

< Original Article >

## DNA 교차 오염 방지 기능을 가진 돼지 인플루엔자바이러스 감별진단용 one-step multiplex RT-PCR 진단법

김희정<sup>1</sup> · 김은미<sup>1,4</sup> · 신연경<sup>2</sup> · 송재영<sup>2</sup> · 김성희<sup>3</sup>  
이경기<sup>3</sup> · 이명현<sup>3</sup> · 김영화<sup>5</sup> · 박준철<sup>5</sup> · 여상건<sup>1</sup> · 박최규<sup>1\*</sup>

경북대학교 수의과대학 & 수의전염병제어센터<sup>1</sup>, 농림축산검역본부 바이러스과<sup>2</sup>,  
농림축산검역본부 질병진단과<sup>3</sup>, (주) RAD<sup>4</sup>, 국립축산과학원<sup>5</sup>

### One step multiplex RT-PCR preventing DNA carryover contamination for differential diagnosis of swine influenza viruses

Hee-Jung Kim<sup>1</sup>, Eun-Mi Kim<sup>1,4</sup>, Yeun-Kyung Shin<sup>2</sup>, Jae-Young Song<sup>2</sup>,  
Seong-Hee Kim<sup>3</sup>, Kyoung-Ki Lee<sup>3</sup>, Myoung-Heon Lee<sup>3</sup>, Young-Hwa Kim<sup>5</sup>,  
Jun-Cheol Park<sup>5</sup>, Sang-Geon Yeo<sup>1</sup>, Choi-Kyu Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine & Animal Disease Intervention Center,  
Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

<sup>2</sup>Virology Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Anyang 430-757, Korea

<sup>3</sup>Disease Diagnostic Center, Animal and Plant Quarantine Agency, Anyang 430-757, Korea

<sup>4</sup>RAD Inc. Daegu 718-913, Korea

<sup>5</sup>National Institute of Animal Science, R.D.A., Seonghwan 331-308, Korea

(Received 31 October 2014; revised 15 November 2014; accepted 20 November 2014)

#### Abstract

In this study, we developed a cost and time saving one-step multiplex RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of swine influenza viruses (SIV) and 2009 pandemic influenza H1N1 virus (pH1N1). The one-step multiplex RT-PCR using four sets of primer was confirmed to be capable of detection of all SIV subtypes and differential diagnosis of major SIV subtype H1, H3 and pH1N1 on individual or mixed viral culture samples. The sensitivity of the multiplex RT-PCR was determined to be at least  $2^{-6}$  HA/25  $\mu$ L of the presented SIVs, providing sufficient efficacy for a routine SIV monitoring in diagnostic laboratories. In addition, compared with the conventional RT-PCR methods that cannot avoid the carryover DNA contamination, the developed RT-PCR applied with the uracil DNA glycosylase (UNG) system was proven to prevent a false positive reaction by carryover contamination of the pre-amplified DNA. In conclusion, the one-step RT-PCR with UNG system could be applicable to detect and differentiate of SIV from the viral cultures without worry of carryover DNA contamination in clinical laboratories.

**Key words :** Swine influenza virus (SIV), Multiplex RT-PCR, Uracil DNA glycosylase (UNG), Differential diagnosis

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

## 서 론

돼지 인플루엔자 바이러스(swine influenza virus; SIV)는 돼지에서 급성 호흡기질환을 유발하며, 임신 모돈의 유산을 유발하기도 한다. 일반적으로 돼지에서 임신 증상은 경미하며, 대개 1주일 이내에 회복이 되기 때문에 양돈 산업에서의 피해는 그리 크지 않다고 알려져 있다(van Reeth 등, 2012). 그러나 2009 pandemic influenza H1N1 (pH1N1)의 발생 예와 같이 돼지는 조류와 포유류 인플루엔자 바이러스의 재조합이 일어나는 “mixing vessel” 역할을 할 수 있기 때문에 돼지 집단에 감염되는 인플루엔자 바이러스에 대한 감시활동의 필요성이 대두되었다(Hass 등, 2011; Matrosovich 등, 2009). 이에 한국에서도 2009년 pH1N1 발생 이후 국가 가축방역사업의 일환으로 매년 SIV에 대한 양돈장 모니터링 및 바이러스 변이 감시활동을 수행해오고 있다(Kim 등, 2011; Kim 등, 2014).

현재 한국의 가축방역기관의 SIV 진단체계는 세계 보건기구 및 세계동물보건기구에서 추천하는 전통적인 바이러스 배양법과 분자생물학적 진단법을 주로 적용하고 있다(Kim 등, 2014; OIE, 2012; WHO, 2010). 즉, 돼지의 비강에서 채취한 도말시료를 발육란 또는 배양세포에 접종하여 4-5일간 배양한 다음, 혈구응집 반응(hemagglutination test; HAT)을 실시하여 양성인 배양액에 대하여 1차 역전사-중합효소연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)을 실시하여 SIV의 M gene을 증폭함으로써 배양액 내 SIV의 존재를 확인한 다음, 1차 RT-PCR 양성시료를 대상으로 H1, H3 아형의 SIV 및 pH1N1 인플루엔자 바이러스의 감별을 위한 2차 RT-PCR을 실시하여 바이러스 아형을 확인하고 있다(Kim 등, 2011; Kim 등, 2014). 이와 같이 현행 SIV 진단체계는 2단계의 RT-PCR을 실시함으로써 검사시간과 경비가 많이 소요되며, 반복적인 RT-PCR 과정을 통하여 기 증폭된 DNA에 의한 실험실 내부 환경 및 기구의 오염과 이로 인한 위양성 반응이 나타날 가능성이 상존하고 있다(Li 등, 2012, Rys와 Persing, 1993). 이러한 현행 진단법의 단점을 극복하기 위해서는 여러 단계의 돼지 인플루엔자 바이러스의 진단체계를 단순화함으로써 진단시간과 경비를 절감하고, 동시에 실험실 내 핵산 오염 및 오진 가능성을 최소화할 수 있는 새로운 개념의 유전자진단법 개발이 필요한 실정이다.

