

Ultra Real-Time PCR을 활용한 Avian Influenza Virus Subtype의 조기진단법

김상태^{1*} · 김영균² · 김장수³

¹이화여자대학교 생명약학부, ²국민대학교 삼림대학 삼림생명공학과, ³고려대학교 구로병원 진단검사의학과

Early Diagnostic Method of Avian Influenza Virus Subtype Using Ultra Real-Time PCR

Sang-Tae Kim^{1*}, Young Kyoon Kim², and Jang Su Kim³

¹Division of Biological and Pharmaceutical, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Republic of Korea

²Department of Forest Products, College of Forest Science, Kookmin University, Seoul 136-702, Republic of Korea

³Department of Laboratory Medicine, Korea University Guro Hospital, Seoul 152-703, Republic of Korea

(Received January 14, 2011 / Accepted January 26, 2011)

This ultra real-time PCR (UPCR) based diagnosis system for avian influenza A virus (AIV) subtype was designed. The target primer in this study was derived from H5N1 subtype-specific 133 bp partial gene of hemagglutinin (HA), and was synthesized by using PCR-based gene synthesis on the ground of safety. UPCR was operated by Mini-Opticon Q-PCR Quantitative Thermal Cycler using aptamer-based molecular beacon, total 10 µl of reaction mixture with extraordinarily short time in each steps in PCR. The detection including UPCR and analysis of melting temperature was totally operated within 15 min. The AIV-specific 133 bp PCR product was correctly amplified until 5 molecules of HA gene as minimum of templates. This kind of PCR was drafted as UPCR in this study and it could be used to detect not only AIV subtype, but also other pathogens using UPCR-based diagnosis.

Keywords: avian influenza virus, hemagglutinin, molecular beacon, ReadyCell

독감을 유발하는 바이러스는 전염성이 매우 높은 급성 호흡기 병원체로, 인간형 인플루엔자 바이러스(AI: influenza virus)와 조류독감바이러스(AVI: avian influenza virus)에 의해 발병된다. 인플루엔자는 해마다 주기적으로 변형 바이러스에 의해 계절형 독감을 발생시키며, 심한 경우 2-3주 내에 통상 인구의 10-20%가 감염될 정도로 높은 유행성을 보인다(4, 10, 17, 22). 인플루엔자 바이러스는 바이러스의 분류에서 *Orthomyxoviridae* 과에 속하며, spherical형과 filamentous형으로 존재하는 비리온(virion)으로 50-120 nm 크기의 RNA virus로 5종류의 Influenzavirus A, Influenzavirus B, Influenzavirus C, Isavirus, and Thogotovirus으로 나누어진다(28). 주로 조류, 인간 그리고 기타 동물(야생조류, 고양이과, 가금류)에 감염시킨다. 현재까지 알려진 A형 독감바이러스는 H1N1, H1N2, H2N2, H3N1, H3N2, H3N8, H5N1, H5N2, H5N3, H5N8, H5N9, H7N1, H7N2, H7N3, H7N4, H7N7,

H9N2, H10N7이 알려져 있다(27). 유전체는 negative single strand RNA로 8개의 절편으로 polymerase를 암호화한 PB1, PB2, PA, 그리고 glycoprotein인 hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA)와 유전물질을 보호하는 NP와 M, 비구조 단백질인 NS1과 NS2 등으로 구성되어 있다(11). 특히 AIV는 nucleoprotein과 matrix (M1) protein의 항원성에 의해 모두 A형으로 분류되며, 그 이하 아형의 분류는 두 종의 표면 glycoprotein인 HA과 NA의 항원성에 의해 결정된다(5, 7). 1918년대에 유럽에서 가장 강하게 전파된 H1N1 경우처럼 현재까지 16종류의 HA와 9종류의 NA가 인플루엔자 A형 바이러스에서 밝혀졌으며, HA와 NA의 조합에 의해 144종의 다양한 항원을 지녀서 주기 별로 일정한 병원성을 나타내기도 하였다(23). 한편 과거 1918년 스페인독감바이러스의 경우 처음에는 가금류나 조류의 SA2,3Gal (sialic acid 2-3galactose) 수용체에 결합하여 감염을 전파시켰지만 점점 돼지를 거쳐 인간의 SA2,6Gal (sialic acid 2-6galactose) 수용체에 진화된 H1N1가, 아시아에서는 H2N2, 홍콩독감은 H3N2, 현재에는 전염성이 가장 강한 H5N1, 다양한 동물에 감염성을 보이는

* For correspondence. E-mail: hsvkst@empal.com; Tel: +82-2-3277-4161; Fax: +82-2-3277-3760

H7N7가, 또한 H1N2 같은 인간과 동물 전체에 위협을 가하는 병원성 바이러스가 전파되고 있다(21). 일반적으로 HA와 NA 아형 바이러스들은 철새에서 대부분 발견되는데 반해, 3종의 HA아형(H1-H3)과 2개의 NA아형(N1과 N2)은 돼지를 중간매개체로 혹은 동남아 지역에서는 직접 사람에게도 발견이 되었다(24).

