

Quick Real-time PCR을 이용한 Avian Influenza Virus Subtype H5N1의 신속검출법

김을환 · 이동우 · 한상훈 · 권순환¹ · 윤병수*

경기대학교 이과대학 생명과학과 분자생물학연구실

¹아주대학교 의과대학 만성염증질환센터

조류 인플루엔자 바이러스(AIV) H5N1 아형을 Real-time PCR법을 이용하여 가장 빠르게 진단할 수 있는 방법을 개발하였다. 검색 대상의 염기서열은 AIV H5N1 아형의 hemagglutinin 유전자 중 가장 상동성이 높은 387 bp의 부위를 선택하였고, 실험의 안전을 위하여 인공합성의 방법으로 제작하였다. Microchip을 기반으로 한 Real-time PCR법을 사용하였으며, 총 PCR 반응액의 양을 1 µl로, PCR 과정 중 각 단계, 즉 해리, 결합, 신장의 시간을 각 1초, 1초, 3초로 하여 총 실험시간을 단축하였다. 진단을 위한 실험과정에서 PCR 및 융점분석에 소요된 최단 시간은 12분 28초였으며, 민감도측정에서 최소 2.4개의 hemagglutinin 유전자를 기질로 하여 목적인 특이 189 bp의 PCR 산물을 증폭할 수 있었기에, 본 연구에서는 이런 초고속 PCR 실험방식을 Quick Real-time PCR이라 명명하였다. 이 결과들은 가금류 및 사람에게 전파된 AIV H5N1 아형의 진단에 적용될 수 있을 뿐 아니라, PCR이 사용되는 다른 신속검출법에도 널리 적용될 수 있을 것으로 기대한다.

Key words □ avian influenza, detection, hemagglutinin, H5N1, Real-time PCR

인플루엔자(influenza)는 전염성이 매우 높은 급성 호흡기 질환으로, 인플루엔자 바이러스(influenza virus)에 의해 발병된다. 인플루엔자는 매년 전 세계적으로 크고 작은 변형 바이러스에 의해 발병되며, 심한 경우 2-3주 내에 통상 인구의 10-20%가 감염될 정도로 높은 유행성을 보인다(1, 3). 인플루엔자 바이러스는 바이러스의 분류에서 *Orthomyxoviridae*과에 속하며, 유전체는 negative single strand RNA로 8개의 절편으로 분절화 되어있다. 유전자로는 polymerase를 암호화한 PB1, PB2, PA, 그리고 glycoprotein인 hemagglutinin, neuraminidase와 유전물질을 보호하는 NP와 M, 비구조단백질인 NS1과 NS2 등으로 구성되어있다(12).

한편 조류 인플루엔자 바이러스(Avian Influenza Virus, AIV)는 nucleoprotein과 matrix (M1) protein의 항원성에 의해 모두 A형으로 분류되며, 그 이하 아형의 분류는 두개의 표면 glycoprotein인 hemagglutinin (HA)과 neuraminidase (NA)의 항원성에 의해 결정된다(19, 20). 현재까지 16종류의 HA와 9종류의 NA가 인플루엔자 A형 바이러스에서 밝혀졌으며, HA와 NA의 조합에 의해 다양한 종류의 항원성을 갖게 된다(9, 14). 일반적으로 HA와 NA 아형 바이러스들은 수생 조류에서 대부분 발견되는데 반해, 3종의 HA아형(H1-H3)과 2개의 NA아형(N1 과 N2)은 사람에게도 발견이 된다(5, 10).

최근 몇 년간 AIV H5N1, H7N7, H7N3, H9N2등 다양한 아

형의 인플루엔자 A 바이러스(influenza A virus)가 사람에게 감염을 일으키는 것으로 보고되었다(17). 이중 AIV H5N1은 종래 미약한 병원성의 바이러스로 알려져 왔었으나, 1996년 닭에서 100%에 가까운 치사율을 보이는 고병원성 H5N1의 변이형이 발견되었고, 1997년, 처음으로 AIV에 의한 사람의 감염이 확인되었으며, 18명의 발병자 중 6명이 사망하였고, 이 조류독감의 전파를 막기 위해 대량의 가금류들이 도살되었다(8, 13). 이후 2001년부터 현재까지 AI는 국내를 포함, 베트남, 태국, 중국 등 동아시아 각지에서 지속적으로 발생되었으며, 고병원성의 AIV H5N1은 가금류, 사람 뿐 만이 아니라 호랑이, 돼지 등에도 발견될 정도로 전이되었고, 특히 이 병원체에 의한 높은 치사율(2003년 베트남 93명의 감염자 중 42명 사망, 2006년 태국 22명 감염자 중 14명 사망 등)은 해당국의 목축업 뿐 아니라 관광산업에 이르기까지 심각한 피해를 남겼다(4, 7, 15, 18).

이 심각한 병원체인 AI H5N1의 조기 진단은 가금류 등 목축업의 질병 제어를 위하여, 그리고 사람에게 전이 또는 사람간의 전파를 조기 차단하기 위하여 그 중요성이 크게 증대되고 있으며, 그 진단대상도 가금류전염병의 조기 발견 및 확진을 위한 수 의학적 진단 뿐 아니라, 사람에 대한 진단으로 확대되었으며, 병원 등 실험실적 검사 뿐 아니라, 공항 또는 항만에서의 검역요구 등, 현장성이 특히 요구되고 있다. 현재 AIV에 대한 조기 진단법은 계란을 이용한 바이러스 배양법, 혈구응집억제시험법(Hemagglutination Inhibition, HI), 면역형광법(Immunofluorescence Assay, IFA), 효소면역시험법(Enzyme Linked Immunosorbant Assay, ELISA), 중합효소연쇄반응법(Polymerase Chain

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-31-249-9645, Fax: 82-31-243-1707
E-mail: bsyoon@kyonggi.ac.kr

