GOVP1200719571

국립수의과학검역원 출연공동연구과제
완결 연구보고서

DNA Chip을 이용한 돼지콜레라 바이러스 및 PMWS 관련 바이러스 유전자 진단시스템 개발

(Development of Genotyping diagnostic system for CSFV & PMWS related virus using DNA Microarrays)

국립수의과학검역원
(주)바이오메트릭스테크놀로지
(주)제노바이오텍

농 림 부

제 출 문

국립수의과학검역원장 귀하

본 보고서를 “DNA Chip을 이용한 돼지콜레라 바이러스 및 PMWS 관련 바이러스 유전자 진단시스템 개발에 관한 연구” 과제의 완결보고서로 제출합니다

2007년 2월 28일

공동연구책임자: (주)바이오메트릭스테크놀로지 김 태 선

협동연구책임자: 국립수의과학검역원 송 재 영

협동연구책임자: (주)제노바이오텍 주 후 돈

요 약 문

Ⅰ. 제 목

DNA Chip을 이용한 돼지콜레라 바이러스 및 PMWS 관련 바이러스 유전자 진단시스템 개발

Ⅱ. 연구목적 및 중요성

본 연구의 목적은 유전자칩 기술을 이용한 돼지콜레라 및 PMWS 관련 바이러스의 유전정보의 Genotyping을 포함한 동시 정밀 진단 기술 확보하고 Single Nucleotide Polymorphism(SNP) 기술에 의한 돼지콜레라, PMWS 관련 바이러스 감별 진단기술 개발하는데 있다. 또한 유전자 칩 기술을 이용하여 돼지의 주요 바이러스에 대한 검색 시스템 구축하고 국내 PMWS 관련 원인체 조사 및 유전자 분석을 실시하는 것을 부가적인 목적으로 하였다.

최근 눈부신 기술적 발전을 이룬 바이오칩 기술은 단백질칩, 유전자칩의 대량생산이 가능한 기술을 확보하였고 바이오칩을 질병의 진단에 이용하려는 연구개발 노력이 지속적으로 이루어지고 있다. 현재는 유전정보(Genetic Informatics)의 통계적 분석기술로 cDNA Chip이 실험실 수준에서 많이 사용되고 있으며 특정 인간게놈의 분석과 비교연구에 주로 사용되고 있다. 최근에는 사람의 유두종바이러스 (HPV)의 유전형검사에 적용하였고 식품의약품안전청의 품목허가를 취득함으로서 질병진단과 검사에 사용될 수 있음이 증명되었다. 그러나 유전자칩은 유전자칩의 생산, 검사재현성, 검출한계에 아직까지 기술적 한계들이 보고되어 왔다. 그러나 현재의 단일한 마커, 항체, 항원을 주로 검사하는 현재의 기술과 달리 유전자칩은 한번에 다량의 유전정보를 확보할 수 있어 유전형 검사, 원인체의 변이검사 등 진단기술로서 매우 강력한 장점을 가지고 있다. 따라서 본 연구는 동물의 주요 바이러스 질병의 원인체인 CSFV, BVDV 및 PMWS 관련 원인체인 PCV2, PPV, PRRSV의 유전자 정밀검사에 사용할 수 있는 유전자칩 기술을 개발하여 동물분야의 유전자 칩 검사기술의 기초와 틀을 제공하는데 주안점을 두고 수행되었다.

Ⅲ. 연구내용 및 결과요약

유전자칩 고정화 기술로 Guanidine 분자인식기술을 사용하고 대량공정이 가능한 고정화 기술을 확보하였다. 이 기술은 유전자를 일정하게 유리기판위에 배열할 수 있으며 공간확보가 용이하여 SNP검사가 가능하고 짧은 반응시간에서도 높은 검사 재현성과 검사능력을 가지고 있음을 확인하였다.

단일염기서열변이(SNP) 검사가 가능한 유전자 칩 고정화기술과 Hybridization 시약개발 및 반응 조건을 완성하였으며, 유전자 칩의 사용편의성을 위한 slide well의 설계 및 높은 검사 재현성 확보를 위한 검사도구를 개발하여 유전자 칩 진단시스템을 완성 하였다.

CSFV 및 BVDV 감별검사 및 Genotype 을 검사할 수 있는 probe 12종을 최종 선발하고, DNA Chip 용 유전자 증폭 시약을 개발하였다. 각각의 시제품을 제작하여 야외 표준시료를 사용해 그 유효성을 검사하였으며, 염기서열분석 결과와 정확하게 일치하는 유효한 결과를 얻었다.

PMWS 관련 3종 바이러스 검출 및 유전형 구분용 총 14종의 probe를 최종 선발하고, DNA Chip 용 유전자 증폭 시약을 개발하였다. 각각의 시제품을 제작하고 PMWS 의심 야외 표준패널을 사용하여 그 유효성을 검사하여 평가를 완료하였다.

이로서 유전자 검사기술 중 유전자칩을 이용한 질병진단 기술의 기초를 확보하였으며 돼지 바이러스 질병 중 돼지콜레라 바이러스와 PMWS 관련 원인체인 PRRSV, PCV2. PPV에 대한 유전자 정밀기술과 진단기술을 확보하였으며 산업체와의 공동연구를 통하여 산업화 기술까지 확보하게 되었다. 이 기술을 통하여 1회의 검사로 단일염기서열이 다른 바이러스주의 감별검사기술(SNP)과 국내 유행 바이러스의 유전자 모니터링 검사를 위하여 유전자칩을 이용한 유전자 Typing 기술을 동시에 확보하게 되었다.

Ⅳ. 우리원 단독수행시 미해결 분야의 해결된 기술 요약

유전자칩을 이용한 CSFV, BVDV 및 PMWS 관련 3종 바이러스의 유전형 및 유전자 동시 정밀 진단 기술의 확보하였으며 이를 공동특허출원하여 기술권리를 획득하였다.

유전자칩의 설계기술, 검사기술을 아울러 확보하였으며 이를 통하여 정밀실험실을 보유하고 있지 않은 현장실험실에서도 유전자 염기서열분석으로 가능하였던 스크린 수준의 유전형검사, 야외주/백신주 감별검사가 가능한 기술의 제공이 가능하게 되었다.

Single Nucleotide Polymorphism(SNP) 기술에 의한 돼지콜레라, PMWS 관련 바이러스 감별 진단기술이 개발되었고 유전자칩을 이용한 바이러스 유전자 검색 및 모니터링 시스템의 구축이 가능하게 되었다.

Ⅴ. 연구결과 활용에 대한 건의 및 경제성 분석

RT-PCR, PCR에 의한 유전자 검사는 복합감염을 검사하는데 한계가 있으며 육안검사를 하므로 검사 재현성이 부족하며, 또한 유행되는 바이러스를 분석하기 위하여 많은 양의 유전자 염기서열 분석이 필요하다. 이에 CSFV 및 PMWS 관련 바이러스의 1차 유전자 검사를 위한 표준 검사법으로 활용하여 국내 유행 바이러스의 정기적이고 주기적인 유전자 모니터링 시스템 운영을 건의하고자 한다.

돼지콜레라의 유전형 감별검사법으로는 RT-PCR, RFLP, 염기서열분석이 사용되고 있으나 이는 인력 및 시간, 비용이 많이 소요되므로 유전자칩을 사용하는 경우 백신주/야외주의 감별검사, 유전형검사가 동시에 이루어지므로 비용과 시간의 혁신적인 절감이 가능하며 보다 많은 수의 검사가 가능하여 돼지콜레라 발생 시 분자생물학적 역학조사, 분석이 신속하게 이루어 질 수 있을 것으로 기대된다.

또한 SNP 수준의 검사가 가능한 유전자 칩 개발로 주요 동물 병원체 정밀검사용 유전자 칩 개발에 활용하여 첨단 정밀검사 시스템의 신속한 개발과 보급이 가능하게 되었다.

SUMMARY

Generally, many laboratories try to detection of viral DNA or RNA with RT-PCR, PCR and realtime PCR, and than isolate virus and DNA sequencing to identify genotypes, serotypes or genetic identities but it was much costly and time-consumed. Biochip technolgy is useful to identify the biotypes in various samples directly. Especially. DNA chip technology applicable to molecular diagnostics for rapid genotyping and homogeneity study of genome in several sides. Recently, DNA Chip technology is used to diagnosis and identify for genotypes of human papilloma virus (HPV) in Korea. The KFDA admitted the DNA Chip diagnostics as *in vitro* diagnostics in Korea.

The genus *Pestivirus* of the family *Flaviviridae* contains four species that infect domestic animals, namely, classical swine fever virus (CSFV, hog cholera virus), bovine viral diarrhea virus type 1 (BVDV1) and type 2 (BVDV2), and border disease virus (BDV) of sheep (Wengler, 1991). Classical swine fever (CSF) is an OIE listed notifiable disease which can severely cripple a country's swine industry. The extent of losses in control of CSFV outbreaks and their affect on trade can be enormous. For instance, only the direct costs of the 1997-1998 epizootic in The Netherlands, excluding loss of exports, amounted to $2 billion (U.S.) (Terpstra and de Smit, 2000).

The 3 major CSFV genotype is reported in the world. Genotype 1 is classical type and recently genotype 2, 3 are reported to major type of outbreak. The definition of genotype is important in molecular epidemiological studies for CSF eradication program.

We developed the CSFV/BVDV genotyping system using DNA Chip. The DNA chip contains immobilized specific probes to identify 3 genotypes and 1 kinds of CSFV vaccine strain of Korea. The 12 types of probes in 5'NCR of CSFV and BVDV were immobilized on glass chip with Guanidine base molecular recognition technology using microarrayer. This DNA chip is world first micro array based molecular diagnostics in veterinary side.

In field sample test, the CSFV/BVDV DNA Chip system showed highly sensitivity and specificity (100%) and complete matching genotyping results with DNA sequencing data in 117 positive samples. In direct genotyping on DNA chip, 57 samples are genotype 1 and 53, 7 samples are genotype 2 and 3 respectively. In genotype 1 samples, 37 samples are determined as LOM virus (Live vaccine virus strain) with SNP detection. This DNA chip system could cover wide range of genomics and specific to SNP

detection for CSFV and BVDV in samples.

The postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), which was first identified in Canada, and more recently in the United states, in many European countries and in Asia, can cause great economic losses. This disease which is more frequently being described, occurs in swine herds that usually were in good health. It has a relatively high fatality risk mainly in nursery and early growing pigs. Recently, there was many complicated infected cases were reported in Korea and this disease consider as main agent of economic ross in the farms. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine parvovirus(PPV) infections were investigated as possible causes of the PMWS.

We develped PMWS typing DNA Chip system able to genetic typing of PRRSV, PCV2, PPV in various samples. The 14 types of probes are immobilized on glass chip of ORF6 of PRRSV, ORF2 of PCV2 and VP2 of PPV.

In testing 131 filed samples, 104 samples are positive to PRRSV, 119 samples are positive to PCV2 and 3 samples are positive to PPV. The most of PRRSV samples (n=104) were determined as US type but 2 samples were EU type. The 2 samples of EU types are considered as complex infected with US type of virus. This showed that this system could detect and identify the US, EU strain of PRRSV. The PMWS typing DNA Chip system showed high sensitivity and specificity with 93.9-100%. It can be applied to virus identification and typing viral genomes directly in field samples.

We have conclusion that DNA chip system was successfully appliable to CSFV/BVDV genotying and PMWS related virus typing. It would be useful to overcome the several risks and limits of molecular diagnosis of veterinary side because it gives more genetic information than PCR or RT-PCR.

목 차

제 출 문 1
요 약 문 2
SUMMARY 5
Ⅰ. 서 언 8
1. 연구배경 8
2. 연구최종목표 10
Ⅱ. 재료 및 방법 12
1. 균독주 12
2. 유전자 분석 및 염기서열 분석 12
3. DNA 및 RNA의 분리 12
4. Multiplex PCR 및 RT-PCR 시약의 구성 12
5. 유전자칩의 설계 및 제작 13
6. 검사시료의 구축 14
7. 유전자칩을 사용한 유전자검사 방법 14
8. 유전자칩의 유효성 평가 14
Ⅲ. 결과 및 고찰 15
1. CSFV 및 BVDV 유전자칩 개발 15
1) CSFV/BVDV 유전자 probe, primer 설계 및 유전자 증폭시약 개발 15
2) 분자인식기술을 이용한 CSFV, BVDV DNA Chip probe 선발 및 최적화 22
3) CSFV/BVDV DNA chip 의 실험실 유효성 평가 28
4) CSFV 및 BVDV DNA chip 시제품 유효성 평가 37
5) CSFV/BVDV Genotyping 유전자칩의 개발 및 완성 (2년차) 46
2. PMWS 관련 바이러스 유전자 검출용 유전자칩 개발 49
1) PMWS 관련 바이러스 유전자 probe, primer설계 및 유전자 증폭시약 개발 49
2) PMWS (PRRSV/PCV2/PPV) Typing 유전자 칩 설계 56
3) PMWS Typing DNA Chip의 유효성 평가 62
Ⅳ. 종합결과 81
1. 유전자 칩 설계 최적화 81
2. CSFV/BVDV Genotyping DNA Chip 개발 81
3. PMWS 관련 바이러스 유전자 칩의 개발 82
Ⅴ. 적 요 84
Ⅵ. 인용문헌 85

DNA Chip을 이용한 돼지콜레라 바이러스 및 PMWS 관련 바이러스 유전자 진단시스템 개발

Ⅰ. 서 언

1. 연구배경

돼지 바이러스 질병은 돼지콜레라, 돼지오제스키병, PMWS 등 전신성, 설사병, 호흡기 및 번식장애 등을 유발하여 생산성을 저해하고 양돈 산업에 지속적인 경제적 피해를 주고 있다.

돼지콜레라 바이러스(Classical swine fever virus, CSFV)는 세계적으로 3개의 유전형이 보고되어 있으며 최근에 국내에서는 Genotype 2에 속하는 바이러스가 빈번하게 발생하고 있는 것으로 보고되어 있다. 돼지콜레라 바이러스의 유전형 검사는 유행하는 바이러스의 유전적 동질성을 확인함으로서 Molecular epidemiology를 통한 감염원과 전파경로 추적을 위하여 필수적으로 필요한 검사이다.

돼지콜레라 바이러스의 검사는 평상시의 예찰검사에서는 혈액시료에 대한 항원검사, RT-PCR에 의한 유전자검사를 통하여 바이러스의 존재여부를 모니터링 하고 있으며 돼지콜레라 바이러스가 확인되면 바이러스 유전자를 사용하여 RFLP로 검사하고 야외주와 백신주를 감별검사한다. 현재 우리나라에 사용되고 있는 생독백신은 CSFV LOM주로 표준바이러스인 ALD주의 5'NCR 유전자에서 1개의 염기서열의 차이가 있어 검사가 매우 까다롭다. 또한 감염개체가 야외주로 확인되는 경우 유전자 염기서열의 분석을 통하여 유전형을 구분하고 염기서열의 동등성을 확인하여 바이러스의 원천파악, 추적 등을 위한 분자역학적 정보를 제공하게 된다.

그러나 유전자증폭검사(RT-PCR)의 경우 육안검사를 하게 되므로 진단적으로 객관적인 검사 재현성의 확보와 증폭된 유전자가 돼지콜레라 바이러스의 특이적인 유전자 인지 여부는 추가적인 검사를 진행하여야만 확인이 가능하다는 문제점이 있다. 염기서열분석은 일반 실험실에서는 실시할 수 없으며 염기서열검사와 분석에 3-5일 정도 소요되어 많이 시간과 비용이 수반된다는 단점이 있다.

이유후전신소모성증후군(Post-weanning Multiple Wasting Syndrome, PMWS)는 주로 자돈에서 나타나며 지금까지 알려진 바이러스성 원인체는 써코바이러스 2형(Porcine Circo Vitus type 2)로 PRRSV, PPV 등이 복합감염되어 증상을 나타내는 것으로 알려져 있으며 감염된 돼지의 주요 임상증상은 전신 소모성위축, 호흡곤란, 피부 창백 (가끔 황달)이 있는 질병이다. 최근에 국내 양돈장에서 많은 경제적 피해를 주고있는 것으로 보고되고 있

다. PMWS는 일반적으로 7-15주령의 육성돼지에서 다발하며 이환율과 폐사율은 농장들과 배치들 사이에서 다양하게 나타나는데 일반적으로 이환율이 4-10%(범위는 1-60%까지)이고 폐사율은 70-80%(범위는 50-100%)로 최근 양돈장에 발생하여 경제적인 피해가 심한 것으로 알려져 있다.

돼지콜레라 및 PMWS의 원인체 바이러스의 검사는 항원검사, 항체검사 및 RT-PCR을 수행하여 바이러스 감염을 확인하고 유전자 염기서열 분석을 통하여 유전형을 확인하고 있는데 많은 시간(3일 이상) 과 고비용(4만원/case)을 수반한다. 특히 기존의 검사방식은 정밀검사가 가능한 실험실에서만 수행할 수 있어 즉시적이고 효율적인 방역활동을 지원하는데 한계가 있다. 돼지콜레라 바이러스와 관련성이 높아 감별검사가 필요한 바이러스에 대해서는 별도의 PCR검사나 항원검사가 필요하지만 적은 인력으로 많은 질병을 검사하는데 한계가 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위해서는 동일 시료를 사용하여 돼지콜레라 바이러스의 유전자 검출과 기초단계 유전형을 시료 채취 후 1일 이내 속성으로 검사가능하며 다른 관련 바이러스의 유전자까지를 동일 시료로 속성으로 분별이 가능한 진단 시스템 개발의 개발이 요구된다고 할 수 있다.

최근 연구개발이 활발하게 진행되고 있는 유전자 칩 기술은 많은 유전자를 동시에 스크리닝 할 수 있도록 하는 기술로 각광받고 있으며 상용화 단계에 있다. 유전자 칩 기술은 약물 관련 유전자탐색, 기타 유용 유전자의 대량 스크린에 활용되어 생체의 유전자 정보 대량 검출용으로 사용되어 왔으며 최근에는 암 관련 바이러스 조기검출 및 사스바이러스 검색 등 질병 조기진단 기술로 개발되고 있는 것으로 보고되어 있다. 진단용 유전자 칩의 개발과 더불어 사용자의 편의성 및 진단의 재현성을 확보하는데 필수적인 조작 단순화기술 개발에 핵심인 자발적 고정화를 이용한 고밀도/고집적 올리고 유전자 칩 제조기술을 개발하여 진단의 효율성 및 기존의 진단보다 높은 정확도를 확보하여 유전자 칩을 이용한 실제 진단 적용기술개발이 필요한 시점이라고 할 수 있다. 진단용 유전자 칩 기술은 유전자 고정화기술, 증폭기술, 판독 및 해석기술이 모두 요구되는 복합기술로 개발을 위해서는 여러 기관, 산업체의 협력연구가 요구되며 장기적으로 유전자 칩 기반의 진단기술은 동물 질병 원인 체의 다양한 유전자를 동시에 스크리닝 하여 정보를 해석함으로서 종합적으로 속성 진단할 수 있는 기술로 적용이 가능할 것으로 예측된다.

특히, 해외에서 개발되었다는 진단용 유전자 칩들이 진단시장에 진입하지 못하는 핵심요인은 주로 유전자칩의 재현성 부족이며 본 연구에 참여한 기업 및 기관이 보유한 칩 제조 기반기술을 이용하면 획기적으로 개선된 재현성을 확보한 진단용 올리고 유전자 칩의 개발을 가능케 하여 국내의 BT 기술을 기반으로 개발된 진단 제품의 해외 수출 및 시장을 장악하는 제품이 될 것으로 기대된다.

2. 연구최종목표

○ 돼지콜레라 및 PMWS 관련 바이러스 동시 유전자 정밀진단 기술 개발

○ Single Nucleotide Polymorphism (*SNP*) 기술에 의한 돼지콜레라 및 PMWS 관련 바이러스 감별 진단기술 개발

○ 유전자 칩을 이용한 바이러스 유전자 검색 시스템 구축

○ 국내 PMWS 관련 원인체 조사 및 유전자 분석

3. 연차별 연구개발 목표 및 내용

가. DNA Chip을 이용한 돼지콜레라 및 PMWS 관련 바이러스 유전자 진단시스템 개발 (바이오메트릭스테크놀로지)

구분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위	연구기간	진도율		성과활용 실적 및 계획
				계획	실적	
1차년도 (2004년)	돼지콜레라 및 BVDV 바이러스 감별 검출용 DNA Chip 개발	◦ 유전자칩 설계 ◦ 유전자칩 유효성 검사 및 평가 ◦ 돼지콜레라 진단용 유전자칩 개발	04. 11 - 05. 10 (1년)	30 (100)	40 (100)	특허출원 1건
2차년도 (2005년)	돼지콜레라 바이러스 유전형 감별 및 PMWS 관련 바이러스 (PRRSV,PCV2,PPV) 검출 유전자칩 설계 및 최적화	◦ 돼지콜레라 및 PMWS관련 바이러스 고정화 유전자 설계 ◦ 유전자 칩 설계 및 최적화 ◦ Genotyping용 SNP 유전자칩 시제품 개발	05. 11 - 06. 12 (1년)	70 (100)	60 (100)	특허출원 1건 논문 예정

나. 돼지콜레라 및 PMWS 관련 원인체 조사 및 유전자 분석

(국립수의과학검역원)

구분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위	연구기간	진도율		성과활용
				계획	실적	실적 및 계획
1차년도 (2004)	국내 돼지콜레라 바이러스 유전자 분석	◦ 국내 돼지콜레라 바이러스 genomic 유전자 전체 염기서열 분석 ◦ 국내 지역별 PMWS 원인체 분리 및 분류	04. 11 - 05. 10 (1년)	30 (100)	30 (100)	별도보고
2차년도 (2005)	국내 PMWS 관련 병원체 분리 및 유전자 분석 DNA Chip 야외실증시험	◦ 지역별 PMWS 원인체 특이 유전자 염기서열 결정 및 분석 ◦ PMWS 관련 원인체 검출용 DNA chip 개발용 유전자 재료 제공 ◦ DNA chip 야외실증 시험 및 실용성 평가	05. 11 - 06. 12 (1년)	70 (100)	70 (100)	별도보고

다. 돼지콜레라 및 PMWS 관련 바이러스 유전자 진단시약 개발 및 유효성 검사

(제노바이오텍)

구분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위	연구기간	진도율		성과활용
				계획	실적	실적 및 계획
1차년도 (2004)	돼지콜레라 및 BVDV 바이러스 유전자 증폭 시약 개발	◦ 유전자Probe 및 Primer 설계 ◦ 유전자 증폭시약 설계 및 개발 ◦ 유전자칩 실험실 검사 (검출한계, 특이도, 교차반응 검사)	04. 11 - 05. 10 (1년)	30 (100)	30 (100)	제품화
2차년도 (2005)	PMWS 관련 바이러스 Multiplex PCR 시약개발 및 유전자 칩 적용	◦ 유전자 Probe 및 Primer 설계 ◦ PRRSV, PCV2, PPV Multiplex RT-PCR 시약 개발 ◦ 유전자칩 실험실 검사 (검출한계, 특이도, 교차반응 검사) ◦ 유전자 증폭시약의 유전자 칩에 대한 유효성 평가	05. 11 - 06. 12 (1년)	70 (100)	70 (100)	제품화

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 균독주

돼지콜레라 바이러스는 CSFV LOM주 및 국내분리주의 각 유전형의 바이러스를 표준주로 사용하였으며 BVDV는 NADL주, PRRSV는 미국주(VR2332), 유럽주(LV)를 표준주로 사용하였다. PCV2와 PPV는 국내 분리주를 사용하였다.

2. 유전자 분석 및 염기서열 분석

국립수의과학검역원에서 2004년부터 수집된 각 바이러스의 유전자 정보를 분석하여 국내분포 바이러스의 유전정보를 기준으로 유전자 증폭용 프라이머, 유전자칩용 Probe를 설계하였다. 또한 전세계에 보고되어 있는 유전자 염기서열을 NCBI Genebank를 탐색하여 확보하고 유전자칩에 포함될 Probe의 염기서열을 확인하였다. 유전자 염기서열은 다음의 유전자 부위를 중심으로 분석하였다.

CSFV/BVDV: 5'NCR

PRRSV: ORF6, ORF7

PCV2: ORF2

PPV: NS1

3. DNA 및 RNA의 분리

각 바이러스의 배양액 혹은 조직 유제액으로부터 Qiagen RNeasy Mini Kit을 이용하여 제조사의 사용설명서에 따라 유전자를 분리 하였다. 분리된 유전자는 -20℃에 보관하면서 검사에 사용하였다.

4. Multiplex PCR 및 RT-PCR 시약의 구성

원인체 바이러스의 유전자 증폭을 위하여 수종의 Primer를 합성(Cosmo, Korea)하고 PCR 또는 RT-PCR로 검사하여 Primer를 선발하였다. 유전자칩에 적용하기 위하여 Primer의 5-end 말단에 Cy3를 표식하여 유전자 증폭에 사용하였다. Multiplex (MP) PCR 또는 RT-PCR의 적정화를 위하여 Single PCR에서 유효성이 확인된 Primer를 조합하여 MP PCR, MP RT-PCR의 조건을 최적화 하였다. 최적화를 위하여 PCR 및 RT-PCR의 Primer 농도, KCl, $MgCl_2$ 등의 농도별 검사를 통하여 최적농도를 산출하여 최종적인 증폭시약의 조성을 산출하였다.

최적화된 유전자증폭시약은 바이러스 농도별 검사를 실시하여 최저검출한계 (Limit of detection, LOD)를 측정하여 증폭효율을 확인하였다.

5. 유전자칩의 설계 및 제작

유전자 염기서열에서 추정된 염기서열을 사용하여 Guanine Immobilizer와 Spacing sequence를 포함한 Probe를 합성하였다. Guanidine Immobilizer는 표면변성된 유리기판의 Guanine 인식분자와 결합시켜 Probe를 고정화하는 부위이며 Spacing영역은 Target Oligonucleotide의 반응을 돕기 위하여 포함하였다.

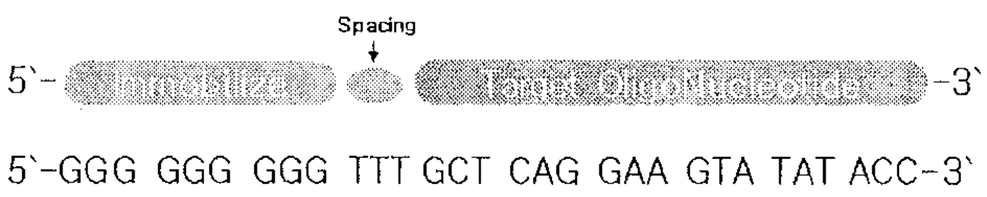


그림 1. 유전자칩 고정화용 DNA Probe의 설계

합성된 Probe는 Guanine 인식용 칩기판에 Microarrayrer (Genetix Qarray, UK)를 사용하여 고정화한 후 검사하였다. Probe중 해당 바이러스의 유전자가 가장 높은 Fluorescent Intensity를 나타내는 Probe를 선발하였다.

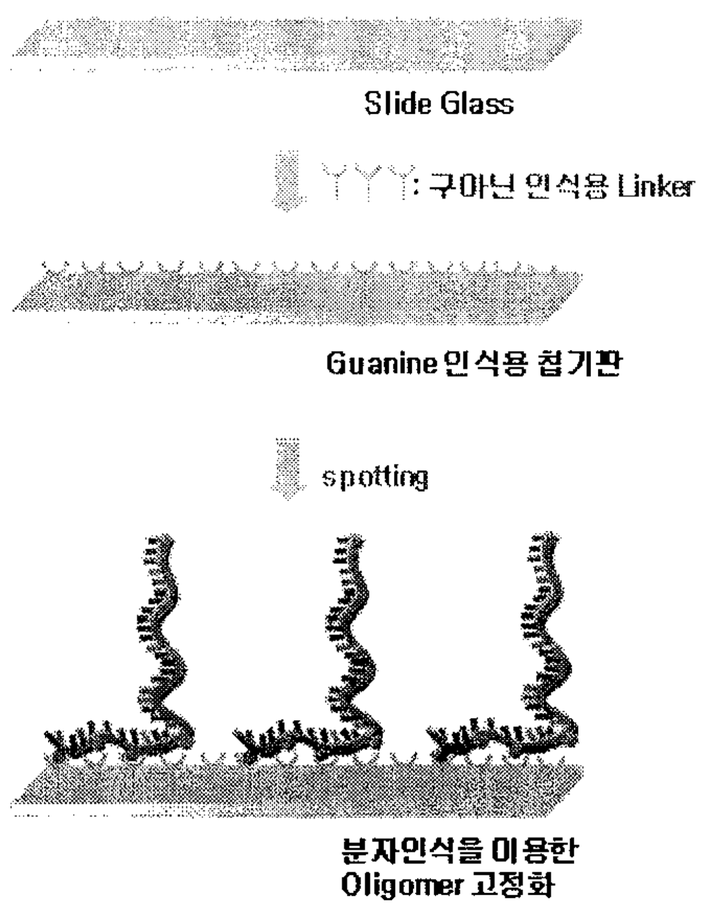


그림 2. 유전자 칩의 Probe 고정화

Probe의 고정화를 위하여 여러 농도의 Probe를 사용하여 고정화하고 Probe별 적정농도를 결정하였다. 또한 비특이 반응의 방지를 위하여 여러 가지 Blocking buffer를 검사하여 가장 낮은 Noise(배경형광)를 나타내는 물질을 선발하는 과정을 거쳤다. 이를 통하여 Probe의 고정화 공정을 최적화 하였다.

6. 검사시료의 구축

국립수의과학검역원에서 2004년에서 2006년에 검사한 야외시료 중 바이러스가 분리된 시료를 표준시료로 선정하였다. 또한 PCR 또는 RT-PCR에서 양성반응을 보인 시료는 야외실증시험 시료로 사용하였다.

7. 유전자칩을 사용한 유전자 검사방법

유전자 증폭시약을 사용하여 Thermal cycler (Biometra, Germany)를 이용하여 유전자를 증폭하였다. 증폭산물은 1.5% agarose gel에 전기영동한 뒤 EtBr로 염색하고 Transilluminator에서 증폭 여부를 확인하였다.

PCR product는 정제하지 않고 DNA Chip위에 hybridization buffer와 혼합하여 hybridization chamber에 넣고 48℃ 항온기에서 1시간 동안 반응 하였다. 반응이 끝난 DNA Chip은 42~46℃에서 Wash I 용액으로 1분간 2회 세척하고, 다시 실온의 Wash II 용액으로 1회 세척한 뒤 slide glass dryer 로 chip의 물기를 제거하였다. 교잡반응이 끝난 DNA Chip 은 Laser scanner (Perkin-Elmer Express HT, USA)를 이용하여 LP=90, PG=80에서 판독하였으며, Quantitation program (PerkinElmer)을 이용하여 spot의 Fluorescent intensity (FI)를 측정하였다.

8. 유전자칩의 유효성 평가

유전자칩의 실험실 유효성평가를 위하여 표준주 바이러스를 사용하여 바이러스 농도별 시료를 구축하고 제조된 MP PCR 또는 MP RT-PCR 시약을 사용하여 유전자를 증폭하고 제작된 유전자칩을 사용하여 검사한 후 최저검출한계를 측정하였다.

유전자칩의 반응재현성은 표준주 바이러스의 농도별 시료를 사용하여 반복검사하고 FI값의 변이계수를 측정하였다. 유전자칩에서 FI 판정기준을 설정하기 위하여 TG-ROC분석 (Two-graph Receive Operating Curve Analysis)을 실시하여 판정기준을 설정하였고 음성으로 확인된 시료의 FI값의 분석으로 통하여 판정기준의 적절성을 확인하였다.

국립수의과학검역원에서 구축된 2004년에서 2006년에 검사한 야외시료 중 바이러스가 분리된 시료를 표준시료로 사용하였고 그외 혈액, 조직시료는 야외시료로 구축하여 검사에 사용하였다. 표준시료는 국립수의과학검역원에서 유전자 염기서열 자료를 받아 검사결과 분석에 사용하였다.

유전자칩의 유효성 검사를 위하여 국립수의과학검역원 실험실에서 표준시료 및 야외시료에서 RNA, DNA를 분리하여 제조된 MP PCR 또는 MP RT-PCR을 사용하여 유전자를 증폭하였다. 증폭된 유전자는 전기영동하고 위의 방법에 따라 결과를 판정하였다. 또한 증폭된 유전자를 제작된 각각의 유전자칩으로 검사하여 표준시료와 임상시료들에 대한 검사결과를 PCR, RT-PCR 결과와 비교하고 유전자 염기서열과 비교하여 유전자칩의 유효성 평가결과로 사용하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. CSFV 및 BVDV 유전자칩 개발

1) CSFV / BVDV 유전자 probe, primer 설계 및 유전자 증폭시약 개발

가. CSFV 및 BVDV 유전자 probe 설계

CSFV 및 BVDV 5 'NCR영역의 유전자 칩용 유전자 Probe를 선발하기 위하여 표1과 표2와 같이 유전형별, 바이러스주 영역별로 설계하여 작성하였다.

표 1. CSFV 유전자 probe 설계

Probe group	Probe name	Location of sequence	Tm value	Remark
Common 영역	9G0P10000	5`NTR 20mer	63	Posi 001
	Posi 002	5`NTR 18mer	53	
	Posi 003	5`NTR 20mer	53	
	9G0P20000	5`NTR 20mer	61	
	9G0P30000	5`NTR 20mer	61	
SNP 영역 (vaccine or wild Strain)	Wild 001	5`NTR 19mer	49	
	Wild 002	5`NTR 17mer	47	
	Wild 003	5`NTR 18mer	51	
	Wild 004	5`NTR 19mer	53	
	Wild 005	5`NTR 21mer	57	
	9G0T10100	5`NTR 21mer	57	Wild 006
	Vac 001	5`NTR 19mer	47	
	Vac 002	5`NTR 20mer	51	
	Vac 003	5`NTR 21mer	55	
	9G0L00000	5`NTR 21mer	55	Vac 004
아외주 영역 (Wild Strain)	9G0T10200	5`NTR 21mer	59	
	9G0T10301	5`NTR 20mer	57	
	9G0T10302	5`NTR 21mer	61	
	9G0T10303	5`NTR 20mer	65	
	9G0T10401	5`NTR 22mer	57	
	9G0T20101	5`NTR 20mer	57	
	9G0T20102	5`NTR 21mer	61	
	9G0T20202	5`NTR 22mer	61	
	9G0T20203	5`NTR 23mer	65	
	9G0T20200	5`NTR 21mer	59	
	9G0T30100	5`NTR 21mer	57	
	9G0T30200	5`NTR 22mer	57	
	9G0T30300	5`NTR 21mer	59	
	9G0T30102	5`NTR 23mer	63	
	9G0T30103	5`NTR 22mer	61	
	9G0T30203	5`NTR 22mer	59	
	9G0T30104	5`NTR 23mer	67	
	9G0T30105	5`NTR 22mer	73	
	9G0T30106	5`NTR 22mer	55	
	9G0T30303	5`NTR 24mer	65	

*CSFV 5'NCR: 421bp

표 2. BVDV 유전자 프로브의 설계

Probe group	Name of Probe	Location of probe	Tm
BVDV 1	9G0B10000	5`NTR 26mer	65
	9GBV10101	5`NTR 23mer	63
	9GBV10201	5`NTR 23mer	65
	9GBV10102	5`NTR 22mer	63
	9GBV10103	5`NTR 23mer	63
BVDV 2	9GBV20101	5`NTR 21mer	63
	9GBV20102	5`NTR 21mer	65
	9GBV20103	5`NTR 21mer	61
	9GBV20104	5`NTR 21mer	63
	9GBV20201	5`NTR 21mer	59
	9GBV20301	5`NTR 21mer	61
	9GBV20401	5`NTR 21mer	61
	9GBV20402	5`NTR 21mer	61
	9GBV20403	5`NTR 21mer	65

나. CSFV/BVDV DNA Chip 검사용 Multiplex RT-PCR 시약개발

(1) CSFV, BVDV Primer의 설계

CSFV와 BVDV DNA chip에 적용할 수 있는 유전자 증폭시약을 작성하기 위하여 Primer를 설계하였다. CSFV와 BVDV는 같은 Pestivirus 속의 바이러스로 유전자 유사성이 높기 때문에 대부분의 연구자들은 Pestivirus common RT-PCR 방법을 사용하고 있다. 그러나 Pestivirus common RT-PCR 산물을 사용하여 유전자 칩에 적용한 결과 BVDV의 판독은 가능하나 유전자 증폭산물의 크기가 적어 CSFV에서는 바이러스의 양성 프로브와 반응하지 않거나 약하게 반응하여 사용이 불가능하였다.

