

마이크로칩젤 전기영동에서 충전젤 혼합물을 이용한 ORF 바이러스의 진단

김윤정 · 채준석¹ · 강성호*

전북대학교 화학과

¹전북대학교 생체안전성연구소

(2004. 8. 2 접수)

Diagnosis of the ORF Virus Using a Mixture of Sieving Gel Matrixes in Microchip Gel Electrophoresis

Yunjeong Kim, Joon-Seok Chae¹, and Seong Ho Kang*

Department of Chemistry, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

¹Bio-safety Research Institute and College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

(Received August 2, 2004)

요 약. 시판 중인 poly(vinylpyrrolidone) (PVP)와 hydroxy ethyl cellulose (HEC) 혼합물을 충전젤 기질로 이용하여 한국 재래산양에 감염된 orf virus (ORFV)를 빠른 시간에 검출하여 진단할 수 있는 새로운 효소중합연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)-마이크로칩젤 전기영동법 (microchip gel electrophoresis, MGE)을 개발하였다. Orf 바이러스 B2L 유전자에서 지표-DNA인 594-bp DNA를 PCR로 증폭시킨 뒤, MGE법을 이용하여 증폭된 DNA를 분석하였다. MGE법은 64 mm 총길이(유효길이 36 mm) × 90 μm 폭 × 20 μm 깊이의 유리로 제작된 마이크로칩을 사용하였다. 1.0% PVP (M_n 360,000)와 1.0% HEC (M_n 250,000)의 혼합 충전젤과 277.8 V/cm의 전기장에서 4분 안에 증폭된 594-bp DNA를 분석하였다. PVP와 HEC의 혼합된 충전젤을 사용시 DNA 단편의 길이에 영향이 없이 하나의 DNA 피크를 나타내며 향상된 분리도와 이동시간의 재현성을 보여주었다. 본 PCR-MGE법은 고전적인 슬랩젤 전기영동법에 비해 약 20배 이상의 빠른 검출시간과 정량분석이 가능한 효과적인 ORFV 유전자단편 검출법이었다.

주제어: Orf 바이러스, 혼합 충전젤, 질병진단, 마이크로칩젤 전기영동

ABSTRACT. We have developed a novel polymerase chain reaction (PCR)-microchip gel electrophoresis (MGE) method based on the sieving gel mixture of commercially available poly(vinylpyrrolidone) (PVP) and hydroxy ethyl cellulose (HEC) for the rapid detection and diagnosis of the orf virus (ORFV) from Korean indigenous goat. After amplification of 594-bp DNA fragment from the B2L gene of ORF virus, the amplicon was analyzed by the MGE separation. The glass microfluidic chip (64 mm total length (36 mm effective length) × 90 μm width × 20 μm depth) allowed the fast detection and diagnosis of ORFV in the mixture of 1.0% PVP (M_n 360,000) and 1.0% HEC (M_n 250,000) as a sieving matrix with better resolution and reproducibility of DNA fragments. Under the electric field of 277.8 V/cm, the 594-bp DNA was analyzed within 4 min. Compared to traditional slab gel electrophoresis, the PCR-MGE method was twenty times faster and an effective clinical method for the quantitative analysis of ORFV.

Keywords: Orf virus, DNA Sieving Matrix, Diagnosis, Microchip Gel Electrophoresis

서 론

Orf virus(ORFV)는 bovine papular stomatitis virus와 pseudocowpoxvirus, 그리고 뉴질랜드 붉은사슴의 parapoxvirus와 함께 parapoxvirus 군에 속하는 질병이다.^{1,8} 이것은 신양이나 염소와 같은 동물에게서 두드러지게 나타나는 전염성 농포성 피부염으로 동물을 사육하는 사람에게까지 감염되어 손이나 팔의 피부에 수포성 구진을 일으킬 수 있다.^{9,10} 주로 상처와의 직접 접촉에 의해서 바이러스가 전파되며, 오염된 토양이나 기구도 중요한 감염원이 된다. 양과 염소들은 이 질병에 감염되면 구강 주위, 안구 주변, 혀, 코, 유방, 생식기를 비롯한 점액근육 부위에 출혈성 수포병변과 안구백탁, 안구충혈, 통증으로 인한 식욕부진 등을 일으키며, 전염성이 매우 높은 것이 특징이다.¹¹ 동물들에게서 나타나는 병변은 3~4일 주기에 홍반, 농양, 궤양의 순으로 진행하며, 치유까지는 10일에서 4주가 걸리며 치사율은 어린 동물 이외에는 낮게 나타난다.³ 하지만 이러한 전염성 농포성 피부염에 대한 바이러스는 자연환경에 대한 저항성이 높아 본 병이 발병된 농장은 수년간 오염되어 질병을 전파시키므로 근절이 어렵다.^{12,13} 따라서 ORFV에 의한 감염은 예방과 정확하고 빠른 질병진단이 더욱 중요시되고 있는데 현재 사용되는 예방법으로는 주로 살아있는 백신을 이용하고 있다.¹⁴ 질병진단을 위한 분석방법으로는 전자현미경을 이용하여 바이러스를 확인하거나,¹⁵ 젤 내 확산침강반응에 의해 바이러스 항원을 검출하는 방법,¹⁶ Poxvirus 감염에 있어서의 바이러스 숙주세포의 상호관계를 측정하는 세포화학적 방법, 자동방사선법, 세포면역학적 방법 등¹⁷이 사용되어 왔으나, 최근에는 다른 바이러스와 효과적으로 구별이 가능한 방법으로 PCR법과^{18,19} PCR로 증폭된 DNA를 슬랩젤 전기영동하여 진단하는 방법^{4,20} 등이 소개되고 있다. 하지만 이러한 방법들은 긴 분석시간, 많은 노동력, 빈번한 오차의 발생, 정량성의 어려움 등과 같은 단점이 있다.

