

## 조류인플루엔자 H5N1 바이러스 유전자의 신속 검출을 위한 초고속 다중 실시간 PCR법의 개발

김을환<sup>1</sup> · 이동우<sup>2</sup> · 한상훈<sup>1</sup> · 임윤규<sup>3</sup> · 윤병수<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>경기대학교 생물학과, <sup>2</sup>경기대학교 생명공학과, <sup>3</sup>제주대학교 수의학과

(제재승인: 2007년 11월 27일)

## Development of Ultra-rapid Multiplex Real-time PCR for the Detection of Genes from Avian Influenza Virus subtype H5N1

Eul-Hwan Kim<sup>1</sup>, Dong-Woo Lee<sup>2</sup>, Sang-Hoon Han<sup>1</sup>, Yoon-Kyu Lim<sup>3</sup>, Byoung-Su Yoon<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea

<sup>2</sup>Department of Biological engineering, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea

<sup>3</sup>Department of Veterinary Medicine, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

(Accepted: November 27, 2007)

**Abstract :** Cause of high lethality and dissemination to human being, new development of rapid method for the detection of highly pathogenic Avian Influenza Virus (AIV) is still necessary. For the detection of AIV subtype H5N1, typical pathogenic AIV, new method to confirm sub-typing of this virus is also needed. For the purpose of ultra-rapid detection and sub-typing of hemagglutinin and neuraminidase of AIV, this study was planned. As the results we could demonstrate an ultra-rapid multiplex real-time PCR (URMRT-PCR) for the detection of AIV. In this study, the URMRT-PCR were optimized with synthesized AIV H5- and AIV N1-specific DNA templates and GenSpector TMC, which is a semiconductor process technology based real-time PCR system with high frequencies of temperature monitoring. Under eight minutes, the amplifications of two AIV subtype-specific PCR products were successfully and independently detected by 30 cycled ultra-rapid PCR, including melting point analysis, from  $1 \times 10^3$  copies of mixed template DNA. The URMRT-PCR for the detection of AIV H5N1 developed in this study could be expected to apply not only detections of different AIVs, but also various pathogens. It was also discussed that this kind of the fastest PCR based detection method could be improved by advance of related technology in near future.

**Key words :** AIV, detection, H5N1, real-time PCR, ultra-rapid PCR

### 서 론

조류 인플루엔자 A 바이러스는 orthomyxoviridae에 속하며 표면 단백질인 16종의 hemagglutinin(HA)와 9종의 neuraminidase(NA)의 조합에 따라 항원성이 매우 다양하게 나타난다 [14, 16]. HA는 수용체에 결합하는 기능과 세포막에 융합하는 기능을 가지고 있으며, NA는 virus를 세포 밖으로 방출할 수 있는 기능을 가지고 있다 [9]. 16종의 HA중 H5와 H7은 가금류에서 높은 병원성을 갖

는 것으로 알려져 있으며 [5, 26]. 특히 H5N1은 1997년 홍콩에서 처음으로 고 병원성으로 나타난 후 지속적으로 증가하는 추세이고, 최근에는 독일 및 프랑스 등 유럽등지에서도 그 출현이 보고되고 있다 [8].

이러한 고 병원성 H5N1은 가금류뿐 아니라 사람에게도 전이되어 막대한 경제적 피해 뿐 아니라 사람에 대한 신형 인플루엔자의 대유행으로 확산될 우려가 있기 때문에, 가금에서 인플루엔자의 발생시 HA 및 NA의 아형을 조기에 정확히 감별, 진단하여 대처함은 실로 중요

\*Corresponding author: Byoung-Su Yoon

Department of Biology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea

[Tel: +82-31-249-9645, Fax: +82-31-243-1707, E-mail: bsyoon@kyonggi.ac.kr]

한 사항일 것이다 [15, 19].

Avian influenza A virus(AIV)의 진단법에는 조직 배양을 기반으로 한 진단법이 가장 높은 민감도와 특이도를 가지고 있지만 여기에는 많은 시간과 인력이 필요하다 [21, 25]. 또한 효소면역측정법(ELISA)는 빠른 진단에 있어서 효과적이나 민감도가 상대적으로 낮은 것으로 지적되고 있다 [18]. 따라서 AIV의 대유행을 조기에 차단하기 위하여, 빠르고 민감도가 높은 AIV 진단방법의 개발이 계속 요구되고 있었으며, 이중 역전사 PCR법(Reverse Transcription PCR; RT-PCR)은 특히 민감도의 면에서 바이러스의 세포배양법과 효소면역측정법에 비해 더 우수한 것으로 알려졌다 [25].

이러한 RT-PCR법을 이용하여 다양한 조류인플루엔자 바이러스의 진단방법이 소개되었으며 [4, 13, 24, 25, 26], 또한 목표 유전자의 PCR산물의 합성량을 실시간으로 측정할 수 있는 실시간 PCR법(real-time PCR)이 개발된 이래 [1, 2, 6], RNA의 정량적 분석과 정밀진단에 사용될 수 있는 실시간 역전사 PCR법(real-time reverse transcription PCR)을 이용한 AIV 진단방법도 보고되었다 [4, 22].

또한 일반적 실시간 PCR법에 초고속의 개념을 적용하여, 초고속 실시간 PCR(Ultra Rapid Real-Time PCR) 진단법도 보고되었으며 [10, 12], 이는 일반 PCR-tube가 아닌 micro-scale chip을 사용하는 신 개념의 real-time PCR 법으로, 진단에 필요한 30회전의 PCR과 융점분석(melting temperature analysis)을 단 10분대에 끝마치는 놀라운 속성을 보여 주었다. AIV의 PCR 진단법에서도 H5형을 목표 유전자로 하여 초고속 실시간 PCR법이 적용된 바 있었으나 [10], PCR 진단에 소요된 최소 시간이 12분 수준이었기에 더욱 진단 시간을 단축시킬 필요가 있었고, 특히 N1의 아형에 대하여 감별이 불가능하다는 한계가 있었다.

