 다음과 같이 설정하였다.

Vent DNA 중합효소(1U) 및 1X 버퍼, 더불어 25uM씩 각각의 dNTP(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP), 4ul의 100mM $MgSO_4$, 100pmol씩 각각의 올리고뉴클레오티드 3d-13(SEQ ID NO: 92) 및 3d-14(SEQ ID NO: 103). 주형은 0.83pmole씩의 올리고뉴클레오티드 3d-13 3d-24의 혼합물로 하였다.

상기 반응은 95℃에서 5분간 배양한 후, 95℃에서 30초, 55℃에서 30초 및 72℃에서 90초씩 35번 순환하여 증폭시킨 후, 72℃에서 5분간 배양하였다. 상기 반응 혼합물은 아가로우스 미니-겔에서의 전기영동에 의해 분석하였다.

3. 3DC 단편의 PCR

PCR 반응(100ul volume)은 다음과 같이 설정하였다.

Vent DNA 중합효소(1U) 및 1X 버퍼, 더불어 25uM씩 각각의 dNTP(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP), 4ul의 100mM $MgSO_4$, 100pmol씩 각각의 올리고뉴클레오티드 3d-25(SEQ ID NO: 104) 및 3d-36A(SEQ ID NO: 115). 주형은 0.83pmole씩의 올리고뉴클레오티드 3d-25 3d-36A의 혼합물로 하였다.

상기 반응은 95℃에서 5분간 배양한 후, 95℃에서 30초, 53℃에서 30초 및 73℃에서 100초씩 35번 순환하여 증폭시킨 후, 73℃에서 5분간 배양하였다. 상기 반응 혼합물은 아가로우스 미니-겔에서의 전기영동에 의해 분석하였다.

4. 3DB-C 단편 PCR

PCR 반응(100ul volume)은 다음과 같이 설정하였다.

Vent DNA 중합효소(1U) 및 1X 버퍼, 더불어 25uM씩 각각의 dNTP(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP), 4ul의 100mM $MgSO_4$, 100pmol씩 각각의 올리고뉴클레오티드 3d-13(SEQ ID NO: 92) 및 3d-36A(SEQ ID NO: 115). 주형은 상기에 언급한 B 및 C 단편들의 혼합물로 하였다.

상기 반응은 95℃에서 5분간 배양한 후, 95℃에서 30초, 55℃에서 30초 및 73℃에서 90초씩 35번 순환하여 증폭시킨 후, 73℃에서 5분간 배양하였다. 상기 반응 혼합물은 아가로우스 미니-겔에서의 전기영동에 의해 분석하였다.

5. 완전한 3D(ABC) PCR

PCR 반응(100ul volume)은 다음과 같이 설정하였다.

Vent DNA 중합효소(1U) 및 1X 버퍼, 더불어 25uM씩 각각의 dNTP(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP), 4ul의 100mM $MgSO_4$, 100pmol씩 각각의 올리고뉴클레오티드 3d-1A(SEQ ID NO: 80) 및 3d-36A(SEQ ID NO: 115). 주형은 상기에 언급한 A, B 및 C 단편들의 혼합물로 하였다.

상기 반응은 95℃에서 5분간 배양한 후, 95℃에서 30초, 60℃에서 30초 및 73℃에서 120초씩 35번 순환하여 증폭시킨 후, 73℃에서 5분간 배양하였다. PCR 산 물을 아가로우스 겔에서 분해시켜, DNA 밴드를 상기 겔로부터 분리한 후, DNA를 Qiagen 겔 추출 키트를 사용하여 용출하였다.

(ii) PCR 산물의 클로닝

상기에 언급된 대로 증폭된 PCR 산물을 제한 핵산내부가수분해효소 Bam HI+Eco RI으로 분해하여 먼저 Bam HI+Eco RI로 분해되어진 벡터 pGEX-4T-1에 연결하였다. 상기 결합 산물은 *E. Coli* XL-1 Blue 능력세포들을 전환하는데 사용되었다. 상기 전환된 세포들을 100μg/㎖의 앰피실린이 첨가된 LB 배지에서 배양하였다. 미니프랩을 위한 DNA들은 콜로니 배지로부터 밤새 배양하여 얻었고 Bam HI+Eco RI으로 분해하여 소정의 클론들을 선별하였다. 정확하게 삽입된 클론은 pBM-3DTw97F라 명명하였다. (도 9)

B. 3D 플라즈미드를 갖는 대장균주의 성장 및 발현유도

재조합 GST-3D 단백질을 발현시키기 위해서, pBM-3DTw97F 플라스미드를 *E.coli* BL21(DE3)로 형질전환시키고 상기 형질전환체들을 100μg/㎖의 앰피실린이 첨가된 LB-아가 배지에 확산(spread)시켰다. 밤새 pBM-3DTw97F 클론의 종균을 100μg/㎖의 앰피실린이 첨가된 500㎖의 멸균 LB에서 제조하고, 37℃의 진탕배양기(shaking orbital incubator)에 보관하였다. 50㎖의 접종물을 100μg/㎖의 앰피실린이 첨가된 0.5 리터의 살균 LB를 함유한 플래스크로 옮겨두었다. 배양주들이 중-대수증식할때까지 37℃로 배양한 후, 1mM ITPG(isopropylthiogalactoside)로 37℃에서 3시간 동안 유도하였다. 상기 유도기 후에, 세포들을 원심분리에 의해 펠렛화하고 표준 절차에 따라 수거하였다. 펠렛화 된 세포들은 다음 단계까지 -70℃에서 보관하였다.

D. GST-3D 단백질의 준비

실시예로부터 얻어진 동결된 세포를 1mM PMSF와 함께 PBS에 재부유하였다. 상기 세포들을 초음파처리(sonication, Branson, model S-125)하여 용해시켰다. 세포-용해질의 원심분리(10,000rpm, 30분)를 통해 수용성 용해질을 제조하였고 0.45um의 주입필터(syringe filter, Sartorius)로 여과시켰다. 글루타치온 친화력 크로마토그래피로 rGST-3D 단백질을 정제하였고, 수용성 세포 용해질은 PBS로 평형화된 글루타디온 세파로우스 4B(Pharmacia) 컬럼에 로드되었다. 3층용적(bed volumn)의 PBS로 컬럼을 세척한 후에, GST-3D를 10mM의 환원된 글루타치온, 50mM의 Tris-HCl, pH 8.0의 버퍼용액으로 용출하였다. 상기 용출 단편은 8%의 SDS-PAGE에서 분석하였다. 융합 단백질이 함유된 단편은 PBS에서 밤새 투석하였다.

KIT 분석

<실시예 5>

구제역 바이러스 항체검출 키트 구성

A. 항원이 도포된 막(membrane)의 준비

보존 용액으로부터, 재조합 2C 및 3ABC를 0.5㎎/㎖ 농도로 맞추어 혼합하고, 0.22㎛의 필터 유니트 Millex-GV(Millipore)로 여과시켰다. 여과 후에는 아비딘 용액을 내부 대조제로서 사용하였다. 상기 항원 혼합물 및 대조 용액은 Bio-Dot 기구(Bio-Dot)를 사용하여 니트로셀룰로오스 막에 도포하였다. 낮은 습도의 실험실 에서 밤새 건조시킨 후에 상기 막을 BSA/PBS로 블로킹한 후, 적어도 2시간 이상 팬에서 건조시켰다. 상기 제조된 막의 플레이트는 건조제와 함께 밀봉된 컨테이너 또는 낮은 습도의 실험실에서 보관하였다.

B. 단백질 G-금(Gold)의 접합 제조

혈청 알부민과의 비특이적 결합이 제거된 재조합 단백질 G를 시그마사로부터 구매하여 1㎎/㎖의 농도로 만들었다. 단백질 G를 최종 농도가 10μg/㎖가 되도록 교반하면서 금 용액에 한방울씩 첨가한 후, 이 용액을 다시 15분간 교반하였다. 그 후, 금 입자 부유물에 15%의 BSA 용액을 첨가하였다. 다시 15분간 교반한 후, 결합된 금용액을 원심분리하여, 결합되지 않은 단백질 G를 제거하기 위해서 상등액은 버렸다. 결합된 금 용액 펠렛에, 2%의 BSA를 첨가한 후 상기 펠렛을 재부유하기 위해서 음파 배스(Branson model #2200 또는 그 동일당량)에서 초음파처리하였다. 상기 부유물을 다시 원심분리하고, 최종 펠렛을 2% BSA에 재부유하고 냉장고에서 보관하였다.

C. 바이오틴(Biotin)-BSA-금(Gold) 결합물(Conjugate)의 준비: 대조 지표

피어스(Pierce)사로부터 구입한 바이오틴화된 BSA는 금과의 결합에 사용하였다. 상기 결합 절차는 일반적으로 상기에 기재된 단백질 G의 것과 동일하였다. 금 입자 부유물 1㎖당 각각 바이오틴화된 BSA 10μg씩을 강한 교반과 함께 금 용액에 첨가하였다. 상기 결합 반응의 말기에, 금 입자 부유물에 15%의 BSA 용액을 첨가하였다. 또다시 15분 동안 교반한 후, 바이오틴-BSA 금 결합 부유물을 원심분리한 후, 결합되지 않은 바이오틴-BSA를 제거하기 위하여 상등액은 버렸다. 결합된 금 용액 펠렛에, 2%의 BSA를 첨가하여, 부유물을 세척하기 위하여 다시 원심분리 하였다. 상기 펠렛을 2% BSA에 재부유하고 냉장고에서 보관하였다.