그간 PCR 과정 중에 발생할 수 있는 실험실 내 핵

산 오염 및 이에 의한 오증폭에 대한 우려가 꾸준히 제기되어 왔으며, 그 중에서도 이전의 PCR 과정에서 대량으로 증폭된 PCR 증폭산물에 의한 오염이 가장 심각한 문제로 대두되었다(Aslanzadeh, 2004). 이러한 PCR 과정 중 핵산 오염에 의한 오진을 방지하기 위한 다양한 방법들이 모색되어 왔으며(Rys와 Persing, 1993), uracil DNA glycosylase (UNG) 시스템을 이용한 핵산 오염 방지 전략은 가장 현실적이고, 효과적인 방법으로 제시되어왔다(Longo 등, 1990; Pang 등, 1992; Tetzner, 2009). 그러나 아직 수의학분야에서 가축 질병에 대한 PCR 진단과정의 오염을 방지하기 위한 목적으로는 UNG 시스템이 응용된 바는 많지 않으며, 특히 SIV의 PCR 진단에 적용된 예는 아직 보고된 바가 없다.

따라서 이 연구에서는 배양액 내에서 SIV 존재 여부와 바이러스 아형을 동시에 감별 진단할 수 있으며, 실험실내 핵산의 오염을 사전에 차단할 수 있는 UNG 시스템을 적용한 one-step multiplex RT-PCR기법을 개발하였고, 기존의 RT-PCR 방법과 진단 효율 및 핵산 오염 방지효과를 비교 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 공시 바이러스 및 핵산추출

시험에 사용한 SIV는 농림축산검역본부에서 분양 받았으며, 공시 바이러스를 이용한 실험은 농림축산검역본부에서 수행하였다. 즉, H1N1 아형(A/Korea/D180-2/2009), H1N2 아형(A/Korea/103/2009), H3N2 아형(A/Korea/A18/2011) 및 pH1N1 (A/Korea/VD01/2009) 바이러스를 세계동물보건기구(OIE)의 표준 방법에 준하여 발육란에 접종하여 배양한 다음, 혈구응집반응을 실시하여 역가를 측정한 다음, 시험에 공시하였다(Kim 등, 2014; OIE, 2012; WHO, 2010). 각 바이러스 배양액으로부터 시판 RNA 추출키트(Inclone biotech, Korea)를 이용하여 RNA를 추출한 다음,  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하며, RT-PCR에 제공하였다.

### 진단용 프라이머 설계

SIV H1 및 H3 아형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set를 선별하기 위하여 2009~2012년 사이에 Genbank에 등록된 SIV H1 아형의 유전자 염기서열

**Table 1.** Primer sets of the one-step multiplex RT-PCR for differential diagnosis of swine influenza viruses (SIV)

Name	Target* gene	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Reference
ComF	Matrix	ATGAGYCTTYTAACCGAGGTCGAAACG	242	Shin et al. (2011)
ComR		TGGACAAANCGTCTACGCTGCAG		
NFF	Matrix	GGAGGTGTCACCTAAGCTATTCA	452	Shin et al. (2011)
NFR		CCCAATGATATTTGCTGCAATG		
SH1F	HA	CAGTRTCATCATTTGARAGRIT	375	This study
SH1R		GTCCAGTARTAGTTSATTCT		
SH3F	HA	CCTCGRGGTTACTTCAAAAT	608	This study
SH3R		CCATRTCCTCAGCATTTC		

\*ComF-R, NFF-R, SH1F-R and SH3F-R primer sets were designed for the specific amplification of matrix gene of all influenza A viruses and 2009 pandemic influenza H1N1 virus, HA gene of SIV subtype 1 and 3, respectively.

정보 100여 개와 SIV H3 아형의 유전자 염기서열 정보 70여 개를 확보하였다. 확보된 정보를 유전자 염기서열 분석 프로그램인 DNASTAR<sup>®</sup>Lasergene (DNASTAR, Inc, USA)으로 통합 분석하여, 가장 변이가 적고 안정적인 유전자 부위를 탐색하여 SIV H1 및 H3 아형을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set (SH1F-SH1R 및 SH3F-SH3R)를 선발하였다(Table 1). 모든 SIV 아형을 증폭할 수 있는 공통 primer set (ComF-ComR)와 pH1N1 바이러스를 증폭할 수 있는 primer set (NFF-NFR)는 Shin 등(2011)이 보고한 primer set를 준용하였다. 제작된 primer set를 혼합하여 multiplex RT-PCR을 수행할 경우, H1 아형의 SIV는 공통 primer set와 H1 아형 특이 primer set에 의해 242 bp 및 375 bp의 특이 유전자가 증폭되며, H3 아형의 SIV는 공통 primer set와 H3 아형 특이 primer set에 의해 242 bp 및 608 bp의 특이 유전자가 증폭되도록 설계하였다. 그리고 pH1N1 바이러스인 경우에는 공통 primer set와 H1 아형 primer set 및 pH1N1 특이 primer set에 의해 3개의 밴드(242, 375 및 452 bp)가 증폭되도록 설계하였다.