이에 따라 CSFV, BVDV의 5 'NCR 영역을 각각 증폭할 수 있는 Multiplex(MP) RT-PCR을 설계하였다. 그러나 CSFV와 BVDV에 각각 특이적인 프라이머를 사용한 MP RT-PCR은 이들 두가지 바이러스의 유전적 유사성으로 인하여 상호 증폭산물을 방해해서 각각의 바이러스 유전자는 증폭되지만 복합감염 시료에서는 한쪽의 유전자 증폭이 다른 쪽을 방

해하여 검출감도가 낮아지거나 다른 크기의 증폭산물이 나타나는 문제점이 있었다. 따라서 CSFV의 5' NCR 증폭 부위와 동일한 부위를 사용한 MP RT-PCR을 설계하고 검사에 사용하였다.

CSFV 5 'NCR 유전자의 증폭을 위한 Primer는 검사의 일관성 및 증폭산물의 크기에 유의하여 기존에 국립수의과학검역원에서 정밀검사에 사용하고 있는 Primer를 사용하였다.

BVDV는 5'NCR 유전자의 증폭을 위하여 유전자를 배열(align)하고 CSFV 및 BVDV (Type 1, 2)를 동시에 증폭하기 위해 CSFV와의 간섭현상을 고려하여 Reverse primer 1,2 (R1, R2)를 CSFV와 염기서열이 상이한 위치에 설정하였다.

또한, CSFV와 BVDV의 유전적 유사성으로 인한 상호 간섭현상을 고려하여 CSFV의 기존 Reverse primer와 같은 위치에서 BVDV primer를 설계(R3, R4)하여 RT-PCR의 반응성을 확인하였다.

표 3. CSFV 및 BVDV 유전자 증폭용 Primer 설계

Primer Name	Base pair (bp)	Nucleotide position	Remark
*CSFV F	20	102-121	
CSFV R	19	503-521	421bp
*Pesti F1	24	101-124	
BVDV1 R1	24	575-598	498bp
BVDV2 R2	18	505-488	405bp
BVDV1 R3	19	503-521	421bp
BVDV2 R4	21	504-522	422bp

*Forward prime: 5'Cy3 labeled primers

(2) BVDV Primer의 유효성 평가

BVDV 유전자 primer의 RNA 증폭을 확인하기 위하여 설계된 2종의(F1,R1,R2) Primer pairs와 기존 CSFV single RT-PCR primer pair를 사용하여 Premix를 제작하고 표준시료에 대한 검사를 실시하였다. 각각의 single RT-PCR에 대해서는 양호한 결과를 보였으나 BVDV 각 PCR pair에서 CSFV RNA 존재 시 비특이 증폭산물이 나타남을 확인하였다.

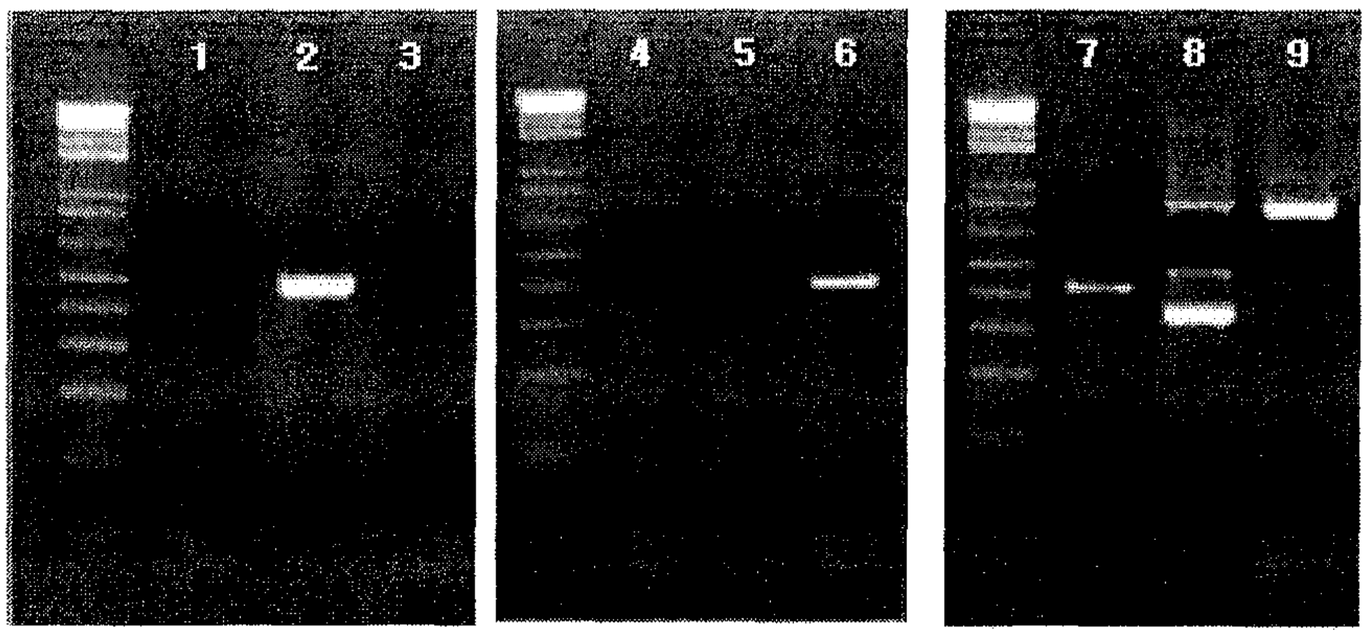


그림 3. BVDV 5'NCR Single RT-PCR의 특이도 검사결과

A: BVDV1 RNA, B: BVDV2 RNA, C: CSFV RNA

Lane 1,4,7: CSFV RT-PCR, Lane 2,5,8: BVDV1 RT-PCR, Lane 3,6,9: BVDV2 RT-PCR

2종의(F1,R1,R2) Primer와 CSFV primer를 사용하여 CSFV / BVDV MP RT-PCR premix를 조성하고 검사한 결과 그림 3의 결과에서 예상한 결과와 같이 CSFV RNA가 존재 시 비특이적으로 유전자가 증폭됨을 확인할 수 있었다.

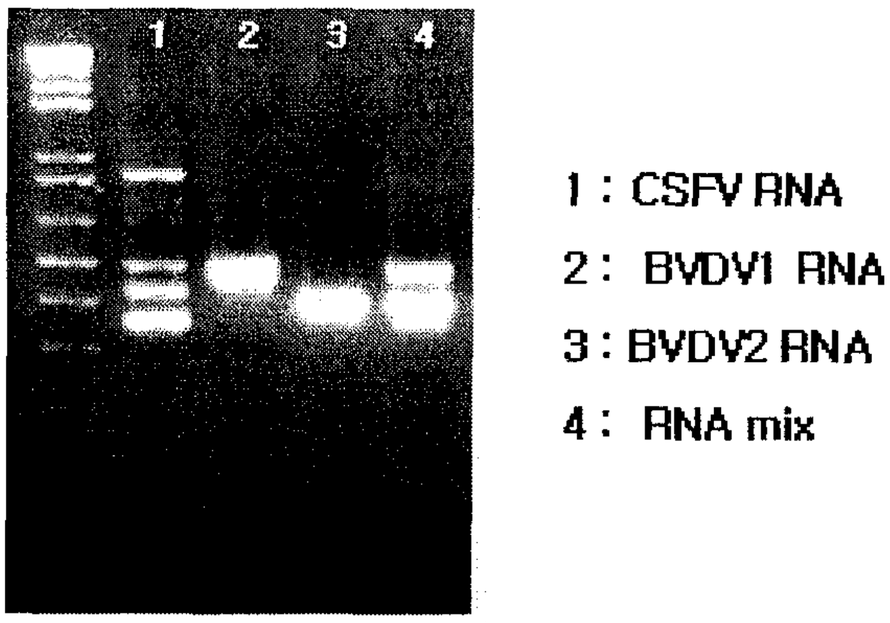


그림 4. CSFV/BVDV Multiplex RT-PCR에서 유전자 증폭결과

CSFV와 BVDV 유전자 유사성으로 인하여 나타나는 비특이증폭을 제거하기 위하여 CSFV 5'NCR primer와 같은 위치에서 BVDV Primer를 설계하고 이들 Primer의 유효성을 검사하였다.

표 3에서 설계된 2종의(F1,R3,R4) primer pairs와 CSFV primer pair를 사용하여 유효성을 확인한 결과 BVDV1 primer pair (R3)에서는 우수한 결과가 확인되었으나 BVDV2 primer pair(R4)에서는 BVDV RNA 존재 시에는 효과적으로 유전자가 증폭되었으며 CSFV RNA 존재 시에는 약간의 증폭산물이 확인 되었다. 그러나 다른 크기의 비특이 유전자는

증폭되지 않았다.

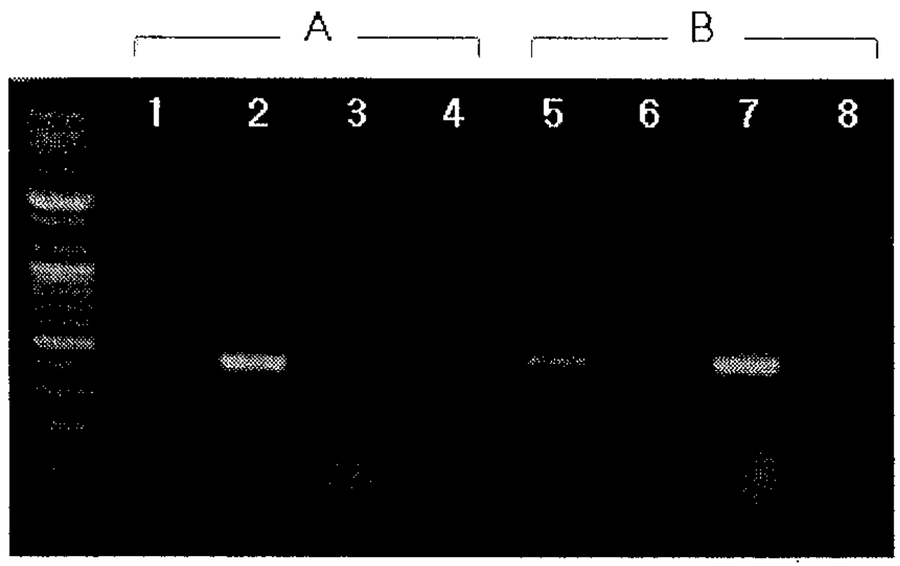


그림 5. BVDV Reverse primer의 재설계 및 검사결과

A: BVDV1 RT-PCR, B: BVDV2 RT-PCR

Lane 1,5: CSFV RNA, Lane 2,6: BVDV1 RNA, Lane 3,7: BVDV2 RNA, Lane 4,8: Negative

이들 Primer의 조합을 이용하여 CSFV/BVDV MP RT-PCR에서의 유효성을 평가한 결과 그림 6과 같이 각각의 바이러스 표준시료에서 효과적으로 유전자 증폭이 이루어짐을 확인할 수 있었다. CSFV/BVDV 5 'NCR MP RT-PCR의 Primer로서 CSFV F, R, BVDV R3, R4 Primer를 선택하였다.

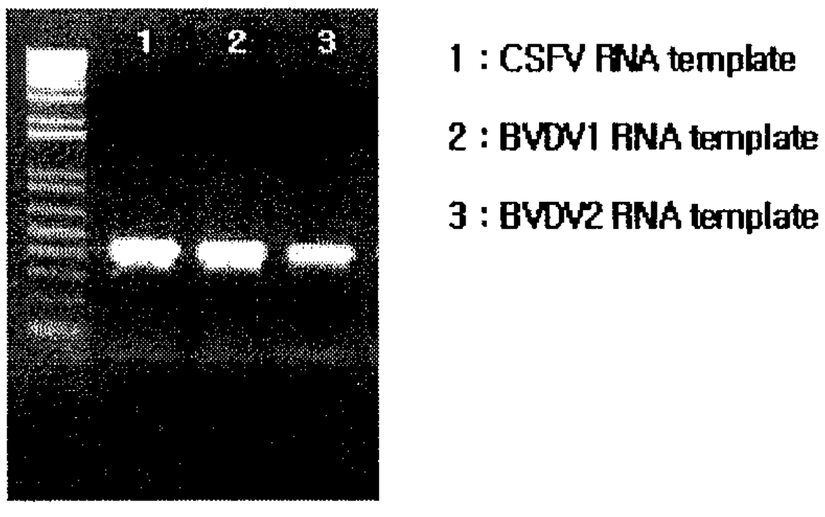


그림 6. 그림2-3의 Primer를 사용한 CSFV, BVDV Multiplex RT-PCR 검사결과

다. 유전자 Multiplex 증폭시약의 개발 및 유효성 검사

(1) CSFV RT-PCR의 최적화

1-Step RT-PCR시약의 구성을 위하여 Qiagen Taq polymerase를 사용하여 Primer 농도, PCR buffer를 single 및 multiplex RT-PCR에 적정화 시험을 실시하고 1-step RT-PCR Premix를 제작하였다.

DNA chip에서의 검사 간 변이를 최소화하기 위해서는 RNA 추출이 일정해야 하고 유전자 증폭산물의 양이 동일농도에서 일정해야 하는데 이를 위하여 PCR program에서 일정한 산물이 증폭될 수 있도록 안정되어야 한다.

CSFV Cy3 RT-PCR premix에서 PCR cylcle 프로그램을 현재 국립수의과학검역원에서 사용하고 있는 프로그램을 포함하여 3가지로 설계하고 증폭산물의 변화를 검사하였다. 돼지콜레라 바이러스 (LOM)를 저역가(10^3-10^1 $TCID_{50}$/50ul) 시료들을 사용하여 각 PCR 프로그램별 증폭산물을 agarose gel electrophoresis(AGE)하고 Gel Doc을 사용하여 바이러스 농도별 전기영동 분획의 Density를 측정하였다.

그림7과 같이 Cycle 2 program에서 10^2TCID_{50}에서 판독이 가능한 전기영동 분획이 형성되었고 Cycle 시간을 증가시킨 cycle 3와 비교할 때 분획의 면적이 거의 변동이 없어 Cycle 2 프로그램이 가장 재현성 있는 결과를 보였다.

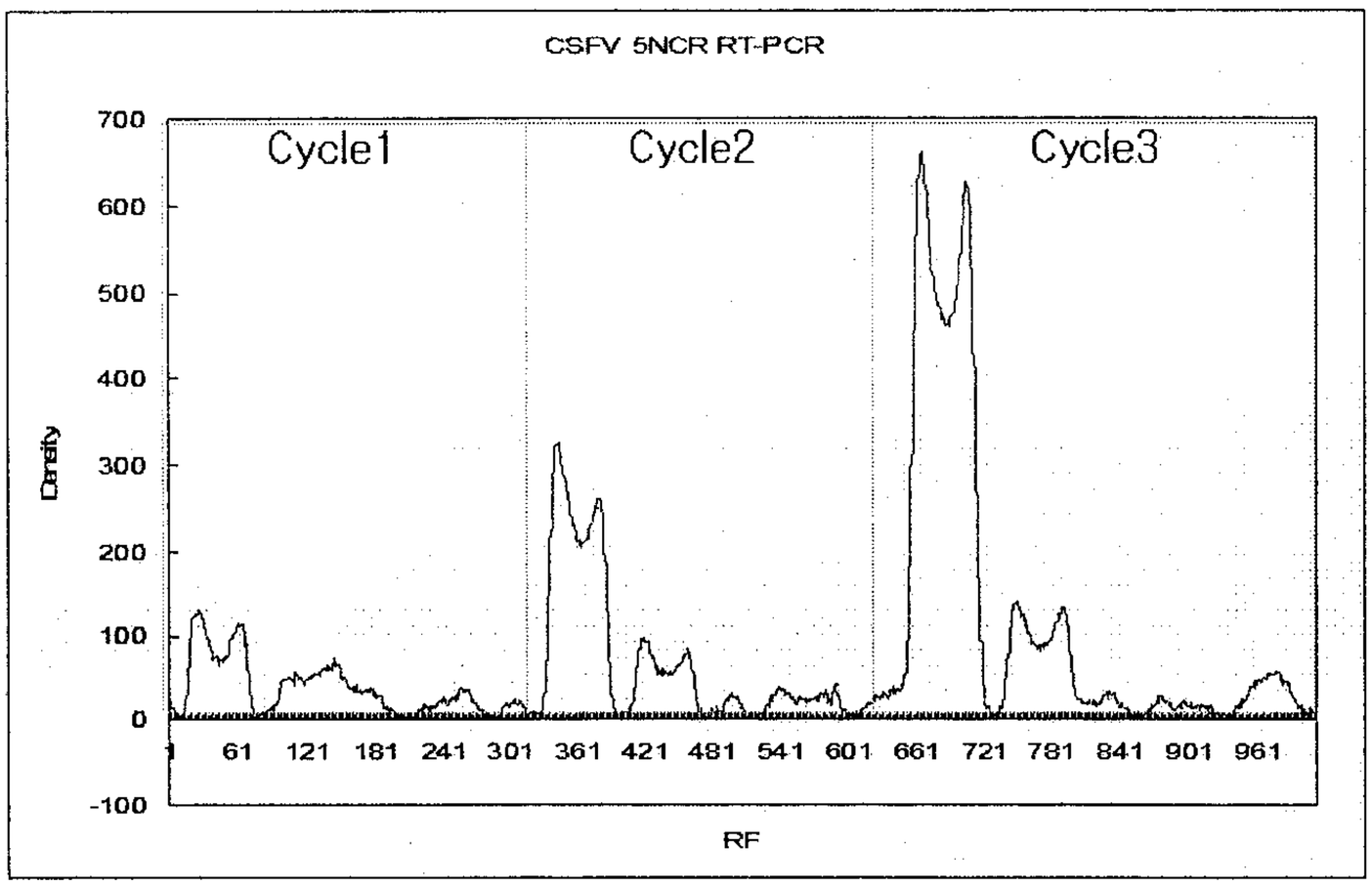


그림 7. CSFV RT-PCR cycle program에 따른 유전자 증폭산물의 Density 변화

Cycle 1 : 94℃ - 10s / 55℃ - 10s / 72℃ - 15s (30 clycles)

Cycle 2 : 94℃ - 20s / 55℃ - 20s / 72℃ - 30s (30 clycles)

Cycle 3 : 94℃ - 30s / 55℃ - 30s / 72℃ - 45s (30 clycles)

(2) CSFV/BVDV Multiplex RT-PCR premix의 제작 및 증폭효율 검사

CSFV/BVDV Multiplex RT-PCR premix를 제작하고 CSFV/BVDV의 단독 및 복합시료에서 CSFV, BVDV, CSFV/BVDV 검출한계(Limit of detection, LOD)를 검사하였다. Multiplex RT-PCR Program은 다음과 같이 설정하였다.

표 4. CSFV / BVDV Multiplex RT-PCR 프로그램의 설정

Step	Program
RT reaction	50℃ - 30min
Denature	95℃ - 15min
PCR Cycles (30cycles)	94℃ - 20sec 55℃ - 20sec 72℃ - 30sec
Final extension	72℃ - 10min

CSFV/BVDV Multiplex RT-PCR에서 검출한계(LOD)를 측정한 결과 CSFV는 바이러스 역가 10^0 $TCID_{50}$/50ul 까지 모든 검사에서 양성으로 검출되었으며, BVDV는 바이러스 역가 10^1 $TCID_{50}$/50ul 까지 검출 가능함을 확인하였다.

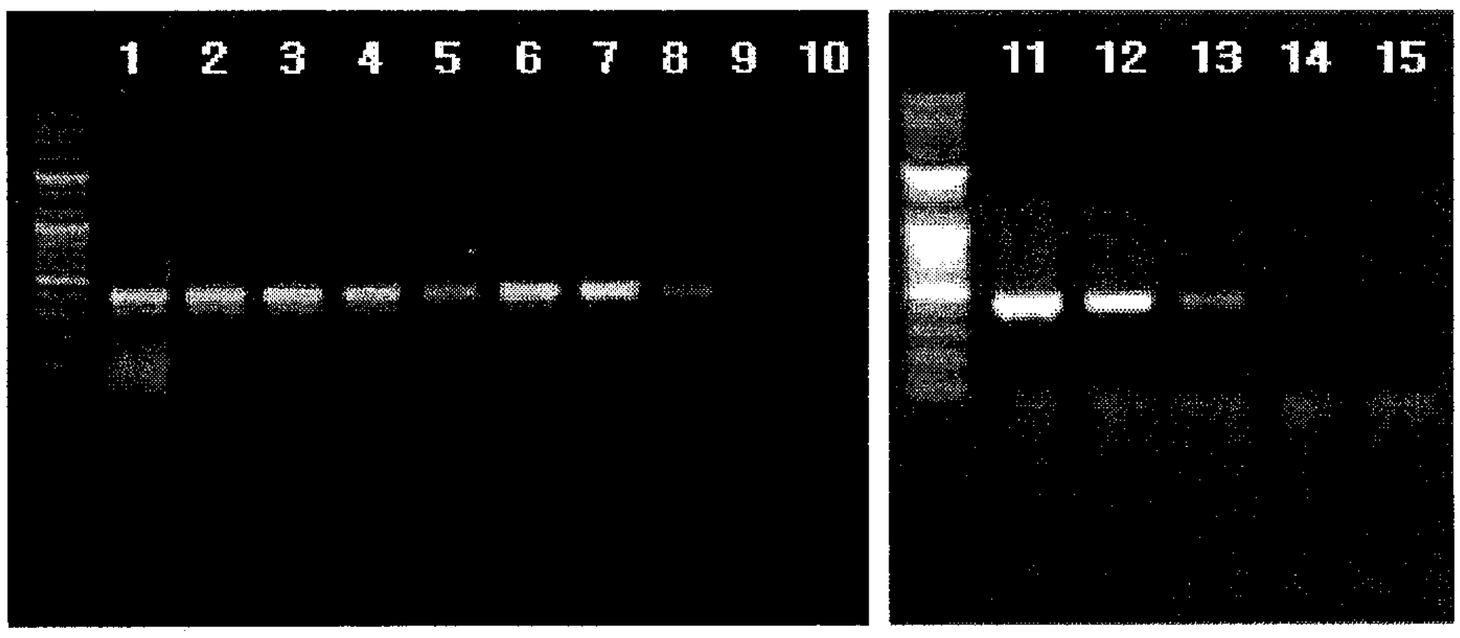


그림 8. CSFV/BVDV Multiplex RT-PCR 검출한계 측정결과 (LOD)

A: CSFV, B: BVDV Type 1, C: BVDV Type 2

Lane 1-5: 10^4-10^0 $TCID_{50}$/50ul of CSFV (LOM)

Lane 6-10: 10^4-10^0 $TCID_{50}$/50ul of BVDV Type 1

Lane 11-15: 10^4-10^0 $TCID_{50}$/50ul of BVDV Type 2

2) 분자인식기술을 이용한 CSFV, BVDV DNA Chip probe 선발 및 최적화

가. CSFV 5'NCR유전자 검출을 위한 probe DNA 선발

(1) Probe 유효성 검사를 위한 표준검증시험 고안 및 probe 선발

CSFV 백신주(LOM)와 야외주를 감별하기 위하여는 SNP 수준의 감별검사가 필요하므로 정밀한 Probe 선발과 평가가 요구된다. 설계된 Probe를 사용하여 DNA chip을 제작하고 이를 검증하기 위하여 그림 9과 같이 검사하였다. PCR에 의해 얻은 cDNA의 농도가 실험 조건에 따라 변할 수 있다는 점을 감안하여 probe와 상보적인 DNA(target DNA)를 합성하여 1차적으로 probe를 평가하고 선발하였다. 이때 probe와의 교잡반응 후 확인을 위하여 target DNA와 상보적인 Cy3가 부착된 detection DNA를 합성하여 반응성 검사에 사용하였다.

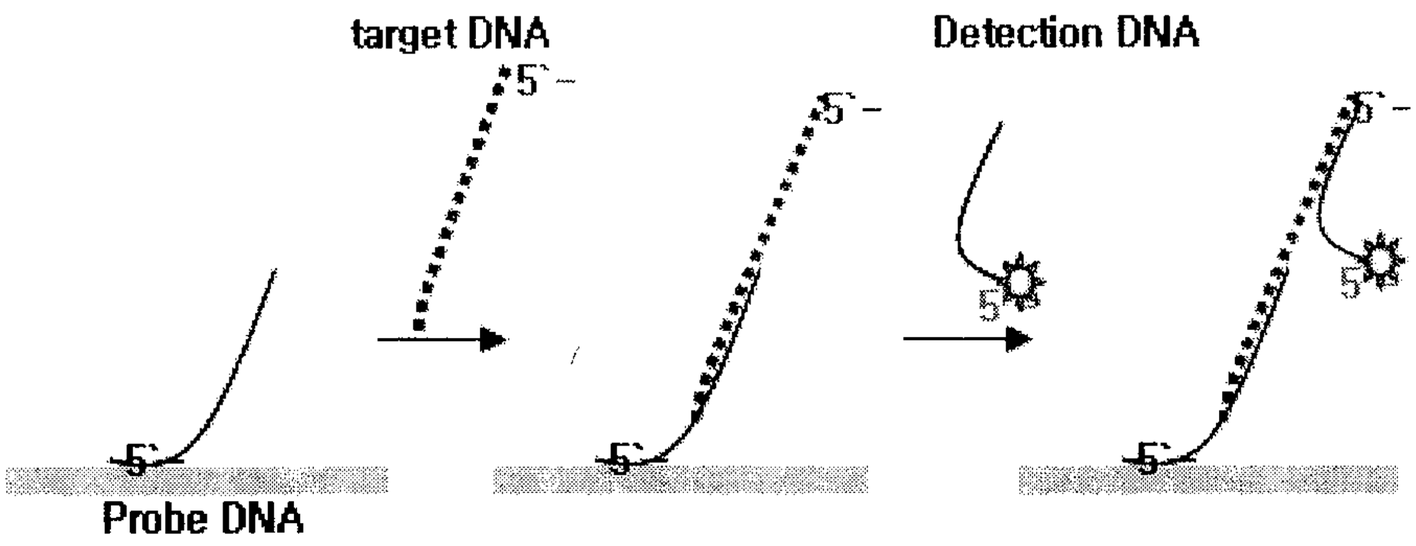


그림 9. SNP용 Probe 선발을 위한 검사방법

○ DNA Chip에서 CSFV SNP용 probe의 Hyb 온도별 반응성 검사 결과

다수의 백신주, 야외주 검출용 probe를 선발한 결과 가장 반응성이 우수한 probe는 vac003과 wild005로 일정 온도에서 Fluorescent intensity(FI)가 가장 높으며, SNP 차이가 월등하였다

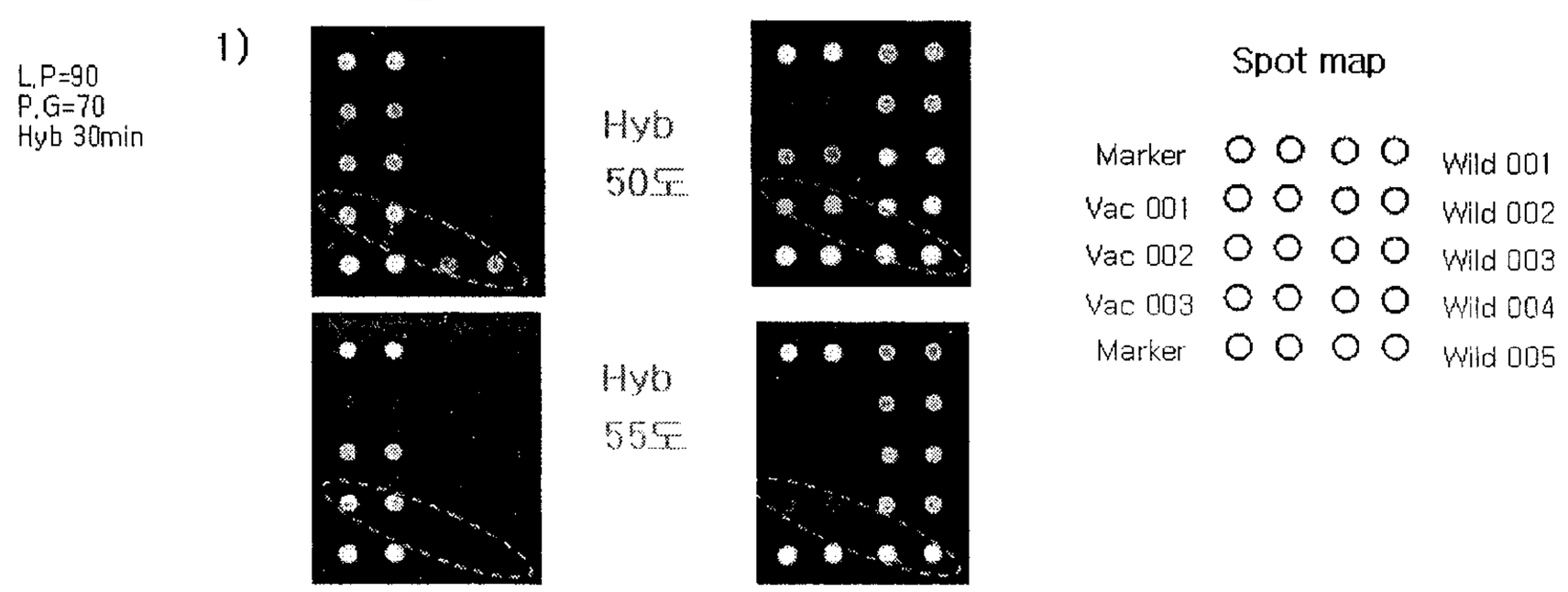


그림 10. SNP용 Probe의 Fluorescent intensity (FI)

● **SNP 위치에 따른 probe 반응성 검사**

동일 길이의 probe 중 SNP 위치에 따른 probe의 영향을 시험한 결과 probe의 정 가운데에 SNP 위치가 존재하는 것보다 표면에서 3 '염기 위쪽에 SNP 위치가 존재하는 probe vac004, wild006이 더욱 우수한 반응성을 보이는 것을 확인하였다.

FI값은 지수함수로 처리된 값이어서 실제 white(60000이상)와 green(15000이상)사이는 cDNA로 10배의 농도 차이가 있으므로 이는 SNP가 있는 시료에서 약 50배 이상 차이가 있는 것으로 판정 시 SNP를 가지는 돼지콜레라 바이러스의 야외주와 백신주(LOM)를 정확하게 감별할 수 있다는 것을 의미한다. 또한 돼지콜레라 바이러스의 유전형 감별을 위한 경우에도 SNP 수준에서 검사가 가능함을 예측할 수 있다. SNP 검사가 가능한 경우 바이러스 유전자에 대한 염기서열 결과 보다 정확한 검사결과를 얻을 수 있을 것으로 예측된다.

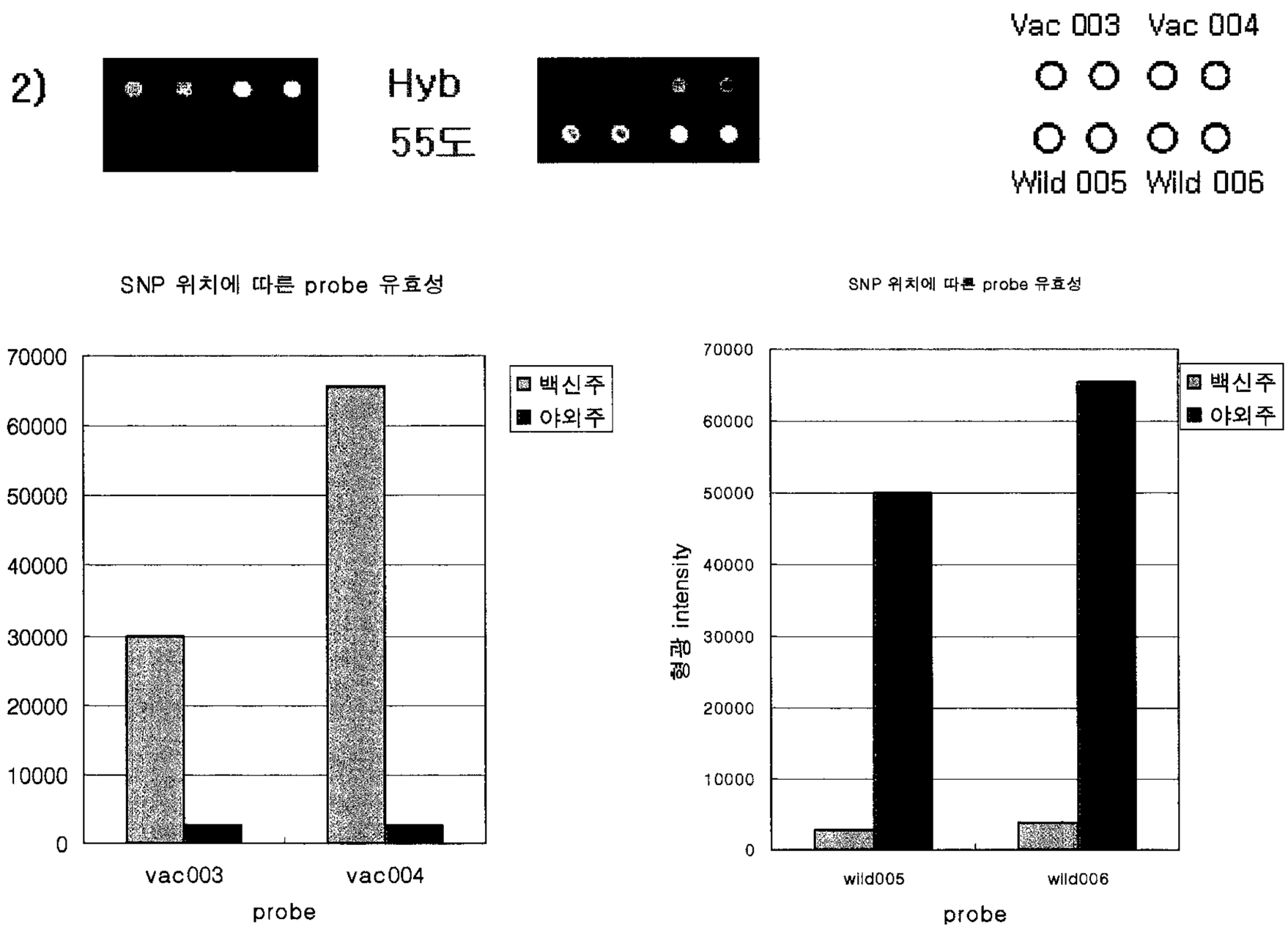


그림 11. SNP 위치에 따른 Probe의 Fluorescent intensity (FI)

나. 선발된 probe와 cDNA간 반응성 확인 및 최적화

(1) Hybridization 온도 최적화

선발된 Probe를 사용하여 작성된 DNA chip에 시료를 30분간 다양한 Hybridization 온도에서 반응하고 FI를 측정하여 Hybridization에 필요한 최적온도를 설정하였다.