D. 필터패드(염료패드 겸함)의 준비

단백질 G가 결합된 금용액을 염료 희석 버퍼(dye dilution buffer, 1% 카제인, 100mM의 인산나트륨, pH 7.0)를 사용하여 희석하였다. 전개막에서 아비딘과 결합하는 대조 라인을 생성하기 위해서 바이오틴-BSA 결합된 금용액을 첨가하였다. 상기 용해된 금 수용액을 Lydall 패드 스트립(미세유리 페이퍼)에 도포한 후 동결건조기에서 건조시켰다. 상기 Lydall 패드는 사용할 때까지 저습의 실험실에서 보관하였다.

E. 저장패드의 준비

셀룰로우스 필터 페이퍼를 전처리 버퍼(10 mM 인산나트륨, pH 7)에 미리 담궈둔 후, 과량의 액체는 제거한 다음 팬에서 건조시켰다. 상기 준비된 저장패드는 저습의 실험실에서 보관하였다.

F. 기구의 조립

상부의 테입으로부터 보호시트를 벗겨낸 후 기저부재인 플레이트의 긴 축을 따라 흡수 패드를 부착하였다. 필터패드는 플레이트 하부의 테입으로부터 보호 시트를 벗겨낸 후 플레이트의 긴 축을 따라 전개막 부위의 근처에 부착하였다. 상기 필터패드는 전개막의 하부면과 겹쳐져야만 한다. 그리고, 저장패드는 필터패드의 하부면을 뒤덮도록 플레이트에 접착하였다. 상기 제조된 막 플레이트는 하우징 내에 맞는 폭의 스트립으로 절단되었다.

결과

모두 1540개의 규명된(identified) 소, 돼지, 염소 및 양의 혈청을 사용하였으며, 검사혈청은 백신전의 음성축, 비감염 백신축 및 감염축으로 구성되어 있다. 참조 시험으로는 각 시험소에서 사용하는 3ABC ELISA(Italy and USDA, USA)를 사용하였다. 전체 시험에서 상대적 민감도는 98.6%(69/70), 특이도는 98.6 %(1449/1470)이며 전체 정확도는 98.6%(1518/1540)이었다.

본 발명에 다른 시험구 vs 참조 시험구

		포지티브	네가티브	총계
대조구	감염구(+)	69	1	70
시험구	무처리구(-)	11	1236	1247
	백신처리구(-)			
	단수접종	4	149	153
	중복접종	6	64	70
총계		90	1450	1540

<인용문헌(특허)>

H.L. Bachrach et al., 미국특허 제 4,140,763호

미국특허 제 5,656,448호 'Dipstick Immunoassay Device'

미국특허 제 5,252,498호 'Carbon Black Immunochemical Label'

미국특허 제 5,559,041호 'Immunoassay Devices and Materials'

미국특허 제 5,728,587호 'Immunoassay Devices and Materials'

미국특허 제 6,027,943호 'Immunoassay Devices and Materials'

W. Yang et al., 미국특허 제 6,048,538호

<인용문헌(저널 및 발표)>

K.J.H. Robson et al., 'An assessment by competition hybridization of the sequence homology between the RNAs of the seven serotypes of FMDV', 37 J. Gen. Virol. 271-276 (1977).

J.F. Newman et al., 'Foot-and-mouth disease virus particles contain replicase protein 3D' 91 Proc Natl Acad Sci USA 733-737 (1994)

D.K. Mackay et al., 'Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant, non-structual proteins in ELISA', 16 Vaccine 446-459 (1998)

B. Pattnail et al., 'Evaluation of primers for PCR amplification of RNA polymerase gene sequences of foot-and-mouth disease virus', 41 Acta Virol 333-336 (1997)

K.J. Sorensen et al., 'Blocking ELISAs using the FMDV non-structral proteins 3D, 3AB, and 3ABC produced in the baculovirus expression system', 20 Vet Q Suppl 2:S17-20 (1998)

J.I. Nunez et al., 'RT-PCR in foot-and-mouth disease diagnosis', 20 Vet Q Suppl 2:S34-36 (1998)

J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, Molucular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)

C. Prodromou et al., 'Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis', 5 Protein Eng 827-829 (1992)

G. Ratish et al., 'C-teminal resign of VP1 of selected FMMDV serotypes: expression in *E. coli* and affinity purification', 43 Acta Virol. 205-211 (1999)

V.V. Suryanarayana et al., ' *E. coli* expressed proteins as diagnostic reagents for typing of FMDV', 144 Arch Virol. 1701-1712 (1999)

S. Viswanathan et al., 'Comparative studies on immunoreactivity of truncated recombinant proteins of foot and mouth disease virus(FMDV) produced in E.coli and insect cells', 37 Indian J Exp Biol. 356-540 (1999)

J. Bayry et al., 'Protective immune response to 16 kDa immunoreactive recombinant protein encoding the C-terminal VP1 portion of Foot and Mouth Disease Virus type Asia 1', 43 Microbiol Immunol. 765-771 (1999)

J. Lubroth et al., 'Cattle response to foot-and-mouth disease virus nonstructual proteins as antigens within vaccines produced using different concentrations.' 29 Vet Q. Suppl 2:S13-17 (1998)

VK. O'Donnell et al., 'Detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus using a liquid-phase blocking sandwich ELISA(LPBE) with a bioengineered 3D protein.' 8 J Vet Diagn Invest 143-150 (1996)

J.L. Bittle et al., 'Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide from the viral nucletide sequence.' 298 Nature 30-33 (1982)

S. Fross et al., 'Nucleotide sequence and genomic organization of foot and mouth disease virus.' 12 Nucleic Acid Res 6587-6601 (1984)

P.V. Barnett et al., 'The role of small ruminants in the epidemiology and transmission of foot-and-mouth disease.' 158 Vet. J. 6-13 (1999)

M.Callens et al., 'Detection of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction and virus isolation in contact sheep without clinical signs of foot-and-mouth disease.' 20(Suppl.2) Vet. Q. 37-40 (1998)

A. Rodriguez et al., 'Immunogenecity of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus: differences between infected and vaccinated swine.' 136 Arch Virol 123-131 (1994)

발명의 효과

본 발명에 의하면 동물체로부터 수득한 검체를 대상으로 구제역 바이러스의 감염여부에 대한 신속하고도 정확한 진단이 가능하다. 또한 경우에 따라 소량의 검체만으로도 구제역 백신접종축과 감염축의 감별이 가능하므로, 야외에서 손쉽고 빠르게 구제역 백신접종여부에 관계없이 구제역 감수성 가축의 구제역 감염여부를 판정할 수 있다.

상술한 바와 같이, 본 발명의 바람직한 실시예를 참조하여 설명하였지만 해당 기술 분야의 숙련된 당업자라면 하기의 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 따라서, 본 발명의 실시예는 FMDV 항원만을 예를 들어 설명하고 있지만,

본 발명의 기술적 사상은 FMDV 항체, PRRSV(Porcine Respiratory and Reproductive Symptom Virus) 항원 및 항체, FeLV(Feline Leukemia Virus)항원, FIV(Feline Immunodeficiency Virus)항체, 광우병 진단 마커, CSF(Classical Swine Fever) 항원 및 항체, B. canis(Brucellosis canis) 항원 및 항체, 요네스(Johnes)항체, BVDV(Bovine Viral Diarhrea Virus)항원 및 항체의 검출에도 동일하게 적용될 수 있음은 물론이다.