지난 몇 십년 동안에는 AIV H5N1, H7N7, H7N3, H9N2 등 다양한 아형의 인플루엔자 A형 바이러스(*influenza A virus*)가 사람에게 감염을 유발한 보고가 많았다(13). 특히 H5N1은 종래 미약한 병원성의 바이러스로 알려져 왔으나, 최근 몇 년간 닭에서 100%에 가까운 치사율을 보이는 고병원성 H5N1의 변이형이 발견되었다. 1997년, 처음으로 AIV에 의한 사람의 감염이 확인되었으며, 18명의 발병자 중 6명이 사망하였고, 이 조류독감의 전파를 막기 위해 대량의 가금류들을 도살하기도 하였다(1, 19). 이후 2001년부터 현재까지 AI는 국내의 음성지역을 포함하여, 베트남, 태국, 중국 등 동아시아 각지에서 지속적으로 발생되었으며, 고병원성 AIV H5N1은 가금류, 사람뿐 만이 아니라 호랑이, 고양이, 돼지 등에서도 발견될 정도로 전파되었다. 특히 이 병원체에 의한 높은 치사율(2003년 베트남 93명의 감염자 중 42명 사망, 2006년 태국 22명 감염자 중 14명 사망 등)은 해당국의 축산업뿐 아니라 경제적으로 심각한 피해를 야기하였다(8, 14, 19). 이 심각한 병원체인 H5N1의 조기 진단은 가금류등 축산업의 질병 제어를 위하여, 그리고 사람에게 전파 또는 사람간의 전파를 조기 차단하기 위하여 그 중요성이 크게 증대되고 있다. 진단 대상도 가금류 전염병의 조기 발견 및 확진을 위한 수의학적 진단 뿐 아니라, 사람에 대한 진단으로 확대되었다. 병원, 실험실 검사법뿐 아니라, 공항 또는 항만 같은 지역에서 검역 필요성이 절실히 요구되고 있다. 현재 실험적으로 많이 적용하고 있는 AIV에 대한 진단법은 계란을 이용한 바이러스 배양법(Plaque assay), 중합효소연쇄 반응법(PCR; Polymerase Chain Reaction), 혈구응집억제 시험법(HI; Hemagglutination Inhibition), 면역형광법(IFA; Immunofluorescence Assay), 효소면역 시험법(ELISA; Enzyme Linked Immunosorbant Assay) 등이 있다(3, 25, 26). 이중 바이러스 배양법과 HI IFA와 ELISA는 민감도가 높고 정확하나 상대적으로 많은 시간을 필요한 점이 단점으로 보고되고 있다. 이런 방법에 비해 PCR법은 특이적이고 신속하게 다량의 검체를 정확히 진단할 수 있다는 장점이 있다. 또 PCR 기술이 발달함에 따라 다양하게 AIV의 진단이 가능한 multiplex PCR, Real-time PCR, NASBA, PCR-ELISA 등이 알려져 있다(9). 하지만 이러한 PCR을 이용한 진단법은 혈청을 이용한 간이진단법(Immunochromatography) 등에 비하여 정확성과 민감성은 뛰어나지만, 신속성, 간편성 및 현장성이 떨어지기에, 질병의 전파를 막기 위하여 대중적 밀집장소인 공항 및 항만에서의 검역에는 적당하지 못하고, 병원에서만 적용할 수 있다는 한계점이 있다.

한편 기존 항체가 가지는 비용과, 생산어려움이 많고 변형 또한 용이하지 못한 반면 압타머(aptamer)는 단일가닥 DNA 내지 RNA 같은 약 20-80 nt 핵산분자로 구성되어 필요에 의

해 변형이 용이한 장점을 가지고 있다. 또한 항체에 비해 매우 안정성이 우수하고 실온상태에서 보관이나 운반이 가능하며 멸균 후에도 기능을 유지할 수 있다는 장점이 있다. 한편 변형 후에도 핵산이 마치 리간드-수용체처럼 또는 항원-항체반응에서와 동일한 표적단백질의 활성부위에 신속히 재생이 가능하다는 점이다. 그리고 장시간 또는 반복사용이 요구되는 진단 측면에서 항체대용의 우수한 친화력을 가지는 성질로 임상 적용이 가능하다는 점이다(15, 20). 또한 특성상 상대적으로 작은 크기로도 커다란 단백질이 작용할 수 없는 부위에 선택적이며 생체 내에서 면역반응을 일으키지 않는 매우 강한 결합력을 가질 수 있다는 점이다. 따라서 이런 생체 친화적인 특성을 이용하여 항바이러스제, 뇌암 및 간암 같은 항암제의 적용 및 여러 질병의 진단분야에서 응용이 가능하다(6, 18, 29). 따라서 본 논문에 적용되는 기술인 압타머를 기반으로 한 molecular beacons 시스템은 핵산합성, 유전자발현의 추적 및 생체 내에서 형광학적으로 탐지할 수 있는 양말단에 fluorophore와 quencher를 부착시켜 표적에 반응하여 서로 해리되면 형광이 띠도록 DNA, RNA 및 정량 PCR 기법에 이용하고자 한다.

그러므로, 본 연구에서는 AIV의 존재를 Real-time PCR에 근거한 진단법으로 압타머 기반한 molecular beacon 시스템을 활용하여 수분내로 진단하는 방법을 개발하였는데 기존의 Real-time PCR과 구분하여 특이적 Ultra Real-time PCR법이라 명명하였고 2차적으로 정밀한 분석을 위한 공초점 현미경분석법을 융합하여 분석한 것이 차별화된 방법이다. 이 진단법은 AI의 유전자를 정량적으로 검색할 수 있을 뿐 아니라, 다량의 시료를 대상으로, 최소 수분~수십분 이내에 동시에 감염유무를 확인할 수 있는 신종플루 아형에 대한 비주열하게 현장에 적용 가능한 진단법이라 사료되어 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

RNA 추출 및 cDNA 합성

본 연구에서는 독섬, 탄천 및 안양천에서 채집한 철새조류의 분뇨와 사체로부터 viral RNA를 추출하기 위해 야외 검체 0.2 g을 PBS (phosphate buffered saline) 300 µl에 넣고 섞은 다음 vortex로 현탁 시킨 후 10,000 rpm으로 원심분리하였다. 상등액을 Gene-spin™ kit (iNtRON Biotechnology, Korea)으로 viral RNA를 추출하거나 바이러스량이 적을 경우 R-Mix ReadyCell (Mink Lung/A549 세포주)을 이용하여 virus를 증폭시켜 상기방법으로 추출하였다(12). 추출한 viral RNA는 random hexamer와 murine leukemia virus reverse transcriptase (Revert Aid M-MuLV RT, Fermentas, Canada)을 이용하여 역전사과정을 25분 동안 37°C에서 random hexamers 1 µl (0.2 µg/µl), total RNA 7.5 µl (100 ng), murine leukemia virus reverse transcriptase 1 µl (200 U/µl), RNase inhibitor 1 µl (20 U/µl), dNTP (10 mM) 2 µl, 5× RT buffer (4 mM MgCl₂) 그리고 H₂O 3.5 µl을 혼합하여 수행하였다. 반응 혼합물은 사용하기 전까지 -20°C에서 보관하였다.