### One-step multiplex RT-PCR 조건 확립

RT-PCR premix (Inclone, Korea)에 각 인플루엔자 바이러스 아형 특이 primer set를 2~20 pmol/ul로 농도를 달리하여 첨가한 one-step multiplex RT-PCR premix를 제조하였으며, RT-PCR 증폭효율에 따라 각 primer set의 농도를 적절하게 조정하여 최적의 증폭 조건을 확립하였다. 제조한 PCR-premix 20  $\mu$ L에 바이러스 배양액으로부터 추출한 RNA 5 ml를 첨가 혼합한 다음, 핵산증폭기(Geneteck, USA)를 이용하여 RT-PCR을 실시하였다. 즉, 50°C에서 30분간의 RT 과

정을 거친 후, 95°C에서 15분간 처리한 다음, 35 회전의 PCR 과정(denaturation 95°C 30초, annealing 50°C 60초, extension 72°C 90초)를 수행한 다음, 72°C에서 10분간 최종 반응하였다. RT-PCR 증폭산물은 1.5% agarose gel에 전기 영동한 후 UV transilluminator (Bio-Rad, USA)로 확인하였다.

### 개발 진단법의 특이도와 민감도

개발진단법의 특이도를 확인하기 위하여 검출 대상 SIV (H1N1, H1N2, H3N2) 및 pH1N1 바이러스 배양액에서 RNA를 추출한 다음, multiplex RT-PCR을 실시하여 각 바이러스 유전자를 특이적으로 증폭하는지 여부를 확인하였다. 또한 개발진단법의 민감도를 확인하기 위하여 공시 바이러스 H1N1, H1N2, H3N2 및 pH1N1 바이러스의 배양액에 대하여 HAT를 실시하여 바이러스 역가를 8배로 조정하였고, 각 SIV 아형 및 동량의 각 바이러스 혼합액을 인산완충액 (pH 7.2)으로 4배수 단계 희석하였다. 각 희석액에서 추출된 RNA를 이용하여 RT-PCR을 실시한 후 최종 검출한계를 조사하였다.

### UNG 시스템 적용 및 비적용 RT-PCR의 민감도 비교

UNG 시스템 적용 RT-PCR 키트를 개발하기 위하여 우선 UNG-RT-PCR premix (uPremix)를 제조하였다. 즉, uPremix는 시판 RT-PCR premix (Inclone, Korea)의 구성 성분에서 deoxythymidine triphosphate (dTTP)를 2/3 수준(1.5 mM)으로 줄이고, deoxyuridine triphosphate (dUTP) 1.0 mM 및 UNG 효소(ArcticZymes Inc., USA) 0.1 unit을 첨가하여 제조하였다. UNG 시스템 적용 RT-PCR의 경우 기존의 RT-PCR 조건에 UNG

처리과정이 포함되어야 하므로 RT-PCR 과정 이전에 추출된 RNA 시료를 포함한 모든 RT-PCR 성분이 포함된 튜브를 실온(25°C)에서 5분간 정치하였고, UNG 활성을 제거하기 위하여 92°C에서 1분간 반응시켰다. UNG 시스템 적용 시 RT-PCR의 민감도가 영향을 받는지 여부를 확인하기 위하여 공시바이러스를 대상으로 동일한 반응조건으로 UNG 시스템 비적용 RT-PCR과 UNG 시스템 적용 RT-PCR을 실시하였다. 즉, 제조된 기존 RT-PCR premix와 uPremix 20 µL에 HAT 역가 8배로 조정된 4종의 공시 바이러스 배양액을 인산완충액(pH 7.2)으로 4배수 단계 희석하였다. 각 희석액(2<sup>1</sup>, 2<sup>-1</sup>, 2<sup>-3</sup>, 2<sup>-5</sup> 및 2<sup>-7</sup> HA unit/25 µL)에서 추출한 RNA 5 µL를 두가지 방식의 RT-PCR premix에 첨가하여 RT-PCR을 실시한 다음, 각 바이러스에 대한 검출한계를 비교하였다.

**UNG 시스템 적용 RT-PCR의 핵산오염 방지효과**

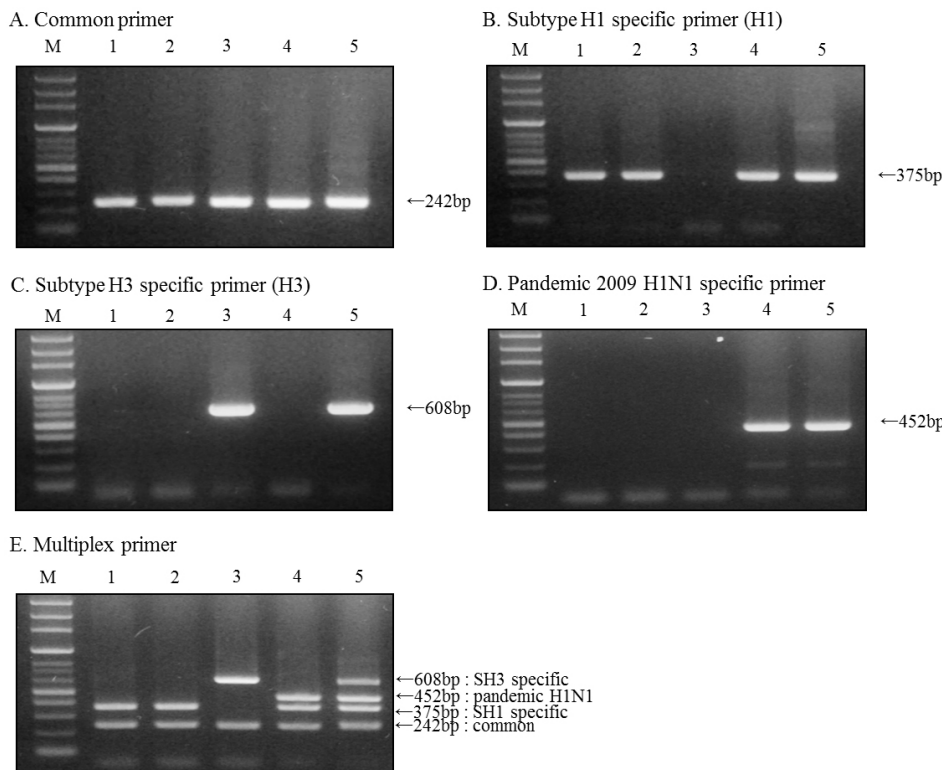
이전에 실시된 RT-PCR에 의해 증폭된 SIV 유전자 산물이 실험실 내에 오염되어 있음을 전제로 하여 이 연구에서 개발된 UNG 시스템 적용 RT-PCR법이 기 증폭된 핵산의 오염에 의해 영향을 받는지 여부를 확인하였다. 즉, UNG 시스템 적용 RT-PCR을 통하여