또한 본 발명의 기술적 사상은 검체내의 암진단 마커, 호르몬, 효소, 약물, 및 각종 항원 등 생물체의 각종 질병 마커에도 동일하게 적용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.
(1) 검체를 스트립의 로딩영역에 일정량 투입하는 단계; (2) 소정의 표지가 구비된 검출시약과 상기 검체 중의 분석물과 결합시켜 복합체를 형성하는 단계; (3) 상기 복합체를 전개막에 전개하는 단계; 및 (4) 상기 전개막 상의 소정 영역에 FMDV로부터 유래된 또는 FMDV로부터 면역반응을 통해 얻어질 수 있는 항원, 항체 또는 합텐 중에서 선택되는 적어도 하나 이상의 고정상을 갖는 반응부의 외관 변화를 관찰하여 구제역 바이러스의 감염여부를 판단하는 단계를 포함하는 구제역 바이러스 감염 진단방법

청구항 2.
제 1항에 있어서, 상기 진단방법은 샌드위치법 또는 경쟁법인 진단방법

청구항 3.
제 1항에 있어서, 고정상은 FMDV 유래 비구조적 단백질 또는/및 구조적 단백질에서 선택되는 적어도 하나 이상의 단백질을 포함하는 진단방법

청구항 4.
제 1항 또는 제 3항에 있어서, 고정상은 구조적 단백질인 VP1 VP4 폴리펩타이드 또는 불활화된 FMDV 바이러스 파쇄체인 진단방법

청구항 5.
제 1항 또는 제 3항에 있어서, 고정상은 비구조적 단백질인 리더펩타이드(Lb), 2B, 2C, 3D, 3A, 3AB, 3ABC의 군에서 선택되는 적어도 하나 이 상의 폴리펩타이드를 포함하는 진단방법

청구항 6.
제 1 항에 있어서, 반응부는 백신제조가 가능한 구조적 단백질, 3D 단백질 중에서 선택되는 적어도 1종을 포함하는 제 1반응부와, 3D를 제외한 비구조적 단백질로부터 선택되는 적어도 1종을 포함하는 제 2반응부를 포함하는 진단방법

청구항 7.
제 1항에 있어서, 검출시약은 스트립상의 임의의 위치에 구비되는 진단방법

청구항 8.
제 7항에 있어서, 검출시약은 표지된 소정의 항원, 항체 또는 합텐에서 선택되는 적어도 하나 이상의 물질을 포함하는 진단방법

청구항 9.
제 7항에 있어서, 검출시약은 표지된 단백질 G, 단백질 A, 단백질 G/A, 또는 종특이적 IgG, IgM에 결합가능한 항체의 군에서 선택되는 적어도 하나 이상의 물질을 포함하는 진단방법

청구항 10.
제 1항에 있어서, 검체는 혈액, 혈청, 혈장, 소변, 눈물, 침, 젖인 진단방법

청구항 11.
FMDV로부터 유래된 또는 FMDV로부터 면역반응을 통해 얻어질 수 있는 항원, 항체 또는 합텐 중에서 선택되는 적어도 하나 이상의 고정상을 갖는 반응부 및 정상동작여부를 판단하기 위한 대조부가 전개막상의 소정영역에 구비된 스트립; 상기 스트립을 수납하며, 적어도 검체를 투입하기 위한 검체투입부 및 스트립상의 반응부와 대조부에서의 반응결과를 관찰하기 위한 표시창을 구비한 하우징을 포함하는 구제역 바이러스 감염 진단용 키트

청구항 12.
제 11항에 있어서, 고정상은 FMDV 유래 비구조적 단백질 또는/및 구조적 단백질에서 선택되는 적어도 하나 이상의 단백질을 포함하는 키트

청구항 13.
제 11항 또는 제 12항에 있어서, 고정상은 구조적 단백질인 VP1 VP4 폴리펩타이드 또는 불활화된 FMDV 바이러스 파쇄체인 키트

청구항 14.
제 11항에 있어서, 고정상은 비구조적 단백질인 리더펩타이드(Lb), 2B, 2C, 3D, 3A, 3AB, 3ABC의 군에서 선택되는 적어도 하나 이상의 폴리펩타이드를 포함하는 키트

청구항 15.
제 11항에 있어서, 반응부는 백신제조가 가능한 구조적 단백질, 3D 단백질 중에서 선택되는 적어도 1종을 포함하는 제 1반응부와, 3D를 제외한 비구조적 단백질로부터 선택되는 적어도 1종을 포함하는 제 2반응부를 포함하는 키트

청구항 16.
제 11항에 있어서, 스트립상의 임의의 위치에 검출시약이 구비되는 키트

청구항 17.
제 16항에 있어서, 검출시약은 표지된 단백질 G, 단백질 A, 단백질 G/A, 또는 종특이적 IgG, IgM에 결합가능한 항체에서 선택되는 적어도 하나 이상의 물질을 포함하는 키트

청구항 18.
제 11항에 있어서, 상기 스트립은 기저부재상에서 저장패드와, 상기 저장패드의 일단부와 접촉하여 검체를 여과하는 필터패드와, 상기 필터패드의 일단부와 접촉하여 여과된 검체를 모세관 이동시키는 전개막과, 상기 전개막의 일단부에 접촉하는 흡수패드가 순차 연결된 구조인 키트

청구항 19.
제 18항에 있어서, 스트립상의 임의의 위치에 검출시약이 구비되는 키트

청구항 20.
제 18항에 있어서, 기저부재는 플라스틱 또는 유리재질인 키트

청구항 21.
제 19항에 있어서, 검출시약은 분석물의 확인을 위해 육안 또는 기타 기구를 통해 외부에서 인식가능하도록 소정의 표지를 함유하는 키트

청구항 22.
제 19항에 있어서, 검출시약은 촉매, 효소, 효소기질, 형광화합물, 화학발광화합물, 방사성 원소, 금속졸, 비금속졸, 염료졸, 칼라인디케이터, 리포좀에 포함된 색재료, 라텍스 입자, 면역화학적 표지의 군에서 선택된 적어도 하나의 표지를 함유하는 키트

청구항 23.
제 11항에 있어서, 검체내의 분석물은 항원, 항체 또는 합텐 및 이들의 조합인 키트

청구항 24.
제 23항에 있어서, 상기 항체는 단일 클론항체 또는 폴리클론 항체인 키트

청구항 25.
제 18항에 있어서, 스트립은 저장패드와 필터패드 사이에 또 다른 필터패드가 더 추가된 키트

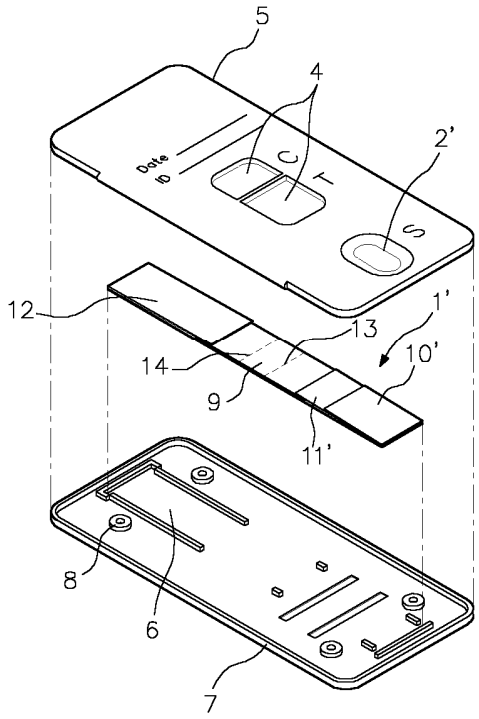
청구항 26.
제 11항에 있어서, 전개막으로 될 수 있는 물질은 나일론, 폴리에스터, 셀룰로오스, 폴리설폰, 폴리비닐리덴디플루오라이드, 셀룰로오스 아세테이트, 폴리우레탄, 유리섬유, 니트로셀룰로오스의 군에서 선택되는 적어도 하나 이상의 물질인 키트

청구항 27.
제 11항에 있어서, 대조부를 구성하는 고정상은 아비딘, 바이오틴, FITC, 항FITC 항체, 마우스 면역 글로불린, 항마우스 면역 글로불린항체에서 선택되는 1종인 키트

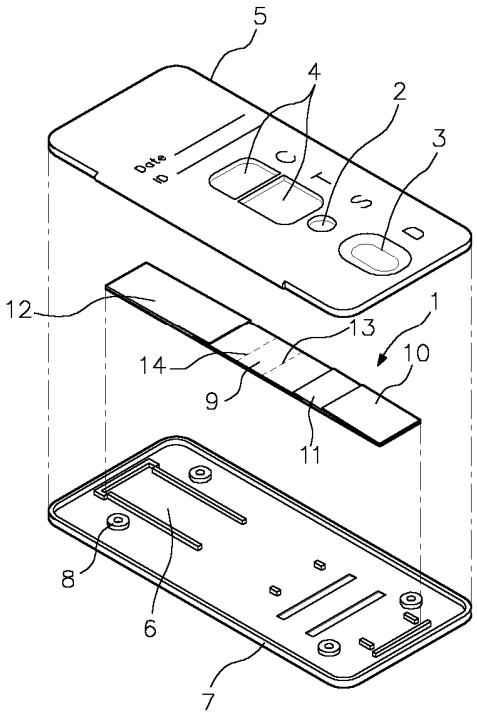
청구항 28.
제 11항에 있어서, 대조시약은 전개막상의 대조부를 구성하는 고정상과 특이적으로 결합하는 표지된 단백질, 항원, 항체에서 선택되는 키트