961 ACCATCGGGG AATGCCCAA ATATGTGAAA TCAAACAGAT TAGTCCTTGC GACTGGACTC
 1021 AGAATACCC CTCAGAGAGA GAGAAGAAGA AAAAAGAGAG GACTATTTGG AGCTATAGCA
 1081 GGTTTTATAG AGGGAGGATG GCAGGGAATG GTAGATGGTT GGTATGGGTA CCACCATAGC

Fig. 1. DNA sequences of an artificial synthesis of hemagglutinin genes (133 bp, partial sequence). The underline represent two position of AIV detection primers pairs named sense and reverse primer, 5'→3' respectively, in this study.

합성 oligonucleotide 및 진단용 molecular beacon의 제작

본 연구에서는 AIV H5N1의 표준 주형 DNA의 설계 및 표적용 aptamer 기반 Taqman Primer의 설계를 위하여 GenBank database (National Center of Biotechnology Information, NCBI)에 밝혀져 있는 avian influenza A virus subtype H5N1 중 5종의 HA 염기서열을 참고하였다.

이 염기서열들을 표본으로 하여 비교 정렬분석을 행하였으며[CLUSTAL W (1.81) Multiple Sequence Alignments, <http://align.genome.jp/sit-bin/clustalw>], 여기서 도출된 가장 보존적인 염기서열 부분을 취합하여 인공적 염기서열을 설계하였다. 이 염기서열은 avian influenza A virus subtype H5N1 (GenBank accession no. EU874899) hemagglutinin 유전자와 가장 유사하였기에, 그 중 가장 보존 정도가 높은 염기서열 부위 133 bp를 선택하여 본 연구를 위한 AIV의 표준 염기서열로 결정하였으며, 이는 유전자 인공합성의 방법으로 제작하였다(Table 1 and Fig. 1). 이 표준염기서열은 상기 유전자(EU874899)의 971 nt에서 1103 nt까지의 염기서열과 동일한 것이며, 이 서열을 재료로 합성용 oligonucleotide 및 고병원성/저병원성 진단용 primer쌍을 설계하였다. 이들 oligonucleotide는 (주)제노텍에서 제작을 의뢰하였으며(Genotech, Korea), 공급된 oligonucleotide는 인공합성 유전자제작 및 진단용 primer로 사용되었다. 검색용 primer와 H5N1 특이적 aptamer-molecular beacon의 염기서열은 Table 1에, 표준 주형 DNA에서 그 위치는 Fig. 1에 나타내었다.

공초점 형광현미경 관찰 및 세포배양

AIV탐지의 검출을 확인하거나 증폭하기 위하여 실험실 조건에서 바이러스 증폭을 위하여 DHI D3 DFA (Diagnostic Hybrids, Inc., USA)의 R-Mix ReadyCell (Mink Lung/A549 세포주)을 미리 녹여 검체 200 µl를 분주하여 700×g, 실온에서 60분간 원심분리한 다음 35°C, 5% CO₂ incubator에서 16

시간 동안 배양하였다. 자세히 설명하면 세포를 분주된 커버 글라스를 PBS로 세척하고 아세톤으로 고정 후 respiratory virus fluorescent antibody pool (Respiratory Panel 1 Viral Screening & Identification Kit, Chemicon, USA)에 준하여 virus-specific monoclonal antibody으로 표지 후 이를 Respiratory virus DFA screening reagent의 DFA monoclonal antibody으로 one-step process staining 방법을 수행하여 influenza virus A를 공초점 형광현미경하에서 판별하였다.

Hemagglutinin 유전자의 합성 및 RT-PCR

HA 합성용 nucleotide를 사용하여, PCR (Mini-Opticon Bio-Rad, USA)을 이용, 133 bp의 HA 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 30초간 reneaturation 후, denaturation 94°C, 1초, annealing 60°C, 1초, extension 74°C, 15초를 45 cycles 동안 수행하였으며, 74°C에서 30초간 final extension을 하였다. 또한 검체내의 AIV 검출을 증폭하기 위해 R-Mix ReadyCell (Mink Lung/A549 세포주)을 이용하여 확보된 세포 배양액을 10 µl Seeplex RV master mix (Seegene, Inc, Korea), 4 µl 5× multiplex primer sets, 3 µl 8-MOP용액을 통해 DSO technology (Seegene, Inc)에 의해 디자인된 Seeplex RV A/B세트의 primer으로 cDNA를 합성하고 94°C, 30초 동안 통해 Mini-Opticon (Bio-Rad)으로 denaturation 시킨 후 94°C, 1초, annealing 60°C, 1초, extension 74°C, 15초를 45 cycles 동안 수행하였다. 각 단계 별로 합성된 DNA는 2.0% agarose gel에 전기영동 후 EtBr (ethidium bromide)로 염색하였으며 UV transilluminator 상에서 각 생성물의 크기를 확인하고 이를 agarose gel에서 확인하였다(Table 2).

Table 1. Nucleotide sequences of AIV detection primers

Name	sequence(5'→3')	mer	products
IV HAF	aatgcccaa atatgtgaaat	21	133 bp
IV HAR	tgccatcctcctctataaaa	21	
MB LP	aattaaccctcactaaaggcgtgagtcggaga gagaagaagaaaaaggactattttcaaac cgcaatacactggtgtatgctgaataagttaa	97	
MB HP	attaaccctcactaaaggcgtctcaa aagaa acaagaggactattatttttcaggttgggtctt cctattatggtcgaataagttaa	89	

Real-time PCR의 최적조건

본 연구에서 Real-time PCR용 기기로는 Mini-Opticon (Bio-Rad)을 사용하였다. 증폭산물의 정량 측정을 위하여 SYBR Green의 Taqman primer와 특수 제작된 HA-MB (molecular beacon) primer를 사용하여 상호 비교하였으며, Avian influenza virus의 Real-time PCR 검색을 위한 최적 annealing 조건을 확립하기 위해 기존 primer 10 pmol과 특수 제작한 MB-HP/LP (molecular beacon) primer 10 pmol과 각 지역별 시료를 cDNA로 합성하여 주형으로 하여 10 µl SYBR

Table 2. Comparison of viral culture with IF and Seeplex RV (S-RV) assays from 8 major respiratory viruses

	Viral culture with IF		Seeplex RV	Total
	Positive	Negative		
	18 ^a	7 ^c	positive	25
	11 ^b	2 ^d	negative	13
Total	29	9		38

^a The major respiratory viruses were influenza virus type A and B, parainfluenza virus type 1, 2, 3, and adenovirus.

