



후천성 면역결핍증(AIDS)환자의 진단시약 개발에 관한 연구

Development of AIDS Diagnostic Kits

연구기관
한국과학기술연구원
부설 유전공학연구소

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 “후천선 면역 결핍증(AIDS) 환자의 진단시약 개발”에 관한 최종 보고서로 제출합니다.

1992. 7.

주관연구기관명 : 한국과학기술연구원 부설 유전공학연구소
총괄연구책임자 : 이 영 익 (유전공학연구소 책임연구원)
연구 원 : 남 상 욱 (유전공학연구소 선임연구원)
손 미 진 (유전공학연구소 연구원)
박 명 례 (유전공학연구소 연구원)
조 서 회 (유전공학연구소 연구원)
이 기 순 (유전공학연구소 연구원)
장 지 은 (유전공학연구소 연구원)

요 약 문

I. 제 목

후천성 면역 결핍증(AIDS) 환자의 진단시약 개발 연구

II. 연구의 목적 및 중요성

본 연구에서는 최근 세계적 및 국내적으로도 크게 보건문제화 되고 있는 AIDS의 확산을 막기 위한 조기진단 및 감염의 방지를 위하여 유전공학적 기법으로 특이하게 항체의 존재유무를 확인할 수 있는 초고속 초정밀의 진단시약 개발을 목표로 한다.

본실험에서는 HIV(Human Immuno deficiency Virus)의 유전인자중 env 유전인자와 gag 유전인자를 비롯 몇개의 중요한 구조 유전인자를 *E. coli* 내에서 발현시켜, 정제된 다음 정제된 단백질을 사람 적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론 항체에 화학적으로 결합(cross-link)시켜 합성체(conjugate)를 만든후 1~2방울의 환자혈액을 첨가하였을때 HIV가 감염된 AIDS 환자일 경우 환자자신의 적혈구와 특이하게 응집을 일으킨다. 이 반응은 매우 빠르게 일어나며 쉽게 육안으로도 판독할 수 있어 기존의 효소면역법이나 Western blot, RIA의 방법보다 간단하고 빨라서 진단과정에서 생길수 있는 여러가지 위험을 줄일 수 있는 이점이 있으며 이러한 진단시약의 개발은 조기진단으로 전세계적으로 확장추세에 있는 AIDS의 국

내전파를 막아 앞으로 국민보건 향상에 크게 기여할 것이다.

II. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구는 후천성 면역결핍증(AIDS)을 일으키는 사람의 면역결핍 바이러스 타입1(HIV-1) 에서 가장 강한 항원성을 나타내는 항원인 gp41(env) 와 gag 부위를 유전공학적 기법으로 대장균내에서 용합단백질 상태로 발현 시킨후 수많은 대장균의 단백질중 바이러스 항원만을 DEAE 크로마토그래피를 이용하여 one step 으로 신속하면서도 용이하게 고순도로 정제한후 이 HIV-1 항원을 이용하여 진단시약을 개발하고자 한것이다. 이렇게 분리된 단백질을 사용하여 효소면역 측정법으로 HIV-1 양성 및 음성혈청을 조사해 본 결과 이들 단백질이 항체에 대하여 민감도와 특이성이 높음이 밝혀졌으며, 정제된 단백질의 수율도 높아 (10mg-20mg/l) 기존의 방법보다 진보된 것임을 알수 있었다. 또한 순수하게 정제된 항원단백질을 사람적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론항체에 여러가지 cross linker를 이용하여 화학적으로 결합시켜 합성체 (conjugate)를 만든후 여기에 1-2방울의 환자 혈액을 첨가하였을 때 HIV가 감염된 AIDS환자일 경우 환자자신의 적혈구와 특이하게 응집을 일으키는 방법을 고안하였다. 이 방법은 반응이 매우 빠르며 육안 판독이 가능하고 간편하여 기존의 효소면역법이나 Western blot, RIA의 방법보다 진보된 진단시약임을 알수 있다.

IV. 연구결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서는 E. coli에서 HIV-1 유전인자를 발현시킨 다음, 발현된 단백질을 정제하여 사람적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론항체를 만들어 정제한 후 chemical linker를 이용하여 결합시키는 실험으로 이렇게 만든 진단시약은 AIDS의 확산을 막아 국민보건문제로 대두되고 있는 AIDS를 조기 배양하는데 기여하게 될 것이다.

Summary

Development of AIDS diagnostic Kits.

AIDS, which is caused by HIV, become big social problems in all over the world. Ever since the cause of the AIDS has been identified by Robert C. Gallo and Luc Montagnier, lots of efforts were put onto the development of vaccines in these fields. So, it is our urgent problem to develop the diagnostic kits in order to prevent the diffusion of AIDS in this society which has become one of the big social health problems in these days.

The diagnostic tests already developed to detect HIV antibodies in infected patients include enzyme-linked immunoassay, Western blotting method, radioimmune precipitation assays. Such procedures are relatively slow and time consuming that it usually takes 3-5 hours. In many urgent cases, we need to diagnose within few minutes, to check whether the patient have been infected with HIV or not. For these reasons, we developed a simple qualitative procedure using small volumes of whole blood that would take 2 min or less.

We generated nonagglutinating monoclonal antibody to human red blood cells in order to make simple and rapid AIDS diagnostic kits using one or two drops of human whole blood. After complete purification of immunodominant region of HIV-gp120, 41, gag, we will use above mentioned nonagglutinating monoclonal antibody in order to cross-link with purified

HIV-epitopes. These diagnostic reagent will be used for quick and mass screening of bloods in order to check wethere the blood is HIV positive or not.

Contents

I. Introduction	13
II. Materials & Methods	15
1. Materials	15
2. Experimental Methods	18
III. Results & Discussion	21
1. Cloning, expression & purification of HIV-1 env gene(gp41)	21
(1) Expression of env protein gp41	21
(2) Purification & immunoblotting of env protein gp41	23
2. Cloning, expression & purification of HIV-1 core protein Gag3(p15-24-17)	26
(1) Expression of core protein Gag3	26
(2) Purification & immunoblotting of Gag protein	27
3. Detection of HIV-1 antibodies using ELISA	29
4. Crosslinking of HIV-1 gp41', gag3 proteins and nonagglutinating monoclonal antibody against human red blood cells	31

IV. Conclusion and Recommendations	35
V. Reference	37
Figure and Table	39

목 차

제 1 장 서론 -----	13
제 2 장 실험재료 및 방법 -----	15
제1절 실험재료 및 기기 -----	15
제2절 실험방법 -----	18
제 3 장 결과 및 고찰 -----	21
제1절 HIV- I env 유전자(gp41)의 cloning, 발현, 정제 및 immunoblotting -----	21
1. env protein gp41 단백질의 발현 -----	21
2. β -gal/gp41의 융합 발현단백질의 정제 및 immunoblotting -----	23
제2절 HIV- I core protein Gag3 (p15-24-17)의 cloning, 발현 정제 및 immunoblotting -----	26
1. core protein Gag3 단백질의 발현 -----	26
2. Gag3 융합단백질의 정제 -----	27
제3절 ELISA Method를 이용한 HIV- I antibodies 확인및 진단시약 개발 -----	29
제4절 HIV- I gp41', gag3 단백질과 적혈구비응집 단일클론항체의 cross-linking과 hemagglutination에 관한 연구 -----	31

1. 분리된 gp41' 과 단일클론항체와의 cross-linking -----	31
제 4 장 결론 및 건의사항 -----	35
제 5 장 참고문헌 -----	37
그림 및 도표 -----	39

제1장 서론

현대 사회문제로 야기되고 있는 AIDS의 원인이 되는 HIV의 발견은 극히 최근의 일이며 1984년 미국의 Robert C Gallo에 의해서 AIDS를 일으키는 원인체임이 밝혀졌다. 이러한 AIDS환자를 진단하는 데는 무엇보다도 먼저 바이러스의 확산을 막고 환자의 혈액에 오염되지 않도록 해야하며 이들 환자를 치료하는 의료진들을 보호할 수 있도록 간단하고 빠르게 그리고 특이하게 항체의 존재유무를 확인할 수 있어야 한다.

지금까지 알려진 항체의 존재유무를 확인하는 방법은 주로 효소면역법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)¹⁾, Radio Immuno Assay²⁾, Western blot³⁾ 등이 있으나 시간이 오래걸리고 환자의 혈액으로 부터 혈청을 분리 사용하여야 하는 단점이 있다. 이외에도 gelatin이나 latex입자^{4,5)}를 이용하여 항체의 존재유무를 확인하는 방법도 이용되고 있으나 이 방법역시 쉽고 빠르기는 하나 혈청을 분리 사용해야하는 단점이 있다.

본 과제에서는 이미 오래전부터 널리 사용되어온 적혈구응집반응(Haemagglutination)^{6,7)}, 즉 적혈구 표면에 여러가지 항원이나 항체를 부착시켜 항체나 항원의 존재 유무를 확인하는 방법을 수정하여 간단하고 빠르게 환자자신의 혈액을 직접 이용하여 항체를 확인하는 방법을 고안하였다. 즉 사람 적혈구 비응집 표면항원에 대한 단일클론항체를 만들어 여기에 합성 peptide항원이나 이미 본 연구실에서 cloning한 표면항원(env) 유전인자와 core protein(gag)등을 화학적으로 결합시켜(cross-link) 합성체(conjugate)를 만든후 소량의 혈액을 첨가하였을 때 이미 항원에 대한 항체가 형성된 환자라면 환자자신의 적혈구와 특이하게 응집을 일으키는 원리이다. 이 반응은 매우 빠르게 일어나며(약 10분이내)

쉽게 육안으로 판독할 수 있어서 종래에 사용되어 온 어느 방법보다도 진단과정에서 생길 수 있는 여러가지 위험을 줄일 수 있는 큰 이점이 되고 있다고 할 수 있으며, 앞으로 국민보건에 많은 기여를 하게 될 것이다.

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절 실험재료 및 기기

1. 균주

사용균주는 *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* HB101을 균체내의 형질전환과 발현에 사용하였다.

2. 배지 및 완충용액

a) 배지

LB배지는 1 liter당 10 g의 bacto-trypton, 5 g yeast extract와 5 g의 NaCl을 포함하여, plate를 만들때는 1.5 % (w/v)의 bacto-agar를 사용하였고, ampicilin은 100 μ g/ml의 농도로 사용하였다. M₉배지는 1 liter당 6 g의 Na₂HPO₄, 0.5 g의 NaCl, 그리고 1 g의 NH₄Cl, 5g의 Casamino acid를 넣어 멸균하고, 따로 멸균한 1 M MgSO₄ 2 ml와 20 % glucose 10 ml에 1 M CaCl₂ 0.1 ml을 넣어 사용하였다.

b) 완충용액

Agarose gel의 loading buffer는 0.25 % bromophenol blue, 0.25 % Xylene cyanol FF, 15 % Ficoll 1 type 400의 조성으로, running buffer는 0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA의 조성으로 사용하였다.

SDS-PAGE의 loading buffer는 2 % SDS, 5 % β -mercaptoethanol, 10 %

glycerol, 0.002 % bromophenol blue, 0.1 M Tris-HCl(PH 6.8)의 조성으로, running buffer는 25 mM Tris, 250 mM glycine, 0.1 % SDS의 조성으로 만들어 사용하였다.

제한효소와 유전자 조작효소의 반응 완충용액은 사용하는 효소와 함께 효소 제조회사에서 공급하는 용액을 사용하거나 효소의 특성에 맞도록, 조제하여 사용하였다. 기타의 용액은 Maniatis의 "Molecular Cloning, A Laboratory Manual"에 기술된 방법으로 제조 사용하였다.

3. 효소 및 생화학물질

제한효소와 T4 DNA ligase, T4 DNA Kinase, Klenow fragment, Bacterial alkaline phosphatase 등의 각종효소는 제철화학, BRL, Boehringer Mannheim 그리고 Promega 등의 회사제품을 구입하여 사용하였다. Acrylamide, N'N'-methylene-bis-acrylamide, Lysozyme, SDS Tris base는 Sigma chemical Co의 제품을 Agarose, TEMED, Ammonium persulfate, DNA와 단백질의 MW standard marker는 BRL 제품을 사용하였으며, 기타 생화학물질들을 Aldrich, Merck, Junse Chemical Co, Ltd(Tokyo Japan)등에서 특급시약을 구입하여 사용하였다.

4. 기기

DNA 절편들의 크기확인과 회수를 위하여 Agarose gel 전기영동은 Mupid-2(losmo Bio Col., Ltd)를 사용하였으며 단백질발현을 확인하기 위하여 SE600 Vertical Slab Gel Unit와 SE 250 Mighty Small II Dual 7 cm Slab Unit(Moeffer Scientific Instruments, CA, U.S.A.)를 사용하여 polyacrylamide 전기영동을 실시하였다.