도면

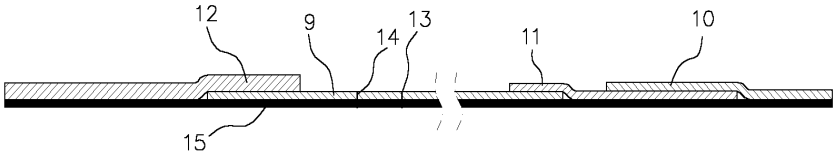
도면1a



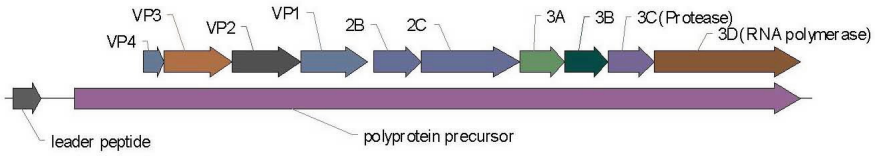
도면1b



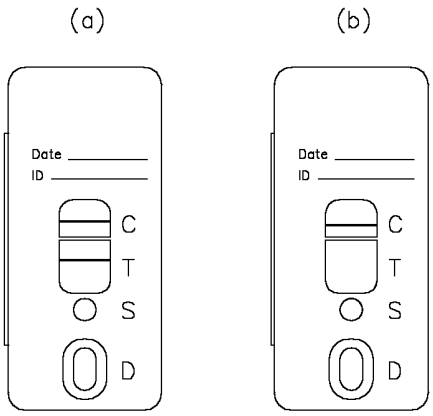
도면2



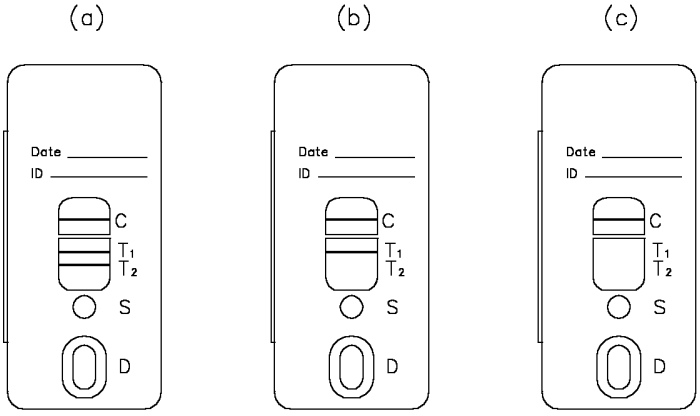
도면3



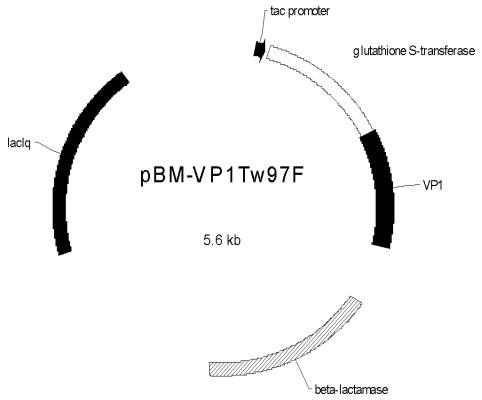
도면4



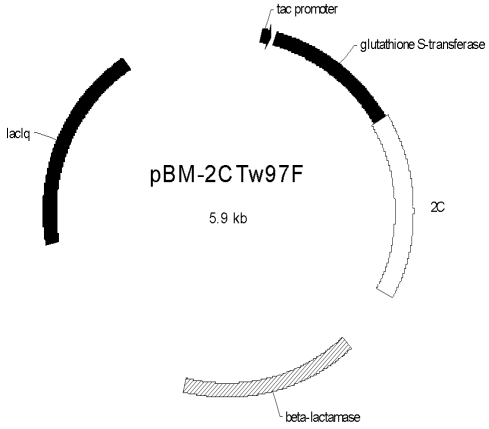
도면5


(a)
(b)
(c)
Date
ID
C
T1
T2
S
D

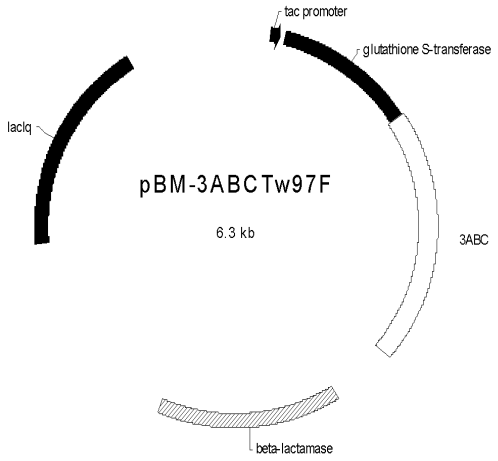
도면6


tac promoter
glutathione S-transferase
laclq
pBM-VP1Tw97F
5.6 kb
VP1
beta-lactamase

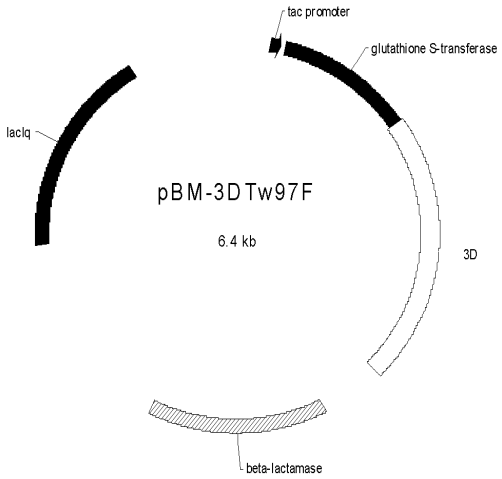
도면7


tac promoter
glutathione S-transferase
laclq
pBM-2CTw97F
5.9 kb
2C
beta-lactamase

도면8



도면9



<110> National Veterinary Research amp; Quarantine Service

<120> Method of Diagnosis of Foot and Mouth Disease and The Diagnotic kit

<160> 121

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for VP1(TW97-1)

<400> 1

atccaaggat ccaccacctc tgcgggtgag tctgcggacc cggtgactgc caccgttgag 60

aac 63

<210> 2

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for VP1(TW97-2)

<400> 2

ccgtgtgctg gcgacgctga acttgggtct caccaccgta gttctcaacg gtggcagtca 60

c 61

<210> 3

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for VP1(TW97-3)

<400> 3

tcagcgtcgc cagcacacgg acagcgcgtt catcttggac cgtttcgtga aagttaagcc 60

60

<210> 4

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for VP1(TW97-4)

<400> 4

cagggatctg catcaggtcc aacacattaa cttgttcctt tggcttaact ttcacgaaac 60

gg 62

<210> 5

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for VP1(TW97-5)

<400> 5

tggacctgat gcagatccct gcccacacct tggtaggtgc gctcctgcgt acggccacct 60

act 63

<210> 6

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for VP1(TW97-6)

<400> 6

tcgccctcgt gcttaacggc cagctccagg tcagagaagt agtaggtggc cgtacgcagg 60

60

<210> 7

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for VP1(TW97-7)

<400> 7

gccgttaagc acgagggcga tctcacctgg gttccaaacg gcgcccctga gaccgcactg 60

ga 62

<210> 8

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for VP1(TW97-8)

<400> 8

gagcggttcc ttgtggtaag cggttgggtt ggtagtgttg tccagtgcgg tctcaggggc 60

60

<210> 9

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for VP1(TW97-9)

<400> 9

cttaccacaa ggaaccgctc acccgtctgg cgctgcctta cacggctcca caccgtgttt 60

tagc 64

<210> 10

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for VP1(TW97-10)

<400> 10

tgctggtgtc accgtacttg ctgctaccgt tgtaaacggt cgctaaaaca cggtgtggag 60

cc 62

<210> 11

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for VP1(TW97-11)

<400> 11

caagtacggt gacaccagca ctaacaacgt gcgtggtgac ctgcaagtgt tagctcagaa 60

gg 62

<210> 12

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for VP1(TW97-12)

<400> 12

gatggcaccg aagttgaagg aggtaggcag agtacgttct gccttctgag ctaacacttg 60

caggt 65

<210> 13

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for VP1(TW97-13)

<400> 13

tccttcaact tcggtgccat caaggcaact cgtgttactg aactgctcta ccgtatgaag 60

cg 62

<210> 14

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for VP1(TW97-14)

<400> 14

ttgaatggcg agcagcggac gcggacagta ggtctcggca cgcttcatac ggtagagcag 60

60

<210> 15

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for VP1(TW97-15)

<400> 15

gtccgctgct cgccattcaa ccgagcgacg ctcgtcacaa gcagcgtatt gtggcaccgg 60

60

<210> 16

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for VP1(TW97-16)

<400> 16

gcctatgaat tcttacagca gctgttttgc cggtgccaca atacgctgct 50

<210> 17

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-1)

<400> 17

gcaggatccg acgacgacga caaactcaaa gcacgtgaca tcaacgacat atttgccgtt 60

ct 62

<210> 18

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-2)

<400> 18

ttgctgtata aacggcaaga attcttgcca ctcaccgacc agtttgacta ggaccggtag 60

60

<210> 19

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-3)

<400> 19

tcaaactgat cctggccatc cgcgactgga ttaaggcatg gatcgcctca gaagagaagt 60

60

<210> 20

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-4)

<400> 20

ctagcggagt cttctcttca aacagtggta ctgtctggac cacggaccgt aggaactttc 60

60

<210> 21

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-5)

<400> 21

gtgcctggca tccttgaaag tcaacgggat ctcaatgacc ccggcaaata caaggaggcc 60

60

<210> 22

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-6)

<400> 22

ggccgtttat gttcctccgg ttccttaccg acctgttgcg cgcagttcgc acaaacttct 60

60

<210> 23

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-7)

<400> 23

gcgtcaagcg tgtttgaaga gcgggaacgt gcacattgcc aatctgtgta aagtggtcgc 60

60

<210> 24

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-8)