따라서, 본 연구는 조류인플루엔자 H5N1의 진단에서, H5 아형과 N1 아형을 동시에 판별할 수 있는 다중 PCR(Multiplex PCR)로써, 또한 융점분석을 포함한 PCR 진단에 소요되는 시간을 10분 이내로 단축한 초고속 다중 실시간 PCR(Ultra-rapid Multiplex Real-time PCR)법을 개발하고자 하였으며, 이를 위하여 유전자 인공 합성

법으로 NAI 유전자를 새로이 합성하고, 초고속 PCR에 필요한 제반 실험조건을 개선하고 최적화하였기에, 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### AIV H5N1 특이 유전자의 선별 및 설계

본 연구에서 AIV H5N1아형의 특이적 유전자 주형 중 neuraminidase(N) 특이적 유전자는 유전자 인공 합성법을 이용하여 합성하였으며, H5유전자의 주형은 기보고한 논문의 것을 사용하였다 [10]. N1 유전자는 GenBank database(National Center of Biotechnology Information, NCBI)에 보고된 N1 유전자 77종의 염기서열들을 Clustal X(ver. 1.81, <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/clustalX>)를 이용한 정렬분석 및 부분비교분석 수행 후, 여기서 도출된 유전자 정보에서 가장 보존정도가 높은 염기서열을 바탕으로 인공 염기서열을 설계하였다. 설계된 염기서열은 489 bp 크기의 DNA로써, 이는 avian influenza A virus subtype H5N1의 NA 유전자(GenBank AY651433, 226 nt-714 nt)와 일치되는 것이었다. 유전자 인공합성을 위하여 16개의 long-nucleotide를 새로이 설계하였으며, 이를 주형으로 하는 진단용 primer쌍을 Primer3(ver. 0.2, primer design software)을 사용하여 설계, 제작하였다(Table 1). 본 실험에서 설계된 long-nucleotide 및 oligonucleotide들은 전문 회사에 의뢰하여 제작하게 하였다(Bionics, Korea).

### 인공 유전자 합성 및 염기서열 분석

AIV H5N1의 특이적 NA 유전자(489 bp DNA)를 합성하기 위하여, 설계된 총 16개의 long-nucleotide가 사용되었으며(염기서열 미제시), thermocycler(PTC-200, MJ Reaserch, USA)을 이용하여 fragment-fragment extension 법(templateless PCR)으로 제작하였다. 이를 약술하면, 20 μl의 총량의 합성반응은 각 1 μM의 long-nucleotide와 각 1.25 mM dNTP(BioBasic, Canada), 0.5 unit *Ex taq* DNA polymerase(Takara, Japan). 2 μl의 10 × reaction buffer(25 mM MgCl<sub>2</sub>)를 사용하였으며, 반응조건은 94°C에서 3분간 pre-denaturation 후, denaturation 94°C 12초,

**Table 1.** Oligonucleotide sequence of AIV detection primers

Name	Sequence (5' → 3')	mer	GC%	Product (bp)
HAQ-S	CAGATTAGTCCTTGCAGCTGG	22	63.24	
HAQ-AS	TGCCATCCTCCCTCTATAAAACC	23	62.58	108
NAQ-S	CTGAATGACAAGCACTCCAACG	22	63.06	
NAQ-AS	GCTGACCAAGCAACAGACTCAA	22	62.84	125

annealing 61°C 12초, extension 72°C 12초를 30회전 반복하여 수행하였으며, 72°C에서 5분간 post-extension을 하였다. 각 단계별로 합성된 DNA는 2.5% agarose gel에 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하였으며 UV transilluminator상에서 각 생성물의 크기를 확인하고, 이를 MEGA-spin agarose gel elution kit(Intron, Korea)를 제조사의 지시대로 사용하여 DNA를 회수한 후, 이를 다음 유전자 합성단계에 기질로 사용하였다. 이런 과정을 8단계 반복하여 최종 합성된 dsDNA는 pBX vector에 cloning한 후 [7], 염기서열을 전문 회사에 의뢰, 분석하였으며(Solgent, Korea), 합성된 DNA 염기서열이 설계된 염기서열과 동일함을 확인하고 pNc14라 명명하였다.

#### 초고속 실시간 PCR의 실험조건 최적화

초고속 실시간 PCR에 사용된 기기는 GenSpector TMC-1000(Samsung, Korea)이며, 이는 실리콘과 백금으로 구성되어있는 micro heater plate를 사용하며, PCR반응 용기도 일반 PCR-tube가 아닌 6 μl의 반응용액을 탑재할 수 있는 micro-scale chip을 사용하여 더욱 빠른 온도의 변화가 가능한 기기이다 [3]. 이 기기를 사용하여 AIV의 H5와 N1을 최단시간 내에 동시에 진단하기 위한 각 PCR 단계별 실험조건의 최적화를 추구하였다.

Real-time PCR에서 PCR cycle이 증가됨에 따라 생성된 PCR product의 양이 증가하며. 보통 10 cycles 수준에서 형광측정 오차값(base lane)의 10배에 달하는 형광 강도를 threshold level이라 하고, 이 수준에 도달되는 cycle 횟수를 threshold cycles( $C_T$  value)라 인정하고 있으며 [6, 7], 본 실험에서도  $C_T$ 는 최소의 역가와 증폭 곡선의 교차점을  $C_T$ 로 하는 crossing point법을 사용하여 측정하였다.

PCR에서 denaturation, annealing, extension의 각 단계별로 최적온도를 측정하였으며, 이는 또한 시간을 극단적으로 줄이며, 극단적 시간 조건에서 온도와 시간과의 상관관계를 조사하였다. 최종적으로 denaturation 1초, annealing 1초, extension 3초까지 실험을 수행하였으며, 별도의 온도구배 PCR을 통하여 초고속 실시간 PCR의 최적 온도조건을 확립하고 본 연구의 표준 초고속 PCR 조건으로 하였다.

