

< Original Article >

## 돼지생식기호흡기증후군바이러스(PRRSV)의 전장 유전체 염기서열(whole-genome sequencing) 분석을 위한 차세대 염기서열 분석법의 활용

문성현<sup>1</sup> · 아미나 카툰<sup>1</sup> · 김원일<sup>1</sup> · 후세인 엠디 묵터<sup>2</sup> · 오연수<sup>3</sup> · 조호성<sup>1\*</sup>

전북대학교 수의과대학 수의학과 및 전북대학교 생체안전성연구소<sup>1</sup>, 방글라데시 실렛농업대학교 수의동물자원과학과<sup>2</sup>  
강원대학교 수의과대학 수의학과 수의병리학교실<sup>3</sup>

### Application of next generation sequencing (NGS) system for whole-genome sequencing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)

Sung-Hyun Moon<sup>1</sup>, Amina Khatun<sup>1</sup>, Won-Il Kim<sup>1</sup>, Md Mukter Hossain<sup>2</sup>, Yeonsu Oh<sup>3</sup>, Ho-Seong Cho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine and Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University, Iksan 54596, Korea  
<sup>2</sup>Department of Medicine, Faculty of Veterinary & Animal Science, Sylhet Agricultural University, Sylhet 3100, Bangladesh  
<sup>3</sup>Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine and Institute of Veterinary Science,  
Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

(Received 16 February 2016; revised 11 March 2016; accepted 17 March 2016)

#### Abstract

In the present study, fast and robust methods for the next generation sequencing (NGS) were developed for analysis of PRRSV full genome sequences, which is a positive sensed RNA virus with a high degree of genetic variability among isolates. Two strains of PRRSVs (VR2332 and VR2332-R) which have been maintained in our laboratory were used to validate our methods and to compare with the sequence registered in GenBank (GenBank accession no. EF536003). The results suggested that both of strains had 100% coverage with the reference; the VR2332 had the coverage depth from minimum 3 to maximum 23,012, for the VR2332-R from minimum 3 to maximum 41,348, and 22,712 as an average depth. Genomic data produced from the massive sequencing capacities of the NGS have enabled the study of PRRSV at an unprecedented rate and details. Unlike conventional sequence methods which require the knowledge of conserved regions, the NGS allows *de novo* assembly of the full viral genomes. Therefore, our results suggested that these methods using the NGS massively facilitate the generation of more full genome PRRSV sequences locally as well as nationally in regard of saving time and cost.

**Key words :** Next Generation Sequencing, NGS, PRRSV, Whole-genome sequencing

## 서 론

수의학 분야에서 질병을 유발하는 다양한 병원체를 연구하는 방법 중 유전자 염기서열을 분석하는 방법은 전통적으로 Sanger 방식의 primer walking 기법을

이용해왔다(Sanger 등, 1977; Yi 등, 2013). 그러나, 이 분석 방법은 이후 많은 개선이 있었지만 여전히 1,000 bp 이상 길이의 염기서열은 정확하게 분석하기 어렵고 이로 인한 많은 분석 시간과 비용이 소요되기 때문에 다양한 연구분야에 활용되는데 제약이 많았다(Yi 등, 2013). 이와 같은 문제를 해결하기 위해 최근 차세대염기서열 분석법(next generation sequencing,

\*Corresponding author: Ho-Seong Cho, Tel. +82-63-850-0960,  
Fax. +82-63-850-0910, E-mail. [hscho@jbnu.ac.kr](mailto:hscho@jbnu.ac.kr)

NGS)이 개발되었다. 이 방법은 2008년 인간 게놈의 염기서열 분석 결과를 4.5개월만에 내놓았고 이는 2001년 발표된 human genome project 연구가 13년 걸린 것과 비교되면서 주목 받기 시작했다. 그러나 고가의 장비와 많은 실험 비용 뿐 아니라 이를 분석하는 생물정보학과의 연계 등이 선행되어야 하는 문제 때문에 수의학 분야에서 활용하기에는 어려움이 있었다(Wheeler 등, 2008). 그러나 최근 기존 NGS 분석 서비스를 하는 기관이 늘어나고 있고 기존 공장형 NGS의 수백 Gb (giga base=1,000,000,000 bp) 단위가 아닌, 개인 연구실이나 진단기관에서 운영하기 적합하도록 상대적으로 적은 양의 데이터를 손쉽게 빠르게 생산하여 분석할 수 있고, 장비 가격과 운영비도 저렴해진 소형 NGS가 보급되면서 이를 수의학 분야에서도 직접 운용하거나 활용이 가능하게 되었다.