마이크로칩 전기영동법(microchip electrophoresis, ME)은 1992년 Manz와 Harrison 등에 의해 처음 소개된 이후로,^{21,22} 분석의 효율성, 빠른 분석속도, 적은 시료량, 자동화의 용이성, 기기의 소형화, 높은 분리도 등과 같은 장점에 의해 현재 DNA 분석에 있어 중요성이 점점 더 증가하고 있다.²³⁻²⁹ 슬랩젤 전기영동에서 기존에 전형적으로 사용하던 교차 결합된 폴리아크릴아마이드

(PA)는 높은 전기장에서 불안정하기 때문에 선형폴리머가 DNA분리를 위한 매체로 모세관 전기영동(capillary electrophoresis, CE)에서 사용되고 있다.³⁰ Barron 등은 PA 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌글리콜, 폴리비닐알코올, 갈락토만난과 아가로즈 등의 12개 수용성 선형폴리머를 DNA 분리를 위해 CE에서 사용하였고,³¹ 다른 새로운 젤 매트릭스인 폴리 N-메틸아크릴아마이드도 조사되었다.³² DNA 분리에 미치는 젤 조성의 효과나 모세관의 길이, 전기장의 영향도 CE에서는 체계적으로 연구되고 있다.³³⁻³⁶ 특히, 온도에 영향을 받는 hydroxypropyl-cellulose와 hydroxyethylcellulose의 혼합젤 매트릭스를 사용하거나,³⁷ 친수성인 hydroxypropylmethyl cellulose와 polyethylene oxide 등의 혼합젤을 사용하여³⁸ 효과적인 DNA 단편들에 대해 높은 분리도를 얻을 수 있었다. 일반적으로, CE에서 사용되는 모세관은 ME에서 사용하는 마이크로채널과 재질과 크기가 비슷하여 CE에 적용되는 젤의 종류 및 특성을 ME에 응용하면 좋은 결과를 얻을 수 있다. 하지만 아직까지, ME에서는 DNA 분리에 영향을 미치는 혼합된 젤 매트릭스의 조성에 대한 연구는 보고된바 없다. 따라서 본 연구에서는 혼합된 PVP와 HEC를 충전젤로 사용하여 DNA 단편들의 분리에 미치는 영향을 조사하였다. 아울러 ORFV의 신속한 질병진단을 위해 본 방법의 응용 가능성을 조사하였다. ORFV의 최적 PCR 조건을 조사한 뒤, ORFV에 감염된 한국재태산양의 피부 병변조직에서 ORFV의 B2L유전자 단편을 PCR법으로 증폭하고, 증폭된 DNA 단편을 PVP와 HEC의 2개의 다른 혼합된 충전젤 매트릭스에서 ORFV를 빠르고 정확히 진단 할 수 있는 새로운 PCR-MGE 방법을 개발하였다.

실 험

시약 및 시료. 1× TBE 완충액(0.089 M tris, 0.089 M borate와 0.002 M EDTA, pH 8.5)은 미리 혼합되어 있는 TBE 분말 (Amersco, USA)을 증류수에 녹여 제조하여 사용하였다. 10× PCR 완충액 I과 II (super Bio Co., LTD, Korea), ethidium bromide (EtBr)는 Promega (USA)에서 아세트산과 글리세롤은 Junsei (Japan)에서 bromophenol blue는 Showa (Japan)에서 xylene cyanol FF는 Polysciences (England)에서 2.5 mM dNTP mix와 Taq DNA polymerase (5 U/μL)는 Super-Bio사(Korea)에서 구입하였다. Nuclease free water, Tris, EDTA는