#### Sensitivity test of detection primer set

최단시간 내에 AIV를 진단하기 위해 제작된 진단용 primer의 민감도(sensitivity)를 측정하기 위해 특이 유전자  $1 \times 10^7$  copies부터 1/10씩 단계회식 하여  $1 \times 10^3$  copies 까지의 각 주형 유전자를 사용하였다.

PCR 조성 및 시간은 표준조건과 같았으며 PCR은 총 30 cycle을 수행하였고, 용융온도분석을 77°C~87°C까지

수행하였다.

#### Multiplex PCR detection

H5와 N1 유전자를 동시에 진단하기 위하여 2 × Micro PCR Mastermix with SYBR Green I(GenetBio, Korea) 3 μl, 10 μM의 HAQ-S primer와 HAQ-AS, NAQ-S, NAQ-AS primer를 각 0.5 μl 씩, 각 농도의 주형 DNA인 H5와 N1의 양은 각 0.5 μl로 하였고, 본 연구에서 제시한 표준조건으로 초고속 다중 실시간PCR(UR multiplex real-time PCR)을 수행하였다.

## 결 과

#### Neuraminidase 유전자의 합성

AIV H5N1 아형의 N1 유전자는 77종의 N1 sequence를 비교, 분석한 결과 최소 1151 bp, 최대 1458 bp로 평균 1400 bp의 크기이며, 본 연구에서는 N1 유전자 중 항원결정기로서 역할을 할 수 있는 친수성 부분을 hydrophilicity analysis를 통하여 항원 결정기가 우수한 것으로 판단된 부분과, 77종의 AIV N1유전자 상호간에 상동성이 높은 부분을 고려하여 489 bp의 NA 유전자를 인공 합성법을 통하여 제작하였다.

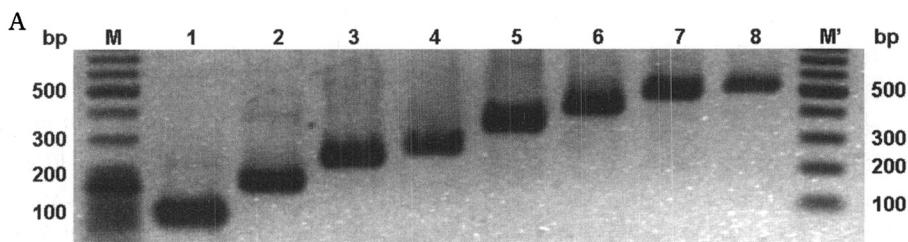
NA 유전자는 총 8차에 걸쳐 합성하였으며 각 단계별 합성된 유전자는 2.5% agarose gel을 이용한 전기영동에서 분자량이 일치함을 확인할 수 있었다. 최종 합성된 NA 유전자는 pBX vector에 cloning하였고, 염기서열분석을 수행하여 설계된 목적단편의 유전자 염기서열과 일치함을 재차 확인하였으며, pNc14라 명명하였다. 분리된 DNA는 spectrophotometer로 정량 하고, -70°C에 보관하며 차후 연구에 사용하였다(Fig. 1).

AIV HA5에 대한 검색 PCR법 연구 [10]에서 사용된 pHc16의 H5 목표 유전자 및 H5 특이 검색용 PCR primer들은 본 연구에서 그대로 사용하였으며, 같은 방법으로 보관하고 사용하였다(Fig. 2).

#### 초고속 실시간 PCR의 실험조건 최적화

초고속 PCR에서 각 단계별 시간은 최종적으로 denaturation 1초, annealing 1초, extension 3초로 고정할 수 있었으며, 별도의 온도구배 PCR을 통하여 초고속 실시간 PCR의 최적 온도조건을 확립하였다.

본 연구를 통하여 도출된 초고속 PCR의 최적 조건은 본 연구의 결과에서 제시된 모든 초고속 PCR에 적용되었으며, 이를 표준조건이라 표현하였다. 우선 이 표준조건하의 반응용액은 2 × Micro PCR Mastermix with SYBR Green I(GenetBio, Korea) 3 μl, 5 μM의 sense primer와 anti-sense primer 각 1 μl, 각 농도의 주형 DNA 1 μl로



B

5'-ATAAGGATCGGTTCCAAGGGGGATGTGTTGTTATTAGAGAGCCGTTCATCTCATGCTCCACTTGAATGCAGAACATTCT  
TTTGACTCAGGAGGCCCTGCTGAATGACAAGCACTCCAACCGGACTGTCAAAGACAGAAGCCCTCACAGAACATTGATGAG  
TTGTCCCTGTTGGGCTGGGCTCCCTCCCATATAACTCAAGGTTGAGTCAGTGTGCTTGGTCAAGCAACTGCTGCCATGATGGC  
ACCAGTTGGGTGACAATTGGAATTCTGGCCAGACAATGGGCTGTGGCTGTATTGAAATACAATGGCATAATAACAGACACTA  
TCAAGAGTTGGAGGAACAACATACTGAGAACTCAAGAGTCTGAATGTGTCATGTGAAATGGCTCTGCTTACTGTAATGACTGA  
TGGACCAAGTAATGGGCAGGCATCATATAAGATCTTCAAATGGAAAAGGGAAAGTGGTTAAATCAGTCGAA-3'

**Fig. 1.** Synthesis of NA1 specific DNA by templateless gene synthesis.

Panel A. 489 bp-long neuraminidase 1 (NA1) specific DNA. It was synthesized through 8-step serial long-nucleotide extension. This electrophoretic image shows the result of each extension step. That originated AY651433 lane 1 to 8 were 78 bp, 157 bp, 228 bp, 273 bp, 343 bp, 405 bp, 468 bp and 489 bp of NA1 DNA, respectively. Lane M and M' represent two different DNA size markers. Panel B. Sequence of AIV NA1 specific 489 bp-long, DNA using this study. The bold letters represent two position of primers pairs using AIV NA1 specific detection, named NAQ-S and NAQ-AS, 5' → 3' respectively.

