

< Original Article >

UNG 기반 direct polymerase chain reaction (udPCR)을 이용한 돼지 써코바이러스 2형 진단법

김은미^{1,2} · 박최규^{1*}

경북대학교 수의과대학 & 수의전염병제어센터¹, (주) RAD²

UNG-based direct polymerase chain reaction (udPCR) for the detection of porcine circovirus 2 (PCV2)

Eun-Mi Kim^{1,2}, Choi-Kyu Park^{1*}

¹College of Veterinary Medicine & Animal Disease Intervention Center,
Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea, ²RAD Inc., Daegu 718-913, Korea

(Received 23 September 2014; revised 27 October 2014; accepted 7 November 2014)

Abstract

Porcine circovirus disease (PCVD) is a major problem of swine industry worldwide, and diagnosis of PCV2, causal agent of PCVD, has been done in clinical laboratories of pig disease by polymerase chain reaction (PCR) methods. But the PCR analyses have a serious problem of misdiagnosis by contamination of DNA, in particular, from carryover contamination with previously amplified DNA or extracted DNA from field samples. In this study, an uracil DNA glycosylase (UNG)-based direct PCR (udPCR) without DNA extraction process and DNA carryover contamination was developed and evaluated on PCV2 culture and field pig samples. The sensitivity of the udPCR combined with dPCR and uPCR was same or better than that of the commercial PCR (cPCR) kit (Median diagnostics, Korea) on PCV2-positive serum, lymph node and lung samples of the pigs. In addition, the udPCR method confirmed to have a preventing ability of mis-amplification by contamination of pre-amplified PCV2 DNA from previous udPCR. In clinical application, 170 pig samples (86 tissues and 84 serum) were analysed by cPCR kit and resulted in 37% (63/170) of positive reaction, while the udPCR was able to detect the PCV2 DNA in 45.3% (77/170) with higher sensitivity than cPCR. In conclusion, the udPCR developed in the study is a time, labor and cost saving method for the detection of PCV2 and providing a preventing effect for DNA carryover contamination that can occurred in PCR process. Therefore, the udPCR assay could be an useful alternative method for the diagnosis of PCV2 in the swine disease diagnostic laboratories.

Key words : Porcine circovirus 2 (PCV2), Uracil DNA glycosylase (UNG), Direct PCR (dPCR)

서 론

돼지 써코바이러스 2형(porcine circovirus; PCV2) 감염에 의한 돼지 써코바이러스병(porcine circovirus disease; PCVD)은 전 세계적으로 양돈업이 성행하는 거의 모든 국가에서 발생하고 있으며, 양돈산업에 가

장 큰 피해를 주는 질병 중의 하나이다(Segales 등, 2012). PCVD는 감염 돼지에서 다양한 임상증상을 유발할 뿐만 아니라 PCVD의 특이 증상을 보이지 않는 돼지에서도 흔히 검출되기 때문에(Brunborg 등, 2004; Chae, 2012; Opriessnig 등, 2007; Segales 등, 2005) 돼지질병을 진단하는 실험실에서는 PCVD의 확진 및 유사 질병과의 감별진단을 위하여 PCV2에 대한 진단을 상시적으로 실시하고 있다. PCV2 진단에는 다양

*Corresponding author: Choi-Kyu Park, Tel. +82-53-950-5973,
Fax. +82-53-950-5973, E-mail. parkck@knu.ac.kr

한 방법이 이용될 수 있으나 polymerase chain reaction (PCR)은 특이도와 민감도가 높고, 바이러스의 정량적 분석 등이 가능하기 때문에 국내·외에서 가장 많이 이용되고 있다(Kim 등, 2011; Larochelle 등, 1999; Trible과 Rowland, 2012; Yang 등, 2013). 그러나 PCR 진단법은 고도의 민감도로 인하여 실험과정 중 증폭 대상 미생물이나 유전자가 극소량만 혼입되더라도 오증폭을 유발하는 결정적인 단점을 가지고 있다(Kwok과 Higuchi, 1989; Persing, 1990). PCR에 있어 오증폭은 크게 PCR 이전에 검사시료를 전처리하고 핵산을 추출하는 과정에서 검사대상 미생물이나 추출 핵산이 실험실내에 오염되었을 때나 PCR 이후에 증폭된 DNA가 실험실내에 오염되었을 때 발생할 수 있다(Borst 등, 2004; Champlot 등, 2010). 특히 후자의 PCR 증폭 DNA에 의한 실험실내 교차오염은 PCR 오증폭 유발의 가장 중요한 원인으로 지목되고 있다(Aslanzadeh, 2004; Kwok과 Higuchi, 1989; Persing, 1990). 이러한 PCR 과정 중의 오염 및 오증폭 문제를 해결하기 위하여 다양한 방법들이 시도되어 왔으나 핵산 추출과정의 오염 문제는 검사 시료에서의 핵산 추출과정을 생략하거나 단순화한 direct PCR (dPCR)이 효과적인 대안으로 제시되고 있으며(Kermekchiev 등, 2009), 이전의 PCR로 기증폭된 DNA에 의한 오염 문제는 uracil DNA glycosylase (UNG) 시스템을 이용한 핵산 오염 방지 전략이 가장 현실적이고, 효과적인 대안으로 제시되고 있다(Longo 등, 1990; Pang 등, 1992; Tetzer, 2009). 그러나 아직 국내에서 가축전염병의 PCR 진단에 이러한 dPCR이나 UNG 시스템을 적용한 예가 거의 없는 실정이다. 따라서 이 연구에서는 현재 돼지 질병 진단실에서 가장 많이 진단이 이루어지고 있는 PCV2를 모델로 하여 핵산 추출과정을 단순화하여 PCR 이전의 오염문제를 최소화할 수 있는 dPCR을 확립하고, 동시에 이전 PCR로 기 증폭된 DNA에 의한 오염을 방지할 수 있는 UNG 시스템을 적용한 UNG 기반 dPCR (udPCR) 기법을 개발하여 그 효용성을 평가하였기에 보고한다.