돼지생식기호흡기증후군(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)은 PRRS 바이러스(PRRS virus, PRRSV) 감염에 의한 질병으로(Baron 등, 1992), 임신돈에서 유산, 사산, 조산 등의 번식 장애와 호흡기 장애, 비육돈에서 성장 저하 등의 증상이 나타날 뿐 아니라(Cavanagh, 1997) 혈관염, 심근염, 뇌염, 비염 등 다른 질병들과 합병증이 동반되어 양돈산업에 막대한 경제적 손실을 주고 있다(Rossow 등, 1995; Neumann, 2005; Seo 등, 2015). PRRSV는 전 세계적으로 두 종류의 유전자형이 있는데 Lelystad virus (LV)로 대표되는 유럽형(type I)과 VR-2332으로 대표되는 북미형(type II)이다(Collins 등, 1992). PRRS는 1987년 미국에서 처음으로 보고되었고(Albina, 1997), 1990년 독일에서 type I에 의한 발생이 처음 확인된 이래(Wills 등, 1997) 한국에서는 1990년 초 type II 유전자형의 PRRSV가 처음 출현하였고(Kweon 등, 1994), type I 바이러스는 2005년에 처음 검출되었다(Kim 등, 2006).

PRRSV는 9개의 open reading frame (ORF)를 포함하는데 그 중 ORF5는 virion의 표면에 노출되는 GP5 단백질을 발현시키는 유전자로써 중화항체반응 유도하고, 바이러스간 매우 높은 유전자 변이를 보이기 때문에 PRRSV의 분자역학적 분석 대상 부위이다(Ansari 등, 2006; Key 등, 2001). 따라서 ORF5의 계통수 분석을 통해 바이러스의 변이에 따른 분류를 통해 전반적인 분포상황을 파악할 수 있다. PRRSV간 유전자 변이가 상대적으로 낮은 ORF7은 PRRSV 진단에 주로 이용되고 있는 부위이다(Pesente 등, 2006). 이렇게 특정 유전자 부위만을 한정적으로 분석하는데는

ORF만의 특징을 분석하는데도 이유가 있지만 PRRSV 전체 유전자가 15,500 bp 내외인 점을 고려하면 기존의 염기서열 분석법의 기술적 한계에도 이유가 있다.

따라서 본 논문에서는 NGS를 이용하여 다양한 PRRSV 전장 염기서열 분석을 수행함으로써 수의학 분야에서 NGS 시스템의 활용성을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 공시 바이러스

실험에 사용한 바이러스는 북미형 표준바이러스인 PRRSV VR2332 (ATCC VR2332)와 리바비린(Ribavirin) 처리를 통한 변이주인 VR2332-R, 총 2종을 사용하였다. 이들 바이러스들은 MARC-145 cells (ATCC No. CRL-12231)에서 배양하였고 역가는  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL로 조정하여 실험에 이용하였다.

### 바이러스 RNA 추출 및 cDNA 합성

각각의 바이러스는 RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Germany)를 이용하여 제조사에서 추천한 방법대로 바이러스 RNA를 추출하였다. cDNA와 standard는 Qubit<sup>®</sup> dsDNA HS Assay kit (Molecular Probes, Life technologies<sup>™</sup>, USA)를 사용하여 제품 설명서에 따라 준비하였고, DNA sample 1  $\mu$ L에 Quanti-iT reagent와 Quanti-iT buffer의 1:200 혼합액 199  $\mu$ L를 첨가하여 준비하였고, standard는 standard low buffer와 standard high buffer 각 10  $\mu$ L에 위와 동일 혼합액 190  $\mu$ L를 첨가하여 준비한 후 Qubit<sup>®</sup> 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Life technologies<sup>™</sup>, USA)를 이용하여 농도를 측정하였다.

### DNA Library 준비

정량한 cDNA sample은 Ion Xpress<sup>™</sup> Plus Fragment Library Kit (Life technologies<sup>™</sup>, USA)를 사용하여 350~400 bp의 크기의 단편으로 준비하였다. 간단히 설명하면, DNA sample에 Ion Shear<sup>™</sup>Plus 10X Reaction Buffer와 Nuclease-free Water 및 Ion Shear<sup>™</sup>Plus Enzyme Mix2를 혼합 후 Hot block에서 37°C, 5분간 처리하였고, 여기에 Ion Shear Stop Buffer를 혼합하였다. DNA sample의 정제에는 AMPure bead (Beckman Coulter,