5'-AAGAAAGGGACTCAGCAATTATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACGTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCCAATGGGGCGA  
TAAACTCTAGTATGCCATTCCACAAACATACACCCCTCTCACCATCGGGAAATGCCCAAATATGTGAAATCAAACAGATTAG  
TCCTTGCAGTGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGAGGACTATTGGAGCTATAGCAGGTTTAT  
AGAGGGAGGATGGCAGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGAGTGGATACGCTGCAG  
ACAAAGAATCCACTCAAAGGCAATAGATGGAGTTACCAATAAGGTCAACTCGATCATT-3'

**Fig. 2.** Sequences of AIV hemagglutinin 5 sub-type specific DNA (387 bp, partial sequence). The bold letters represent two position of AIV HA5 detection primers pairs named HA-HF and HA-HR, 5' → 3' respectively [9].

결정되었으며, Micro Chip Master-mix의 구성 성분은 dNTPs(2.5 mM each), *Taq* DNA polymerase(2.5 U/μl), 40 mM의 KCl, pH9.0의 Tris-HCl(20 mM)로 결정되었다.

또한 초고속 PCR의 표준조건의 각 단계별 적용 온도는 95°C에서 pre-denaturation 으로 15초간 반응한 후 denaturation 89°C 1초, annealing 64°C 1초, extension 68°C 3초를 30 cycle 반복하는 것으로 결정되었다. 한편 반응 생성물의 형광측정은 PCR 단계 중 extension이 시작된 후 1초 후에 490 nm의 파장을 주어 발생된 520 nm의 형광파장을 1초간 측정하게 하는 것이 최적임을 보여 주었으며. 용융온도분석은 77°C부터 87°C까지의 온도 범위에서 초당 0.2°C의 속도로 온도를 증가시키며 수행하는 것이 최소의 시간으로 최대의 검색을 수행할 수 있음을 보여 주었다(자료 미제시).

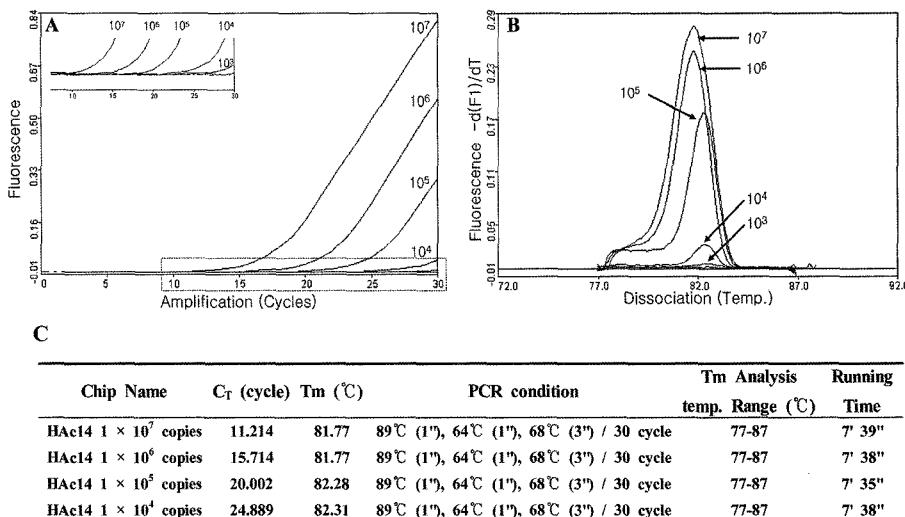
#### HA 및 NA 유전자의 detection limit 측정

최단시간 내에 AIV subtype H5N1을 진단하기 위하

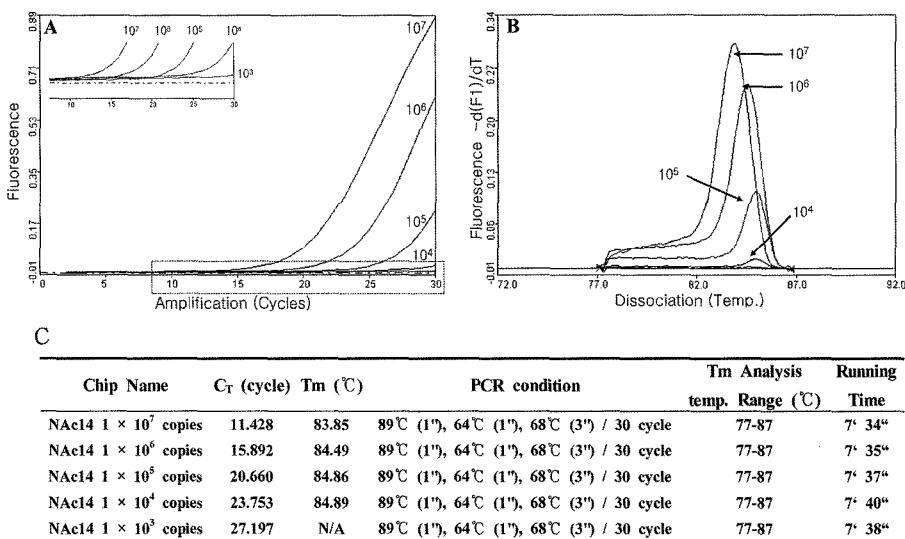
여 최종적으로 기계적 설정이 가능한 시간(denaturation 1sec, annealing 1sec, extension 3sec)까지에서 HA 및 NA 각각의 detection limit을 측정하였다. 이를 실험을 앞서 제시한 표준 조건의 초고속 PCR법을 사용하여 얻어진 결과이며 본 연구를 통한 최선의 결과를 보여 주었다.