Reaction, PCR) 등이 적용되고 있다. 이중 바이러스 배양법과 HI는 민감도가 높고 정확하지만 상대적으로 많은 시간을 필요로 하고, IFA와 ELISA는 빠르지만 바이러스 배양법에 비해 민감도와 특이성이 떨어지는 것으로 알려져 있다(16). 이들에 반해 PCR 방법은 높은 민감도를 가지고 다량의 검체를 특이적이고도 빠르게 진단할 수 있다는 장점이 있고 또 multiplex PCR, Real-time PCR, NASBA, PCR-ELISA 등 PCR 기술이 발달함에 따라 다양하게 AIV의 진단이 가능하게 되었다(6). 이중 PCR을 이용한 진단법은 정밀검사법에 속하는 실험실적 방법으로, 혈청을 이용한 간이진단법(Immunochromatography) 등에 비하여 정확성과 민감성은 뛰어나나, 신속성, 간편성 및 현장성이 떨어지기에, 이 질병의 전파를 막기 위하여 공항, 항만에서의 검역에는 적용하지 못하고, 병원에서만 적용할 수 있다는 제한점이 있었다.

따라서, 본 연구에서는 AIV의 존재를 검색할 수 있는, Real-time PCR에 근거한 검색 방법으로 10분대의 총 검사시간을 요하는 실험방법을 개발하고자 하였으며, 이를 증명한 본 연구에서 이를 기존의 Real-time PCR과 구분하여 Quick Real-time PCR법이라 명명하였다. 이 검사방법은 AI의 병원체 유전자를 정량적으로 검색할 수 있을 뿐 아니라, 다량의 시료를 대상으로, 최소 13분 이내에 확인실험을 마칠 수 있었기에, AIV H5N1아형에 대한 현장성 있는 실험방법으로 제시하고자 하며, 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

합성 oligo 및 진단용 primer의 제작

본 연구에서는 AIV H5N1의 표준 주형 DNA의 설계 및 검색용 Primer의 설계를 위하여 GenBank database (National Center of Biotechnology Information, NCBI)에 밝혀져 있는 avian influenza A virus subtype H5N1 중 82종의 hemagglutinin (HA) 염기서열을 참고하였다.

이 염기서열들을 재료로 하여 비교 정렬분석을 행하였으며 (CLUSTAL X program, Version 1.81, ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX), 여기서 도출된 가장 보존적인 염기서열 부분을 취합하여 인공적 염기서열을 설계하였다. 이 염기서열은 avian influenza A virus subtype H5N1 (GenBank accession number, AY651322) hemagglutinin 유전자와 가장 유사하였기에, 그 중 가장 보존정도가 높은 염기서열 부위 387 bp를 선택하여 본 연

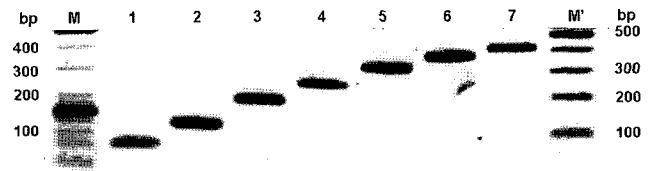


Fig. 1. Synthesis of partial hemagglutinin gene from avian influenza A virus subtype H5N1 by templateless gene synthesis. 387 bp-long hemagglutinin (HA) DNA was synthesized through 7-step templateless oligonucleotide extension. This electrophoretic image shows the result of each extension step. Lane 1 to lane 7 were 77 bp, 119 bp, 182 bp, 244 bp, 309 bp, 330 bp, and 387 bp of HA DNA, respectively. Lane M and M' represents two different DNA size markers.

구를 위한 AIV의 표준 염기서열로 결정하였으며, 이는 유전자 인공합성의 방법으로 제작하였다(Fig. 1, 2). 이 표준염기서열은 상기 유전자(AY651322)의 820 nt에서 1206 nt까지의 염기서열과 동일한 것이며, 이 서열을 재료로 Primer3 (Version 0.2, primer design software)를 사용하여 합성용 oligonucleotide 및 검색용 primer쌍을 설계하였다. 이들 oligonucleotide는 (주)바이오닉스사에 제작을 의뢰하였으며(Bionics, Korea), 공급된 oligonucleotide는 인공합성 유전자제작 및 검색용 primer로 사용되었다. 검색용 primer의 염기서열은 Table 1에, 표준 주형 DNA에서 그 위치는 Fig. 2에 나타내었다.

Hemagglutinin 유전자의 합성

7쌍의 HA 합성용 oligonucleotide를 사용하여(염기서열 미제시), PCR (PTC-200, MJ Research, USA)을 이용, 387 bp의 hemagglutinin 표준유전자를 합성하였다. 20 µl의 총량에 각 10 pmole oligonucleotide와 각 1.25 mM dNTP, 1.25 unit *Ex Taq* DNA polymerase (TaKaRa, Japan), 2 µl 10배 reaction buffer (25 mM MgCl₂)를 사용하였으며 반응 조건은 94°C에서 3분간 pre-denaturation 후, denaturation 94°C 12초, annealing 61°C 12초,

Table 1. Oligonucleotide sequence of AIV detection primers

Name	Sequence(5'->3')	mer	Amplicon
HA	HF TCCACAACATACACCCTCTC	20	189 bp
	HR ACCCATACCAACCATCTACC	20	

5' -AAGAAAGGGGACTCAGCAATTATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAAGTCAACACCAAGTGTCAAACTCCAATGGGGCGA
TAAACTCTAGTATGCCATT**CCACAACATACACCCTCTC**ACCATCGGGGAATGCCCAAATATGTGAAATCAAACAGATTAG
TCCTTGCGACTGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTAT
AGAGGGAGGATGCCAGGGAAT**GCTAGATGGTTGGTATGGGT**ACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGATACGCTGCAG
ACAAAGAATCCACTCAAAGGCAATAGATGGAGTTACCAATAAGGTCAACTCGATCATT-3'