검사결과 48도에서 양성대조 Probe의 형광이 가장 높고 백신주와 야외주의 SNP 검사가 수월하여 가장 적합한 반응온도로 설정하였다.

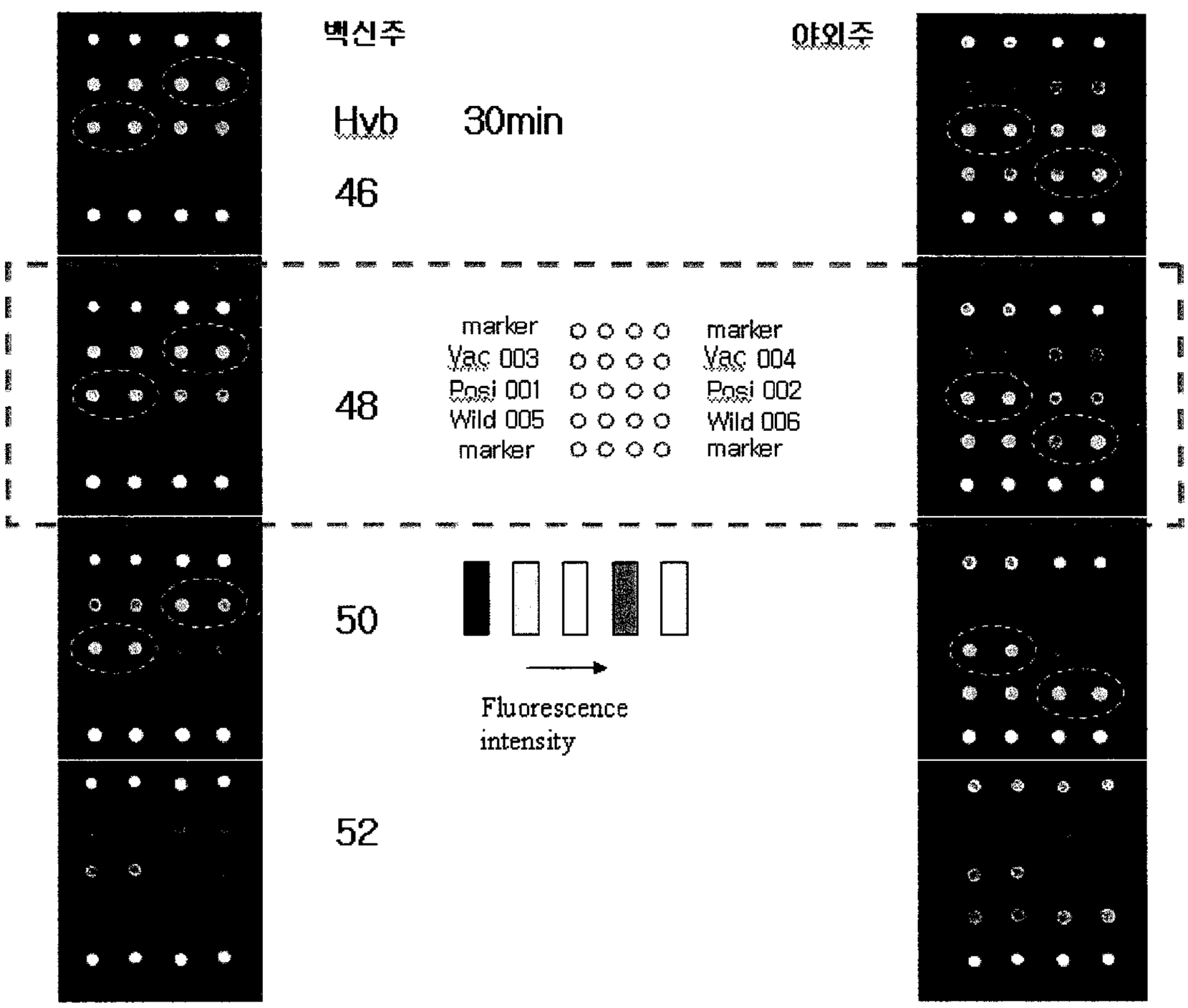


그림 12. 반응온도별 Probe의 반응성 검사결과

(2) 반응시간 최적화

Hybridization 온도 48도에서 동일 PCR 결과물로 반응시간을 변화시키면서 반응성을 검사하였다. 검사결과 반응 2시간에 가장 높은 수준의 형광을 나타내었고 그 이후에는 변동이 없어 적정반응 시간은 2시간으로 설정하였다.

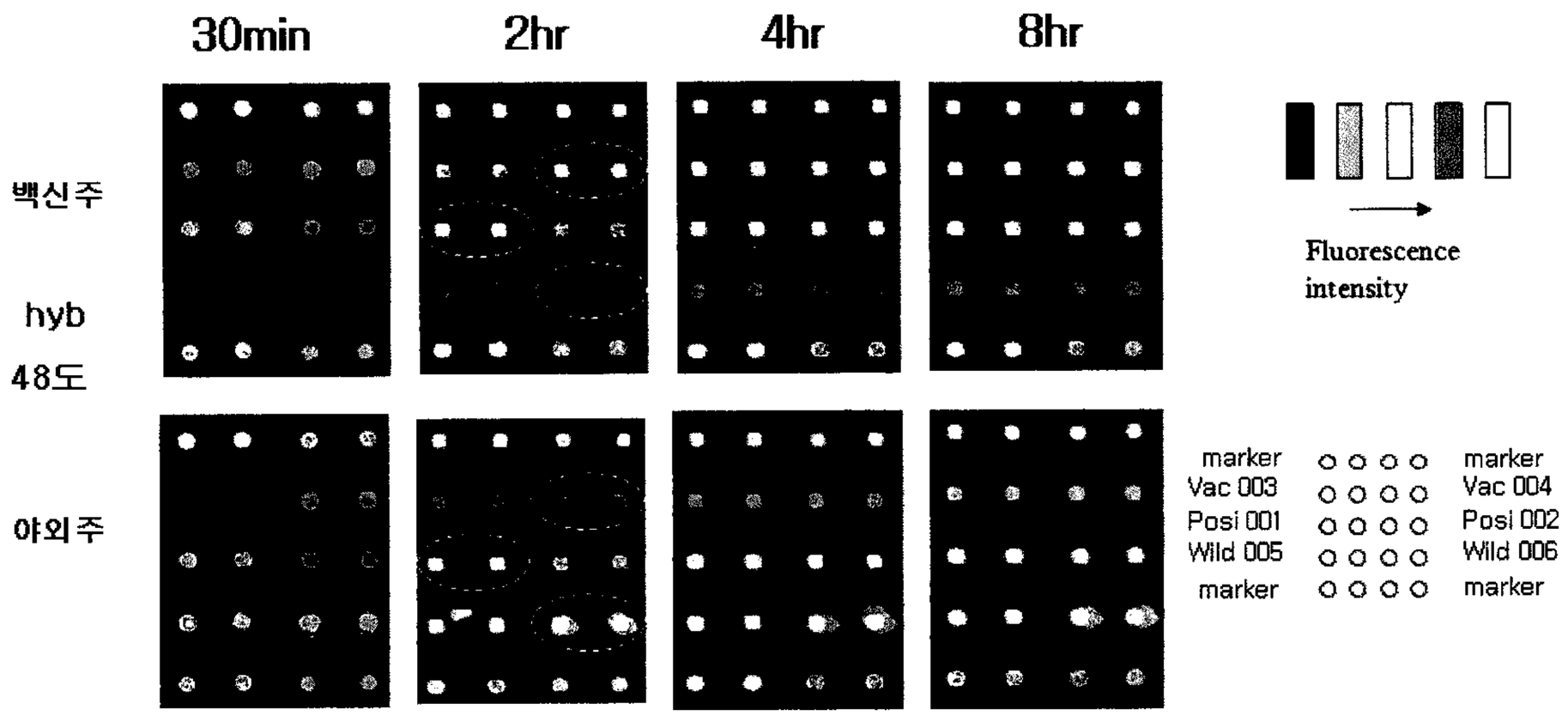


그림 13. cDNA를 이용한 반응시간별 반응성 검사결과

*FI (Fluorescent Intensity): white > red > yellow > green > blue

다. BVDV 5'NCR유전자 검출을 위한 probe DNA 선발

BVDV 유전자 Probe의 선발을 위하여 설계된 14종의 Probe를 사용하여 DNA chip을 제작하고 RT-PCR 증폭산물을 반응시켜 반응성을 검사하였다. 반응시간과 온도는 CSFV DNA chip에 설정된 조건을 조정 없이 그대로 사용하였다.

Genotype이 다른 BVDV Type 1 시료 (시료 1-1, 1-2)에서는 probe G0BV10103, 9G0B10201에서 FI값의 Signal-to-noise가 가장 높으며, BVDV Type 2 시료에서는 Probe 9GBV20101에서 FI값의 Signal-to-noise가 가장 높아 3종의 Probe를 선발하였다.

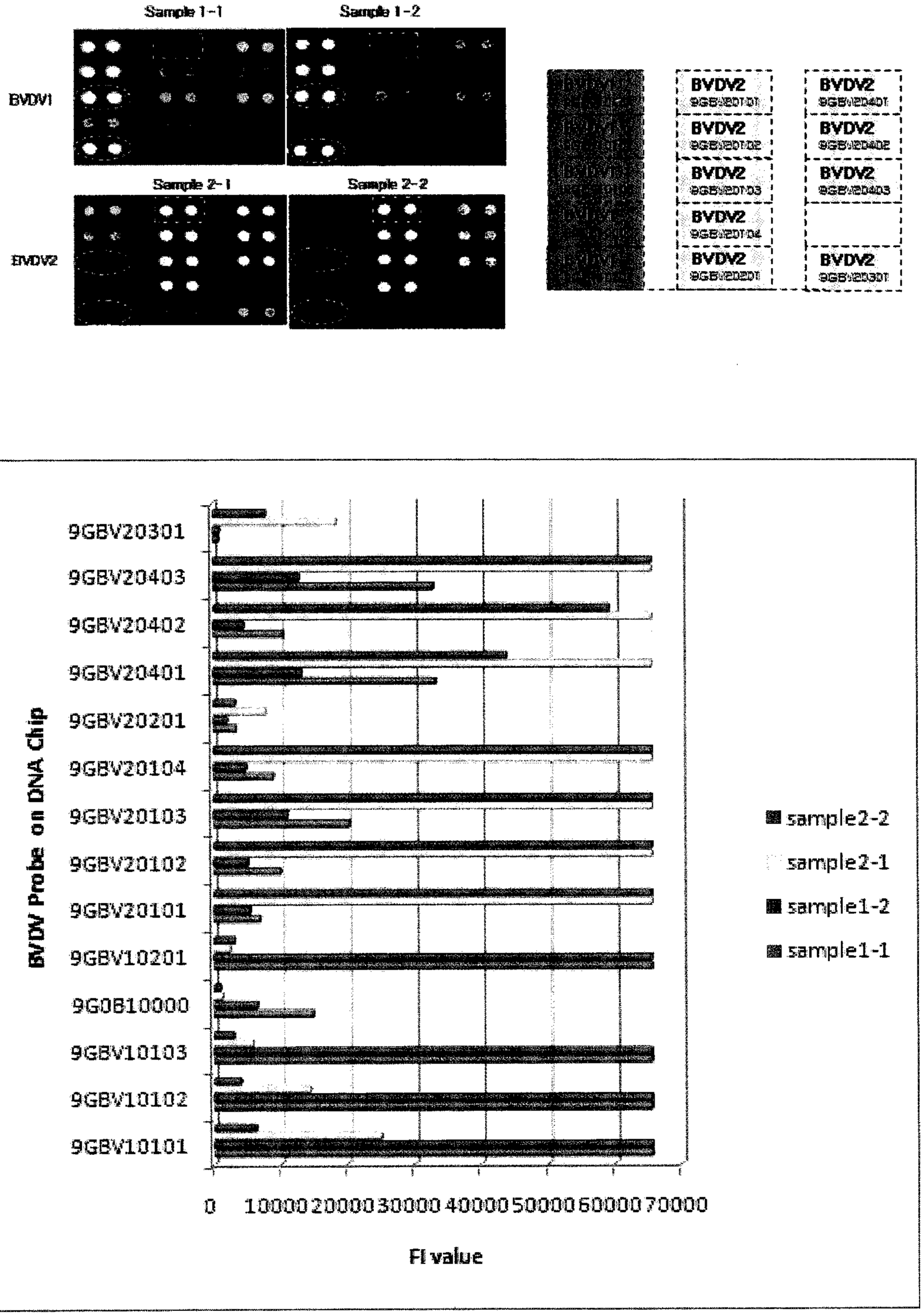


그림 14. BVDV Probe의 FI value

*BVDV1 : Sample1-1, 1-2, BVDV2 : Sample 2-1, 2-2

3) CSFV/BVDV DNA chip 의 실험실 유효성 평가

가. DNA chip의 최저검출한계 (Limit of detection, LOD)의 측정

선발된 유전자 Probe들의 최저검출한계를 검사하기 RT-PCR로 유전자를 증폭한 뒤 이를 정량하여 최저검출한계를 검사하였다. RT-PCR 증폭산물의 정량은 UV spectrophotometer를 사용하여 260nm에서 흡광도 값을 구한 뒤 다음 식으로 부터 그 농도를 구했으며, 적정농도로 희석하여 사용하였다.

흡광도 A260 = e C

(e : extinction coefficience, C : Oligo concentration)

또한 바이러스 역가별 LOD를 측정하기 위하여 바이러스 역가를 측정하고 이를 희석한 시료에서 RNA를 추출하고 RT-PCR하여 DNA chip에 반응시킨 후 LOD를 측정하였다.
이때 모든 DNA chip에서의 반응은 반응시간 2시간, 반응온도 48도에서 시험하였다.

(1) CSFV LOM주 유전자에서 유전자칩의 이론적 LOD

백신주(LOM)의 정량된 유전자를 희석하여 검사한 결과 LOD는 최소 0.4ng/ul 까지 검출 가능하여 전기영동에서 육안으로 검사할 수 있는 농도 이하까지 검출이 가능함을 확인하였다.

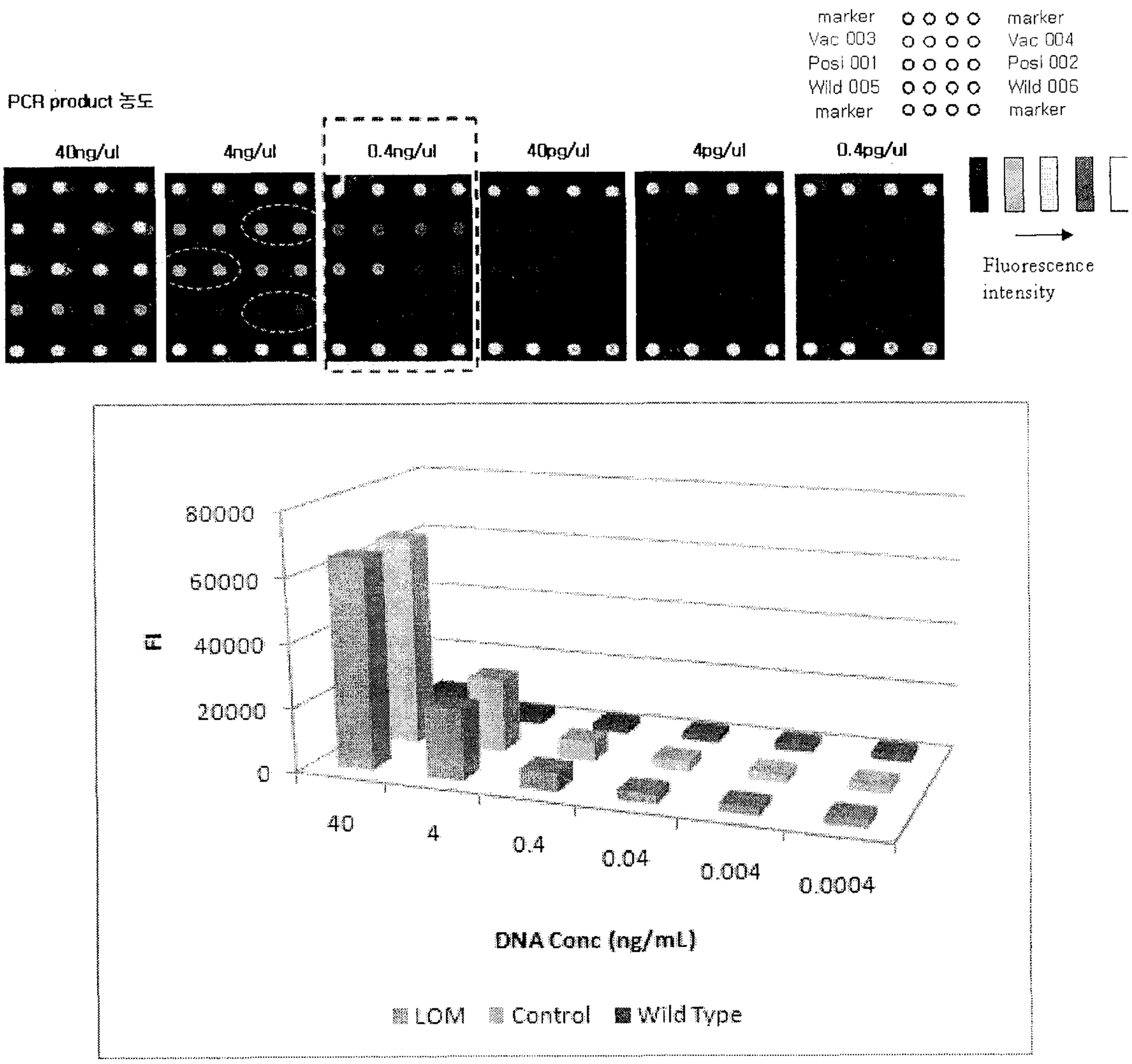


그림 15. CSFV 백신주 (LOM)의 유전자에서 LOD 측정

(2) CSFV 야외주 유전자에서 유전자칩의 이론적 LOD

야외주에서 증폭하여 정량된 유전자의 LOD는 최소 0.4ng/ul 까지 검출 가능하여 백신주와 동일한 결과를 보였다. 또한 cDNA에서도 앞에서 Probe의 선발과정에서 사용한 합성 DNA로 검사한 결과와 동일한 SNP 감별능력을 나타내어 1차적인 Probe 선발에서는 합성 DNA를 사용할 수 있는 것으로 판단되었다.

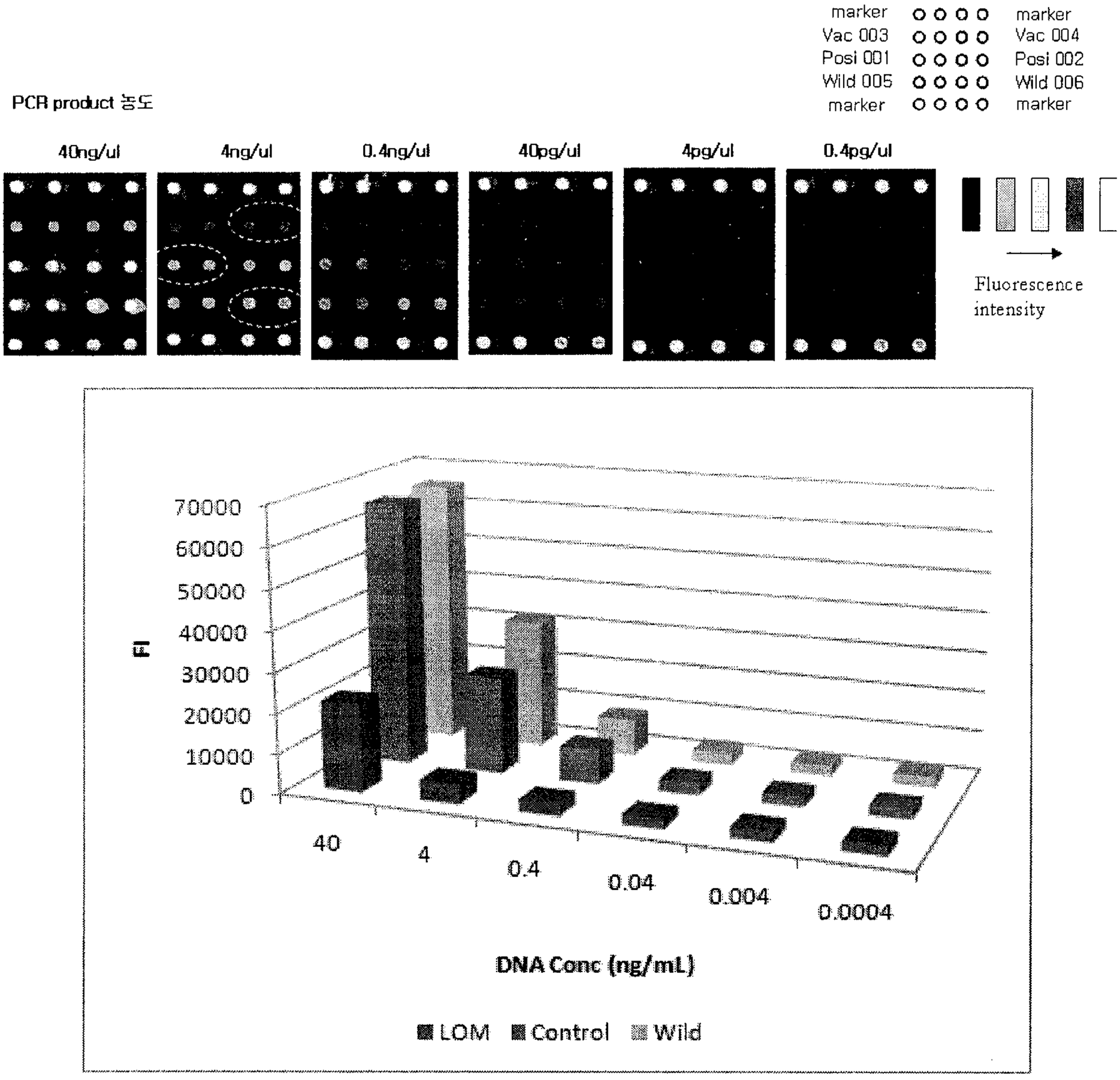
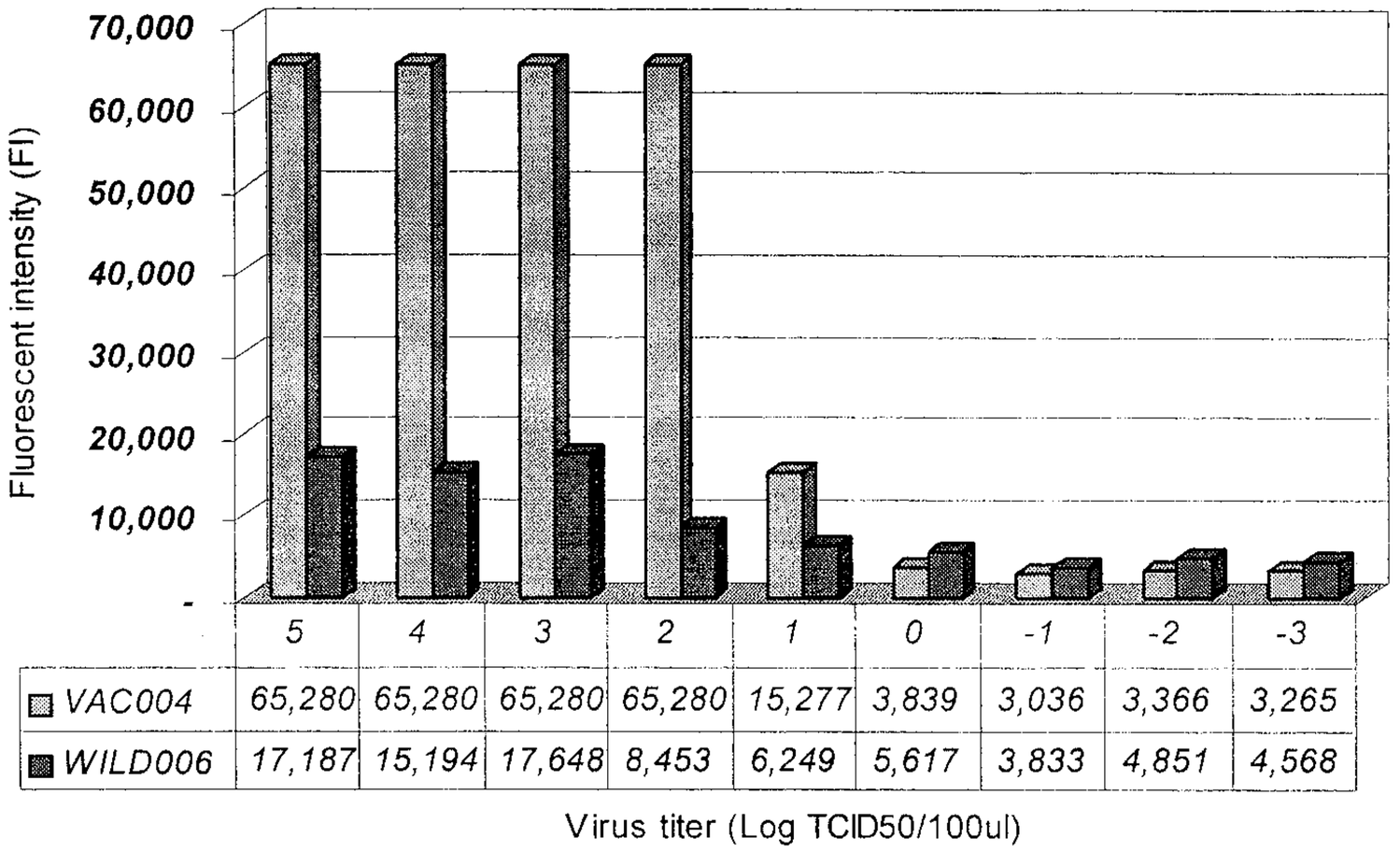


그림 16. CSFV 야외주 유전자에서 LOD의 측정

(3) CSFV(LOM주) 바이러스 역가별 시료에서 유전자 칩의 LOD 측정

CSFV (LOM)의 바이러스 역가를 측정하고 역가에 따른 LOD를 검사한 결과 전기영동에서 확인 가능한 10^1 $TCID_{50}$/100ul 까지 검출되었다. 또한 바이러스 농도에 관계없이 완전하게 SNP검사가 가능함을 확인하였다.



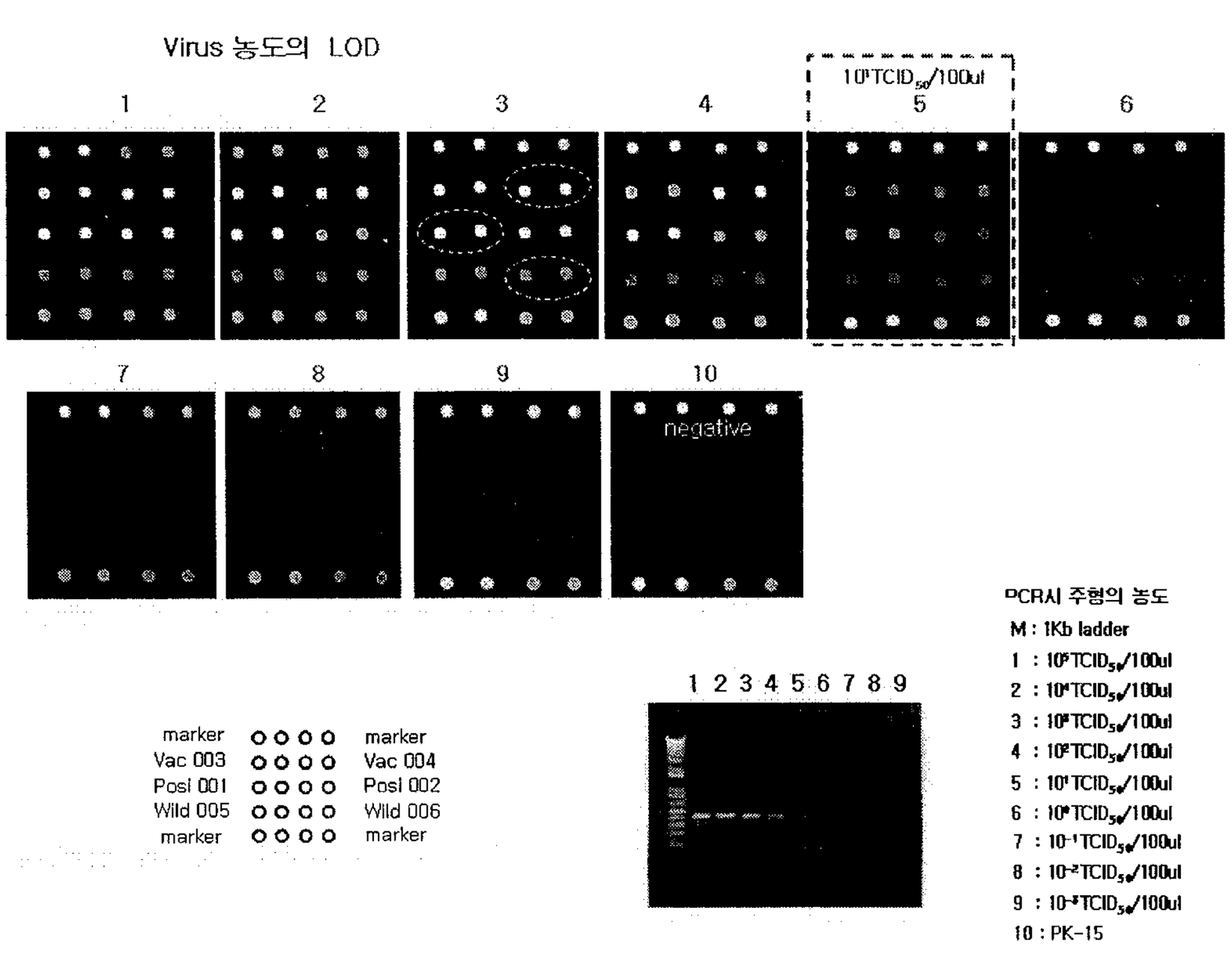


그림 17. CSFV LOM주 역가별 시료에서 유전자칩의 LOD 반응

나. CSFV 및 BVDV 유전자 표준시료 유효성 평가

(1) 표준시료의 구성 및 검사방법

CSFV의 유전형별 분리주와 BVDV에서 RT-PCR 시약과 DNA chip에서의 반응성을 확인하여 DNA chip의 유효성을 평가하였다. 이를 위하여 CSFV는 유전형별로 14개의 표준시료를 구축하고 BVDV는 NADL주를 사용하여 표준시료를 구축하였다. 표준시료는 야외 강독바이러스의 경우 바이러스를 직접 사용하지 않고 클로닝된 유전자를 사용하여 구축하고 검사에 사용하였다.(표 5)

표. 5. CSFV/BVDV 표준시료의 구축

No.	Sample No.	Strain	Cloning Vector	비고
1	HC1001	ALD-KOR	PCR 2.1 TOPO	G1 표준주
2	HC1002		PCR 2.1 TOPO	
3	HC1003		PCR 2.1 TOPO	
4	HC1008	88136	pGEM-T	
5	HCL001	LOM	PCR 2.1 TOPO	LOM주
6	HCL002	LOM	PCR 2.1 TOPO	
7	HCL003	LOM	PCR 2.1 TOPO	
8	HCL004	LOM	PCR 2.1 TOPO	
9	HC2001		PCR 2.1 TOPO	
10	HC2002		PCR 2.1 TOPO	G2 표준주
11	HC2003		PCR 2.1 TOPO	
12	HC2004		PCR 2.1 TOPO	
13	HC3001	97009	pGEM-T	G3 표준주
14	HC3002	98114	pGEM-T	
15	BVDV	NADL	PCR 2.1 TOPO	BVDV 표준주

(2) 표준시료의 농도별 DNA chip 유효성 평가

표준시료의 검사를 위하여 그림 18과 같이 CSFV/BVDV 유전자 칩 시제품을 제작하고 검사에 사용하였다.

표준시료는 multiplex RT-PCR 시약에서 유전자를 증폭하여 전기영동으로 확인하고 DNA chip에서 검사하였다. 검사결과는 각 probe spot의 FI를 Quantitation program (PerkinElmer)을 사용하여 분석하였다.

검사결과 CSFV 표준시료의 유전형에 관계없이 DNA chip에서 Control probe에서 높은 FI 값을 나타내었고 각 표준시료의 농도에 의존적으로 형광이 감소하고 있음을 확인하였다.