기 증폭된 DNA를 핵산정량기(Thermo Fisher scientific Inc., USA)로 정량한 다음, RT-PCR premix와 개발 uPremix에 농도별로 20 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg 및 10 pg을 각각 첨가하여 혼합한 다음, 전술한 방법으로 RT-PCR을 수행하여 증폭산물을 확인하였다.

**결 과**

**One-step multiplex RT-PCR 조건 및 특이도 확인**

SIV H1 및 H3 아형 및 pH1N1 바이러스 진단용 primer set의 작동 여부를 확인하기 위하여 각 primer set 별로 해당 바이러스 아형에 대하여 RT-PCR을 실시한 결과, 해당 primer set가 각 바이러스 아형을 특이적으로 증폭함을 확인할 수 있었다. 즉, SIV 공통 primer set (ComF-comR)로는 공시된 모든 바이러스의 matrix 유전자를 증폭하였고, SIV H1 및 H3 아형 특이 primer set (SH1F-SH1R 및 SH3R-SH3R)는 H1 아형의 SIV (H1N1, H1N2)의 HA 유전자를 증폭하였으며, pH1N1 바이러스 특이 primer set (NFF-NFR)는 pH1N1 바이러스의 특이 matrix 유전자를 특이적으로 증폭함



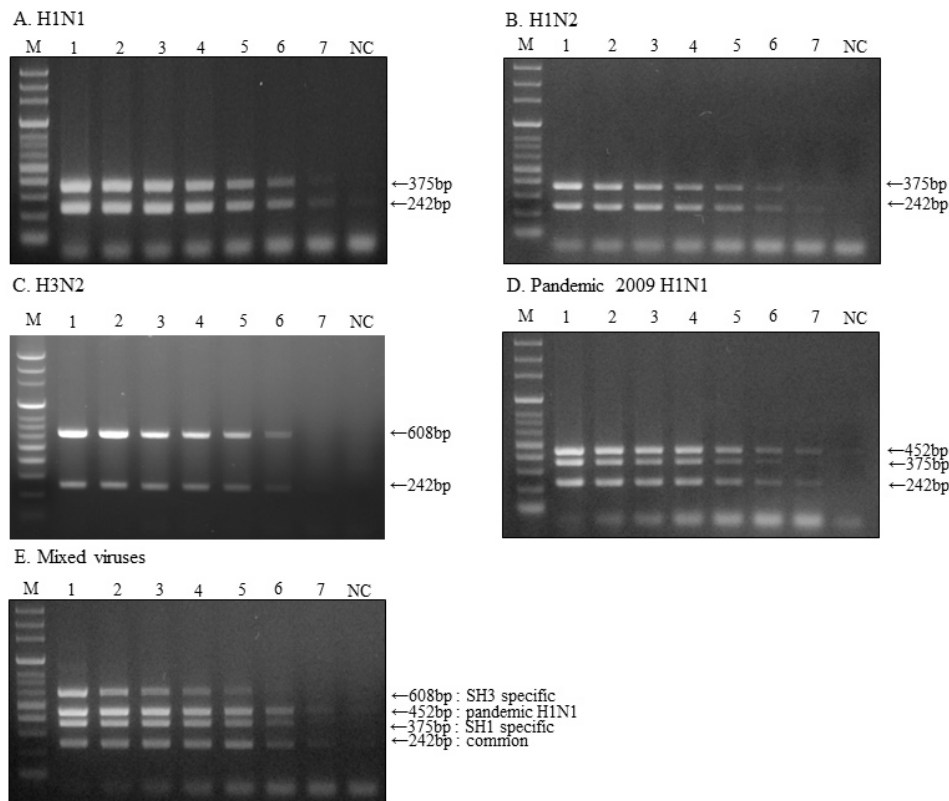
**Fig. 1.** Specificity of RT-PCR in detecting swine influenza virus (SIV) subtype H1, H3, pandemic 2009 H1N1 (pH1N1) by single (A ~D) or multiplex RT-PCR (E). Lane M; 100 bp DNA ladder, Lane 1; SIV H1N1, Lane 2; SIV H1N2, Lane 3; SIV H3N2, Lane 4; pH1N1, Lane 5; mixed viruses.

을 확인하였다(Fig. 1A). 이어 4종의 primer sets를 H1 및 H3 아형과 pH1N1 바이러스를 동시에 검출할 수 있는 최적 반응조건을 확립하기 위하여 각 primer set의 농도별 최적 반응 조건을 탐색한 결과, 공통 primer set는 2 pmol, H1 및 H3 아형 검출용 primer set는 각각 20 pmol, 그리고 pH1N1 검출용 primer set는 3 pmol을 혼합하였을 때 최적의 증폭이 일어남을 확인하였다(Fig. 1).