재료 및 방법

공시재료

표준 양성 시료로 사용한 PCV2는 박 등(2004)이 분리한 국내 분리주(PCK0201)를 돼지 신장세포(PK-15)

에 배양하여 사용하였으며, 음성 대조군은 PCV2 음성이 확인된 돼지 신장세포(PK-15)를 사용하였다. 약 외 시료는 PCVD 이환 돼지로부터 혈액(혈청)과 조직(폐장, 림프절)을 채취하여 시험에 제공하였다. 혈청 시료는 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 채취한 다음, -20°C에 보관하며 실험에 사용하였고, 조직시료는 세척하여 phosphate buffer saline (PBS)로 10% 유제액을 만든 다음, 조직균질기(Bertin technologies, France)을 사용하여 파쇄하였고, 8,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 채취한 다음, -20°C에 보관하며, 실험에 사용하였다. 모든 혈청 및 조직시료로부터 시판 핵산 추출키트(Inclone biotech, Korea)를 이용하여 DNA를 추출한 다음, 시판 PCR 키트를 이용한 PCR을 통하여 PCV2 양성이 확인된 시료를 -20°C에 보관하며, 시험에 제공하였다.

Commercial PCR (cPCR)

cPCR은 현재 농림축산검역본부와 시·도 가축방역기관에서 PCV2 진단용으로 주로 사용하고 있는 시판 PCV2 ORF PCR kit (Median diagnostics, Korea)를 이용하여 제조사의 추천방법에 따라 사용하였다. 시판키트에서 사용한 primer는 Ouardani 등(1999)이 보고한 primer의 염기서열을 일부 변형한 것으로 표 1과 같다. 공시 재료로부터 추출한 DNA 5 µL를 PCR premix에 첨가한 다음, PCR 증폭기(Biometra, Germany)를 이용하여 95°C에서 5분간 처리하고, 35 회전의 PCR 과정(denaturation 95°C, 20초; annealing 55°C, 20초; extension 72°C 30초)를 수행하였고, 72°C에서 5분간 최종 반응하였다. PCR 증폭산물은 NEO green 염색액(NEO science, Korea)을 첨가하여 1.5% agarose gel에 전기 영동한 다음, UV trans-illuminator (Bio-Rad, USA)로 493 bp의 특이 벤드를 관찰하여 판독하였다.

udPCR용 primer 설계

udPCR을 위한 primer는 Lyoo 등(2008)이 보고한 PCV2b 유전형에 해당하는 MN-NP162 바이러스주의 ORF2 염기서열(accession number EF452353)을 표준으로 하여 2005~2013년 사이에 Genbank에 등록된 PCV1과 PCV2 ORF2 유전자 염기서열 정보 150개를 유전자 염기서열 분석 프로그램(clone manager 6, Scientific & Educational Software, USA)을 이용하여 분석한 다음, primer 설계 프로그램인 DNASTAR®

Table 1. Oligonucleotide primer sets for commercial PCR (cPCR) kit and UNG-based direct PCR (udPCR) in this study

Method	Name	Nucleotide sequences (5'-3')	Genomic position	Reference sequence
cPCR	Forward	CACGGATATTGTAGTCCTGGTCG	1093~1115	GenBank No.
	Reverse	CGCACCTCAGGATATACTG	1567~1585	AF027217
dPCR	PCV2-F	CATGGTTACACGGATATTG	1085~1113	GenBank No.
	PCV2-R	AATACTCCTCCGCCATAC	1291~1309	EF452358

Lasergene (DNASTAR Inc, USA)을 이용하여 PCV1의 유전자는 증폭하지 않고, PCV2의 ORF2 유전자만을 증폭할 수 있는 특이 primer set를 설계하였다(Table 1).

dPCR 조건 확립

dPCR의 조건은 국내 시판 dPCR-용 kit (Nanohelix, Korea)를 이용하여 확립하였다. cPCR과 달리 dPCR의 경우 검사시료에 대한 핵산 추출 및 정제과정 없이 바로 PCR을 실시하기 때문에 최초 검사시료에 대한 전처리 과정이 PCR 증폭에 가장 큰 영향을 미친다. 따라서 dPCR에 적합한 최적 시료 처리 조건을 설정하기 위하여 사전에 cPCR로 PCV2 양성이 확인된 혈청 및 립프절 조직시료 5 개씩을 선별하여 해당 시료를 시판 키트에 포함된 시료 처리용 완충액(sample dilution buffer; SAB)에 1:2.5, 1:5, 1:10, 1:20의 희석비율로 혼합한 다음 상온에서 3분간 방치한 후, 해당 희석액 2 μL를 들어내어 dPCR premix에 첨가한 다음, PCR을 실시하여 그 증폭효율을 확인하였다. dPCR의 반응 조건은 제조회사에서 추천하는 방법을 다소 변형하여 PCR-용 튜브(Axygen, USA)에 증폭대상 시료와 0.4 mM의 primer를 포함하여 총 25 μL의 premix를 PCR 증폭기(Biometra, Germany)를 사용하여 95°C에서 5분간 처리하고, 40 회전의 PCR 과정(denaturation 95°C 30초, annealing 50°C 30초, extension 72°C 30초)를 수행한 다음, 72°C에서 5 분간 최종 반응하였다. PCR 증폭산물은 NEO green 염색액(NEO science, Korea)을 첨가하여 1.5% agarose gel에 전기영동 한 다음, UV trans-illuminator (Bio-Rad, USA)로 225 bp의 PCV2 ORF2 유전자의 특이단편을 관찰하여 판독하였다.