그 이외에도 highspeed centrifuger, Du-7 spectrophotometer(Beckman Instruments, Inc., U.S.A.), RH 20-12 speed Vac Concentrator(Savant Instrument, Ins., U.S.A.)등이 있다.

제 2 절 실험방법

1. HIV 유전자로 부터 표면유전자 DNA의 분리

PSP64 플라스미드의 Sst I 위치에 HIV 유전자가 들어있는 플라스미드 BH10을 Kpn I 효소로 37 °C 에서 2시간 작용시켜 절단한 후 1 % agarose gel에서 전기영동하여 표면유전자 DNA를 포함하고 있는 Kpn I 절편을 분리하였다.

2. Plasmid의 분리

Plasmid의 분리는 Manistis의 “Molecular cloning, A Laboratory Manual”에 기술된 방법에 준하거나, 다소 변경시켜 실시하였다.

3. DNA 절편의 회수

제한효소로 절단한 plasmid절편과 새로이 조립한 유전자의 정제, 회수는 저용점 agarose gel이나 Nusieve agarose gel을 이용하였다.

4. E. coli의 형질전환

준비된 plasmid에 의한 E. coli의 형질전환은 Maniatis의 “Molecular cloning, A Laboratory Manual”에 기술된 방법에 준하거나 약간 변형시켜 실시하였다.

5. 융합단백질의 발현

Tac promoter 조절하의 HIV- I env 유전자(gp41)을 가진 clone의 단백질 발현을 유도하기 위하여 고형배지의 colony에서 새로이 seed culture(37 °C

overnight, 5 ml) 하여 seed를 확보한 후, 100 ml의 발현배지에 접종하여 37 °C에서 배양하였다. 일정한 시간(약 1.5-2시간)이 지난후 600 nm에서의 O.D값이 0.3 일 때 IPTG(Isopropyl- β -thiogalactoside)를 최종 0.6 mM 농도로 가한 뒤 다시 overnight 배양하였다. 이렇게 하여 얻어진 배양세포로부터 β -gal-gp41 융합단백질의 발현 확인을 위한 SDS-PAGE는 일반적인 Laemmli, U.K.(1970)의 방법에 준하였다. 또한 trp promoter 조절하의 HIV- I core 유전자(p17'-p24-p15')을 가진 clone의 단백질 발현유도를 위하여 E. coli HB101을 seed culture 후 600 nm에서의 O.D값이 0.5-0.8 일 때 최종 10 mM 농도의 IAA를 가한뒤 overnight 배양하였다.

6. 세포의 파쇄

2 L culture cell을 harvest하여 50 mM Tris-HCl 1 mM EDTA buffer(PH 7.5) 30 ml에 suspension하여 French pressure(10,000 PSL) 혹은 Sonicator를 사용하여 파쇄하였으며 이를 6000 rpm에서 원심분리하여 침전물만을 얻어내었다.

7. 융합단백질의 분리 및 정제

Cell 파쇄액을 원심분리하여 얻은 침전물을 4-5 M Urea buffer(50 mM Tris 10 mM DTT 1 mM EDTA PH 7.8)로 2번 씻어주므로 비교적 순수한 융합단백질을 얻을 수 있으며 이것을 8 M Urea buffer에 녹여 하이드록실아민과 45 °C에서 4시간 반응시켜 β -gal 과 gp41사이와 trpE와 gag3 사이에 있는 Asp-Gly 잔기사이를 절단한 뒤 DEAE-sepharose-CL-6B와 CM-sepharose-CL-6B를 각각 이용하여 순수한 gp41와 gag3을 분리하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 HIV-I gp41의 Cloning, 정제 및 immunoblotting

1. env.gp41 단백질의 발현

a) pre- β -galactosidase-gp41 융합단백질 발현벡터의 제조 및 발현

gp41의 N-말단에 위치한 Hae III-Hind III 절편이 아주 강한 immunogenicity를 띠는 강력한 epitope임이 알려져 있으므로, 이 region을 trpE promoter 하의 trpE 단백질의 카르복실 말단에 융합 단백질 상태로 발현시킬 시도를 했으나 발현이 안정하지 않고 정제과정에서 또한 어려움이 있으므로 아주 강력한 promoter 중의 하나인 tac promoter를 이용한 β -galactosidase의 카르복실 말단에 융합 단백질 형태로 over-expression 시키려는 시도를 했다.

Fig.1에서 보여준 것 처럼 gp41의 N-말단에 해당하는 strong epitope를 포함하는 region을 Msp I, Cla I 으로 절단하여 pYJM-env2로 부터 잘라냈고, 이를 PCT10의 β -galactocidase 유전자내에 위치한 Cla I site에서 절단하여 준비한 벡터와 ligation 시켜서 올바른 방향성을 갖는 pre-pYCM-env2를 제조하였다.

이와같이하여 얻은 pre-pYCM-env2는 아미노말단에 278개 아미노산으로 이루어진 β -galactosidase 유전자 카르복실말단에 102개의 아미노산으로 이루어진 gp41 유전자가 정제의 편리를 위해 삽입한 Hydroxylamine 절단 위치가 포함된 Linker에 의해 연결되어 있다. 하지만 이 vector 의 경우 전사종결코든이 gp41뒤의 42 아미노산뒤에 위치하므로 102개의 gp41 단백질 이외의 쓸모없는 42개 아미노산을 포함하게 된다.

b) β -galactosidase-gp41 융합단백질 발현벡터의 제조 및 발현

위에서의 쓸모없는 42개 아미노산을 없앴뒤 gp41 뒤에 곧바로 전사중결 코돈을 갖는 plasmid를 제조하기 위하여 pre-pYCM-env2를 Cla I 을 이용하여 절단한 후 Klenow filling 을 하여 빈 자리를 매꾼후 다시 ligation하여 pYCM-env2를 제조하였다(Fig.1). pYCM-env2는 아미노말단의 278개 aa로 이루어진 β -gal, 곧이어 정제의 편리를 위해 넣은 Hydroxylamine Linker, 그 아래에 순수한 gp41의 103개 aa로 이루어진 융합단백질을 만드는 완성된 발현 벡터가 된다.

이 발현벡터를 IPTG(isopropyl-thiogalactosidase)를 이용하여 발현시킨 결과 β -galactosidase-gp41 융합 단백질이 coomassie-blue로 염색한 SDS-PAGE gel 에서 *E.coli* 전체 단백질의 40%에 해당하여 Inclusion body 형태로 over-expression됨을 알았다.(Fig.3) 단백질의 분자량은 44KD 정도로 예상되나, 실제 크기가 그 이상(약 50KD)에서 위치하는 것을 설명하기 위해 western blotting을 한결과 AIDS환자의 혈청내의 항체와 강력히 결합하는 것으로 보아 over-expression 융합단백질은 gp41을 포함하며 (-)charge가 많아서 SDS-PAGE상에서 좀 늦게 이동함을 짐작할 수 있다.

c) protein A-gp41 융합단백질 발현 벡터의 제조 및 발현

융합단백질 발현 벡터인 PRIT2T는 proteinA의 카르복실 말단 융합 단백질 형태로 원하는 유전자를 발현시켜, 발현후 protein A와 친화성이 있는 IgG column을 통과 시킴으로써 쉽게 발현된 융합 단백질을 정제 시킬 수 있다는 점을 이용하여, gp41의 N-term을 포함하는 region을 proteinA의 C-term으로 옮기는 subcloning을 하였다.

Fig.2에서 처럼 pYJMenv2의 gp41 의 N-term을 포함하는 EcoR I , Ase I 절편

을 EcoR I, EcoR V 로 잘라 준비한 벡터에 ligation시켜서 pYCA-gp41을 제조 하였다. 이때 EcoR I, Ase I 절편내에는 전사종결코돈또한 포함되어 있으므로 앞의 경우처럼 더이상의 조작은 필요없었다. pYCA-gp41은 promoter λP_R 의 조절을 받아 protein A의 카르복실 말단에 gp41이 105개 aa가 융합된 상태로 발현되게 된다. 이를 heat induction (37°C→42°C)에 의해 발현을 유발시킨 결과, 단순히 Heat에 의해 유발되는 단백질이외의, 열고자하는 융합단백질과 분자량이 비슷한 단백질이 발현되는 것을 보았으나 Western blotting이 안됨을 알았다(data not shown). 이 발현 벡터는 더 많은 확인 작업이 필요하다.

2. β -gal/gp41의 융합 발현 단백질의 정제 및 immunoblotting

대장균 내에서 HIV-1의 구성유전자인 gp41을 직접 발현시킬 경우 세포내 단백질 가수분해 효소에 쉽게 노출되어 gp41의 생성효율이 매우 낮으므로 다른 종류의 단백질과 융합시켜 불용성의 융합단백질 상태로 발현되면 생성효율이 높아져 많은 수확을 할 수 있다.

그러므로 본 실험에서는 β -galactosidase, trp E 등과 HIV-1의 구성유전자들 사이에 hydroxylamine cleavage site가 들어 있는 융합단백질을 발현하는 플라스미드 PCT10, PATH II를 사용하여 융합 단백질을 *E. coli*에서 다량 발현시킨 후 hydroxylamine을 처리하여 순수한 gp41과 gag3(p17-24-15)을 분리해낼 수 있었다.

a) 융합단백질의 발현유도

발현백터인 PCT10을 갖고 있는 E.coli JM109 배양액에 IPTG(1 mM) 를 첨가하여 β -galactosidase/gp41 융합단백질 생성을 유도한 후 SDS-PAGE로 확인한 결과 유도하기 전에 비해 유도후 시간이 지남에 따라 50,000 dalton의 위치에 융합단백질이 유도된 세포를 전자현미경으로 관찰해본 결과 생성된 β -galactosidase/gp41 융합단백질은 대장균 세포내에서 inclusion body의 형태로 축적됨을 확인하였다.(Fig.2)

b) 융합단백질의 분리

융합단백질은 단백질내에 존재하는 다수의 cystein 잔기들이 서로 무작위적으로 결합하여 disulfide 결합을 유지하고 있기때문에 4~5M urea buffer에도 용해되지 않으나 대부분의 cell extract protein들은 용해된다. 이러한 성질을 이용하여 4~5M urea buffer로 2번 정도 씻어주므로 비교적 순수한 융합단백질 만을 얻을 수 있었다(Fig.4).

c) Hydroxylamine에 의한 융합단백질의 절단

분리된 융합단백질을 8M urea(50mM Tris 10mM DTT 1mM EDTA pH7.8) buffer에 녹여 하이드록실 아민과 45°C에서 4시간 반응시켜 β -galactosidase와 gp41 사이에 있는 Asp-Gly 잔기 사이를 절단한 뒤 이 반응액을 SDS-PAGE 한 결과 9,000 dalton의 gp41 band를 확인할 수 있었으며(Fig.4) 그 절단 효율 또한 60% 이상으로 매우 높았다.

d) gp41의 분리 및 정제

Hydroxylamine 반응액의 pH를 2~3으로 낮춘후 증류수에 하룻밤동안 투석하면 gp41 및 β -galactosidase의 단편들이 침전된다.

이것을 원심분리하여 침전물 만을 취하여 8M Urea buffer(50mM Tris 10mM DTT 1mM EDTA pH 7.8)에 녹인후 0.4ml/min의 flow rate로 DEAE-sepharose-CL-6B(11x2.8)이온 교환수지 칼럼을 실시한 결과 (Fig 5)와 같이 비흡착 부분의 두개의 피이크와 나머지 흡착부위의 피이크를 얻었으며 gp41은 비흡착 부위의 앞 피이크에서 추출되었다. 또한 280nm에서 각 분획들의 흡광도를 조사하며 단백질 피이크 부분의 각 분획들을 15% SDS-PAGE로 확인한 결과 순수한 gp41이 정제 되었음을 확인하였다(Fig.5).

e) 발현 정제된 gp41의 immunoblotting

이 융합 단백질의 특이성은 western blot analysis에 의해 HIV-1 sero-positive plasma에 대한 강한 Immunoreactivity로 확인 되었다(Fig.6).

