

배양세포에서 Semi-quantitative RT-PCR에 의한 조류인플루엔자 H9N2의 전사활성 분석 최적 시기 결정 및 전사체 분석

나기윤¹ · 이영민² · 변승준³ · 전익수⁴ · 박종현⁵ · 조인수⁵ · 주이석⁵ · 이윤정⁵ · 권준현⁵ · 구용범^{1*}

¹인제대학교 생명과학부, ²충북대학교 의과대학 미생물학교실, ³농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오공학과, ⁴농촌진흥청 국립축산과학원 기획조정과, ⁵국립수의과학검역원

조류인플루엔자 바이러스 mRNA의 전사는 감염 동안에 시간적으로 조절되어진다. 감염 후 세포 내에서 증식된 바이러스가 방출되어 세포를 다시 감염하게 되면 전사 수준 분석에 오차가 발생할 수 있으므로 바이러스가 방출되기 이전에 전사 수준의 측정이 이루어져야 한다. 본 연구에서는 조류인플루엔자 H9N2를 감염시킨 닭의 섬유아세포주 UMNSAH/DF-1에서 바이러스 감염 후 증식된 바이러스의 방출까지의 시간을 측정하기 위하여 배양액 중에 방출되는 바이러스 RNA 계층 수준을 semi-quantitative RT-PCR에 의해 측정하였다. 배양액 중의 바이러스 RNA 계층의 분리 과정에서 발생할 수 있는 RNA 회수율의 오차를 보정하기 위해 mouse의 전체 RNA를 배양액 시료에 넣어서 바이러스 RNA 분리에 carrier로 사용하고 그 속에 포함된 mouse의 GAPDH를 RNA를 역전사 반응 및 PCR의 내부 대조 RNA로 사용하였다. 그 결과 감염 후 방출까지 16~20시간이 소요됨을 알 수 있었다. 따라서 감염 후 12시간 후에 세포 내에서 합성된 8종의 전사체의 수준을 측정하였다. 8종의 mRNA 중 PA를 제외한 7종의 mRNA (HA, NA, PB1, PB2, NP, M, NS를 암호화하는 mRNA)는 뚜렷한 증폭 band를 보였으며, 이것은 이들이 전사활성 측정에 사용될 수 있는 것으로 나타났다. 이상과 같은 전사수준의 측정 방법은 조류인플루엔자 바이러스의 RNA polymerase를 표적으로 한 항바이러스제의 검색에 사용할 수 있을 것으로 보인다.

Key words □ avian influenza virus, H9N2, RT-PCR

조류인플루엔자 바이러스는 A형 인플루엔자 바이러스로서, 8종의 negative strand RNA 계층을 갖고 있다. 이 바이러스는 표면항원 단백질인 hemagglutinin (HA)와 neuraminidase (NA)의 종류에 따라서 서로 다른 아형으로 존재할 수 있으며, 16가지 HA와 9가지 NA가 자연계에 존재하고 있으므로 그 두 가지의 조합에 의해 총 144종의 아형이 존재할 수 있으며, 그 중 다수의 조합이 자연계에서 확인되고 있다(8). 따라서 새로운 아형이 발생할 때마다 새로운 백신의 대량생산이 요구되고 있으며(2). 동일한 아형이라고 할지라도 돌연변이에 의해 그 항원성이 달라지므로 변종에 따라서 백신의 효력이 다를 수 있다. 이러한 문제에 대한 대책의 일환으로 모든 조류인플루엔자에 적용되는 항바이러스제의 개발이 시도되고 있으며(1, 3, 6, 10), 이러한 항바이러스제의 개발은 NA, RNA polymerase 등 모든 조류인플루엔자에 공통적인 기능 및 구조를 표적으로 개발되어야 한다. 최근에 서로 다른 아형에 공통적인 구조가 HA에서 발견되어 그 공통적인 구조를 표적으로 한 단일사슬 항체의 개발에 대한 보고가 있으며(9), NP와 상호작용하는 단일 사슬 항체에 의한 바이러스 복제 억제에 관하여 보고된 바 있다(5).