uPCR 조건 확립

UNG 시스템을 적용하여 기증폭된 핵산의 오염을 방지하기 위해서는 PCR premix에 적정한 농도의 de-

oxyuridine triphosphate (dUTP)와 UNG를 첨가하되 기존의 PCR 반응에 영향을 주지 않는 최적 농도를 설정하여야 한다. 먼저 적정 dUTP (Inclone biotech, Korea)의 첨가 비율을 탐색하기 위하여 앞서 설정한 dPCR premix에 dATP, dCTT 및 dGTT의 농도는 2.5 mM로 고정하였고, dTTP와 dUTP의 최종 농도는 2.5 mM로 하되 dTTP와 dUTP의 비율을 2.5 mM/0 mM (5:0), 2.0 mM/0.5 mM (4:1), 1.5 mM/1.0 mM (3:2), 1.0 mM/1.5 mM (2:3), 2.0 mM/0.5 mM (1:4) 및 2.5 mM/0 mM (5:0) 비율로 조정하여 첨가한 다음, PCR을 실시하여 증폭효율에 영향을 주지 않는 최적의 비율을 확인하였다. 다음 단계로 PCR 반응에 영향을 주지 않는 최적의 UNG 농도를 탐색하기 위하여 dPCR premix에 UNG (NanoHelix, Korea)를 5 unit, 2.5 unit, 1 unit, 0.5 unit, 0.1 unit로 조정하여 첨가한 uPCR premix 2 set를 제조한 다음, 1 set에는 희석한 PCV2 바이러스 배양액을 대상으로 PCR을 실시하였고, 다른 1 set에는 사전에 uPCR로 기 증폭된 DNA를 Nanodrop lite (Thermo Scientific, USA)로 정량하여 100 pg/μL, 1 pg/μL, 10 fg/μL 농도의 기증폭 DNA 1 μL를 각각 첨가한 다음, PCR을 실시하여 PCR 반응에 영향을 주지 않으면서도 오염시킨 기증폭 핵산에 대해 반응을 일으키지 않는 적정 UNG 농도를 교차탐색하였다. uPCR의 반응조건은 PCV2 공식 바이러스 배양액으로부터 추출한 DNA 5μL를 PCR premix에 첨가하여 dPCR과 동일한 반응조건으로 PCR을 실시하되, uPCR인 경우, 기존의 PCR 조건에 UNG 처리 및 불활화 과정이 포함되어야 하므로 PCR 이전에 DNA를 포함한 모든 PCR 성분이 포함된 튜브를 50°C에서 5 분간 정지하여 오염된 핵산 제거 과정을 거친 다음, 반응이 끝난 UNG를 불활화하기 위하여 95°C에서 5 분간 처리한 후 PCR 과정을 수행하였다.

uPCR의 핵산 교차오염 방지 효과 확인

이전 PCR에 의해 증폭된 PCV2 유전자 증폭산물이 실험실 내에 오염되어 있음을 전제로 하여 개발된

UNG 적용 PCR법이 기증폭 된 핵산의 오염에 의해 영향을 받는지 여부를 확인하였다. 즉, uPCR을 통하여 기증폭된 DNA를 Nanodrop lite (Thermo Scientific, USA)로 정량한 다음, 20 ng/ μ L에서 2 fg/ μ L 농도로 10 배수 단계 희석하였고, 이 희석액을 UNG를 적용한 premix와 UNG를 적용하지 않은 premix에 각각 첨가한 다음 동일한 조건으로 PCR을 실시하여 225 bp의 특이 밴드 증폭 여부를 확인하였다.

검사시료별 cPCR과 udPCR간 민감도 비교

PCV2 배양액과 PCV2 양성이 확인된 혈청, 림프절 및 폐장조직 시료를 PBS (pH 7.2)로 10 배수 단계 희석 한 다음, 이들 시료를 대상으로 cPCR과 최종 확립된 udPCR을 실시하여 두 진단법간의 민감도를 비교하였다. cPCR인 경우, 각 시료 희석액 150 μ L를 덜어내어 시판 핵산 추출키트(Inclone biotech, Korea)를 이용하여 핵산을 추출한 다음, 50 μ L의 중류수에 용출한 다음, 그 중 5 μ L를 채취하여 PCR에 사용하였다. 반면, udPCR인 경우, 핵산 추출 과정 없이 혈청 및 조직 희석액 5 μ L을 SAB 45 μ L에 혼합한 다음, 다음 상온에서 3분간 방치한 후 그중 2 μ L를 덜어내어 PCR에 사용하였다.

야외시료에 대한 cPCR과 udPCR의 PCV2 검출효율 비교

야외 시료에 대한 udPCR의 효용성을 평가하기 위하여 2014년 경북대학교 실험실에 검사 의뢰되어 보관하고 있던 돼지 혈청 84점과 림프절 조직 86점을 무작위로 추출한 다음, 개발 udPCR과 cPCR을 실시하여 야외시료에 대한 PCV2 검출 효율을 비교하였다.

결과

dPCR 조건 확립

야외시료에 적합한 dPCR 조건을 확립하기 위하여 cPCR로 PCV2 양성이 확인된 혈청 및 조직시료 각 5개를 대상으로 dPCR에 적합한 시료와 SAB의 희석비율을 확인하였다. 시료와 SAB의 희석비율을 달리하여 반응시킨 후 PCR을 실시하여 최적 반응조건을 탐색한 결과, 혈청시료는 희석비율에 관계없이 공히 증폭이 된 반면, 조직시료는 희석비율이 1:5 이하인 경우에는 증폭이 저해되었으며, 1:10 이상의 희석비율에서는 고르게 증폭됨을 확인하였다(Fig. 1). 따라서 혈청 및 조직시료에 공통적으로 적용이 가능한 1:10의 희석비율을 적용하여 이후 실험을 수행하였다.