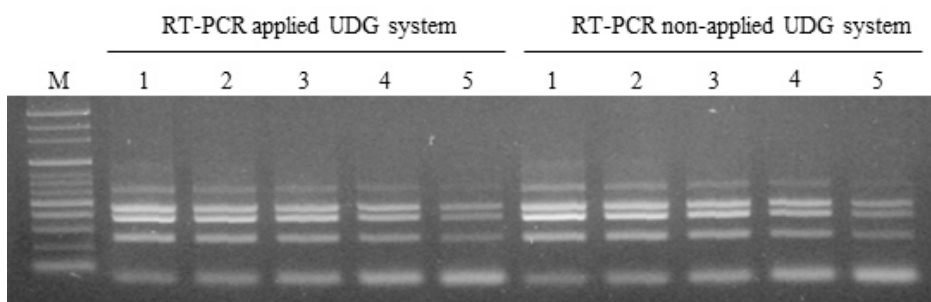
### 개발 진단법의 민감도

조건이 확립된 one step multiplex RT-PCR의 민감도를 확인하기 위하여 단계희석한 각 아형의 SIV와

pH1N1 바이러스 배양액에서 핵산을 추출한 다음, 4종의 primer set가 포함된 RT-PCR premix를 이용하여 RT-PCR을 실시하고, 증폭산물을 전기영동 및 염색하여 육안으로 관찰한 결과, 각 바이러스별로는 H1N1 아형은  $2^{-7}$  HA/25  $\mu$ L, H1N2 아형은  $2^{-6}$  HA/25  $\mu$ L, H3N2 아형은  $2^{-6}$  HA/25  $\mu$ L, 그리고 pH1N1 아형은  $2^{-7}$  HA/25  $\mu$ L까지 명확하게 관찰이 가능하였으며, 5종의 공시 바이러스 혼합시료인 경우에도 개별 바이러스에 대한 RT-PCR 결과와 별 차이 없이  $2^{-6}$  HA/25  $\mu$ L까지 특이밴드가 확인되었다(Fig. 2). 또한 UNG 시스템 적용에 따른 민감도 변화를 확인하기 위하여 동일한 민감도 측정 과정으로 공시 바이러스 혼합액의 희석액( $2^1$ ,  $2^{-1}$ ,  $2^{-3}$ ,  $2^{-5}$ , 및  $2^{-7}$  HA unit/25  $\mu$ L)에 대하



**Fig. 2.** Sensitivity of one-step multiplex RT-PCR in detecting swine influenza virus (SIV). A to E correspond to SIV subtype H1N1, H1N2, H3N2, pandemic 2009 H1N1 and mixed virus samples, respectively. Lane M; 100 bp ladder, Lane 1-7:  $2^3$ ,  $2^1$ ,  $2^{-1}$ ,  $2^{-3}$ ,  $2^{-5}$ ,  $2^{-7}$  and  $2^{-9}$  HA/25  $\mu$ L of cultured influenza viruses, respectively. Lane NC; negative control.



**Fig. 3.** Comparison of the sensitivity of the one-step multiplex RT-PCR between UNG-applied and non-applied case. Lane M; 100 bp ladder, Lane 1-5:  $2^1$ ,  $2^{-1}$ ,  $2^{-3}$ ,  $2^{-5}$ , and  $2^{-7}$  HA unit/25  $\mu$ L of cultured influenza viruses, respectively.

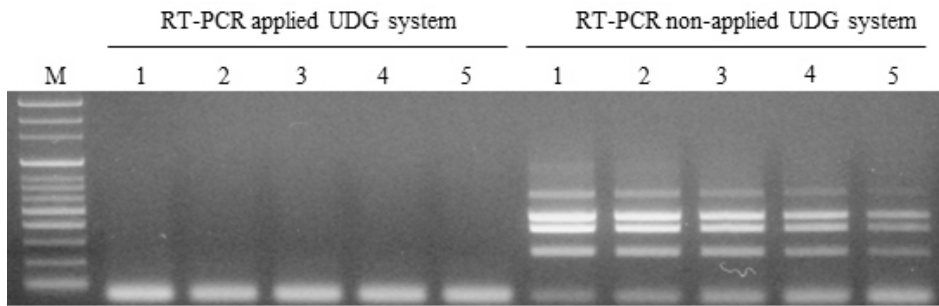


Fig. 4. Control of DNA carryover contamination by the developed UNG system-applied one-step multiplex RT-PCR. Lane M; 100 bp ladder, Lane 1-5; RT-PCR results with each premix incorporated with pre-amplified SIV DNAs by the developed RT-PCR as a different concentration of 20 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg and 10 pg/ $\mu$ L, respectively.

여 비교 시험을 실시한 결과, UNG 시스템을 적용한 RT-PCR과 UNG 시스템 비적용 RT-PCR에서 공히  $2^{-7}$  HA unit/25  $\mu$ L 희석농도까지 측이 밴드가 확인되어 UNG 적용에 따른 민감도의 차이는 나타나지 않았다 (Fig. 3).

#### 개발진단법의 핵산 오염 방지효과

개발진단법의 핵산 오염 방지효과를 확인하기 위하여 개발진단법으로 기증폭된 DNA를 20 ng/ $\mu$ L에서 10 pg/ $\mu$ L까지 희석한 다음, UNG 적용 uPremix와 UNG 비적용 RT-PCR premix에 각각 동일한 조건으로 혼입하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과, UNG 시스템 비적용 premix로 RT-PCR을 실시한 경우에는 오염된 DNA에 의한 증폭이 일어났지만 UNG 시스템 적용 uPremix으로 RT-PCR을 실시한 경우에는 오염시킨 DNA의 양에 상관없이 오증폭이 일어나지 않음이 확인되었다(Fig. 4).

