한국가축위생학회지 제32권 제4호 (2009)
Korean J Vet Serv 32(4) : 299~306 (2009)

Real-time PCR을 이용한 돼지써코바이러스 감염증 진단법 연구

김은경* · 황보원 · 이종민 · 손병국 · 박호정 · 김도경
경상남도축산진흥연구소

(접수 2009. 9. 10, 게재승인 2009. 12. 22)

Rapid detection and quantification of porcine circovirus type 2 (PCV 2) DNA in Real-time PCR

Eun-Gyeong Kim*, Bo-Won Hwang, Jong-Min Lee, Byeong-Guk Son, Ho-Jung Park, Tho-Kyoung Kim
Gyeongnam Livestock Veterinary Research Institute, Jinju 660-985, Korea

(Received 10 September 2009, accepted in revised from 22 December 2009)

Abstract

Assay for the detection and quantification of porcine circovirus type 2 (PCV 2) with the real-time PCR were developed. TaqMan probe real-time using a set of primer/probe was developed for detection of PCV 2. In this study we applied real-time PCR assay to 320 samples, collected from pig farms. In 151 of 320 samples, PCV 2 DNA was detected by conventional PCR assay. All samples positive for PCV 2 DNA in conventional PCR assay were also positive in Real-time PCR assay, but 69 of 169 samples that tested negative for PCV 2 DNA in conventional assay were tested positive in TaqMan probe real-time PCR assay. The test of TaqMan probe real-time PCR resulted in detection and quantification limits of 101 copies per sample. TaqMan probe real-time PCR assay increased the number of samples in which PCV 2 was detected by 21%. TaqMan probe real-time PCR assay is very efficient method in contrast to the conventinal PCR, becoming increasingly important method for gene analysis.

Key words : Porcine circovirus type 2, TaqMan probe real-time PCR

서 론

Porcine circovirus type 2 (PCV 2)는 *Circoviridae*에 속하며 직경이 17nm 정도로 작은 원형의 single-stranded DNA 바이러스이다. PCV 2는 1990년대 후반에 이유자돈전신소모성증후군(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 증상을 보이는 돼지에서 분리되어 지속적으로 연구되고 있으며 거의 세계적으로 광범위하게 분포되어 있는 것으로 알려져 있다. PMWS는 주로 생후 6～8주령의 젖 뗀 어린돼지들이 불량한 사육환경에서 바이러스나 세균 등 여러 가지 병원체에 복합 감염되어 발생하며, 감염된 돼지는 식욕감퇴, 전신쇠약, 황달, 호흡기 증상 등을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Straw 등, 1999).

PCV 2의 진단은 중합효소연쇄반응법(PCR)이 주로 사용되고 있으며, 그 밖의 진단법으로는 간접형광항체검사법, 조직진단법, 면역조직화학염색법, 전자현미경검사법 등이 있다.

* Corresponding author: Eun-Gyeong Kim, Tel. +82-55-771-6651~6, Fax. +82-55-771-6619, E-mail: egkim87@korea.kr; 87silverg@hanmail.net

PCV 2는 1982년 돼지신장세포주(PK-15, ATCC-CCL 33)에서 분리된 PCV1(porcine circovirus type 1)과는 다르게 분류되는데, PCV1과 PCV 2는 서로 병원성이 다를 뿐 아니라 유전자의 염기서열에서도 큰 차이가 있음을 확인할 수 있다. 두 바이러스는 전체적으로는 유사한 구조를 가지고 있으나 세부 유전자별로 다양한 차이가 있다. PCV1의 원형 구조유전자는 전체 1,759개의 nucleotide로 5KDa 이상의 단백질을 생성할 수 있는 7개의 open reading frame (ORF)이 있고 PCV 2는 1,767～1,768개의 nucleotide로 구성되어 있으며 6개 또는 11개의 ORF가 존재한다. PCV1과 PCV 2의 전체 유전자염기서열은 68～76%의 상동성을 가지며, 특히 주요 구조단백질인 capsid protein의 조성에 관계하는 open reading frame 2 (ORF2)의 경우 65～67%로 매우 낮은 상동성을 나타내고 있어 중합효소연쇄반응법을 이용한 PCV 2의 감별진단에 유용하게 활용되고 있다(박과 김, 2004; 박 등, 2004; 김 등, 2003; 김 등, 2004a; 김 등, 2004b; 김 등, 2005; Choi 등, 2000; Hamel 등, 2000; Liu 등, 2000; Nawagitgui 등, 2002; Fenaux 등, 2002; Fenaux 등, 2003; Mankertz 등, 2004; Cheung, 2004; Grieson 등, 2004).