Fig. 2. DNA sequences of an artificial synthesis of hemagglutinin genes (387 bp, partial sequence). The bold letters represent two position of AIV detection primers pairs named HA-HF and HA-HR, 5' → 3' respectively, in this study.

extension 72°C 12초를 30 cycles 동안 수행하였으며, 72°C에서 5분간 final extension을 하였다. 각 단계별로 합성된 DNA는 2.5% agarose gel에 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하였으며 UV transilluminator상에서 각 생성물의 크기를 확인하고 이를 였다. MEGA-spin™ agarose gel elution kit (Intron, Korea)을 사용하여 제조사의 지시대로 DNA를 수거하여 다음 PCR합성에서 기질 DNA로 사용하였다. 이런 과정을 7단계 반복하여 최종 합성된 dsDNA는 pBX vector (2)에 cloning 한 후, 염기서열분석 (Bionics, Korea)으로 확인하였고, pHc16이라 명명하였다.

Real-time PCR의 최적조건

본 연구에서 일반 Real-time PCR용 기기는 Exicycler™ Quantitative Thermal Block (Bioneer, Korea)을 사용하였다. 증폭 산물의 정량 측정을 위하여 SYBR Green을 사용하였으며, 본 연구에서 제작된 표준유전자인 pHc16 및 HA의 검색용 primer를 사용하여 PCR을 수행하였다(Table 1).

AIV의 Real-time PCR 검색을 위한 최적 annealing 조건을 확립하기 위해 primer 각 10 pmole과 pHc16 1 ng을 template로 하여 5 µl 4× GreenStar PCR premix (Bioneer, Korea), 최종 2.0 mM MgCl₂ 농도로 총 20 µl의 반응액을 조성하여 온도구배 (temperature gradient) Real-time PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94°C에서 3분간 pre-denaturation 후, denaturation 94°C 20초, annealing 53-64°C 15초, extension 20초를 35 cycles 수행하였고, 이후 94°C부터 50°C까지 온도를 낮추며 각 1°C마다 형광값을 측정함으로써 생성된 PCR 산물 각각의 용융온도분석(melting temperature analysis)을 실시하였다. 또한 최적 MgCl₂ 농도를 확립하기 위해 최종 MgCl₂ 농도를 2 mM부터 6 mM까지 1 mM 씩 MgCl₂의 농도를 증가시켜 MgCl₂ 농도에 따른 최적 PCR 조성을 같은 PCR cycle 조건으로 수행하여 결정하였다.

민감도 측정

AIV의 Real-time PCR 검출의 민감도를 조사하기 위하여 합성한 hemagglutinin 유전자를 pBX vector에 재조합한 AIV plasmid (pHc16)을 10 ng부터 10 ag까지 1/10배로 단계 희석한 후 이를 template로 하여 확립된 최적 PCR 조건으로 Real-time PCR을 수행하였다. Real-time PCR에 사용한 표준유전자는 avian influenza A virus H5N1의 합성 hemagglutinin (387 bp)이 재조합된 pHc16으로, DNA의 농도는 spectrophotometer로 정밀 측정하였고 plasmid의 copy수의 계산은 아래의 식을 따랐다(11).

$$\frac{6 \times 10^{23} \text{ (copies/mol)} \times \text{concentration (g/}\mu\text{l)}}{\text{MW (g/mol)}} = \text{amount (copies/}\mu\text{l)}$$

Quick real-time PCR

Quick Real-time PCR은 10분대에 Real-time PCR 및 용융온도 분석이 끝나는 매우 빠른 Real-time PCR방법을 뜻하며, 본 연구에서 기존의 Real-time PCR방법과 구분하기 위하여 명명한 것이다. 본 연구에 사용된 기기는 GenSpector TMC-1000 (Samsung,

Korea)이며, 이는 백금선과 실리코칩을 기반으로 하며, 1 µl수준의 극소량을 총 PCR 반응액으로 사용함으로써 검색에 필요한 총 반응시간을 단축할 수 있었다. Quick Real-time PCR의 검출 한계를 구하기 위한 PCR은, 시료로써 pHc16 DNA를 1 pg-10 ag 사용하여 수행하였다. 최종 reaction volume은 1 µl로 조성하였으며, 이는 각 일정농도의 1 µl template와 2 µl 10 mM MgCl₂, 7 µl 증류수를 혼합 후 1 µl를 취하고, detection primer 각 1 µl씩을 가한 후, 그 중 1 µl를 1 µl 2× premix (GeNet Bio, Korea)와 혼합하여 다시 1 µl를 취하여 PCR-chip에 넣어줌으로써 수행하였다. GenSpector TMC-1000 (Samsung, Korea)을 사용한 정규 Real-time PCR의 조건은 94°C 1분간 pre-denaturation 과정을 거친 후 denaturation 94°C 10초, annealing 58°C 7초, extension 72°C 7초를 35 cycles 로 하였다. 이후 96°C부터 66°C까지 온도를 낮추며 각 1°C마다 형광값을 측정함으로써, 생성된 PCR 산물 각각에 대한 용융온도분석(melting temperature analysis)을 실시하였다.

또한 빠른 AIV의 진단을 위해서 PCR 각 단계의 시간을 점차적으로 줄여 수행하였으며, 94°C, 1분간 pre-denaturation 과정을 거친 후, PCR 3단계의 시간은, 최종적으로 denaturation 1초, annealing 1초, extension 3초가 되게 하였다. 이 Quick PCR에서는 빠른 검색을 위하여 30 cycles만 수행하게 하였다. 또한 용융온도분석(melting temperature analysis)도 85°C부터 75°C까지 온도를 낮추며 형광값을 측정하였다.