두 가지 표면 항원을 제외한 나머지 6종의 유전자는 서로 다

른 아형의 조류인플루엔자 바이러스에 공통적이며, 변이가 적은 편이다. 특히, RNA polymerase는 바이러스의 증식에 매우 중요한 역할을 수행하므로 항바이러스제의 개발에 있어서 좋은 표적이라고 할 수 있다.

본 연구에서는 배양세포 UMNSAH/DF-1에서 저병원성 조류인플루엔자 H9N2의 8종의 유전자로부터 생산된 전사체의 양을 semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (semi-quantitative RT-PCR)에 의해 측정함으로써 RNA polymerase의 전사 활성 측정법을 확립하였다. 이 방법은 RNA polymerase를 표적으로 한 항바이러스제의 탐색에 사용될 수 있을 것이다.

재료 및 방법

바이러스의 배양

저병원성 조류인플루엔자 바이러스 H9N2(A/Ck/kr/MS96/96)는 국립수의과학검역원에서 분양받았으며, 9일간 배양한 유정란에 접종하여 증식한 다음, 요막액을 채취하여 -70°C에 보관하였다.

세포배양 및 바이러스 감염

닭의 섬유아세포주 UMNSAH/DF-1 (ATCC cat no. CRL 12203)은 American Type Culture Collection (USA)으로부터 구입하였으며, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 10% FBS가 첨가된

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-55-320-3266, Fax: 82-55-336-7706
E-mail: mbkooyb@inje.ac.kr

DMEM 배지에서 배양하였다. 24 well 배양접시에 80% 증식하였을 때, 1 ml의 PBS로 세척하고 요막액을 10~100,000배 PBS에 희석한 바이러스 용액 100 µl를 접종하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양 후 1 ml의 PBS로 3회 세척하고 DMEM 배지 1 ml를 넣은 다음 정해진 시간 동안 배양하여 필요에 따라 상층액 또는 세포를 회수하여 RNA 분리에 사용하였다.

RNA 분리 및 semi-quantitative RT-PCR

세포 배양액 및 세포로부터 QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN, USA)을 사용하여 RNA를 분리하였다. 배양액의 경우 배양액 140 µl에 mouse의 간으로부터 분리한 전체 RNA 0.5 µg을 첨가하여 바이러스 RNA를 분리하였다. 분리한 배양액 RNA 시료 10 µl (1 µg)을 50 µl의 역전사 반응액에서 universal primer (Uni 12, AGCAAAAGCAGG)(4) 0.5 µg, oligo(dT)₁₅ (Promega, WI, USA) 0.5 µg, 100 unit MMLV reverse transcriptase (Bioneer, Korea)와 42°C에서 1시간 반응하여 역전사 반응을 수행하였다. 배양세포에서 RNA는 Trizol (Invitrogen, USA)를 사용하여 분리하였다. 배양세포에서 분리한 전체 RNA 10 µl (1 µg)의 경우는 oligo(dT)₁₅를 프라이머로 사용하여 동일한 조건에서 역전사하였다. 역전사한 시료 1 µl를 25 µl 부피의 PCR 반응액에서 Table 1에 표시된 합성 oligonucleotide를 이용하여 증폭하였다. 사용한 Taq polymerase는 Genetbio (Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 증폭은 94°C 10분 배양 후, 94°C 30초, 57°C 30초, 72°C 30초를 25번 반복하고, 마지막에 72°C에서 7분간 배양하였

다. 중합효소연쇄반응 산물은 1.5% 아가로스 전기영동에 의해 분석하였다.