국내에서는 이유자돈전신소모성증후군에 이환된 자돈에서 PCR 검사를 통하여 PCV 2를 분리 · 동정하여 국내 분리주의 유전적 특성을 조사한 결과 캐나다 분리주 및 미국 분리주와 99% 수준으로 가장 밀접한 유전적 상동성을 나타내었으며 스페인, 독일 그리고 대만 분리주와는 97% 수준의 상동성을 나타내었고 프랑스, 중국 분리주와는 94%로 낮은 상동성을 나타낸 것으로 보고하였다(박과 김, 2004; 박 등, 2004; 김 등, 2003; 김 등, 2004a; 김 등, 2004b; 김 등, 2005).

최근 real-time PCR 검사법이 도입 · 보고되고 있으며 이 방법은 thermal cycler와 분광형광광도계를 일체화 시킨 실시간 확인 PCR 장비를 적용한 검사법이다. 기존 PCR 검사법은 End point에서 증폭산물을 전기영동 한 다음 결과를 판정하는데 비해, real-time PCR 검사법은 전기영동을 할 필요가 없으며 PCR 증폭산물의 증가를 형광물질 검출을 이용하여 실시간으로 탐지할 수 있다.

Real-time PCR 검사법에는 형광물질인 SYBR Green을 이용하는 방법과 형광물질 및 억제물질을 부착한 TaqMan probe를 이용하는 방법이 소개되어 있다. SYBR Green real-time PCR 검사법은 SYBR Green이라는 형광물질을 PCR 반응액에 첨가하여 PCR 반응 중에 합성되는 double-stranded DNA 내의 minor groove에 SYBR Green을 결합시키고, 이 결합된 SYBR Green의 형광강도를 주기적으로 탐지하여 판정하는 방법이다. TaqMan probe real-time PCR은 형광물질 및 억제물질을 양쪽 끝에 부착하여 PCR을 실시함으로써, TaqMan probe가 target 부위에 탐침(hybridization)된 상태에서 증폭반응이 진행되고, double strand DNA extension 반응 중에 활성된 exonuclease의 작용으로 template에 탐침되어 있던 TaqMan probe가 분해되면서, TaqMan probe에 부착되어 있던 형광물질이 억제자로부터 풀려나 활성화 된 형광물질의 강도를 주기적으로 탐지하여 결과를 판정하는 검사법이다(Brunborg 등, 2004; Olvera 등, 2004; Chung 등, 2005; Yang 등, 2007).

이 연구에서는 먼저 경남지역의 PCV 2 감염실태를 파악하기 위하여 돼지를 사육하고 있는 480농가를 중심으로 기존 PCR을 이용하여 농장별 양성율을 조사하였고, 다음으로 기존 PCR 결과 양성 판정된 35농가와 음성 판정된 35농가에서 한 농가당 4~5두씩 총 320두에 대한 시료를 기존 PCR, SYBR Green real-time PCR 및 TaqMan probe real-time PCR에 적용하여 검사방법에 따른 개체별 양성율과 검출한계를 비교하였다.

재료 및 방법

공시재료

2006년부터 2007년까지 경남도내 480농가에서 돼지 혈액검사를 목적으로 우리 연구소에 의뢰된 1,900여두의 혈액을 시료로 사용하였으며 그 중 검사방법에 따른 개체별 양성율 조사를 위하여 320두의 시료를 사용하였다.

DNA 추출

PCR을 위한 Template DNA는 QIAamp DNA mini kit (QIAGEN)를 이용하여 추출하였으며, 추출한 DNA는 분광광도계(Nanodrop ND-1000)를 이용하여 OD_{260}에서 농도를 측정하였다.

PCR primers와 probe

Primers와 probe는 GenBank accession number AF027217과 국내외에서 분리 보고된 다수의 porcine

circovirus type2 (PCV 2) 유전자 염기서열을 검색하여 가장 적합한 ORF2 부위를 선택하였다. Conventional PCR을 위한 primers는 박 등이 진단용으로 제시한 sequence를 적용하였고, SYBR Green real-time PCR을 위한 Primers는 IDT Scitools (Integrated DNA Technologies)로 선정하여 (주)제노텍에서 각각 제작하여 사용하였다. TaqMan probe real-time PCR을 위한 Primers와 probe는 Beacon Designer Software (PRE-MIER Biosoft International)로 선정하여 (주)바이오니아에 의뢰하여 제작하였으며, Probe의 5′에는 Fluore-scein인 FAM을, 그리고 3′에는 Quencher인 BHQ를 부착하였다(Table 1).