제 2 절 HIV-1의 Core protein Gag3(p15-24-17)의 cloning 발현,

정제 및 immunoblotting

1. core protein Gag3 단백질의 발현

a) pYHC-gag3 발현벡터의 제조 및 발현

Fig.7에서 보는것처럼 발현벡터 pYEM-Gag/Env2에서 Ban II-Cla I DNA fragment를 잘라 제거시킴으로서 pYHC-Gag3 발현벡터를 제조하였다. 이 plasmid는 trp promoter의 조절을 받아 p17의 카르복실 말단의 12aa와 p24(major core protein)와 아미노말단의 p15가 합쳐진 약 70kd의 trpE-Gag3의 융합단백질이 만들어지게 된다. 이 발현벡터 pYHC-Gag3를 *E. coli* HB 101에서 10 mM IAA로 발현 유도시킨 결과 다량합성 되었으며 10% SDS PAGE로 확인한 결과 Fig.9와 같이 68kd 정도에서 total cell protein의 약 40%이상의 융합단백질이 합성되었다.

b) pYHC-Gag4 발현벡터의 제조 및 발현

앞에서 기술한 Gag3(p17'-p24-p15') 단백질을 trpE와 융합시키지 않고 직접 생산하기 위한 시도로 Fig.8에서 보는 바와 같이 Gag3를 coding하는 0.8kb의 BamH1(Pvu II ∇)-Ban II DNA fragment를 발현벡터 pYEM-Gag/Env2에서 잘라낸후 restriction enzyme BamH I 으로 LacZ"를 제거시킨 vector PCT10(LacZ")에 frame을 맞추어 삽입시켜 발현벡터 pYHC-Gag4를 제조하였다. 이 발현벡터 pYHC-Gag4는 tac promoter의 조절을 받아 Gag3 단백질을 직접 생성하게 된다.

이 발현벡터 pYHC-Gag4를 *E. coli* JM109를 이용하여 발현유도한 결과 약 31kd의 Gag3(p17'-p24-p15') 단백질을 확인할 수 있었고(Fig.10B, Lane 6),

Western blotting 분석결과 이 단백질의 특이성이 HIV-1 seropositive plasma에 대한 강한 Immuno-reactivity에 의해 증명되었다.(Fig.10A, Lane 6)

2. Gag 3 융합단백질의 정제

a) gag 3 융합단백질의 발현유도

발현 벡터인 PATHII를 갖고 있는 *E. coli* HB101 배양액의 세포농도가 $A_{600}=0.8-0.9$ 이 되었을때 IAA(3-Indole acetic acid)를 최종농도 10mM이 되도록 첨가하여 *trpE* 융합단백질의 발현을 유도하고 계속해서 37°C에서 overnight culture하여 6000xg에서 10분간 원심분리하여 cell을 모았으며 발현의 정도를 10% SDS-PAGE로 확인한 결과 유도하기전에 비해 유도후 6.8kd의 위치에 융합단백질의 진한 band가 보임으로 다량의 융합단백질이 유도합성 되었음을 확인하였다.(Fig.9)

b) 융합단백질의 분리

융합단백질체(inclusion body)의 분리를 위해 1 l M9 배양액으로 부터 모은 *E. coli*를 TE buffer(50 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7.8)에 녹인후 초음파 파쇄기로 30분간 파쇄한다. 이것을 5000xg에서 10분간 원심분리하여 모아진 침전물을 융합단백질의 불용성을 이용하여 1~2M urea buffer로 두번 정도 씻어준후 8M Urea buffer에 녹여 이것을 12000xg에서 30분간 원심분리하여 상등액 (crude inclusion body)만을 취하여 이들의 정제 정도를 10% SDS-PAGE로 확인한 결과 68,000 dalton에서 거의 pure한 융합단백질제를 얻었다. 또한 여기에서 envelope

protein 융합체인 β -gal/gp41보다 core protein 융합체인 trpE/gag3가 더 soluble 함도 알 수 있었다.

c) Hydroxylamine에 의한 융합단백질의 절단

분리된 융합단백질을 8 M urea buffer에 녹여 2 M 하이드록실 아민 과 45 °C에서 4시간 반응시켜 trpE와 gag3 사이에 있는 Asp-Gly 잔기 사이를 절단한 뒤 증류수로 하룻밤동안 투석한 후 생긴 침전물을 12000xg에서 30분간 원심분리 하여 모은후 이 침전물을 SDS-PAGE한 결과 31.000 dalton의 gag3 band를 확인할 수 있었으며 절단 효율 또한 60~70% 이상으로 높은 효율을 보였다.(Fig.9)

d) gag 3의 분리 및 정제

8 M urea buffer(50 mM Tris-HCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7.8)로 미리 equilibrated 시킨 DEAE-Sepharose-CL-6B column(12x2.8)에 상기의 과정에서 모은 침전물을 동일 buffer에 녹여 column에 loading하여 통과시킨 후 흡착부분을 50 mM NaCl이 포함된 동일 buffer의 elution부위에서 gag3만이 추출되었다. 280 nm에서 각 분획들의 흡광도를 조사하여 단백질 피이크 부분의 각 분획들을 10% SDS-PAGE 로 확인한 결과 순수한 gag3가 정제되었다(Fig.11).

제 3 절 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)를 이용한 HIV-1 항체 확인 및 진단 시약 개발

정제된 gp41 과 gag3의 HIV-1 항원으로서의 특이도 와 민감도를 조사하기 위하여 여러 HIV-1 양성 혈장과 음성 혈장을 대상으로 Table 1에서의 방법으로 실험을 수행하였다. 그 결과 Fig.12에서 보는 바와 같이 음성을 음성으로 잡아 낼 수 있는 특이도 (Specificity) 는 gp41과 gp41+gag3는 모두 100%이었고, gag3는 99%였다. 30개의 양성 혈장으로 실시한 민감도(sensitivity)실험은 gp41, gag3 각각을 또는 gp41과 gag3를 합친 경우 모두 100%이었다. 이 결과를 기존의 재조합 HIV-1항원과 비교하여보면 Table 2와 같다. 또한 본연구에서 제시된 방법으로 정제된 HIV-1항원은 특히 항체형성기간 이 오래지 않아 항체의 양이 많지않은 초기 피검자의 경우에도 양성으로 판정할 수 있는 민감도를 지녔음이 밝혀졌다. 한 환자를 대상으로 시간적 간격을 두고 채취한 혈청을 가지고 Western blotting을 한 결과 Table 4와 같은 상태의 혈청이며 이 혈청을 가지고 기존의 효소면역측정법을 이용한 진단키트와 본 연구의 결과 정제된 gp41 과 gag3 그리고 gp41+gag3 와 비교하여 본 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 타사제품의 경우보다 본 연구결과의 항원을 이용하였을 때 항체의 양이 많지않은 초기의 환자까지 detection할 수 있었다. 또한 gp41, gag3, gp41+gag3 3가지 항원을 이용하여 항체 함유량이 다른 양성혈청을 분석하여 Fig. 13의 결과를 얻었다. 여기에서 strong positive serum은 세가지 항원이 모두 높게 잡았으며, positive control serum은 core protein에 대한 항체가 많아 gag3가 가장 높게 잡았다. Glycoxylated positive control serum 은 gp41에 대한 항체가 많은 sample이므로 gag3만으로 측정할 수 없는것을 gp41을 섞으므로 높게 검출할 수가 있었다.

Western blot 검사 결과 p17, p25, p51 or p55 band가 나타나지만 국립보건원에서 음성판정이 난 20개의 dubious sample 중에서 O.D.가 높은 D6, D12, D19를 여러가지 항원을 이용해 검사한 결과 fig. 14과 같다. 녹십자에서 생산되는 하이비로의 검사결과 false positive 판정이 난 D6, D12, D19가 본 연구소에서 개발한 항원으로 측정된 결과 모두 음성 판정이 났음을 알 수 있다. 그러므로 lysate를 사용하는 진단 kit에서의 false positive 판정 가능성을 본 연구소에서 개발한 재조합 HIV-1 항원을 이용하여 크게 줄일 수 있다.

이상 지금까지 얻어진 실험결과에 의하면 유전자 재조합 기술에 의해 발현 제조 그리고 정제된 HIV-1 viral antigens Gp41', Gag3를 이용한 ELISA diagnostic assay는 헌혈자들 (Blood Donors)의 혈액중에 HIV-1 virus에 대한 antibodies가 있는지 없는지를 확인하는 Initial mass Screening test로서, 지금 널리 사용되고 있는 항원으로 조직배양된 virus를 사용하고 있는 Commercial ELISA Diagnostic kits보다 안전하며 또한 항체에 대한 그 민감도와 특이성이 보다 높은 것으로 보여지고 있어 HIV-1 감염확산을 방지하며 또한 병의 단계를 결정하는데 있어 큰 역할을 할 것으로 기대된다.

제 4절 HIV-1 gp41', gag3 단백질과 적혈구 비응집 단일클론항체의
cross-linking 및 hemagglutination에 관한 연구

1. 분리된 gp41' 과 단일클론항체와의 cross-linking

a) MBS를 이용한 cross-linking

순수하게 분리된 단일클론항체를 PBS(10 mM Sodium phosphate, 150 mM NaCl, 1.0 mM EDTA, pH 7.0)에 녹이고, 1 mg의 항체에 4 μ l DMSO에 용해된 MBS(1 mg/ml)를 첨가해서 상온에서 30분간 진탕배양한다. 그 후 이 용액을 pH 6.0의 PBS로 투석시킨다. 분리된 gp41'을 0.05 % SDS, 10 mM sodium phosphate 150 mM NaCl, pH 7.5에 용해시키고, 0.6 mg의 단백질에 10 μ l의 SPDP(10 mg/ml methanol)을 더하여 상온에서 30분간 흔들어주면서 반응시킨다. 반응이 완료된 후 0.05 % SDS가 포함된 PBS pH 6.0에서 투석을 시킨다. 투석이 끝난후 MBS로 처리된 항체와 cross-linking이 일어나도록 50 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시킨다. 항체와 gp41'와의 결합정도는 SDS-PAGE에서 판정한다. Fig. 10에서 보는 바와 같이 gp41'이 항체의 light chain과 heavy chain에 결합되어 있다. 이 결과는 denature 상태인데 MBS를 이용한 cross-linking은 disulfide가 아닌 다른 공유결합이 되므로 DTT가 포함된 상태에서도 안정하다. 화살표가 지시하는 단백질 band는 분자량이 68kd 정도되고 HIV positive 혈청과 아주 잘 결합하는 것으로(Fig. 16.B) 이것은 immunoglobulin의 heavy chain과 gp41'이 하나 또는 두 분자가 결합된 것이다. 이 결과는 적혈구에 대한 단일클론항체와 분리된 gp41'의 결합 즉

cross-linking이 잘 일어나며 이것을 대량으로 생산했을때에 진단시약으로 사용할 수 있는 가능성을 보여주고 있다.

b) Glutaraldehyde를 이용한 crosslinking 및 합성체를 이용한 hemagglutination

순수하게 분리된 단일 클론항체 1mg을 PBS(10mM Sodium phosphate, 150mM NaCl, 1.0mM EDTA, pH 7.0)에 녹이고, 1mg의 정제된 항체 gp41을 final 0.05% SDS/PBS 1ml에 녹인 후 final 1% 농도의 glutaraldehyde를 한방울씩 적하하며 상온에서 2시간 진탕반응시킨다. 그후 이 용액을 pH 7.3의 PBS로 하루동안 투석시킴으로 free SDS 를 제거한다. 이렇게 coupling된 reagent를 SDS-PAGE상에서 그 상태를 확인한다. Coupling reagent의 titer를 결정하기 위해 정상인 사람의 혈청과 환자 혈청의 농도를 고정시키고 reagent를 희석하며 hemagglutination test를 실시하였다. 고정된 reagent titer에 sample test를 아래와 같은 방법으로 실시하였다. 사람의 blood를 96well plates의 한 well에 3 μ l를 적하하고 coupling reagent를 적정농도로 희석시켜 50 μ l씩 첨가하였다. 실험의 결과는 Fig.17과 같다. 음성혈청 32개와 양성혈청 20개를 test한 결과 혈청 희석농도가 1:80일때를 cut off로 결정하였고, 이것에 기준하여 양성혈청 20개중 16개를 detection 할 수 있었다. 이 실험의 결과로 판단하건대 여기서 사용한 conjugate는 비특이 crosslinker에 의한 반응이므로 우리가 기대하는 단일클론항체와 gp41의 conugate뿐만 아니라 gp41과 gp41, 단일클론항체와 단일클론항체의 conjugates형태가 섞여 있으므로 이러한 결과를 얻었으나 conjugate를 purification하면 좀더 높은 specificity와 sensitivity를 기대할 수 있을 것이

며, heterobifunctional crosslinker와 같은 특이적인 crosslinker를 사용하여 합성체를 만듦으로 위와같은 비특이적 반응의 purification없이 진단시약으로 사용할 수 있는 방법도 연구중에 있으며, 앞으로 좀더 많은 blood를 test해봄으로 진단시약의 민감도와 특이성을 높이고자 한다. 상기의 실험결과를 통해 본 연구의 결과 유전공학적 기법으로 만들어진 recombinent antigen은 기존의 조직배양된 virus를 사용하는 commercial ELISA Diagnostic kits보다 안전하고, 민감도와 특이성이 높아 이들의 개량, 대체할 수 있는 2세대 진단항원으로서의 가능성을 보였으며, 적혈구 비용집 단일클론 항체와의 conjugate를 만들어 간편하면서도 정밀도가 높고 종래의 혈액에서 혈장만 분리하는 과정이 필요없어 검사도중 생길 수 있는 감염사고를 없앨 수 있는 장점이 있다. 적은양의 혈액으로도(통상 한방울) HIV-1 감염여부를 알아낼 수 있는 이 시약은 많은 양의 혈액을 스크리닝 할 때, 또는 시간을 요하는 검사, 이를테면 비행장이나 항구등에서 간편하게 사용될 수 있다. 개발효과로서는 매년 국내에서 500만건의 혈액 테스트가 수행되는데 이에 대한 수요를 충당할 수 있으며 AIDS진단시약이 상당부분을 수입에 의존하는데 이것을 대체할 수 있으므로 수백억원의 외화절감 뿐만아니라 수출로 인한 외화획득 또한 기대할 수 있다.