^b More than 1 virus detected with S-RV in 2 specimens: influenza B + parainfluenza 1;

^c More than 1 virus detected with S-RV in 1 specimen: influenza B + adenovirus.

^d Parainfluenza virus detected only by viral culture and IF.

Premix Ex Taq (TaKaRa, Korea)을 포함한 총 10 µl의 반응액을 조성하여 Real-time PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94°C에서 30초간 pre-denaturation을 거치고, denaturation 94°C, 1초, annealing 60°C, 1초, extension 74°C, 15초를 45 cycles 동안 수행하였다.

Real-time PCR의 민감도 측정

AIV HA 탐지의 감수성 측정을 위하여 합성 AIV HA 유전자를 포함하는 pLUG® TA에 클론시켜 재조합한 AIV-HA 벡터인 pLUC-TA-HA를 1 ng부터 1/10배씩 점점 단계 희석한 후 이를 주형으로 확립된 최적 PCR 조건으로 Real-time PCR를 수행하였다. Real-time PCR에 사용한 표준유전자는 AIV-H5N1의 합성 HA부위(133 bp)를 재조합한 pLUC-TA-HA으로 DNA의 농도는 NanoDrop 2000 (Thermo, USA)로 정밀하게 측정하여 plasmid의 copy 수를 아래의 식을 계산하였다(16).

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

결과

Real-time PCR의 최적조건

HA 주형에 대한 농도별로 Real-time PCR 탐지의 최적화를 확립하였는데 Fig. 2에서처럼 모두 133 bp의 특이적 PCR 반응산물을 증폭하였다. 본 연구에서 제작한 표준 유전자인 pLUC-TA-HA 및 HA의 탐색용 AIV HA PCR-탐지에서 반응 최적조건은 60°C였으며 특히 AIV아형만을 탐지하도록 제작한 고병원성 및 저병원성을 특이적 HA-MB (molecular beacon)으로 탐지하는데는 약 1 pmol 농도에서 가장 최적에서 증폭되었다.

AIV HA 탐지의 감수성 측정을 위하여 합성 AIV HA 유전자를 포함하는 pLUC-TA에 재조합한 pLUC-TA-HA를 1 ng부터 1/10배씩 점점 단계 희석한 후 10 ag까지 연속 희석

을 한 다음 이를 초기기질로 하여 최적의 Real-time PCR 조건하에서 Real-time PCR을 수행하였다. 초기 측정농도의 기질을 사용한 PCR 결과는 우선 증폭된 형광곡선과 표준곡선을 통해 나타내었고 초기 기질농도 10 ag부터 1 fg (약 194개 HA 유전자 포함)의 범위에서는 기질의 양들과의 Ct 수치들은 정확한 연관성이 있는 것으로 확인하였다. 한편 10 ag (5개 HA 유전자)의 초기기질 농도로도 Real-time PCR법으로 AIV 특이 염기서열의 검출은 가능하지만 실제 공초점 현미경에서 확인된 형광결과와 연관성 및 정량도 양호한 범위는 검색이 가능한 범위로 판정되는 최소의 가능한 HA 유전자 검체 copy 수는 약 20개로 설정하였다. pLUC-TA-HA 10 pg부터 10 ag 까지 1/10 농도로 연속 희석한 6개의 기질농도로 Real-time PCR 결과로 측정된 Ct 수치들의 회귀직선은 Y (초기기질농도의 양: log ag)-0.41X(Ct value: cycles)+12.04로 계산하였으며 회귀상수 R²는 0.9821로 산출하였다. 이는 정량의 범위를 넘어서는 것으로 판정한 초기 기질의 양들인 100 ag과 10 ag를 포함하여 계산한 것으로 이들을 제외하고 계산하면 회귀상수는 회귀상수 R²=0.997 이상으로 나타내었다. 각 PCR 산물이 생성되었는지 재차 전기영동으로 확인하였다(Figs. 2 and 3).

Quick Real-time PCR

PCR 반응물의 총량은 10 µl 부피범위에서 가장 신속한

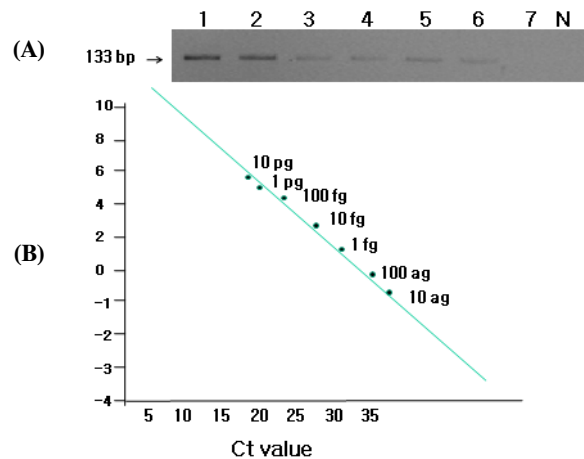


Fig. 2. Standard curve and electrophoresis of Real-time PCR with serially diluted templates of AIV HA-MB gene using Mini-Opticon Q-PCR Quantitative Thermal Cycler. (A) Electrophoresis of same PCR products. Lane M is 100 bp DNA size marker; Lanes 1-7 were loaded 7 PCR products amplified from initial template plasmid, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 100 ag (62 copies of AIV gene) and 10 ag, respectively. Lane N; negative control (distilled water). PCR products of 133 bp were shown in all lanes, except 10 ag and blank. (B) 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=-0.41X+12.04. Regression coefficient was R²=0.997.

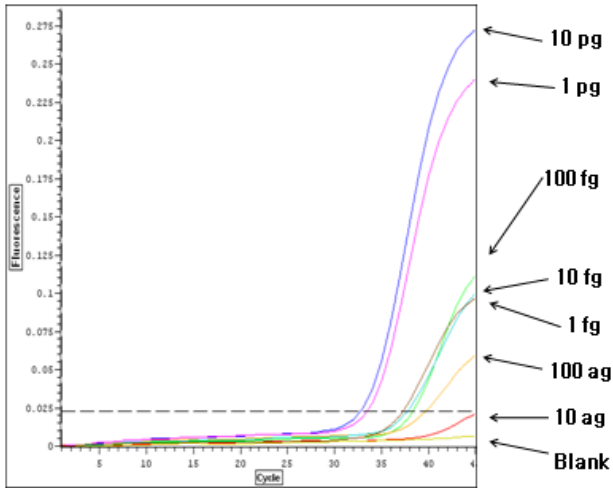


Fig. 3. Real-time PCR with serially diluted templates of AIV HA-MB gene using Mini-Opticon Q-PCR Quantitative Thermal Cycler. Real-time PCR was performed with the standard condition in this study. Initial quantities of templates in each experiment were 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 100 ag and 10 ag, respectively. Fluorescence curve, the Ct values were shown initial quantity- dependent manner in the range of 10 pg to 10 ag. Distilled water was used in blank instead of DNA template.