Conventional PCR

Conventional PCR을 위하여 DW 6.5μl, Taq master mix 12.5μl(Promega M7122), forward primer 20pmol 0.5μl, reverse primer 20pmol 0.5μl 그리고 DNA template 5μl를 PCR tube에 넣은 후 혼합액을 thermal cycler (Biometra T-gradient)에서 증폭하였으며, 음성대조군으로 멸균증류수를 이용하였고 양성대조군으로 PCV 2 DNA(10^0～10^7 copies)를 이용하였다.

PCR 반응 조건은 95℃에서 10분간 predenaturation 시킨 후, 94℃에서 30초 denaturation, 55℃에서 30초 annealing, 72℃에서 40초 동안 extension을 35회 반복 실시한 후 마지막 extension은 72℃에서 10분간 실시하였다.

PCR 증폭산물 DNA 확인은 증폭산물 10μl, loading buffer (0.03% bromophenol blue, 30% glycerol, 30mM EDTA, 0.03% xylene cyanol) 2μl과 혼합한 후 0.002% ethidium bromide를 첨가한 1% agarose gel에 loading 하여 90V에서 1시간동안 전기영동을 실시한 다음 UV light로 조사하여 501bp를 확인하였다.

SYBR Green real-time PCR

SYBR Green real-time PCR을 위하여 2×Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix 10μl, dH_2O 4μl, sense primer 10pmol 0.5μl, antisense primer 10pmol 0.5μl, DNA template 5μl로 Total 20μl를 PCR tube에 넣은 후 혼합액을 Real-time thermal cycler (STRATAGENE Mx3000P)에서 증폭하였으며 음성대조군으로 멸균증류수를 이용하였고 양성대조군으로 PCV 2 DNA (10^0～10^7 copies)를 이용하였다.

SYBR Green real-time PCR 반응 조건은 95℃에서 10분간 predenaturation 시킨 후, 95℃에서 30초 denuaturation, 60℃에서 30초 annealing, 72℃에서 30초 동안 extension을 40회 반복 실시한 다음, 마지막으로 95℃에서 30초 denuaturation, 60℃에서 30초 annealing, 95℃에서 30초 동안 denuaturation을 1회 실시하였으며, extension을 실시할 때마다 복제된 target 부위 157bp 내에 끼어들어 간 SYBR Green fluorescence를 탐지하고 처음 탐지된 cycle수(Ct)는 amplification plots로 표현하였다. 이때 탐지된 fluorescence는 primer간의 dimer 형성을 확인하기 위해 melting temperature를 분석한 dissociation curve로 검증하였다.

TaqMan probe real-time PCR

TaqMan probe real-time PCR을 위하여 2×Brilliant II QPCR Master Mix 10μl, dH_2O 5.5μl, sense primer 10pmol 0.5μl, antisense primer 10pmol 0.5μl, probe 10pmol 0.5μl, DNA template 3μl로 Total 20μl를 PCR tube에 넣은 후, 혼합액을 Real-time thermal cycler (STRATAGENE Mx3000P)에서 증폭하였으며 음성대조군으로 멸균증류수를 이용하였고 양성대조군으로 PCV 2 DNA(10^0～10^7 copies)를 이용하였다.

TaqMan probe real-time PCR 반응 조건은 95℃에서

Table 1. Description of primers and probe used in this study

Name		Sequences (5′→3′)	Position	Amplified size (bp)
Conventio -nal PCR	pPCKF2 pPCKR2	CATGGTTACACGGATATTG CGCACCTTCGGATATACTG1085-1103	1085-1103 1567-1585	501
SYBR Green RT PCR	PCV-sF PCV-sR	GGAGTCAAGAACAGGTTTGGGTGT AGTGGGCTCCACTGCTGTTATTCT	1229-1252 1362-1385	157
TaqMan probe RT PCR	PCV-tF PCV-tR PCV-tProbe	AGGAGGGCGTTCTGACTGTG ACCGCTACCGTTGGAGAAGG FAM-TCTTCAACACCCGCCTCTCCCGCAC- BHQ*	1537-1556 1616-1635 1581-1605	99**

*The probe is 5′labeled with FAM whereas 3′ labeled with BHQ
**The amplified size is 99bp with primers and probe covering 65bp

10분간 predenaturation 시킨 후, 95℃에서 20초 denuaturation, 56℃에서 1분 annealing을 40회 반복 실시하였고, annealing 반응 중에 Quencher로부터 분리된 fluorescein FAM이 활성화 될 때마다 fluorescence를 탐지하고 처음 탐지된 cycle 수(Ct)는 amplification plots로 표현하였다. Taqman probe real-time PCR 검사로 복제된 증폭산물은 크기가 99bp이며 이 중 65bp는 이 실험에서 제작되어 적용된 primer와 probe가 차지하게 된다.