Sigma에서 구입하였다. ORFV의 유전자증폭을 위해 PCR에서 사용된 정방향 합성개시물질 (5'-GTC GTC CAC GAT GAG CAG CT-3')와 역방향 합성개시물질 (5'-TAC GTG GGA AGC GCC TCG CT-3')은 제노텍 (Korea)에 의뢰하여 합성하였으며, 합성된 10 pmol PCR 합성개시물질은 희석하여 1 pmol로 사용하였다.¹ 100-bp DNA ladder (100 µg/mL)는 Genepia (Korea)에서 구입하였다. 충전젤은 분자량이 360,000인 PVP (Polyscience)와 분자량이 250,000인 HEC (Aldrich, USA)를 혼합하여 사용하였다. 그 밖의 모든 화학시약은 시약등급을 사용하였으며, 증류수는 0.22 µm-membrane filter Millipak 40이 결합되어 있는 Milli-QTM/Milli-RO Water System (USA)에서 제조된 것을 사용하였다. ORFV 시료는 전형적인 전염성 농포성 피부염 소견을 보이는 전북 익산 지역 농가의 재래 산양으로부터 채취된 병변조직으로서 전북대학교 동물병원에서 채취한 것을 제공받았다.

효소중합연쇄반응. 최적 PCR 반응혼합물의 비율은 주형 DNA 50-200 ng, 각각의 합성개시물질 2 µL (5 pmole), 2.5 mM dNTP 2 µL, 10× PCR 완충액 I과 II를 각각 1 µL, Taq polymerase (5U/mL) 0.3 µL, nuclease free water 9.7 µL이었다. PCR 반응은 열순환기 (Perkin-Elmer model 2400, USA)를 사용하였다. 변성은 1주기로 95 °C에서 1분, 합성개시물질 결합은 55 °C에서 1분, DNA 신장은 72 °C에서 1분간씩 30주기로 하였고, 마지막으로 72 °C에서 7분 동안 신장을 하였으며, 16 °C에서 보관되도록 순서를 진행하였다.¹

슬랩젤 전기영동. Tris 242 g과 아세트산 57.1 ml, 그리고 EDTA 37.2 g을 섞어서 만든 50× TAE 완충액을 묽혀 1× TAE 완충액을 제조하였다. 1× TAE 완충액 50 mL에 아가로스 (Sigma) 0.5 g을 넣어 가열하여 녹이고, 이것을 젤 틀에 부어 굳힌 뒤 1% 아가로스젤로 사용하였다. Bromophenol blue 0.25%와 xylene cyanol FF 0.25% 그리고 30% 글리세롤을 섞어 만든 6× dye 5 µL에 PCR으로 증폭한 DNA 1 µL를 혼합해 총 6 µL를 시료로 하여 슬랩젤에 주입하였다. 100-bp DNA ladder 2 µL를 PCR 산출물인 증폭된 DNA의 길이를 비교하기 위해 젤에 함께 주입하였다. 이것을 150 V에서 45분간 SaB-Cell[®] (Bio RAD, USA)에서 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝난 젤을 키네이 EtBr에 5분간 염색 후 탈색하여, UV검출기 Gel Doc 2000 (Bio-Rad, USA)를 사용하여 증폭된 594-bp DNA 밴드를 확인하였다.

마이크로칩젤 전기영동. 0.5 ppm의 EtBr이 포함된 1×

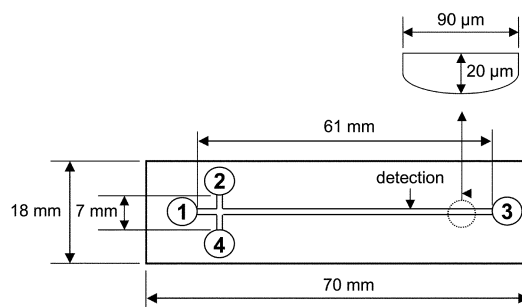


Fig. 1. Layout and dimensions of the single-channel glass microchip used for the fast separation of ORFV PCR product. Reservoir 1=buffer inlet, Reservoir 2=sample inlet, Reservoir 3=buffer waste, Reservoir 4=sample outlet.