USA)를 사용하였다. 각 DNA sample들은 Ion Xpress™ Barcode Adapters Kits (Ion Torrent, Life technologies™, USA)를 이용한 barcode 부착으로 구별할 수 있었다. 각 DNA fragment sample에 각각 barcode 서열이 다른 Ion Xpress™ Barcode를 혼합한 뒤, 25°C에서 15분, 72°C에서 5분간 처리하여 AMPure bead (Beckman Coulter, USA)를 사용해 정제하였다. 본 실험에 필요한 size의 fragment는 E-gel® iBase™ (Invitrogen, Life technologies, Israel)와 E-Gel® SizeSelect 2% Agarose Gel (Invitrogen, Life technologies, Israel)을 사용하여 선택하였다. 선택된 size의 DNA fragment는 Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit (Ion Torrent, Life technologies™, USA)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 DNA fragment sample에 Platinum® PCR SuperMix High Fidelity와 Library Amplification Primer Mix를 혼합하여 95°C에서 5분 initial denaturation을 수행한 뒤, 95°C에서 15초, 58°C에서 15초, 70°C에서 1분간 총 18 cycle을 반복 수행하였다. 증폭된 DNA fragment sample은 AMPure bead (Beckman Coulter, USA)를 사용하여 정제한 후 Ion Library Quantitation Kit (Life technologies™, USA)의 사용 설명서에 따라 serially dilution으로 준비하였고 control로 *E. coli* DH10B Control 400 Library (Ion Torrent, Life technologies™, USA)를 이용하였다. 준비된 sample은 real-time PCR machine (7500 Fast System, ABI, USA)을 사용하여 real-time PCR을 수행함으로써 정량하였다.

### Emulsion PCR 및 염기서열 분석

Emulsion PCR sample은 Ion PGM™ Template OT2 Reagent 400 kit (Life technologies™, USA)와 Ion PGM™ Template OT2 solution 400 kit (Life technologies™, USA)를 사용하여 설명서에 따라 준비하였다. Emulsion PCR은 OneTouch™2 (Life Technologies™, USA)를 이용하였다. 회수된 template-positive ISPs Pellet은 Dynabeads MyOne Streptavidin C1 beads (Life technologies™, USA)를 사용해 정제하였으며, Qubit® 2.0 Fluorometer를 사용하여 농도를 확인하였다.

Ion PGM™ Sequencing Reagent 400 kit (Life technologies™, USA)를 이용하여 시퀀싱을 수행하였다. 간단히 설명하면, template-positive ISPs에 control ISP를 혼합하고 15,500 × g에서 4분간 원심분리 하였고, 수거된 template-positive ISPs pellet은 sequencing primer와 혼합하여 95°C에서 2분, 37°C에서 2분간 in-

cubation 하였다. Template-positive ISPs는 Ion 316™ Chip Kit V2 (Life technologies™, USA)에 loading 하였고, sequencing은 Ion PGM™ (Life Technologies, USA) 장비를 사용하여 진행하였다.

### Data 분석

NGS sequencing 반응의 Raw data는 Ion PGM™을 통하여 Torrent Suite Server (ver. 4.0)에 저장되었고, 1차 sequencing 분석이 진행되었다. Torrent Suite Server에서 raw data를 export하여 CLC Genomics Workbench 8 program (CLC Bio, Qiagen, USA)을 사용하였고, VR2332 (Genbank No. EF536003)와 염기서열을 비교 분석하였다.

바이러스간의 상동성 분석을 위한 염기서열 분석은 DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, WI) 프로그램을 이용하여 정리하였고 수정된 염기서열은 ClustalW2 (EBI, UK) 프로그램을 이용하여 reference strain과 정렬시켰다. Genetic distance는 Kimura's two-parameter model을 사용하여 확인하였다.

## 결 과

### Sequencing 자료의 quality control 분석

NGS 316 chip (Life Technologies, CA, USA)에 염기서열 분석이 가능한 상태로 들어간 Ion Sphere particles (ISPs)이 93% loading (5,901,174 counts) 되었고, 최종 library reads 71% (4,153,741)의 raw data를 얻었다. 최종 library reads에서 VR2332는 879.853 reads (평균 read length 248 bp), VR2332-R은 1,339,484 reads (평균 read length 258 bp)를 얻게 되어 분석이 가능한 수준으로 평가되었다.

### PRRSV의 *de novo* assembly 및 전장 유전자 염기서열 분석

NGS의 raw data는 CLC Genomics workbench (ver 8.0.1)를 이용하여 *de novo* assembly 하였다. 분석결과 VR2332는 1개의 contig, VR2332-R은 8개의 contig로 분석되었고 이 contig들을 조합한 결과 VR2332 consensus length는 15,185 bp로 확인 되었으며 GC content는 52.74%였다. 한편 VR2332-R의 consensus length

는 15,184 bp로 확인되었고 GC content는 52.74%였다 (Fig. 1).

**Reference 염기서열에 대한 coverage analysis**

Reference 염기서열인 VR2332 (Genbank No. EF-536003)와 분석된 염기서열을 매칭한 결과 VR2332 및 VR2332-R 모두 reference와의 커버율은 1.00으로 확인되었다. 한편 VR2332의 최소 coverage depth는 3, 최대 coverage depth는 23,012 그리고 평균 coverage depth는 14,297로 확인되었으며 VR2332-R은 reference sequence와 최소 coverage depth는 3, 최대 coverage depth는 41,348 그리고 평균 coverage depth는 22,712로 확인되었다(Fig. 2).