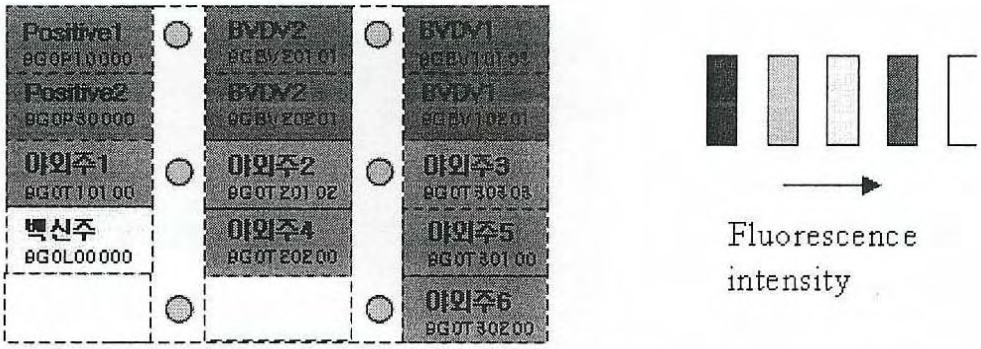
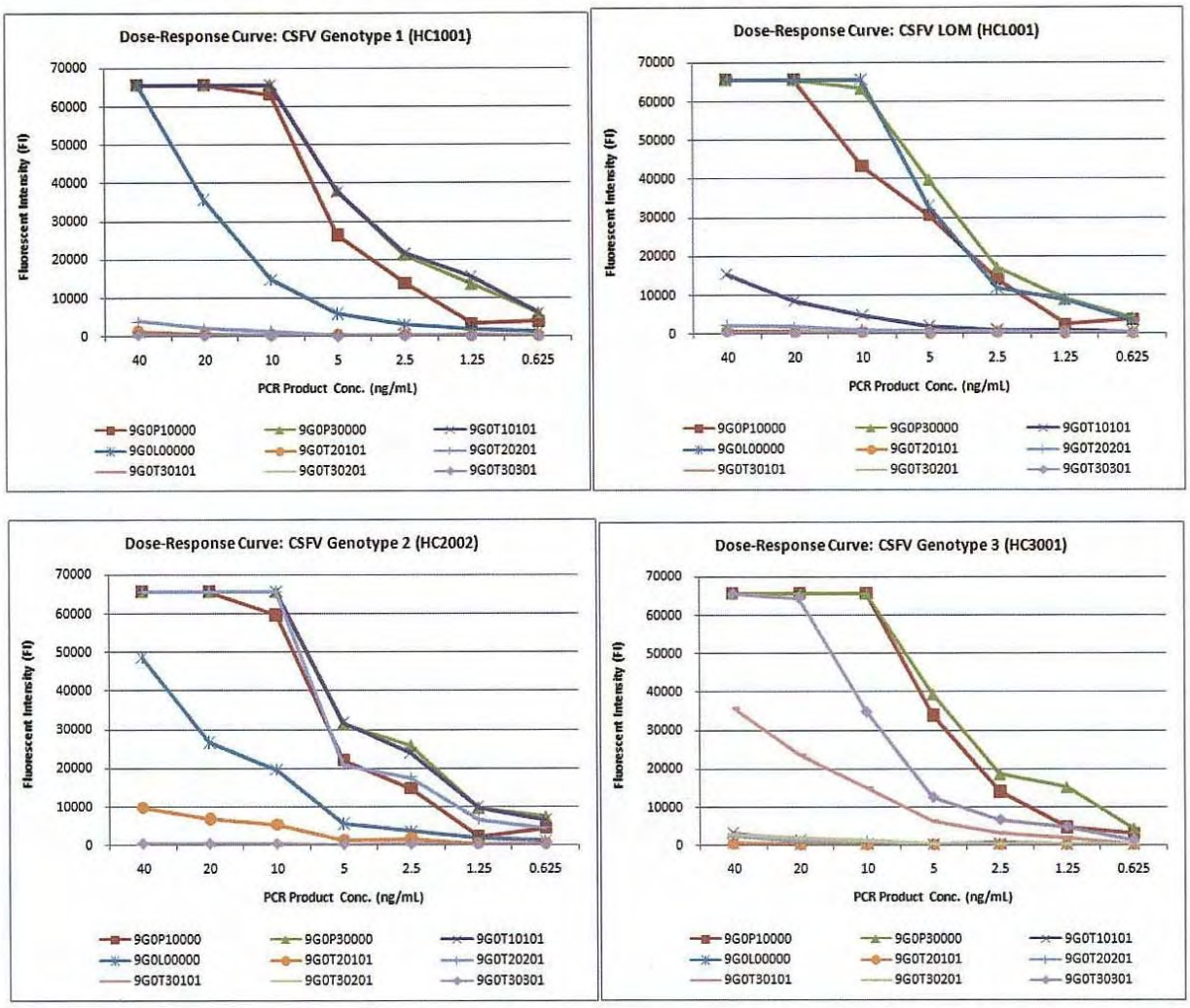


그림 18. CSFV DNA chip의 probe map

○ CSFV 표준시료의 농도별 DNA Chip 유효성 평가



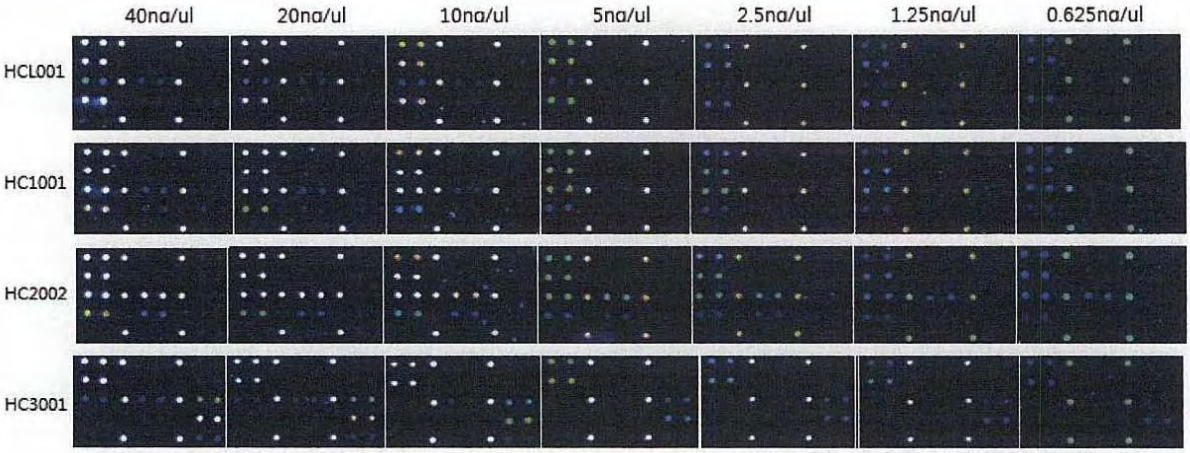


그림 19. CSFV 농도별 표준시료에서 각 Probe의 유전자칩 반응성 및 Dose-response curve

○ BVDV Sample (NADL strain) 의 농도별 DNA Chip 유효성 평가

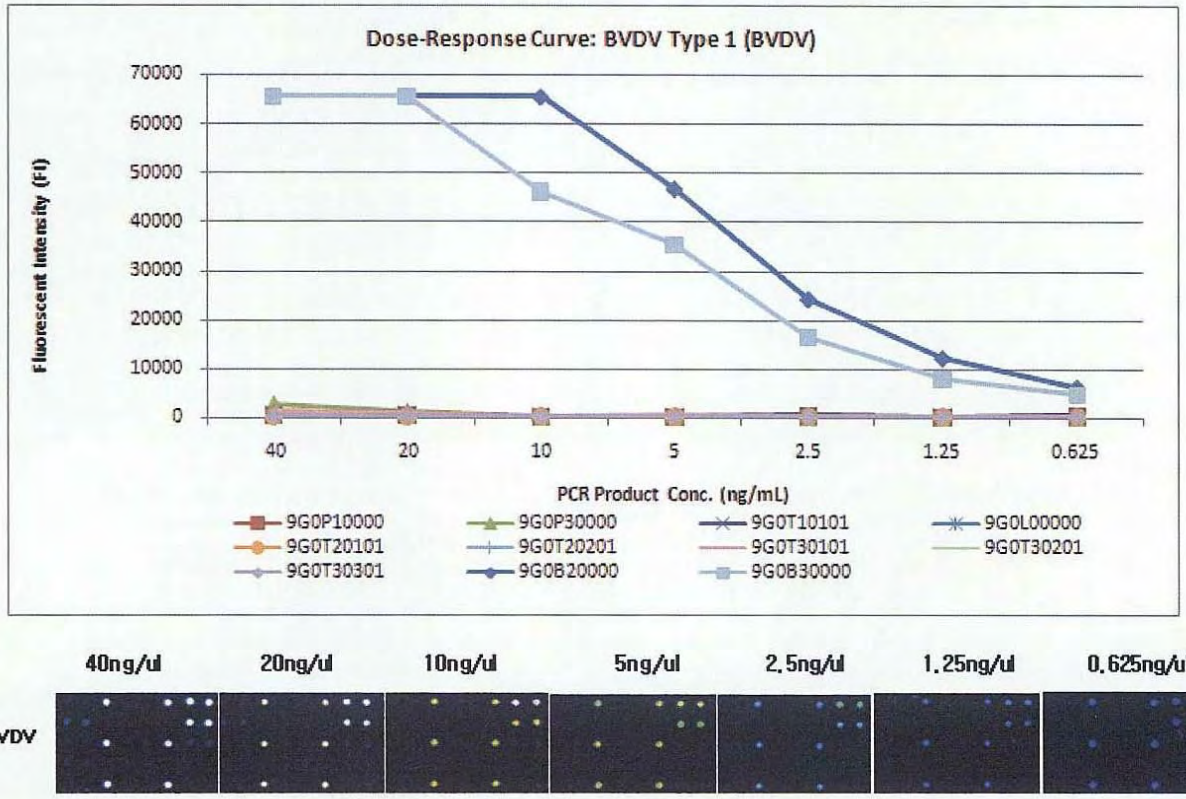


그림 20. CSFV 농도별 표준시료에서 각 Probe의 유전자칩 반응성 및 Dose-response curve

표 6. 표준시료 HC2002에 대한 각 Probe group 별 FI의 재현성 검사결과

Conc. (ng/mL)	Sample No.	Positive probe group		SNP probe group		Wild probe group			
		9G0P 10000	9G0P 30000	9G0T 10100	9G0L 00000	9G0T 20102	9G0T 20200	9G0T 30303	9G0T 30101
25ng/ul	1	65535	65535	65535	55186	17008	65535	1540	242
	2	65535	65535	65535	45168	16659	65535	1658	252
	3	65535	65535	65535	65448	19858	65535	1907	344
	4	65535	65535	65535	50580	18407	65535	1510	257
	5	65535	65535	65535	45558	20555	65535	1498	283
	6	65535	65535	65535	38888	19769	65535	1403	211
	7	65535	65535	65535	47342	13691	65535	1299	170
	8	65535	65535	65535	40779	18522	65535	1364	285
	9	65535	65535	65535	18600	8155	65535	906	155
	10	65535	65535	65535	22215	12996	65535	1412	113
	11	65535	65535	65535	31084	9898	65535	1687	236
	12	65535	65535	65535	25590	11491	65535	1915	192
	13	65535	65535	65535	40591	18619	65535	1128	224
	14	65535	65535	65535	29530	15022	65535	1335	219
	15	65535	65535	65535	27920	20377	65535	1075	128
	16	65535	65535	65535	39427	15007	65535	1285	98
	Mean	65535	65535	65535	38994	16002	65535	1432	213
	SD	0	0	0	12662	3872	0	277	68
	CV%	0	0	0	32	24	0	19	32
5ng/ul	17	65535	65535	65535	11203	4390	65535	575	119
	18	65535	65535	65535	10094	6948	65535	445	156
	19	65535	65535	65535	16464	7392	65535	420	207
	20	65535	65535	65535	7362	9670	65535	586	275
	21	65329	65535	65535	11244	8116	65535	435	122
	22	44869	63042	53190	5353	4536	58924	379	279
	23	65535	65535	65535	21119	7405	65535	514	220
	24	62865	65535	65535	9038	11018	65535	656	351
	25	60857	65535	65535	8497	7545	65535	633	98
	26	65535	65535	65535	12175	5449	65535	268	54
	27	65535	65535	65535	17103	4900	65535	594	159
	28	65522	65535	65535	10927	4753	65535	375	136
	29	65535	65327	65535	7832	8217	65535	493	139
	30	58073	65535	65535	11870	4815	61976	342	116
	31	65535	65535	65535	11954	5535	65535	354	233
	32	41113	63641	65535	10486	4666	65535	434	127
	Mean	61778	65248	64763	11420	6584	64899	469	174
	SD	7670	754	3086	3968	2016	1824	115	79
	CV%	12	1	5	35	31	3	24	45
1ng/ul	33	49428	47728	40756	2971	2651	38551	264	110
	34	23456	27903	35218	2812	2654	34431	178	151
	35	21670	33212	27525	5792	2221	22639	454	547
	36	13283	20737	15024	2319	4465	24237	269	251
	37	16049	24537	32689	3448	2574	28119	248	107
	38	14395	22859	27355	3572	2589	25565	299	198
	39	17045	22092	26613	3620	3324	25357	499	176
	40	13229	21473	30368	2332	2351	26633	247	232
	41	22781	31532	41199	3822	2318	25115	318	167
	42	26233	39769	46524	3952	2121	27427	163	97
	43	33687	43620	26125	8239	2364	25950	428	131
	44	23901	47007	55796	11420	3253	34692	395	115
	45	10641	22522	25909	2689	2087	21683	242	174
	46	17781	28222	37873	3777	2235	19820	303	235
	47	25130	37154	35989	2142	2793	24828	268	166
	48	9936	19490	13322	1682	1609	12447	163	170
	Mean	21165	30616	32393	4037	2600	26093	296	189
	SD	9916	9723	10891	2524	654	6157	101	106
	CV%	47	32	34	63	25	24	34	56

CV%: Percent of Coefficient variation

SD: Standard deviation, Value: Mean value of fluorescent density.

4) CSFV 및 BVDV DNA chip 시제품 유효성 평가

유전자 증폭을 위한 RT-PCR 시약과 유전자 칩 시제품을 제작하고 국립수의과학검역원 바이러스과에서 보유하고 있는 표준시료 및 야외시료를 이용하여 시제품의 유효성을 평가하였다. 유전자시료 추출은 야외주 바이러스의 유출 위험을 고려하여 국립수의과학검역원 바이러스과 실험실에서 Qiagen RNeasy Mini kit을 이용하여 실시하였다.

RT-PCR은 CSFV 5'NTR single RT-PCR과 CSFV/BVDV Multiplex RT-PCR 시제품을 사용하고 Biometra사 PCR machine에서 유전자를 증폭하였다. DNA chip 시제품 검사는 제노바이오텍 부설기술연구소 실험실에서 진행하였다. DNA chip은 Scan Array Express HT (Perkin-Elmer, USA)를 이용하여 판독한 후 Quantitation program (PerkinElmer)을 이용해 각 probe의 Fluorescent intensity (FI)를 분석 하였다.

가. 국립수의과학검역원 표준 및 야외시료 패널

표준시료는 국립수의과학검역원에서 보관하고 있는 발생농장에서 채취된 시료, 배양된 분리주를 포함하여 구축되었으며 1947-2005년까지 구축된 시료를 포함하고 있다.

표 7. 표준 및 야외시료 패널 내역

Virus	Year	5'NCR RT-PCR			
		Positive(+)	Suspect(±)	Negative(-)	Total
CSFV	1947	1	1		2
	1987	6			6
	1988	4	1	3	8
	1996			2	2
	1997	3	4	6	13
	1998	2		1	3
	1999	2		3	5
	2002	39	2	6	47
	2003	4	4	5	13
	2004	5	3	6	14
	2005	24	21	33	78
	NA	3	1	1	5
BVDV	NA			7	7
Total		93	37	73	203

*표준주, 분리주, 야외시료가 포함되어 있음

표 8. 표준시료의 분리 지역별 현황

Virus	시도	5'NCR RT-PCR			Total
		Positive	Suspect	Negative	
CSFV	강원	2			2
	경기	19	2	9	30
	경남		1		1
	경북	2	1	1	4
	서울	1	1		2
	울산		1	1	2
	인천	20	2	4	26
	전북	1	1	3	5
	제주	27	21	37	85
	충남	2	1	1	4
	충북	2	2	3	7
	Unknown	17	4	7	28
BVDV	Unknown			7	7
Total		93	37	73	203

나. 유전자칩용 CSFV/BVDV MP RT-PCR 시제품에서 시료검사 결과

표준 및 야외시료 196개를 검사한 결과 CSFV 5'NTR single RT-PCR 보다 CSFV/BVDV MP RT-PCR 시제품에서 의양성으로 판독된 37개의 시료에서 13개가 양성으로 확인되어 우수한 검출민감도를 보였다.

표 9. CSFV/BVDV Multiplex RT-PCR 시제품에서 표준시료의 유전자 검사 결과

5'NCR RT-PCR	No. Samples	Multiplex RT-PCR		
		Positive	Suspect	Negative
Positive	93	93		
Suspect	37	13	24	
Negative	66		21	45
Total	196	106	45	45

다. CSFV/BVDV 유전자칩 시제품에서 표준시료 패널의 검사

CSFV/BVDV MP RT-PCR 시제품으로 증폭된 유전자를 유전자칩 시제품으로 검사하고 FI값을 판독하고 RT-PCR 검사결과와 비교하였다. RT-PCR에서 양성 또는 음성으로 판정된 시료는 유전자 칩에서 동일한 결과를 나타내었다. 전기영동의 육안판독에서 의양성으로 판정된 시료 중 일부는 유전자칩 시제품에서 양성으로 판독이 가능하여 우수한 검출감도를 나타내었다.

표 10. 유전자칩 시제품에서 표준/야외시료 패널의 검사결과 (n=196)

5'NCR RT-PCR	No. Samples	CSFV/BVDV MP RT-PCR			DNA Chip Results	
		Positive	Suspect	Negative	Positive	Negative
Positive	93	93			93	
Suspect	37	13	24		13	24
Negative	66		21	45		66
Total	196	106	45	45	106	90

라. DNA Chip의 판정기준 설정

DNA chip에서 CSFV에 양성 및 음성판정은 Control (P1, P2 Probe)영역의 반응을 기준으로 판정하고 양성판정 시료는 SNP 영역에서 백신주/야외주를 감별하게 된다. 따라서 Control 영역의 양/음성 판정기준의 설정을 위하여 P1, P2 Probe의 표준시료에서 FI 값 분포와 TG-ROC 분석을 실시한 결과 FI값 5,000이상에서 특이도와 민감도가 99% 이상임을 확인 하였다.

또한 P1, P2 probe영역의 FI값 분포를 검사하면 양성시료는 90% 이상이 FI 20,000이상에 분포하고 있으며 음성시료는 100% FI 5,000미만에 분포하고 있음을 확인하여 판정기준은 다음과 같이 설정할 수 있었다.

판정기준 (Cut-off): Control probe 기준

양성(Positive) FI 5,000 이상

음성(Negative) FI 5,000 미만

표 11. Control P1 영역에서 FI값의 TG-ROC 분석

FI Range	No. Samples	5'NCR RT-PCR			Sensitivity (%)	Specificity (%)
		P	D	N		
0-1000	52		7	45	100.0	68.2
1000-2000	17	1*	4	12	98.9	86.4
2000-3000	13		6	7	98.9	97.0
3000-4000	10		8	2	98.9	100.0
4000-5000	2	1*	1		97.8	100.0
5000-6000	4		4		97.8	100.0
6000-7000	1	1			96.8	100.0
7000-8000	2		2		96.8	100.0
9000-10000	2	1	1		95.7	100.0
11000-12000	1		1		95.7	100.0
12000-13000	1		1		95.7	100.0
13000-14000	1		1		95.7	100.0
14000-15000	1	1			94.6	100.0
16000-17000	1	1			93.5	100.0
20000-21000	3	3			90.3	100.0
21000-22000	2	1	1		89.2	100.0
23000-24000	2	2			87.1	100.0
25000-26000	1	1			86.0	100.0
26000-27000	1	1			84.9	100.0
28000-29000	2	2			82.8	100.0
>30000	77	77			82.8	100.0
Total	196	93	37	66		

*Positive reaction on P2 Probe

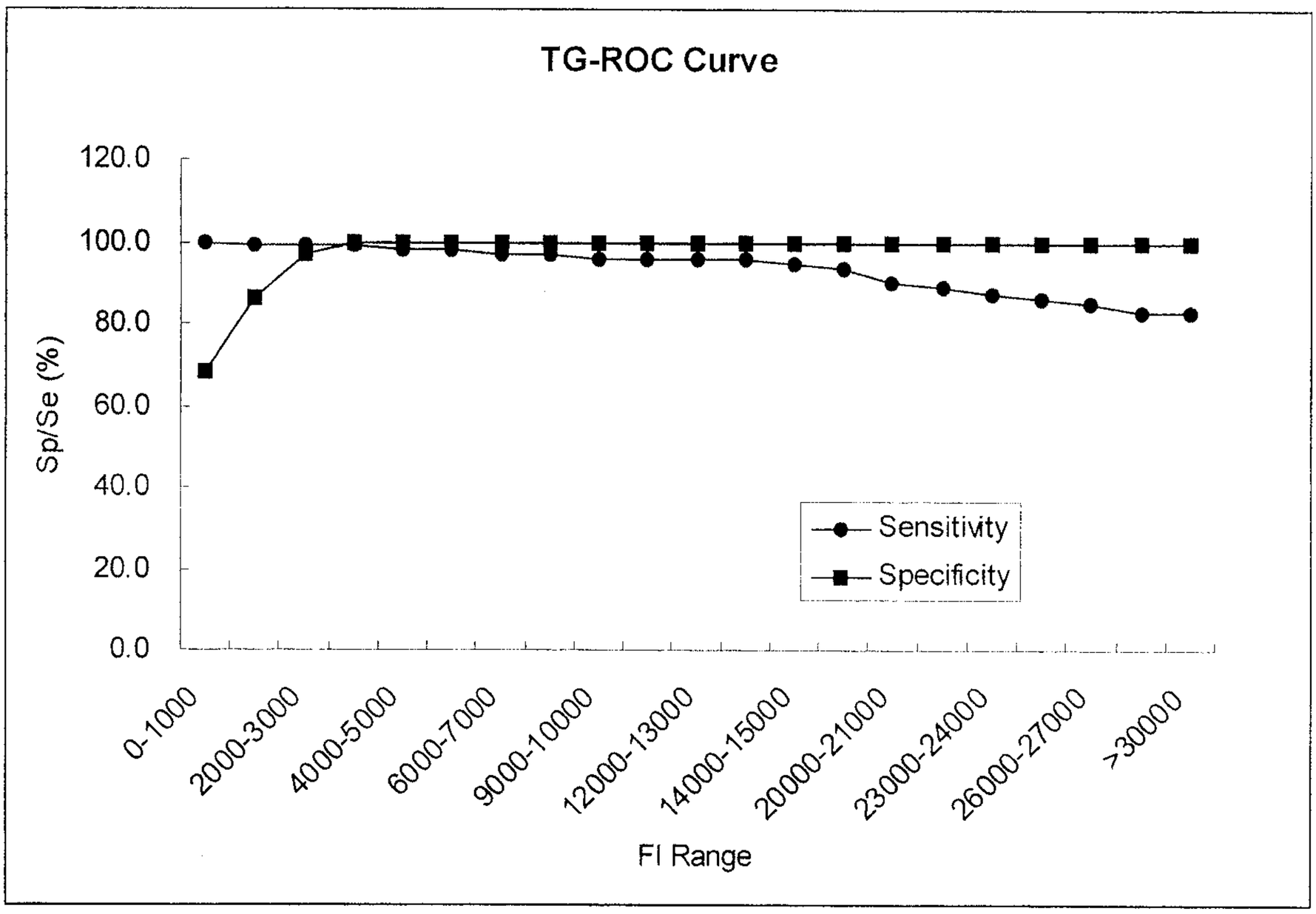


그림 21. Control P1의 TG-ROC curve

표 12. Control P2 영역에서 FI값의 TG-ROC 분석

FI Range	No. Samples	5'NCR RT-PCR			Sensitivity (%)	Specificity (%)
		P	D	N		
0-1000	73		10	63	100.0	95.5
1000-2000	6	1*	3	2	98.9	98.5
2000-3000	12	1*	10	1	97.8	100.0
3000-4000	3	1*	2		96.8	100.0
4000-5000	2	1*	1		95.7	100.0
5000-6000	2	1	1		94.6	100.0
6000-7000	1		1		94.6	100.0
7000-8000	1		1		94.6	100.0
9000-10000	3	1	2		93.5	100.0
10000-11000	2		2		93.5	100.0
12000-13000	2		2		93.5	100.0
13000-14000	1	1			92.5	100.0
14000-15000	1		1		92.5	100.0
17000-18000	1	1			91.4	100.0
20000-21000	1	1			90.3	100.0
21000-22000	1	1			89.2	100.0
24000-25000	1	1			88.2	100.0
27000-28000	1	1			87.1	100.0
28000-29000	2	1	1		86.0	100.0
>30000	80	80			86.0	100.0
Total	196	93	37	66		

*Positive reaction on P1 Probe

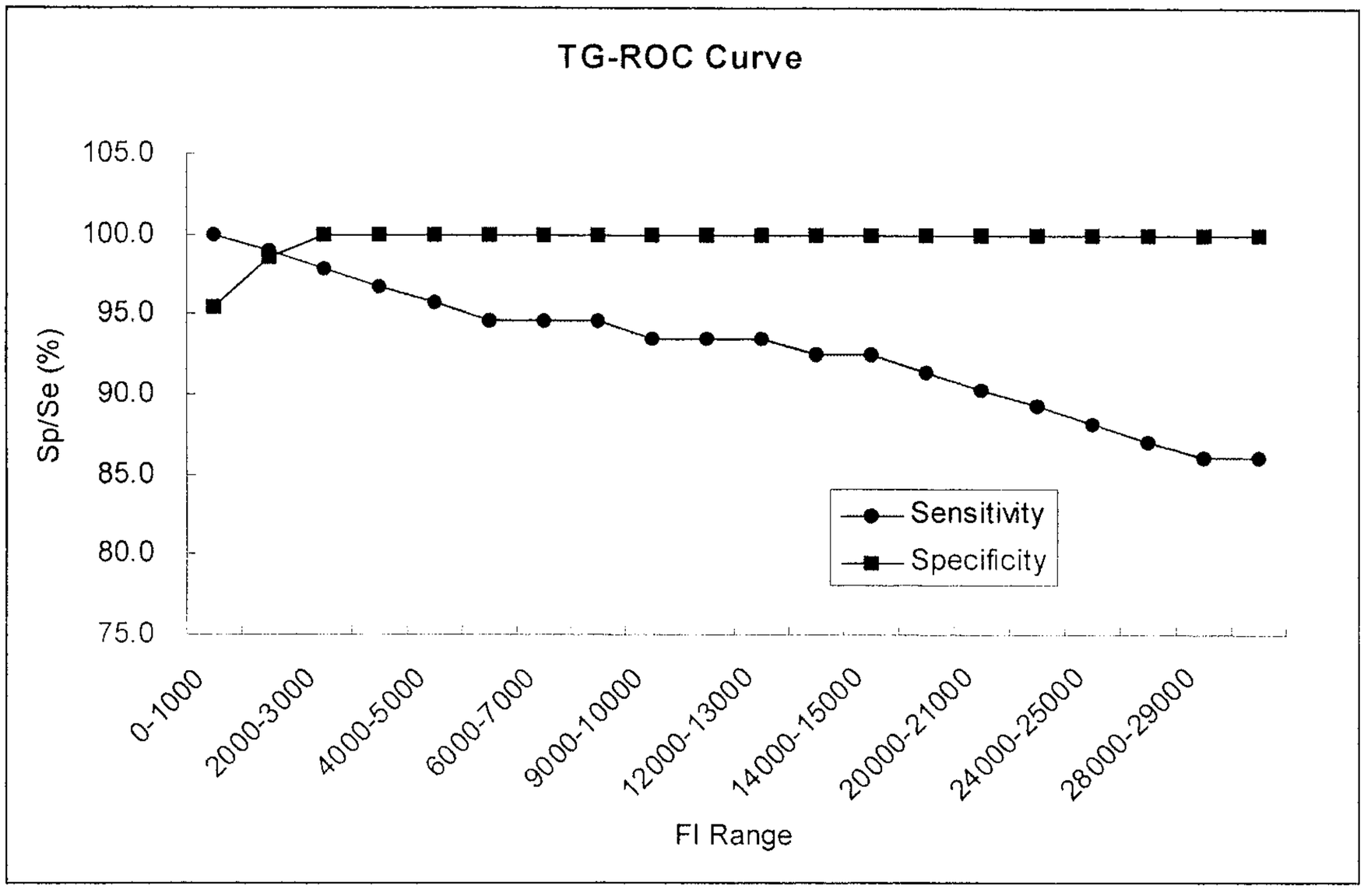


그림 22. Control P2의 TG-ROC curve

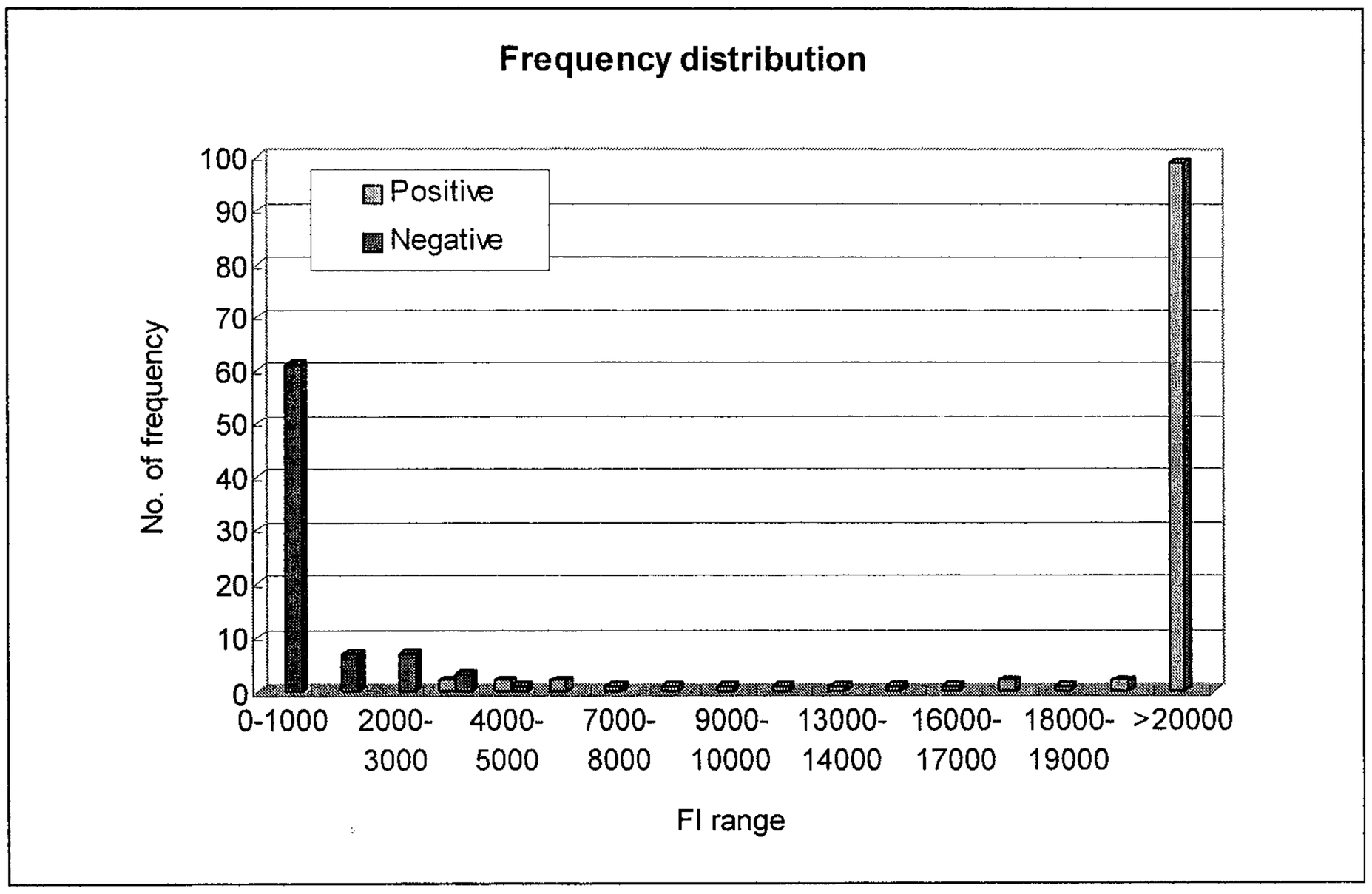


그림 23. 표준 및 야외시표패널의 Control P1의 FI값의 Frequency ditribution

○ 야외 음성시료에서 유전자 칩 판정기준 평가

국내 도축장에서 돼지의 전혈 및 백혈구 시료를 채취하여 구축한 음성시료를 사용하여 CSFV/BVDV MP RT-PCR 시제품으로 유전자를 증폭하고 유전자 칩 시제품으로 검사하였다. Control Probe영역에서 평균 FI값이 각각 335 ~ 1,597로 배경형광과 유사한 수준을 나타내었다. Control probe의 평균 FI값으로 판정값을 추정(Mean FI + 5SD)한 결과 4,725로 TG-ROC 분석에서 결정한 FI 판정기준과 동일하였다.

표 13. 음성시료 (도축돈 전혈, 백혈구 시료, n=22)에서 유전자칩의 FI값 분석

Data	**P1 Probe**	**P2 Probe**
No. of Samples	22	22
Mean	1597.2	335.1
SD	625.6	149.4
Max	2584.5	752.0
Min	524.0	113.5
Mean+3SD	3474.1	783.2
Mean+5SD	**4725.4**	**1082.0**

마. CSFV 표준시료에서 DNA Chip을 이용한 바이러스 감별검사 결과

○ 유전자칩에서 BVDV, CSFV 야외주 및 백신주의 감별(SNP)검사 결과

본 연구과제에서 SNP검사의 유효성을 평가하는 중요한 부분으로 CSFV의 야외주/백신주의 유전자를 감별하기 위한 SNP 감별검사를 실시하였다. 감별검사는 유전자 칩의 SNP 영역의 2개의 Probe에 반응여부와 FI값을 비교하여 판정하였다. 검사 결과 CSFV 양성 sample 전체에 대해 야외주와 백신주가 정확하게 감별되어 SNP검사가 가능함을 확인하였다.

검사결과를 연도별로 분석한 결과 2004년도 이전 시료에서는 주로 야외주가 검출되었으며 2005년도 시료에서는 모든 시료가 백신주 바이러스로 판독되었다. 이는 검역원의 유전자 염기서열 검사결과와 완전히 일치하였다.

또한 양성시료 중 일부는 국내에서 주로 유행한 CSFV 염기서열과 다를 것으로 추측되는 시료가 유전자칩의 반응패턴 분석에서 확인되었는데 이들 시료를 검역원에서 정밀검사 한 결과 이들 시료는 2종의 대조 Probe 영역에 1-2개의 염기 변이가 있음을 확인하였다.

유전자 칩의 SNP 감별검사 유효성을 평가한 결과 기존의 제한효소처리나 유전자 염기

서열 분석 없이 야외시료에서 증폭된 유전자를 사용하여 직접 야외주/백신주를 감별검사 할 수 있는 것으로 판단되었다.

표 14. CSFV 양성 표준시료에서 야외주 및 백신주의 감별검사 결과 (n=117)

연도	시료수	야외주	백신주(LOM)
1947	2	2	
1987	6	6	
1988	4	2	2
1997	7	7	
1998	2	2	
1999	2	1	1
2002	40	40	
2003	8	8	
2004	8	5	3
2005	34	0	34
NA	4	2	2
Total	117	75	42

*NA: 연도 미기록 시료

○ **DNA Chip 시제품에서 BVDV 검사결과**

BVDV 표준시료 7개는 유전자 칩의 BVDV Probe영역에서 100% 양성으로 판정되어 효과적으로 검출되었다. CSFV 시료패널 중 BVDV가 검출되거나 혼합되어 검출되는 시료도 확인되었으며 혼합감염의 경우에도 CSFV/BVDV 유전자칩을 사용하여 감별검사가 가능함을 확인하였다. CSFV와 BVDV 혼합감염이 확인된 시료는 국립수의과학검역원의 기록을 확인한 결과 바이러스 분리에 사용된 표준시료로 야외감염이 아닌 배양 중 BVDV에 오염된 것으로 추정되었다.

BVDV의 혈청형별(Type 1, 2) Probe에는 구분되어 반응하였으나 검역원 표준시료 6개에서는 BVDV Type 1과 2가 혼합되어 검출되었으며 1개의 시료에서 BVDV Type 2가 확인되었다. 그러나 감별검사의 정확성은 BVDV 표준주의 추가 분리 및 도입 후 추가적인 검사가 필요한 것으로 판단되었다.

표. 15. CSFV/BVDV 유전자칩 시제품에서 BVDV 검사결과

Samples	No. of samples	DNA Chip result				
		Negative	Positive			
			CSFV+ BVDV1,2	BVDV1	BVDV2	BVDV1+2
CSFV 표준시료	196	176	19	1	0	
BVDV 표준시료	7	0	0		1	6
Total	203	176	19	1	1	6

*CSFV 시료 중 BVDV가 검출된 시료는 바이러스 실험실 배양시료로 확인됨

5) CSFV/BVDV Genotyping 유전자칩의 개발 및 완성 (2년차)

가. 유전자 칩 설계 최적화

유전자 칩 사용방법과 스펙을 최적화하기 위하여 다음과 같은 시험을 진행 하였다.

유전자 칩의 사용편의성을 위해 Slide well을 재설계하여 기존 6-well에서 multipipette를 사용 할 수 있도록 4-well로 설계 하고 유효성을 확인하였다.

높은 검사 재현성 확보를 위해 DNA Chip용 검사도구로 hybridization 및 wash를 동일 챔버에서 작업할 수 있는 검사 도구를 설계, 제작하였다.

나. CSFV/BVDV 유전형감별(Genotyping) DNA Chip 시제품제작 및 유효성평가

CSFV/BVDV의 유전형 감별 검사용(Genotyping) 유전자칩을 완성하고 검역원에서 보유한 표준시료 패널을 이용해 그 유효성을 시험하였다.

