

## 연재 2

### RT-PCR을 이용한 전염성 기관지염 바이러스의 검출과 국내분리

#### 전염성 기관지염 바이러스의 Nucleocapsid gene의 염기서열 분석

안영기\*, 권혁준, 윤종용, 이동우, 안영진, 김선중

서울대학교 수의과대학 조류질병학교실

#### 서론

전염성 기관지염(IB)은 조류에 있어서 호흡기 증상을 주증으로 하고, 산란을 저하와 난질 저하 및 신장염 등을 일으키는 급성 바이러스성 질병이다. 전염성 기관지염 바이러스(IBV)는 Coronaviridae에 속하는 enveloped, single stranded RNA virus로서, positive sense viral RNA와 관련이 있는 Nucleocapsid protein, transmembrane protein인 Membrane glycoprotein, translation후에 S1, S2 sub-unit로 cleavage되는 spike protein의 3개의 주된 structural protein을 가지고 있다. 본 실험에서는 RT-PCR을 이용하여 Nucleocapsid gene의 일부를 증폭하여 IBV를 검출하고, 증폭된 PCR산물의 염기서열 분석을 통한 국내분리 IBV의 분자적인 분류를 시도하였다.

#### 재료 및 방법

바이러스 검출 재료로는 1980년도부터 1991년도까지 서울대학교 조류질병학교실에 의뢰된 IB감염이 의심되는 30개의 가검물 재료를 각각 접종한 계태아의 Allantoic fluid와 1999년도에 의뢰된 가검물중 5건의 기관 유제액을 이용하였다. 표준주로는 IB 백신주인 Ma5와 HI20을 사용하였다. RNA는 Tri reagent를 이용하여 추출하였고, cDNA는 Random primer 2 $\mu$ l, RNA 5 $\mu$ l, DEPC DDW 4 $\mu$ l를 넣고 70°C에서 10분간 반응시킨 후, 4°C로 온도를 낮춰 5 $\times$ Buffer 4 $\mu$ l, 0.1M DTT 2 $\mu$ l, dNTPs 1 $\mu$ l, M-MLV Reverse transcriptase 1 $\mu$ l를 넣어주고 37°C에서 1시간을 반응시킨 후, 70°C에서 10분간 불활화를 시켰다. RT-PCR을 위한 primer는 IBNF(144-163bp; 5'-CCAGTYATYAACTAGGAGG -3'; Y는 T 또는 C), IBNR(406-387bp; 5'-GCGGCWGGTCCTGTTCCA GT-3'; W는 A 또는 T)을 이용하고, PCR은 10 $\times$ Buffer 2 $\mu$ l, dNTPs 2 $\mu$ l, Taq polymerase 1 $\mu$ l, cDNA 1 $\mu$ l, IBNF및

IBNR primer를 각기 1 $\mu$ l씩 넣어 94 $^{\circ}$ C 4분간 pre-denaturation시킨 후, 94 $^{\circ}$ C 1분, 45 $^{\circ}$ C 1분, 65 $^{\circ}$ C 1분씩 40 cycle을 실행하고 72 $^{\circ}$ C에서 4분간 final polymerization시켰다. PCR band는 1.5% agarose gel에서 15분간 전기영동을 하여 UV에서 관찰하였다. 염기서열 분석은 ABI prism automatic sequencer를 이용하여 수행하였다.

### 결과 및 고찰

35건의 가검물중 IBNF, IBNR primer를 이용하여 10건에서 IBV의 특이적인 263bp의 PCR 증폭산물을 얻을수 있었다. 증폭산물의 염기서열을 분석하여 외국 보고주와 국내주의 상동성을 비교하여 아래와 같은 결과를 얻었다(표1). 분리주중 2주(SNU8628, SNU8910A)는 HI20과 100%의 상동성을 보였고, SNU8644와 SNU8650이 100%의 상동성을 보이면서 SNU80108과 같은 계열에 속했으며, SNU9993과 SNU99114 역시 100%의 상동성을 보이면서 SNU90110, SNU90129C, SNU99143등과 같은 계열을 형성하였다(그림1). 이 결과에서 국내분리 IBV는 1980년도 이후 크게 두 그룹으로 진화되어 온 것으로 사료된다. RT-PCR을 이용한 IBV의 검출은 S1 gene과 nucleocapsid gene등을 대상으로 하여 실시되어 왔다. Nucleocapsid gene은 S1 gene에 비하여 비교적 conserved된 부분이 많아 PCR등을 이용하여 IBV를 검출할 때 유리할 것으로 생각되고, 약 1700bp 정도로 구성된 S1 gene은 HI항체와 virus 중화항체를 induce시키는 gene으로서 RFLP등의 방법을 통하여 분석해보면 serotype specific한 양상을 보이므로 실험에 이용한 10주의 virus도 S1 gene을 증폭시켜 혈청형을 분류하는 실험이 필요할 것으로 사료된다.

(Key words; RT-PCR, Infectious Bronchitis Virus, Nucleocapsid gene)

### 인용문헌

Emiliana Falcone, Emanuela D'Amore, et al., *J Virol Methods*, 64;125-130.  
C-S. Song, Y-J. Lee, J-H. Kim, H-W. Sung, C-W. Lee, et al., *Avian Pathology*, 27;409-416

Table 1. Sequence pair distance of 18 strains of infectious bronchitis virus by using the Clustal program with weight residue weight table [MegAlign package (Window version3.12e)].