이 시약은 첨단기술 및 지식을 이용한 시약이므로 타 시약개발에 지적 자극이되어 파급효과를 유도할 것이며 첨단유전공학과 면역학, 세포생물학의 발전에 응용효과가 기대된다.

제4장 결론 및 건의 사항

본 연구는 전세계적으로 보건의료의 문제를 야기시키는 현대의 흑사병인 후천성면역결핍증(AIDS)을 조기에 진단하고자 간편하고 빠른 진단시약으로 개발하는데 목표를 두었다.

연구의 주된 성과로는 먼저 AIDS를 일으키는 Human Immunodeficiency virus-1의 표면 항체중 면역성이 높은 env단백질중 gp41과 gag3(p17-24-15)을 유전공학적 방법으로 값싸게 대량으로 생산하여 순수분리하였고, 둘째로는 혈액을 혈청과 적혈구로 분리하여야 하는 종래의 번거로움을 덜수있는 한 방법으로 시약을 제조하기 위하여 사람의 적혈구에 반응하여 간접적으로 응집을 일으키는 생쥐의 단일클론항체를 제조하였다. 셋째로는 분리된 항원(gp41)을 이용해서 AIDS환자, HIV-1보균자의 혈액에 특이하게 존재하는 항체를 검출할 수 있도록 단일클론항체와 이 바이러스항원을 화학적으로 결합하였고 이를 사용하여 HIV-1 양성혈액을 특이적으로 판별하는데 성공하였다. 이와같은 결과를 토대로 빠르고 손쉬우며 정확한 진단시약을 산업화하는 단계에 이르렀으며 이런 유사한 바이러스진단시약 개발에 큰 이정표를 제시하였다고 할 수있겠다. 이런 연구로서 AIDS 확산을 저지하는데 또한 커다란 기여를 할 것이라 기대된다.

참 고 문 헌

1. Eva Engvall, Peter Perlmann (1971)
Immunochemistry 8,871
2. M.G. Stangadgaran et al (1984), Science 224, 506
3. D.S. Burke et al (1987), J. Clin. Microbiol, 25, 81
4. James M, Meeganm, Brigitte K. Evans, and Dorothy
M. Horstmann (1982), J. Clin. Microbiol. 16, 644
5. Sheila Freeman, Lucille Clark, and Nellie Dumas (1983),
J. Clin. Microbiol. 18, 197
6. Noel R. Ling and David Catty (1988)
Antibodies Bol. I, pp. 169-188
7. 하대유, 김형일, 임선영 : 대한면역학회지 9:1, 1987.
8. Kohler, G., and Milstein, C. (1975), Nature 256,495
9. C. Brudk, D. Portetella, C. Glineur and A. Bollen (1982),
J. Immunological Methods, 53, 313
10. Laemmli, U.K. (1970), Nature 227, 680
11. M. Popovic and Robert C. Gallo Science 224: 497 (1984)
12. Phyllis J. Kanki et al. Science 236: 827 (1987)
13. "The control of hyman retrovirus gene expression" edited by
B. Robert Franza Jr. Cold Spring Harbor, in press
14. The AIDS Virus Robert C. Gallo in Scientific American vol
256 No. 1, pages 38-48, Jan, 1988.

15. Willian A. Haseltine and Joseph G. Sodroski "in Retrovirus
Biology" edited by Robert C. Gallo Marcel Dekker, Inc., 1988
16. Molecular Cloning (1982)
T. Maniatis, T. Fritsh. E. F. and Sambrook J.

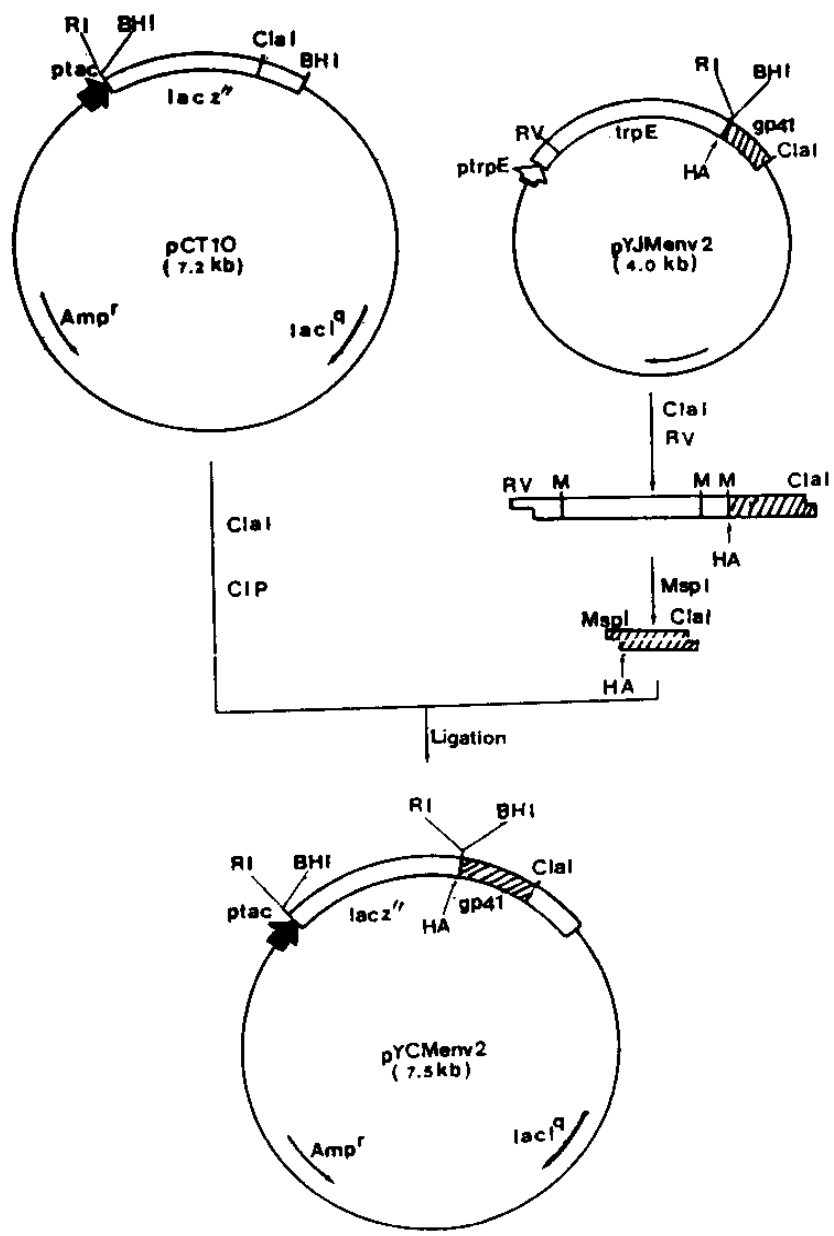


Fig. 1. Construction of pYCM-env2 expression-plasmid with a *tac* promoter

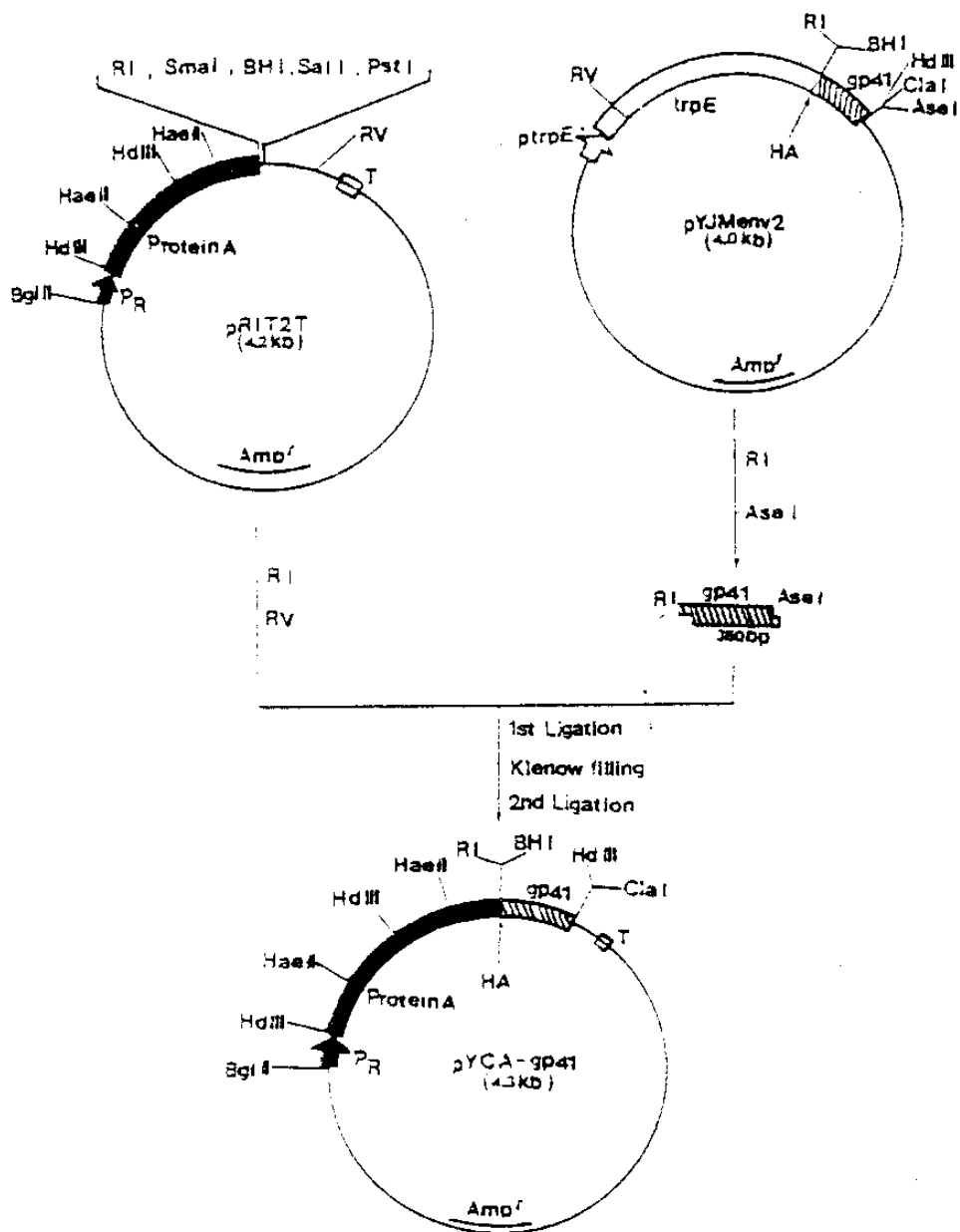


Fig. 2. Construction of pYCA-gp41 expression plasmid with a Pr promoter



AIDS 바이러스
항원

AIDS 바이러스 항원을 생산하는 대장균의
전자현미경 사진

Fig. 3. Expression of beta-gal/gp41 fusion protein in *E. coli* JM109 harboring pYCM-env2