**PRRSV ORF5 염기서열 비교 분석**

분석이 완료된 PRRSV의 전장유전체 염기서열에서 ORF5에 해당하는 부분의 염기서열을 분리하여 Genbank에 등록된 PRRSV VR2332 (Genbank No. EF536003)의 ORF5와 염기서열을 비교 분석 하였다. 분석된 2종의 PRRSV와 reference 염기서열에서 모두 602 bp의 ORF5 염기서열을 확인하였고 reference 염기서열과 VR2332는 3개의 염기서열의 차이를 보여 99.50% (599/602), reference 염기서열과 VR2332-R은 4개의 염기서열의 차이를 보여 99.34% (598/602)의 상동성을 보였다 (Fig. 3, Table 1).



Fig. 1. Results for whole-genome sequencing of PRRSV by *de novo* assembly method.

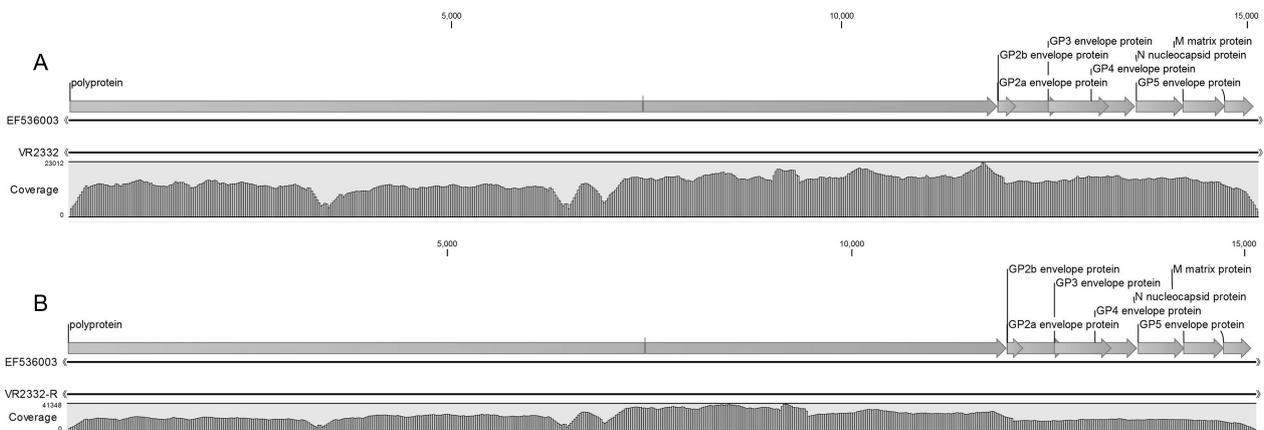


Fig. 2. Results of coverage analysis of PRRSV VR2332 (A) and PRRSV VR2332-R (B) compared by reference strain, PRRSV (GenBank No. EF536003).