<400> 24

ttagacacat ttcaccagcg aggccgcggg tcgttcagct ctgggcttgg tcaccagcac 60

60

<210> 25

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-9)

<400> 25

gacccgaacc agtggtcgtg tgccttcgcg gcaaatccgg cacaaggaaa agcatcctc 59

<210> 26

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-10)

<400> 26

gtgttccttt tcgtaggagc gcttgcacga gcgcgtccgt taaaggtgtg tgaagtgacc 60

60

<210> 27

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-11)

<400> 27

atttccacac acttcactgg taggaccgac tcggtctggt actgcccgcc cgaccctgac 60

60

<210> 28

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-12)

<400> 28

tgacgggcgg gctgggactg gtgaaactgc caatgttagt cgtctggcag cagcactacc 60

60

<210> 29

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-13)

<400> 29

gcagaccgtc gtcgtgatgg acgacttggg ccaaaaccca gacggcaaag acttcaagta 60

60

<210> 30

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-14)

<400> 30

ctgccgtttc tgaagttcat gaaacgggtt taccagaggt ggtgccccaa gtagggcgga 60

60

<210> 31

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-15)

<400> 31

ccacggggtt catcccgcct atggcctcgc tcgaggataa gggtaaaccc ttcaacagca 60

60

<210> 32

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-16)

<400> 32

cccatttggg aagttgtcgt tccagtatta tcgatgttgg ttggacatga gccctaagtg 60

60

<210> 33

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-17)

<400> 33

aacctgtact cgggattcac cccaaagacc atggtgtgcc ccgatgcgct taaccggagg 60

60

<210> 34

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-18)

<400> 34

ggctacgcga attggcctcc aaagtgaaac tgtagctgca ctcgcggttt ctgcccatgt 60

60

<210> 35

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-19)

<400> 35

gagcgccaaa gacgggtaca agatcaacaa caaactggac atagtcaaag cacttgaaga 60

60

<210> 36

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-20)

<400> 36

tatcagtttc gtgaacttct gtgggtgcga ttgggccacc gctacaaggt tatgctgacg 60

60

<210> 37

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-21)

<400> 37

cgatgttcca atacgactgc gctcttctca acggaatggc cgttgaaatg aagagaatgc 60

60

<210> 38

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-22)

<400> 38

gcaactttac ttctcttacg tcgttctgta caagttcgga gttggtggga aggtcttgta 60

60

<210> 39

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-23)

<400> 39

caaccaccct tccagaacat ctaccagctc gttcaggagg tgattgagcg ggtggaacta 60

60

<210> 40

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-24)

<400> 40

actaactcgc ccaccttgat gtgcttttcc acagctcggt gggctataaa tttgtc 56

<210> 41

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-25)

<400> 41

gtcgagaccc gaaccagtgg tcgtgtgcct 30

<210> 42

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 2C(2C-26)

<400> 42

aggcacacga ccactggttc gggtctcgac 30

<210> 43

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-1)

<400> 43

gcaggatccg acgacgacga caaaatttca atcccttccc agaagtccgt gttgtact 58

<210> 44

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-2)

<400> 44

ggtcttcagg cacaacatga aggagtaact cttcccagtc gtgcttcgtc gctagctcaa 60

60

<210> 45

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-3)

<400> 45

cacgaagcag cgatcgagtt cttcgagggg atggtccacg attccatcaa agaggaactc 60

60

<210> 46

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-4)

<400> 46

taaggtagtt tctccttgag gctggggagt aagtcgtctg gagcaagcat tttgcgcgga 60

60

<210> 47

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-5)

<400> 47

ctcgttcgta aaacgcgcct tcaagcgcct gaaagagaac tttgaagttg tagccctgtg 60

60

<210> 48

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-6)

<400> 48

aaacttcaac atcgggacac aaactgggag aaccgtttgt atcactaata cgaggcggtt 60

60

<210> 49

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-7)

<400> 49

tagtgattat gctccgccaa gcgcgcaaga ggtaccaatc ggtggatgac ccactggacg 60

60

<210> 50

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-8)

<400> 50

ccacctactg ggtgacctgc cgctgcatcg agaaccgctg cgccttttct tgggagacct 60

60

<210> 51

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-9)

<400> 51

gcggaaaaga accctctgga gacgagtgcc gctagcgctg tcggtttcag agagagatcc 60

60

<210> 52

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-10)

<400> 52

agccaaagtc tctctctagg gggtggctcg ttccctgcgc gcttctgcgc ttgcgactcg 60

60

<210> 53

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-11)

<400> 53

cgaagacgcg aacgctgagc ccgtcgtgtt cggtagggaa caaccgcgag ctgaaggacc 60

60

<210> 54

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-12)

<400> 54

gttggcgctc atgcggccgg gttacctctc tgtctttggc gatttccact ttcgttttcg 60

60

<210> 55

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-13)

<400> 55

gtcagaaacc tcttaaagtg aaagccgagc tgccacaaca ggagggacca tacgccggcc 60

60

<210> 56

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-14)

<400> 56

gcttttgctt tcacctttag cggtttctgt ctctccattg ggccggcgta tggtccctcc 60

60

<210> 57

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-15)

<400> 57

ctaaaggtga aagcaaaagc ccccgtcgtg aaggaaggac cttacgaggg accggtgaag 60

60

<210> 58

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-16)

<400> 58

gaatgctccc tggccacttc tttggacagc gaaattttca ctttcgtttc ttgaactatc 60

60

<210> 59

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-17)

<400> 59

gaaagcaaag aacttgatag tcactgagag tggtgcgcca ccgaccgact tgcaaaagat 60

60

<210> 60

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-18)

<400> 60

ggctggctga acgttttcta ccagtacccg ttgtgattcg gtcagctcga gtaggagctg 60

60

<210> 61

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-19)

<400> 61

cagtcgagct catcctcgac ggcaagacgg tagccatttg ctgtgctacc ggagtgttcg 60

60

<210> 62

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-20)

<400> 62

gacacgatgg cctcacaagc cgtgacggat ggagcacgga gcagtagaga agcgcctttt 60

60

<210> 63

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-21)

<400> 63

cgtcatctct tcgcggaaaa gtacgacaag atcatgttgg acggcagagc cttgacagac 60

60

<210> 64

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-22)

<400> 64

tgccgtctcg gaactgtctg tcactgatgt ctcacaaact caaactctaa tttcattttc 60

60

<210> 65

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-23)

<400> 65

gtttgagatt aaagtaaaag gacaggacat gctctcagac gccgctctca tggtgttgca 60

60

<210> 66

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-24)

<400> 66

cggcgagagt accacaacgt ggcaccctta gcgcacgcac tgtagtgctt tgtgaaagca 60

60

<210> 67

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-25)

<400> 67

acatcacgaa acactttcgt gacgtagcga gaatgaagaa gggaaccccc gtcgtcggtg 60

60

<210> 68

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-26)

<400> 68

cccttggggg cagcagccac actagttgtt acgactgcag ccctctgagt ataagagacc 60

60

<210> 69

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-27)

<400> 69

gggagactca tattctctgg tgtagccctc acttacaagg acatcgtcgt gtgtatggat 60

60

<210> 70

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-28)

<400> 70

tgtagcagca cacataccta cctctgtggt acggacccga gaaacggatg tcccgtaggt 60

60

<210> 71

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-29)

<400> 71

ctttgcctac agggcatcca ccaaggcagg ctactgcgga ggagccgtcc tggcaaagga 60

60

<210> 72

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-30)

<400> 72

cctcggcagg accgtttcct gccccggctt tgcaagtagc aaccgtgggt gaggcgtcca 60

60

<210> 73

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-31)

<400> 73

ttggcaccca ctccgcaggt ggaaacggca taggatactg ttcgtgtgtt tcccgatcaa 60

60

<210> 74

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-32)

<400> 74

aagcacacaa agggctagtt acgaggactt ctacttccgt gtgtagctgg gacttggtgt 60

60

<210> 75

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-33)

<400> 75

tgcaagcttt tactcgtggt gtggttcagg gtcgatgtgt gccttcatc 49

<210> 76

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-34)

<400> 76

ctttaaaagt gaaagcaaag aacttgatag tcact 35

<210> 77

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-35)

<400> 77

agtgactatc aagttctttg ctttcacttt taaag 35

<210> 78

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-36)

<400> 78

ccgtcgtgtt cggtagggaa 20

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3ABC(3ABC-37)

<400> 79

aaagtaaaag gacaggacat 20

<210> 80

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-1A)

<400> 80

gctatcggat ccgggttgat cgttgatacc agagatgtgg aa 42

<210> 81

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-2)

<400> 81

tgggtgcaag cttggttttg cgcattacat ggacgcgctc ttccacatct ctggtatcaa 60

60

<210> 82

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-3)

<400> 82

caaaaccaag cttgcaccca ccgtcgcgca cggtgtgttc aatcctgagt tcgggcctgc 60

60

<210> 83

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-4)

<400> 83

aacaccttcg ttcagacgtg ggtccttgtt agacaaggcg gcaggcccga actcaggatt 60

60

<210> 84

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-5)