TBE 완충용액 5 mL에 분자량이 360,000인 PVP 0.05 g과 분자량이 250,000인 HEC 0.05 g을 잘 혼합한 뒤, 실온에서 2분 동안 흔들어주고 2시간 동안 저어주어 1% (W/V)의 ME용 충전젤로 사용하였다. ME 기기는 DBCE-100 Microchip CE system (Digital Bio Technology Co., Korea)으로 532 nm의 들뜸파장을 갖는 diode-pumped solid-state laser와 605 nm 방출형광을 검출할 수 있는 광증배관으로 구성되어 있다. 고전압공급장치는 DBHV-100 (Digital Bio Technology Co., Korea)을 사용하였다. 마이크로칩은 양면이 유리로 제작된 십자 형태의 cross-T를 갖는 마이크로칩 (Digital Bio Technology Co., Korea)을 사용하였다. 이 칩의 채널은 90-µm 폭과 20-µm 깊이를 가지며 저장용기의 직경은 0.3 mm이고, 길이는 20 µm이었다. 저장용기 2에서 저장용기 4까지의 채널 길이는 7 mm, 저장용기 1에서 3까지의 채널 길이는 61 mm이며, 분리된 DNA시료는 cross-T로부터 36 mm 떨어진 지점에서 검출하였다 (Fig. 1). 완충용액은 0.5 ppm EtBr이 포함된 1× TBE 완충용액 (pH 8.5)을 사용하였다. 먼저 충전젤을 저장용기 1, 2에 넣은 뒤 저장용기 3에서 진공기 (EYELA A-3S vacuum aspirator, Tokyo Rikakikai Co., Japan)를 이용하여 채널 내에 유체 역학적으로 채웠다. 시료는 마이크로칩의 저장용기 4의 위치에 넣어 60초 동안 도입저장용기 4에서 배출저장용기 2로 180 V의 전압을 걸어주어 계면동전기주입법으로 주입하였다. 그리고 저장용기 1, 2, 3, 4 각각에 0 V, 151 V, 1000 V, 151 V의 전압을 걸어 주어 길이가 다른 DNA 단편들을 분리하였다. 매 실험 후 마이크로칩의 채널은 3분 동안 증류수로 씻고, 2분 동안 충전젤로 다시 충전하여 마이크로칩의 채널상태를 똑같이 유지하였

다. 100-bp DNA ladder와 PCR 산출물인 594-bp DNA의 이동시간의 비교 뿐만 아니라 소량첨가를 통해 ORFV의 정성분석을 재확인 하였다. 또한 기지 농도의 594-bp DNA를 표준물로 하여 표준물첨가법을 사용하여 DNA의 피크면적을 구한 뒤, 594-bp DNA에 대한 검정곡선을 작성하여 ORFV의 정량분석을 하였다. MGE에서 얻은 DNA 단편의 피크면적은 OriginPro7.5 software (OriginLab Co., USA)를 이용하여 구하였다.

결과 및 고찰

한국 재래산양으로부터 진염성 농포성 피부염이 발생한 병변조직에서 추출한 DNA를 Inoshima 등의 방법¹을 응용하여 최적의 PCR조건에서 DNA의 증폭을 시도하였다. PCR 반응 후 PCR 산출물을 슬랩젤 전기영동을 한 결과 주어진 전기영동조건에서 ORFV 양성의 염소에서 594-bp DNA인 ORFV B2L 유전자 단편을 확인할 수 있었다(Fig. 2 lane 2). ORFV에 감염되지 않은

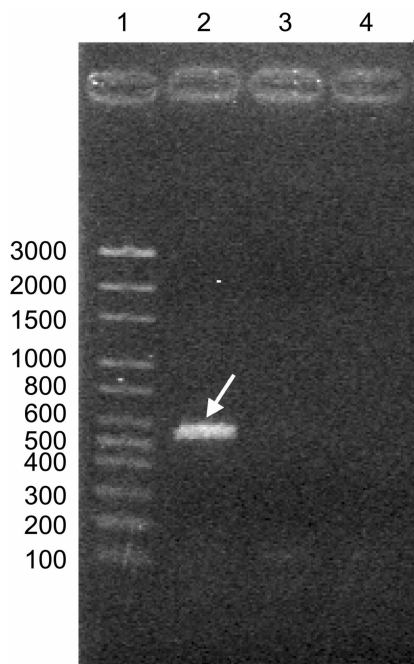
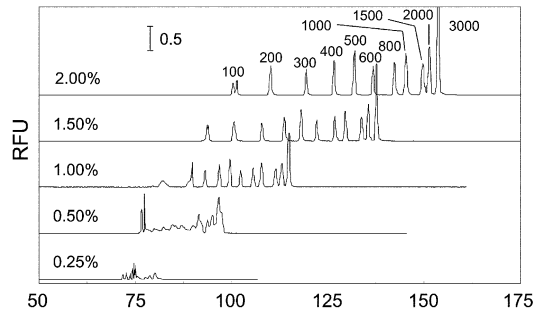


Fig. 2. Slab gel electrophoresis of the 594-bp DNA PCR products (stained with ethidium bromide) from the B2L gene of ORFV. Lane 1, 100-bp DNA ladder (100 µg/ml.); lane 2, PCR product from the ORFV infected goat; lane 3, PCR product from the non-infected goat; lane 4, negative control.

(A) PVP effect



(B) HEC effect

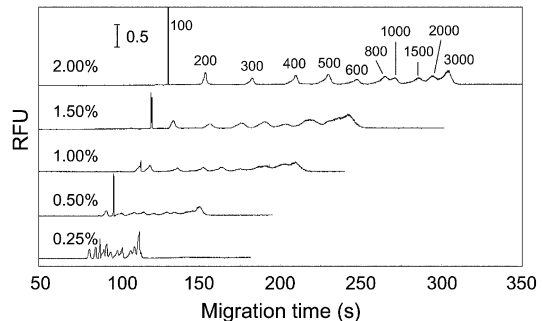


Fig. 3. MGE electropherograms of DNA fragments as (A) a function of PVP (M_n 360,000) concentration and (B) as a function of HEC (M_n 250,000) concentration. MGE conditions: microfluidic Chip, 64-mm long · 90-µm width · 20-µm depth, effective length, 36 mm; sieving gel filling for 2 mins; sample electrokinetic injection, 0.18 kV for 60 s, separation electric field, 277.78 V/cm.