CSFV 및 BVDV 는 그림 24의 phylogenetic tree와 같이 CSFV경우 크게 3가지 유형, BVDV경우는 크게 2가지 유형으로 나누어진다. 본 과제에서는 기본 표준주 및 분리주(아래 그림 중 음영표시)를 이용하여 각 Genotype에 대해 시험을 진행하였다.

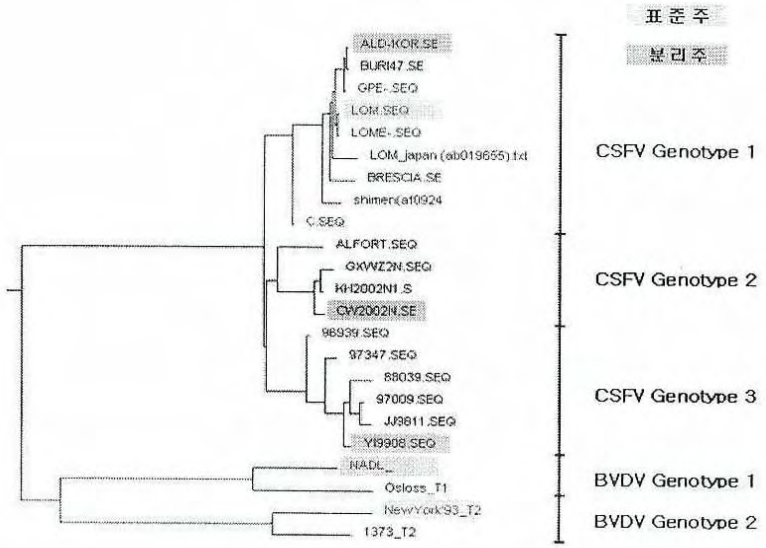


그림 24. CSFV 유전자 프로브 설계를 위한 Phyogenetic tree

(1) CSFV/BVDV DNA Chip map 설정

○ 돼지콜레라 및 소설사증 virus 검출 및 유전형 검출용 DNAChip Map

CSFV/BVDV Genotyping DNA Chip 시제품의 Probe map은 그림 25와 같이 설계하였다.

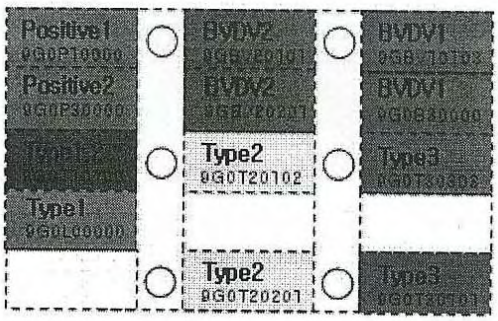


그림 25. CSFV/BVDV genotyping DNA Chip 프로브 위치지도 (Map)

좌측 상단의 Postive 1,2는 Control Probe 영역으로 CSFV 양음성을 판정하는 영역으로 CSFV 5'NTR 영역 중 염기서열이 가장 유사하며, 과거의 표준주 및 분리주로부터 가장 변이가 적은 부분을 targeting 하였다. 또한 Type1,2,3 영역은 CSFV의 유전형을 구분하는 영역이며, 우측 상단과 중앙 상단의 BVDV1,2는 BVDV1과 BVDV2의 양성 유무를 판단하는 영역으로 설계하였다.

○ CSFV 및 BVDV 유전형검출 DNAChip probe의 선발

수십종의 유전자 프로브를 위의 Probe 선발기준에 따라 검사하고 표 16과 같이 유전자 프로브를 확정하였다.

표 16. CSFV Genotyping DNA Chip의 유전자 프로브 염기서열

Probe name	sequence	Tm
9G0P10000	5'-GGG GGG GGG AAA CAG GAC TTA GAC CAC CCA GGG	63
9G0P30000	5'-GGG GGG GGG AAA CAG CAC CCT ATC AGG TCG TAC	61
9G0L00000	5'-GGG GGG GGG TTT AC ATA GCA TAT CGA GGT GGG	55
9G0T10100	5'-GGG GGG GGG TTT AC ATA GCA TCT CGA GGT GGG	57
9G0T20102	5'-GGG GGG GGG AAA ATA CTA GCC TGC TAG TGG GCC	61
9G0T20201	5'-GGG GGG GGG AAA ATA CTA GCC TGT TAG TGG GCC	59
9G0T30101	5'-GGG GGG GGG AAA ATC TCG AGA TGA GCT GCT GC	57
9G0T30303	5'-GGG GGG GGG AAA CCC ATC ACG CAG TGT GAT TTC AC	65
9GBV10103	5'-GGG GGG GGG AAA AT CCA ACG AAC TCA CCA CTG TTG	63
9G0B30000	5'-GGG GGG GGG AAA CCA CTG ACG ACT ACC CTG TAC	65
9GBV20101	5`-GGG GGG GGG AAA TAC TCA GGG GTT CGG CCA TCC	63
9GBV20201	5`-GGG GGG GGG AAA TAC TCA GGG ATT AGG CCA TCC	59
9G0HC0000	5`- GGG GGG GGG AAA CCT ACT RTG GGC ATG GCT AG	57/59

(2) CSFV/BVDV Chip에 대한 각 virus별 type에 대한 DNA Chip 유효성 평가

○ Genotyping의 실험실 유효성 평가

설계된 DNA Chip을 이용하여 각 genotype별 바이러스 표준시료를 사용하여 유전자를 증폭하고 정량한 후 희석하여 표준희석시료를 구성하였다. 이들 시료를 유전자칩에서 검사한 결과 그림 26와 같이 매우 우수한 반응성을 확인하였다. 모든 genotype에 대해 유전자 Probe가 정확하게 반응하고 있음을 확인하였다. 전기영동 후 육안검사가 가능한 최소농도인 1ng/ul에서 유전자 칩으로 모두 검출 가능함을 확인 하였다.

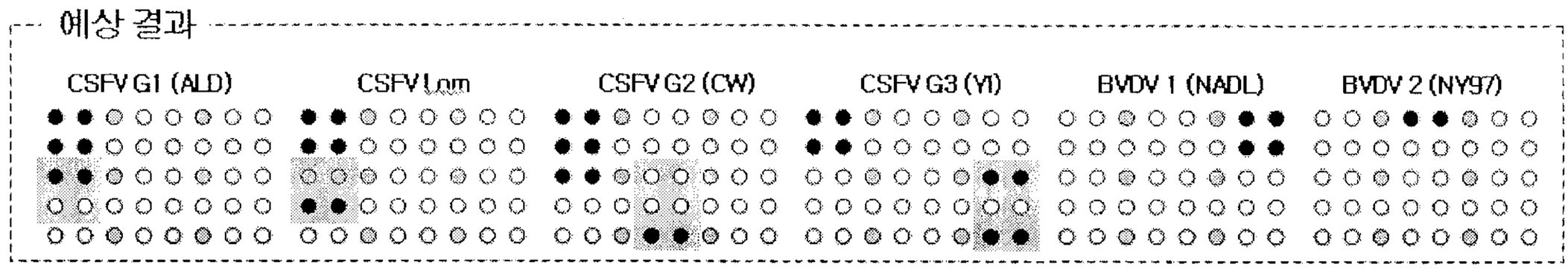


그림 26. CSFV/BVDV Genotyping DNA chip 시제품의 표준희석시료 반응성

○ CSFV/BVDV Genotyping DNA Chip의 표준시료를 이용한 유효성 평가

국립수의과학검역원에서 보유하고 있는 표준주, 분리주 및 야외시료 203개 시료를 사용하여 유효성평가를 실시한 결과 표 17에서와 같이 돼지콜레라 바이러스 양성 117개 시료가 확인되었다. 양성시료의 CSFV genotype을 검사한 결과 표 17와 같이 염기서열 분석 결과와 100% 일치함을 확인하였다.

Genotyping 결과는, 양성 117개 시료 중 CSFV Genotype 1형이 57개 시료에서 검출되었으며 그 중 백신주인 LOM주가 42종임을 확인하였다. 또한 CSFV Genotype 2형은 53개 시료에서 검출 되었으며, CSFV Genotype 3형은 7개 시료에서 검출되었다. 유전자 서열 분석 결과와 비교한 결과 100% 일치하여 우수한 결과를 나타내었다. 뿐만 아니라 CSFV Genotype 1형 과 Genotype 2형 일부 시료에서는 비전형적인 반응결과를 나타내는 바이러스주가 검출되었으며, 유전자 염기서열 분석결과 single mutation 된 virus주임을 확인하였다. 이는 본 연구에서 개발된 DNA chip이 SNP의 검사가 가능하기 때문에 나타나는 현상으로 바이러스의 유전자를 정밀하게 검사하고 확인할 수 있음이 확인 되어 돼지콜레라 발생 시 발생농장에 대한 분자유전학적 동등성검사와 바이러스 전파경로 추적에 사용될 수 있음이 확인되었다.

표 17. CSFV Genotyping DNA Chip의 유효성평가 결과 (검역원 시료)

Genotype	NVRQS (Sequencing)	CSFV/BVDV DNA Chip		Sensitivity (%)
		Subgroup	No. of Positive	
Genotype 1	57	G1	14	100
		G1-	1	
		LOM	42	
		Sub-total	**57**	
Genotype 2	53	G2	44	100
		G2-	9	
		Sub-total	**53**	
Genotype 3	7	**G3**	**7**	100
Total	117		117	100

*검역원의 염기서열 분석결과와의 일치율: 100%

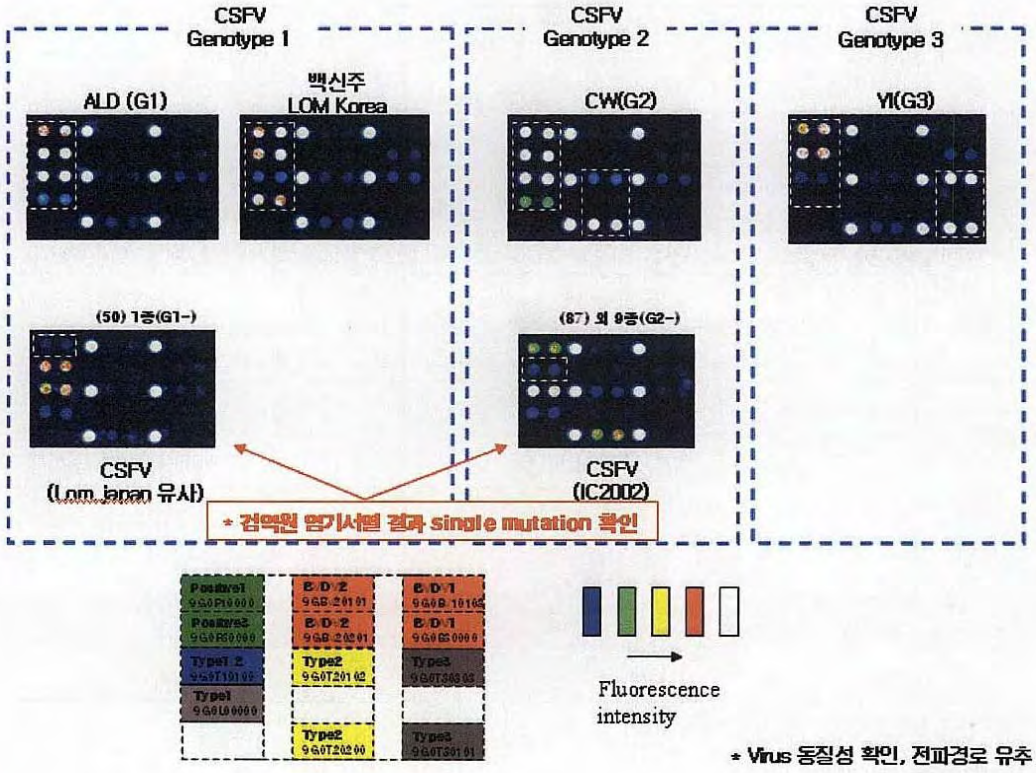


그림 27. CSFV 표준주, 분리주 및 야외시료에서 Genotyping DNA Chip의 반응결과

검사에 사용한 시료의 발생, 분리연도 및 지역별 CSFV 유전형 검사결과를 분석한 결과는 표 18와 같았다.

표 18. CSFV Genotyping DNA Chip에서 분리지역, 연도별 유전형 검사결과

시료패널 내역			Genotype in DNA Chip				
			Genotype 1		Genotype 2		Genotype 3
연도	분리지역	시료수	LOM	G1	G2	G2-	G3
1947	서울	2		2			
1997	경기	2					2
	전북	2					2
1998	충남	1					1
2002	강원	2			2		
	경기	17			17		
	인천	21			12	9	
2003	경기	1			1		
	경남	1			1		
	경북	3			3		
	울산	1			1		
	충남	2			2		
2004. 5	경기	1			1		
	충북	4			4		
2004. 11	제주	3	3				
2005	제주	34	34				
Total		97	37	2	44	9	5

2. PMWS 관련 바이러스 유전자 검출용 유전자칩 개발

1) PMWS 관련 바이러스 유전자 probe, primer설계 및 유전자 증폭시약 개발

가. PMWS 관련 바이러스 유전자 검사용 Probe 설계

PMWS 유전자 칩에 사용될 관련 바이러스에 대한 국립수의과학검역원의 유전자 염기서열과 NCBI에 보고된 유전자 염기서열을 분석하고 PRRSV, PCV2, PPV의 유전자 칩용 프로브를 설계한 뒤 유전자 칩에서 유효성을 확인하였다.

또한 유전자 칩의 프로브 설계에 따라 PMWS 관련 바이러스 유전자 증폭을 위한 Primer를 설계하고 유효성을 평가하여 이들 DNA, RNA를 동시에 증폭할 수 있는 PCR 시약 개발에 사용하였다.

(1) PRRSV 유전자 검사용 Probe 설계

PRRSV는 미국주와 유럽주로 분류되는데, 본 과제에서는 PRRSV 유전자의 양, 음성 검사와 더불어 미국주, 유럽주를 동시에 감별검사 할 수 있도록 Probe를 설계하였다. 본 과제에 사용한 표준주 및 분리주는 아래 그림 28과 같이 phylogenetic tree에 표시 하였다. (음영표시)

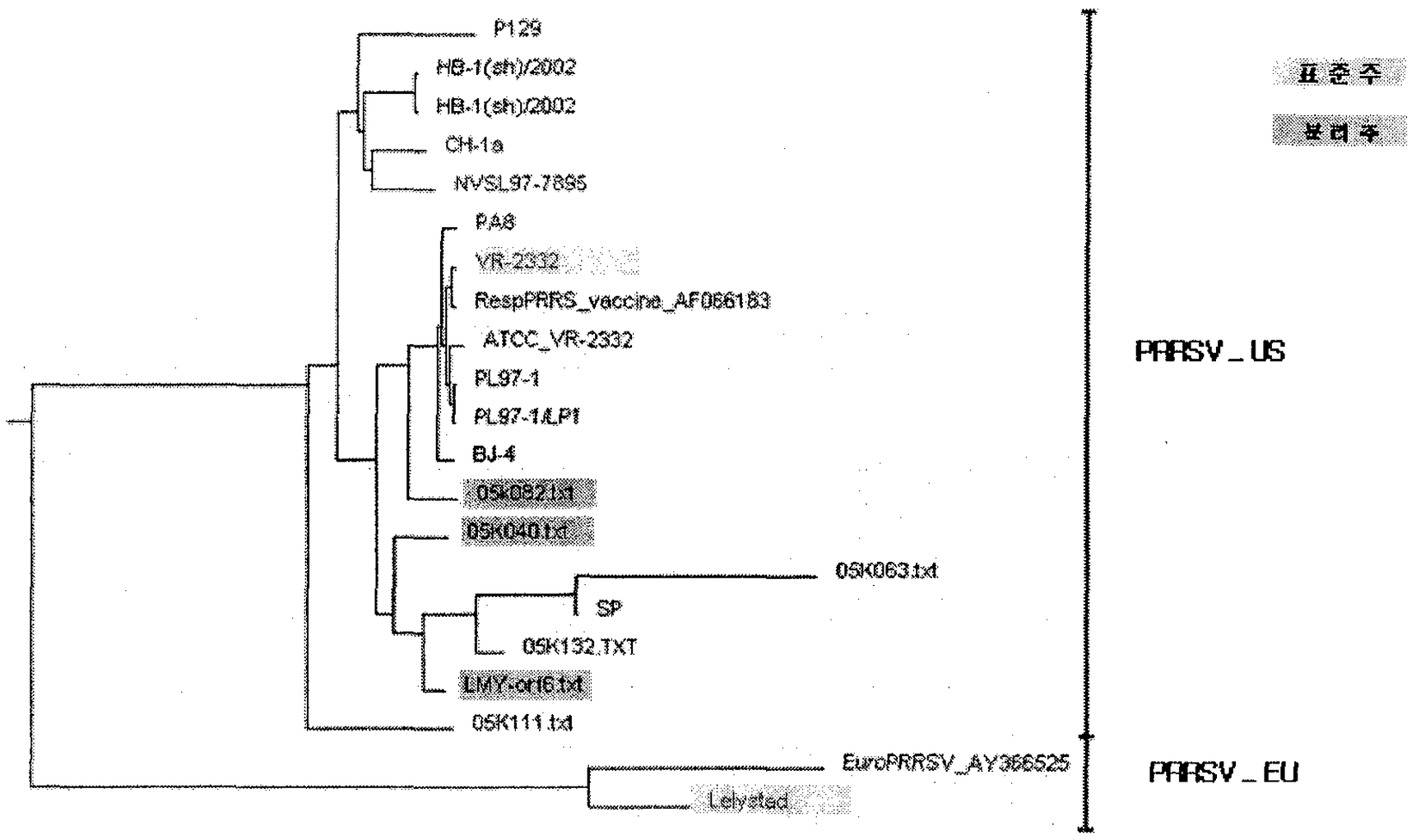


그림 28. 유전자칩 Probe 설계를 위한 PRRSV의 ORF6-7 유전자 Phylogenetic tree.

PRRSV에 대한 국립수의과학검역원의 유전자 염기서열 자료와 NCBI에 보고된 유전자

염기서열을 분석하고 유전자칩에 사용할 probe를 아래와 같이 설계하였다.

표 19. PRRSV 검사에 사용한 Probe의 설계

Probe group	Name of Probe	Location of probe	Tm
US	9GPRUS011	Orf7 22mer	61
	9GPRUS021	Orf7 19mer	57
	9GPRUS031	Orf7 22mer	59
	9GPRUS041	Orf7 21mer	61
	9GPRUS051	Orf7 25mer	61
	9GPRUS052	Orf7 25mer	61
	9GPRUS061	Orf7 21mer	63
	9GPRUS062	Orf7 21mer	63
	9GPRUS063	Orf7 21mer	63
	9GPRUS012	Orf7 24mer	69
	9GPRUS022	Orf7 23mer	69
	9GPRCO011	Orf7 20mer	61
EU	9GPREU011	Orf7 21mer	61
	9GPREU012	Orf7 22mer	61
	9GPREU013	Orf7 20mer	57
	9GPREU014	Orf7 22mer	63
	9GPREU015	Orf7 21mer	65
	9GPREU016	Orf7 21mer	61
	9GPREU017	Orf7 21mer	61
	9GPREU018	Orf7 20mer	61
	9GPREU021	Orf7 24mer	72
	9GPREU022	Orf7 24mer	69
	9GPREU023	Orf7 23mer	70
	9GPREU019	Orf7 23mer	65

(2) PCV2 유전자 검사용 Probe 설계

PCV2는 ORF2를 기준으로 국립수의과학검역원에서 분석한 Phylogenetic tree를 기준으로 하였다. 그러나 현재까지 정확한 유전형의 분류체계는 보고되어 있지 않다. PCV2의 ORF2 유전자는 크게 두개의 유전자 유형을 가지며 그중 Group 2는 유전자 상동성에 따라 다시 두개의 유전자형으로 분류할 수 있어 3가지의 유전자형으로 분류하였다. 본 과제에서는 PCV2 양음성 판정만을 목적으로 계획하였으나, 국내 분리된 바이러스를 중심으로 파악된 유전형의 검사에 사용할 수 있도록 유전자정보를 포함하였다. 본 과제에 사용한 표준주 및 분리주는 그림 29의 phylogenetic tree에 표시 하였다.(음영)

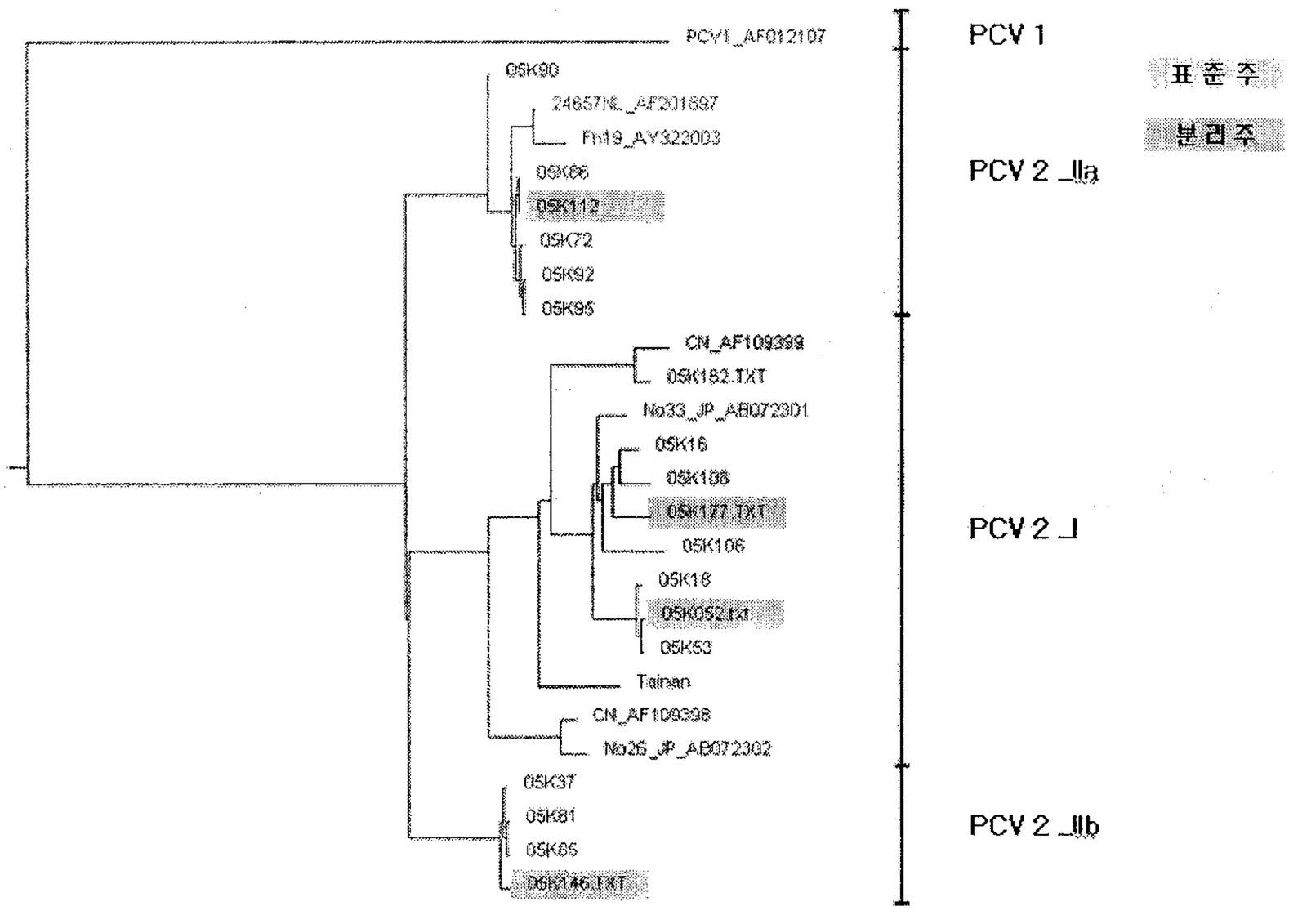


그림 29. 유전자 칩용 Probe 설계를 위한 PCV2의 ORF2 유전자 Phylogenetic tree.

PCV2에 대한 검역원의 유전자 염기서열과 NCBI에 보고된 유전자 염기서열을 분석하고 유전자칩에 사용될 다수의 probe를 표 20과 같이 설계하였다.

표 20. PCV2 Genotyping Probe의 설계

Probe group	Name of Probe	Location of probe	Tm
PCV2 I	9GPC20101	ORF2 21mer	57
	9GPC20102	ORF2 23mer	61
	9GPC20103	ORF2 20mer	61
	9GPC20104	ORF2 21mer	65
	9GPC20105	ORF2 24mer	69
	9GPC2FT11	ORF2 23mer	66
	9GPC2FT12	ORF2 23mer	66
PCV2 II	9GPC20201	ORF2 22mer	59
	9GPC20202	ORF2 23mer	63
	9GPC20203	ORF2 24mer	67
	9GPC202a1	ORF2 21mer	64
	9GPC202a2	ORF2 21mer	68
	9GPC202b1	ORF2 21mer	59
	9GPC202b2	ORF2 26mer	71
	9GPC202b3	ORF2 24mer	65
	9GPC202a3	ORF2 24mer	71
	9GPC202b4	ORF2 26mer	73
	9GPC2FT21	ORF2 23mer	66
	9GPC2FT22	ORF2 23mer	66
PCV2 II-2	9GPC20301	ORF2 23mer	61
	9GPC20302	ORF2 22mer	63
	9GPC20303	ORF2 21mer	63
	9GPC20304	ORF2 20mer	59
	9GPC20305	ORF2 26mer	73
	9GPC2FT31	ORF2 23mer	66
	9GPC2FT32	ORF2 23mer	62
PCV2 Common	9GPC2CO01	ORF2 22mer	69
	9GPC2CO02	ORF2 22mer	69
	9GPC2CO03	ORF2 21mer	63
	9GPC2CO04	ORF2 23mer	65
	9GPC2CO05	ORF2 23mer	65
	9GPC2CO06	ORF2 22mer	65
	9GPC2CO02-	ORF2 23mer	69
	9GPC2CO04-	ORF2 26mer	71

(3) PPV 유전자 검사용 Probe 설계

PPV는 VP2 유전자를 기준으로 바이러스의 양음성 검사를 목적으로 계획하였다. PPV의 경우 백신주나 야외주의 염기서열 동등성이 매우 높으며 외국의 분리주의 경우에도 동일하게 보고하고 있어 유전형이나 기타 유전자 감별검사는 불필요한 것으로 판단하였다.

국립수의과학검역원의 유전자 염기서열과 NCBI에 보고된 유전자 염기서열을 분석하고 다수의 probe를 표 21와 같이 설계하였다.

표 21. PPV 유전자 Probe의 설계

Probe group	Name of Probe	Location of probe	Tm
Common	9GPPV0101	VP2 23mer	63
	9GPPV0102	VP2 23mer	61
	9GPPV0103	VP2 23mer	61
	9GPPV0104	VP2 22mer	57
	9GPPV0105	VP2 22mer	61
	9GPPV0101-	VP2 26mer	69
	9GPPV0103-	VP2 26mer	67

나. PMWS 유전자칩용 Multiplex PCR 시약의 개발

PMWS관련 3종 바이러스 (PRRSV, PCV2, PPV) 유전자를 동시에 증폭하여 유전자 칩에서 검사가 가능하도록 하기 위하여 MP RT-PCR을 설계하였다. 각 바이러스별 크기가 다른 PCR 결과물을 얻기 위해 다양한 primer를 설계하고 이를 유전자 칩에 적용하여 가장 효과적인 Primer를 선발하였고, 동시에 증폭할 수 있는 Multiplex PCR을 최적화하여 유전자 증폭 시약을 개발하였다.

(1) PRRSV 유전자 검사용 Primer 설계

PRRSV는 ORF7 유전자를 중심으로 표 22과 같이 Primer를 설계하고 유효성을 검사하였다. Primer의 유효성을 평가한 결과 그림 30와 같이 PR F1과 R1의 Primer에서 미국주 및 유럽주 표준시료에서 특이적이고 양호한 증폭산물을 확인할 수 있었다.

표 22. PRRSV ORF6-7의 검사용 Primer

Primer	Base pair (bp)	Nucleotide Position	remark
*PR F1	17	14703-14719	Cy3-label
PR R1	21	15344-15364	662bp
PR R2	20	15216-15235	533bp
PR R3	21	15098-15118	416bp(US)
PR R4	20	14829-14848	436bp(EU)
PR R5	19	14932-14950	249bp
PR R6	19	14935-14953	252bp
PR R7	20	14889-14908	207bp(US)

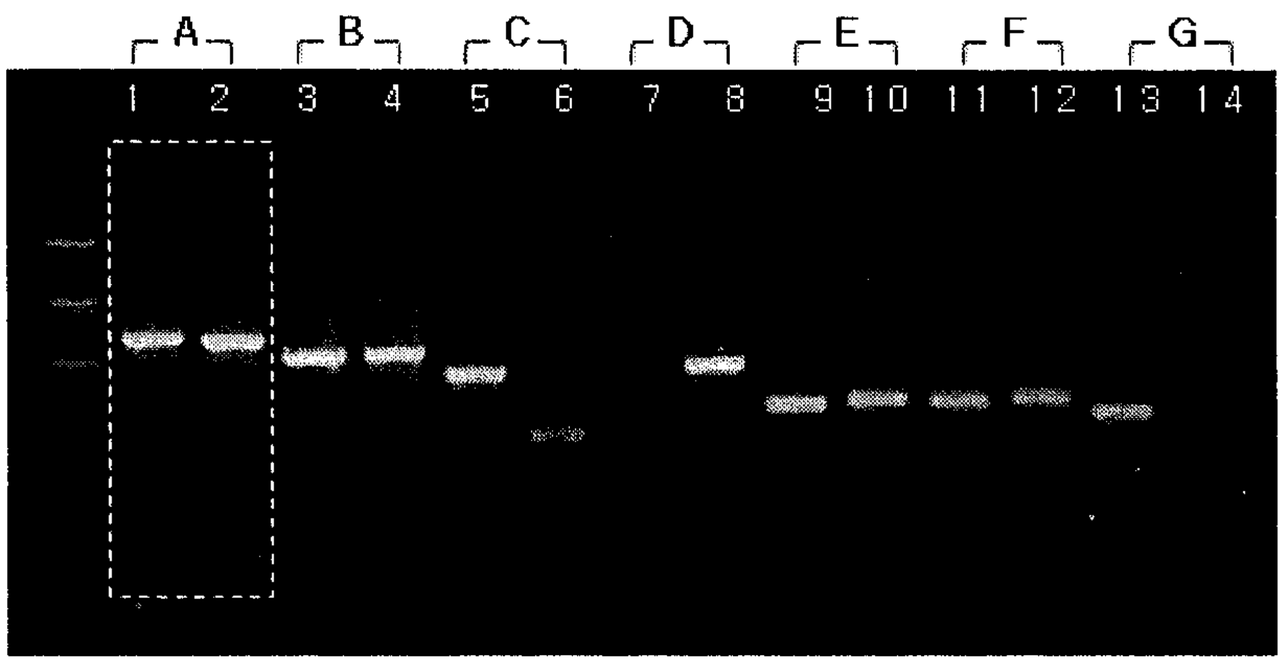


그림 30. Primer를 사용한 PRRSV RT-PCR 검사 결과

Primer pair. A: PR F1-R1, B: PR F1-R2, C: PR F1-R3, D: PR F1-R4,
E: PR F1-R5, F: PR F1-R6, G: PR F1-R7
Lane 1,3,5,7,9,11,13 : PRRSV VR2332 RNA
Lane 2,4,6,8,10,12,14 : PRRSV Lelystad RNA

(2) PCV2, PPV 유전자 검사용 Primer 설계

PCV2는 ORF2, PPV는 VP2 유전자 증폭을 위한 Primer를 표23와 같이 설계하고 유효성을 평가하였다. Primer의 유효성을 평가한 결과 그림 31과 같이 PCV2는 PC F1, R1에서 PPV는 PP F1, R1에서 가장 효과적인 증폭을 확인하였다.

표 23. PCV2 및 PPV의 유전자 증폭용 Primer 설계

Primer	Base pair (bp)	Nucleotide position	remark
*PC F1	19	1076-1094	Cy3-label
PC R1	19	1566-1584	493bp
PC R2	22	1289-1310	219bp
PC R3	21	1408-1428	337bp
PC R4	24	1744-1767	676bp
PC R5	21	1743-1763	672bp
*PP F1	24	3475-3498	Cy3-label
PP R1	21	3784-3804	330bp
PP R2	21	3908-3928	454bp
PP R3	21	4323-4343	560bp

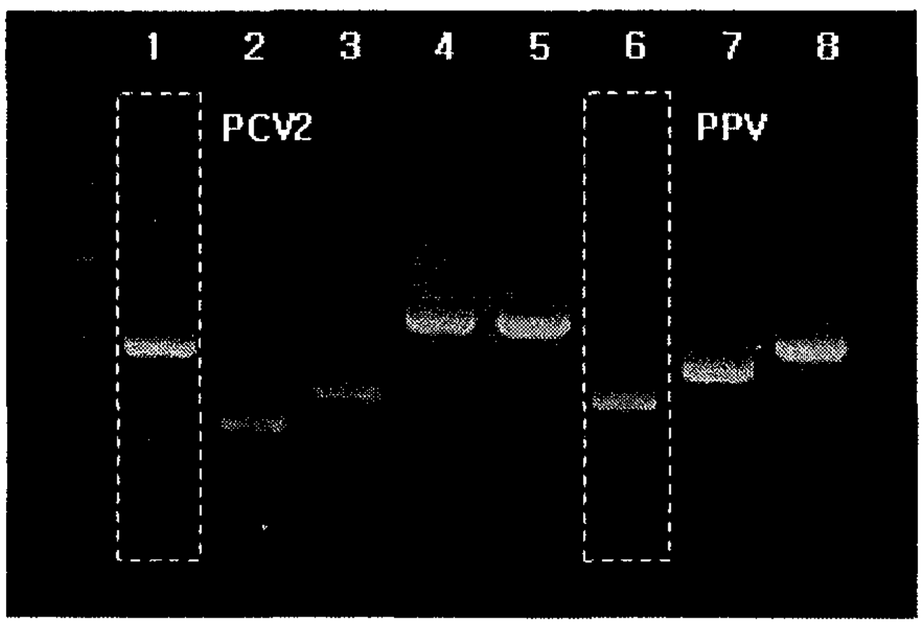


그림 31. PCV2, PPV Primer를 사용한 PCR 검사 결과

Primer pair 1: PC F1-R1, 2: PC F1-R2, 3: PC F1-R3, 4: PC F1-R4, 5: PC F1-R5

6: PP F1-R1, 7: PP F1-R2, 8: PP F1-R3

Lane 1 ~ 5 : PCV2 DNA

Lane 6 ~ 8 : PPV DNA

(3) PMWS Multiplex RT-PCR

위에서 각각 선발한 Primer를 사용하여 PRRSV ORF7 662bp, PCV2 ORF2 493bp, PPV VP2 330bp로 각각의 PCR을 최적화 하였으며, 이들 유전자를 동시에 증폭하기 위하여 Multiplex RT-PCR을 최적화하고 유전자 증폭시약을 개발하였다. (그림 32)

Multiplex RT-PCR 시약을 사용하여 각 virus별 시료와 virus가 혼합된 표준시료를 작성하여 유효성을 검사한 결과 그림 31과 같이 3종의 바이러스 유전자가 효과적으로 검출됨을 확인하였다. 검사에 사용한 각 virus 역가는 10^5TCID$_{50}$/ml 로서 혼합시료에서는 10^1 TCID$_{50}$/ml까지 검출되어 우수한 검출감도를 보였다.