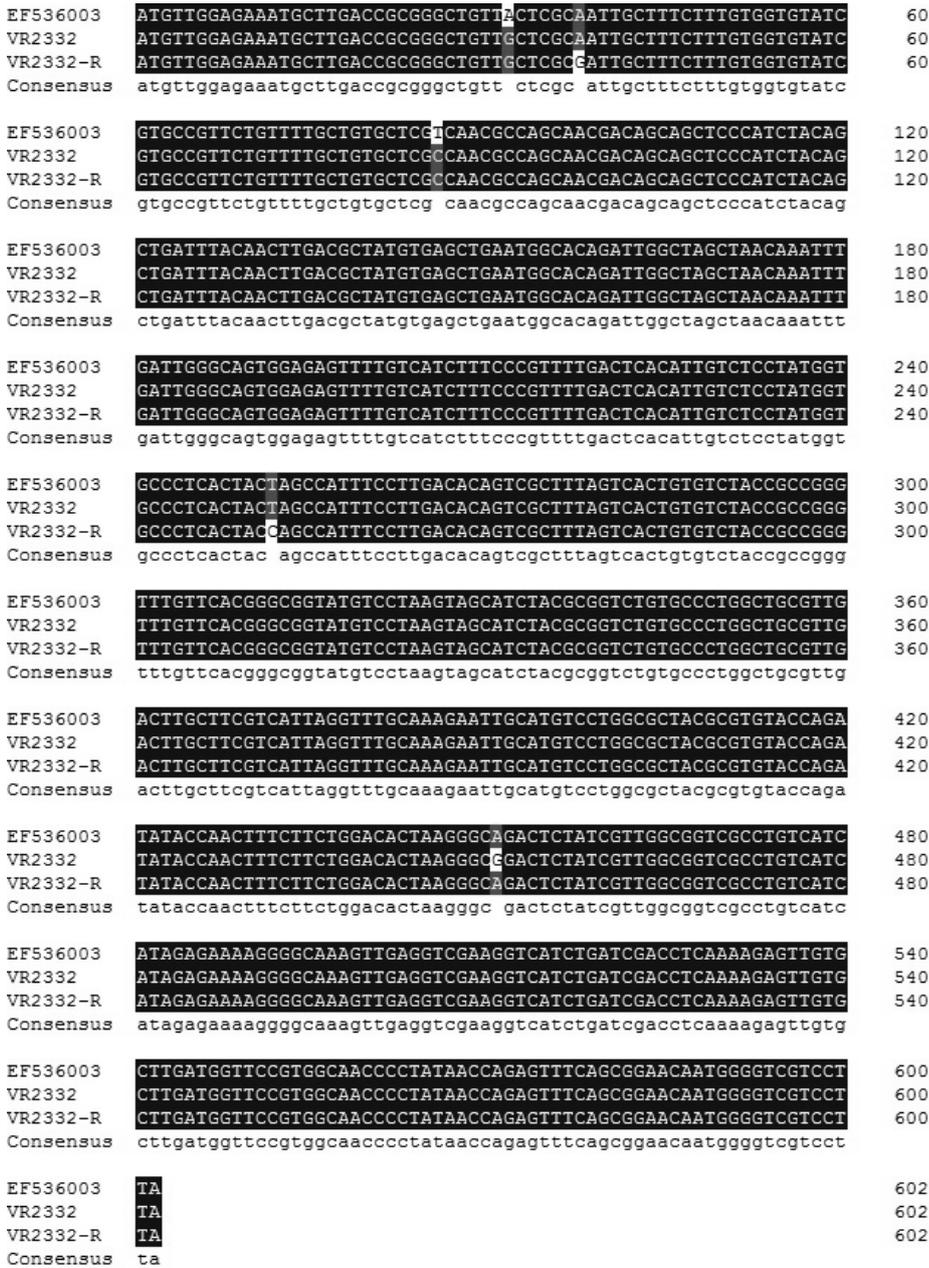


Fig. 3. Results of multi-alignment of PRRSV ORF5 from NGS analysis.

Table 1. Mean percent nucleotide identity and divergence among the whole-genome sequence of PRRSVs

Divergence	Percent identity			
	1	2	3	
1		99.5	99.3	1 PRRSV (EF536003)
2	0.5		99.5	2 PRRSV (VR2332)
3	0.7	0.5		3 PRRSV (VR2332-R)
	1	2	3	

## 고 찰

동물과 사람에게 질병을 유발하는 다양한 병원체의 특성을 규명하는 방법 중 하나로 병원체 특이 염기서열을 분석하는 연구는 주로 PCR을 통해 특정 유전자를 증폭한 후 염기서열을 분석하는 과정으로 진행되는 것이 일반적이다. 그 이유는 대부분 목적하는 유전자가 정해져 있으며 증폭할 유전자의 크기도 1 kb 정도이기 때문에 고전적인 염기서열 분석 방법으로도 충분한 것처럼 보였다(Sanger 등, 1977; Yi 등,