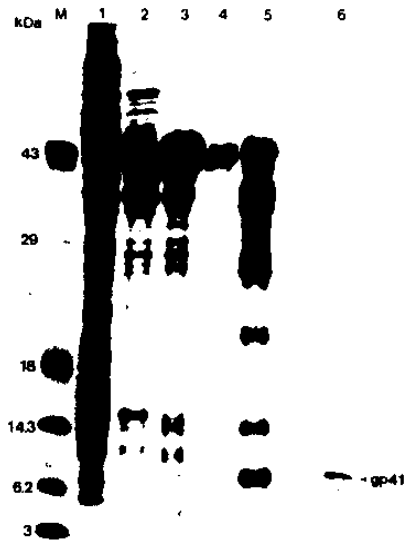


Fig. 4. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Env Gene Product(gp41)

M : Size marker

Lane 1 : pYCM-env2 ; Uninduced

Lane 2 : pYCM-env2 ; Induced

Lane 3 : Proteins in inclusion body

Lane 4 : Purified beta-gal/gp41 fusion protein

Lane 5 : Hydroxylamine cleavage of beta-gal/gp41 fusion protein

Lane 6 : Purified gp41 diluted from a DEAE-Sepharose column

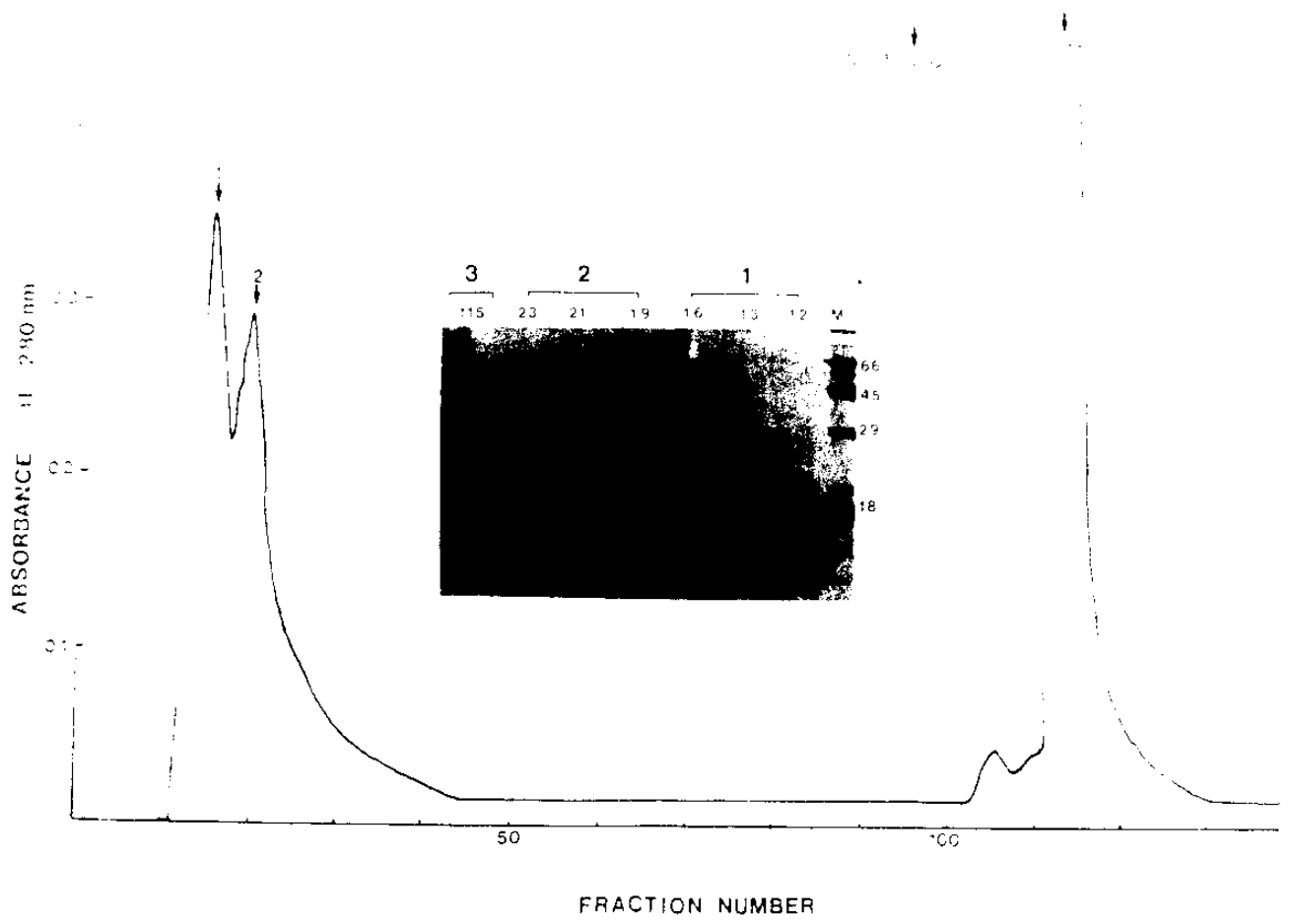


Fig. 5 Purification of gp41 by DEAE-Sepharose-CL-6B chromatography

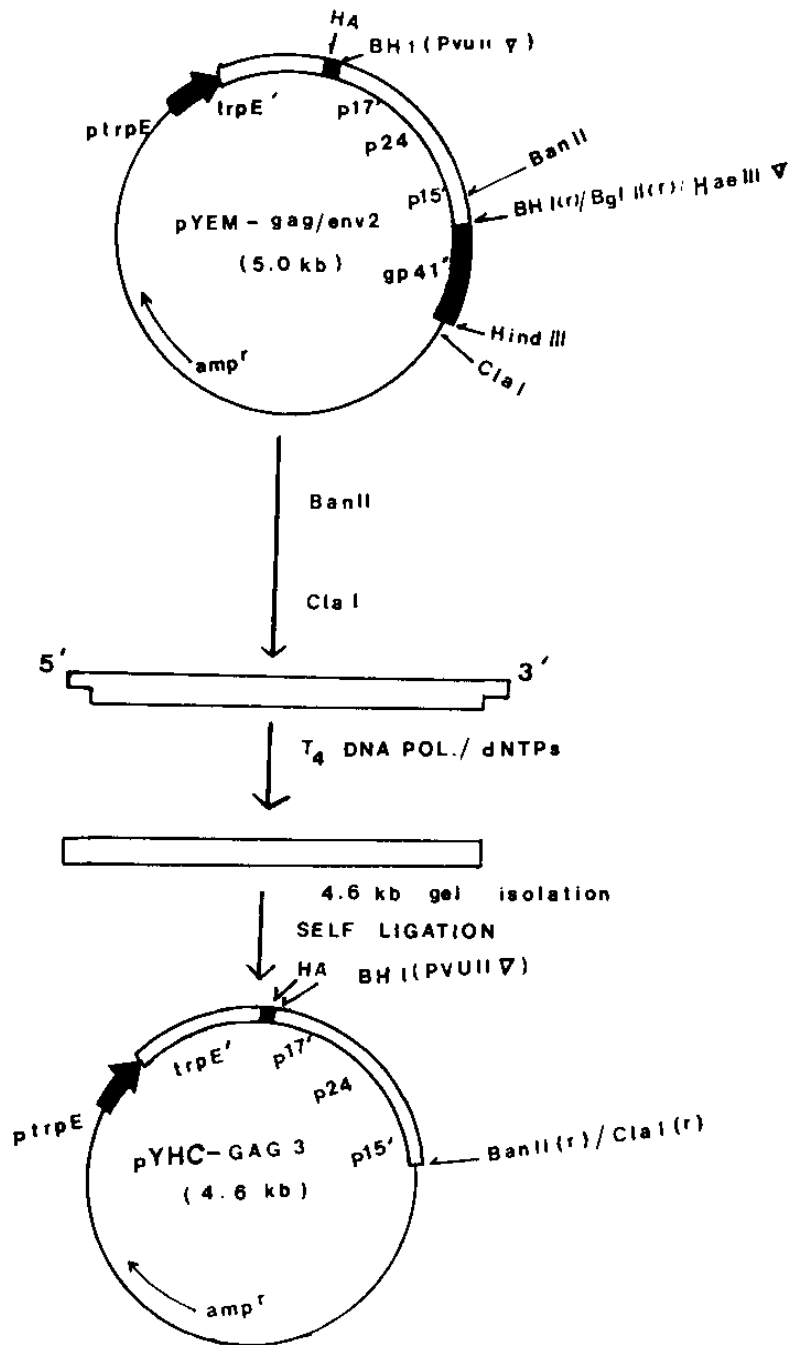


Fig. 7. Construction of pYHC-gag3 expression plasmid under a trp promoter

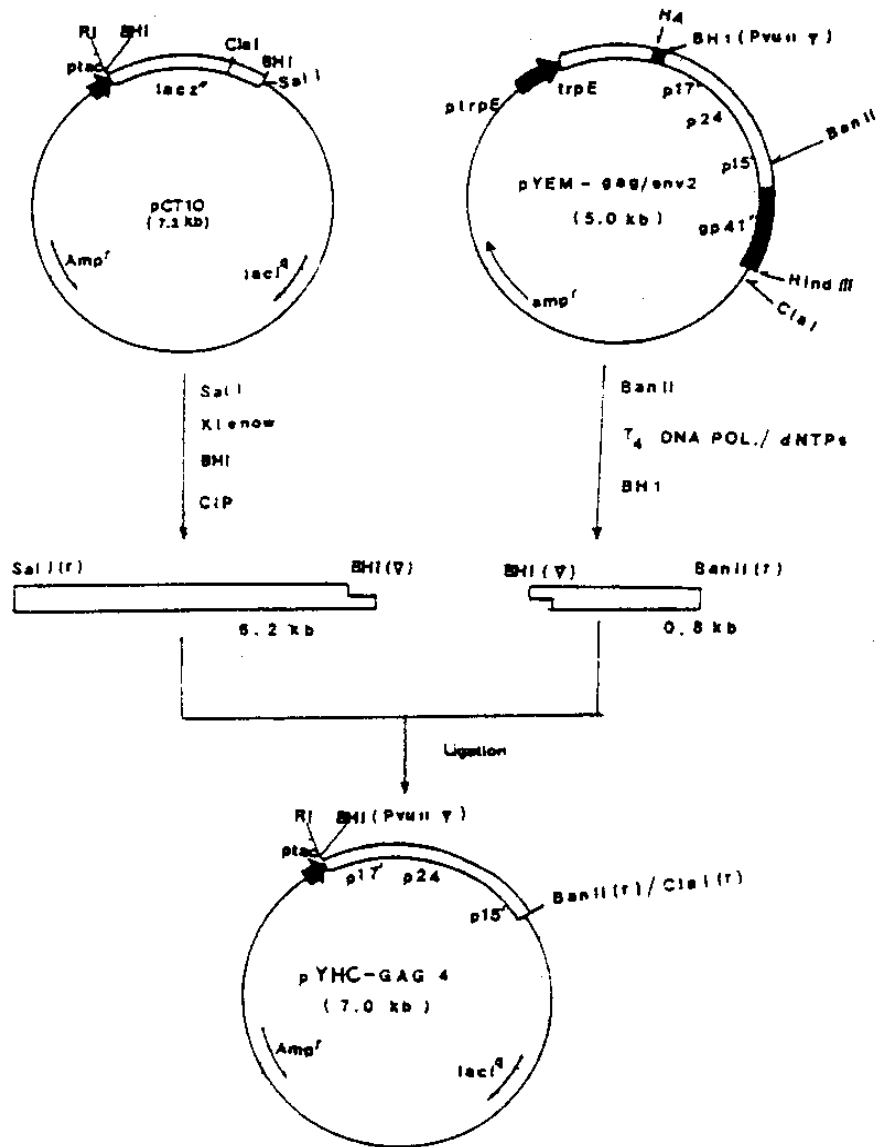


Fig. 8. Construction of pYHC-gag4 expression plasmid under a tac promoter

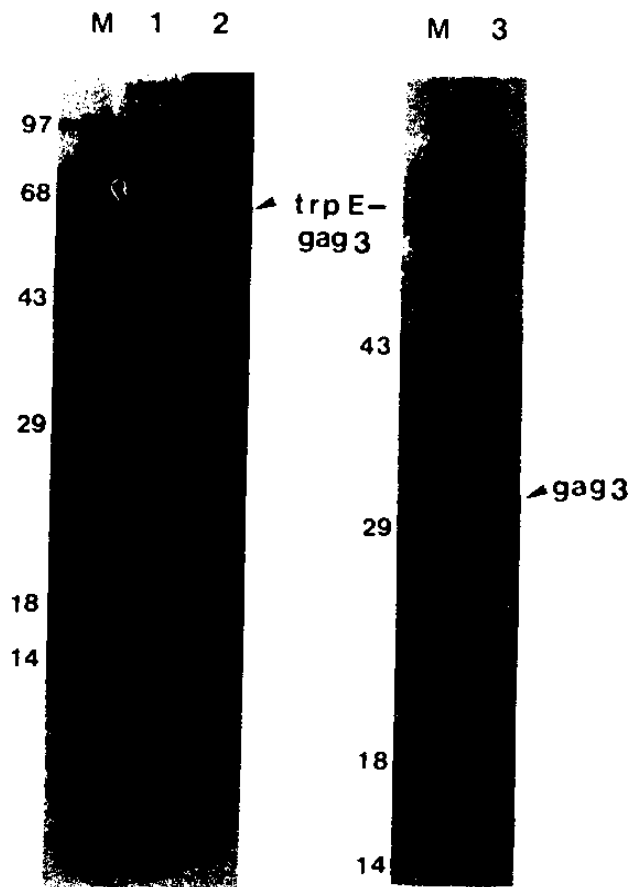


Fig. 9. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of GAG Gene product gag3
(p17-24-15)