결 과

Conventional PCR 결과

경남지역의 PCV 2 감염실태를 파악하기 위하여 돼지를 사육하고 있는 480농가를 중심으로 기존 PCR을 이용하여 농장별 양성율을 조사한 결과 총 480농가 가운데 235농가에서 써코바이러스가 확인되어 49.0%의 양성율을 나타내었다. 2005년 10월 사단법인 전국양돈협회에서 조사한 농장감염률 52.6%보다 조금 낮은 수치로 나타났지만, 우리 도 역시 많은 농가에 PCV 2가 감염되어 있다는 것을 알 수 있었다. 농장별 양성율을 돼지 사육 규모별로 비교하였을 때 500두 이상을 사육하는 양돈농가는 380농가 가운데 179농가(47.1%), 500두 미만을 사육하는 양돈농가는 100농가 가운데 56농가(56.0%)에서 써코바이러스가 확인되었다. 복제된 증폭산물을 전기영동 하여 501bp의 특이 유전자를 증폭할 수 있었으며 음성대조군은 모두 음성으로 판정되었다(Fig. 1).

검사방법별 검출한계를 비교하기 위하여 기존 PCR법과 SYBR Green real-time PCR 및 TaqMan probe real-time PCR에 대하여 양성대조군 PCV 2 DNA를 10^0~10^7 copies로 희석하여 검사한 결과 기존 PCR 분석법의 경우 10^3 copies 이상의 농도까지는 양성으로 판정되었으나, 10^2 copies 이하에서는 501bp의 특이 유전자를 확인 할 수 없었다(Fig. 2).

SYBR Green real-time PCR 결과

SYBR Green real-time PCR 반응에서 PCV 2 특이산물을 복제하는 매 cycle마다 SYBR Green fluorescence를 탐지하였으며 40 cycle을 반복한 결과 amplification plots를 확인할 수 있었다. 그리고 탐지된 fluorescence가 특이한 melting temperature로 이루어졌는지 dissociation curve로 검증할 수 있었으며, 음성대조군은 모두 음성으로 판정되었고 양성대조군은 PCV 2 DNA 10^2 copies 이상의 농도에서 양성으로 판정되었다(Fig. 3, 4).

Taqman probe real-time PCR 결과

TaqMan probe real-time PCR 반응에서 PCV 2 특이산물을 복제하는 매 cycle마다 Quencher로부터 분리된 fluorescein FAM을 탐지하였으며 40 cycle을 반복한 결과 amplification plots를 확인할 수 있었으며 음성대조군은 모두 음성으로 판정되었고 양성대조군은 PCV

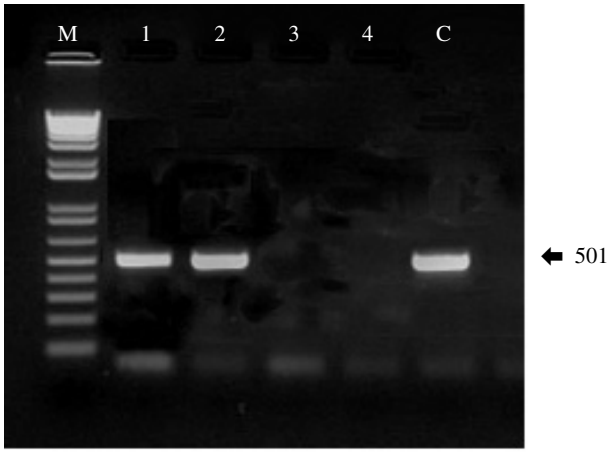

Fig. 1. DNA amplified from ORF2 gene of PCV 2 by conventional PCR. [M: 1kb plus DNA ladder(Invitrogen), Lane 1, 2: positive sample, Lane 3, 4: negative sample, C: positive control (NVRQS)].