## 고 찰

A형 인플루엔자 바이러스(influenza A virus; IAV)는 사람과 다양한 동물에 감염되면서 유전적 변이를 지속하고 있으며, 2009년 pH1N1의 대유행과 같이 인류의 보건을 위협하는 새로운 변이주가 출현할 가능성이 상존하고 있다(Peiris 등, 1992; Vijaykrishna 등, 2010). 이러한 위협요인에 효율적으로 대응하기 위하여 사람 및 동물 집단에 감염되는 IAV에 대한 지속적인 감시활동이 필요하며, 특히 2009년 대유행한 pH1N1이 돼지에서 유래되었음이 밝혀진 이후 돼지 집단에 대한 IAV 감시활동이 강화되고 있다(Schnitzler와

Schnitzler, 2009; Vincent 등, 2014).

SIV를 포함한 IAV에 대한 효율적인 감시활동을 위해서는 신속, 정확한 진단법의 활용이 필수적이며, RT-PCR이나 real-time RT-PCR과 같은 유전자진단법은 IAV에 대한 감시활동과 동시에 바이러스의 유전적 특성 분석이 가능하기 때문에 여러 가축질병 진단 기관에서 보편적으로 사용되고 있다(Wang와 Taubenberg, 2010). 그러나 PCR 기반 진단법은 목표유전자를 고도로 증폭시킴으로써 높은 민감도와 특이도를 갖는 반면에 오히려 고도의 민감도로 인하여 실험과정 중 극소량의 핵산 오염만으로도 오증폭을 유발하는 결정적인 단점을 가지고 있다(Li 등, 2012; Tetzner, 2009). 따라서 기존 PCR 진단법의 장점을 유지하면서 오염 가능성을 감소시키기 위하여, PCR 과정의 단순화와 함께 기증폭된 DNA의 오염에 의한 오진을 방지할 수 있는 새로운 방식의 PCR 진단법 개발이 시급한 실정이다. 이 연구에서는 이러한 요구에 부응하여, 돼지집단에서 감시활동 대상이 되는 SIV (H1 및 H3 아형)와 pH1N1을 동시에 감별 진단할 수 있는 one-step Multiplex RT-PCR을 개발하여 실험과정을 단순화하고, 또한 UNG 시스템을 적용하여 기증폭된 DNA의 오염에 의한 오진을 막고자 하였다.

현재까지 SIV 주요 아형을 감별진단하거나 SIV H1 아형과 pH1N1 바이러스를 감별 진단할 수 있는 다양한 RT-PCR 또는 real-time RT-PCR이 개발되어 왔다(Aunyaratana 등, 2011; Chiapponi 등, 2012; Lee 등, 2008; Lorusso 등, 2010; Nagarajan 등, 2010; Shin 등, 2011). 그러나 돼지에서는 기존의 H1 및 H3 아형과 pH1N1 뿐만 아니라 다양한 변이주의 감염이 국내·외에서 확인되고 있다(Kim 등, 2014; Ma 등, 2010; Vincent 등, 2014). 또한 돼지는 조류와 포유류에서 유래한 다양한 아형의 IAV가 감염될 수 있으며, 동일

돼지에서 다양한 축종에서 유래한 다양한 아형의 IAV가 복합 감염될 수도 있다(Fu 등, 2010). 따라서 돼지에 대한 국가 감시사업에 있어서는 돼지에 주로 감염되는 SIV의 주요 아형(H1 및 H3 아형)과 pH1N1은 물론 다른 아형의 IAV 감염 가능성을 대비하여 모든 IAV 아형을 동시에 감별 진단할 수 있는 RT-PCR법의 개발 및 적용이 필요하다. 이 연구에서는 SIV H1, H3 및 pH1N1 진단용 primer set들과 모든 IAV를 검출할 수 있는 공통 primer set를 이용한 one-step multiplex RT-PCR을 개발하였고, 공시 바이러스에 대하여 특이도를 확인한 결과(Fig. 1) 해당 바이러스들을 모두 특이적으로 진단할 수 있음이 확인되었다. 따라서 이 연구에서 개발된 RT-PCR 진단법을 돼지집단의 SI 감시활동에 매우 유용할 것으로 판단된다.

공시 바이러스를 이용하여 개발 진단법의 민감도를 조사한 결과, 개별 바이러스에 대한 single PCR의 검출한계와 4종 바이러스에 대한 multiplex RT-PCR의 검출한계는 공히 최소 HAT 역가  $2^{-6}/25 \mu\text{L}$ 으로 확인되었다(Fig. 2). 이는 현행 SIV 진단체계에서 바이러스 배양액에서 HAT 2배 이상의 역가가 확인되어야 바이러스 양성으로 판정하고, 추가적인 유전자진단법을 적용하고 있음을 고려할 때 현행 진단체계에서 활용할 수 있을 만큼 충분한 민감도를 가지는 것으로 판단된다(OIE, 2012; WHO, 2010).

PCR 진단법에서의 오염문제는 검사시료를 처리하는 과정에서부터 PCR 전 과정에서 발생할 수 있으며, 특히 이전의 PCR을 통하여 증폭된 DNA의 오염문제가 가장 심각한 것으로 보고되고 있다(Aslanzadeh, 2004; Kwok과 Higuchi, 1989; Persing, 1990). 따라서 이 연구에서는 이전의 PCR에서 증폭된 DNA의 오염과 이로 인한 오증폭을 방지하기 위하여 UNG 시스템을 도입하였다. UNG는 DNA 염기서열로부터 uracil 염기를 절단하는 기능을 가지고 있으며, RNA나 유리된 nucleotide 상태의 uracil 염기를 절단하지는 않는다(Duncan, 1981). 따라서 PCR 진단시약에 포함되는 dTTP 대신에 dUTP를 첨가하여 PCR을 실시하게 되면 증폭된 DNA 단편의 유전자염기서열에는 dTTP 대신에 dUTP가 자리하게 되며, 이러한 DNA 단편에 UNG를 반응시키면 DNA 염기서열이 절단되기 때문에 다음 PCR 과정에 증폭된 DNA가 오염되더라도 오증폭을 유발하지 않게 된다(Aslanzadeh, 2004; Longo 등, 1990). 이 연구에서 개발된 진단법은 이러한 원리를 이용하여 제조된 uPremix를 이용하여 각 아형의