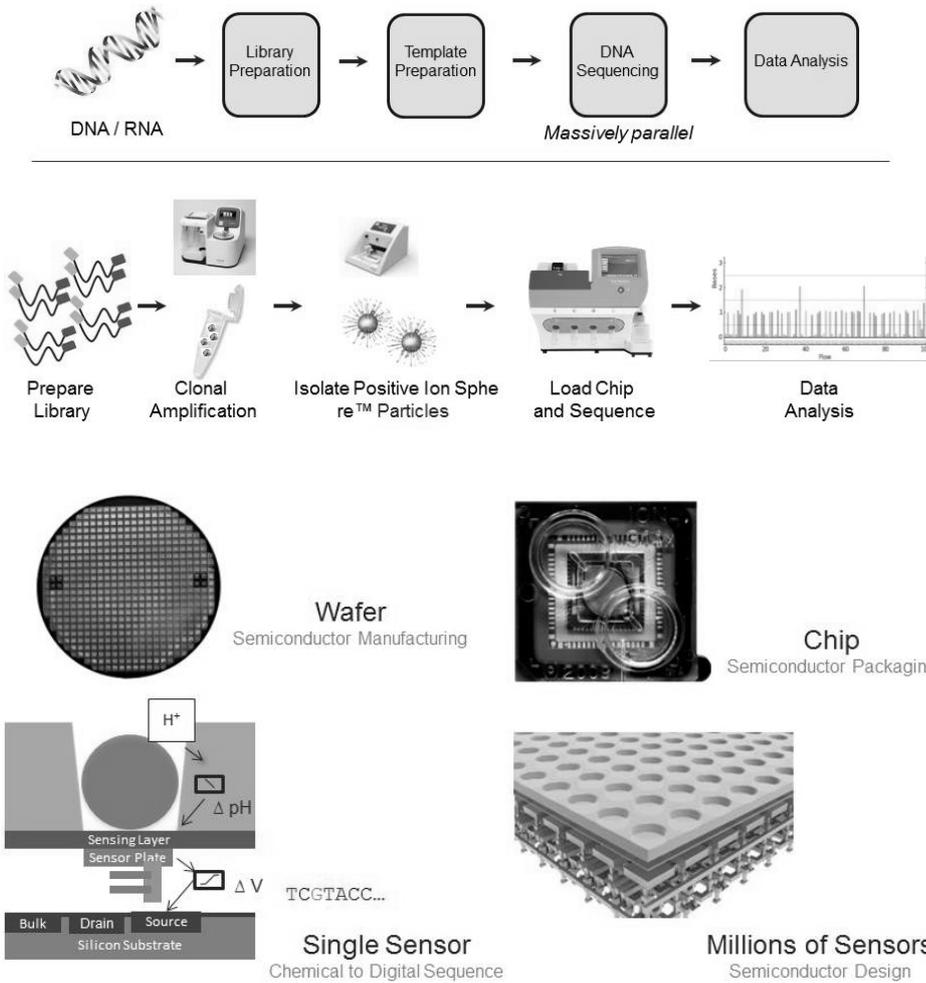


Fig. 4. Workflow of next generation sequencing (NGS) analysis (<http://www.thermofisher.com>).

Fig. 5. Sensor, well and chip architecture of next generation sequencing (NGS) analysis (<http://www.thermofisher.com>).

2013).

그러나 최근 유전자 분석 기술의 발전으로 단시간에 대량의 유전자를 동시에 분석할 수 있게 되면서 수의학 분야에서도 조금씩 활용이 되어 가고 있다. 수의학 분야 관심 병원체 가운데 전체 유전자 크기가 PRRSV가 15,000 bp 정도이고 대장균이 4,600,000 bp 정도임을 고려할 때 기존 방법으로는 시간과 비용면에서 어려움이 많았다.

본 연구에서 활용된 NGS 분석법은 이러한 문제를 쉽게 해결할 수 있었다. NGS를 이용하여 유전적 변이가 일어나 기존의 바이러스와 병원성의 차이가 있어 유전적 변이 여부를 확인하기 위해 바이러스의 전장 염기서열을 분석을 하거나(Chan 등, 2015; Lee 등, 2015) ribavirin 같은 항바이러스제에 노출되어 유전자 변이가 유발된 PRRSV의 특성을 파악하는 연구(Khatun 등, 2015) 등에 이용되면 기존의 염기서열 분석법에 비해 단시간에 많은 유전자 정보를 얻을 수

있을 것이라는 점에서 시도 되었다. 실험결과에서 확인 된 바와 같이 PRRSV 전장 염기서열 길이는 VR2332가 15,185 bp, VR2332-R이 15,184 bp로 Genbank에 등록된 PRRSV VR2332 (Genbank No. EF536003)의 15,182 bp에 비교해 염기서열의 변화가 나타났다. 이는 동일 바이러스를 분양받아 실험실에서 계대배양하거나 실험적 약물처치를 한 경우 염기서열 변화가 일어날 수 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

현재 PRRSV를 연구하기 위해서는 주로 ORF5 유전자의 염기서열을 분석하는데 이를 통해 농장내 어떤 바이러스가 문제되고 있는지 파악할 뿐 아니라 미국형인지 유럽형인지를 정확히 알 수 있게 되며 이를 바탕으로 대책을 수립하게 된다. 또한 본 연구에서 얻은 전체 염기서열 결과에서 ORF5 부분을 쉽게 분리하여 분석을 할 수 있으며(Fig. 3) 다른 유전자 부위의 개별 비교도 가능하다.

NGS 분석을 통해 얻어지는 염기서열 조각들을

short reads data라고 부르는데 이를 이용한 염기서열 분석에는 *de novo* assembly와 re-sequencing 두 가지 접근 방법이 있다. 이 두 가지 방법의 차이는 비교할 대상인 reference sequence가 있는지의 여부이다. re-sequencing 분석은 본 연구에서처럼 reference 염기서열을 기준으로 NGS read 들을 붙여가면서 퍼즐 조각을 맞춰가는 것(mapping)이고 이에 반해 *de novo* assembly는 무슨 병원체인지 아무런 정보가 없을 때 또는 많은 변이가 예상되는 바이러스라고 추정되는 경우 백지 위에서 유전자 서열 단편들을 모아 놓고 서로 연결되는 것을 찾아서 새로운 긴 서열을 완성해 나가는 방법이다. 본 연구에서도 *de novo* sequencing을 하였고 분석 결과 VR2332는 1개의 contig 반면, VR2332-R은 8개의 contig로 분석되었다. 이후 이 두 방법 모두 공통으로 모든 read들의 mapping이 끝나게 되면 Assembly 결과를 얻게 되고 각각의 유전자의 기능에 해당하는 부위에 이름을 붙여주는 annotation과정을 마치면 GenBank에 등록된 것과 같은 형태의 염기서열을 얻거나 Fig. 1과 같은 그림 형태의 결과를 볼 수 있게된다. 이후 이렇게 만들어진 염기서열 결과를 이용하여 다양한 연구에 활용할 수 있다.