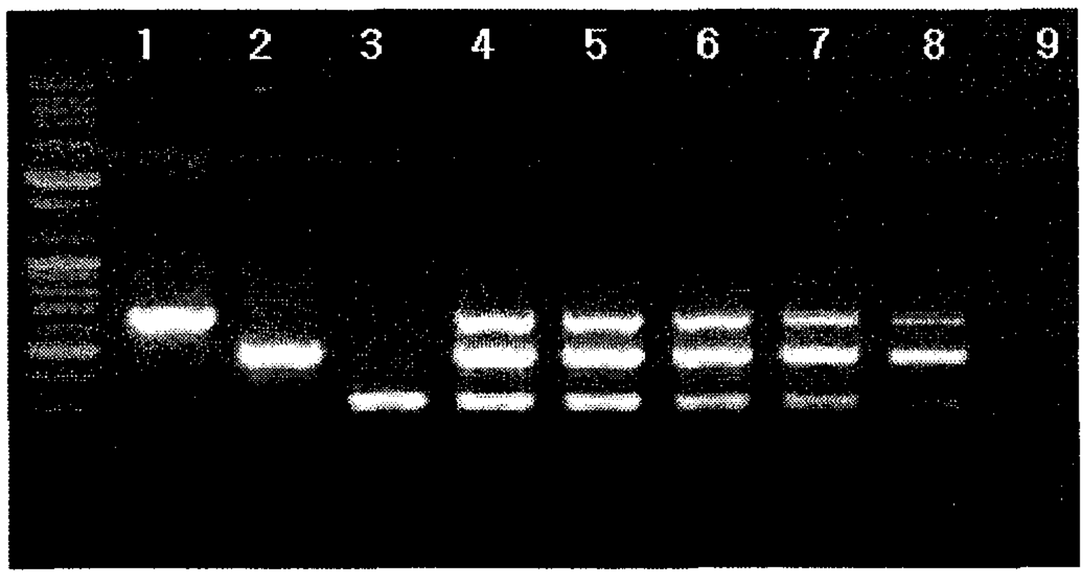


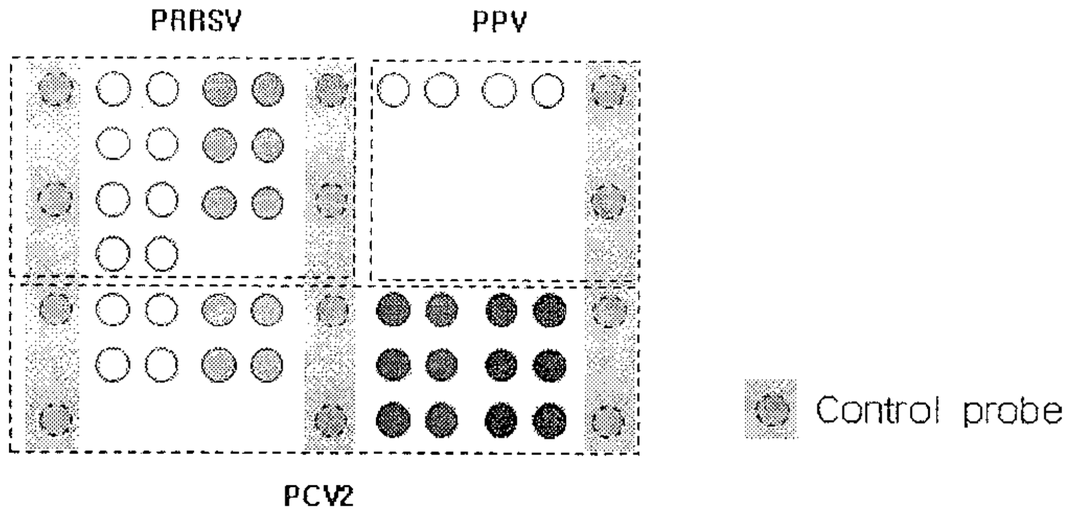
그림 32. Multiplex RT-PCR에서 3종 바이러스의 유전자 증폭검사 결과

Lane 1: PRRSV RNA, Lane 2: PCV2 DNA, Lane 3: PPV DNA,
Lane 4-8: PRRSV,PCV2,PPV mix 10^{-1}~10^{-5}, Lane 9: Negative control

2) PMWS (PRRSV/PCV2/PPV) Typing 유전자 칩 설계

설계된 유전자 Probe의 반응성을 검사하여 반응성이 우수한 probe를 선별하고, 그림 33와 같이 PMWS 관련 virus 검사를 위한 DNA Chip의 Probe Map을 설계하였다.

그림 33과 같이 좌측상단은 PRRSV의 양성 유무(on/off) 및 미국형과 유럽형(Typing)을 구분하는 영역이고, 우측상단은 PPV의 양성유무를 확인하는 영역이며, 하단은 PCV2의 양성 확인 및 유전형(Typing)을 감별할 수 있도록 칩의 프로브위치를 설계하였다. PRRSV, PCV2, PPV의 유전형 구분은 현재까지 표준화 되어있지 않아 유전자 변이의 병원성과 관련성이 보고된 바 없으므로 유행하는 바이러스와 유전자 동질성의 검사에 활용 할 수 있도록 유전자 칩을 설계하였다. 그러나 이후 병원성이나 유전형에 관련된 유전자분석결과가 밝혀진 후 유전자칩의 정보해석을 위하여 가능한 넓은 범위의 유전자를 포함하였다.



11 X 7

9GHC0005	9GPRUS011	9GPREU019	9GHC0005	9GPPV0101	9GPPV0103	9GHC0003
	9GPRUS062	9GPREU021				
9GHC0005	9GPRUS063	9GPREU022	9GHC0005			9GHC0003
	9GPRUS061					
9GHC0004	9GPC2C002	9GPC2FT12	9GHC0004	9GPC2FT21	9GPC2FT32	9GHC0004
	9GPC2C004	9GPC20105		9GPC2FT22	9GPC20302	
9GHC0004			9GHC0004	9GPC202a3	9GPC202b1	9GHC0004

그림 33. PMWS 관련바이러스 감별검사 DNA Chip의 Probe Map

가. PMWS DNA Chip의 각 virus별 표준시료에서 유효성 평가

(1) PRRSV virus Typing 검사

그림 34과 같이 PRRSV의 미국형(VR2332) 및 유럽형(LV) 바이러스 유전자를 정확하게 감별검사 할 수 있음을 확인하였다.

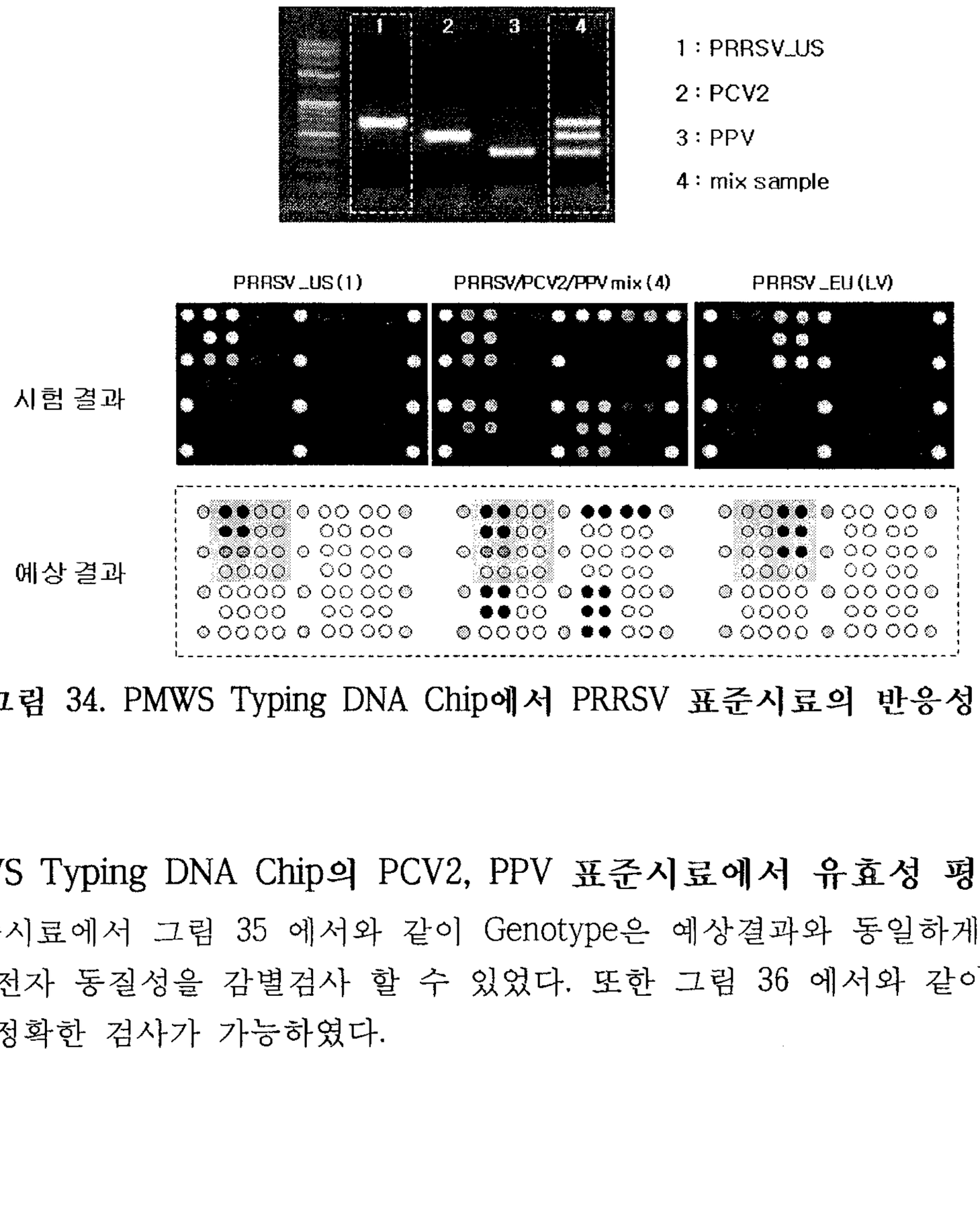
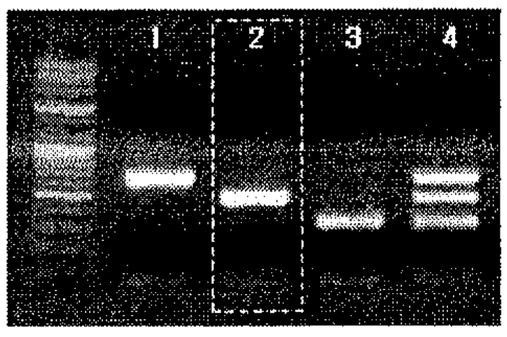


그림 34. PMWS Typing DNA Chip에서 PRRSV 표준시료의 반응성

(2) PMWS Typing DNA Chip의 PCV2, PPV 표준시료에서 유효성 평가

PCV2 표준시료에서 그림 35 에서와 같이 Genotype은 예상결과와 동일하게 검사가 가능하였고 유전자 동질성을 감별검사 할 수 있었다. 또한 그림 36 에서와 같이 PPV 표준시료에서도 정확한 검사가 가능하였다.



1 : PRRSV_US

2 : PCV2

3 : PPV

4 : mix sample

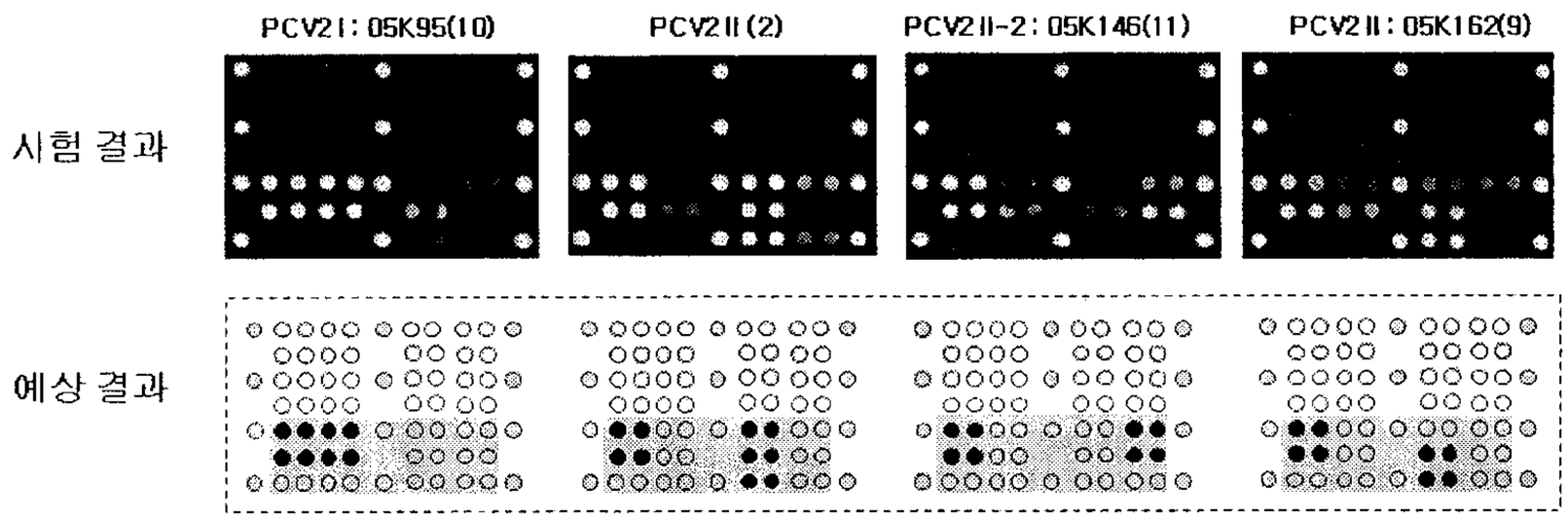
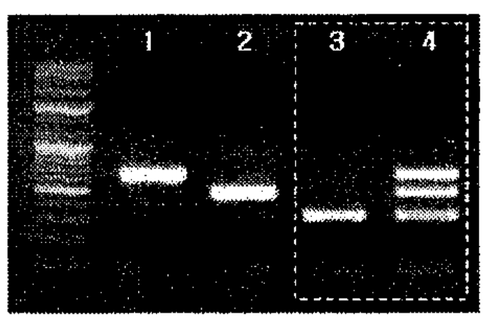


그림 35. PMWS Typing DNA Chip에서 PCV2 표준시료의 반응성



1 : PRRSV_US

2 : PCV2

3 : PPV

4 : mix sample

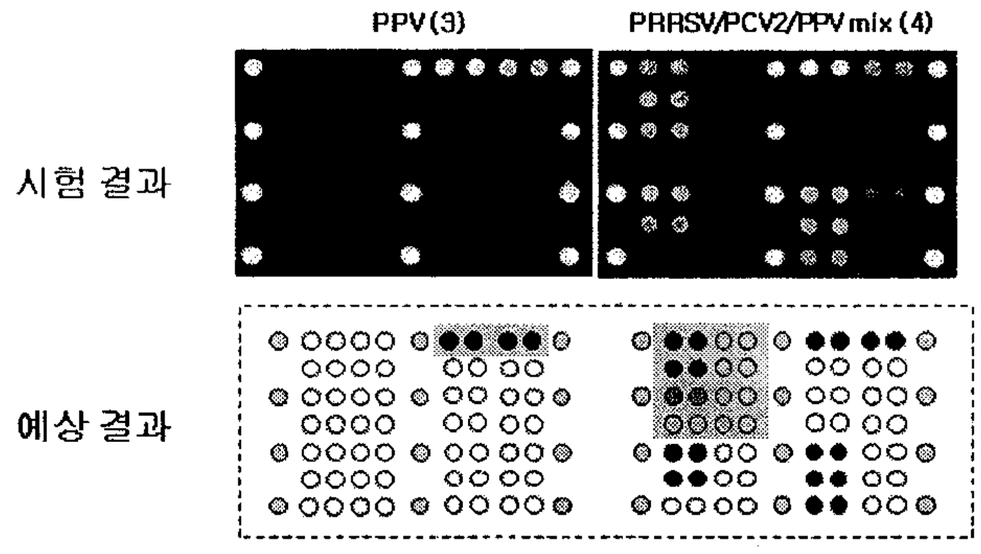
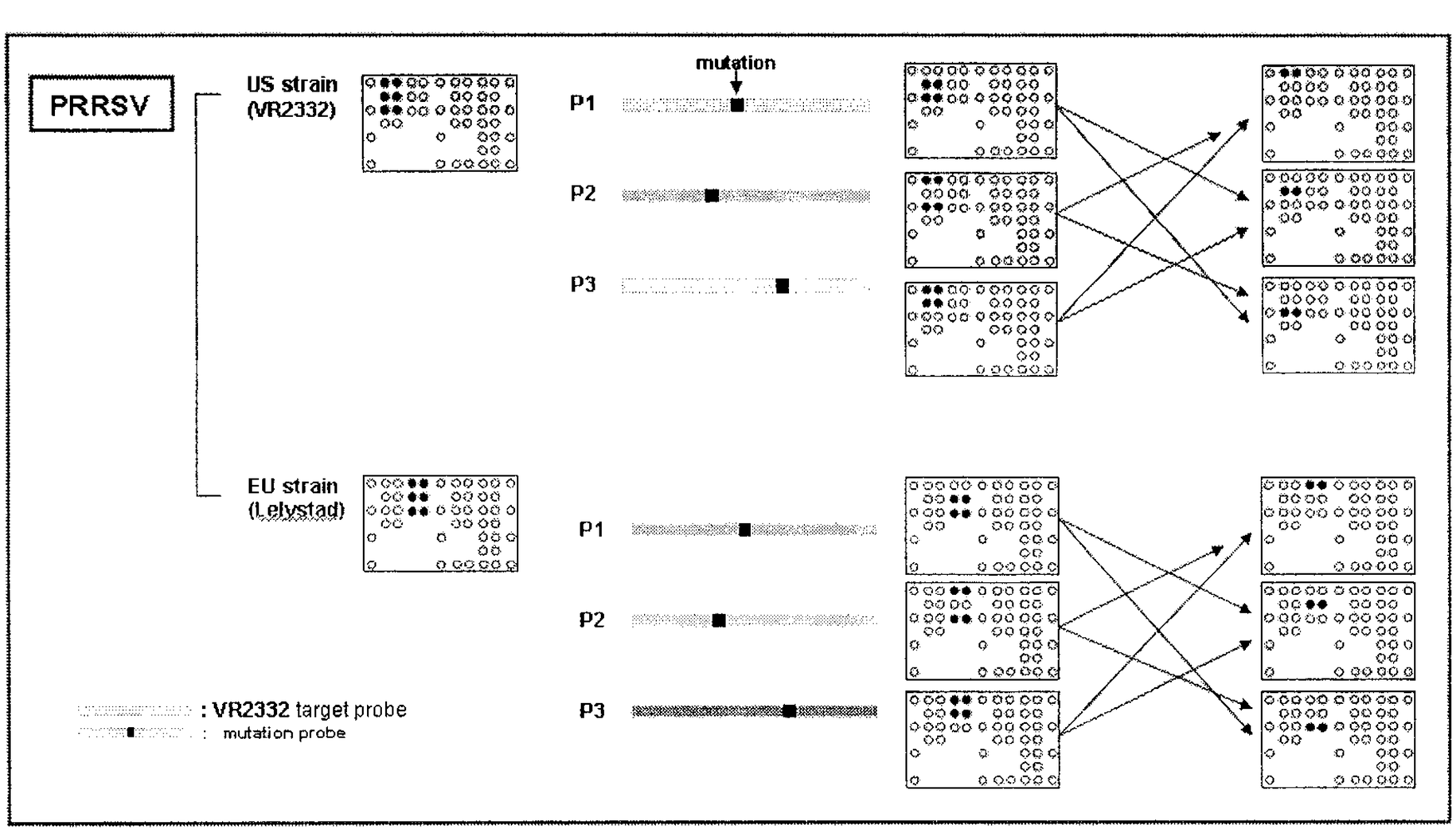
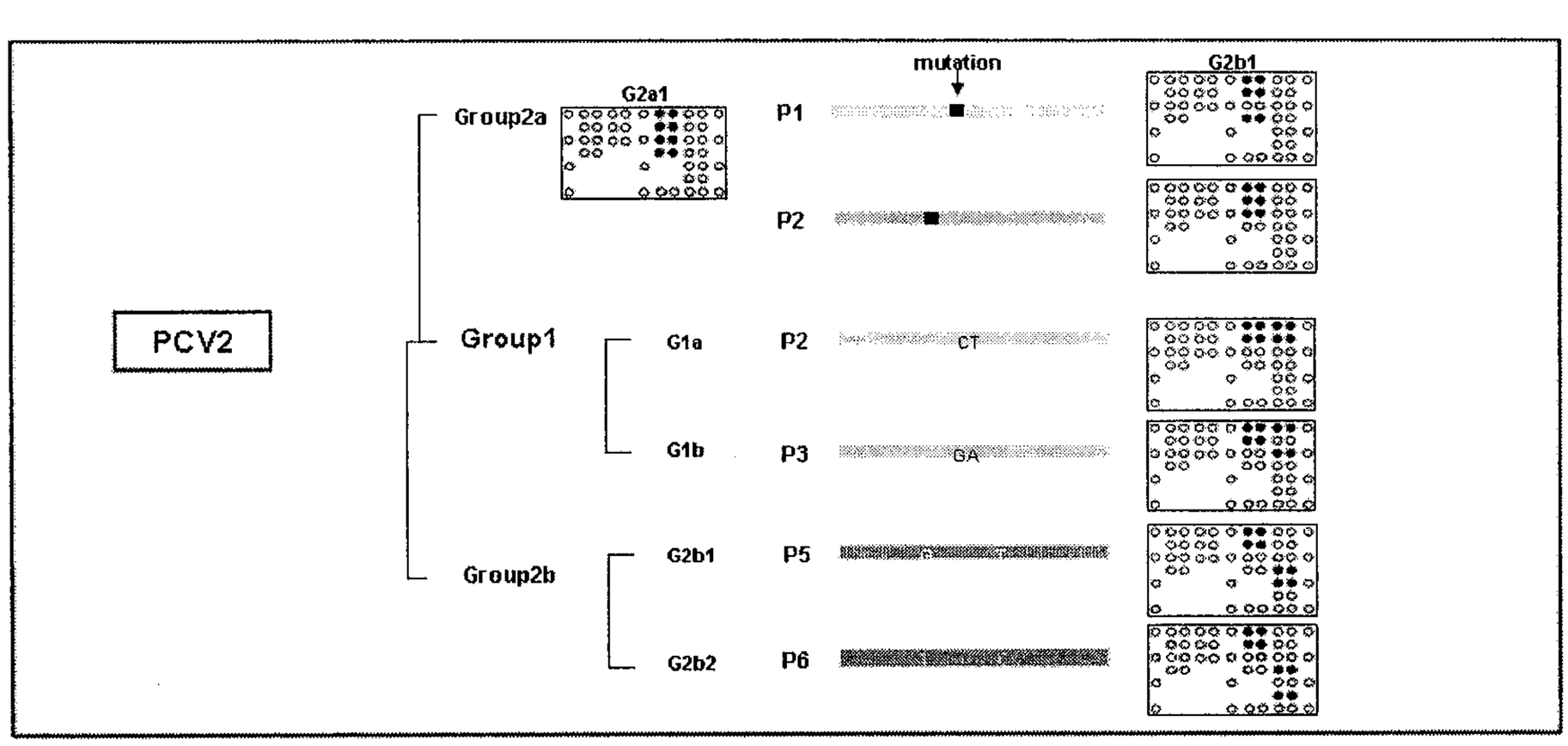


그림 36. PMWS 관련바이러스 감별검사 DNA Chip에서 PPV에 대한 반응성

나. PMWS 관련 바이러스 유전자 칩의 유전자 Map설정

○ PMWS Chip에 대한 각 virus별 DNA Chip의 반응패턴 예측





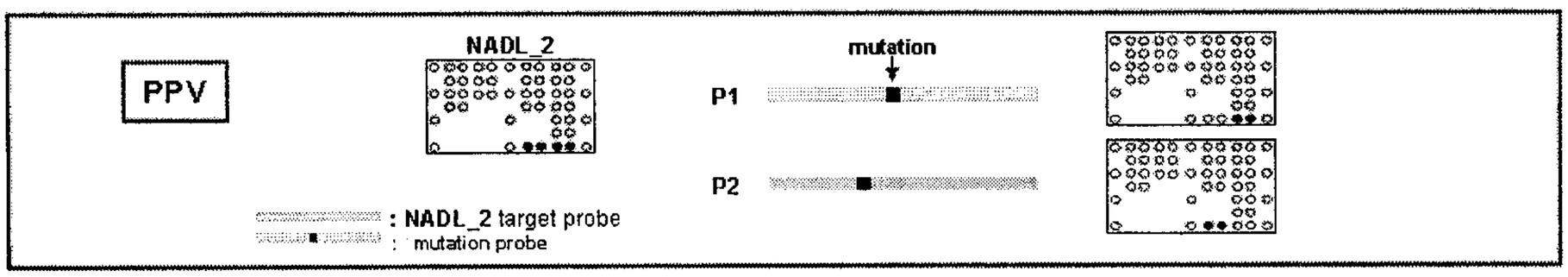


그림 37. PMWS Typing DNA Chip의 반응패턴 분석

PRRSV, PCV2, PPV에 대한 DNA Chip의 반응 pattern의 예측반응을 그림 37과 같이 분석하였다. PRRSV는 미국주(VR2332)와 유럽주(Lelystad)의 염기서열을 기준으로 각각 3종의 Probe에서 PRRSV US주/EU주를 감별하고 표준주를 기준으로 유전자 변이를 검사할 수 있어 3종의 패턴이 출력되며 패턴에 속하지 않는 경우 Untyping으로 분류된다. PCV2는 국내 분리주의 Phylogenetic tree를 기준으로 6종의 Probe를 사용하여 3개이 그룹으로 Typing이 가능하며 패턴에 속하지 않는 경우 Untyping으로 판정된다. PPV는 NADL2 strain을 기준으로 2개의 Probe를 사용하여 2종의 패턴으로 검사 된다. PPV의 경우 유전자 변이가 거의 없는 바이러스로 Untyping은 판정하지 않고 2종의 Probe 중 1가지에만 반응하면 양성으로 판정한다..

○ PMWS DNA Chip 최종 Map

최종적으로 설계된 PMWS Typing DNA Chip의 Probe map은 그림 38과 같다. Map의 좌측(probe 1~7)은 PRRSV의 양,음성 판정영역으로 probe 1~4 는 PRRSV US주, probe 5~7은 PRRSV EU주의 반응을 판독한다. Map의 우측(probe 8~19)은 PCV2 양성 및 subtype을 구분하는 영역(probe 8~17)과 PPV의 양성을 확인하는 영역(probe 18~19)으로 구성되어 있다. 최종 Probe map에 따라 시제품을 제작하고 표준 및 야외시료를 이용한 유효성 평가를 진행 하였다.

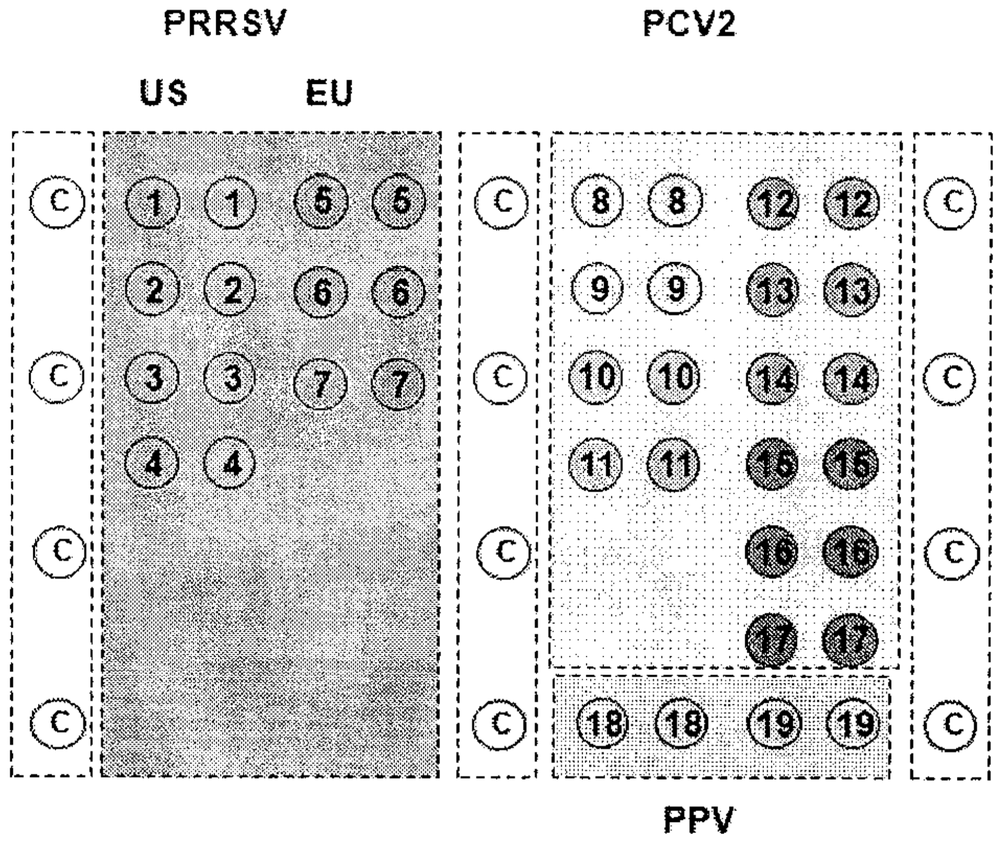


그림 38. PMWS Typing DNA Chip의 Probe Map

3) PMWS Typing DNA Chip의 유효성 평가

가. PMWS 3종 virus Multiplex RT-PCR의 DNA Chip 적용

PMWS 관련바이러스 Multiplex RT-PCR 시약에서 유전자를 증폭한 후 DNA Chip에서 검사하여 반응재현성을 검사하였다. 반복검사 결과 DNA virus 인 PCV2, PPV에 대해서 chip과 약하게 반응 하거나 혹은 전혀 반응하지 않는 현상이 불규칙하게 발생하였다. (그림 39)

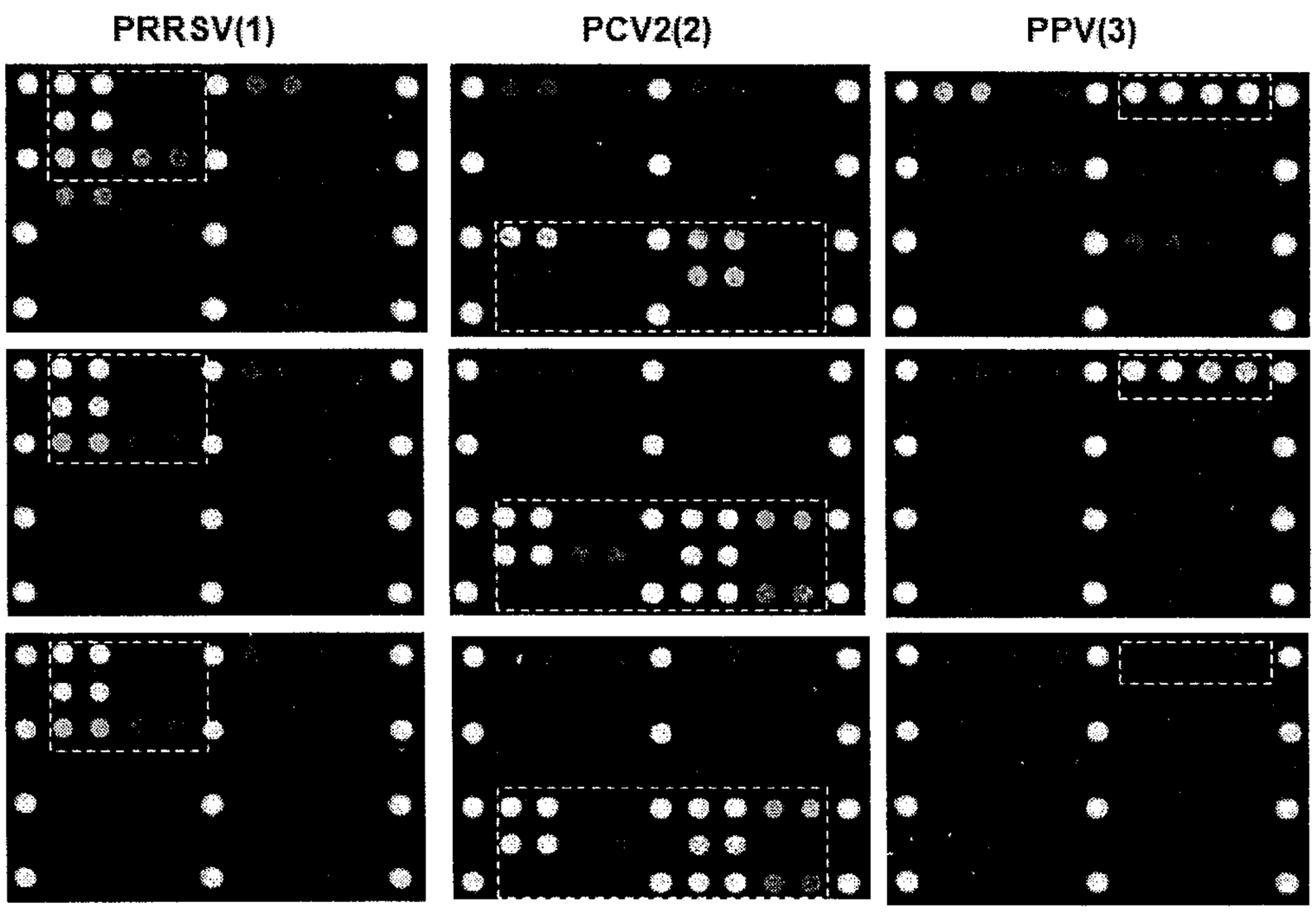


그림 39. DNA/RNA Multiplex RT-PCR시약 증폭산물의 PMWS Typing DNA Chip에서 재현성 검사결과

불규칙한 검사결과의 원인을 분석한 결과 그림 40에서와 같이 DNA 및 RNA virus를 동시에 Multiplex RT-PCR하는 경우 DNA virus에서 DNA chip과 불규칙하게 반응한다는 결과를 확인하였다. DNA virus와 RNA virus를 구분하여 유전자를 증폭하여 DNA Chip에 반응하면 정상적인 Hybridization 결과를 확보할 수 있었다. 그러나 이러한 반응의 원인을 확인하기 위하여 증폭산물의 유전자염기서열을 확인하였으나 유전자 증폭은 시약에 관계없이 정확하게 이루어지고 있어 정확한 원인은 확인하지 못하였다.