SIV를 RT-PCR로 증폭하였고, 증폭된 DNA를 의도적으로 오염시켜 신규 RT-PCR을 실시한 결과, UNG 시스템을 적용한 경우에는 PCR 이전 UNG 처리단계에서 오염된 증폭 DNA가 모두 제거되어 오증폭이 일어나지 않음을 확인하였다(Fig. 4). 한편, UNG 시스템을 적용할 경우에는 적정량의 UNG를 사용하는 것이 중요하다. 이에 대하여 Longo 등(1990)은 UNG 첨가 시 진단의 민감도가 감소된다고 보고한 바 있으며, Pang 등(1992)은 오히려 적당한 UNG 첨가가 민감도를 증가시키는 결과를 가져왔다고 보고하는 등 UNG 첨가에 따른 민감도 저하 부분은 논란의 여지가 있다. 이에 이 연구에서는 UNG 첨가량을 달리하여 사전 시험을 실시한 결과, 0.1 unit 이상의 UNG를 첨가할 경우 반응의 민감도에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 따라서 반응의 민감도에는 영향을 미치지 않으면서도 오염 DNA를 제거할 수 있도록 UNG 첨가량을 0.1 unit으로 고정하였고, 또한 PCR 증폭과정에 사용되는 중합효소의 증폭효율이 기존의 dTTP 첨가할 때보다 dUTP를 첨가할 때 감소된다는 점을 고려하여 본 연구에서 uPremix를 제조할 때 dTTP를 dUTP로 완전 대체하지 않고 부분적으로 대체하여 UNG 시스템 적용에 따른 민감도 감소 문제를 해결하였다(Fig 3). 현재까지 수의학 분야의 유전자 진단에 이러한 UNG 시스템을 적용한 예는 본 연구가 국내에서 최초이며, 향후 이 UNG 시스템은 인플루엔자 바이러스뿐 아니라 다른 바이러스성 질병의 진단에도 폭넓게 이용될 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 인플루엔자바이러스의 경우에는 실험실 내 공기 오염을 통해서도 오진이 발생할 수 있으므로(Li 등, 2012) PCR 증폭산물에 의한 오염 뿐만 아니라 실험실내에서 이루어지는 진단 전과정에 걸쳐서 바이러스 및 핵산 오염과 이로 인한 오진이 발생할 수 있음을 고려하여 향후 더 엄격한 오진 방지대책이 개발되어야 할 것으로 생각된다. 또한 이 연구에서 개발된 진단법은 1차적으로 배양과정을 통하여 바이러스 증식이 확인된 바이러스 배양액을 대상으로 한다는 점에서 향후 야외 검사 시료에 대한 직접적인 진단이 가능한 방식으로 더 개선되어야 할 것으로 생각된다.

결론적으로 이 연구에서는 SIV의 주요 아형(H1, H3 아형)과 pH1N1을 동시에 감별 진단할 수 있는 one-step multiplex RT-PCR을 개발하여 진단경비와 진단시간을 절감할 수 있게 되었다. 또한 개발 진단법에 UNG 시스템을 적용함으로써 이전의 RT-PCR에 의해 증폭된 DNA의 오염에 따른 오증폭을 방지할

수 있었다. 따라서 본 연구에서 개발된 UNG 시스템 적용 one-step multiplex RT-PCR은 SIV를 진단하는 실험실에서 바이러스 배양액을 대상으로 SIV를 확진하는데 있어 기존의 RT-PCR법을 대체하는 상용 진단법으로 널리 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 결 론

이 연구를 통하여 돼지 인플루엔자 바이러스(swine influenza virus; SIV)의 주요 아형과 2009 팬데믹 인플루엔자 H1N1 바이러스(pH1N1)를 동시에 신속하게 감별진단 할 수 있는 one step multiplex RT-PCR을 개발하였다. 개발 one step multiplex RT-PCR은 모든 SIV를 검출할 수 있는 공통 프라이머 세트와 SIV의 H1 및 H3 아형, 그리고 pH1N1을 특이적으로 검출할 수 있도록 총 네 쌍의 프라이머 세트를 이용함으로써 각각의 해당 바이러스 단독 시료 또는 여러 아형의 바이러스의 혼합시료로부터 각 바이러스를 동시에 감별진단 할 수 있었다. 개발된 one step multiplex RT-PCR의 검출한계는  $2^{-6}$  HA/25  $\mu$ L로 확인되어 일선 진단실에서 충분히 사용 가능한 것으로 평가되었다. 또한 개발 진단법은 uracil DNA glycosylase (UNG) 시스템을 적용하였던 바, 일반 RT-PCR과는 달리 이전의 PCR을 통하여 증폭된 DNA의 오염에 의한 오증폭을 방지할 수 있음이 확인되었다. 따라서 이 연구에서 개발된 UNG 시스템 적용 one step multiplex RT-PCR은 임상 실험실에서 SIV의 감별진단법으로 상용화될 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사의 글

이 연구는 농림축산식품부 가축질병대응기술개발사업(과제번호: 313060-03-1-HD020), 생명산업기술개발사업(311007-5), 농촌진흥청 FTA대응경쟁력향상기술개발사업(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.