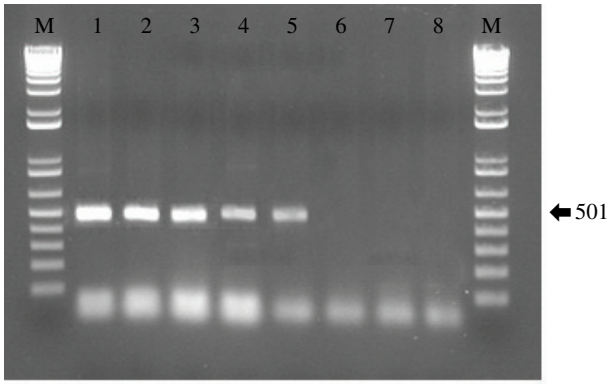

Fig. 2. DNA products obtained by conventional PCR with a serial dilution of positive control. [M: 1kb plus DNA ladder, Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: PCV2 DNA containing 10^7copies, 10^6copies, 10^5copies, 10^4copies, 10^3copies, 10^2 copies, 10^1copies, respectively. Lane 8: Negative control].

2 DNA 10^1 copies 이상의 농도에서 양성으로 판정되었다(Fig. 5).

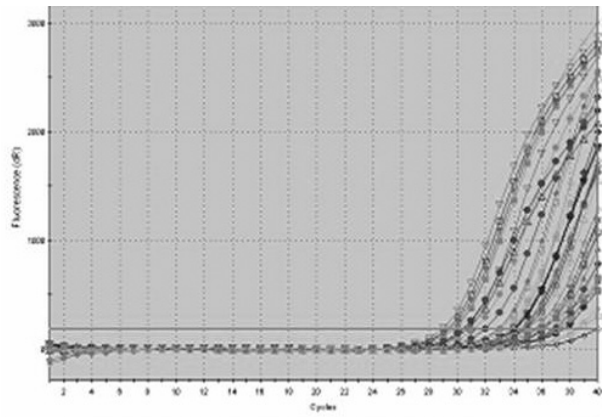

Fig. 3. Amplification plots of SYBR Green real-time PCR products obtained following 40 cycles of amplification.

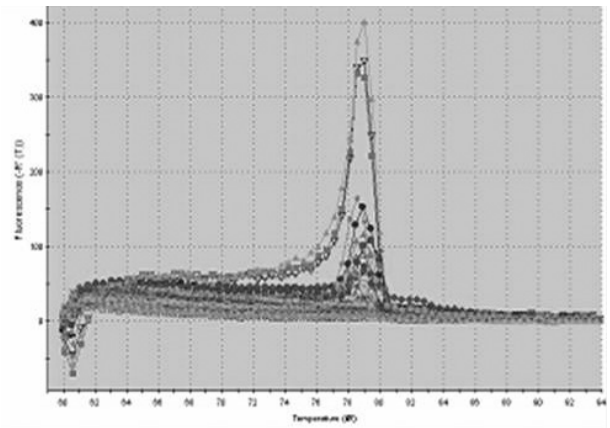

Fig. 4. Dissociation curves subjected the DNA of SYBR Green real-time PCR assay.

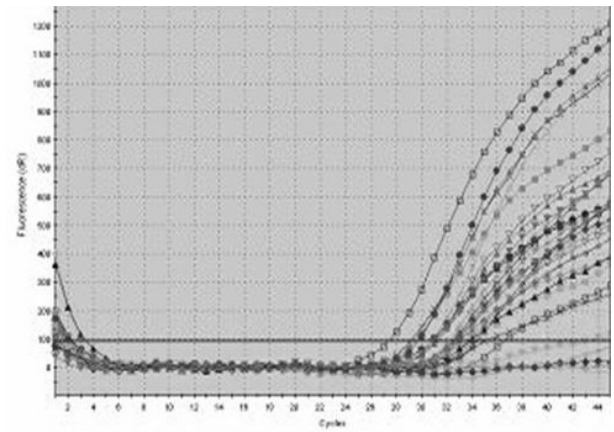

Fig. 5. Amplification plots of Taqman probe real-time PCR products obtained following 40 cycles of amplification.

경남지역의 PCV 2 감염실태 파악을 위하여 기존 PCR을 실시하였을 때 양성 판정된 35농가와 음성 판정된 35농가에서 한 농가당 4～5두씩 총 320두에 대한 시료를 기존 PCR, SYBR Green real-time PCR 및 TaqMan probe real-time PCR에 적용하여 검사방법에 따른 개체별 양성율을 조사한 결과 기존 PCR은 47.2%, SYBR Green real-time PCR은 59.1%, TaqMan probe real-time PCR은 68.8%의 양성율을 보였다.