HA의 특이 유전자 검출에서 초고속 PCR은 본 연구에서 제시한 표준조건의 실험에서 검출 한계(detection limit)가  $1 \times 10^3$  copies이었고, 용융온도(melting temperature)는 평균 82.12°C이었으며, 이의 표준편차는 0.32°C이다. 또한  $C_t$ 에 의한 회귀식에서 회귀계수( $R^2$ )는 0.9993으로 계산되었다. 이 조건에 의한 AIV HA5형의 진단 시간은 용융온도분석단계를 포함하여 7분39초 내에 가능하였다(Fig. 3).

NA에 대한 표준조건에서 검출한계를 측정한 결과  $1 \times 10^4$  copies 로 나타났으며, melting temperature는 평균 84.52°C이었고, 이의 표준편차는 0.48로 계산되었다. 한편 각  $C_t$ 값에 의한 회귀식에서 회귀계수( $R^2$ )는 0.9922



**Fig. 3.** Ultra-rapid real-time PCR with serially diluted AIV HA5 specific DNA. Panel A. The sensitivity of UR real-time assay. Serially 10 fold diluted AIV specific DNA were used from  $1 \times 10^7$  to  $1 \times 10^3$  copies as initial template, respectively. From each initial template, AIV H5 specific amplification was quantitatively detected. The small figure is enlarged for supplement results. With initial template,  $1 \times 10^3$  copies of AIV H5 could be also detectable in 7 min 39 sec by UR real-time PCR. Regression equation of  $C_T$  and initial template was calculated as 0.9993. Panel B. Melting temperature analysis of HA specific PCR product. The detection limit for the assay is estimated up to around  $1 \times 10^3$  copies of AIV H5 specific DNA. Panel C. Detection data of UR real-time PCR for the AIV H5. Threshold cycles ( $C_T$ ) were quantitatively increased with concentrations (copies of specific DNA) of initial templates. All detections were finished under 7 min 40 sec with 30 cycled PCR and analysis of melting temperature.



**Fig. 4.** Ultra-rapid real-time PCR with serially diluted AIV N1 specific DNA. Panel A. The sensitivity of UR real-time assay. Serially 10 fold diluted AIV specific DNA were used from  $1 \times 10^7$  to  $1 \times 10^3$  copies, respectively. From each initial template, AIV N1 specific amplification was quantitatively detected except  $1 \times 10^3$  copies. The small figure is enlarged for supplement results. With initial template,  $1 \times 10^4$  copies of AIV H5 could be also detectable in 7 min 40 sec by UR real-time PCR. Regression equation of  $C_T$  and initial template was calculated as 0.9922. Panel B. Melting temperature analysis of N1 specific PCR product. The detection limit for the assay is estimated up to around  $1 \times 10^4$  copies of AIV N1 specific DNA. Panel C. Detection data of UR real-time PCR for the AIV N1. Threshold cycles ( $C_T$ ) were quantitatively increased with concentrations (copies of specific DNA) of initial templates. All detections were finished under 7 min 40 sec with 30 cycled PCR and analysis of melting temperature.

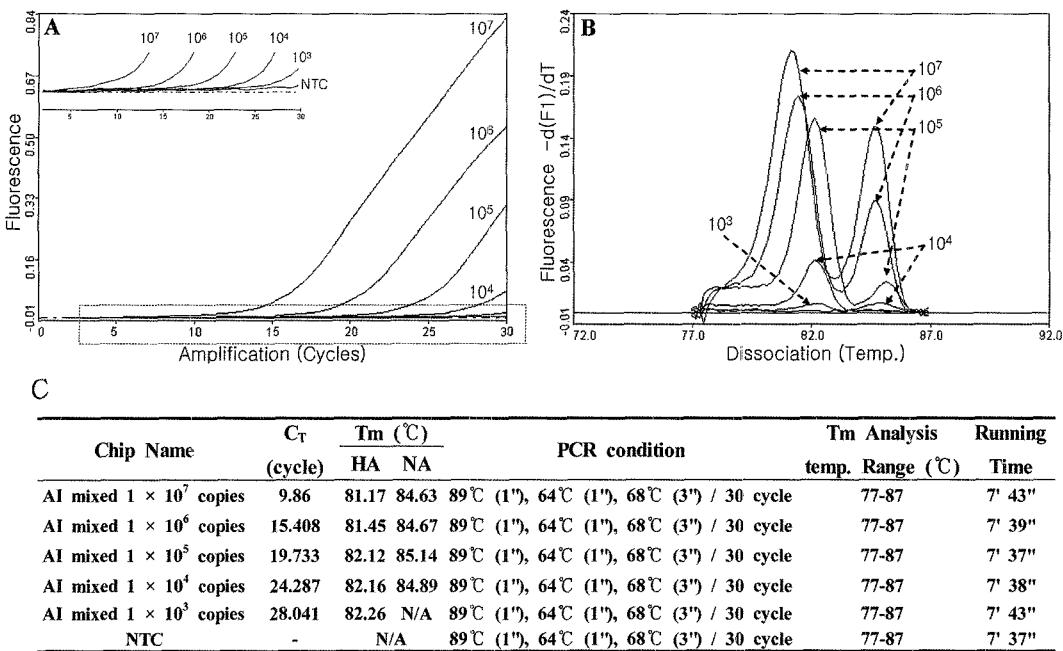


Fig. 5. Ultra-rapid multiplex real-time PCR with serially diluted AIV specific DNA.