- Aunyaratana T, Rachod T, Ranida T, Donreuthai S, Roongroje T, Alongkorn A, Kanisak O, Pravina K. 2011. Single-step multiplex reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of the 2009 H1N1 Influenza A virus pandemic in Thao swine populations. *J Vet Diagn Invest* 23: 1017-1021.
- Chiapponi C, Moreno A, Barbieri I, Merenda M, Foni E. 2012. Multiplex RT-PCR assay for differentiating European swine influenza virus subtype H1N1, H1N2, H3N2. *J Virol Methods* 184: 117-120.
- Duncan BK. 1981. DNA glycosylases. pp. 565-586. In: Boyer P(ed). *The Enzymes*. 3rd ed. Academic Press, New York.
- Hass J, Matuszewski S, Cieslik D, Haase M. 2011. The role of swine as "mixing vessel" for interspecies transmission of the influenza A subtype H1N1: a simultaneous Bayesian inference of phylogeny and ancestral hosts. *Infect Genet Evol* 11: 437-441.
- Fu G, Liu M, Zeng W, Pu J, Bi Y, Ma G, Liu J. 2010. Establishment of a multiplex RT-PCR assay to detect different lineages of swine H1 and H3 influenza A viruses. *Virus Genes* 41: 236-240.
- Kim SH, Moon OK, Lee KK, Song YK, Yeo CI, Bae CW, Yoon H, Lee OS, Lee JH, Park CK. 2011. Outbreak of pandemic influenza (H1N1) 2009 in pigs in Korea. *Vet Rec* 169: 155a.
- Kim SH, Roh IS, Lee KK, Park CK. 2014. A novel reassortant H1N2 virus related to the pandemic H1N1 2009 influenza virus isolated from Korean pigs. *Virus Genes* 48: 193-198.
- Kwok S and Higuchi R. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature (London)* 339: 237-238.
- Lee CS, Kang BK, Lee DH, Lyou SH, Park BK, Ann SK, Jung K, Song DS. 2008. One-step multiplex RT-PCR for detection and subtyping of swine influenza H1, H3, N1, N2 viruses in clinical samples using a dual priming oligonucleotide (DPO) system. *J Virol Methods* 151: 30-34.
- Li Z, Li J, Zhang Y, Li L, Ma L, Li D, Gao F, Xia Z. 2012. Aerosolized avian influenza virus by laboratory manipulations. *Virology J* 9: 146(1-8).
- Longo MC, Beminger MS and Hartley JL. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93: 125-128.
- Lorusso A, Faaberg KS, Killian ML, Koster L, Vincent AL. 2010. One-step real-time RT-PCR for pandemic influenza A virus (H1N1) 2009 matrix gene detection in swine samples. *J Virol Methods* 64: 83-87.
- Ma W, Lager KM, Lekcharoensuk P, Ulery ES, Janke BH, Solórzano A, Webby RJ, García-Sastre A, Richt JA. 2010. Viral reassortment and transmission after co-infection of pigs with classical H1N1 and triple-reassortant H3N2 swine influenza viruses. *J Gen Virol* 91: 2314-2321.
- Matrosovich M, Stech J, Klenk HD. 2009. Influenza receptors, polymerase and host range. *Rev Sci Tech* 28: 203-217.



- Nagarajan MM, Simard G, Longtin D, Simard C. 2010. Single-step multiplex conventional and real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays for simultaneous detection and subtype differentiation of Influenza A virus in swine. *J Vet Diagn Invest* 22: 402-408.
- Pang J, Modlin J and 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.
- Peiris JS, Poon LL, Guan Y. 2009. Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S-OIV) H1N1 virus in humans. *J Clin Virol* 45: 169-173.
- Persing DH. 1990. Polymerase chain reaction: trenches to benches. *J Clin Microbiol* 29: 1281-1285.
- 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.
- Schnitzler SU, Schnitzler P. 2009. An update on swine-origin influenza virus A/H1N1: a review. *Virus Genes* 39: 279-292.
- Shin YK, Yoon SS, Song JY, Kim JB, Hang DT, Park JW, Kim MY, Kim SH, Park CK, Li OS. 2011. One-step multiplex reverse-transcriptase PCR for detection of pandemic(H1N1) 2009 influenza virus. *J Vet Med Sc.* 73: 55-63.
- Tetzner R. 2009. Prevention of PCR cross-contamination by UNG treatment of bisulfite-treated DNA. *Methods Mol Biol* 507: 357-370.
- Van Reeth K, Brown IH and Olsen CW. 2012. Influenza virus. pp. 557-571. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ and Stevenson GW(ed.). *Diseases of Swine*, 10th ed. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa.
- Vincent A, Awada L, Brown I, Chen H, Claes F, Dauphin G, Donis R, Culhane M, Hamilton K, Lewis N, Mumford E, Nguyen T, Parchariyanon S, Pasick J, Pavade G, Pereda A, Peiris M, Saito T, Swenson S, Van Reeth K, Webby R, Wong F, Ciacci-Zanella J. 2014. Review of influenza A virus in swine worldwide: a call for increased surveillance and research. *Zoonoses Public Health* 61: 4-17.
- Vijaykrishna D, Poon LL, Zhu HC, Ma SK, Li OT, Cheung CL, Smith GJ, Peiris JS, Guan Y. 2010. Reassortment of pandemic H1N1/2009 influenza A virus in swine. *Science* 328: 1529.
- Wang R, Taubenberger JK. 2010. Methods for molecular surveillance of influenza. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8: 517-527.
- OIE. 2012. Manual of diagnostic test and Vaccines for terrestrial Animals. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.03.04\\_AI.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf)
- WHO. 2010. Pandemic(H1N1)2009-update100. [http://www.who.int/csr/don/2010\\_05\\_14/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2010_05_14/en/index.html)