PCR이 가능한 것으로 생각되었던 Mini-Opticon (Bio-Rad)으로 Quick Real-time PCR을 수행하였다. 즉 탐지한계를 측정하기 위해 AIV HA 유전자 cDNA를 포함한 pLUC-TA-HA을 기질로 하여 초기 농도를 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 10 ag, 100 ag (약 5개 pLUC-TA-HA 분자)씩 각각 사용하여 PCR을 수행하였다. 분석결과 plasmid 100 fg부터 10 ag까지의 Ct 수치(Threshold cycles)는 비교적 정량적 상관성을 보여 주었으며 그 외의 범위에서 PCR 결과는 초기 기질량과 Ct 수치들의 정량성은 일치하지 않았다. 한편 AIV HA 유전자의 아형의 존재여부를 가장 신속히 진단하기 위해 HA-MB primer를 도입하여 PCR 과정중 각 단계들의 시간을 극단적으로 줄인 Quick Real-time PCR을 수행하였다. 이는 간이 진단법인 10 분대 Rapid kit의 진단법보다 최소시간을 판정하는 시간을 측정하고자 하였다. 최종적으로 94°C에서 30초간 pre-denaturation을 거치고, denaturation 94°C, 1초, annealing 60°C, 1초, extension 74°C, 15초를 45 cycles 동안 수행하였다. 용융온도 분석을 통한 PCR 산물의 Tm 역시 82°C 내외로 추정 PCR 산물을 만들어 냄을 확인하였다(Fig. 3).

Ct 수치를 기준으로 133 bp의 DNA를 증폭해 내는 본 실험에서 폴리머화의 시간은 우선 가장 큰 영향을 미치지만 AIV-아형에 대한 결합유무는 각 아형에 대한 특이적인 HA-MB primer와 결합시점에는 annealing의 시간도 중요함을 추측 되었다.

Hemagglutinin 유전자의 합성

조류독감 바이러스(avian influenza A virus: AIV H5N1)의



Fig. 4. Pintails (*Anas acuta acuta*) in riverside of Tutkseom region (AVI samples were isolated from the head and neck of the corpse of pintail)

9종류 HA 유전자 경우는 약 1.69 kb의 게놈크기로 15종 NA와의 조합에 의해 144여 종 아형을 결정하게 되어 그 중에서 병원성이 가장 강한 고병원성과 병원성이 약한 저병원성으로 나누는데 본 연구에서는 HA 유전자 중 항원결정기로 친수성 영역을 통하여 133 bp의 HA 유전자 영역을 디자인하여 이를 합성하여 real-time PCR을 이용하여 정밀하게 정량 분석하는데 사용하였다. 설계된 유전자를 합성하여 2% agarose gel 상에서 size를 일치하는지를 확인하였다. 최종 합성후 HA 유전자는 Real-time PCR를 사용하여 정량분석 하였으며 AIV HA 부분 유전자를 염기서열을 분석하여 HA와 일치함을 확인하였으며 이를 pLUC-TA-HA으로 명명하였다. pLUC-TA-HA의 DNA 정량은 NanoDrop 2000를 사용하여 정량 분석하였는데 10 ag의 pLUC-TA-HA는 약 18개의 AIV HA 영역 유전자를 포함하는 것으로 계산하였다(Figs. 2 and 3).

Ultra real-time PCR 결과치

AIV 유전자의 Ultra Real-time PCR 결과를 얻게 된 동기는 뚝섬, 탄천 및 안양천으로부터 채집된 고방오리의 사체와 철새의 분뇨에서 분리한 AIV를 Real-time PCR에 의해 획득한 결과물로부터 바이러스의 유전자를 신속하고 소량의 검체로부터 유전자를 증폭하는데 어려운 문제가 야기된 이유였다(Figs. 4 and 5). 따라서 소량의 바이러스를 진단하기 위한 방법으로 일반적으로 적용되고 있는 Real-time PCR에 AIV를 특이적으로 반응하도록 고안된 압타머를 사용하여 위의 문제점을 해결하고자 하였다. 그래서 확인결과로는 Table 1과 Fig. 6에서처럼 표준 시료의 pLUC-TA-HA 10 pg부터 10 ag까지 탐지범위를 설정하고 UPCR를 수행한 결과 plasmid 100 fg부터 10 ag까지의 Ct 수치(Threshold cycles)를 설정범위 한계점으로 하여 비교적 정량적 상관성을 보여 Ct 수치들의 정량성은 일치하였다. 그 결과로부터 양성 시료와 음성시료와 비교하여 고병원성 AVI 경우(MB-HP 압타머 적용시) 뚝섬지역은 양성 대조군과 비교시 약 0.65배였고 탄천은 0.48배이었고 안양천은 0.23배 정도였다. 한편 저병원성 AVI 경우(MB-LP 압타머 적용시) 뚝섬지역이 양성대조군과 비교시 약 0.78배였고 탄천은 0.18배이었고 안양천은 0.09배 정도였다. 이

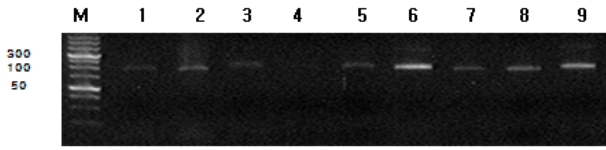


Fig. 5. Synthesis of hemagglutinin gene from avian influenza A virus subtype H5N1 by template gene synthesis. 133 bp-long hemagglutinin (HA) DNA was synthesized through template. This electrophoretic image shows the result of each sample. Lane 1 to 3 were at Ttukseom, lane 4 to 6 were at tanchen, and lane 7 to 9 were at anyangchen samples, respectively. Lane M represents DNA size markers.