NGS 장비 가운데 소형 장비인 Ion Torrent PGM 단점이 200~400 bp의 작은 단편을 이용하는 분석이기 때문에 세균과 같이 전체 유전자가 큰 병원체는 *de novo* assembly로 전장 유전자 염기서열 분석하는 것에 한계가 있다고 하였다(Da Silva Santos와 Rodrigues, 2015). 그러나 본 연구결과에서처럼 15 kb 길이의 유전자를 갖는 PRRSV와 같이 일반적인 세균에 비해 유전자의 길이가 상대적으로 짧은 경우에는 본 방법에서의 결과와 같이 contig가 2개에서 8개 사이로 쉽게 assembly가 가능하기 때문에 이런 문제를 고민하지 않아도 될 것으로 생각된다.

NGS를 이용한 병원체 염기서열 분석에 있어 시간과 비용의 경제성을 분석할 필요가 있다. 분석 시간의 경제성은 설명할 필요가 없지만 비용면에서 살펴보자면 본 실험에 사용한 중간 용량인 316™ v2 chip (Life Technologies, USA)을 기준으로 염기서열 처리량은 1 Gb로 대장균 기준 유전자의 전체 길이를 대략 5,000,000 bp라고 계산할 때 이론적으로 200개의 균주를 동시에 분석할 수 있다. 그러나 이는 전체가 동시에 한 번의 염기서열로 읽혔을 때를 가정한 것이므로 충분한 coverage depth를 고려한다면 10~20개의 세균을 동시에 분석하는 것이 안정적이다. 바이러스의 경우는 본 실험에 사용한 PRRSV를 예로 들면 유

전자 길이를 대략 20,000 bp라고 가정할 때 5,000개의 PRRSV를 동시에 읽을 수 있으나 coverage depth를 고려하면 100~500개의 PRRSV를 한 칩에서 분석을 할 수 있다. 또한 많은 시료를 동시에 분석을 할 수 있게 하는 것은 바이러스 시료 준비과정 동안 각각 다른 바코드를 붙일 수 있기 때문이다.

한편 기존의 염기서열 분석 방법에 비해 NGS가 장점만 있는 것은 아니다. NGS 분석 칩의 고용량의 분석 능력 때문에 경제성을 고려하다보면 다량의 시료가 필요하게 된다. 따라서 병성감정을 위해 분석해야 하는 PRRSV 개별 검사의 목적 보다는 수 개월 또는 수 년 동안 분리해 보관해온 바이러스를 동시에 분석하여 PRRSV의 유전적 또는 역학적 특성을 분석하는 용도의 연구에 적합하다. 또한 염기서열 분석을 위한 DNA나 RNA 추출 단계에 세심한 주의를 기울여야 하는데 일반적인 염기서열 분석을 위한 DNA나 RNA 농도보다 고 순도를 요구하기 때문에 이에 대한 대비를 하지 않으면 몇 번의 재반응을 해야 하는 경우도 생길 수 있다. 무엇보다도 새로운 개념에 익숙해져야 하는 문제도 남아있다. 기존의 염기서열 분석에 사용되었던 FASTA 포맷이 아닌 FASTA포맷에 base의 quality가 함께 포함된 FASTAQ 포맷, 기존의 alignment format과 다른 SAM (sequence alignment map)파일 및 SAM파일을 binary로 변환한 BAM 파일 등 새로운 파일 포맷에 적응이 필요할 뿐 아니라 CLC Genomics Workbench program (CLC Bio, Qiagen, USA) 같은 새로운 프로그램도 활용할 수 있어야 한다.

최근 국내에서는 PRRS 근절을 위해 지역단위 청정화 사업을 추진하고 있다(Kang 등, 2014). 이를 위해서는 전국 및 지역 단위의 다량의 시료에서 분리한 다양한 변이주 PRRSV의 유전자 분석 연구는 매우 중요하며 본 연구에서 검증한 NGS 기법의 활용이 매우 효과적이라 판단된다.

## 결 론

새로운 염기서열 분석 시스템인 NGS를 이용한 PRRSV의 전장 유전체 염기서열 분석 방법을 확립하기 위해 실험실에서 사용 중인 2종의 PRRSV (VR2332 및 VR2332-R)를 분석한 후 GenBank에 등록된 염기서열(Genbank No. EF536003)과 비교한 결과 VR2332 및 VR2332-R 모두 reference와의 커버율은 100%, VR2332의 최소 coverage depth는 3, 최대 coverage

depth는 23,012 그리고 평균 coverage depth는 14,297로 확인되었으며 VR2332-R은 reference sequence와 최소 coverage depth는 3, 최대 coverage depth는 41,348 그리고 평균 coverage depth는 22,712로 확인 되었다. 또한 PRRSV의 변이 연구에 주로 이용되는 ORF5 부분 염기서열에 대한 상동성 분석을 수행한 결과 기존의 염기서열 분석법을 대체할 수 있음을 확인하였다. 따라서 NGS를 이용한 PRRSV 전장 유전체 분석법은 시간과 비용의 경제성과 효율성 측면에서 전국 및 지역 단위의 대량의 시료에서 분리한 다양한 변이주 PRRSV의 유전자 분석 연구에 활용될 경우 매우 효과적이라는 결론을 얻었다.