검사 결과를 방법별로 비교하여 보면 기존 PCR 분석법의 경우 시료 320건 중 151건에서 PCV 2가 검출되었으며 기존 PCR에서 양성으로 판정된 151건 모두 SYBR Green real-time PCR 및 TaqMan probe real-time PCR에서 양성이었다. 그런데 기존 PCR에서 음성으로 판정된 169건 가운데 SYBR Green real-time PCR에서는 38두, TaqMan probe real-time PCR에서는 69두가 양성으로 판정되었다. 검출한계를 비교하기 위하여 양성대조군 PCV 2 DNA를 10^0～10^7 copies로 희석하여 검사하였을 때 기존 PCR 분석법의 경우 10^3 copies 이상의 농도까지 양성으로 판정되었고 SYBR Green real-time PCR의 경우 10^2 copies 이상의 농도까지 양성으로 판정되었으며 TaqMan probe real-time PCR에서는 10^1 copies 까지 양성으로 판정되었다. 즉 TaqMan probe real-time PCR 분석법은 기존 PCR 분석법과 비교하여 PCV 2 검출 시료수를 21%까지 증가시킨 것으로 나타났다(Table 2).

고 찰

PCV 2는 국내의 양돈장에서 PMWS 증상을 보이는 돼지로부터 지속적으로 분리되고 있으며 PCV 2가 PMWS를 일으키는 일차적 원인체인 것으로 추정하고 있다(박과 김, 2004; 박 등, 2004; 김 등, 2003; 김 등, 2004a; 김 등, 2004b; 김 등, 2005). 특히 박과 김(2004) 및 박(2004)은 conventional PCR 검사법을 이용하여 이유자돈전신소모성증후군에 이환된 자돈에서 PCV 2를 분리하였고, 국내에서 분리된 PCV 2에 대하여 유전자염기서열을 분석한 결과 분리주 간의 염기서열이 전체적으로 99.5% 이상 일치되는 것으로 보고한 바 있으며, PCV 1과 PCV 2의 감별진단을 위한 PCR 검사법을 제시하여 전국가축방역기관의 병성감정 진단에 활용되고 있다.

이 연구에서도 PCV 2 감염실태를 파악하기 위한

Table 2. Comparison of Real-time PCR and Conventional PCR by detecting of PCV 2 in swine bloods

Methods	PCR for PCV type 2			
	Total number of samples	Number of positive samples	Positive rate (%)	Detection limits
Conventional PCR	320	151	47.2	10^3 copies
SYBR Green RT PCR	320	189	59.1	10^2 copies
Taqman probe RT PCR	320	220	68.8	10^1 copies

conventional PCR의 primers로 박과 김(2004)이 제시한 sequence를 적용하여 농장별 양성율을 조사하였고 총 480농가 가운데 235농가에서 써코바이러스가 확인되어 49.0%의 양성율을 나타내었다.

사단법인 전국양돈협회에서는 2005년 10월 전국 농장감염률을 52.6%로 보고하였고, 김 등(2003, 2004a)은 경상북도가축위생시험소에 병성감정 의뢰된 돼지를 대상으로 PCV 2의 감염 양상을 조사하여 2003년 6월부터 12월까지 의뢰된 105호의 돼지가검물 210두에 대하여 PCR법으로 검사한 결과 143두에서 PCV 2가 양성으로 판정되어 개체별 양성율이 68.1%, 2004년 10월부터 2005년 2월까지 의뢰된 171건의 돼지에서는 40건에서 PCV 2가 검출되어 양성율이 23.4%인 것으로 보고하였다.

이 연구에서는 검사방법에 따른 개체별 양성율을 조사하였으며 총 320건의 시료를 동시에 적용하였을 때 기존 PCR은 47.2%, SYBR Green real-time PCR은 59.1%, TaqMan probe real-time PCR은 68.8%의 양성율을 보였으며, 기존 PCR에서 음성으로 판정된 169건 가운데 SYBR Green real-time PCR에서는 38두, TaqMan probe real-time PCR에서는 69두가 양성으로 판정된 것을 알 수 있었다. 즉 TaqMan probe real-time PCR 분석법은 기존 PCR 분석법과 비교하여 PCV 2 검출 시료수를 21%까지 증가시킨 것으로 나타났으며 이러한 결과는 검사방법에 따라 DNA 검출한계가 다르기 때문인 것으로 추정된다. 양성대조군 PCV 2 DNA를 $10^0 \sim 10^7$ copies로 희석하여 검출한계를 비교하였을 때 기존 PCR 분석법의 경우에는 시료내의 DNA 농도가 10^3 copies 이상인 경우에만 target 부위를 증폭할 수 있었으나 TaqMan probe real-time PCR에서는 10^1 copies 농도까지 증폭이 가능하여 PCV 2 DNA 검출능력이 매우 뛰어난 것으로 추정된다.