결과 및 고찰

Hemagglutinin 유전자의 합성

Avian influenza A virus (AIV) subtype H5N1의 hemagglutinin (HA) 유전자는 약 1.69 kb의 크기를 가지고 있으며 이는 neuraminidase (NA)와의 조합에 의해 여러 가지 아형을 결정하게 된다. 본 연구에서는 HA유전자중 항원결정기로서 역할을 할 수 있는 친수성 부분을 친수성분석(hydrophilicity analysis)을 통하여 항원결정기가 우수한 부분과, 82종의 AIV H5N1아형의 HA중 homology가 높은 부분을 고려하여 387 bp의 HA유전자 부위를 설계하였으며, 이를 인공적으로 합성하여 Real-time PCR을 이용한 본 검사법에 사용하였다.

설계된 HA 유전자를 합성하기 위해 총 7쌍의 HA 합성 oligonucleotide를 설계하였고, 총 7단계에 걸쳐 HA 387 bp의 유전자를 합성하였으며 2.5% agarose gel 상에서 각 단계별로 size가 일치함을 확인하였다(Fig. 1). 최종 합성 후 HA유전자는 pBX vector에 cloning하여 염기서열분석을 통해 HA와 일치함을 다시 확인하였으며, 이를 pHc16으로 명명하였다. pHc16의 DNA 정량은 spectrophotometer를 사용하여, 정량 측정하였으며, 100 ag의 pHc DNA는 24개의 AIV HA부분 유전자를 포함하는 것으로 계산되었다(Fig. 2).

Real-time PCR의 최적조건

합성된 HA유전자 pHc16 1 ng을 template로 하여 Real-time

PCR detection의 최적 조건을 설정하였다. 53°C-64°C의 annealing 온도에서 gradient Real-time PCR과 2-6 mM의 MgCl₂ 농도를 사용한 Real-time PCR을 수행하였으며 모두 189 bp의 특이 PCR product를 증폭하였다. AIV HA PCR-detection에서 annealing temperature의 최적 조건은 58°C였고, 최적 MgCl₂의 농도는 3 mM로 측정 되었다(자료 미제시).

Real-time PCR의 민감도 측정

본 AIV HA detection의 민감도 측정을 위하여, AIV HA 유전자를 포함하는 pHc16 DNA를 기질로 하여 10 pg pHc16에서 10 ag까지 1/10으로 연속 희석을 한 후, 이를 초기 기질로 하여 최적의 Real-time PCR 조건하에서 Real-time PCR을 수행하였다. 이 측정된 양의 초기 기질을 사용한 PCR 결과는 우선 amplification fluorescence curve와 standard curve를 통해 나타내었고, 초기 기질 10 pg부터 1 fg (약 240개 HA 유전자 포함)의 범위에서는 기질의 양들과 Ct값들은 정확한 상관관계가 있는 것으로 확인되었다(Fig. 3A). 한편, 100 ag (27개 HA 유전자)의 초기 기질의 양으로도 본 Real-time PCR법으로 AIV 특이 염기서열의 검출은 가능하나, 상관관계 및 정량은 양호하지 아니한 것으로 나타났으며, 10 ag (2.7개 HA 유전자)의 초기 기질을 사용한 Real-time PCR은, 수회에 걸친 반복 실험의 결과, 검색이 가능하지 아니한 범위로 판정하였다(Fig. 3, 4B). 따라서 본 실험에서 검색이 가능한 최소의 HA 유전자의 copy수는 24개로 설정하였다.

이어 수행된 용융온도분석에서, 초기 기질 10 pg부터 100 ag까지의 PCR 산물들은 모두 83.1°C의 T_m (Mid-point of melting temperature)을 갖는 것으로 측정되었으며, 또한 -(dF/dT)의 curve가 동일한 형태를 가짐으로 나타나 모두 동일한 PCR산물로 판단되었다(Fig. 3B).

pHc16 DNA 10 pg부터 10 ag까지, 1/10단계로 희석한 7개의 초기 기질의 양들과 Real-time PCR결과로 측정된 Ct값들의 회귀식선(Regression equation)은 Y(초기 기질의 양; log ag) = -0.38X (C_t값; cycles) + 11.00로 계산되었으며, 회귀상수(Regression coefficient) R² = 0.9650로 산출되었다(Fig. 4A). 이는 본 실험

에서 정량의 범위를 넘어선 것으로 판정한 초기 기질의 양들인 100 ag (24개 HA 유전자)과 10 ag를 포함하여 계산한 것으로, 이 둘을 제외하고 계산하면 회귀상수는 R² = 0.995 이상으로 나타났다(자료 미제시). 각 PCR 산물들은 다시 전기영동을 수행하여 예상된 크기의 PCR 산물이 생성되었는지 재차 확인하였으며, 역시 10 ag의 것을 제외한 초기 기질 10 pg부터 100 ag까지의 PCR산물은 189 bp의 예상된 크기의 산물임을 보여 주었다(Fig. 4).

Quick real-time PCR

PCR반응액의 총량이 1 µl 수준으로 매우 빠른 PCR이 가능할 것으로 생각되었던 thermocycler, 즉 GenSpector TMC-1000 (Samsung, Korea)을 사용하여, Quick Real-time PCR을 추구하였다. 먼저, 초기 기질량의 최저치, 즉 검출한계를 구하기 위해 AIV HA 유전자를 포함한 pHc16을 기질로 하여, 초기 기질 양을 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 100 ag, 10 ag (약 2.4개 pHc16 분자)씩 각기 사용하여 PCR을 수행하였다. 실험결과 plasmid DNA 100 fg부터 100 ag까지의 C_t값(Threshold cycles)은 비교적 정량적 상관관계를 보여주었으나, 그 외의 범위 즉 1 pg, 10 ag의 PCR에서는 초기 기질량과 C_t값간의 정량성은 인정할 수 없었다(Fig. 5).