염소로부터 추출한 DNA에서는 유전자 증폭이 일어나지 않아 전기영동했을 때 같은 위치에서 전혀 밴드가 나타나지 않음을 알 수 있었다(Fig. 2 lane 3).

ORFV의 B2L 유전자에서 증폭된 594-bp DNA를 ME에서 분리하기 위한 최적의 MGE 조건을 구하기 위해 먼저 다양한 충전젤로 PVP와 HEC의 최적 조성을 조사하였다. 일반적으로 PVP는 낮은 점도와 빠르고 안정한 전기삼투적 흐름(EOF)의 제거, 충전젤 제조의 용이성 등으로 CE에서 많이 사용되고 있는 대표적인 충전젤 폴리머이다.³⁰ 본 실험에서는 PVP의 농도가 증가됨에 따라 100-bp DNA ladder의 모든 DNA 단편들의 분리도는 증가하나 분리시간도 증가하였다. PVP의 농도를 1% 이상으로 증가시키면 모든 DNA 단편들의 분리가 시작된다. 하지만 모든 단편들을 바탕선까지 완전분리를 시도하기 위해 1.5% 이상으로 PVP의 농도를 증

가시키면 상대적으로 짧은 길이의 DNA 단편인 100-bp DNA의 피크가 3개로 갈라져 정량의 어려움이 있었다 (Fig. 3A). 반면 HEC만을 충전젤로 사용하면 길이가 짧은 DNA의 분리가 상대적으로 잘 되었고 길이가 짧은 DNA의 피크가 갈라지지 않아 정량이 가능하였다 (Fig. 3B). 하지만 HEC만을 충전젤로 사용하면 PVP보다도 EOF를 제거시키는 효율이 떨어져 각각의 DNA 단편들의 이동시간에 대한 재현성이 감소하는 경향을 보여 주었고, 분리도도 상대적으로 좋지 않았다. 따라서 두 폴리머의 혼합물을 충전젤로 사용하여 DNA 단편들의 분리도와 재현성, 분리시간에 미치는 영향을 조사하였다. 먼저 PVP를 1%로 고정 시켜놓고, HEC의 농도를 0.25%, 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%로 변화시켜 100-bp DNA ladder의 DNA 길이 별 이동시간 및 피크의 분리도에

미치는 영향을 조사하였다. HEC 농도가 높아질수록 분리도는 좋아지나, 분리시간이 증가되고 DNA 피크의 폭이 넓어지며 (Fig. 4A), 각각의 DNA 단편들의 이동시간 또한 증가함을 알 수 있었다 (Fig. 4B). 마찬가지로 HEC의 농도를 1%로 고정하고 PVP의 농도를 변화시키면서 PVP 농도의 효과를 조사하였다 (Fig. 5). PVP의 농도가 증가함에 따라 마찬가지로 DNA 단편들의 분리도는 증가하나, 분리시간 및 피크 폭이 함께 증가하였다. 따라서 PVP와 HEC의 비교에서 100-bp DNA ladder의 각각의 DNA 단편들의 이동시간에 대해 영향은 PVP보다 HEC가 보다 크게 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 또한 분리도와 이동시간을 고려할 때 1% HEC와 1% PVP를 함께 사용하는 것이 PVP나 HEC 개개의 농도를 증가시키는 것보다 DNA 단편들에 대해 높은 분리도와 짧은 이동도를 나타내었다.