uPCR 조건 확립

uPCR용 premix에 첨가되는 최적의 dUTP 농도를 설정하고자 dTTP와 dUTP의 첨가 비율을 달리하여 premix를 제조한 다음, PCV2 배양액을 대상으로 dPCR을 실시하여 증폭효율을 확인한 결과, dTTP를 dUTP로 전부 교체하거나 dTTP와 dUTP의 첨가비율을 0.5 mM/2.0 mM로 조정한 경우에는 증폭효율이 저하되는 것으로 나타났으나 2.0 mM/0.5 mM, 1.5 mM/1.0 mM 및 1.0 mM/1.5 mM 첨가비율에서는 공히 양호한 증폭효율을 나타내었다(Fig. 2). 따라서 PCR 증폭효율에 영향을 미치지 않으면서 최대로 dUTP를 첨가할 수 있는 1.0 mM/1.5 mM 첨가비율을 최적 dUTP 첨가농도로 설정하였다. 또한 PCR 증폭효율에 영향을 미치지 않으면서도 기증폭 된 핵산 오염에 의한 오증폭을 방지할 수 있는 적정 UNG 농도를 확인한 결과, premix에 UNG를 2.5 unit 이상 첨가하였을

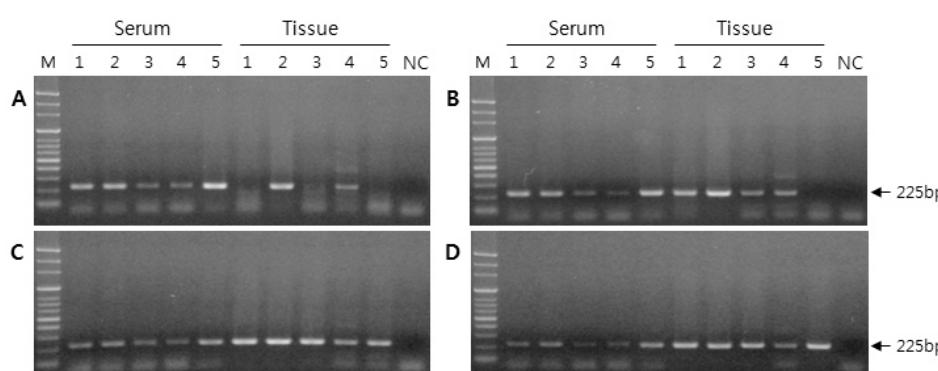


Fig. 1. Optimization of sample pre-treatment condition with sample dilution buffer (SAB) for direct PCR (dPCR). A-D, PCR results for sample pre-treatment condition with different dilution ratio of sample to SAB 1:2.5, 1:5, 1:10 and 1:20. Lane 1-5, different serum and tissue samples presented in the dPCR.

때는 PCR의 민감도가 감소되었으나, UNG를 1.0 unit 이하로 첨가하였을 때는 UNG 미첨가시와 동일한 증폭효율을 나타내었다(Fig. 3A). 한편 기 증폭된 핵산을 오염시켰을 경우에는 UNG 농도가 0.5 unit 이하일 경우에는 핵산 오염에 의한 오증폭을 방지할 수 없는 것으로 나타났다(Fig. 3B). 따라서 이 두 가지 실험 결과를 조합하여 개발 uPCR-용 premix에 첨가되는 UNG의 적정농도는 최종 1 unit으로 확정하였다.

uPCR의 핵산 교차오염 효과 확인

개발진단법의 핵산 오염에 의한 오증폭 방지효과를 확인하기 위하여 개발된 uPCR로 기증폭된 DNA 희석액(20 ng/ μ L-2 fg/ μ L)을 UNG 적용 premix와 UNG 비적용 PCR premix에 각각 첨가하여 동일한 조건으로 PCR을 실시하였다. 그 결과, UNG 시스템 비적용 premix로 PCR을 실시한 경우에는 첨가된 DNA의 양에 상관없이 공히 PCV2 DNA가 증폭되었지만

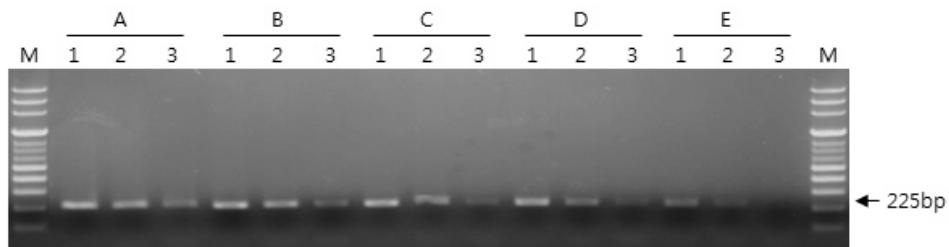


Fig. 2. Optimization of dUTP concentration for direct PCR (dPCR). A-E, PCR results with dPCR premix containing a different concentration ratio of dTTP to dUTP; 2.0 mM/0.5 mM, 1.5 mM/1.0 mM, 1.0 mM/1.5 mM, 0.5 mM/2.0 mM and 0 mM/2.5 mM. Lane 1-3, 10-fold dilutions of porcine circovirus 2 culture.