결 과

UMNSAH/DF-1 세포에서 H9N2의 방출 시간 측정

바이러스 감염 후 방출되기 바로 직전에 세포 내의 바이러스 mRNA의 수준이 높은 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 UMNSAH/DF-1 세포에 H9N2 (요막액을 100배 희석한 것)를 감염시키고 난 후 4시간 간격으로 배양액 속으로 방출되는 바이러스 입자의 수준을 바이러스 게놈 RNA의 semi-quantitative RT-PCR에 의해 측정하였다. 8종의 RNA 게놈 중에서 NP 유전자 게놈 RNA를 증폭하였다. 배양액으로 방출된 바이러스 입자의 RNA를 분리할 때 첨가한 mouse 전체 RNA 중에 있는 GAPDH를 동시에 증폭하였으며, 각 시료에 따른 RNA의 회수율 및 역전사 효율을 보정하기 위하여 증폭된 GAPDH의 수준을 시료별로 동일하게 맞추는 후 PCR을 수행하였다. Semi-quantitative RT-PCR의 결과 바이러스의 방출이 감염 후 16~20시간 사이에 시작되는 것으로 나타났다(Fig. 1). 따라서 본 연구에서는 그 이전인 12시간을 바이러스 mRNA 추출 시간으로 결정하였다.

바이러스 유전자별 mRNA 수준 측정

UMNSAH/DF-1 세포에 10~100,000배로 희석한 H9N2를 감염시키고 세포를 12시간 후에 회수하였다. 세포 전체 RNA를 추출

Table 1. List of synthetic oligonucleotides used in this study

Name	Sequence	Use	Size (bp)
PB2RTf	ATT TGC CGC AGC CCC ACC	RT-PCR for PB2 mRNA	217
PB2RTr	CTC TCA ATA CTG CGG ATT CCA CT		
PB1RTf	CGC AAA TTC AAA CGA GGA GAT C	RT-PCR for PB1 mRNA	218
PB1RTr	CTC AAT TTC CTT ATG ACT GAC AAA C		
PARTf	GAA CTT CTC CAG CCT TGA AAA C	RT-PCR for PA mRNA	181
PARTr	CTT TGA TCG TTG GGA GCA GG		
NPRTf	AGA GAG GGG AAA TGG ATG AGA G	RT-PCR for NP mRNA	191
NPRTr	CTG GGG TCC ATC CCA G		
NSRTf	GGC AGG TTC CCT TTG CAT CA	RT-PCR for NS mRNA	217
NSRTr	TCC GAT GAG AGG ACC CCA ATT G		
MRTf	CGA GGA CTG CAG CGT AGA C	RT-PCR for M mRNA	197
MRTr	CCC ATC CTG TTG TAT ATG AG		
NARTf	AGC ATT GAT TCC AGT TAT GTG TG	RT-PCR for NA mRNA	204
NARTr	CCT GAA AGT CTC ATA ACC TGA G		
HARTf	CAC CAC CCA CCT ACT GAT AC	RT-PCR for HA mRNA	194
HARTr	GAT CTC ACT CGC AGT GTC TG		
GAPDHf	GAG TCA ACG GAT TTG GCC GT	RT-PCR for GAPDH mRNA	309
GAPD Hr	CAC AAA CAT GGG GGC ATC AG		
Uni 12	AGC AAA AGC AGG	Reverse transcription	

* GAPDHf and GAPD Hr were used for amplification of chicken GAPDH mRNA as well as mouse GAPDH mRNA

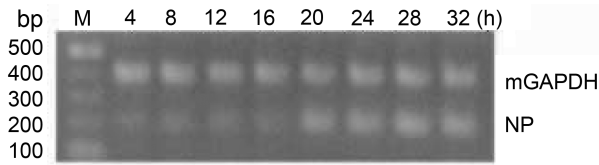


Fig. 1. Determination of interval of viral release after infection in UMNSAH/DF-1 cells. Cells were infected with 100-fold diluted H9N2 (allantoic fluid) as described in the 'Materials and Methods'. Culture medium was taken at indicated time points after infection and mixed with mouse total RNA as carrier used for viral RNA isolation. Isolated RNA was reverse transcribed using uni12 primer and oligo(dT)₁₅. Polymerase chain reaction was carried out for NP RNA as well as mouse GAPDH (internal control).