런 결과로부터 특정지역에서의 철새 도래지인 점을 감안한다면 어린이대공원의 동물원내 서식하고 있는 조류들의 감염이 우려되고 언론에서 보도된 바처럼 모 구청내 새 사육장에서의 AVI 감염과는 무관하지 않음을 암시하고 있다. UPCR법은 기존 방법에서 탐지하기 어려운 소량의 시료에서 직접 Real-time PCR으로 검출되지 않는 범위까지 AVI의 고병원성 및 저병원성 유무를 특이적이고 민감성에 있게 판별이 가능하다고 한 점이 차별화된다(Figs. 5 and 6).

Confocal 분석의 정확성

상기 결과에서 확보된 AIV의 유전자의 Ultra Real-time PCR 산물에서 나온 결과를 단백질항원에 대해서 더욱 정밀한 AIV 탐지의 검출을 확인하기 위해 DHI D3 DFA (Diagnostic Hybrids, Inc., USA)의 R-Mix ReadyCell (Mink Lung/A549 세포주)을 사용하여 검체 200 µl를 미리 배양한 세포주에 분주하여 35°C, 5% CO₂ incubator에서 16시간 동안 배양하였다. 이후에 세포가 자라고 있는 커버글라스를 PBS로 세척하고 아세톤으로 고정후 respiratory virus fluorescent antibody

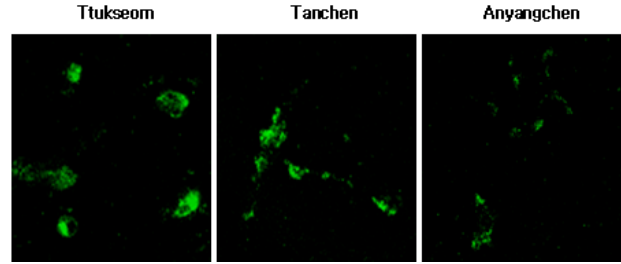


Fig. 7. Immunofluorescence detection of respiratory pathogens in R-Mix cells. (left) Ttukseom; (middle) Tanchen; (right) Anyangchen, Magnification, ×200.

pool (Respiratory Panel 1 Viral Screening & Identification Kit, Chemicon, USA)에 준하여 virus-specific monoclonal antibody으로 표지후 이를 Respiratory virus DFA screening reagent의 DFA monoclonal antibody으로 one-step process staining 방법을 수행하여 LSM 510META (칼자이크)인 공초점 형광현미경하에서 판별한 결과 검체 분리지역인 뚝섬, 탄천 및 안양천에서 모두 양성반응인 녹색형광을 나타냄으로 이 지역이 철새들에 의해 조류독감바이러스가 존재함을 확인하여 상기 유전자분석 결과를 뒷받침해주고 있다(Fig. 7). 따라서 도시뿐만 아니라 하천 호수주변지역의 축산농가 그리고 공항 및 항만의 종사자와 승객의 안전을 위해 신속하고 가장 정확한 검사법을 통해 초기에 AIV를 진단하는 시스템을 구축하므로 AIV의 대재앙으로부터 총체적 보건방역 조치를 취해야 한다 라고 사료된다.

고찰

심각한 병원체인 신종플루의 초기 진단은 가금류등 축산업의 질병 제어를 위하여, 그리고 사람에게 전파 또는 사람간의 전파를 조기 차단하기 위한 중요성이 크게 증대되고 있으며, 그 진단 대상도 가금류 전염병의 조기 발견 및 확진을 위한 수의학적 진단 뿐 아니라, 사람에게 대한 진단으로 병원, 실험실 검사법, 공항 또는 항만에서의 검역 요구성으로, 현장성이 절실히 요구되고 있다. 현재 실험적으로 많이 적용하고 있는 AIV에 대한 진단법은 계란을 이용한 바이러스 배양법(Plaque assay), 중합효소연쇄 반응법(PCR; Polymerase Chain Reaction), 혈구응집억제 시험법(HI; Hemagglutination Inhibition), 면역형광법(IFA; Immunofluorescence Assay), 효소면역 시험법(ELISA; Enzyme Linked Immunosorbant Assay) 등이 있다 (3, 25, 26). 이중 바이러스 배양법과 HI IFA와 ELISA는 민감도가 높고 정확하나 상대적으로 많은 시간이 필요한 점이 단점으로 보고되고 있다. 이런 방법에 비해 PCR법은 특이적이고 신속하게 다량의 검체를 정확히 진단할 수 있다는 장점이 있다. 또 PCR 기술이 발달함에 따라 다양하게 AIV의 진단이 가능한 multiplex PCR, Real-time PCR, NASBA, PCR-ELISA 등이 알려져 있다(9). 하지만 이러한 PCR을 이용한 진단법은 혈청을 이용한 간이진단법(Immunochromatography)

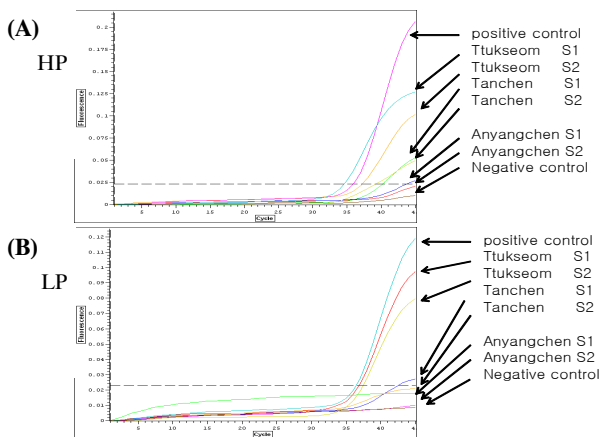


Fig. 6. Ultra Real-time PCR pattern of each samples with AIV HP-MB and AIV HP-MB aptamer using Mini-Opticon Q-PCR Quantitative Thermal Cycler. Ultra Real-time PCR was performed with the standard condition in this study. Fluorescence curve, the Ct values were shown initial quantity-dependent manner in the range of 10 pg to 10 ag.

등에 비하여 정확성과 민감성은 뛰어나지만, 신속성, 간편성 및 현장성이 떨어지기에, 질병의 전파를 막기 위하여 대중적 밀집장소인 공항 및 항만에서의 검역에는 적당하지 못하고, 병원에서만 적용할 수 있다는 한계점이 있다.