이 GenSpector TMC-1000 (Samsung, Korea)을 사용한 결과와 Exicycler™ Quantitative Thermal Block (Bioneer, Korea)을 사용한 결과는 우선, 그 정량가능 범위가 크게 차이가 나는 것으로 나타났으며, 전자는 plasmid pHc16 100 fg부터 100 ag (약 24개 HA 유전자)까지의 C_t값이 정량 가능 범위로 판단되었으나, 후자는 10 pg부터 1 fg (약 240개 HA 유전자 포함)의 범위에서 초기 기질의 양들과 C_t값들이 정량적 상관관계가 있는 것으로 확인되었다. 즉 전자는 후자에 비해 극소량의 정량은 더욱 정확해질 수 있으나, 1 pg 이상에서는 정량이 부정확해 진다는 것이다. 이는 GenSpector TMC-1000이 1 µl 수준의 총 PCR반응액을 사용해야 하기 때문에, 보다 농축된 초기 기질 DNA에 의해 전체 PCR의 반응성이 저하될 수도 있기 때문이라 추측되었다.

한편, 검출 가능한 초기 기질량의 최저치, 즉 검출한계에 대한

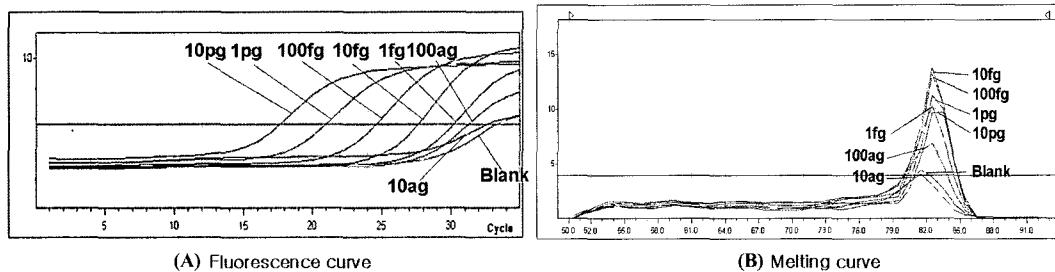


Fig. 3. Real-time PCR with serially diluted templates of AIV HA gene using Exicycler™ Quantitative Thermal Cycler. Real-time PCR was performed with the standard condition in this studies. Initial quantities of templates in each experiments were 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 100 ag (24 copies of AIV gene) and 10 ag, respectively. Panel (A) Fluorescence curve. The Ct values were shown initial quantity-dependent manner in the range of 10 pg to 1 fg. Distilled water was used in blank instead of DNA template. Panel (B) Melting point analysis of same PCR products. All products were identical, depending on same temperature of midpoint around 83.1°C, except 10 ag and blank.

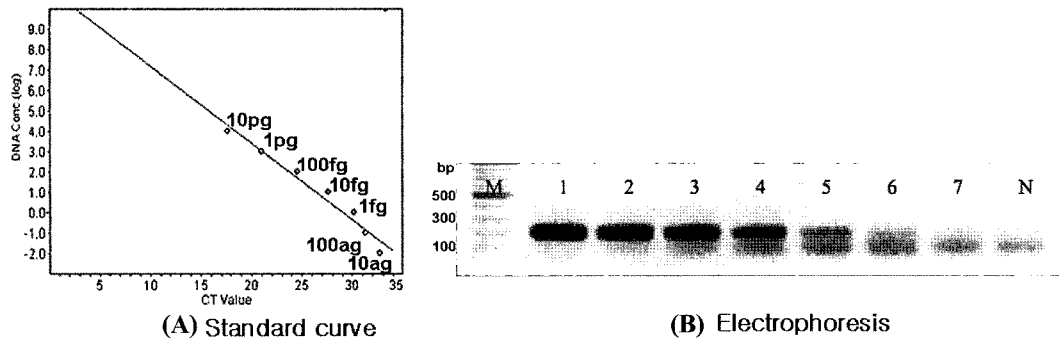


Fig. 4. Standard curve and electrophoresis of Real-time PCR with serially diluted templates of AIV HA gene using Exicycler™. Panel (A) Regression analysis of PCR products. The linear relationship between the quantities of initial template and Ct values was fairly accepted. Regression equation was calculated as $Y = -0.38X + 11.00$. Regression coefficient was $R^2 = 0.9650$. Panel (B) Electrophoresis of same PCR products. Lane M is 100 bp DNA size marker; Lane 1-7 were loaded 7 PCR products amplified from initial template plasmid, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 100 ag (24 copies of AIV gene) and 10 ag, respectively. Lane N; negative control (distilled water). PCR products of 189 bp were shown in all lanes, except 10 ag and blank.