하여 semi-quantitative RT-PCR를 사용하여 분석한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 증폭 횟수는 25로 하였다. 그 결과 PA를 제외한 나머지 7종의 mRNA의 수준은 해당 증폭 조건에서 뚜렷한 band를 보여주었다. 요막액의 희석배수에 따른 증폭정도를 고려할 때, 10, 100, 1,000배 희석하여 접종하였을 때 증폭된 band를 관찰할 수 있었다.

토 론

본 연구와 유사한 연구 결과가 Uchide 등(11)에 의해 보고된 바 있다. 그들은 인플루엔자를 감염한 배양세포에서 HA 게놈 RNA 및 HA mRNA의 수준을 semi-quantitative RT-PCR과 southern hybridization으로 측정하였다. 그 결과에 의하면 증식한 바이러스가 감염 후 12시간 후에 방출되기 시작하였으며, 그 시기에 HA mRNA의 수준이 최고였으며, 그 이후에는 점차 감소

하였다. 반면에 HA 게놈 RNA는 48시간까지 계속 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 연구 결과에 따라서 본 연구에서는 증식한 바이러스가 방출되는 시간을 semi-quantitative RT-PCR에 의해 결정하고 그 직전에(mRNA가 최고 수준으로 존재할 때) mRNA를 분리하여 실험에 사용하고자 하였다. 그러나 인플루엔자 바이러스의 감염 후 전사되어지는 mRNA는 유전자에 따라서 그 전사 시기가 서로 다르다는 보고가 있다. Shapiro 등(7)에 의하면 NS1 mRNA는 감염 초기에 발견되어지며, M mRNA는 감염 후기에 발견된다고 보고하였다. 따라서 감염 후 바이러스 mRNA 분리의 최적 시기는 mRNA에 따라 다를 수 있다. 본 연구에서는 감염 후 12시간 후에 분리한 mRNA를 대상으로 8종 mRNA 모두를 대상으로 RT-PCR을 수행하였다. 그 중 PA mRNA를 제외한 7종의 mRNA에 대해서는 만족할 만한 PCR 산물을 얻었다. PA mRNA의 경우 감염 전반에 걸쳐 그 수준이 낮은지 아니면 높은 수준으로 존재하는 시기가 있는지 더 연구해야 할 것이다.

요막액에서 증식한 조류인플루엔자의 최적 희석 배수는 실험적으로 결정하여야 한다. 본 연구에서는 요막액 원액과 10배 희석한 것을 감염한 세포에서 방출되는 바이러스의 양을 NP 유전자의 게놈을 semi-quantitative RT-PCR로 증폭하여 측정할 결과 큰 차이가 없었지만 10배 희석액과 100배 희석액을 비교하였을 때 감염 후 방출되는 바이러스의 양이 차이가 있는 것으로 나타났다(자료 미제시). 따라서 포화 감염을 일으키는 희석배수는 10배와 100배 사이일 것으로 보인다. 최적 바이러스 농도는 포화 감염을 시킬 수 있는 농도보다 조금 낮은 농도가 될 것으로 추정된다. 본 연구에서는 100배 희석한 요막액을 배양세포에 감염하고 12시간 후에 방출되는 바이러스 RNA 게놈의 semi-quantitative RT-PCR을 수행하였다. 반면에 배양세포 내에서 전사되어지는 mRNA의 semi-quantitative RT-PCR을 위해서는 감염 바이러스의 양에 따른 8종 유전자의 mRNA의 수준을 보기 위하여 요막액을 10~100,000배 희석한 것을 배양세포에 접종하였다.