따라서 이와 같은 PCR법은 공항 및 항만에서의 검역에는 적당하지 못하고, 병원에서만 적용할 수 있는 한계가 있다. 그러므로 질병의 전파를 조기에 막기 위해서는 새로운 현장 용이성이 있는 진단법이 요구된다.

한편 압타머(aptamer)는 기존 항체처럼 비용과, 생산이 어려움이 많고 변형 또한 용이하지 못한 반면 단일가닥 DNA 내지 RNA 같은 약 20-80 nt 핵산분자로 구성되어 필요에 의해 변형이 용이한 장점을 가지고 있다. 또한 항체에 비해 매우 안정성이 우수하고 실온상태에서 보관이나 운반이 가능하며 멸균 후에도 기능을 유지할 수 있다는 장점이 있다. 한편 변성 후에도 핵산이 마치 리간드-수용체처럼 또는 항원-항체반응에서와 동일한 표적단백질의 활성부위에 신속히 재생이 가능하다는 점이다. 그리고 장시간 또는 반복사용이 요구되는 진단측면에서 항체대용의 우수한 친화력을 가지는 성질로 임상 적용이 가능하다는 점이다(23, 24). 또한 특성상 상대적으로 작은 크기로도 커다란 단백질이 작용할 수 없는 부위에 선택적이며 생체내에서 면역반응을 일으키지 않는 매우 강한 결합력을 가질 수 있다는 점이다. 따라서 이런 생체 친화적인 특징을 이용하여 항바이러스제, 뇌암 및 간암 같은 항암제의 적용 및 여러 질병의 진단분야에서 응용이 가능하다(6, 18, 29). 따라서 본 논문에 적용되는 기술인 압타머를 기반으로 한 molecular beacons 시스템은 핵산합성, 유전자발현의 추적 및 생체내에서 형광학적으로 탐지할 수 있는 양말단에 fluorophore와 quencher를 부착시켜 표적에 반응하여 서로 해리되면 형광이 띠도록 DNA, RNA 및 정량 PCR기법에 이용된다.

따라서 본 연구의 목적은 AIV의 특이 여러 아형의 HA 유전자를 대상으로 10-20분대의 판정시간이 가능한 신개념의 Real-time PCR법을 개발하고자 한 것이다. 이를 위하여 PCR의 각 cycles 중 변성, 결합 및 신장의 시간을 각 1초의 시간으로 설정하고 PCR이 가능한 것과 특이적 AIV HA 아형에 대해 결합하는 MB-HP/LP (molecular beacon) primer와의 탐지능력을 정량화하는 것을 실험의 초점으로 설정하였다. 그러므로, AIV의 존재를 검색할 수 있는 Real-time PCR에 근거한 검색법으로 수분내의 진단법을 개발하여 기존의 Real-time PCR과 구분되는 특이적 aptamer 기반한 Ultra Real-time PCR (UPCR)법과 2차적으로 정밀한 분석을 위한 공초점 현미경분석법을 융합하여 분석하였다. 이 검사법은 AI의 병원체 유전자를 정량적으로 검색할 수 있을 뿐 아니라, 다량의 시료를 대상으로, 최소 수분~수십분 이내에 확인실험을 마칠 수 있기에, H5N1 아형에 대한 비주열하게 현장성 있는 실험방법으로 제시하고자 하였다.

본 실험의 결과를 통하여 PCR의 각 cycle마다 시간을 1초 설정으로도 극소량의 존재를 진단할 수 있었으며 이는 Mini-Opticon (Bio-Rad)으로도 검사시간을 정성시간인 PCR 산물의 용융온도분석이 종료시점까지로 볼 때 본 연구에서 나타난

진단시간은 역전사시간을 포함하여 10분-20분대에 종료될 수 있을 가능성을 보여 준 것이라 사료된다.

진단시간의 단축은 Quick real-time PCR법의 적용범위를 보다 확장 한 것으로 연구실내 방법인 PCR법이 Rapid kit이 가지고 있는 현장성에 보다 진일보할 가능성을 보인 것으로 생각된다. 따라서 만약에 이 시스템을 PDMS (polydimethylsiloxane) 기반 microfluidic chip와 연계된다면 이동이 용이하게 전원이 있는 모든 야외 장소에서 탐지가 가능할 것으로 생각된다. 또한 PCR 반응액을 탐지하는 chip이 1 µl 이하의 극소량 검체를 사용하는 경우 현장 검체로부터 Rapid kit보다 유리한 점으로 작용할 것이다. AI 검색을 위한 Quick real-time PCR 적용 사례를 들면 호수거나 강가주변의 가금류 농장에 1차 탐지를 우선 적용하고 유무선 글로벌 현장에 실시간 모니터링 할 수 있고 공항이나 항만에서 적외선 카메라에 의한 안면의 발열여부를 판정하는 등 매우 초보적인 방법으로 수행하는 AI 발생지역 귀국자에 대한 1차 검색을 대치할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서 제기한 AIV 신속 진단법은 기존의 Real-time PCR법에서 간과된 탐지시간을 단축과 AIV의 아형 판별 성과를 보여준 점이 큰 성과로 사료되고 AIV 뿐만 아니라 구제역에 대한 PCR 방법에 의한 검출에서 보다 현장 용이성을 가질 수 있다고 기대된다.