유전자칩에서의 반응재현성을 확보하기 위하여 DNA 및 RNA바이러스를 분리하여 PRRSV MP RT-PCR, PCV2/PPV MP PCR 시약을 재구성하여 검사에 사용한 결과 재현성 있는 반응결과를 얻었다. (그림 41, 42)

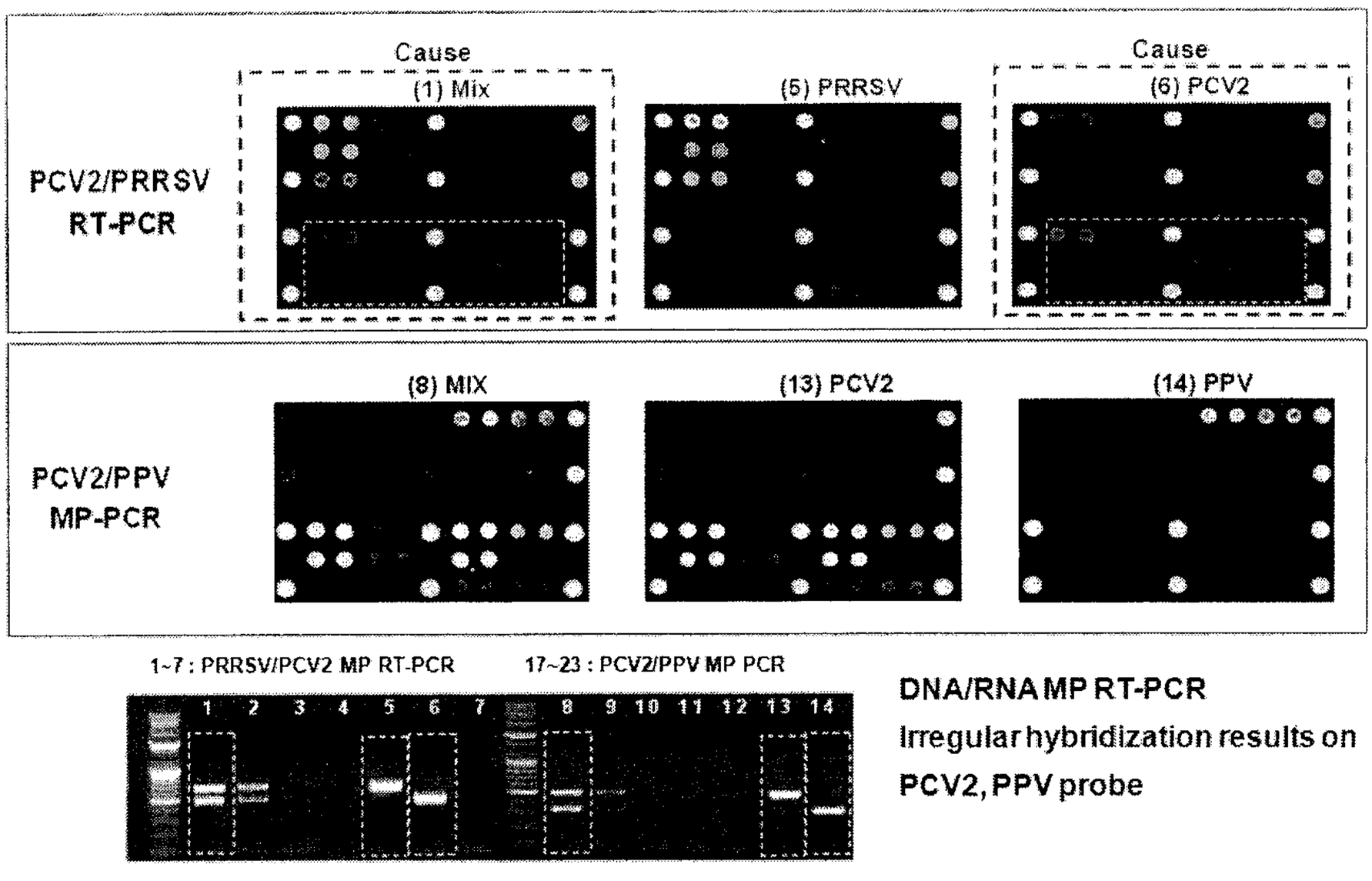


그림 40. Multiplex RT-PCR 시약 조합별 증폭산물의 DNA Chip에서의 반응성

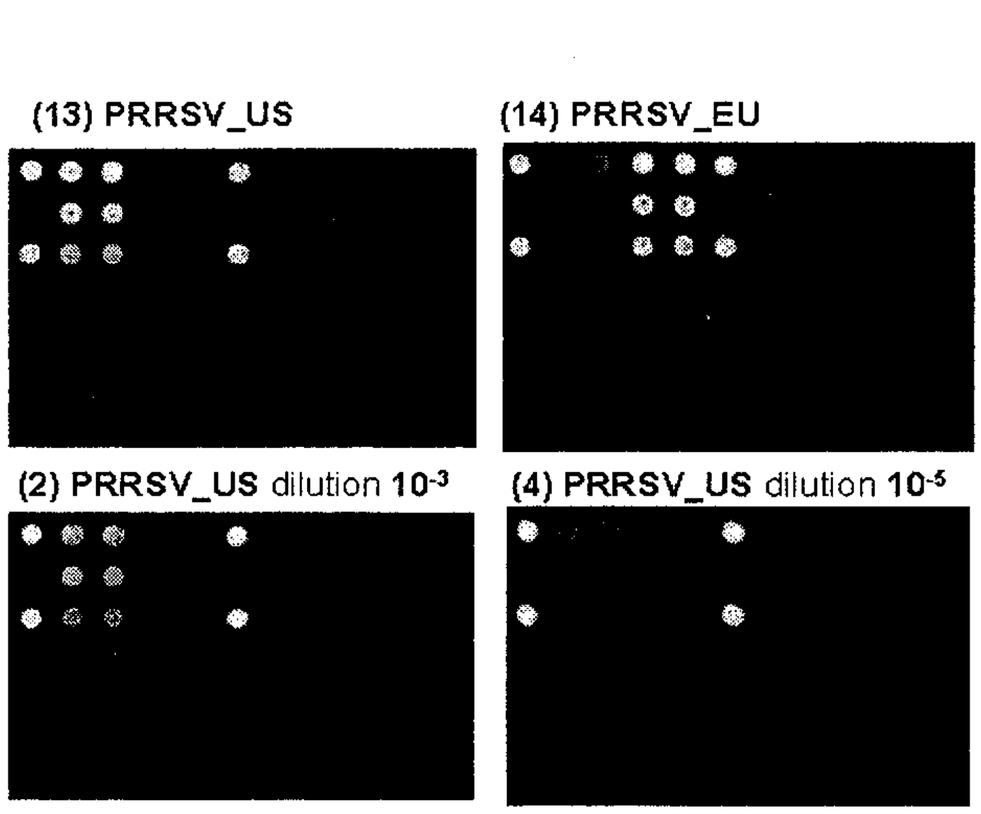
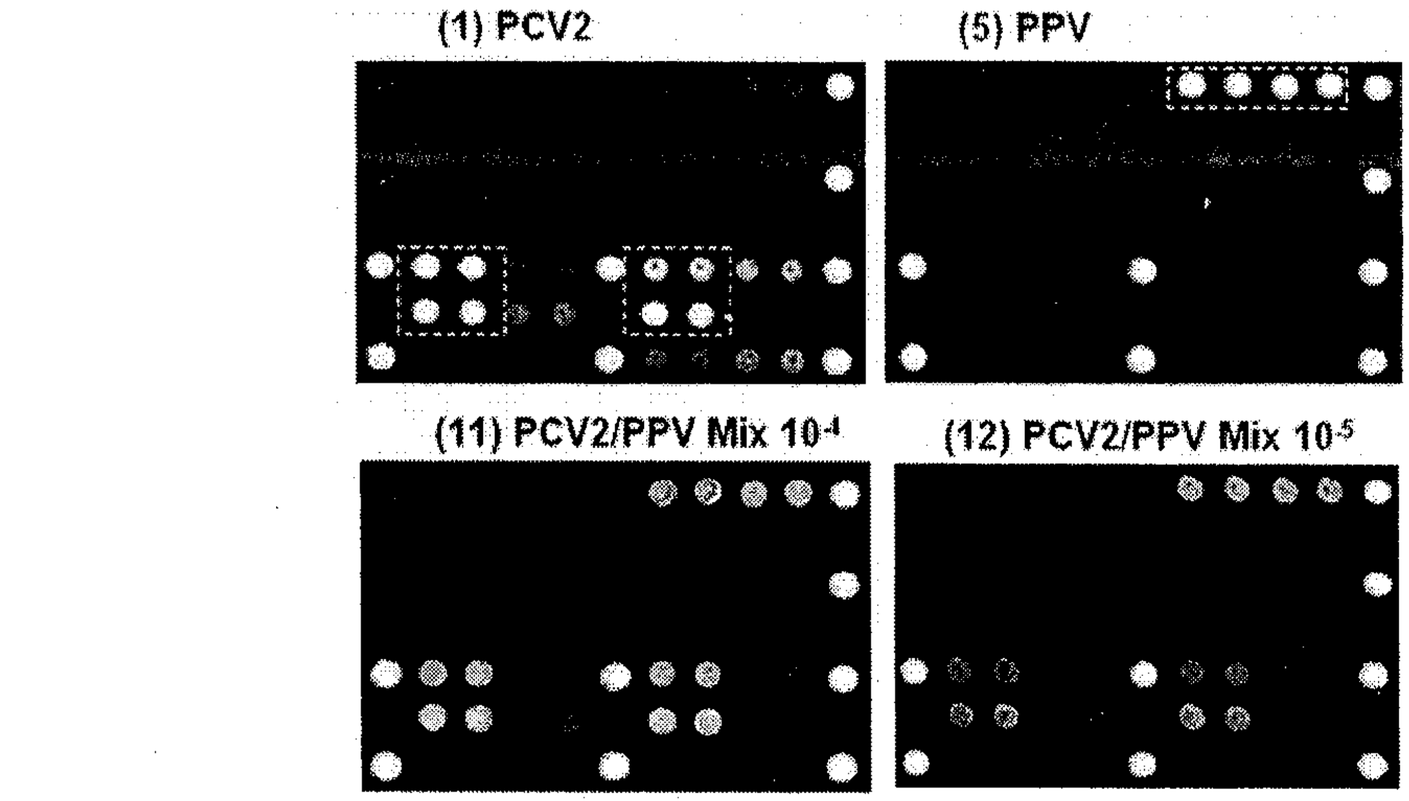


그림 41. PRRSV MP RT-PCR product의 DNA Chip 반응 결과



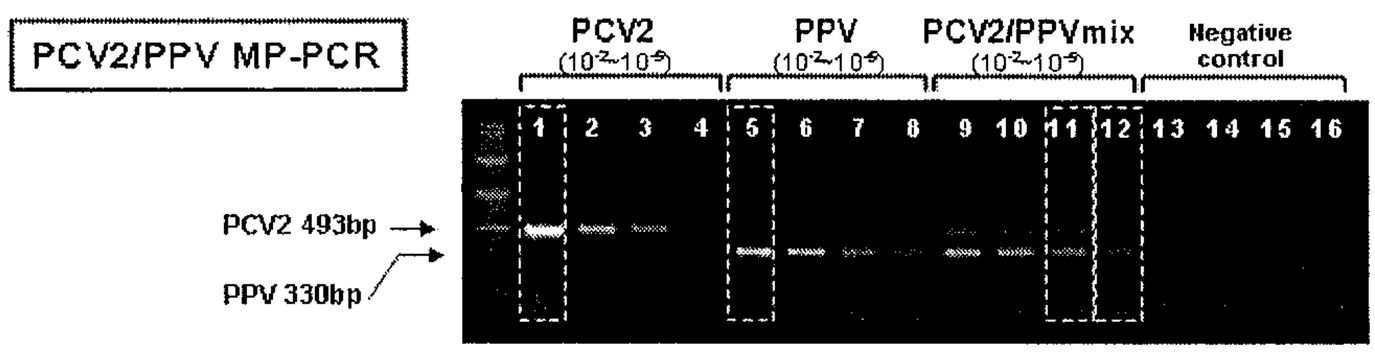


그림 42. PCV2/PPV MP PCR product의 DNA Chip 반응 결과

나. PMWS DNA Chip의 이론적 LOD(Limit of Detection) 측정

PMWS Typing DNA Chip의 최저검출한계(LOD)를 측정하기 위하여 정량된 PCR product로부터 표준시료를 구성하고 검사 하였다. RNA virus 인 PRRSV US(VR2332)주에 대한 최저검출한계는 2~5 ng/ul, EU(Lelystad)주에서는 1ng/ul로 나타나 US주 보다 EU주에 대해 좀 더 우수하여 민감한 검출한계를 나타내었다.

DNA virus 인 PCV2와 PPV의 검출한계는 모두 1ng/ul 수준으로 그 검출 한계가 우수함을 확인하였다.

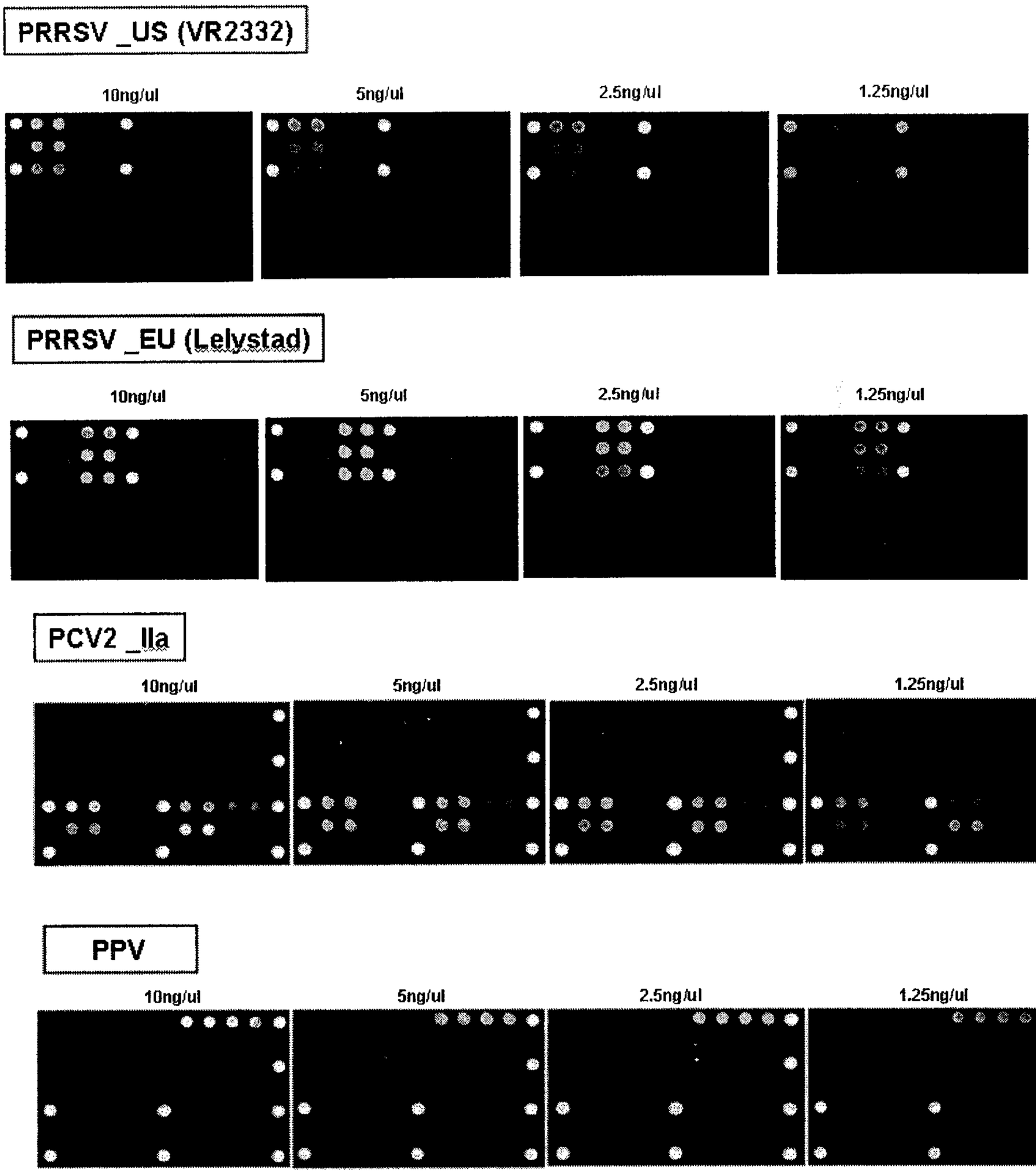


그림 43. PMWS Typing DNA Chip에서 원인체별 LOD 측정

다. PMWS Typing DNA Chip의 표준/야외시료에서의 1차 시제품 유효성 평가

PMWS MP RT-PCR 및 PCR 시약과 PMWS Typing DNA Chip 시제품 사용하여 국립수의과학검역원 바이러스과에서 보유하고 있는 야외 및 표준시료를 이용하여 시제품의 유효성을 평가하였다. 시료 추출은 야외주 바이러스의 유출 위험을 고려하여 국립수의과학검역원 바이러스과 실험실에서 Qiagen RNeasy Mini kit을 이용하여 실시하였다.

유전자증폭은 검역원과 제노바이오텍 실험실에서 실시하였고 유전자 칩 검사는 제노바이오텍 실험실에서 실시하였다. DNA chip의 판독은 Scan Array Express HT(PerkinElmer, USA)를 사용하여 판독하고 Quantitation program(PerkinElmer)을 이용해 각 probe의 Fluorescent intensity(FI)를 분석 하였다.

(1) 국립수의과학검역원 야외시료 패널

국립수의과학검역원에서 보관하고 있는 PMWS 의심농장에서 채취된 조직시료로 구성하였으며 2005-2006년까지의 구축된 야외시로로서 검역원의 자체 검사에서 PRRSV 양성, PCV2 양성 혹은 PRRSV/PCV 중복 감염시료를 포함하여 159개 시료를 사용하였다.

표 24. 국립수의과학검역원 야외시료 패널 내역

PRRSV ORF6 RT-PCR	No. samples	PCV2 ORF2 PCR	
		+	-
+	99	59	40
-	60	60	
Total	**159**	**119**	**40**

(2) PRRSV ORF7 RT-PCR 및 PCV2/PPV MP-PCR 시제품에서 표준시료의 검사결과

159개 시료에서 DNA Chip용 PRRSV ORF7 single RT-PCR, PCV2/PPV MP-PCR 시제품에서 유전자를 증폭하고 전기영동하여 유전자의 증폭여부를 확인한 결과 표 25과 같이 유전자 증폭 시제품에서 보다 민감한 검사가 가능함을 확인하였다. 그러나 표준시료 중 일부는 Virus 농도가 낮아 유전자가 증폭되지 않은 경우도 있었다. 국립수의과학검역원의 검사결과와 다소 다르게 판독된 시료는 시료의 보관, 관리 및 분리효율에 따라 달라진 것으로 추정되었으며 PRRSV의 경우 유전자 변이로 인하여 일부 음성으로 판독된 것으로 확인되었다.

표 25. 국립수의과학검역원 야외시료 패널 내역

NVRQS	Result	No. of samples	PCR for DNA Chip (Cy3-labelled)					
			PRRSV-ORF7		PCV2-ORF2		PPV	
			+	-	+	-	+	-
PRRSV ORF6	+	99	94	5				
	-	60	25	35				
PCV2 ORF2	+	119			112	7		
	-	40			38	2		
PPV	NT	159					2	157
Total		**159**	**119**	**40**	**150**	**9**	**2**	**157**

(3) PMWS Typing DNA Chip 시제품에서의 판정검사 결과

○ PRRSV 판정검사 결과

PRRSV PCR 양/음성 시료 159개중 PRRSV ORF7 RT-PCR 시제품에서 119개의 양성을 확인하였으며 유전자칩 시제품에서는 90개의 시료에서 양성으로 확인되어 75.6%의 검출율을 보였다. 전기영동 판독에서 약하게 확인되는 시료 29종에 대해서는 DNA Chip에서 음성으로 판독되어 낮은 민감도를 나타내었다. 그러나 음성시료는 유전자칩 시제품에서 모두 음성으로 판정되어 100%의 특이도를 보였다.

표 26. 야외시료의 PRRSV에 대한 유전자칩 검사결과

PRRSV RT-PCR	No. of samples	PMWS DNA Chip	
		Positive	Negative
+	119	90	29
-	40		40
Total	159	90	69

* Positive FI > 2,000, Negative FI < 2,000

DNA Chip에서 양성으로 판정된 시료의 주요 pattern을 분석한 결과 표준준인 VR2332 (Type a)와 같은 pattern에서 42종, Type b, c, d가 다수 존재하였으며 유럽주와 혼합 감염으로 추정되는 시료도 2개가 발견되어 확인검사를 진행하였다.

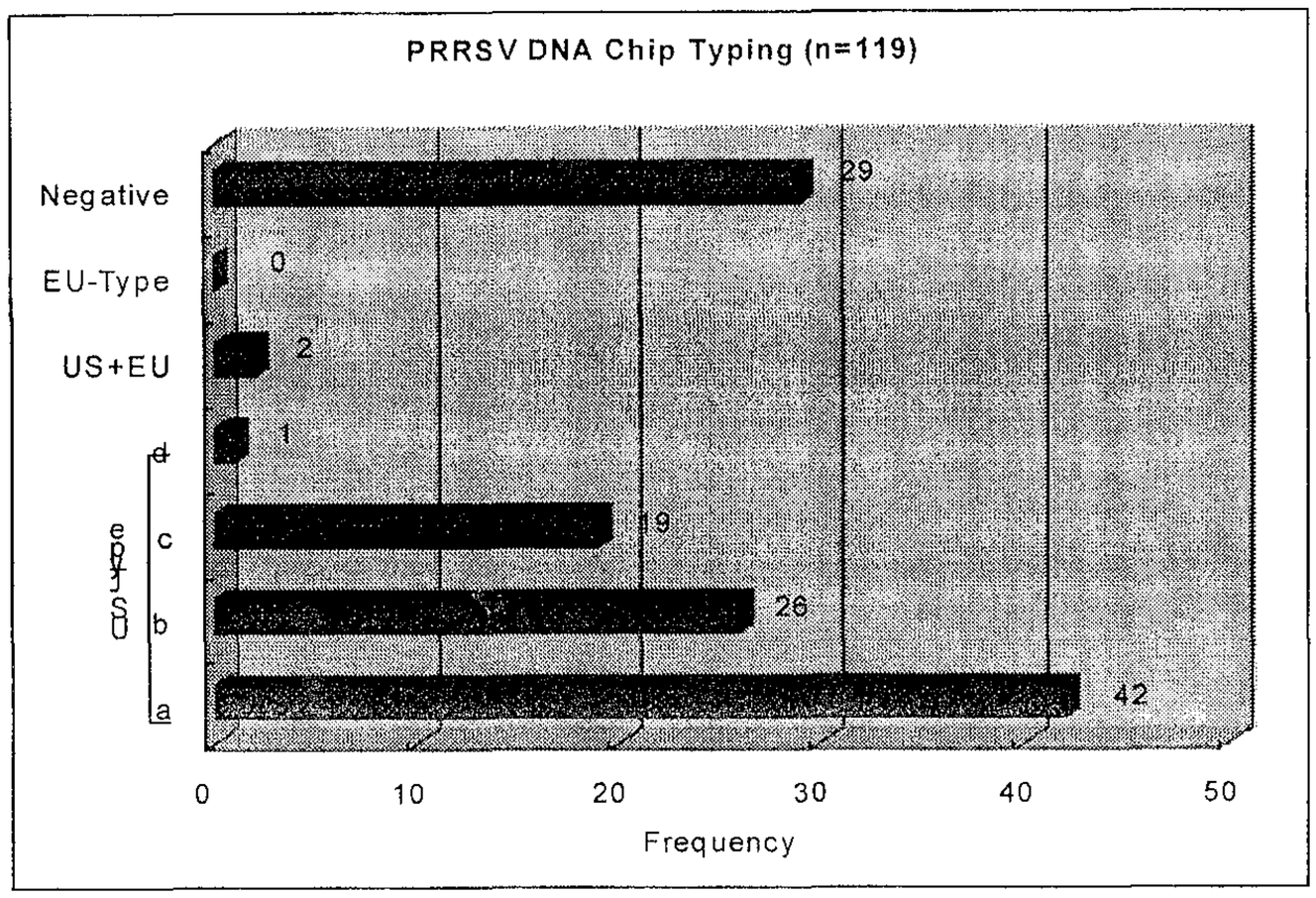


그림 44. PMWS Typing DNA Chip에서 PRRSV 양성시료의 Type 분포

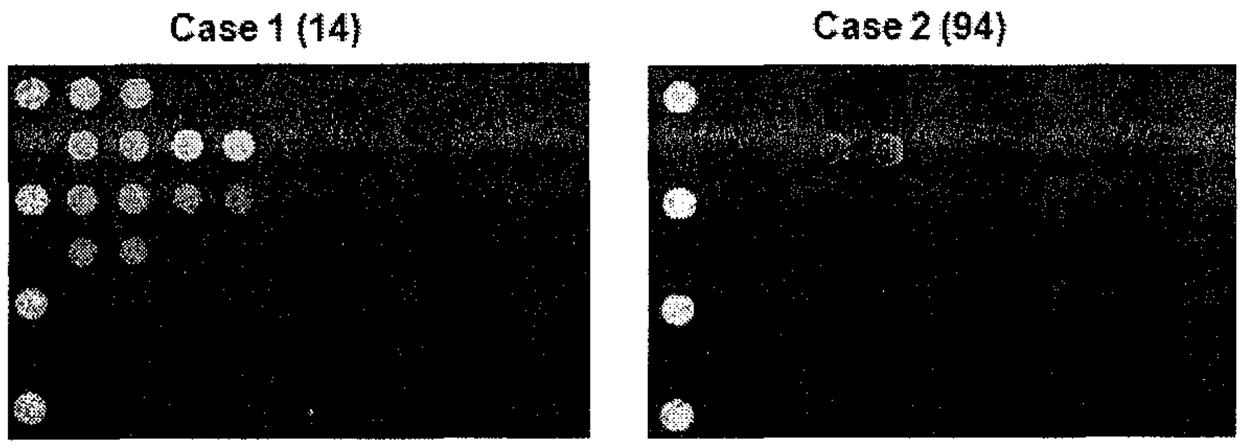


그림 45. PMWS Typing DNA Chip에서 PRRSV의 Untyping 시료의 반응양상

PRRSV EU주의 실제 존재여부를 확인하기 위하여 유럽주 특이 primer를 사용하여 RT-PCR하여 확인한 결과 양성반응을 확인하였으며 DNA chip에서 재검사한 결과 유럽주 바이러스 유형으로 판독되었다. 또한 국립수의과학검역원에 의뢰하여 염기서열을 분석한 결과 유럽주가 중복감염된 시료임을 최종확인 하였다. 유럽주의 표준주인 Lelystad주와는 변이된 다른 Type의 바이러스임을 확인하였다.

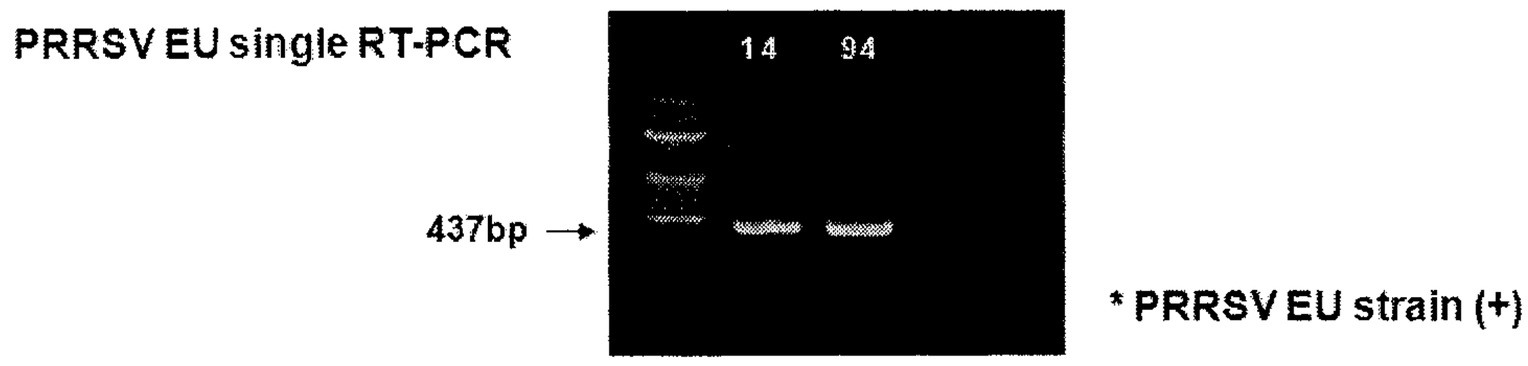


그림 46. PMWS Typing DNA Chip에서 PRRSV EU주의 확인검사 결과

○ 유전자칩에서 PCV2에 대한 판정검사 결과

PCV2는 PCR 시제품에서 양성판정된 150개의 시료에서 DNA Chip에서 모두 양성으로 판정하였으며 전기영동에서 음성으로 판독된 6개의 시료에서 추가적으로 양성이 확인되어 전기영동보다 우수한 민감도를 가지고 있음을 확인 하였다.

표 27. 야외시료의 PCV2에 대한 유전자칩 검사결과

PCV2/PPV MP PCR	No. of samples	DNA Chip Results	
		Positive	Negative
+	150	150	
-	9	6	3
Total	**159**	**156**	**3**

* Positive FI > 5,000, Negative FI < 5,000

* Detector : Perkin Elmer Express HT, LP=90,PG=80

PCV2에 대한 유전자칩에서의 Typing 검사결과는 그림 47, 48과 같이 PCV2 Type 2a2형이 56개 시료로 가장 많이 존재하였으며 다른 type의 바이러스도 다수 존재하고 있음을 확인 하였다.

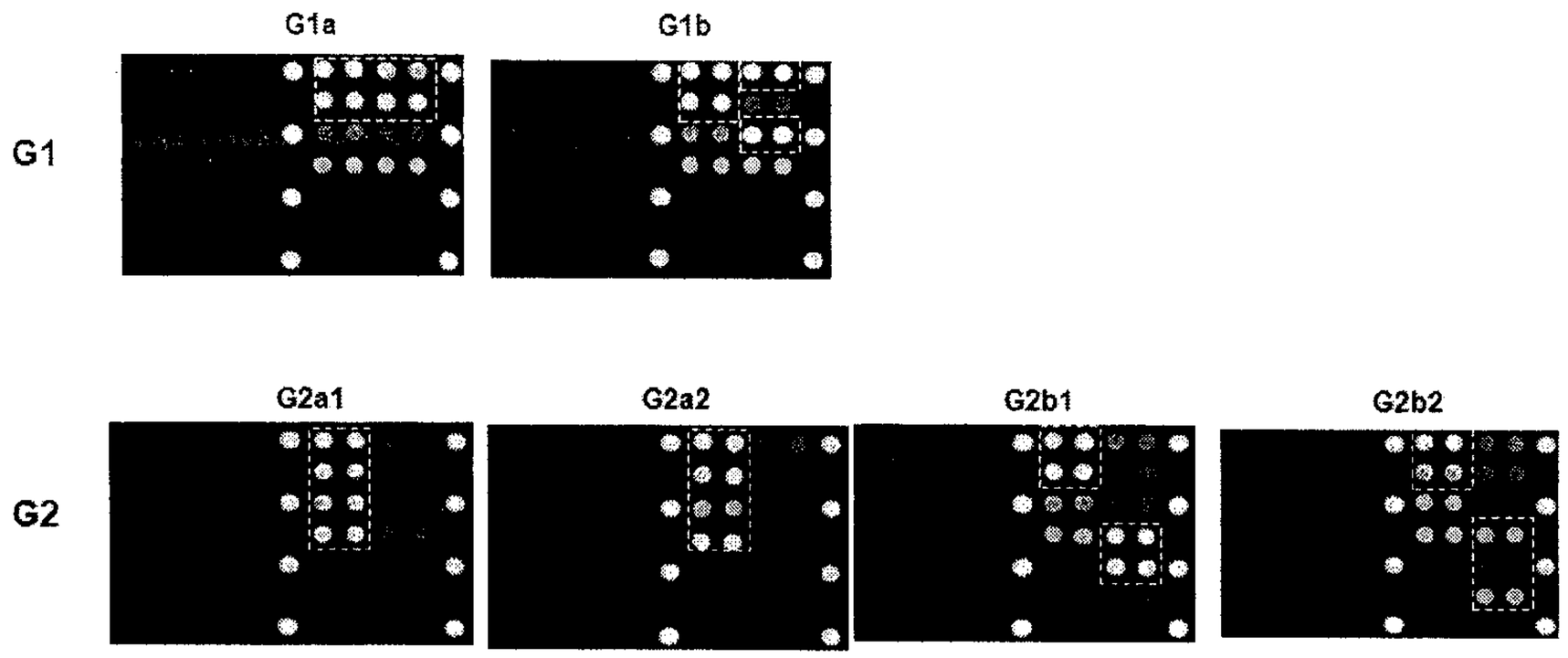


그림 47. PMWS Typing DNA Chip에서 PCV2의 Typing 반응결과

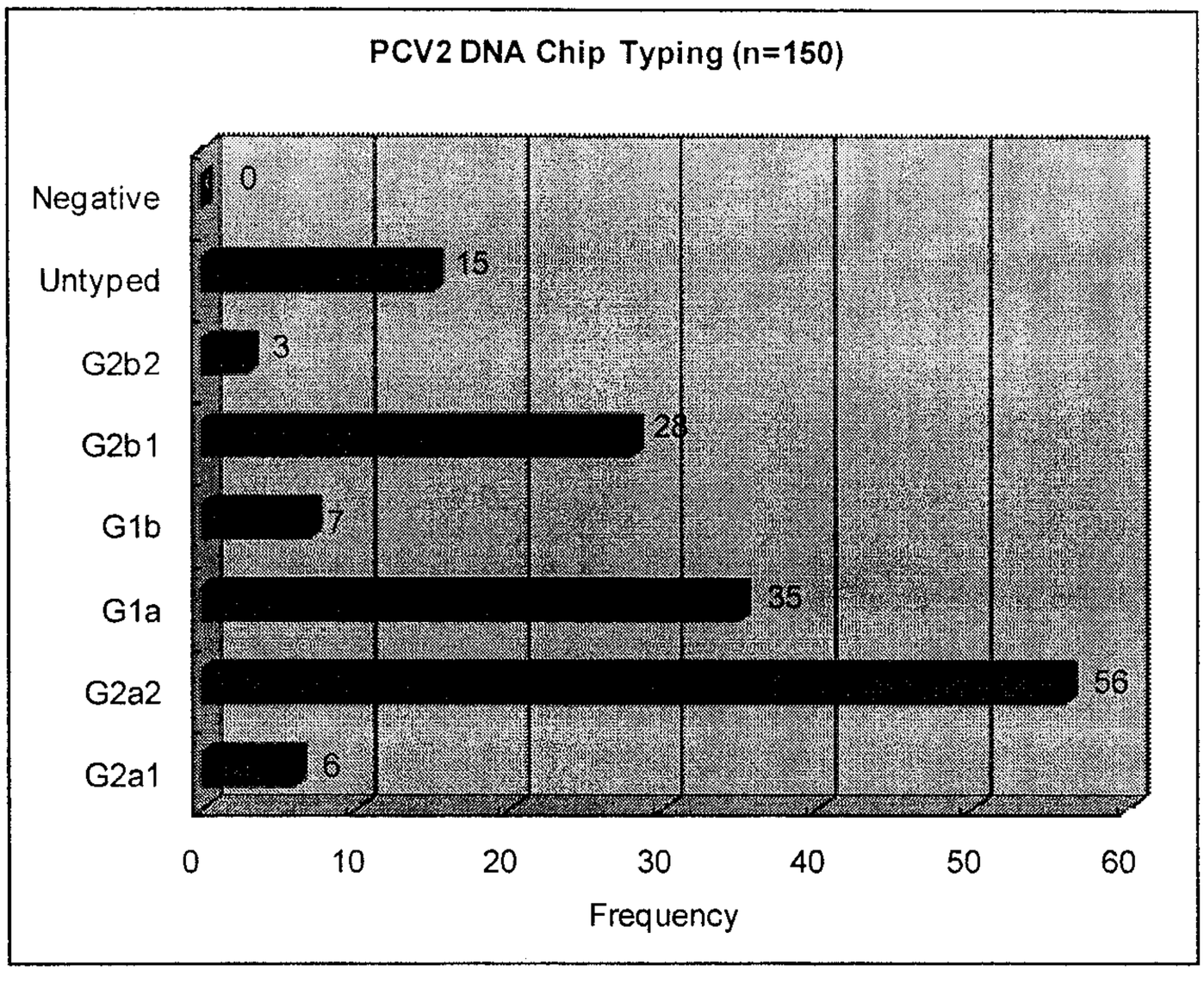


그림 48. PMWS Typing DNA Chip에서 PCV2의 Type 별 분포분석

PCV2의 untyping으로 확인되는 바이러스도 그림 48에서와 같이 다수 존재하였는데 untyping 시료는 PCV2 type 간 중복 감염과 특정 염기서열의 변이에 기인되는 것으로 추정되나 보다 정확한 원인 조사가 필요한 것으로 판단 된다.