<400> 84

cacgtctgaa cgaaggtgtt gtcctcgatg aagtcatttt ctccaagcat aaaggagaca 60

60

<210> 85

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-6)

<400> 85

cagcggcgga acagcgcttt gtcctcctca gacatctttg tgtctccttt atgcttggag 60

60

<210> 86

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-7)

<400> 86

aaagcgctgt tccgccgctg cgctgctgac tacgcgtcac gcctgcacag tgtgctgggt 60

60

<210> 87

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-8)

<400> 87

ccttgattgc ctcgtaaatg ctcagtgggg catttgccgt acccagcaca ctgtgcaggc 60

60

<210> 88

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-9)

<400> 88

catttacgag gcaatcaagg gcgttgacgg actcgacgcc atggagccag acaccgcacc 60

60

<210> 89

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-10)

<400> 89

tgcaccgcgg cgtttcccct ggagggccca gggaaggcca ggtgcggtgt ctggctccat 60

60

<210> 90

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-11)

<400> 90

aggggaaacg ccgcggtgca cttatcgatt tcgagaacgg cacggtcgga cccgaggttg 60

60

<210> 91

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-12)

<400> 91

aacttgtatt ctcttttctc catgagcttc aaggcagcct caacctcggg tccgaccgtg 60

60

<210> 92

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-13)

<400> 92

gagaaaagag aatacaagtt tgtttgccag accttcctga aggacgaaat tcgcccgatg 60

60

<210> 93

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-14)

<400> 93

aaacgtcgac aatgcgagtc ttgccggcac gtactttctc catcgggcga atttcgtcct 60

60

<210> 94

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-15)

<400> 94

gactcgcatt gtcgacgttt tgcctgttga acacattctt tacaccagga tgatgattgg 60

60

<210> 95

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-16)

<400> 95

ctgcggcccg ttgtttgagt gcatttgtgc acaaaatctg ccaatcatca tcctggtgta 60

60

<210> 96

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-17)

<400> 96

actcaaacaa cgggccgcag attggctcag cggtcggttg caaccctgat gttgattggc 60

60

<210> 97

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-18)

<400> 97

cacacgtttc tgtattgggc gaagtgtgtg ccgaatctct gccaatcaac atcagggttg 60

60

<210> 98

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-19)

<400> 98

gcccaataca gaaacgtgtg ggacgtggac tattcggcct ttgatgcaaa ccactgcagc 60

60

<210> 99

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-20)

<400> 99

ccgtgcggaa cacctcttca aacatgatgt tcatggcatc gctgcagtgg tttgcatcaa 60

60

<210> 100

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-21)

<400> 100

tgaagaggtg ttccgcacgg agttcggctt ccacccgaat gctgagtgga ttctgaagac 60

60

<210> 101

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-22)

<400> 101

gatgcgcttg ttctcatagg cgtgttccgt gttcacgaga gtcttcagaa tccactcagc 60

60

<210> 102

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-23)

<400> 102

cctatgagaa caagcgcatc actgttgaag gcgggatgcc atctggctgt tccgcaacaa 60

60

<210> 103

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-24)

<400> 103

tagagcacgt agatgttatt caaaattgtg ttgatgatgc ttgttgcgga acagccagat 60

60

<210> 104

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-25)

<400> 104

aataacatct acgtgctcta cgccttgcgt agacactatg agggggttga gctggacacc 60

60

<210> 105

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-26)

<400> 105

ttgccaccac gatgtcgtct ccataggaga tcatggtgta ggtgtccagc tcaacccccct 60

60

<210> 106

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-27)

<400> 106

agacgacatc gtggtggcaa gcgattatga tctggacttt gaggccctca agcctcactt 60

60

<210> 107

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-28)

<400> 107

gcttttgtca gctggagtaa tggtttggcc aagagatttg aagtgaggct tgagggcctc 60

60

<210> 108

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-29)

<400> 108

ttactccagc tgacaaaagc gacaaaggtt ttgttcttgg tcactccatt actgacgtca 60

60

<210> 109

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-30)

<400> 109

ccagtgccat aatccatgtg gaagtgtctt ttgaggaaag tgacgtcagt aatggagtga 60

60

<210> 110

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-31)

<400> 110

cacatggatt atggcactgg gttttacaaa cctgtgatgg cctcgaagac cctcgaggct 60

60

<210> 111

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-32)

<400> 111

acttctcctg gatggtccca cggcgtgcaa aggagaggat agcctcgagg gtcttcgagg 60

60

<210> 112

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-33)

<400> 112

tgggaccatc caggagaagt tgatttccgt ggcaggactc gccgtccact ccggaccaga 60

60

<210> 113

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-34)

<400> 113

aaagaggccc tggaagggct caaagagacg ccggtactcg tctggtccgg agtggacggc 60

60

<210> 114

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-35)

<400> 114

agcccttcca gggcctcttt gagattccaa gctacagatc actttacctg cgttgggtga 60

60

<210> 115

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(3d-36A)

<400> 115

gcaatcgaat tcttatgcgt cgccgcacac ggcgttcacc caacgcaggt aaagt 55

<210> 116

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(pGEX5)

<400> 116

ctggcaagcc acgtttggtg 20

<210> 117

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide for 3D(pGEX3)

<400> 117

ggagctgcat gtgtcagagg 20

<210> 118

<211> 639

<212> DNA

<213> Foot-and-mouth disease virus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(639)

<223> Synthetic Nucleotide and Amino acid Sequence of VP-1 Protein

<400> 118

acc acc tct gcg ggt gag tct gcg gac ccg gtg act gcc acc gtt gag 48

Thr Thr Ser Ala Gly Glu Ser Ala Asp Pro Val Thr Ala Thr Val Glu

1 5 10 15

aac tac ggt ggt gag acc caa gtt cag cgt cgc cag cac acg gac agc 96

Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Val Gln Arg Arg Gln His Thr Asp Ser

20 25 30

gcg ttc atc ttg gac cgt ttc gtg aaa gtt aag cca aag gaa caa gtt 144

Ala Phe Ile Leu Asp Arg Phe Val Lys Val Lys Pro Lys Glu Gln Val

35 40 45

aat gtg ttg gac ctg atg cag atc cct gcc cac acc ttg gta ggt gcg 192

Asn Val Leu Asp Leu Met Gln Ile Pro Ala His Thr Leu Val Gly Ala

50 55 60

ctc ctg cgt acg gcc acc tac tac ttc tct gac ctg gag ctg gcc gtt 240

Leu Leu Arg Thr Ala Thr Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Glu Leu Ala Val

65 70 75 80

aag cac gag ggc gat ctc acc tgg gtt cca aac ggc gcc cct gag acc 288

Lys His Glu Gly Asp Leu Thr Trp Val Pro Asn Gly Ala Pro Glu Thr

85 90 95

gca ctg gac aac act acc aac cca acc gct tac cac aag gaa ccg ctc 336
Ala Leu Asp Asn Thr Thr Asn Pro Thr Ala Tyr His Lys Glu Pro Leu
100 105 110

acc cgt ctg gcg ctg cct tac acg gct cca cac cgt gtt tta gcg acc 384
Thr Arg Leu Ala Leu Pro Tyr Thr Ala Pro His Arg Val Leu Ala Thr
115 120 125

gtt tac aac ggt agc agc aag tac ggt gac acc agc act aac aac gtg 432
Val Tyr Asn Gly Ser Ser Lys Tyr Gly Asp Thr Ser Thr Asn Asn Val
130 135 140

cgt ggt gac ctg caa gtg tta gct cag aag gca gaa cgt act ctg cct 480
Arg Gly Asp Leu Gln Val Leu Ala Gln Lys Ala Glu Arg Thr Leu Pro
145 150 155 160

acc tcc ttc aac ttc ggt gcc atc aag gca act cgt gtt act gaa ctg 528
Thr Ser Phe Asn Phe Gly Ala Ile Lys Ala Thr Arg Val Thr Glu Leu
165 170 175

ctc tac cgt atg aag cgt gcc gag acc tac tgt ccg cgt ccg ctg ctc 576
Leu Tyr Arg Met Lys Arg Ala Glu Thr Tyr Cys Pro Arg Pro Leu Leu
180 185 190

gcc att caa ccg agc gac gct cgt cac aag cag cgt att gtg gca ccg 624
Ala Ile Gln Pro Ser Asp Ala Arg His Lys Gln Arg Ile Val Ala Pro
195 200 205