Panel A. The sensitivity of UR Multiplex real-time assay. Serially 10 fold diluted AIV specific DNA were used from  $1 \times 10^7$  to  $1 \times 10^3$  copies of each H5 and N1 as template, respectively. From each initial template, AIV H5 and N1 specific amplifications was quantitatively detected. The small figure is enlarged for supplement results. With initial template,  $1 \times 10^3$  copies of AIV H5 and N1 could be also detectable in 7 min 43 sec by UR real-time PCR. Regression equation of  $C_T$  and initial template was calculated as 0.9956. Panel B. Melting temperature analysis of AIV H5 and N1 specific PCR products. The detection limit for the assay was estimated up to  $1 \times 10^3$ copies of AIV H5 specific DNA and  $1 \times 10^4$ copies of AIV N1 specific DNA, respectively. Panel C. Detection data of UR real-time PCR for the AIV H5 and N1. Threshold cycles ( $C_T$ ) were quantitatively increased with concentrations (copies of specific DNA) of initial templates. All detections were finished under 7 min 43 sec with 30 cycled PCR and analysis of melting temperature. NTC; non template control.

으로 계산되었으며, AIV NA1형의 진단을 위한 PCR분석에 소요된 시간은 용융온도분석단계를 포함하여 7분 40초 내에 가능하였다(Fig. 4).

#### Multiplex UR real-time PCR detection

Multiplex UR real-time PCR은 한개의 PCR chip에 template로써 H5 와 N1, 그리고 이의 검색을 위한 특이 2쌍, 즉 4개의 primer들을 넣어 고 병원성의 AIV H5N1을 진단하기 위해 수행되었다. H5와 N1을 같은 농도로  $1 \times 10^7$  copies부터  $1 \times 10^3$  copies까지 각각을 진단한 결과 detection limit는 HA가  $1 \times 10^3$  copies, NA  $1 \times 10^4$  copies로 측정되었고 template를 넣지 않은 대조군에서는 증폭되지 않았음을 확인하였다(Fig. 5A). Melting temperature는 HA가 평균  $81.83^{\circ}\text{C}$ , 표준편차 0.49였으며 NA는 평균  $84.83^{\circ}\text{C}$ , 표준편차 0.23으로 나타났으며, HA 및 NA 특이 유전자의 존재는 각기 용융온도분석에서 모두 확인 가능하였다(Fig. 5B).  $C_T$ 에 의한 회귀식에서

회귀계수( $R^2$ )는 0.9956으로 확인되었으며 소요시간은 용융온도분석단계를 포함하여 최소 7분37초, 최대 7분 43초 내에 진단이 가능하였다(Fig. 5C).

#### 고 칠

AIV subtype H5N1은 본래 병원성이 미약한 바이러스로 알려져 왔었으나 이것의 변이형인 고병원성 H5N1이 발견되어 가금류에서 100%에 가까운 치사율을 보임으로 해서 다시금 AIV에 대한 신속진단의 중요성이 대두되었다 [11].

기존의 AIV의 진단법으로 직접 바이러스의 분리 및 조직배양에 기반을 둔 배양, 그리고 바이러스 특이항원을 특이항체를 사용하여 진단하는 방법들은 나름의 높은 민감도와 특이도를 가지고 있지만, 고병원성 바이러스를 배양하는 부담과 상대적으로 많은 시간이 소요된다는 문제점이 있었다 [17]. 더욱이 AIV 중에서 고병원

성을 나타내는 HA5형과 NA1형에 대하여 충분한 특이도와 민감도를 나타내어 상용화 수준에 이른 항체는 또한 쉽게 찾을 수 없었다.

병원체의 검색을 위한 PCR진단법은 일반적으로 특이 항체를 사용하는 효소면역측정법(ELISA) 등에 비하여 높은 민감도와 신속성을 담보하고 있으며 [4], 근래 실시간 PCR은 대량의 시료를 보다 쉽게 처리할 수 있도록 자동화 되고 있고 또한 보다 민감한 형광센서의 개발 등으로 보다 정밀화 되고 있다.

본 연구는 AIV의 실시간 PCR법에서 다중 PCR(Multiplex PCR) 법을 적용하고, 용융점분석에 의하여 subtype H5N1 바이러스의 유전자 검출이 가능하도록 하는 방법을 제시하였을 뿐 아니라, 초고속 신속진단을 위하여 30회전의 PCR과 용융점분석을 7분대에 완료할 수 있음을 보여 주었다.

이러한 초고속은 우선 본 연구에 사용된 실시간 PCR 기기인 GenSpector TMC-1000(Samsung, Korea)의 빠른 온도 변화 기능(heating and cooling: 10°C/sec), 분당 1천 회의 신호전달을 통하여 정확한 순간 온도 측정 기능 [3], 그리고 micro-scale chip을 사용한 최소한의 PCR 용액에 의한 실제적 온도전달 기능 등에 담보되었으며, 최적화를 통한 세계 최고의 초고속을 보여 줄 수 있었다.

본 연구의 초고속 PCR은 우선 PCR의 각 단계별 시간 감소에 따른 thermal factor의 영향을  $C_T$ 값을 중심으로 하여 확인하였다. 우선 Denaturation 온도는 일반적으로 92-95°C의 온도를 많이 사용하고 있으나, 본 연구의 실험결과에서는 각 단계별 시간을 충분히 즉, 10초씩 주어졌을 경우, 94°C의 denaturation 온도보다 낮은 denaturation온도가 보다 빨리 PCR의 형광값을  $C_T$ 값에 도달하였으며, 89°C의 denaturation 온도에서 가장 먼저  $C_T$ 값을 보여주는 것으로 나타났다(자료 미제시). 그러나 각 단계별 시간을 최단시간, 즉 1초로 반응시켰을 경우 92-89°C의 범위에서는 온도의 영향은 거의 나타나지 않는 것으로 확인되었고, 앞의 충분한 시간이 주어졌을 경우 denaturation 온도가 낮은 것이 유리한 현상은 고온에 의한 *Taq* DNA polymerase의 조기 손상, 즉 *Taq* DNA polymerase가 고온에 노출되는 시간이 상대적으로 작은 PCR조건이 보다 유리한 결과를 보인 것을 해석되었다 [23]. 따라서 초고속 PCR에서는 각 단계별 시간을 충분히 주어진 일반 PCR에 비하여  $C_T$ 값이 상대적으로 늦게 형성되나, 30회전 이상 60회전 수준의 PCR에서 *Taq* DNA polymerase의 활성이 보다 더 잘 유지됨을 관찰할 수 있었다.