적요

조류 인플루엔자 바이러스(AIV) 아형을 ultra-time PCR법 (UPCR)을 이용하여 초스피드로 진단할 수 있는 방법을 고안하였다. 표적 대상의 프라이머는 AIV H5N1 아형의 hemagglutinin (HA) 유전자 중 가장 상보성이 높은 133 bp의 부위를 선택하였고, 실험의 안전을 위하여 인공합성의 방법으로 제작하였다. 압타머와 결합한 molecular beacon 기반 Mini-Opticon Q-PCR 기기를 사용한 UPCR법으로, 총 UPCR 반응액의 양을 10 µl로, UPCR과 용융온도 분석시간을 15분 이내로 매우 짧게 단축시켰다. 민감도 측정에서 최소의 주형인 5분자의 HA 유전자만으로 정확히 AIV의 특이적 133 bp를 합성하였다. UPCR로 디자인된 이 PCR은 AIV 아형의 진단에 적용될 수 있을 뿐 아니라, UPCR이 기반되는 진단을 이용하여 다른 병원체에도 널리 적용 될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- Alexander, D.J. 1995. The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. *J. Comp. Pathol.* 112, 105-126.
- Basuno, E., Y. Yusdja, and N. Ilham. 2010. Socio-economic impacts of avian influenza outbreaks on small-scale producers in Indonesia. *Trans Emerg. Dis.* 57, 7-10.
- Ben, S.M., R. Meir, R. Haddas, E. Lapin, I. Shkoda, I. Raibstein, S. Perk, and I. Davidson. 2010. Development of a real-time TaqMan RT-PCR assay for the detection of H9N2 avian influenza viruses. *J. Virol. Methods* 168, 72-77.
- Boehm, K.M. 2010. Seasonal and avian influenza knowledge

- base of attending physicians in a community-based hospital: a survey-based study. *J. Am. Osteopath. Assoc.* 110, 285-289.
5. Bosch, F.X., M. Orlich, H.D. Klenk, and R. Rott. 1979. The structure of the hemagglutinin. A determinant for the pathogenicity of influenza viruses. *Virology* 95, 197-207.
 6. Butz, K., C. Denk, B. Fitscher, I. Crnkovic-Mertens, A. Ullmann, C.H. Schröder, and F. Hoppe-Seyler. 2001. Peptide aptamers targeting the hepatitis B virus core protein: a new class of molecules with antiviral activity. *Oncogene* 45, 6579-6586.
 7. Castrucci, M.R. and Y. Kawaoka. 1993. Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus. *J. Virol.* 67, 759-764.
 8. 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.
 9. Criado-Fornelio, A. 2007. A review of nucleic-acid-based diagnostic tests for Babesia and Theileria, with emphasis on bovine piroplasms. *Parassitologia* 49, 39-44.
 10. Deyde, V.M., R. Sampath, R.J. Garten, P.J. Blair, C.A. Myers, C. Massire, H. Matthews, P. Svoboda, M.S. Reed, J. Pohl, and *et al.* 2010. Genomic signature-based identification of influenza A viruses using RT-PCR/electro-spray ionization mass spectrometry (ESI-MS) technology. *PLoS One* 12, in press.
 11. Edward, C.H., C.V. Johann, K.R. Julia, and P.D. Gog. 2010. Genome packaging in influenza A virus. *J. Gen. Virol.* 91, 313-328.
 12. Fader, R.C. 2005. Comparison of the Binax NOW Flu A enzyme immuno-chromatographic assay and R-Mix shell vial culture for the 2003-2004 influenza season. *J. Clin. Microbiol.* 43, 6133-6135.
 13. Fauci, A.S. 2006. Emerging and re-emerging infectious diseases: Influenza as a prototype of the host-pathogen balancing act. *Cell.* 124, 665-670.
 14. 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. *B.M.J.* 29, 290-291.
 15. Gopinath, S., C. Sakamaki, Y. Kawasaki, and K. Kumar. 2006. An efficient RNA aptamer against human influenza B virus hemagglutinin. *J. Biochem.* 139, 837-846.
 16. Guan, M.K., L.C. Hsueh, Y.K. Liang, T.J. Liang, 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.
 17. Guan, Y., D. Vijaykrishna, J. Bahl, H. Zhum, J. Wang, and G.J. Smith. 2010. The emergence of pandemic influenza viruses. *Protein Cell.* 1, 9-13.
 18. Hilleman, M.R. 2003. Critical overview and outlook: pathogenesis, prevention, and treatment of hepatitis and hepatocarcinoma caused by hepatitis B virus. *Vaccine* 32, 4626-4649.
 19. Horimoto, T. and Y. Kawaoka. 2001. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 129-149.
 20. Ito, T., Y. Suzuki, L. Mitnaul, A. Vines, H. Kida, and Y. Kawaoka. 1997. Receptor specificity of influenza A viruses correlates with the agglutination of erythrocytes from different animal species. *Virology* 227, 493-499.
 21. Jeon, S.H., B. Kayhan, T. Ben-Yedidia, and R. Arnon. 2004. A DNA aptamer prevents influenza infection by blocking the receptor binding region of the viral hemagglutinin. *J. Biol. Chem.* 279, 48410-48419.
 22. Kim, E.H., D.W. Lee, S.H. Han, S.H. Kwon, and B. Yoon. 2007. Rapid detection method of avian influenza subtype H5N1 using quick real-time PCR. *Kor. J. Microbiol.* 43, 23-30.
 23. Knipe, D.M. and P.M. Howley. 2007. *Field Virology*, fifth ed., Lippincott Williams & Wilkins *Immunol.*
 24. Kuiken, T.V., M. Pantin-Jackwood, and D.E. Swayne. 2010. Comparative pathology of select agent influenza a virus infections. *Vet. Pathol.* 47, 893-914.
 25. Leonardi, G.P. 2010. Rapid identification of 2009 H1N1 influenza A virus using fluorescent antibody methods. *Am. J. Clin. Pathol.* 134, 910-914.
 26. Li, Z., C. Ma, Z. Liu, and W. He. 2010. Serologic cross-reactivity among humans and birds infected with highly pathogenic avian influenza A subtype H5N1 viruses in China. *Immunol. Lett.* in press.
 27. Rachel, B.S., M.C. Donald, J.C. Corey, G. Elodie, M.R. Ted, and V.B. Panayiotis. 2009. *Genome. Biol.* 10, R18.
 28. Rachel, M., P. Guoyan, Z. Wandy, L. Beatty, K.A. Mihindikulasuriya, A.P.A. Travassos da, R. Vsevolod, L.P. Robert, B. Tesh, H.W. Virgin, and D. Wang. 2009. Quarantill, Johnston Atoll, and Lake Chad viruses are novel members of the family *Orthomyxoviridae*. *J. Virol.* 83, 11599-11606.
 29. Verhoeff, J.J., L.J. Stalpers, A. Claes, K.E. Hovinga, G.D. Musters, V.W. Peter, D.J. Richel, W.P.J. Leenders, and W.R. van Furth. 2009. Tumour control by whole brain irradiation of anti-VEGF-treated mice bearing intracerebral glioma. *Eur. J. Cancer.* 45, 3074-3080.