M : Size marker

Lane 1 : pYHCM-gag3 ; Uninduced

Lane 2 : pYHCM-gag3 ; Induced

Lane 3 : Hydroxylamine cleavage of trpE/gag3 fusion protein

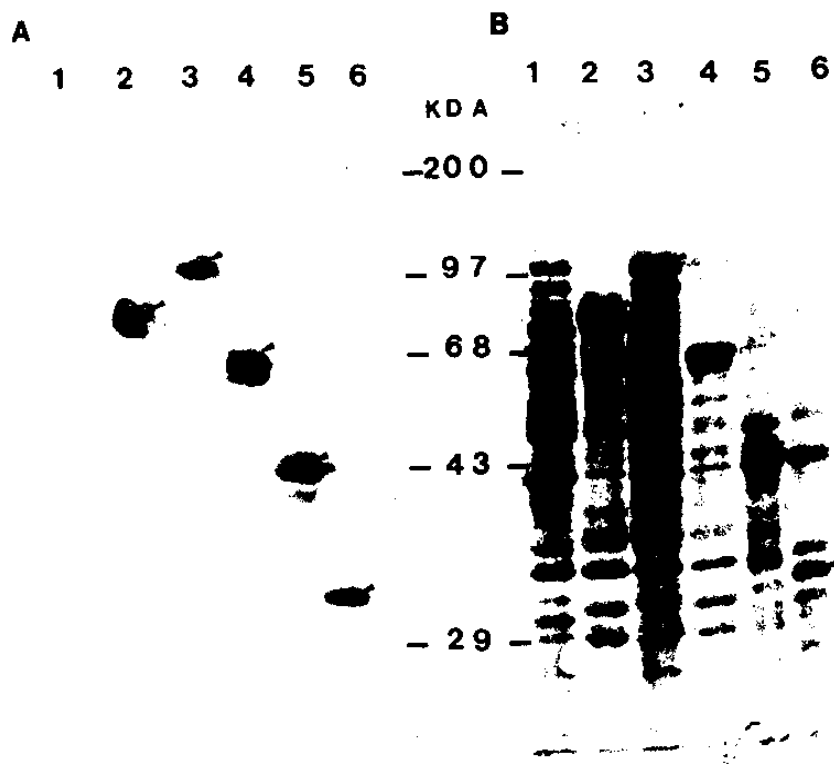


Fig. 10. A : Western blot analysis of HIV gag' and env' polypeptides
 B : Amido black staining of HIV gag' and env' polypeptides

- lane 1 : pCT10(∇LacZ")
- lane 2 : pYEM-gag/env2
- lane 3 : pT1M-env6
- lane 4 : pYHC-gag3
- lane 5 : pYHC-gag/env2
- lane 6 : pYHC-gag4

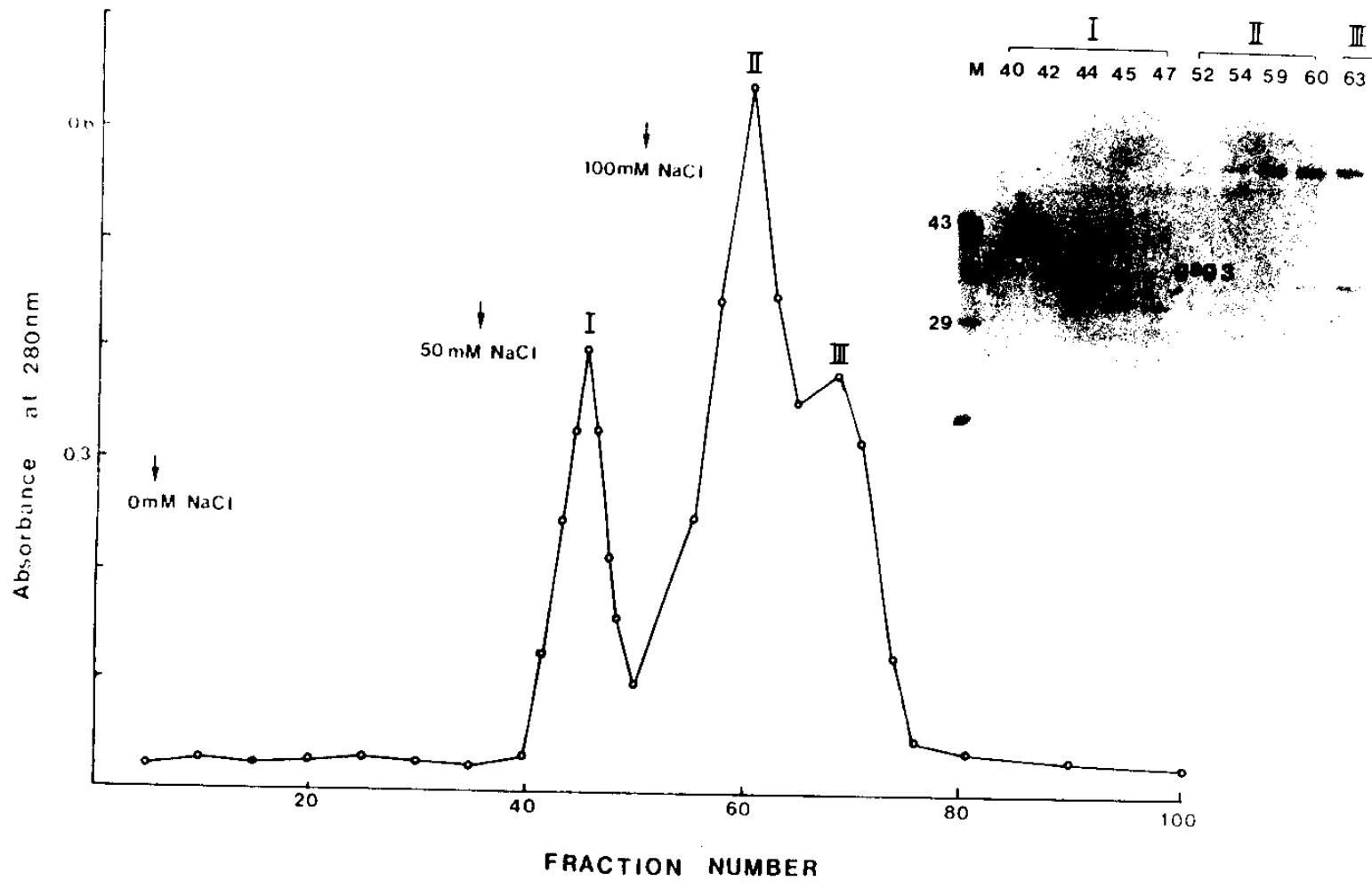


Fig. 11. Purification of gag3 by DEAE-Sepharose-CL-6B chromatography

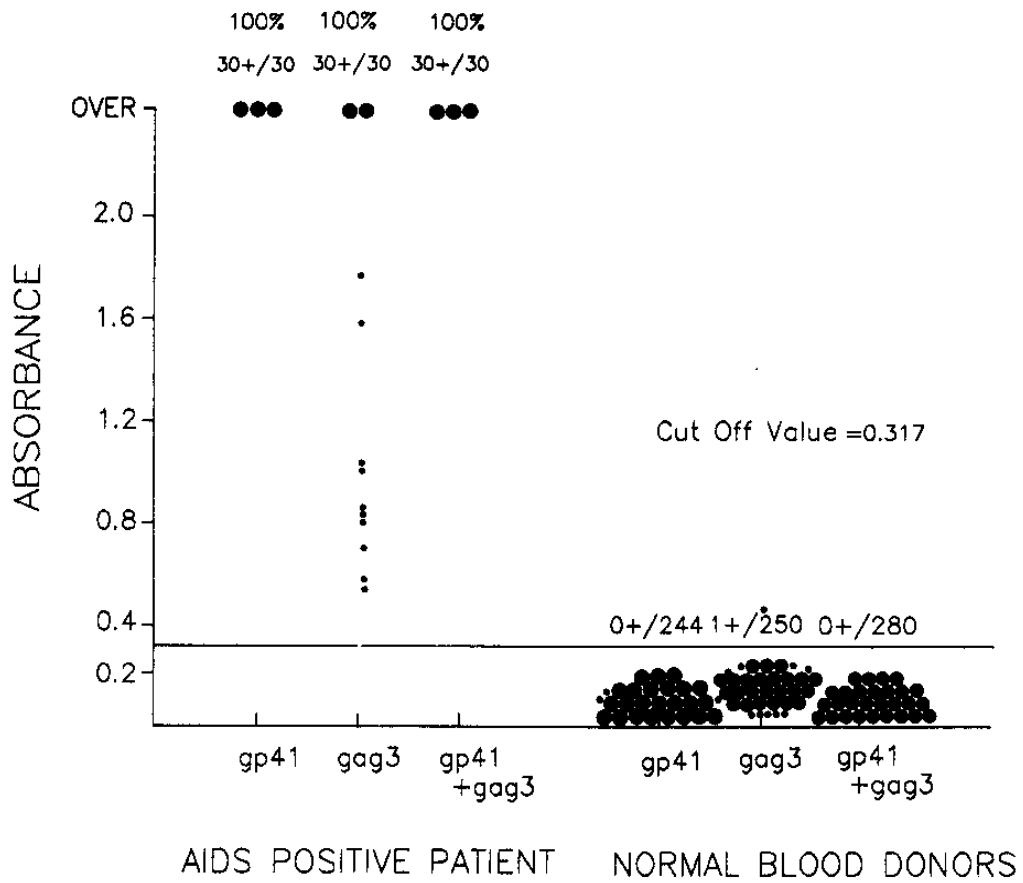


Fig.12. Histogram showing ELISA values obtained with sera from AIDS patients.

Each dot represents the value for one individual.