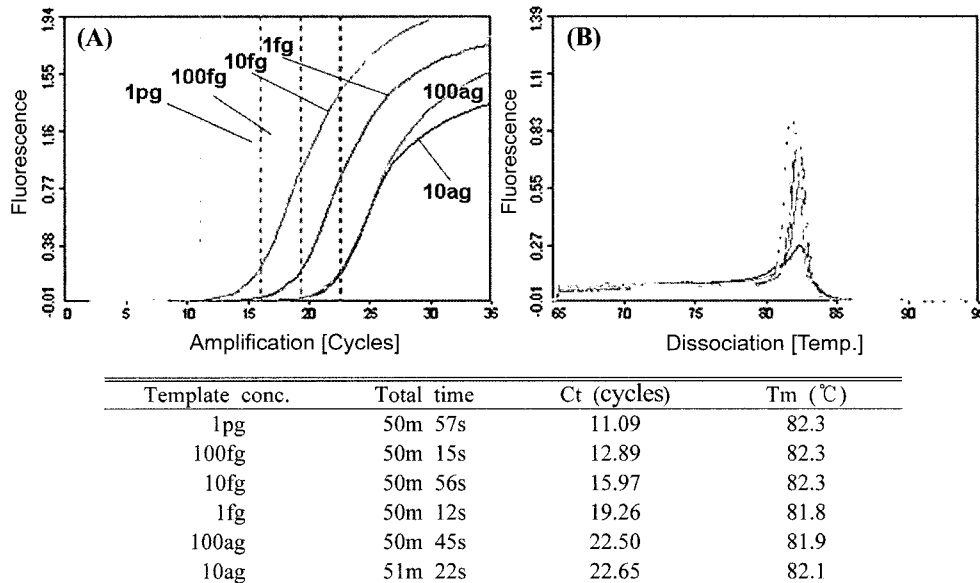


Fig. 5. The sensitivity of Quick Real-time PCR by 10-fold serially diluted template DNA. Quick Real-time PCRs were performed with 1 pg (2.4×10^5 copies of AIV gene) - 10 ag plasmid template using GenSpector under 10 seconds - 7s - 7s of 3 steps (denaturation-annealing-extension) in 35 cycles. Panel (A) Fluorescence curve of template-diluted Quick Real-time PCRs. 1 pg, 1 fg, 10 ag etc. represent each weight of template DNA, 1 picogram, 1 femtogram, 10 attogram etc., respectively. PCR with 10 ag template (2.4 copies of AIV gene) was detectable. Panel (B) Melting point analysis in the range of temperature 96°C to 65°C. All 6 PCR products were identical, depends on same melting temperature. The temperatures of mid point (Tm) were calculated in range of 81.8-82.3°C.

여는 전자가 10 ag의 plasmid pHc16 (AIV HA 유전자 2.4개)을 성공적으로 증폭시켰기에, 후자가 보인 검출한계의 수준(100 ag의 pHc 16, 24개 AIV HA 유전자)을 분명히 뛰어 넘는 것으로 나타났다. 10 ag에서 100 ag까지 10 ag단위의 보다 정밀한 검출 한계에 대한 실험은 수행하지 아니하였지만, 10 ag과 100 ag을 단위를 사용한 양자의 반복 실험을 통하여 전자의 우수한 검출 한계를 분명하게 볼 수 있었으며, 이는 GenSpector TMC-1000이 1 µl수준의 총 PCR 반응액을 사용하기에, 20 µl의 총 PCR 반응액을 사용하는 Exicycler™ Quantitative Thermal Block보다 초기

기질 농도의 면에서 유리하고, 이 수준의 저농도 기질 DNA의 PCR 증폭은 전자가 보다 유리할 수 있을 것이라 해석하였다(자료 미제시).

또한 PCR 산물들의 용융온도분석에서 이 PCR 산물들이 모두 동일한 Tm (Temperature of midpoint; 약 82°C)을 가지는 것으로 나타났고, 이는 모두 성공적 증폭에 의한 동일한 DNA들임을 시사하는 것이라 하겠다. 이 PCR산물들은 1 µl수준의 극소량이기에 건조에 의한 정량적 회수가 불가능하나, 각기 회수하여 전기영동을 실시하였으며, 모두 AIV HA유전자의 예상된 크기인

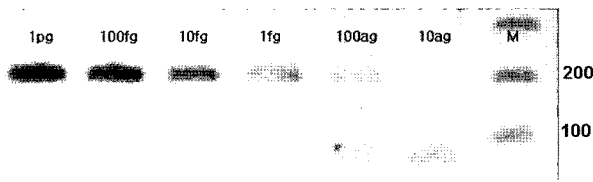


Fig. 6. Electrophoresis of Quick Real-time PCR products. Quick Real-time PCRs were performed with 1 pg - 10 ag plasmid template. 10 fg plasmid was calculated as 2.4×10^3 copies of AIV gene. Lane M was DNA size marker in 100, 200, 300 bp, respectively. PCR with 10 ag template (2.4 copies of AIV gene) was detectable in the level of fluorescence (Fig. 5A), but hard to detect in this electrophoresis.

189 bp의 DNA임을 확인하였다(Fig. 5, 6).

한편, AIV HA 유전자의 존재여부를 가장 빠르게 진단하기 위하여 PCR 과정 중 각 단계들의 시간을 극단적으로 줄인 Quick Real-time PCR을 수행하였다. 이는 간이진단법인 Rapid kit (Lateral flow Immunochromatography법)의 진단에 소요되는 시간이 10분대인 것을 염두에 둔 것으로, 본 연구인 AIV HA의 Quick Real-time PCR진단법의 판정을 위한 최단시간을 측정하고자 한 것이다.

기질의 농도는 각 10 fg의 AIV HA pHc16 DNA를 사용하였으며, PCR의 실행조건 중 각 cycle의 각 단계별 시간을 극단적으로 줄였으며, 최종적으로는 94°C 1분간 pre-denaturation 과정을 거친 후 denaturation 94°C 1초, annealing 58°C 1초,

extension 72°C 3초를 30 cycles 동안 수행하였고 이어 용융온도 분석을 시행하였다. 용융온도분석이 완료된 순간까지 AIV HA의 진단에 소요된 시간 중 최단시간은 12분 28초였으며, Ct값은 25.03 cycles였으며, 용융온도분석을 통한 PCR product의 Tm 역시 82.8°C 내외로써 예상된 PCR산물을 만들어 낸 것으로 확인되었다(Fig. 7).

Ct값을 기준으로 고려할 때, 189 bp의 DNA를 증폭해 내는 본 실험에서 polymerization의 시간은 우선 가장 큰 영향을 미치는 것으로 판단되었으며, 이에 비해 denaturation 시간 및 annealing의 시간은 상대적으로 적은 영향을 미치는 것으로 추측되었다.

본 연구의 목적은 AIV hemagglutinin 특이유전자를 대상으로 10분대의 고속 판정이 가능한 새로운 Real-time PCR법을 개발하고자 한 것이다. 이를 위하여 PCR의 각 cycles 중 denaturation, annealing, polymerization의 시간을 각 1초 또는 수초의 시간으로 설정하여 PCR이 과연 가능한 것인가가 실험의 초점이 되었다. 본 실험의 결과를 통하여, PCR의 각 cycle 중 각 단계별 시간을 1초, 1초, 3초의 설정으로도, 극소의 Template (10 fg; 2400 개의 AIV HA pHc16 DNA)의 존재를 검출해 낼 수 있었으며, 이는 GenSpector TMC-1000 (Samsung, Korea)으로 설정할 수 있는 polymerization 시간이 3초까지 있었기에, 그 이하의 시간 단축을 추구할 수 없었으나, 차후 기기의 개선에 의해서도 충분히 검색시간의 단축이 가능할 수 있을 것이라 기대된다.