gca aaa cag ctg ctg 639
Ala Lys Gln Leu Leu
210

<210> 119
<211> 954
<212> DNA
<213> Foot-and-mouth disease virus
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(954)
<223> Synthetic Nucleotide and Amino acid Sequence of 2C Protein
<400> 119

```
ctc aaa gca cgt gac atc aac gac ata ttt gcc gtt ctt aag aac ggt          48
Leu Lys Ala Arg Asp Ile Asn Asp Ile Phe Ala Val Leu Lys Asn Gly
  1               5                  10                  15
gag tgg ctg gtc aaa ctg atc ctg gcc atc cgc gac tgg att aag gca          96
Glu Trp Leu Val Lys Leu Ile Leu Ala Ile Arg Asp Trp Ile Lys Ala
             20                  25                  30
tgg atc gcc tca gaa gag aag ttt gtc acc atg aca gac ctg gtg cct         144
Trp Ile Ala Ser Glu Glu Lys Phe Val Thr Met Thr Asp Leu Val Pro
         35                  40                  45
ggc atc ctt gaa agt caa cgg gat ctc aat gac ccc ggc aaa tac aag         192
Gly Ile Leu Glu Ser Gln Arg Asp Leu Asn Asp Pro Gly Lys Tyr Lys
     50                  55                  60
gag gcc aag gaa tgg ctg gac aac gcg cgt caa gcg tgt ttg aag agc         240
Glu Ala Lys Glu Trp Leu Asp Asn Ala Arg Gln Ala Cys Leu Lys Ser
 65                  70                  75                  80
ggg aac gtg cac att gcc aat ctg tgt aaa gtg gtc gct ccg gcg ccc         288
Gly Asn Val His Ile Ala Asn Leu Cys Lys Val Val Ala Pro Ala Pro
                 85                  90                  95
agc aag tcg aga ccc gaa cca gtg gtc gtg tgc ctt cgc ggc aaa tcc         336
Ser Lys Ser Arg Pro Glu Pro Val Val Val Cys Leu Arg Gly Lys Ser
            100                 105                 110
ggc aca agg aaa agc atc ctc gcg aac gtg ctc gcg cag gca att tcc         384
Gly Thr Arg Lys Ser Ile Leu Ala Asn Val Leu Ala Gln Ala Ile Ser
        115                 120                 125
aca cac ttc act ggt agg acc gac tcg gtc tgg tac tgc ccg ccc gac         432
Thr His Phe Thr Gly Arg Thr Asp Ser Val Trp Tyr Cys Pro Pro Asp
    130                 135                 140
cct gac cac ttt gac ggt tac aat cag cag acc gtc gtc gtg atg gac         480
Pro Asp His Phe Asp Gly Tyr Asn Gln Gln Thr Val Val Val Met Asp
145                 150                 155                 160
gac ttg ggc caa aac cca gac ggc aaa gac ttc aag tac ttt gcc caa         528
Asp Leu Gly Gln Asn Pro Asp Gly Lys Asp Phe Lys Tyr Phe Ala Gln
                165                 170                 175
atg gtc tcc acc acg ggg ttc atc ccg cct atg gcc tcg ctc gag gat         576
```

```
Met Val Ser Thr Thr Gly Phe Ile Pro Pro Met Ala Ser Leu Glu Asp
            180                 185                 190
aag ggt aaa ccc ttc aac agc aag gtc ata ata gct aca acc aac ctg          624
Lys Gly Lys Pro Phe Asn Ser Lys Val Ile Ile Ala Thr Thr Asn Leu
        195                 200                 205
tac tcg gga ttc acc cca aag acc atg gtg tgc ccc gat gcg ctt aac          672
Tyr Ser Gly Phe Thr Pro Lys Thr Met Val Cys Pro Asp Ala Leu Asn
    210                 215                 220
cgg agg ttt cac ttt gac atc gac gtg agc gcc aaa gac ggg tac aag          720
Arg Arg Phe His Phe Asp Ile Asp Val Ser Ala Lys Asp Gly Tyr Lys
225                 230                 235                 240
atc aac aac aaa ctg gac ata gtc aaa gca ctt gaa gac acc cac gct          768
Ile Asn Asn Lys Leu Asp Ile Val Lys Ala Leu Glu Asp Thr His Ala
                245                 250                 255
aac ccg gtg gcg atg ttc caa tac gac tgc gct ctt ctc aac gga atg          816
Asn Pro Val Ala Met Phe Gln Tyr Asp Cys Ala Leu Leu Asn Gly Met
            260                 265                 270
gcc gtt gaa atg aag aga atg cag caa gac atg ttc aag cct caa cca          864
Ala Val Glu Met Lys Arg Met Gln Gln Asp Met Phe Lys Pro Gln Pro
        275                 280                 285
ccc ttc cag aac atc tac cag ctc gtt cag gag gtg att gag cgg gtg          912
Pro Phe Gln Asn Ile Tyr Gln Leu Val Gln Glu Val Ile Glu Arg Val
    290                 295                 300
gaa cta cac gaa aag gtg tcg agc cac ccg ata ttt aaa cag                  954
Glu Leu His Glu Lys Val Ser Ser His Pro Ile Phe Lys Gln
305                 310                 315
<210>    120
<211>    1281
<212>    DNA
<213>    Foot-and-mouth disease virus
<220>
<221>    CDS
<222>    (1)..(1281)
<223>    Synthetic Nucleotide and Amino acid Sequence of 3ABC Protein
```

<400> 120

att tca atc cct tcc cag aag tcc gtg ttg tac ttc ctc att gag aag 48
Ile Ser Ile Pro Ser Gln Lys Ser Val Leu Tyr Phe Leu Ile Glu Lys
1 5 10 15

ggt cag cac gaa gca gcg atc gag ttc ttc gag ggg atg gtc cac gat 96
Gly Gln His Glu Ala Ala Ile Glu Phe Phe Glu Gly Met Val His Asp
20 25 30

tcc atc aaa gag gaa ctc cga ccc ctc att cag cag acc tcg ttc gta 144
Ser Ile Lys Glu Glu Leu Arg Pro Leu Ile Gln Gln Thr Ser Phe Val
35 40 45

aaa cgc gcc ttc aag cgc ctg aaa gag aac ttt gaa gtt gta gcc ctg 192
Lys Arg Ala Phe Lys Arg Leu Lys Glu Asn Phe Glu Val Val Ala Leu
50 55 60

tgt ttg acc ctc ttg gca aac ata gtg att atg ctc cgc caa gcg cgc 240
Cys Leu Thr Leu Leu Ala Asn Ile Val Ile Met Leu Arg Gln Ala Arg
65 70 75 80

aag agg tac caa tcg gtg gat gac cca ctg gac ggc gac gta gct ctt 288
Lys Arg Tyr Gln Ser Val Asp Asp Pro Leu Asp Gly Asp Val Ala Leu
85 90 95

ggc gac gcg gaa aag aac cct ctg gag acg agt gcc gct agc cgt gtc 336
Gly Asp Ala Glu Lys Asn Pro Leu Glu Thr Ser Ala Ala Ser Arg Val
100 105 110

ggt ttc aga gag aga tcc ccc acc gag caa ggg acg cgc gaa gac gcg 384
Gly Phe Arg Glu Arg Ser Pro Thr Glu Gln Gly Thr Arg Glu Asp Ala
115 120 125

aac gct gag ccc gtc gtg ttc ggt agg gaa caa ccg cga gct gaa gga 432
Asn Ala Glu Pro Val Val Phe Gly Arg Glu Gln Pro Arg Ala Glu Gly
130 135 140

ccc tac gct ggg cca ctc gag cgt cag aaa cct ctt aaa gtg aaa gcc 480
Pro Tyr Ala Gly Pro Leu Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys Val Lys Ala
145 150 155 160

gag ctg cca caa cag gag gga cca tac gcc ggc cca atg gag aga cag 528
Glu Leu Pro Gln Gln Glu Gly Pro Tyr Ala Gly Pro Met Glu Arg Gln
165 170 175

aaa ccg cta aag gtg aaa gca aaa gcc ccc gtc gtg aag gaa gga cct 576
Lys Pro Leu Lys Val Lys Ala Lys Ala Pro Val Val Lys Glu Gly Pro
180 185 190
tac gag gga ccg gtg aag aaa cct gtc gct tta aaa gtg aaa gca aag 624
Tyr Glu Gly Pro Val Lys Lys Pro Val Ala Leu Lys Val Lys Ala Lys
195 200 205
aac ttg ata gtc act gag agt ggt gcg cca ccg acc gac ttg caa aag 672
Asn Leu Ile Val Thr Glu Ser Gly Ala Pro Pro Thr Asp Leu Gln Lys
210 215 220
atg gtc atg ggc aac act aag cca gtc gag ctc atc ctc gac ggc aag 720
Met Val Met Gly Asn Thr Lys Pro Val Glu Leu Ile Leu Asp Gly Lys
225 230 235 240
acg gta gcc att tgc tgt gct acc gga gtg ttc ggc act gcc tac ctc 768
Thr Val Ala Ile Cys Cys Ala Thr Gly Val Phe Gly Thr Ala Tyr Leu
245 250 255
gtg cct cgt cat ctc ttc gcg gaa aag tac gac aag atc atg ttg gac 816
Val Pro Arg His Leu Phe Ala Glu Lys Tyr Asp Lys Ile Met Leu Asp
260 265 270
ggc aga gcc ttg aca gac agt gac tac aga gtg ttt gag ttt gag att 864
Gly Arg Ala Leu Thr Asp Ser Asp Tyr Arg Val Phe Glu Phe Glu Ile
275 280 285
aaa gta aaa gga cag gac atg ctc tca gac gcc gct ctc atg gtg ttg 912
Lys Val Lys Gly Gln Asp Met Leu Ser Asp Ala Ala Leu Met Val Leu
290 295 300
cac cgt ggg aat cgc gtg cgt gac atc acg aaa cac ttt cgt gac gta 960
His Arg Gly Asn Arg Val Arg Asp Ile Thr Lys His Phe Arg Asp Val
305 310 315 320
gcg aga atg aag aag gga acc ccc gtc gtc ggt gtg atc aac aat gct 1008
Ala Arg Met Lys Lys Gly Thr Pro Val Val Gly Val Ile Asn Asn Ala
325 330 335
gac gtc ggg aga ctc ata ttc tct ggt gta gcc ctc act tac aag gac 1056
Asp Val Gly Arg Leu Ile Phe Ser Gly Val Ala Leu Thr Tyr Lys Asp
340 345 350
atc gtc gtg tgt atg gat gga gac acc atg cct ggg ctc ttt gcc tac 1104