Brunborg 등(2004)은 매우 심한 PMWS 임상증상을 나타내고 있는 돼지에서 혈액과 장간막 림프절 조직을 시료로 TaqMan probe real-time PCR을 실시하여, 혈액 1ml당, 그리고 모든 조직 500ng 당 PCV 2가 10^7 copies 이상으로 정량되었고, PCV 2 및 PMWS를 진단하기위한 시료는 채취하기도 비교적 간편하고, 또한 살아있는 돼지에서도 적용할 수 있는 혈액이 적절하다고 보고하였다.

Chung 등(2005)은 SYBR Green real-time PCR을 이용하여 자연 감염된 돼지에서 PRRSV 및 PCV 2를 진단한 결과 자연감염된 돼지 혈액 1ml 당 PRRSV는 $10^{4.11} \sim 10^{5.05}$ copies로 검출되었고 PCV 2는 $10^{4.24} \sim 10^{4.36}$ copies로 검출되었으며 정량분석이 가능한 real-time PCR 검사법은 연구 분야 뿐 아니라 임상적인 진단에 있어서도 유용한 방법인 것으로 보고하였다.

Yang 등(2007)은 PMWS 이환 돼지 40두에서 채취한 조직 시료에 대하여 SYBR Green real-time PCR을 실시한 결과 500ng 당 PCV 2가 10^6 copies 이상으로 검출되었으며 기존 PCR에서 음성으로 판정되었던 조직 시료가 real-time PCR에서는 양성으로 판정되어 기존 PCR보다 real-time PCR에서 양성율이 15% 증가하였다고 보고하였다. 또한 real-time PCR 검사법은 PCV 2 DNA에 대하여 $10^3 \sim 10^{11}$copies 범위에서 뛰어난 검출력을 가지며 기존 PCR 보다 PCV 2를 진단하는 데 있어 더욱 유용한 방법인 것으로 평가하였다.

Real-time PCR은 전통적인 PCR에 비해 시간이 짧게 걸리고 쉽게 DNA 또는 RNA를 검출 할 수 있으며 증폭과정 동안 축적되는 증폭산물을 실시간으로 확인할 수 있어 세계적으로 널리 도입되고 있다. 또한 real-time PCR은 시료 내의 DNA의 량이 증폭된 PCR 산물이 처음 검출되는 Ct 값을 기초로 산출할 수 있는데 시료의 DNA량은 이미 량을 알고 있는 표준시료를 검사시료와 같이 real-time PCR에 적용하였을 때 표준시료의 Ct 값에 대비하여 산출할 수 있어 시료 내의 DNA 유무를 판정할 수 있을 뿐 아니라 DNA 농도까지 정량적으로 파악할 수 있어 신속하고 정확한 검사법인 것으로 평가되고 있다(Brunborg 등, 2004; Olvera 등, 2004; Chung 등, 2005; Wang 등, 2006).

이 연구에서도 TaqMan probe real-time PCR은 실시간으로 미량의 DNA를 신속하게 검출하였고 시료 내의 DNA 농도까지 파악할 수 있었다. 이러한 결과는 real-time PCR이 단순히 바이러스를 분리하는데 그치

는 것이 아니라 감염의 정도까지 추정할 수 있다는 여러 연구자들의 결과와도 유사한 것으로 판단된다.

결 론

Real-time PCR을 이용하여 돼지써코바이러스 감염증에 대한 진단법을 확립하였다. PCV type 2 감염실태를 파악하기 위하여 경남지역에서 돼지를 사육하고 있는 480농가를 중심으로 기존 PCR 검사법을 이용하여 농장별 양성율을 조사한 결과 총 480농가 가운데 235농가에서 PCV 2가 확인되어 49.0%의 양성율을 나타내었다. 검사방법에 따른 개체별 양성율을 조사한 결과 기존 PCR은 47.2%, SYBR Green real-time PCR은 59.1%, TaqMan probe real-time PCR은 68.8%이었다. 기존 PCR 분석법의 경우 개체별 시료 320건 중 151건에서 PCV 2가 검출되었으며 기존 PCR에서 양성으로 판정된 151건 모두 SYBR Green Real-time PCR 및 TaqMan probe Real-time PCR에서 양성이었다. 그러나 기존 PCR에서 음성으로 판정된 169건 가운데 SYBR Green real-time PCR에서는 38두, TaqMan probe real-time PCR에서는 69두가 양성으로 판정되었다.