본 연구에서 보여준 최단 검사시간인 12분 28초는 PCR의 시

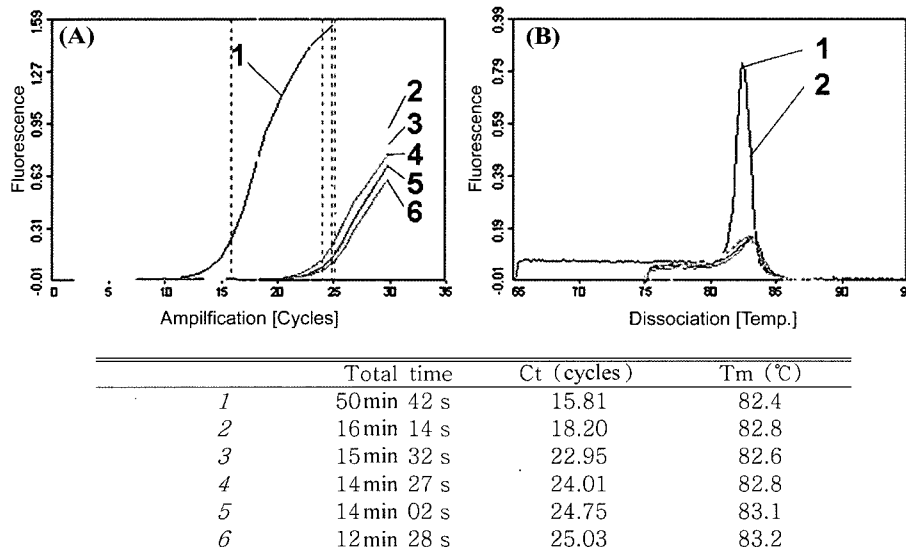


Fig. 7. Detection-time limit of Quick Real-time PCR. Quick Real-time PCR was performed with 10 fg plasmid template DNA (2.4×10^3 copies of AIV gene) using GenSpector. To save time of PCR-experiment, times of each 3 steps (denaturation-annealing-extension) were reduced serially, and PCR were performed with 30 cycles and in the range of temperature in melting point analysis 85°C to 75°C (except PCR 1; 35 cycles, 96°C to 65°C; see Fig. 5). Panel A. Fluorescence curve of time-reduced Quick Real-time PCR. The numbers of 1-6 represent each time-reduced PCR independently performed with 3 different times of denaturation-annealing-extension step in PCR cycles. 1 was 10 seconds - 7 s - 7 s (denaturation-annealing-extension); 2, 2 s - 6 s - 4 s; 3, 2 s - 8 s - 3 s; 4, 2 s - 3 s - 4 s, 5, 2 s - 2 s - 4 s; 6, 1 s - 1 s - 3 s, respectively. Panel B. Melting point analysis of same PCR products. All 6 PCR products were identical, depends on same melting temperature. The temperatures of mid-point (Tm) were calculated in the range of 82.46 to 83.25°C. Only PCR 1 was performed

작부터 증폭산물의 정성이 가능한 용융온도분석(Melting point analysis)이 끝난 시점까지이며, 본 실험에서 추구하지 아니한 역전사 효소(reverse transcriptase) 반응도 보다 신속히 수행하는 방법을 강구한다면, 본 연구에서 보여준 12분대의 PCR 판정까지의 검사시간이란, AI에 대한 PCR 검색법의 전 과정, 즉 시료의 채취부터 판정까지의 시간을 역전사 효소반응을 포함하여 20분대에 끝낼 수 있는 가능성을 보여준 것이라 하겠다.

이런 검사시간의 단축은 본 Quick Real-time PCR 실험법의 적용범위를 보다 넓힐 수 있는 것으로, 실험실적 방법으로 생각되었던 PCR 실험법이 Immunochromatography법을 사용하는 Rapid kit가 가지고 있는 현장성에 보다 접근할 수 있는 가능성을 보인 것으로 생각된다. 본 실험에 사용된 GenSpector TMC-1000 (Samsung, Korea)도 근래 개발된 Real-time PCR 기기들과 함께 그 크기가 비교적 작은 수준이며, 따라서 이동이 용이하여 전원이 있는 모든 장소에서 실험이 가능할 것으로 생각된다. 또한 PCR 용액을 탑재하는 chip이 1 µl 이하의 극소량 시료를 사용하는 것도 현장체형에서 Rapid kit보다 유리한 점으로 작용할 것이다. AI 검색을 위한 Quick PCR의 적용 가능한 예를 들면, 현재 적외선 카메라에 의한 안면의 발열여부로 판정하는 등, 매우 초보적 방법으로 수행되고 있는 AI 발생지역 귀국자에 대한 공항 또는 항만에서의 1차 검색을 우선 대신할 수 있을 것으로 기대한다.

본 연구에서 제시한 AIV의 신속 진단법은 기존의 Real-time PCR법에서 간과되었던 검사시간을 단축하는 성과를 보여주었다 생각하며, 이는 AIV의 진단 뿐 아니라 모든 병원균에 대한 PCR 진단법에 대하여 적용될 수 있을 것으로, 또한 병원균에 대한 PCR 방법에 의한 검출에 보다 현장성을 가질 수 있는 기초가 될 것으로 기대한다.