● = ten sera

• = single serum

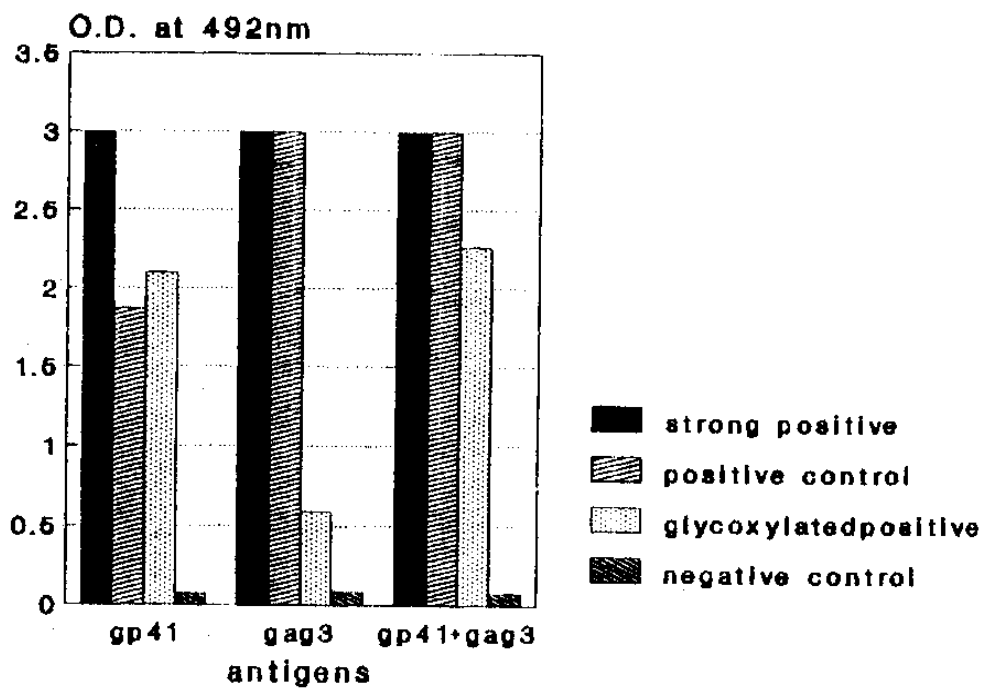


Fig. 13 . Comparison of AIDS sera for various antigens

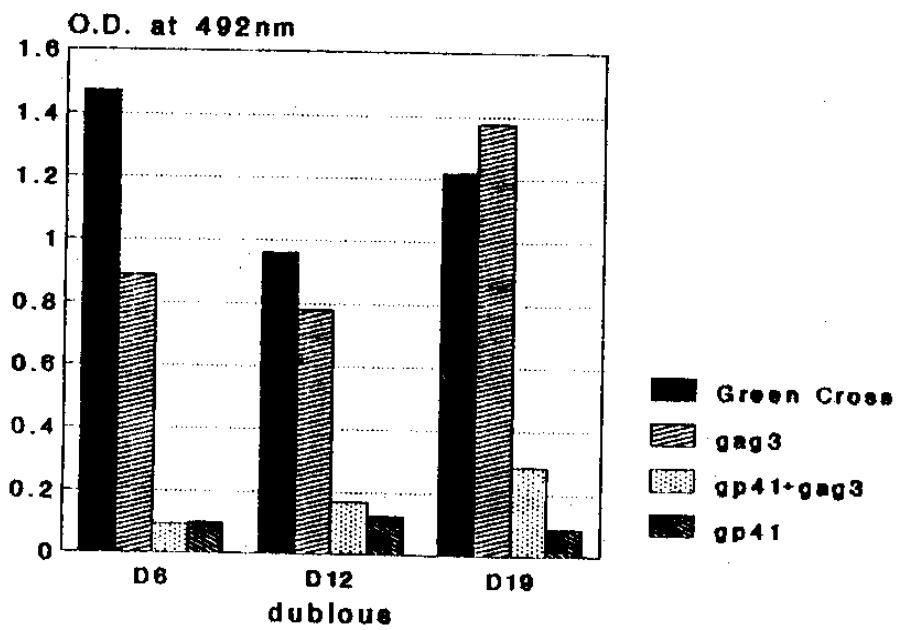


Fig. 14. Comparison of dubious sera for various antigens

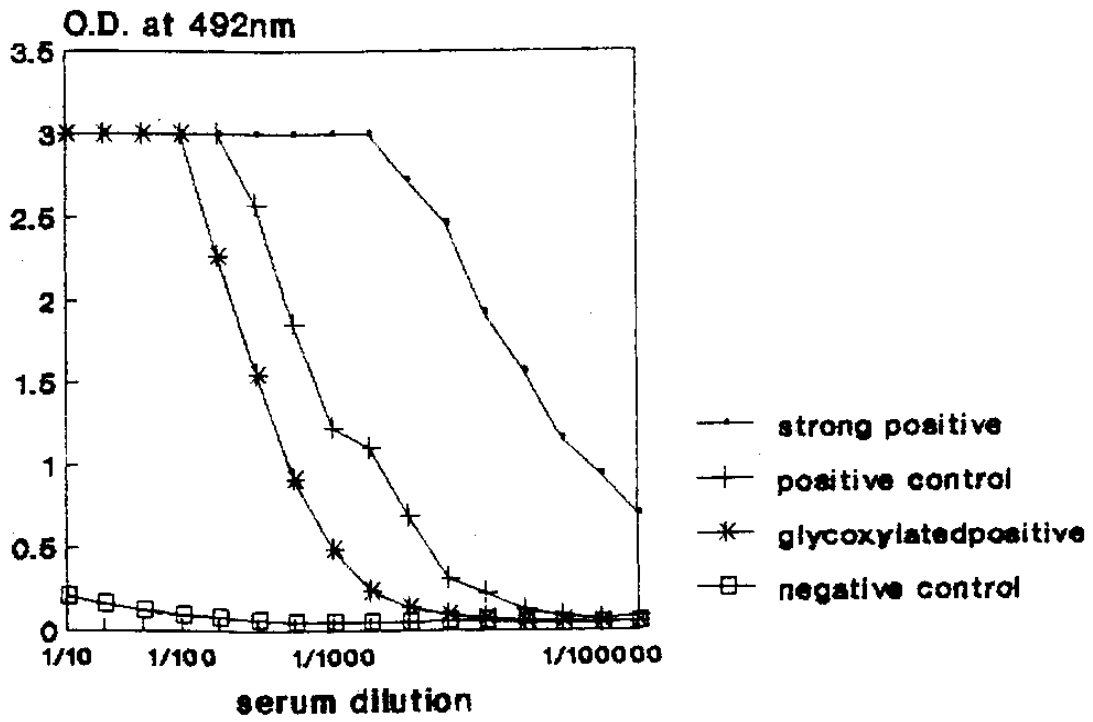


Fig. 15. Titration curves of sera for gp41+gag3

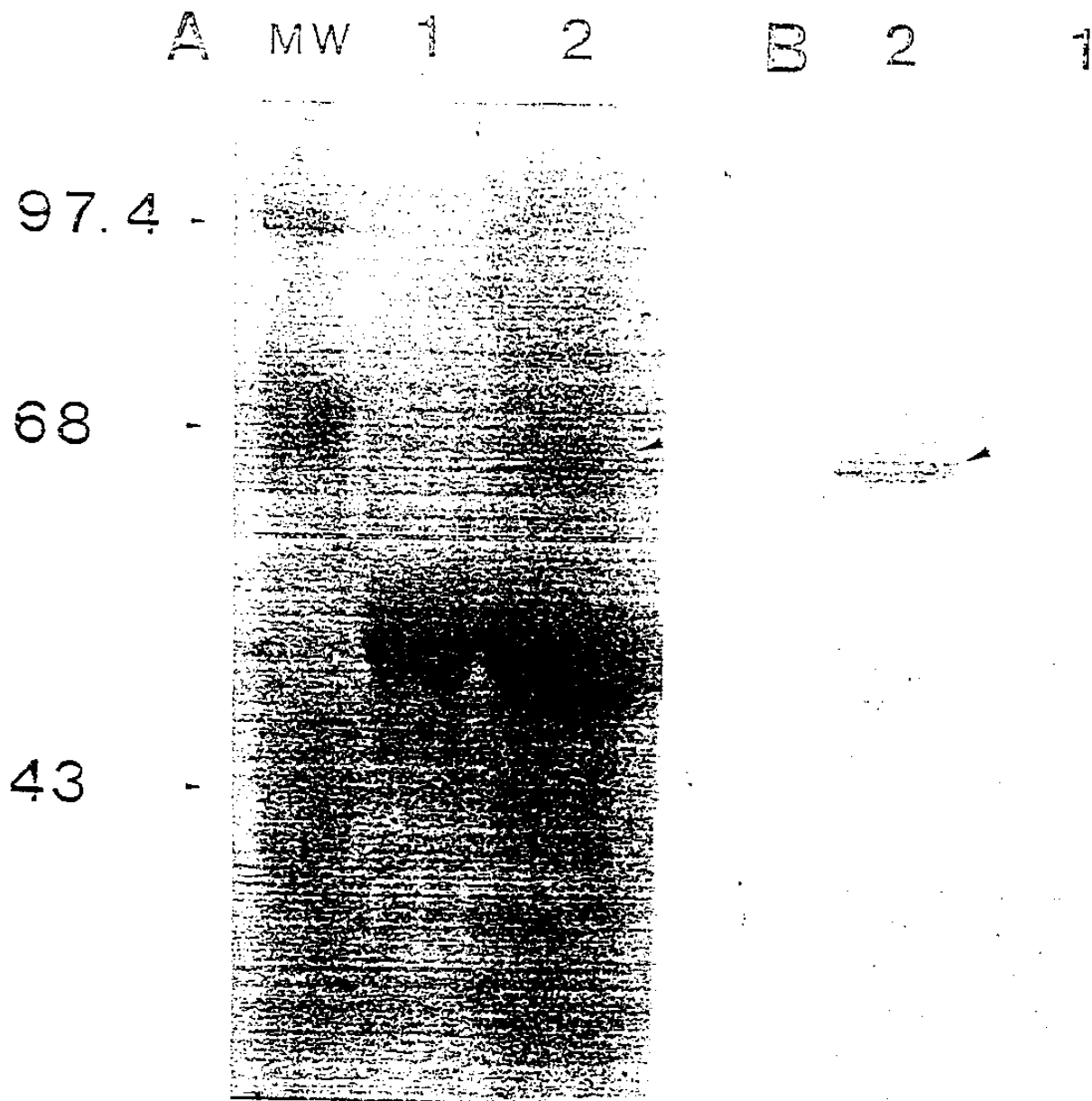


Fig. 16 . Western blot analysis of crosslinked immunoglobulin and gp41'

A : SDS-PAGE of IgG and crosslinked proteins

B : Immunoblot of pannel A

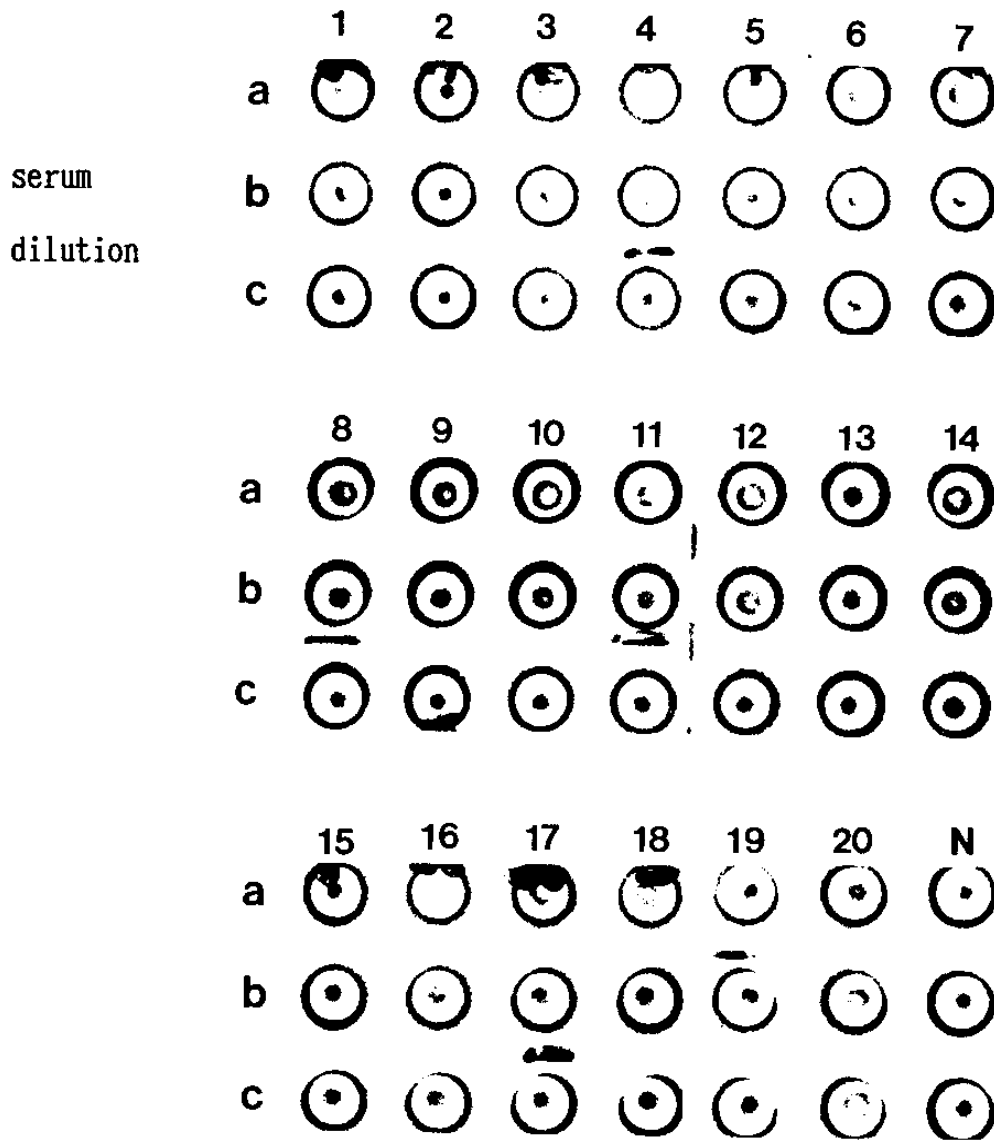
Proteins were subjected to SDS-PAGE and reacted with HIV-1 positive sera.