주어진 충전젤의 농도에서 전압을 0.25-2.0 kV로 변화시키면서 전기장의 영향을 조사하였다. 즉 전기장을

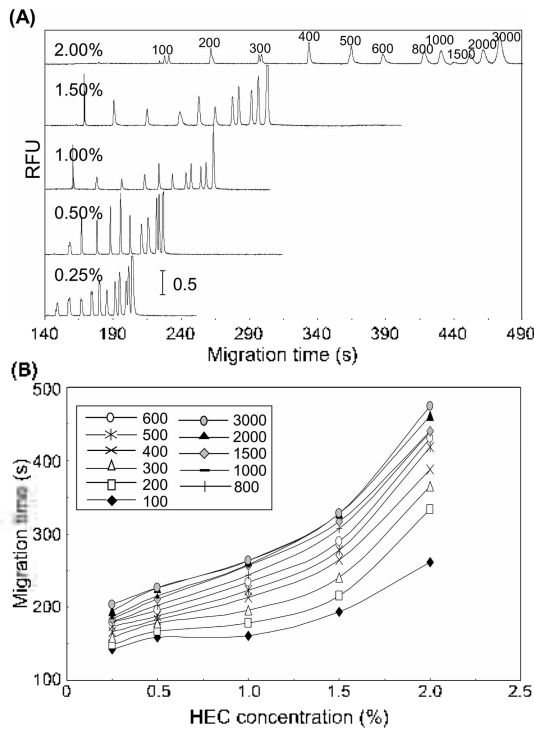


Fig. 4. Representative MGE electropherograms (A) and migration times (B) of DNA fragments as a function of the HEC concentration at 1% PVP. MGE conditions: microfluidic chip, 64-mm long \times 90- μ m width \times 20- μ m depth, effective length, 36 mm; sample electrokinetic injection, 0.18 kV for 60 s, separation electric field, 277.78 V/cm; sieving matrix gel, 1.0% PVP (M_w 360,000) and various HEC (M_w 250,000) concentrations such as 0.25%, 0.50%, 1.00%, 1.50% and 2.00%. RFU: Relative fluorescence unit.

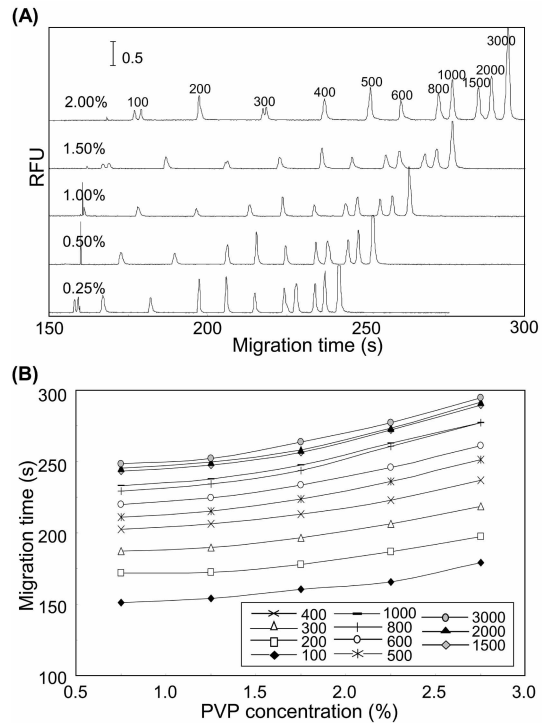


Fig. 5. Representative MGE electropherograms (A) and migration times (B) of DNA fragments as a function of the PVP concentration effect at 1% HEC. MGE conditions: sieving matrix gel, 1.0% HEC (M_w 250,000) and various PVP (M_w 360,000) concentrations, such as 0.25%, 0.50%, 1.00%, 1.50%, and 2.00%. Other MGE conditions as in Fig. 4.

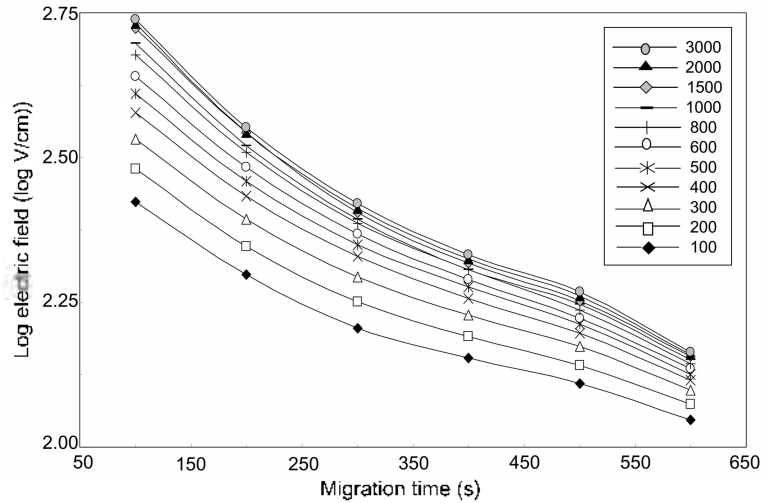


Fig. 6. Relationship between the applied electric field and the migration time of DNA fragments. MGE conditions: sieving matrix gcl, 1.0% PVP (M_n 360,000) and 1.0% HEC (M_n 250,000) for 1 min 30 s; sample electrokinetic injection, 0.18 kV for 60 s. Other MGE conditions as in Fig. 3.