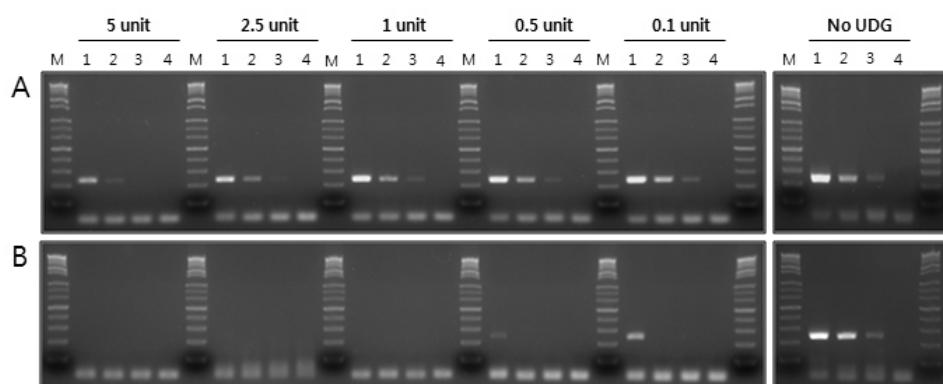


Fig. 3. Optimization of uracil DNA glycosylase (UNG) concentration for direct PCR with serial dilution of porcine circovirus 2 (PCV2) culture (A) and prevention effect of the UNG system by incorporation of pre-amplified PCV2 DNA (B). M, 100 bp DNA marker, (A) Lane 1-3, 10-fold dilutions of PCV2 cultures. (B) Lane 1-3, pre-amplified DNA templates at the concentration of 100 pg/ μ L, 1 pg/ μ L and 10 fg/ μ L.

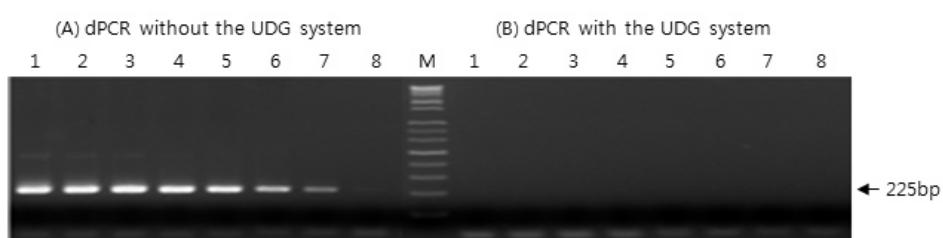


Fig. 4. Prevention effect for the DNA carryover contamination in the developed direct PCR (dPCR) without UNG system (A) and with UNG system (B). Lane 1 to 8 showed dPCR results that were carried out with pre-amplified DNA templates at the concentration of 20 ng-2 fg/ μ L, respectively.

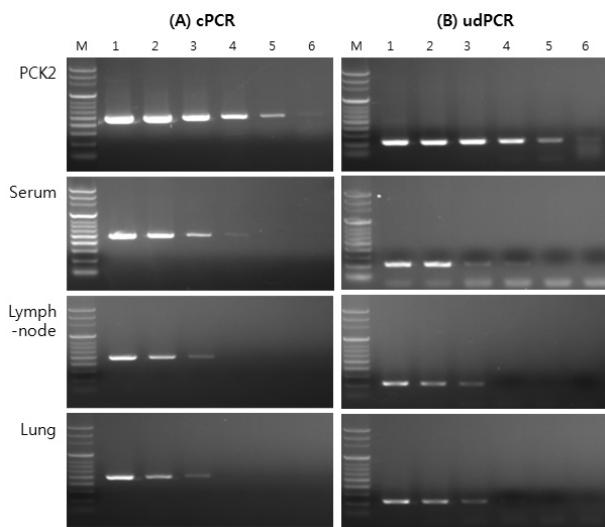


Fig. 5. Comparison of the sensitivity between commercial PCR (cPCR) and UNG-based direct PCR (udPCR) on different pig samples. Lane M, 100 bp DNA marker. Lane 1-6, 10-fold dilutions of each samples.

UNG 시스템 적용 premix으로 PCR을 실시한 경우에는 전혀 증폭이 일어나지 않아 개발 uPCR을 이용할 경우 기증폭된 PCV2 DNA의 오염에 의한 오증폭을 방지할 수 있음이 확인되었다(Fig. 4).

검사시료별 cPCR과 udPCR간 민감도 비교

검사시료별 개발 udPCR의 민감도를 확인하기 위하여 PCV2 배양액과 PCV2 양성이 확인된 혈청, 림프절 및 폐장조직 시료를 10배수 단계 희석하여 각 희석액에 대하여 각각 cPCR과 udPCR을 실시한 결과, 두 가지 진단법 모두 동일한 수준의 희석비율에서 특이 PCV2 ORF2 유전자 단편이 증폭되어 개발된 udPCR의 민감도가 기존 cPCR과 동일 수준 이상임을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

야외시료에 대한 cPCR과 udPCR의 PCV2 검출효율 비교

무작위 추출한 돼지 혈청 84 점 및 조직시료 86 점을 대상으로 udPCR과 cPCR을 실시한 결과, cPCR인 경우 혈청 24점(28.6%) 및 조직시료 39점(45.3%)에서 PCV2가 확인되어 평균 37.1%의 검출율을 나타내었으며, 개발 udPCR인 경우 혈청 31점(36.9%) 및 조직시료 46점(53.5%)에서 PCV2가 확인되어 평균 45.3%의 검출율을 나타내어 개발 udPCR이 cPCR보다 야외

Table 2. Porcine circovirus DNA detection in clinical samples using the commercial PCR (cPCR) and UNG-based direct PCR (udPCR) methods

Samples	No. of samples	Detection of PCV2 DNA (No. of positive)	
		cPCR (%)	udPCR (%)
Tissue	86	39 (45.3)	46 (53.5)
Blood	84	24 (28.6)	31 (36.9)
Total	170	63 (37.1)	77 (45.3)

시료에서의 PCV2 검출효율이 더 우수함이 확인되었다(Table 2).