Lane 1 : IgG treated with MBS

Lane 2 : IgG crosslinked with gp41

Arrows indicate crosslinked proteins.

positive
sample No.



N : negative sample

a : serum dilution 1:80

b : serum dilution 1:160

c : serum dilution 1:320

Fig. 17. Glutaraldehyde에 의한 합성체를 이용하여 실시한 hemagglutination test

ELISA assay procedure

- (1) Antigen 50 μ l (1 μ g/well), O/N at RT.
- (2) Wash 1 x (PBS).
- (3) Block (10% FBS/PBS) well, 2h.
- (4) Serum (50 μ l/well), 1.5 h.
- (5) Wash.
- (6) Second antibody (1:1000 dilution of HRPO antihuman IgG conjugate), 50 μ l, 0.5 h
- (7) Wash.
- (8) Substrate 50 μ l [ABTS; 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid)], 10-20 min.
- (9) 5% SDS 50 μ l.
- (10) Read OD at 405 nm.

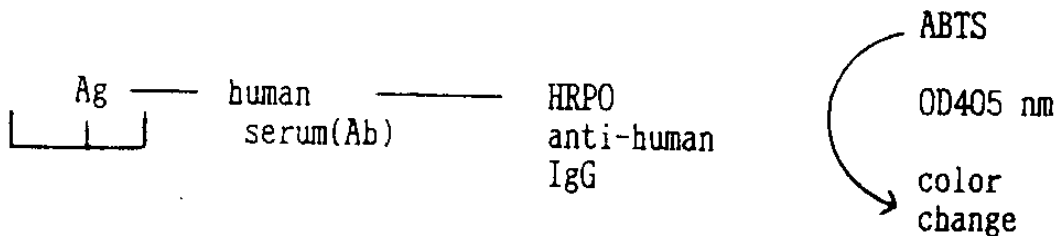


Table 1. ELISA assay procedures

항 원	특이도(%)	민감도(%)	수 율	비 고
p24	100	99.5	-	Ellinger et al Virology,180:811,1991
p121 gp41, 81 a.a	99.8	99.0	4mg/g cell paste	Ghrayeb et al HIV detection by genetic Engineering Method, p41 Dekker
Roche HIV gag/env	99.8	99.5	2.5-3 mg/g dry weight	Shoeman et al HIV detection by genetic Engineering Method,p99 Dekker
Roche HIV env	99.3	99.1	15-20 mg/g dry weight	
gag3+gp41	100	100	10-20 mg/l culture	본 발명

Table 2. 기존의 제조합 HIV-1 항원과의 특이도 비교

Anti-HIV Seroconversion Panel A

Data(GERI-HIV test 이외의 Data는 BBi의 결과임)

Sample ID	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A
집체채취일	5/4	7/8	7/29	8/19	9/2	9/9	9/16	9/23	10/14
하이비로	-	-	-	+	+	+	+	+	+
ABBOTT	-	-	-	+	+	+	+	+	+
CAMB. BIOS.	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CELL PROD.	-	-	-	+	+	+	+	+	+
DUPONT	-	-	-	+	+	+	+	+	+
GENE-CYCT	-	-	-	+	+	+	+	+	+
OLYMPUS	-	-	-	+	+	+	+	+	+
GERI-gp41	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GERI-gag3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GERI-gp41+gag3	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* 타사제품의 경우 항체 미형성 기간이 3개월15일 (ELISA 기준)으로 추정했으나, 본 GERI-HIV test 결과 그 이전이라고 판명됨.

Table 3. Anti-HIV seroconversion panel A에 대한 타사 제품 항원을 이용한 ELISA data 비교

Anti-HIV 1 Seroconversion Panel A

Western blotting of plasma donor

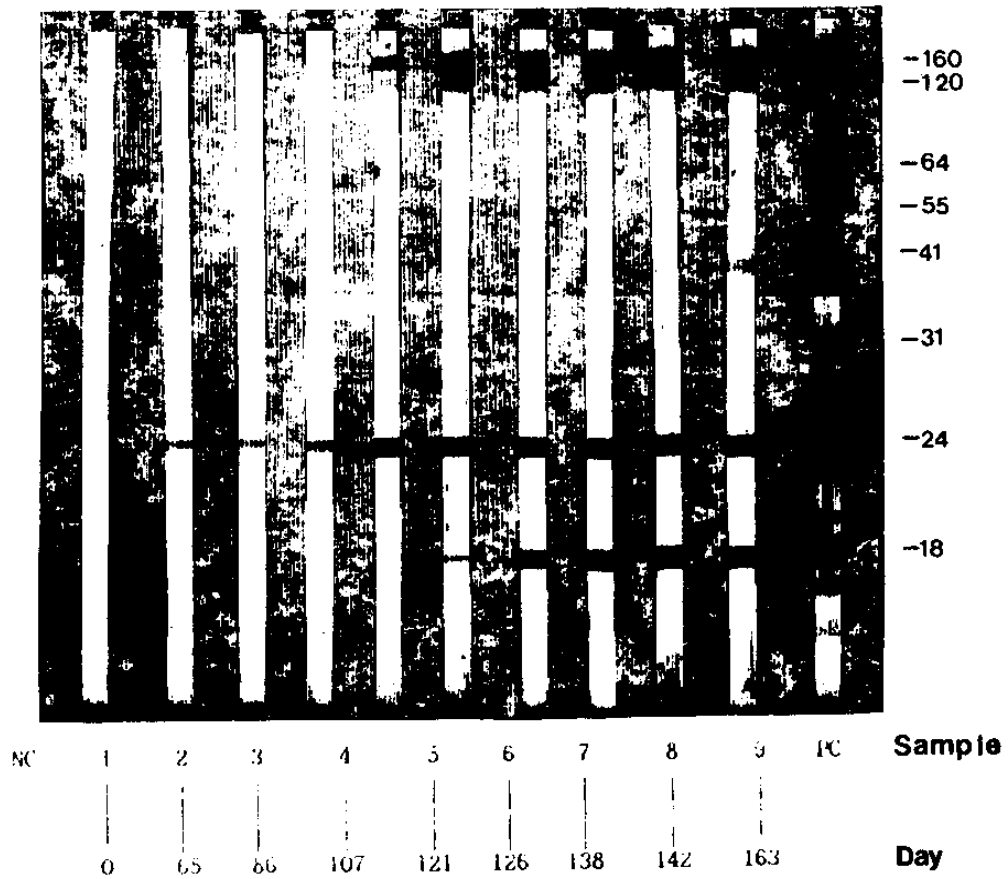


Table 4. Western blotting of Anti-HIV 1 seroconversion panel A

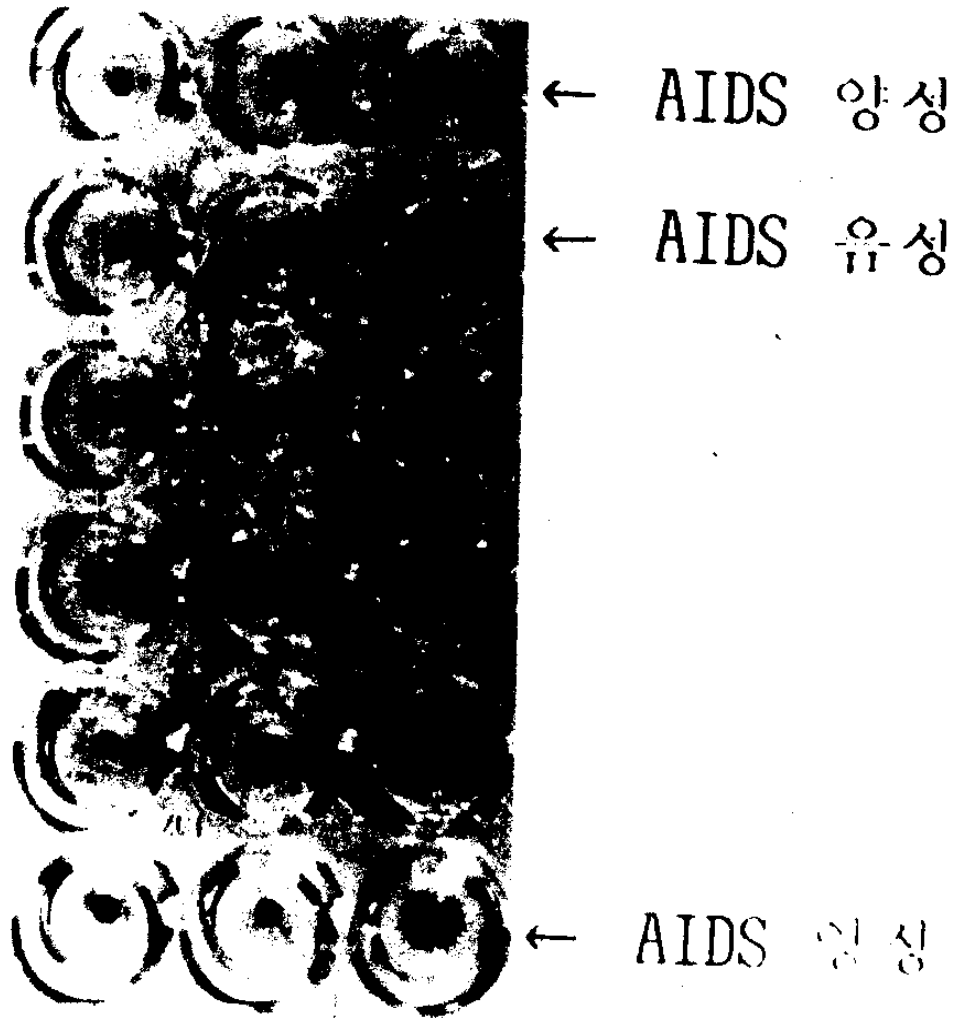


Table 5. 적결구에 대한 비응집 단일클론항체를 이용한 응집, 비응집 모식도.

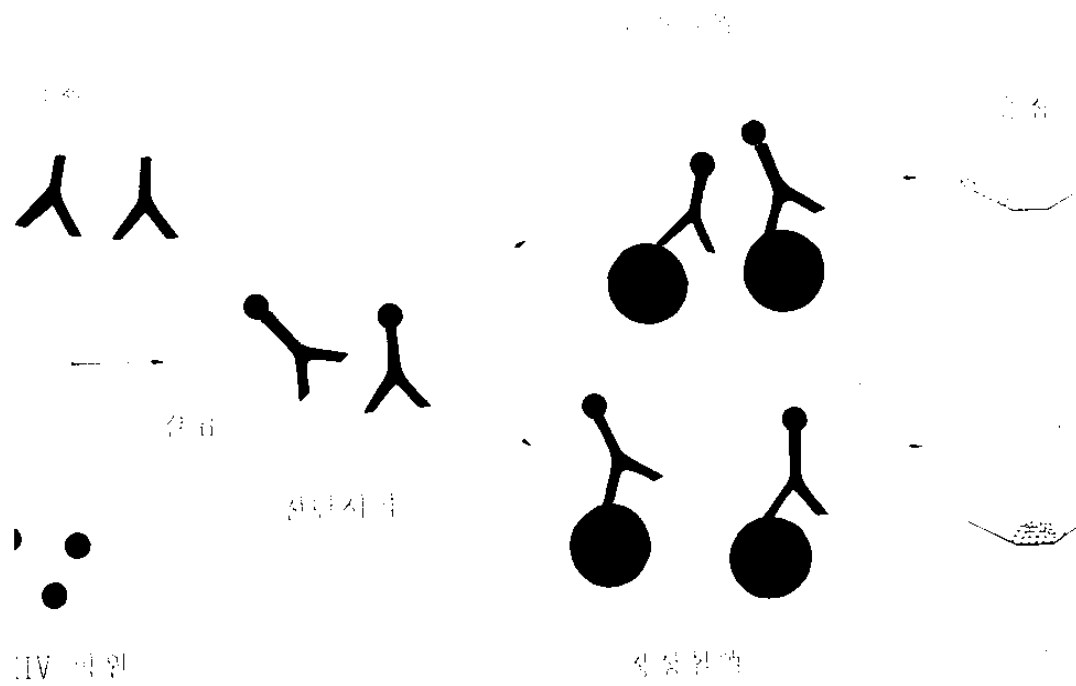


Table 6. AIDS 환자 혈액을 이용한 진단 모식도

ASID 환자 - 환자 혈액내의 AIDS바이러스 항체로 인하여 응집현상이 일어남.

정상인-AIDS 바이러스 항체가 없으므로 적혈구 침전현상이 일어난다.

주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 특정연구 개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학 기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외 적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.