## 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 생명산업기술개발사업(관리번호: 313005-3)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## REFERENCES

- Albina E. 1997. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. *Vet Microbiol* 55: 309-316.
- Ansari IH, Kwon B, Osorio FA, Pattnaik AK. 2006. Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *J Virol* 80: 3994-4004.
- Baron T, Albina E, Leforban Y, Madec F, Guilmoto H, Plana Duran J, Vamier P. 1992. Report on the first outbreaks of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in France. Diagnosis and viral isolation. *Ann Rech Vet* 23: 161-166.
- Cavanagh D. 1997. Nidovirales: a new order comprising *Coronaviridae* and *Arteriviridae*. *Arch Virol* 142: 629-633.
- Chan MC, Hung TN, Kwok K, Chan PK. 2015. Complete Genome Sequence of a Novel Recombinant GII.Pe\_GII.17 Norovirus Strain from Hong Kong in 2015. *Genome Announc* 3: e01338-15.
- Chinault C, Song XZ, Liu Y, Yuan Y, Nazareth L, Qin X, Muzny DM, Margulies M, Weinstock GM, Gibbs RA, Rothberg JM. 2008. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature* 452: 872-876.
- Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, Harris L, Christopher Hennings J, Shaw DP, Goyal SM, McCullough S, Morrison RB, Joo HS, Gorcyca D, Chladek D. 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest* 4: 117-126.
- Da Silva Santos AC, Rodrigues J. 2015. Draft Genome Sequence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strain D92/09. *Genome Announc* 3: e00805-15.
- Kang HW, Oh Y, Song JY, Choi EJ. 2014. Survey of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) on pig farms in Andong and Hapcheon region. *Korean J Vet Serv* 37: 11-18.
- Key KF, Haqshenas G, Guenette DK, Swenson SL, Toth TE, Meng XJ. 2001. Genetic variation and phylogenetic analyses of the ORF5 gene of acute porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet Microbiol* 83: 249-263.
- Khatun A, Shabir N, Yoon KJ, Kim WI. 2015. Effects of ribavirin on the replication and genetic stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *BMC Vet Res* 11: 21.
- Kim JY, Lee SY, Sur JH, Lyoo YS. 2006. Serological and genetic characterization of the European strain of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in Korea. *Korean J Vet Res* 46: 363-370.
- Kweon CH, Kwon BJ, Lee HJ, Cho JJ, Hwang EK, Shin JH, Yoon YD, Kang YB, An SH, Kim YH, Huh W, Jun MH, Wensvoort G. 1994. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Korea. *Korean J Vet Res* 34: 77-83.
- Lee S, Kim Y, Lee C. 2015. Isolation and characterization of a Korean porcine epidemic diarrhea virus strain KNU-141112. *Virus Res* 208: 215-224.
- Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, Mabry JW, Bush EJ, Seitzinger AH, Green AL, Zimmerman JJ. 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 227: 385-392.
- Pesente P, Rebonato V, Sandri G, Giovanardi D, Ruffoni LS, Torriani S. 2006. Phylogenetic analysis of ORF5 and ORF7 sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from PRRS-positive Italian farms: showcase for PRRSV epidemiology and its consequences on farm management. *Vet Microbiol* 114: 214-224.
- Rossow KD, Collins JE, Goyal SM, Nelson EA, Christopher-Hennings J, Benfield DA. 1995. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet Pathol* 32: 361-373.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
- Seo BJ, Kim H, Cho HS, Park BY, Kim WI. 2016. Evaluation of two commercial PRRSV antibody ELISA kits with samples of known status and singleton reactors. *J Vet*

- Med Sci 78: 133-138.
- Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, Shen Y, Chen L, McGuire A, He W, Chen YJ, Makhijani V, Roth GT, Gomes X, Tartaro K, Niazi F, Turcotte CL, Irzyk GP, Lupski JR, Chinault C, Song XZ, Liu Y, Yuan Y, Nazareth L, Qin X, Muzny DM, Margulies M, Weinstock GM, Gibbs RA, Rothberg JM. 2008, The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature* 452: 872-876.
- Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, Swenson SL, Hoffman LJ, McGinley MJ, Hill HT, Platt KB. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion. *Vet Microbiol* 57: 69-81.
- Yi SW, You MJ, Cho HS, Lee CS, Kwon JK, Shin GW. 2013. Molecular characterization of *Aeromonas* species isolated from farmed eels (*Anguilla japonica*). *Vet Microbiol* 164: 195-200.