검출한계를 비교하기 위하여 양성대조군 PCV 2 DNA를 $10^1 \sim 10^7$ copies로 희석하여 검사하였을 때 기존 PCR 분석법의 경우 10^3 copies 이상의 농도까지 양성으로 판정되었고 SYBR Green real-time PCR의 경우 10^2 copies 이상의 농도까지 양성으로 판정되었으며 TaqMan probe real-time PCR에서는 10^1 copies 까지 양성으로 판정되었다. TaqMan probe real-time PCR은 PCV 2 검출 및 정량에 매우 효과적인 검사법으로 판단된다.

참 고 문 헌

김경미, 정지혜, 민홍기, 이승철, 노인순, 강신영. 2004. 돼지 써코바이러스에 대한 단크론항체 생산 및 진단적 응용. 대한수의학회지 44(2): 259-268.

김영환, 조광현, 김성국, 김순태, 박인화, 손재권, 정종식.2004. 경북지방 돼지에서 이유후전신성소모성증후군 및 porcine circovirus type 2의 감염 양상. 한국가축위생학회지 27(2): 139-146.

김영환, 조광현, 정영석, 박인화, 김정화. 2005. 경북지방 돼지의 유산태아에서 PCV 2 감염률 조사. 한국가축위생학회지 28(3): 267-273.

김재훈, 노인순, 손현주, 진영화, 황의경, 윤경진. 2003. 국내 이유자돈의 써코바이러스 감염에 의한 이유후전신소모성증후군. 대한수의학회지 43(3): 463-469.

박최규, 김현수. 2004. 이유자돈 전신소모성증후군 이환 자돈에서의 바이러스성 원인체 검색 및 porcine circovirus 2 분리동정. 대한수의학회지 44(4): 561-569.

박최규, 이경기, 김현수. 2004. porcine circovirus 2 국내 분리주의 유전적 특성. 대한수의학회지 44(4): 571-579.

Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM. 2004. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome using a TaqManbased real-time PCR. *J Virol Methods* 122: 171-178.

Cheung AK. 2004. Identification of essential and non-essential transcription units for protein synthesis, DNA replication and infectious virus production of *Porcine circovirus type* 1. *Arch Virol* 149: 975-988.

Choi C, Chae C, Clark EG. 2000. Porcine postweaning multisystemic wasting sindrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 12: 151-153.

Chung WB, Chan WH, Chaung HC, Lien Y, Wu CC, Huang YL. 2005. Real-time PCR for quantitation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 in naturally-infected and challenged pigs. *J Virol Methods* 124: 11-19.

Fenaux M, Halbur PG, Haqshenas G, Royer R, Thomas P, Nawagitgul P, Gill M, Toth TE, Meng XJ. 2002. Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: Characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions. *J Virol* 76(2): 541-551.

Fenaux M, Opriessnig T, Halbur PG, Meng XJ. 2003. Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weanling pigs. *J Virol* 77(20): 11232-11243.

Grierson SS, King DP, Sandvik T, Hicks D, Spencer Y, Drew TW, Banks M. 2004. Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK. *Arch Virol* 149: 1171-1183.

Hamel AL, Lin LL, Sachvie C, Grudeski E, Nayar GP. 2000. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can J Vet Res* 64(1): 44-53.

Liu Q, Wang L, Willson P, Babiuk LA. 2000. Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 38(9): 3474-3477.

Mankertz A, Caliskan R, Hattermann K, Hillenbrand B, Kurzendoerfer P, Mueller B, Schmitt C, Steinfeldt T, Finsterbusch T. 2004. Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral repli-

cation. *Vet Microbiol* 98(2): 81-88.

Nawagitgul P, Harms PA, Morozov I, Thacker BJ, Sorden SD, Lekcharoensuk C, Paul PS. 2002. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-baxed enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to PCV. *Clin Diagn Lab Immunol* 9(1): 33-40.

Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M, Segales J, Domingo M. 2004. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J Virol Methods* 117(1): 75-80.

Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor D. 1999. Diseases of swine. 8th Eds. Iowa State University Press, Ames: 119-124.

Wang X, Jiang W, Jiang P, Li Y, Feng Z, Xu J. 2006. Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus 2 (PCV 2) in mice. *Vaccine* 24(16): 3374-3380.