고 칠

PCVD는 양돈산업에 가장 큰 피해를 주는 질병 중의 하나이며(Segales 등, 2012), 감염된 돼지에서 다양한 병증을 유발하기 때문에 돼지질병을 진단하는 실험실에서 상시적으로 진단이 이루어지고 있는 질병이다. PCVD의 1차적인 원인체인 PCV2의 진단에는 PCR 기반 진단법이 가장 많이 이용되고 있으나(Kim 등, 2011; Trible과 Rowland, 2012; Yang 등, 2013), 실험과정 중 증폭 대상 미생물이나 유전자가 극소량만 혼입되더라도 오증폭을 유발하는 결정적인 단점을 가지고 있다(Kwok과 Higuchi, 1989; Persing, 1990). PCR과정 중 오염에 의한 오증폭 문제는 검사시료 처리 과정에서부터 PCR 증폭산물의 확인에 걸친 PCR 전 과정에서 발생할 수 있으며, 이러한 오염에 의한 오증폭을 방지하기 위한 다양한 전략들이 개발되고 있다(Borst 등, 2004; Champlot 등, 2010; Rys와 Persing, 1993). 첫 번째 중요한 오염원인인 PCR 이전의 검사시료 처리 및 핵산 추출과정에서 오염 문제에 대해서는 검사시료에서의 핵산 추출과정을 생략하거나 최대한 단순화하여 추출과정 중의 핵산 오염을 방지할 수 있는 대책 수립이 필요하다(Li 등, 2011). 이러한 필요성에 따라 최근 핵산 추출과정을 최대한 단순화한 다양한 dPCR-용 premix들이 시판되고 있으며, 이들 키트들은 동물의 혈액이나 식물 및 동물의 조직을 직접 시료 처리액에 처리한 다음, 바로 PCR에 제공할 수 있도록 구성되어 있다. 이러한 dPCR 기법들은 동시에 많은 시료를 처리해야 하는 식물 병원체 진단 분야에서 활발하게 적용되어 왔으나(Bellstedt 등, 2010; Biswas 등, 2014), 살모넬라(Li와 Mustapha, 2002), B형 간염 바이러스(Cheng 등, 2007), 인플루엔

자 바이러스(Song 등, 2009) 등 사람과 동물의 병원체에도 성공적으로 적용된 바 있다.

시판되는 dPCR용 키트를 이용하여 진단법을 개발할 경우에는 시료의 종류에 따라 시료처리액을 적정 비율로 사용하여 최대의 증폭효율을 확보하는 것이 중요하다. 또한 키트에 포함되어 있는 증폭효소가 실험에 목적에 적합한지를 사전에 검토해야 한다. 이 연구에서는 국내·외 여러 회사의 시판 키트를 사전 검토한 결과, 국내 제조사의 시판 키트(NanoHelix, Korea)를 이용하여 PCV2의 dPCR 기법을 확립하기로 하였다. 다른 제조사의 시판 dPCR용 키트는 대부분 Pfu DNA polymerase나 그 유도체를 중합효소로 사용하고 있지만 이 연구에서 선발한 키트는 Taq DNA polymerase를 중합효소로 사용하면서 dPCR이 가능한 시액 조성으로 구성되어 있다. Taq DNA polymerase 와 달리 Pfu DNA polymerase는 UNG 적용 PCR에서 사용하는 dUTP를 효과적으로 증폭할 수가 없으며, 이는 이 연구에서 최종 목적으로 하는 uPCR과 dPCR 을 접목한 udPCR을 개발하는 데 적합하지 않다고 판단되었다. 시판 키트를 이용하여 PCV2 양성이 확인된 혈청 및 조직시료 유제액과 SAB의 희석비율을 달리하여 dPCR을 실시한 결과(Fig. 1), 혈청 및 조직시료에서 공히 1:10 희석비율 적용하였을 때 가장 증폭 효율이 양호한 것으로 나타났으며, 이후 udPCR 개발과 관련된 모든 실험은 이 조건을 적용하여 진행하였다.

PCR 과정에서의 오염문제는 무엇보다 이전의 PCR 을 통하여 대량으로 증폭된 DNA의 실험실 오염 문제가 가장 심각한 것으로 보고되고 있다(Aslanzadeh, 2004; Kwok과 Higuchi, 1989; Persing, 1990). 진단실험실에서 이루어지는 통상적인 PCR 과정을 통하여 목표 유전자는 10^{12} copy 이상 증폭되며, 증폭된 유전자 가 공기 중에 노출 될 경우에는 가장 작은 공기입자 (10^{-6} μL)에도 약 10^5 copy에 해당하는 유전자가 포함될 수 있다(Kwok과 Higuchi, 1989; Persing, 1990). 따라서 특정 병원체에 대한 PCR 진단이 일상적으로 이루어지는 실험실인 경우, 반복적인 PCR로 인해 실험실 환경 중에 증폭된 핵산의 오염수준이 높아지고, PCR에 사용되는 각종 기구, 장비 및 시약을 오염시킴으로써 예기치 않은 오진을 초래할 가능성이 매우 높다. 이러한 기증폭 된 DNA에 의한 교차오염 문제를 해결하기 위하여 다양한 방법들이 제시되어져 왔으나 UNG 시스템을 이용한 핵산 교차오염 방지전략이 가장 현실적인 대안으로 평가 받아왔으며, 실제