한편 Annealing 온도에 의한 영향은, 충분한 반응 시간이 주어졌을 때, 본 실험에서는 57°C부터 65°C까지의 온도 범위에서는 큰 차이를 보이지 않았으나, 각 단

계별로 최단시간, 즉 PCR 단계별 1초의 PCR을 수행하였을 경우, 64°C 이상 고온의 annealing온도에서는  $C_T$ 값이 6 cycle 이상 높아졌으며, 70°C 이상의 온도에서는 주형으로부터 PCR product가 만들어지지 않는 등 annealing 온도의 상승은 확연한 부정적 영향을 보여 주었다(자료 미제시). 시간이 충분하게 주어진 일반 PCR의 경우 일정 범위의 온도에서 PCR에 큰 영향을 주지 않는 것은 적정온도가 PCR용액 내부에 실질적으로 적용되는 시간이 충분하기 때문으로 추측되었고, 초고속 PCR의 경우와 같이 annealing 1초 수준의 시간이 주어진 경우는 PCR용액의 내부에 적정온도가 실질적으로 적용되는 시간이 충분하지 않기에 보다 annealing온도에 민감한 것으로 해석되었다. 이러한 사실은 본 연구에서 적용시킨 바와 같이 6 μl의 작은 양을 초고속 PCR에 사용하는 것, 그리고 분당 1,000회의 온도측정에 의한 정밀한 온도보정 등은 초고속 PCR에서는 매우 중요한 요소임을 보여 주었으며, 실제의 반응액에 정확한 온도가 적용되었을 경우 1초이내의 시간에서도 충분한 수준의 annealing이 가능할 수 있음을 추측하게 하였다.

또한 extension 온도에 초고속 PCR의 특징으로, 우선  $C_T$ 값의 변화를 보면, 충분한 extension시간이 주어진 일반 PCR의 경우, 62°C부터 77°C까지  $C_T$ 값에서는 큰 차이를 보이지는 아니하였고, 최종 형광값에서 초기 형광값을 뺀 것, 즉 PCR product의 생성량은 62°C의 extension 온도에서 가장 높음을 볼 수 있었다. 그러나 초고속 PCR에서는 extension 온도가 75°C였을 때 가장 낮은  $C_T$ 값을 보였으며 가장 낮은 온도인 63°C에서는 높은  $C_T$ 값을 보였으며, 또한 온도가 높아질수록 전기의 형광값, 즉 PCR 산물의 양이 작아지는 것으로 나타났다(자료 미제시). 이는 초고속 PCR에서는 annealing 단계와는 달리 extension에 일정한 시간적 제한이 있었다는 것을 의미하며, *Taq* DNA polymerase의 활성이 최소 70°C 이상에서 크게 높아지는 것으로 추측될 수 있고, 또한 상기의 annealing 온도의 조건에서 나타난 바와 같이, PCR반응액에 실제의 설정온도가 적용되는 조건, 즉 PCR 반응액의 절대양 및 온도전달이 extension 온도에서도 중요한 영향을 미치고 있음을 추론할 수 있었다. 또한 초고속 PCR에서 본 연구에서 사용된 detection primer는 진단시간 단축을 위한 2단계 PCR, 즉 denaturation, annealing and polymerization에 의한 PCR을 적용하기에는 미흡함을 보여 주었다.

본 연구에서 제시하는 초고속 실시간 PCR법에 의한 병원체 유전자의 검색방법은 검색대상이 인공합성된 AIV H5N1 유전자이기 때문에, AIV H5N1 감염시료에 대한 초고속 실시간 PCR법의 적용과 여타 다른 아형의 바이러스에 대한 교차반응에 대하여 검증되지 아니하였

지만 우선 H5와 N1 두 개의 목적단편을 7분대에 30회 전의 PCR과 융점분석을 마칠 수 있다는 점에서 PCR detection의 적용범위와 활용방법에 대한 여러 제한점을 극복할 수 있을 것으로 기대한다. 또한 초고속 PCR은 우선 보다 민감한 형광센서의 적용과 보다 빠른 온도이동 기술, PCR의 반응액에 보다 정확히 적정온도를 적용시킬 수 있는 기술적 개발, 그리고 각 PCR 온도단계별 설정시간을 1초 이하의 적용하게 하는 것 등에 의하여 보다 빠르고 민감한 초고속 PCR, 즉 5분 PCR 나아가 1분 PCR이 현실적으로 등장할 수 있을 것이다. 또한 이러한 기기적 기술개발의 맞추어 보다 빠른 *Taq* DNA polymerase의 개발도 시급히 필요함을 제안한다.

## 결 롬

고병원성 AIV는 그 높은 차사율과 인간에 대한 전파 위험성 때문에 보다 빠르게 진단할 수 있는 방법의 개발이 시급히 요구되고 있으며, 고 병원성의 대표적 아형인 H5N1에 대한 정확한 아형 판정의 방법도 역시 그 개발이 요청되고 있다.

본 연구는 AIV의 초고속진단과 표면 항원인 hemagglutinin과 neuraminidase의 정확한 아형 판정을 위하여 시도되었으며, 그 결과로써 AIV진단을 위한 초고속 다중 실시간 PCR(Ultra-rapid multiplex real-time PCR) 법을 제시하게 되었다. 본 연구에서 초고속 다중 실시간 PCR은, 인공 합성된 AIV H5-와 AIV N1- 특이 DNA 기질들과 반도체 공정기술에 근간을 둔, 높은 빈도의 온도 측정이 가능한 실시간 PCR기기인 GenSpector TMC-1000으로 최적화하였다.