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Ark99	1	91.1	91.7	95.8	91.7	89.1	92.7	90.1	94.8	95.3	62.0	95.3	95.3	95.3	92.2	90.1	92.2	92.7	1
Beaudette	2	9.5	90.1	92.2	90.1	87.5	91.7	92.7	91.1	89.6	63.5	91.1	92.7	92.7	88.5	88.0	91.1	90.6	2
H120	3	8.9	10.8	92.2	98.4	87.0	90.6	88.0	90.6	91.7	62.5	91.1	92.2	92.2	92.2	94.3	93.2	93.8	3
CU-T2	4	4.3	8.3	7.7	92.2	91.1	93.8	91.7	94.8	96.4	62.5	95.3	96.4	96.4	92.7	91.1	93.8	93.8	4
M85246	5	8.9	10.7	1.6	7.7	85.9	90.6	88.0	90.6	91.7	60.4	91.1	92.2	92.2	92.2	93.2	93.2	93.8	5
NI/62	6	11.8	13.2	13.8	9.4	15.0	89.1	84.4	89.6	89.6	65.1	88.0	90.1	90.1	89.6	90.1	89.6	89.1	6
D14660	7	7.8	8.9	10.1	6.6	10.1	11.2	93.2	92.2	93.8	61.5	92.2	93.2	93.2	91.7	90.6	91.7	92.2	7
M41	8	10.1	6.6	12.0	8.9	11.9	15.6	7.1	89.1	90.1	60.4	90.1	90.6	90.6	87.0	85.9	89.6	89.1	8
Gray	9	5.4	9.5	10.1	5.4	10.1	11.2	8.3	10.7	94.3	61.5	93.8	94.3	94.3	91.1	90.1	92.2	92.7	9
KB8523	10	4.9	10.2	8.3	3.8	8.3	11.2	6.1	9.5	6.0	62.0	95.8	95.8	95.8	91.7	90.6	92.7	93.2	10
NI/88	11	42.2	41.4	43.2	41.3	45.0	39.6	44.1	45.0	44.1	43.2	62.0	64.1	64.1	60.9	62.0	62.5	63.0	11
SNU80108	12	4.8	8.9	9.5	4.8	9.5	12.4	8.3	9.5	6.0	4.3	43.3	96.9	96.9	90.6	90.1	94.3	93.8	12
SNU8644	13	4.8	7.7	8.3	3.7	8.3	10.0	7.1	9.5	6.0	4.3	40.4	3.2	100	93.8	93.2	96.4	95.8	13
SNU8650	14	4.8	7.7	8.3	3.7	8.3	10.0	7.1	9.5	6.0	4.3	40.4	3.2	0.0	93.8	93.2	96.4	95.8	14
SNU90110	15	7.1	11.3	8.3	7.1	8.3	10.6	8.3	12.5	9.4	7.7	45.0	8.8	5.4	5.4	96.4	96.4	95.3	15
SNU90129C	16	9.5	12.6	6.0	8.3	7.1	10.6	9.5	13.8	10.6	8.9	43.2	10.0	6.5	6.5	3.8	95.3	94.8	16
SNU9993	17	7.1	8.9	7.1	6.0	7.1	10.6	8.3	10.1	8.3	6.5	42.2	5.4	3.2	3.2	3.2	4.8	97.4	17
SNU99143	18	6.5	9.5	6.5	5.4	6.5	11.2	7.7	10.7	7.7	6.0	41.3	6.0	3.7	3.7	4.8	5.4	2.7	18

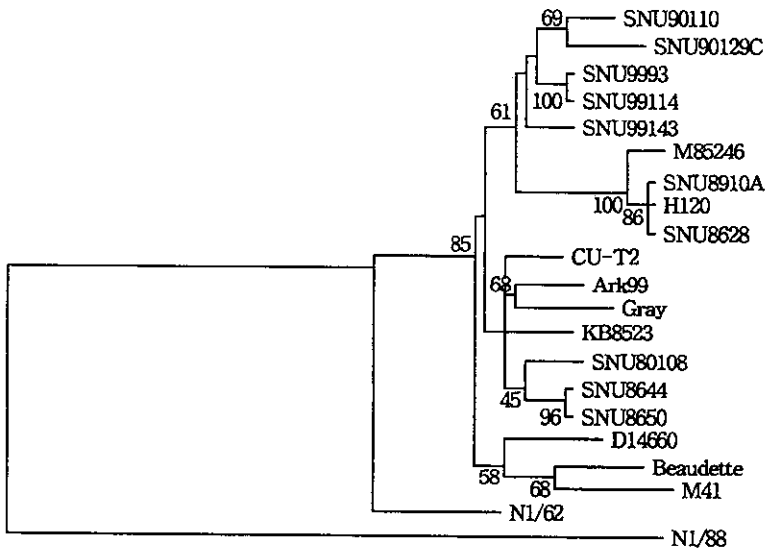


Fig. 1. Phylogenetic tree of infectious bronchitis virus strains on the basis of nucleotide sequence of the nucleocapsid gene. (Scale: each - is approximately equal to the distance of 0.003532)