사람의 enterovirus (Taggart 등, 2002), influenza virus (Poddar 등, 1997) 및 coxsackievirus (Pang 등, 1992)의 진단에 성공적으로 적용된 바 있다. 따라서 이 연구에서는 돼지질병 진단실에서 가장 많이 진단이 이루어지고 있는 PCV2를 대상으로 UNG 시스템을 적용한 PCR (uPCR)을 개발하였다. UNG 시스템을 PCR에 적용할 때에는 PCR premix에 포함되는 UNG 및 dUTP의 농도 조절이 적절하게 이루어지지 않으면 증폭효율이 떨어지는 단점이 있다(Longo 등, 1990; Pang 등, 1992). 따라서 PCR의 민감도를 저하시키지 않으면서도 기증폭된 DNA의 오염을 확실하게 제거할 수 있도록 해당 PCR premix에 포함되는 dUTP와 UNG 농도를 최적화하는 작업이 필요하다. 이에 이 연구에서는 선발된 primer에 적합한 PCR 반응조건을 탐색한 다음, 동일한 반응조건에서 PCR premix에 첨가되는 dUTP와 UNG의 양을 달리하여 사전 실험을 실시한 결과, dTTP와 dUTP를 1.0 mM/1.5 mM의 비율로 첨가하고, UNG의 농도를 1 unit으로 조정하였을 때 최적의 반응이 일어남을 확인하였다(Fig. 2와 3). PCV2 배양액에서 추출한 핵산을 대상으로 uPCR을 실시한 다음, 기증폭된 PCV2 DNA를 인위적으로 오염시켜 재차 uPCR를 실시한 결과, UNG 시스템을 적용한 경우에는 20 ng의 DNA를 오염시켜도 오증폭이 일어나지 않음을 확인하였다(Fig. 4). 이 연구에서 증폭대상으로 하는 PCV2 ORF2 DNA는 크기가 225 bp이며, 표준주의 유전자염기서열(GenBank no. EF452358)을 기준으로 분석해보면 225 bp의 DNA 염기서열 중에는 thymidine이 66개 포함되어 있다. 따라서 PCR premix에 포함된 dTTP와 dUTP의 농도비를 고려할 때 이론적으로 2/5에 해당하는 약 27개의 thymidine 자리에 uracil이 무작위로 대체되었을 것으로 추정되며, 이전의 uPCR을 통하여 증폭된 DNA가 UNG 처리과정을 통하여 약 8 bp 단위로 절단이 되었기 때문에 이후 uPCR에서 증폭이 되지 않은 것으로 생각된다. 이와 같이 UNG 시스템을 적용한 경우에는 PCR 증폭 DNA 염기서열에 dUTP가 혼입되므로 UNG 처리를 통하여 기존의 PCR 증폭 DNA에 의한 오염을 방지할 수 있다는 장점이 있으나 증폭 DNA 염기서열에 dUTP가 혼입되기 때문에 증폭 DNA에 대한 염기서열 분석 등 추가 정보 확보가 제한된다는 단점이 있으므로 일상적인 진단 목적인 PCR에 적용하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

최종 dPCR과 uPCR을 접목한 udPCR의 진단효율을 평가하기 위하여 야외 돼지 혈액 84 점과 조직시료

86 점을 대상으로 현재 국내 가축 방역기관에 보급되어 사용하고 있는 시판 PCV2 ORF PCR kit (Median diagnostics, Korea)와 개발된 udPCR을 이용하여 검사를 실시한 결과, 혈청 및 조직시료에서 공히 시판 키트보다 PCV2 검출율이 8% 이상 높음이 확인되었다 (Table 2). 최근 다양한 식물 및 사람 병원체에 대하여 핵산 추출과정을 생략한 dPCR 기법을 적용한 결과, 기존의 핵산추출-PCR 방법에 비해 민감도가 동일하거나 오히려 높았다고 보고되고 있다(Bellstedt 등, 2010; Biswas 등, 2014; Song 등, 2009). 이는 기존의 핵산추출키트를 이용할 경우, 상당수의 핵산이 추출 과정을 통하여 소실되지만 최근 시판되고 있는 dPCR 용 buffer를 사용할 경우에는 이러한 추출과정 중의 핵산 손실을 막을 수 있을 뿐만 아니라 PCR 저해인자의 작용을 효과적으로 차단할 수 있기 때문으로 해석된다(Yang 등, 2007). 이 연구에서 기존 핵산 추출 키트를 이용한 cPCR보다 핵산 추출과정을 단순화하고, 핵산 오염 방지 기능을 추가한 udPCR에서 PCV2의 검출율이 더 높게 도출된 것은 상당히 고무적인 결과로 생각되며, 향후 다양한 가축전염병의 PCR 진단에도 이러한 udPCR 기법이 확대 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

돼지 써코바이러스병(porcine circovirus disease; PCVD)은 전 세계 양돈산업에서 큰 문제가 되고 있으며, 원인체인 돼지 써코바이러스 2형(PCV2)의 진단에는 주로 PCR이 이용되고 있다. 그러나 PCR 진단법은 DNA 오염, 특히 이전에 기증폭된 DNA나 검사시료의 핵산 추출 과정에서 유래된 DNA 오염에 의한 오증폭 및 오진이 큰 문제점으로 대두되고 있다. 이 연구에서는 핵산추출과정이 필요 없으면서 DNA 교차 오염 방지 기능을 가지는 uracil DNA glycosylase (UNG) 기반 direct PCR (udPCR)을 개발하고, PCV2 배양액 및 야외시료에 대하여 그 효능을 평가하였다. PCV2 양성 혈청과 조직시료에 대하여 시판 PCV2 PCR 진단 키트(Median diagnostics, Korea)와 개발된 udPCR을 실시하여 민감도를 비교한 결과, 개발 udPCR은 시판 PCR 키트와 동일수준 이상의 민감도를 가지는 것으로 나타났다. 또한 개발 udPCR은 이전의 udPCR로 기증폭된 PCV2 ORF2 유전자의 오염에 의한 오증폭을 방지할 수 있는 것으로 확인되었

다. 170 점의 야외 돼지시료(조직 86 점, 혈청 84 점)에 대하여 검사한 결과, 시판 PCR 키트는 검사시료의 37% (63/170)에서 PCV2가 검출된 반면, 개발 udPCR에서는 45.3% (77/170)에서 PCV2가 확인되어 개발 진단법의 민감도가 더 높은 것으로 평가되었다. 결론적으로 개발 udPCR은 기존 PCR 진단법에 비하여 진단시간, 인력 및 경비를 절감할 수 있으면서도 검사과정 중 핵산 오염에 의한 오진을 방지할 수 있기 때문에 향후 돼지 질병 진단실에서 PCV2 진단용으로 편리하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 연구는 농림축산식품부 가축질병대응기술개발 사업(과제번호: 313060-03-1-HD020), 생명산업기술 개발사업(311007-5), 농촌진흥청 연구사업(과제번호: PJ009410) 및 Golden Seed 프로젝트사업의 지원에 의해 이루어진 것임.