바이러스 RNA polymerase에 의해 전사된 8종 mRNA로부터 RT-PCR에 의해 증폭된 산물의 양의 차이가 반드시 세포 내의 바이러스 mRNA 수준 차이를 나타내는 것은 아닐 것이다. 그 이유는 PCR에 사용된 주형 및 프라이머에 따라 증폭 효율에 차이가 있을 수 있기 때문이다. 세포 내에 있는 바이러스 mRNA 종류에 따른 양적 비교는 본 연구에서는 수행하지 않았으며, northern blot 분석이나 quantitative realtime RT-PCR에 의해 측정할 수 있을 것이다. 본 연구에서 사용한 프라이머를 사용하였을 때 PB1, PB2, NS mRNA의 semi-quantitative RT-PCR 산물이 다른 유전자 mRNA의 증폭 산물보다 많은 것으로 보였다. 따라서 이들 중 하나 혹은 그 이상의 mRNA를 대상으로 semi-quantitative RT-PCR을 실행하여 RNA polymerase 활성을 측정하면 될 것이다.

새로운 항인플루엔자 제제의 개발 표적으로서 RNA polymerase가 대두되고 있다(3, 6). 실제로 RNA polymerase에 대한 RNAi 혹은 단일사슬 항체 등에 의한 인플루엔자 바이러스의 RNA의 복제 억제에 관한 연구 결과가 보고되고 있다(1, 10).

Dilution	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
PB2	band	band	band	band	band
PB1	band	band	band	band	band
PA	band	band	band	band	band
NP	band	band	band	band	band
M	band	band	band	band	band
NS	band	band	band	band	band
NA	band	band	band	band	band
HA	band	band	band	band	band
GAPDH	band	band	band	band	band

Fig. 2. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) of viral mRNAs. Total RNA was isolated from cells infected with indicated dilutions of allantoic fluid stock of H9N2 influenza virus. After 12 h incubation cells were harvested and used for RNA isolation. RT-PCR was performed as described in the 'Materials and Methods'.

본 연구에서는 조류인플루엔자 바이러스의 mRNA의 수준을 semi-quantitative RT-PCR로 측정함으로써 바이러스 RNA polymerase의 활성을 보고자 하였다. 그러나 동일한 시료를 이용하여 realtime RT-PCR을 이용하면 더 좋은 결과를 얻을 수 있을 것이다. 실제로 본 연구실에서는 이러한 방법을 바이러스 전사 억제 예상 물질을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포에서의 바이러스 mRNA의 전사활성 측정에 성공적으로 적용하고 있다. 이러한 방법은 바이러스 RNA polymerase를 표적으로 한 항바이러스제의 개발에 사용될 수 있을 것이다.

감사의 말

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 20070401-034-027) 및 2006 인제대학교 학술연구조성비의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