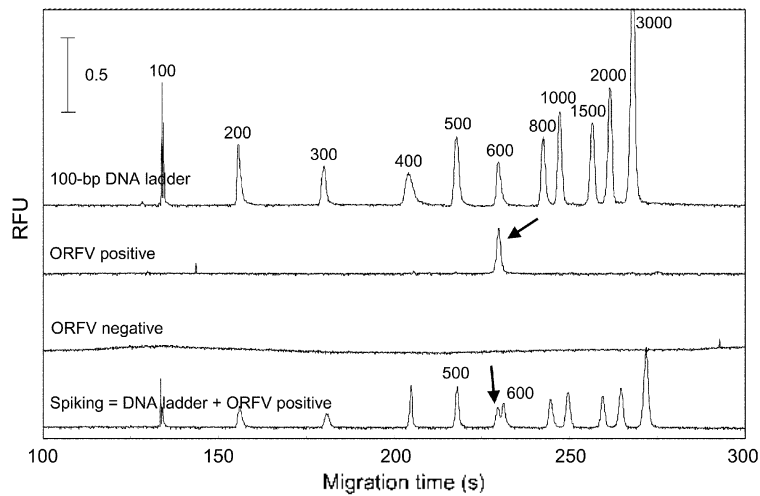


Fig. 7. MGE B2L gene analysis of an 594-bp ORFV fragment. A: 100-bp DNA ladder (0.05 μ g/mL). B: PCR product from the ORFV of infected goat. C: Negative control. D: 100-bp DNA ladder plus the PCR product of the ORFV of the infected goat. MGE conditions are shown in Fig. 5. *Arrow indicates the amplified 594-bp DNA.

138.89 V/cm, 208.33 V/cm, 277.78 V/cm, 347.22 V/cm, 416.67 V/cm 및 555.56 V/cm로 변화시키면서, 각각의 전기장에 대한 길이 별 DNA 단편들의 이동시간을 도 시하였을 때, 전기장의 로그함수 크기에 DNA 단편들 의 이동시간이 반비례함을 보여 주었다(Fig. 6).

본 방법의 질병진단 응용을 위해, ORFV의 양침과 음 성을 나타내는 염소의 시료에 대해 최적의 조건에서

PCR을 한 뒤, PCR 산출물을 주어진 MGE법에 의한 분 리의 결과를 Fig. 7에 수록하였다. PCR 산출물은 회석 하거나 다른 전처리 과정 없이 바로 ME 기기에 주입 을 하였다. 그림에서 보여 주듯이 PCR 혼합물에 포함 된 반응하지 않은 합성개시물질은 예상되는 594-bp ORFV PCR 산출물의 검출 및 분석에는 영향을 주지 않았다. 1.0% PVP와 1.0% HEC의 혼합 충전젤과

277.78 V/cm의 전기장에서 한국 재래산양에 감염된 염소의 ORFV의 B2L 유전자 단편의 증폭된 594-bp DNA는 약 4분 안에 완전히 분리가 되었다. 같은 MGE조건에서 100-bp DNA ladder의 500-bp와 600-bp DNA크기를 갖는 DNA 단편들 사이에 증폭된 ORFV의 594-bp DNA의 이동시간의 비교로 정성분석을 하였다. 또한 DNA ladder와 증폭된 594-bp DNA의 소량첨가를 한 결과의 비교를 통해 594-bp DNA의 피크를 재확인할 수 있었다. 반면 시료 중 음성의 ORFV B2L 유전자에서는 아무 피크도 검출할 수 없었다. 또한 687.96 µg/mL의 농도를 알고 있는 표준 594-bp DNA를 가지고 DNA 농도에 따른 피크면적을 도시하여 검정곡선을 작성하였다. 검정곡선의 추세선은 0.0469x+0.2313 (r=0.9976)의 직선의 방정식을 나타내었다. 검정곡선을 이용하여 ORFV에 감염된 4개의 자기 다른 시료를 임의적으로 선택하여 각 시료에 대해 n=3의 실험을 하여 594-bp DNA의 함량을 계산해 본 결과, 4.510 7±0.161 0 ng/µL, 17.048 7±0.989 4 ng/µL, 22.743 4±0.231 4 ng/µL, 29.226 6±0.173 8 ng/µL의 값을 나타내었다.

결 론

마이크로칩 전기영동에서 PVP와 HEC 개개의 증진젤을 단독으로 사용하는 것 보다 1.0% PVP와 1.0% HEC의 혼합물같이 증진젤을 혼합하여 사용할 때, 길이가 다른 모든 DNA 단편의 혼합물에서 전반적으로 향상된 분리도와 이동시간의 재현성을 보여주었다. PCR-MGE 방법은 전통적인 슬랩젤 전기영동법에 비해 적은 양의(수 백 µL) 시료로도 약 20배 이상의 짧은 분석시간과 높은 분해능을 보여주었다. 또한 본 방법은 PCR을 하여 증폭된 미지의 DNA 시료의 정성분석뿐만 아니라 기지의 표준 DNA를 사용하여 작성한 검정곡선을 이용하여 증폭된 ORFV의 유전자 단편의 정량분석도 가능하였다. 본 PCR-MGE법은 수 분 안에 동물의 ORFV 질병을 진단할 수 있는 새로운 분석방법이 될 수 있을 것으로 사료된다.

저자들은 전북대학교 공동실험실습관 및 마이크로칩을 제공하여 준 Digital Bio Technology Co.에 감사료를 드린다. “이 논문은 2003년도 학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2003-002-C00189).”