참 고 문 헌

- Aslanzadeh J. 2004. Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory. *Annals Clin Lab Sci* 34: 389-396.
- Bellstedt DU, Pirie MD, Visser JC, de Villiers MJ, Gehrke B. 2010. A rapid and inexpensive method for the direct PCR amplification of DNA from plants. *Am J Botany* 97: e65-68.
- Biswas C, Dey P, Satpathy S. 2014. A method of direct PCR without DNA extraction for rapid detection of begomoviruses infecting jute and mesta. *Lett Appl Microbiol* 58: 350-355.
- Borst A, Box ATA, Fluit AC. 2004. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23: 289-299.
- 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 postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *J Virol Meth* 122: 171-178.
- Chae C. 2012. Porcine circovirus type 2 and its associated diseases in Korea. *Virus Research* 164: 107-113.
- Champlot S, Berthelot C, Pruvost M, Andrew Bennett EA, Grange T, Geigl EM. 2010. An Efficient multistrategy DNA decontamination procedure of PCR reagents for hypersensitive PCR applications. *PLoS ONE* 5: e13042.

- Cheng ZJ, Hu LH, Fu WR, Li YR. 2007. Rapid quantification of hepatitis B virus DNA by direct real-time PCR from serum without DNA extraction. *J Med Microbiol* 56: 766-771.
- Kermekchiev MB, Kirilova LI, Vail EE, Barnes WM. 2009. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic Acids Res* 37: e40.
- Kim HK, Luo Y, Moon HJ, Park SJ, Rho SM, Han JY, Nguyen VG, Park BK. 2011. Quantification and genotyping of PCV2 DNA in the tissues of PCV2-infected conventional pigs with different clinical signs. *Korean J Vet Res* 51: 7-14.
- Kwok S, Higuchi R. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature (London)* 339: 237-238.
- Larochelle R, Antaya M, Morin M, Magar R. 1999. Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *J Virol Methods* 80: 69-75.
- Li Y, Mustapha A. 2002. Evaluation of four template preparation methods for polymerase chain reaction-based detection of *Salmonella* in ground beef and chicken. *Lett Appl Microbiol* 35: 508-512.
- Li H, Xu H, Zhao C, Sulaiman Y, Wu C. 2011. A PCR amplification method without DNA extraction. *Electrophoresis* 32: 394-397.
- Longo MC, Beminger MS, Hartley JL. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93: 125-128.
- Lyoo KS, Kim HB, Joo HS. 2008. Evaluation of a nested polymerase chain reaction assay to differentiate between two genotypes of porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest* 20: 283-288.
- Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG. 2007. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 19: 591-615.
- Ouardani M, Wilson L, Jetté R, Montpetit C, Dea S. 1999. Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses. *J Clin Microbiol* 37: 3917-3924.
- Pang J, Modlin J, Yolken R. 1992. Use of modified nucleotides and uracil-DNA glycosylase (UNG) for the control of contamination in the PCR-based amplification of RNA. *Mol Cel Probes* 6: 251-256.
- Park CK, Kim HS. 2004. Detection of pathogens and isolation of porcine circovirus 2 from postweaning multisystemic wasting syndrome-affected piglets. *Korean J Vet Res* 44: 561-569.
- Persing DH. 1990. Polymerase chain reaction: trenches to benches. *J Clin Microbiol* 29: 1281-1285.
- Poddar SK, Sawyer MH, Connor JD. 1997. Optimized PCR amplification of influenza A virus RNA using Tth DNA polymerase, incorporating uracil N glycosylase (UNG) in a single tube reaction. *J Clin Lab Anal* 11: 323-327.
- Rys PN, Persing DH. 1993. Preventing false positives: quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. *J Clin Microbiol* 31: 2356-2360.
- Segalés J, Allan GM, Domingo M. 2012. Porcine ciroviruses. pp. 405-417. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ and Stevenson GW. *Diseases of Swine*, 10th ed. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa.
- Segalés J, Calsamiglia M, Olvera A, Sibila M, Badiella L, Domingo M. 2005. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol* 111: 223-229.
- Song MK, Chang J, Hong Y, Hong S, Kim SW. 2009. Direct multiplex reverse transcription-nested PCR detection of influenza viruses without RNA purification. *J Microbiol Biotechnol* 19: 1470-1474.
- Taggart EW, Carroll KC, Byington CL, Crist GA, Hillyard DR. 2002. Use of heat labile UNG in an RT-PCR assay for enterovirus detection. *J Virol Methods* 105: 57-65.
- Tetzner R. 2009. Prevention of PCR cross-contamination by UNG treatment of bisulfite-treated DNA. *Methods Mol Biol* 507: 357-370.
- Tribble BR, Rowland RRR. 2012. Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. *Virus Res* 164: 68-77.
- Yang YG, Kim JY, Song YH, Kim DS. 2007. A novel buffer system, AnyDirect, can improve polymerase chain reaction from whole blood without DNA isolation. *Clinica Chimica Acta* 380: 112-117.
- Yang BC, Wang FX, Zhang SQ, Song N, Li JX, Yang ZQ, Wen YJ, Wu H. 2013. Comparative evaluation of conventional polymerase chain reaction (PCR), with loop-mediated isothermal amplification and SYBR green I-based real-time PCR for the quantitation of porcine circovirus-1 DNA in contaminated samples destined for vaccine production. *J Virol Methods* 191: 1-8.