- Cheng, C., L. Yao, A. Chen, R. Jia, L. Huan, J. Guo, H. Bo, Y. Shu, and Z. Zhang. 2009. Inhibitory effect of small interfering RNA specific for a novel candidate target in PB1 gene of influenza A virus. *J. Drug Target.* 17, 133-139.
- Collin, N. and X. de Radigis. 2009. Vaccine production capacity for seasonal and pandemic (H1N1) 2009 influenza. *Vaccine* 27, 5184-5186.
- Gong, J., H. Fang, M. Li, Y. Liu, K. Yang, Y. Liu, and W. Xu. 2009. Potential targets and their relevant inhibitors in anti-influenza fields. *Curr. Med. Chem.* 16, 3716-3739.
- Hoffmann, E., J. Stech, Y. Guan, R.G. Webster, and D.R. Perez. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virol.* 146, 2275-2289.
- Mukhtar, M.M., S. Li, W. Li, T. Wan, Y. Mu, W. Wei, L. Kang, S.T. Rasool, Y. Xiao, Y. Zhu, and J. Wu. 2009. Single-chain intracellular antibodies inhibit influenza virus replication by disrupting interaction of proteins involved in viral replication and transcription. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 41, 554-560.
- Nakazawa, M., S.E. Kadowaki, I. Watanabe, Y. Kadowaki, M. Takei, and H. Fukuda. 2008. PA subunit of RNA polymerase as a promising target for anti-influenza virus agents. *Antiviral Res.* 78, 194-201.
- Shapiro, G.I., T. Gurney, Jr., and R.M. Krug. 1987. Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *J. Virol.* 61, 764-773.
- Spackman, E. 2008. A brief introduction to the avian influenza virus. *Methods Mol. Biol.* 436, 1-6.
- Sui, J., W.C. Hwang, S. Perez, G. Wei, D. Aird, L.M. Chen, E. Santelli, B. Stec, G. Cadwell, M. Ali, H. Wan, A. Murakami, A. Yammanuru, T. Han, N.J. Cox, L.A. Bankston, R.O. Donis, R.C. Liddington, and W.A. Marasco. 2009. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 265-273.
- Thathaisong, U., S. Maneewatch, K. Kulkeaw, K. Thueng-In, O. Pongpair, P. Srimanote, T. Songserm, P. Tongtawe, P. Tapchaisri, and W. Chaicumpa. 2008. Human monoclonal single chain antibodies (HuScFv) that bind to the polymerase proteins of influenza A virus. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 26, 23-35.
- Uchide, N., K. Ohyama, T. Bessho, and T. Yamakawa. 2002. Semi-quantitative RT-PCR-based assay, improved by Southern hybridization technique, for polarity-specific influenza virus RNAs in cultured cells. *J. Virol. Methods* 106, 125-134.

(Received September 7, 2009/Accepted September 25, 2009)

ABSTRACT : Determination of an Optimal Time Point for Analyzing Transcriptional Activity and Analysis of Transcripts of Avian Influenza Virus H9N2 in Cultured Cell

Giyoun Na¹, Young-Min Lee², Sung June Byun³, Ik-Soo Jeon⁴, Jong-Hyeon Park⁵, In-Soo Cho⁵, Yi-Seok Joo⁵, Yun-Jung Lee⁵, Jun-Hun Kwon⁵, and Yongbum Koo^{1*} (¹School of Biological Sciences, Inje University, Inje University, Gimhae 621-749, Republic of Korea, ²Department of Microbiology, College of Medicine, Chungbuk University, Chungju 361-763, Republic of Korea, ³Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, Suwon 441-706, Republic of Korea, ⁴Planning and Coordination Division, National Institute of Animal Science, Suwon 441-706, Republic of Korea ⁵National Veterinary Research and Quarantine Services, Anyang 430-757, Republic of Korea)

The transcription of mRNA of avian influenza virus is regulated temporally during infection. Therefore, the measurement of transcript level in host cells should be performed before viral release from host cells because

errors can occur in the analysis of the transcript levels if the viruses released from the infected cells re-infect cells. In this study, the timing of viral release was determined by measuring the level of viral RNA from viruses released from H9N2-infected chicken fibroblast cell line UMNSAH/DF-1 by semi-quantitative RT-PCR. The viral genomic RNA was isolated together with mouse total RNA which was added to the collected medium as carrier to monitor the viral RNA recovery and to use its GAPDH as an internal control for normalizing reverse transcription reaction as well as PCR reaction. It was found that viral release of H9N2 in the chicken fibroblast cell line UMNSAH/DF-1 took between 16 and 20 h after infection. We measured all 8 viral mRNA levels. Of the 8 transcripts, 7 species of viral mRNAs (each encoding HA, NA, PB1, PB2, NP, M, NS, respectively) except PA mRNA showed robust amplification, indicating these mRNA can be used as targets for amplification to measure transcript levels. These results altogether suggest that the method in this study can be used for screening antiviral materials against viral RNA polymerase as a therapeutic target.