모두 8분 이내에,  $1 \times 10^3$  개의 혼합 기질 DNA에서 30회전의 초고속 PCR과 융점분석에 의해 2개의 AIV 아형 특이 PCR 산물들의 증폭은 성공적으로 그리고 독립적으로 검출되었다.

본 연구를 통하여 개발된 AIV subtype H5N1의 진단을 위한 초고속 다중 실시간 PCR진단 방법은 AIV의 진단 뿐 아니라, 다양한 병원체의 PCR 진단에 널리 적용될 수 있을 것으로 기대하며, 또한 이런 종류의 초고속 PCR은 가까운 장래에, 관련 기술의 진보를 통하여 더욱 발전될 수 있음을 논의하였다.

## 감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업 중 농업생명공학 연구원 혁신협력기술개발 사업의 지원(과제번호: 20070501-080-005-001-03-00)을 받았으며, 이에 감사드리는 바입니다.

## 참고문헌

- Bustin SA.** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000, **25**, 169-193.
- Bustin SA, Mueller R.** Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin sci* 2005, **109**, 365-379.
- Cho YK, Kim J, Lee Y, Kim YA, Namkoong K, Lim H, Oh KW, Kim S, Han J, Park C, Pak YE, Ki CS, Choi JR, Myeong HK, Ko C.** Clinical evaluation of micro-scale chip-based PCR system for rapid detection of hepatitis B virus. *Biosens Bioelectron* 2006, **21**, 2161-2169.
- Ellis JS, Zambon MC.** Molecular diagnosis of influenza. *Rev Med Virol* 2002, **12**, 375-389.
- Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD.** Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. *J Virol* 2005, **79**, 2814-2822.
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM.** A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996, **6**, 995-1001
- Han SH, Lim YK, Yoon BS.** Manual of Method for Molecular Biology III. 3rd ed. pp. 82-84, Kyonggi university Press, Suwon, 2006.
- Hoffmann B, Harder T, Starick E, Depner K, Werner O, Beer M.** Rapid and highly sensitive pathotyping of avian influenza A H5N1 virus by using real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2007, **45**, 600-603.
- Horimoto T, Kawaoka Y.** Pandemic threat posed by avian influenza a viruses. *Clin Microbiol Rev* 2001, **14**, 129-149.
- Kim EH, Lee DW, Han SH, Kwon SH, Yoon BS.** Rapid detection of avian influenza subtype H5N1 using quick real-time PCR. *Kor J Microbiol* 2007, **43**, 23-30.
- Lau LT, Banks J, Aherne R, Brown IH, Dillon N, Collins RA, Chan KY, Fung YW, Xing J, Yu AC.** Nucleic acid sequence-based amplification methods to detect avian influenza virus. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **313**, 336-342.
- Lee DW, Kim EH, Yoo MS, Han SH, Yoon BS.** Ultra-rapid real-time PCR for the detection of human immunodeficiency virus (HIV). *Kor J Microbiol* 2007, **43**, 91-99.

13. Munch M, Nielsen LP, Handberg KJ, Jørgensen PH. Detection and sub typing (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA. *Arch Virol* 2001, **146**, 87-97.
14. Murphy BR, Webster RG. Orythomyxoviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds.). *Fields Virology*, 3rd ed. vol. 1. pp. 1397-1445, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996.
15. Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. *Lancet* 2003, **362**, 1733-1745.
16. Payungporn S, Chutinimitkul S, Chaisengh A, Damrongwantanapokin S, Buranathai C, Amonsin A, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Single step multiplex real-time RT-PCR for H5N1 influenza A virus detection. *J Virol Methods* 2006, **131**, 143-147.
17. Poddar SK. Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis. *J Virol Methods* 2002, **99**, 63-70.
18. Reina J, Munar M, Blanco I. Evaluation of a direct immunofluorescence assay, dot-blot enzyme immunoassay, and shell vial culture in the diagnosis of lower respiratory tract infections caused by influenza A virus. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996, **25**, 143-145.
19. Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type a influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* 2002, **40**, 3256-3260.
20. Starick E, Rimer-Oberdrfer A, Werner O. Type- and subtype-specific RT-PCR assays for avian influenza A viruses (AIV). *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2000, **47**, 295-301.
21. Steininger C, Kundt M, Aberle SW, Aberle JH, Popow-Kraupp T. Effectiveness of Reverse Transcription-PCR, Virus Isolation, and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Influenza A Virus Infection in Different Age Groups. *J Clin Microbiol* 2002, **40**, 2051-2056.
22. van Elden LJR, Nijhuis M, Schipper P, Schuurman R, van Loon AM. Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2001, **39**, 196-200.
23. Wang S, Levin RE. Thermal factors influencing detection of *Vibrio vulnificus* using real-time PCR. *J Microbiol Methods* 2007, **69**, 358-363.
24. Webster RG, Kawaoka Y. Avian influenza. *Rev Poultry Biol* 1987, **1**, 212-246.
25. Wei HL, Bai GR, Mweene AS, Zhou YC, Cong YL, Pu J, Wang S, Kida H, Liu JH. Rapid detection of avian influenza virus A and subtype H5N1 by single step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. *Virus Genes* 2006, **32**, 261-267.
26. Xie Z, Pang YS, Liu J, Deng X, Tang X, Sun J, Khan MI. A multiplex RT-PCR for detection of type A influenza virus and differentiation of avian H5, H7, and H9 hemagglutinin subtypes. *Mol Cell Probes* 2006, **20**, 245-249.
27. Yuen KY, Chan PKS, Peiris M, Tsang DN, Que TL, Shortridge KF, Cheung PT, To WK, Ho ET, Sung R, Cheng AF. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet* 1998, **351**, 467-471.