Ile Val Val Cys Met Asp Gly Asp Thr Met Pro Gly Leu Phe Ala Tyr

355 360 365

agg gca tcc acc aag gca ggc tac tgc gga gga gcc gtc ctg gca aag 1152

Arg Ala Ser Thr Lys Ala Gly Tyr Cys Gly Gly Ala Val Leu Ala Lys

370 375 380

gac ggg gcc gaa acg ttc atc gtt ggc acc cac tcc gca ggt gga aac 1200

Asp Gly Ala Glu Thr Phe Ile Val Gly Thr His Ser Ala Gly Gly Asn

385 390 395 400

ggc ata gga tac tgt tcg tgt gtt tcc cga tca atg ctc ctg aag atg 1248

Gly Ile Gly Tyr Cys Ser Cys Val Ser Arg Ser Met Leu Leu Lys Met

405 410 415

aag gca cac atc gac cct gaa cca cac cac gag 1281

Lys Ala His Ile Asp Pro Glu Pro His His Glu

420 425

<210> 121

<211> 1413

<212> DNA

<213> Foot-and-mouth disease virus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1410)

<223> Synthetic Nucleotide and Amino acid Sequence of 3D Protein

<400> 121

ggg ttg atc gtt gat acc aga gat gtg gaa gag cgc gtc cat gta atg 48

Gly Leu Ile Val Asp Thr Arg Asp Val Glu Glu Arg Val His Val Met

1 5 10 15

cgc aaa acc aag ctt gca ccc acc gtc gcg cac ggt gtg ttc aat cct 96

Arg Lys Thr Lys Leu Ala Pro Thr Val Ala His Gly Val Phe Asn Pro

20 25 30

gag ttc ggg cct gcc gcc ttg tct aac aag gac cca cgt ctg aac gaa 144

Glu Phe Gly Pro Ala Ala Leu Ser Asn Lys Asp Pro Arg Leu Asn Glu

35 40 45

ggt gtt gtc ctc gat gaa gtc att ttc tcc aag cat aaa gga gac aca 192

Gly Val Val Leu Asp Glu Val Ile Phe Ser Lys His Lys Gly Asp Thr

```
     50                  55                  60

aag atg tct gag gag gac aaa gcg ctg ttc cgc cgc tgc gct gct gac          240
Lys Met Ser Glu Glu Asp Lys Ala Leu Phe Arg Arg Cys Ala Ala Asp
 65                  70                  75                  80

tac gcg tca cgc ctg cac agt gtg ctg ggt acg gca aat gcc cca ctg          288
Tyr Ala Ser Arg Leu His Ser Val Leu Gly Thr Ala Asn Ala Pro Leu
                 85                  90                  95

agc att tac gag gca atc aag ggc gtt gac gga ctc gac gcc atg gag          336
Ser Ile Tyr Glu Ala Ile Lys Gly Val Asp Gly Leu Asp Ala Met Glu
            100                 105                 110

cca gac acc gca cct ggc ctt ccc tgg gcc ctc cag ggg aaa cgc cgc          384
Pro Asp Thr Ala Pro Gly Leu Pro Trp Ala Leu Gln Gly Lys Arg Arg
        115                 120                 125

ggt gca ctt atc gat ttc gag aac ggc acg gtc gga ccc gag gtt gag          432
Gly Ala Leu Ile Asp Phe Glu Asn Gly Thr Val Gly Pro Glu Val Glu
    130                 135                 140

gct gcc ttg aag ctc atg gag aaa aga gaa tac aag ttt gtt tgc cag          480
Ala Ala Leu Lys Leu Met Glu Lys Arg Glu Tyr Lys Phe Val Cys Gln
145                 150                 155                 160

acc ttc ctg aag gac gaa att cgc ccg atg gag aaa gta cgt gcc ggc          528
Thr Phe Leu Lys Asp Glu Ile Arg Pro Met Glu Lys Val Arg Ala Gly
                165                 170                 175

aag act cgc att gtc gac gtt ttg cct gtt gaa cac att ctt tac acc          576
Lys Thr Arg Ile Val Asp Val Leu Pro Val Glu His Ile Leu Tyr Thr
            180                 185                 190

agg atg atg att ggc aga ttt tgt gca caa atg cac tca aac aac ggg          624
Arg Met Met Ile Gly Arg Phe Cys Ala Gln Met His Ser Asn Asn Gly
        195                 200                 205

ccg cag att ggc tca gcg gtc ggt tgc aac cct gat gtt gat tgg cag          672
Pro Gln Ile Gly Ser Ala Val Gly Cys Asn Pro Asp Val Asp Trp Gln
    210                 215                 220

aga ttc ggc aca cac ttc gcc caa tac aga aac gtg tgg gac gtg gac          720
Arg Phe Gly Thr His Phe Ala Gln Tyr Arg Asn Val Trp Asp Val Asp
225                 230                 235                 240
```

```
tat tcg gcc ttt gat gca aac cac tgc agc gat gcc atg aac atc atg          768
Tyr Ser Ala Phe Asp Ala Asn His Cys Ser Asp Ala Met Asn Ile Met
                245                 250                 255
ttt gaa gag gtg ttc cgc acg gag ttc ggc ttc cac ccg aat gct gag          816
Phe Glu Glu Val Phe Arg Thr Glu Phe Gly Phe His Pro Asn Ala Glu
            260                 265                 270
tgg att ctg aag act ctc gtg aac acg gaa cac gcc tat gag aac aag          864
Trp Ile Leu Lys Thr Leu Val Asn Thr Glu His Ala Tyr Glu Asn Lys
        275                 280                 285
cgc atc act gtt gaa ggc ggg atg cca tct ggc tgt tcc gca aca agc          912
Arg Ile Thr Val Glu Gly Gly Met Pro Ser Gly Cys Ser Ala Thr Ser
    290                 295                 300
atc atc aac aca att ttg aat aac atc tac gtg ctc tac gcc ttg cgt          960
Ile Ile Asn Thr Ile Leu Asn Asn Ile Tyr Val Leu Tyr Ala Leu Arg
305                 310                 315                 320
aga cac tat gag ggg gtt gag ctg gac acc tac acc atg atc tcc tat         1008
Arg His Tyr Glu Gly Val Glu Leu Asp Thr Tyr Thr Met Ile Ser Tyr
                325                 330                 335
gga gac gac atc gtg gtg gca agc gat tat gat ctg gac ttt gag gcc         1056
Gly Asp Asp Ile Val Val Ala Ser Asp Tyr Asp Leu Asp Phe Glu Ala
            340                 345                 350
ctc aag cct cac ttc aaa tct ctt ggc caa acc att act cca gct gac         1104
Leu Lys Pro His Phe Lys Ser Leu Gly Gln Thr Ile Thr Pro Ala Asp
        355                 360                 365
aaa agc gac aaa ggt ttt gtt ctt ggt cac tcc att act gac gtc act         1152
Lys Ser Asp Lys Gly Phe Val Leu Gly His Ser Ile Thr Asp Val Thr
    370                 375                 380
ttc ctc aaa aga cac ttc cac atg gat tat ggc act ggg ttt tac aaa         1200
Phe Leu Lys Arg His Phe His Met Asp Tyr Gly Thr Gly Phe Tyr Lys
385                 390                 395                 400
cct gtg atg gcc tcg aag acc ctc gag gct atc ctc tcc ttt gca cgc         1248
Pro Val Met Ala Ser Lys Thr Leu Glu Ala Ile Leu Ser Phe Ala Arg
                405                 410                 415
cgt ggg acc atc cag gag aag ttg att tcc gtg gca gga ctc gcc gtc         1296
```

```
Arg Gly Thr Ile Gln Glu Lys Leu Ile Ser Val Ala Gly Leu Ala Val
            420                 425                 430
cac tcc gga cca gac gag tac cgg cgt ctc ttt gag ccc ttc cag ggc        1344
His Ser Gly Pro Asp Glu Tyr Arg Arg Leu Phe Glu Pro Phe Gln Gly
        435                 440                 445
ctc ttt gag att cca agc tac aga tca ctt tac ctg cgt tgg gtg aac        1392
Leu Phe Glu Ile Pro Ser Tyr Arg Ser Leu Tyr Leu Arg Trp Val Asn
    450                 455                 460
gcc gtg tgc ggc gac gca          taa                                   1413
Ala Val Cys Gly Asp Ala
465                 470
```