인 용 문 헌

1. Anthony, J. R.; Andrew, A. M. *Virology* **1995**, *208*, 812.
2. 박진호; 김국중; 최욱; 김은하; 한재철; 어성국; 이준화; 조매림; 송희종; 채준석. *J. Vet. Clin.* **2004**, *21*, 102.
3. 최원필; 송희종; 김순재, *수의전염병학*, 경복대학교 출판, 한국, **1994**, p. 146.
4. Inoshima, Y.; Morooka, A.; Sentsui, H. *J. Virol. Methods* **2000**, *84*, 201.
5. Haig, D. M.; McInnes, C. *Virus Res.* **2002**, *88*, 3.
6. Inoshima, Y.; Murakami, K.; Wu, D.; Sentsui, H. *Microbiol. Immunol.* **2002**, *46*, 583.
7. Ogawa, S.; Oku, A.; Sawano, A.; Yamaguchi, S.; Yazaki, Y.; Shibuya, M. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 31273.
8. Inoshima, Y.; Shimizu, S.; Minamoto, N.; Hirai, K.; Sentsui, H. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **1999**, *6*, 388.
9. Haig, D.M.; McInnes, C.J.; Thomson, J.; Wood, A.; Bunyan, K.; Mercer, A. *Immunol.* **1998**, *93*, 335.
10. Hermann, G. S.; Elba, R. S. L.; Carlos, M.; Armando, S.; Selma, M.; Tatiana, R.; Tania, M. P. S.; Maria, C. B.; Ortrud, M. B. *J. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* **2000**, *95*, 625.
11. 류영수; 장영배; 장정호; 문운경; 최상호; 박종원. *J. Korean Veterinary Research* **1998**, *38*, 353.
12. Gaye, U.; Sibel, G.; Melek, U. *Turk. J. Med. Sci.* **2002**, *32*, 173.
13. Torfason, E. G.; Guonadottir, G. *J. Clinical Virology* **2002**, *24*, 79.
14. Nettleton, P.F.; Brebner, J.; Dow, I.; Gilray, J.A.; Bell, G.D.; Reid, H.W. *Vet Rec.* **1996**, *138*, 184.
15. Gelderblom, H.R. *J. Bioforum international* **2001**, *2*, 2.
16. Sentsui, H.; Murakami, K.; Inoshima, Y.; Shibahara, T.; Yokomizo, Y. *Vet. Microbiol.* **1999**, *70*, 143.
17. 김우호. *Kor. Virol.* **1977**, *7*, 41.
18. Guo, J.; Rasmussen, J.; Wunschmann, A.; de la Comcha-Bermejillo A. *Vet. Microbiol.* **2004**, *99*, 81.
19. Becher, P.; Komig, M.; Muller, G.; Siebert, U.; Thiel, H.-J. *Arch Virol.* **2002**, *147*, 1133.
20. 전무형; 조성환; 장경수; 조용성; 안동준; 안수환. *J. Kor. Soc. Virol.* **1995**, *25*, 182.
21. Manz, A.; Graber, N.; Widmer, H. M. *Actuators B* **1992**, *1*, 244.
22. Harrison, D. J.; Manz, A.; Ran, Z. H.; Ludi, H. M. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1926.
23. Zhan, L. g.; Dang, F.; Baba, Y. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *30*, 1645.
24. Woolley, A.T.; Mathies, R. A. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3676.
25. Schmalzing, D.; Adourian, A.; Koutry, L.; Ziaugra, L.; Matsudaria, P.; Ehrlich, D. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2303.
26. Backhouse, C.; Caamano, M.; Oaks, F.; Nordman, E.; Carillo, A.; Johnson, B.; Bay, S. *Electrophoresis* **2000**,

- 21, 150.
27. Jang, S.; Cho, K.; Chae, J.-S.; Kang, S. H. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2004**, *25*, 757.
28. Kang, S. H.; Kim, D. *submitted J. Chromatogr. A* **2004**.
29. Chen, S.-H. *Pharma. Genomics* **2003**, 56.
30. Gao, Q.; Yeung, E. S. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 1382.
31. Barron, A. E.; Sunada, W. M.; Blanch, H. W. *Electrophoresis* **1996**, *17*, 744.
32. Menchen, S.; Johnson, B. F.; Madabhushi, R.; Winnik, M. *Proc. SPIE* **1996**, 2680, 294.
33. Figeys, D.; Dovichi, N. J. *J. Chromatogr. A* **1993**, *645*, 311.
34. Nishikawa, T.; Kambara, H. *Electrophoresis* **1994**, *15*, 215.
35. Luckey, J. A.; Smith, L. M. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 2841.
36. Lssaq, H. J.; Chan, K. C.; Muschik, G. M. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 1153.
37. Kan, C. W.; Barron, A. E. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 55.
38. Kang, D.; Chung, D. S.; Kang, S. H.; Kim, Y. *Microchem. J.* **2004**, in press.
-