감사의 글

본 연구는 농림부 바이오그린 연구사업의 지원에 의하여 수행되었으며, 농림부 농림기술개발사업의 지원을 받았고, (주)삼성테크윈의 후원으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 남정구, 박근용, 심수경, 이영선, 이영희. 2005. 감염병실험실진단; 질환별시험법 3판. 국립보건연구원 857-869.
2. 한상훈, 임윤규, 윤병수. 2006. 분자생물학 연구방법론 III. 경기대학교 출판부 82-84.
3. Alexander, D.J. 1995. The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. *J. Comp. Pathol.* 112, 105-126.
4. CDC. 2004. Outbreaks of avian influenza A (H5N1) in Asia and interim recommendations for evaluation and reporting of suspected cases? United States. *MMWR* 13, 97-100.
5. Claas, E.C.J., A.D. Osterhaus, R. Van Beck, J.C. de Jong, G.F. Rimmelzwaan, D.A. Senne, S. Krauss, K.F. Shortridge, and R.G. Webster. 1998. Human influenza A (H5N1) virus related to highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 351, 472-477.
6. Ellis, J.S., and M.C. Zambon. 2002. Molecular diagnosis of influ-

- enza. *Rev. Med. Virol.* 12, 375-389.
7. Fauci, A.S. Emerging and re-emerging infectious diseases: Influenza as a prototype of the host-pathogen balancing act. *Cell* 124, 665-670.
8. Fleming, D.M., P. Chakraverty, C. Sadler, and P. Litton. 1995. Combined clinical and virological surveillance of influenza in winters of 1992 and 1993-4. *BMJ* 29, 290-291.
9. Fouchier, R.A., V. Munster, A. Wallensten, T.M. Bestebroer S. Herfst, D. Smith, G.F. Rimmelzwaan, B. Oisen, and A.D. Osterhaus. 2005. Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. *J. Virol.* 79, 2814-2822.
10. Gamblin, S.J., L.F. Haire, R.J. Russell, D.J. Stevens, B. Xiao, Y. Ha, N. Vasisht, D.A. Steinhauer, R.S. Daniels, A. Elliot, D.C. Wiley, and J.J. Skehel. 2004. The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. *Science* 303, 1838-1842.
11. Guan, M.K., L.C. Hsueh, Y.K. Liang, T.J. Wen, L.C.J. Chulu, H.M. Liao, T.J. Chang, and H.J. Liu. 2006. Development of a quantitative Light Cycler real-time RT-PCR for detection of avian reovirus. *J. Virol. Methods* 133, 6-13.
12. Horimoto, T. and Y. Kawaoka. 2001. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 129-149.
13. Lau, L.T., J. Banks, R. Aherne, I.H. Brown, N. Dillon, R.A. Collins, K.Y. Chan, Y. W. Fung, J. Xing, and A.C.H. Yu. 2003. Nucleic acid sequence-based amplification methods to detect avian influenza virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 336-42.
14. Nicholson, K.G., J.M. Wood, and M. Zambon. 2003. Influenza. *Lancet* 362, 1733-1745.
15. Payungporn, S., P. Phakdeewirot, S. Chutinimitkul, A. Theamboonlers, J. Keawcharoen, K. Oraveerakul, A. Amonsin, and Y. Poovorawan. 2004. Single step multiplex reverse transcription polymerase chain reaction for Influenza A virus subtype H5N1 detection. *J. Vir. Immun.* 17, 588-593.
16. Poddar, S.K. 2002. 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* 99:63-70.
17. Trampuz, A., R.M. Prabhu, T.F. Smith, and L.M. Baddour. 2004. Avian influenza: a new pandemic threat? *Mayo Clin. Proc.* 79, 523-530.
18. Tran, T.H., T.L. Nguyen, T.D. Nguyen, T.S. Luong, P.M. Pham, V.C. Nguyen, T.S. Pham, C.D. Vo, T.Q. Le, T.T. Ngo, B.K. Dao, P.P. Le, T.T. Nguyen, T.L. Hoang, V.T. Cao, T.G. Le, D.T. Nguyen, H.N. Le, K.T. Nguyen, H.S. Le, et al. 2004. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N. Engl. J. Med.* 350, 1179-1188.
19. Yuen, K.Y., P.K.S. Chan, M. Peiris, D.N. Tsang, T.L. Que, K.F. Shortridge, P.T. Cheung, W.K. To, E.T. Ho, R. Sung, and A.F. Cheng. 1998. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet* 351, 467-471.
20. Xie, Z., Y.S. Pang, J. Liu, X. Deng, X. Tang, J. Sun, and M.I. Khan. 2006. A multiplex RT-PCR for detection of type A influenza virus and differentiation of avian H5, H7, and H9 hemagglutinin subtypes. *Mol. Cell Probes.* 20, 245-249.

(Received December 5, 2006/Accepted February 13, 2007)

ABSTRACT: Rapid Detection Method of Avian Influenza Subtype H5N1 using Quick Real-Time PCR**Eul hwan Kim, Dong woo Lee, Sang hoon Han, Soon hwan Kwon¹, and Byoung Su Yoon***(Department of Life Science, College of Natural Science, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea, ¹Chronic Inflammatory Disease Research Center, School of Medicine, Ajou University, Suwon 443-721, Korea)

The most rapid Real-time PCR based detection method for Avian influenza A virus (AIV) subtype H5N1 was developed. The target DNA sequence in this study was deduced from H5N1 subtype-specific 387 bp partial gene of hemagglutinin, and was synthesized by using PCR-based gene synthesis on the ground of safety. Real-Time PCR was performed by GenSpector™ using microchip-based, total 1 µl of reaction mixture with extremely short time in each steps in PCR. The detection including PCR-amplification and analysis of melting temperature was totally completed within 13 min. The H5N1-specific 189 bp PCR product was correctly amplified until 2.4 molecules of hemagglutinin gene as minimum of templates. This kind of PCR was designated as Quick Real-Time PCR in this study and it could be applied to detect not only AIV H5N1, but also other pathogens using PCR-based detection.