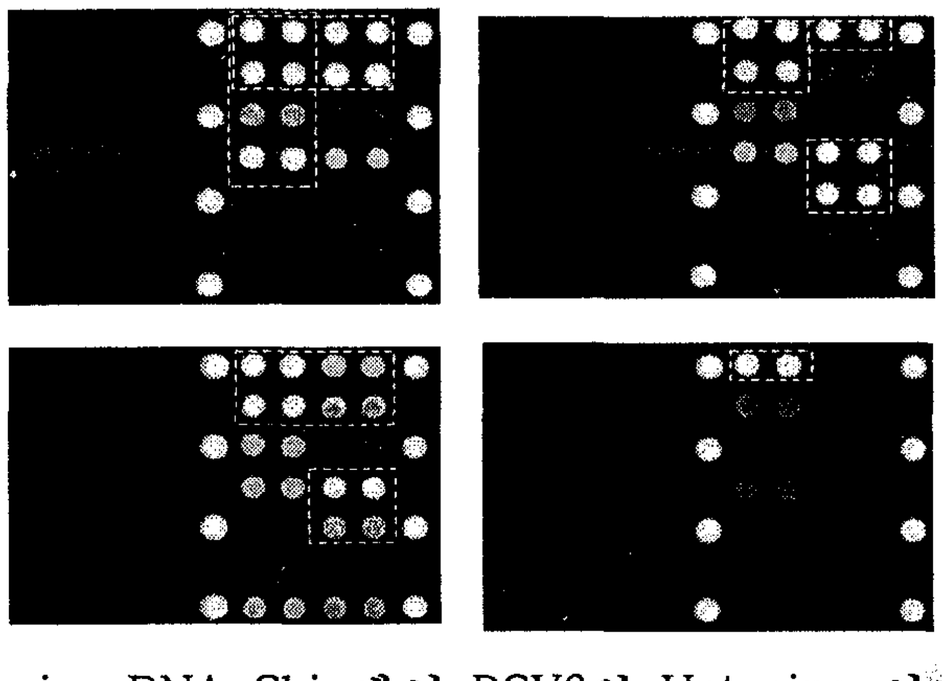


그림 49. PMWS Typing DNA Chip에서 PCV2의 Untyping 시료에서의 반응패턴

○ 유전자 칩에서 PPV의 판정검사 결과

PPV는 PCR 시제품에서 양성으로 판정된 2개의 시료를 DNA Chip에서 검사한 결과 2개 모두 양성으로 판정하였으며, 전기영동에서 음성판독된 1개의 시료에서 추가적으로 양성으로 확인되어 전기영도에서보다 유전자칩의 민감도가 우수함을 확인하였다. 반응 pattern은 표준주인 NADL2와 모두 일치하였다. 야외시료에서 PPV 단독감염은 존재하지 않았으며 모두 PCV2와 중복 감염시료로 판독되었다.

표 28. 야외시료의 PPV에 대한 유전자칩 검사결과

PCV2/PPV MP PCR	No. of samples	DNA Chip Results	
		Positive	Negative
+	2	2	
-	157	1	156
Total	**159**	**3**	**156**

* Positive FI > 5,000, Negative FI < 5,000

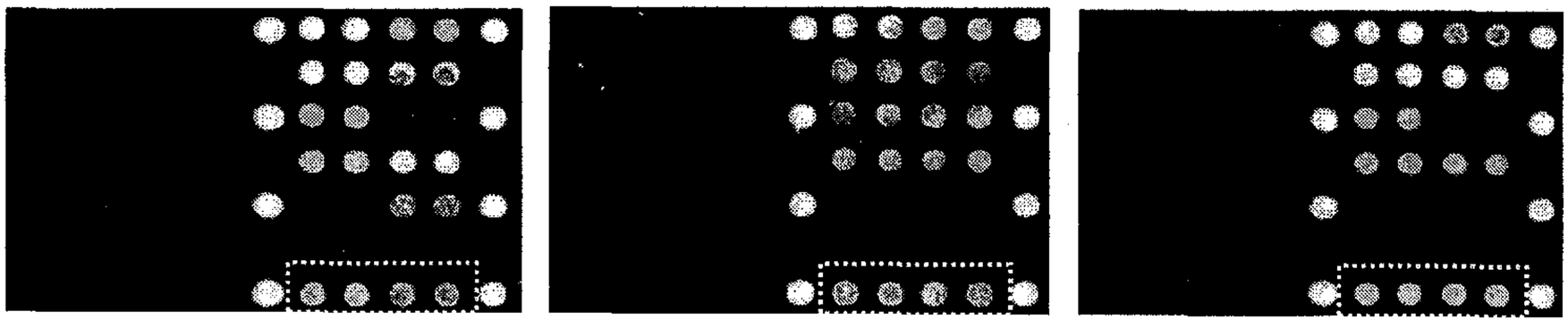


그림 50. PMWS Typing DNA Chip에서 PPV의 반응패턴

라. PMWS Typing DNA Chip의 개선

PMWS Typing DNA Chip 시제품은 1차 유효성 평가결과 PCV2 및 PPV에 대해서는 민감도와 특이도에서 우수한 결과를 보였으나 PRRSV에서는 전기영동에서 양성/의양성으로 판독되는 다수의 시료가 음성으로 판독되어 낮은 민감도를 나태내어 개선의 필요성을 확인하였다. 또한 PCV2의 경우 검출감도는 우수하나 야외시료에서 매우 많은 Untyping 결과가 판독되어 진단적인 혼돈을 줄 수 있는 것으로 파악되었다.

이에 따라 연구팀은 PRRSV의 검출 민감도를 개선하고 PCV2에 대한 결과판독을 용이하게 하기 위한 개선시험을 진행하였다.

(1) PRRSV 유전자 primer, probe 재설계 및 유전자 증폭시약 개발

○ PRRSV 유전자 증폭시약의 개선

PRRSV에 대한 유전자칩의 민감도를 개선하기 위하여 PRRSV의 Primer를 다양하게 설계하여 개선을 시도하였다. PCR 증폭산물의 크기, 조건을 변경하여 개선을 시도하였으나 유전자칩에서의 검출민감도에서는 차이가 없어 PRRSV ORF7 유전자의 특성으로 간주되었다. 즉 ORF7 유전자는 Hybridization 효율이 매우 낮은 것으로 결론을 내리고 PRRSV의 목표유전자를 ORF6로 변경하여 개선을 시도하였다.

PRRSV ORF6 유전자는 PRRSV US주와 EU주를 동시에 증폭할 수 있는 영역이 존재하지 않아 각 type에 맞는 primer pair를 설계하여 PRRSV Multiplex RT-PCR로 고안하였다. 또한 ORF6 영역은 PRRSV의 생독백신으로 사용하는 Vaccine주(미국주)와 야외주의 감별이 가능한 유전자 영역이 SNP로 존재하므로 probe 선발 시 이를 고려하였다.

앞에서와 같은 방법으로 PRRSV ORF6 MP RT-PCR을 최적화하고 기존의 ORF7 RT-PCR과 검출감도를 비교하였다. 바이러스역가별 표준시료를 1/10 계단희석하여 검사한 결과 기존의 ORF7을 사용한 시제품과 유사한 검출능력을 나타내었다.

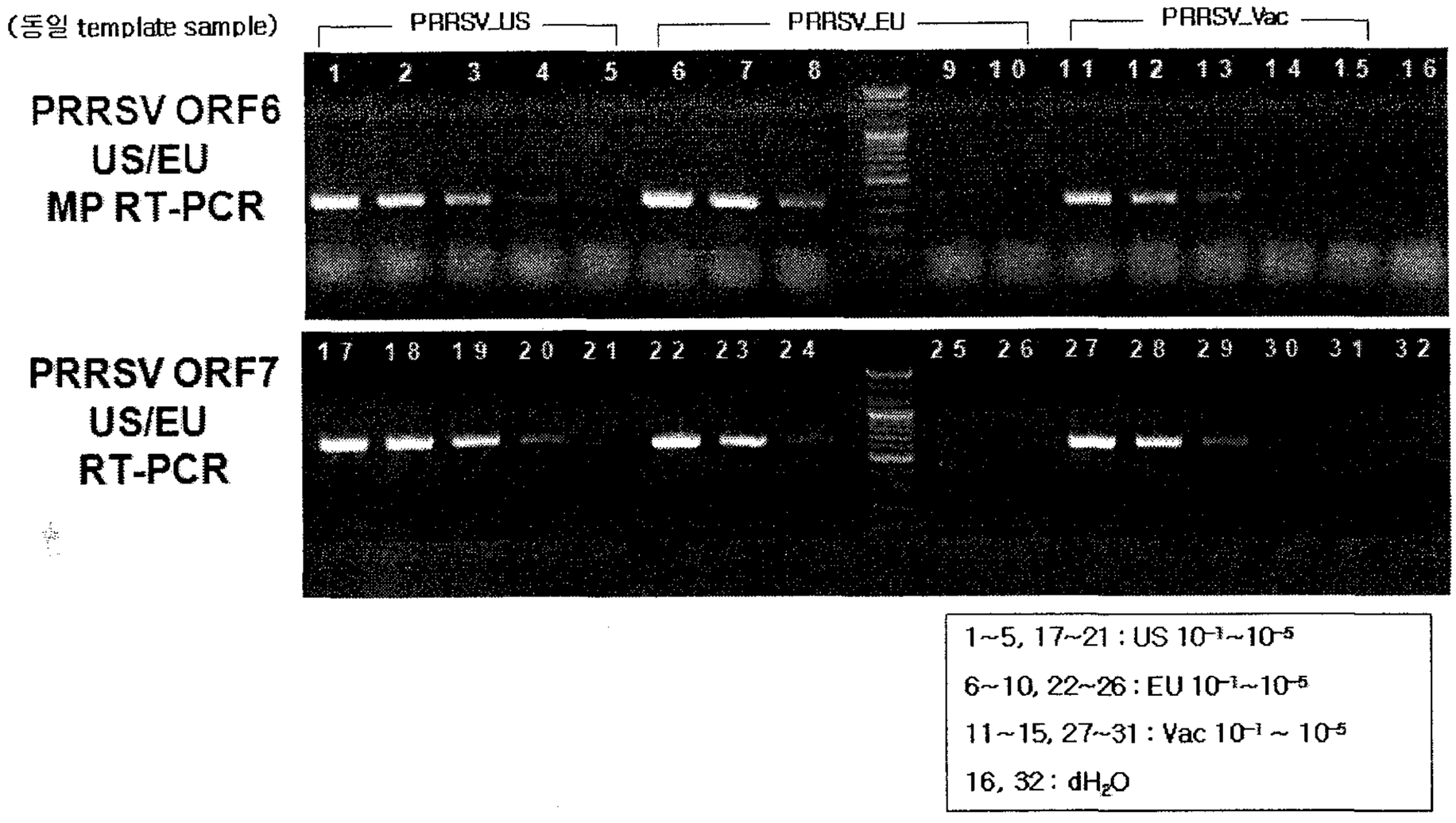


그림 51. PRRSV ORF6 MP RT-PCR의 최소검출한계의 측정

○ PRRSV ORF6 유전자 검출을 위한 DNA Chip probe 재선발

PMWS Typing DNA Chip에서 PRRSV에 대한 민감도 개선을 위하여 다음과 같이 PRRSV에 대한 유전자 probe를 재설계하고 선발을 실시하였다.

표 29. PRRSV ORF6-7 유전자에 대한 Probe 설계

Probe group	Name of probe	Location of probe	Tm
US	9GPRUS601	orf6 20mer	57
	9GPRUS602	orf6 22mer	63
	9GPRUS603	orf6 20mer	57
	9GPRUS604	orf6 22mer	63
	9GPRUS605	orf6 22mer	62
	9GPRUS606	orf6 23mer	63
	9GPRUS607	orf6 28mer	81
	9GPRUS701	orf7 25mer	75
	9GPRUS702	orf7 25mer	71
	9GPRUS703	orf7 25mer	69
	9GPRUS704	orf7 25mer	79
	9GPRUS705	orf7 25mer	81
EU	9GPREU601	orf6 25mer	77
	9GPREU602	orf6 25mer	75
	9GPREU603	orf6 22mer	65
	9GPREU604	orf6 25mer	67
	9GPREU605	orf6 23mer	65

ORF7에 대한 유전자 Probe와 ORF6 유전자 Probe에 대한 검출능력을 검사한 결과 ORF7에서는 Probe의 위치나 서열을 변경하여도 검출능력이 개선되지 않았다. 동일시료에 대해 ORF6의 Probe에서는 현저하게 검출능력이 개선되었으며 전기영동에서의 판독결과와 동일한 검출민감도를 나타내었다.

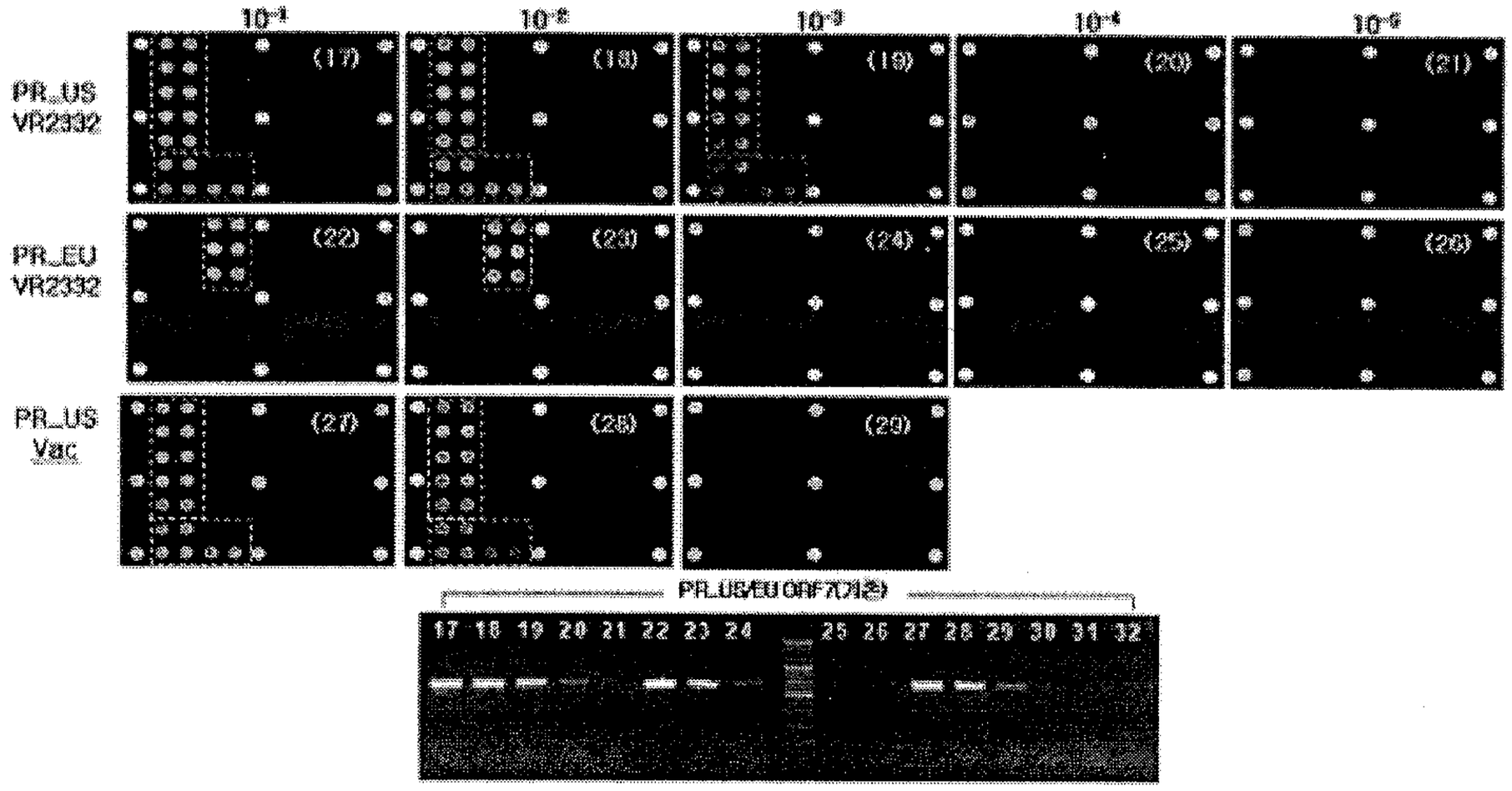


그림 52. PRRSV ORF7에서의 유전자 Probe의 반응성 검사

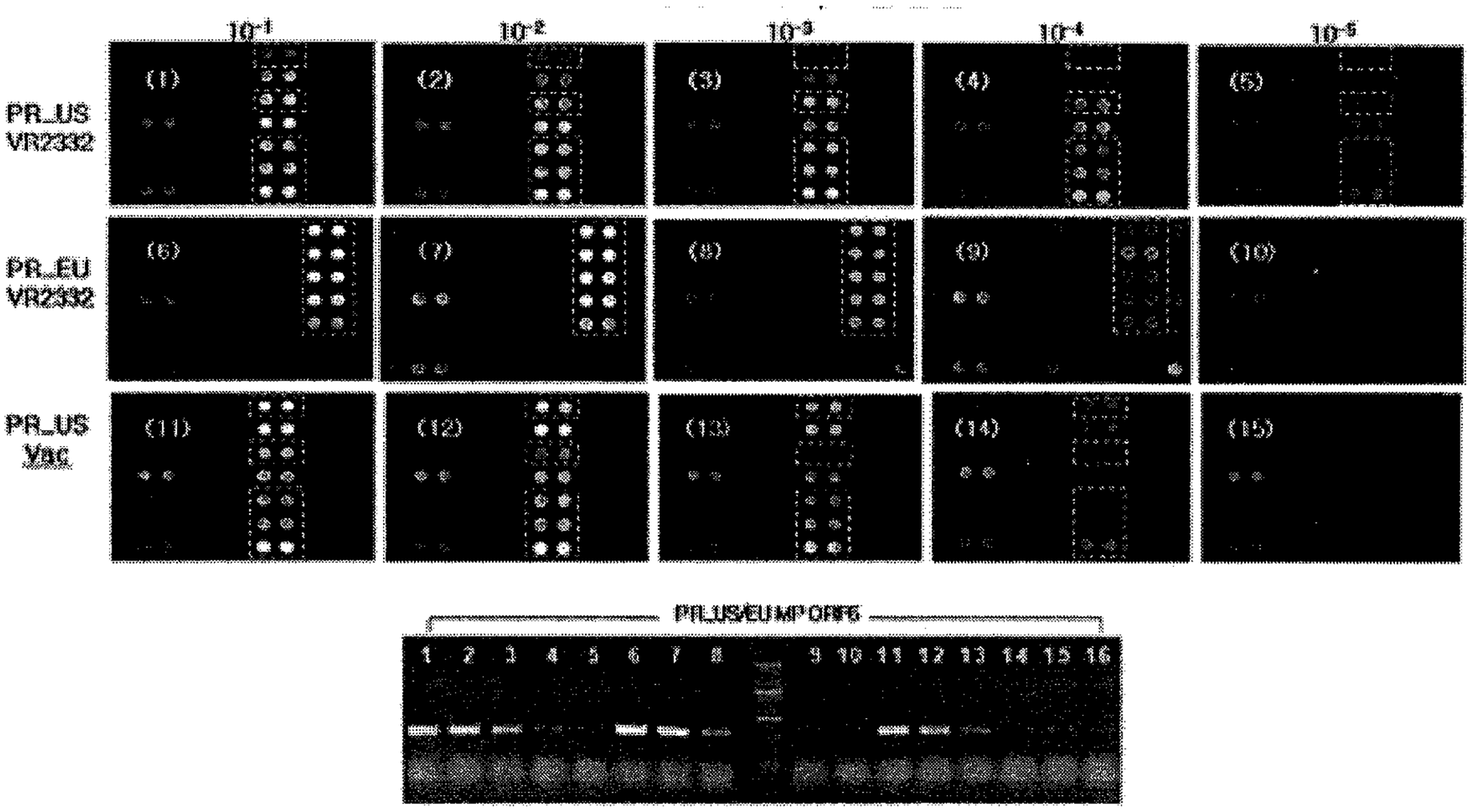


그림 53. PRRSV ORF6에서의 유전자 Probe의 반응성 검사

(2) PMWS Typing DNA Chip의 개선을 위한 재설계 및 평가

PRRSV의 검출능력을 개선하기 위해 PRRSV ORF6에 해당하는 유전자 Probe를 선발하여 향상된 유전자 칩의 Probe map을 설계하고 실험실 유효성을 재평가 하였다.

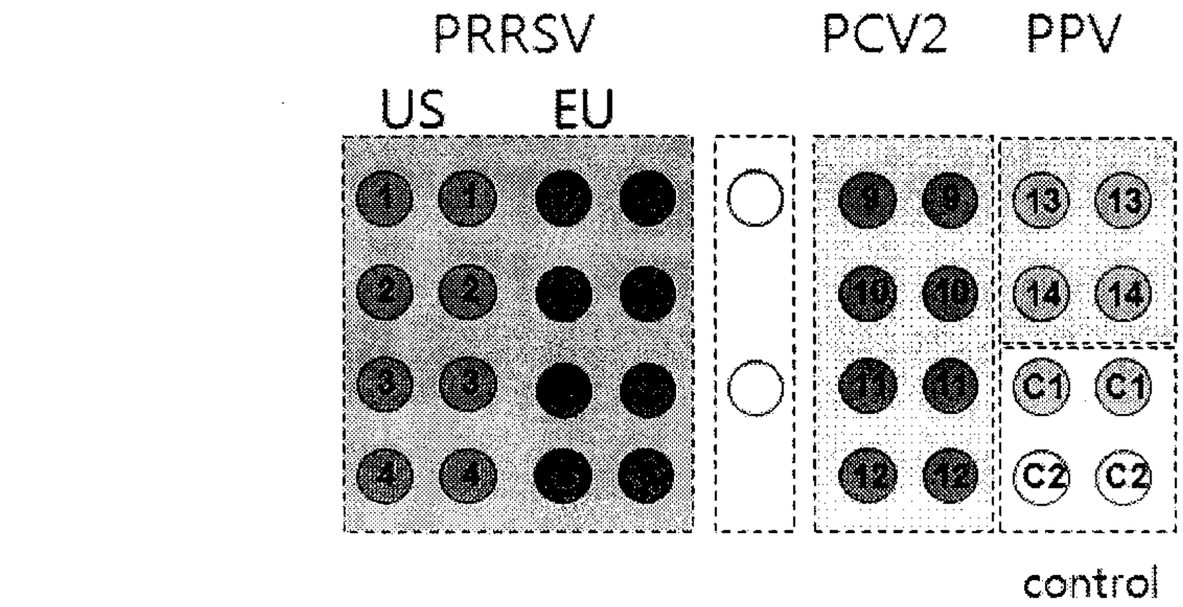


그림 54. PMWS Typing DNA Chip의 Probe Map 재설계 결과 (Ver 1.2)

유전자 Probe map에서 probe 1~8은 PRRSV영역으로 1~4는 PRRSV US주, 5~8은 PRRSV EU주 Probe를 위치시켰으며 PCV2 probe는 9~12 로 1차 평가결과를 토대로 결과 판독을 쉽게 하기 위하여 불필요한 probe를 제거하였다. 13~14는 1차와 동일하게 PPV 양성 probe를 위치시켰다. 특히 probe 3~4는 PRRSV의 생독백신에 사용되는 백신주 유전자 Probe를 위치시켜 SNP검사영역을 두어 야외주와 백신주를 감별하도록 고안하였다.

(3) PMWS Typing DNA Chip (1.2)의 실험실 유효성 평가

재설계된 DNA Chip의 실험실 유효성을 검사하기 위하여 각 virus의 type별 표준시료를 사용하여 이론적인 LOD를 측정한 결과 모든 시료에서 1ng/ul 수준의 우수한 검출감도를 나타내었다.

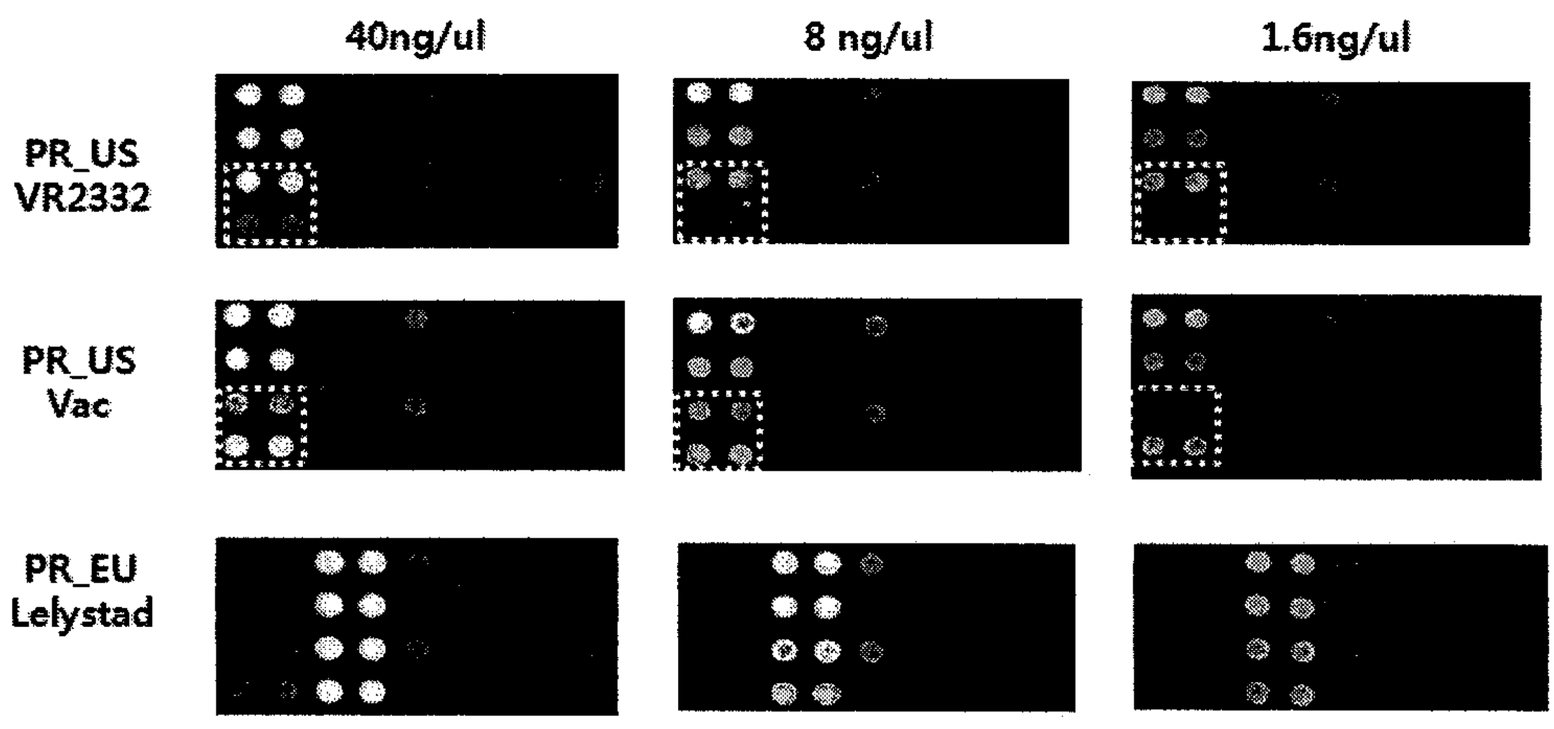


그림 55. PMWS Typing DNA Chip (Ver 1.2)의 PRRSV LOD 검사결과

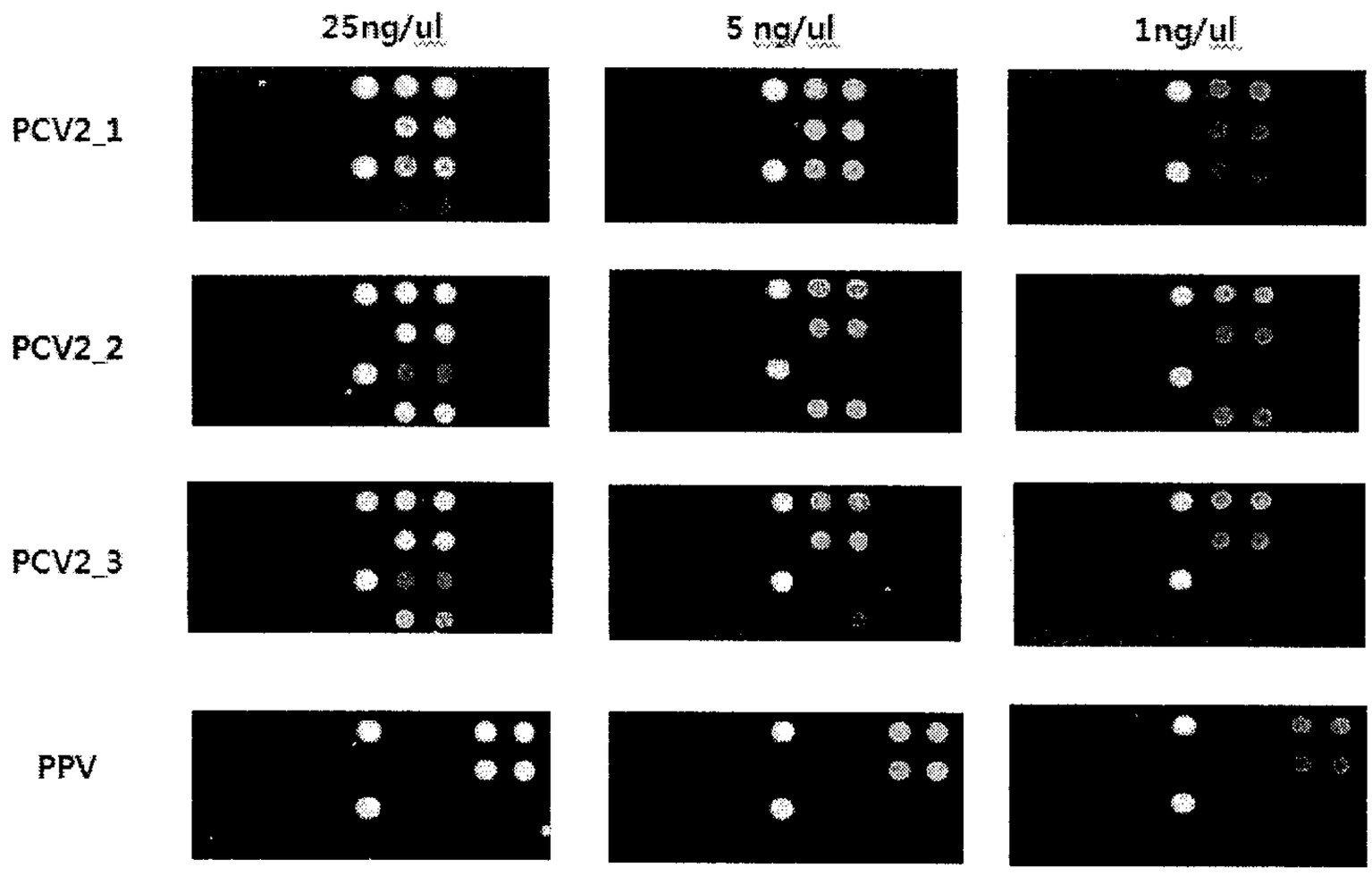


그림 56. PMWS Typing DNA Chip (Ver 1.2)의 PCV2/PPV LOD 검사결과

마. PMWS Typing DNA Chip의 2차 시제품 유효성 평가

개선된 유전자 증폭시약의 시제품과 유전자 칩 시제품을 각각 제작하고 국립수의과학검역원 바이러스과에서 보유하고 있는 야외표준시료를 이용하여 시제품의 유효성을 재평가하였다. 검사는 1차 유효성 평가와 동일한 방법으로 진행 하였다.

○ 국립수의과학검역원 야외시료 패널 (재선발)

야외시료는 1차 유효성 평가에 사용한 시료 중 부족한 시료를 제외하고 131개의 시료를 재 선발하여 유효성 평가에 사용하였다.

표 30. 국립수의과학검역원 야외시료 (재선발)

PRRSV ORF6 RT-PCR	No. of samples	PCV2 ORF2 PCR	
		+	-
+	82	44	38
-	49	49	
Total	**131**	93	38

(2) PMWS Typing DNA Chip용 MP RT-PCR 및 PCR 시약 시제품 유효성평가

야외시료 131개를 DNA Chip용 PRRSV ORF6 MP RT-PCR, PCV2/PPV MP-PCR 시제품에서 검사한 결과 모든 시료에서 우수한 민감도를 확인하였다.

표 31. 유전자 증폭시약 시제품의 야외시료에서의 검사결과

NVRQS	Result	No. of samples	PCR for DNA Chip (Cy3-labelled)					
			PRRSV-ORF6		PCV2-ORF2		PPV	
			+	-	+	-	+	-
PRRSV ORF6	+	82	77	5				
	-	49	27	22				
PCV2 ORF2	+	93			85	8		
	-	38			34	4		
PPV	NT	131					3	128
Total		**131**	**104**	**27**	**119**	**12**	**3**	**128**

(3) PMWS Typing DNA Chip 시제품의 유효성 검사

PRRSV MP RT-PCR과 PSV2/PPV MP PCR 시약 시제품으로 증폭된 시료를 PMWS Typing DNA Chip 시제품으로 검사하고 결과를 분석하였다.

○ PRRSV의 판정검사 결과

전기영동에서 PRRSV 양성 판정된 104개 시료에서는 DNA Chip에서 모두 양성으로 판정되었으며 전기영동 음성으로 판정된 27개 시료에서 3종을 양성으로 판정하였고 24개는 음성판정하였다. 전기영동에서 음성인데 유전자칩에서 양성으로 판정된 3개의 시료는 확인검사결과 양성으로 확인되어 전기영동보다 정확한 결과 판독이 가능함을 확인하였다.

표 32. PMWS typing DNA Chip 시제품에서 PRRSV의 검사결과

PRRSV RT-PCR	No. of samples	DNA Chip Results	
		+	-
+	104	104	
–	27	3	24
Total	**131**	**107**	**24**

* Positive FI > 5,000, Negative FI < 5,000

* Detector : Perkin Elmer Express HT, LP=90,PG=80

PRRSV 양성시료의 DNA Chip Typing 유형은 표준주인 A(VR2332), B(Vaccine)와 같은 Type이 7개의 시료에서 확인되었고, 대부분의 야외시료는 유전자변이가 있어 야외주 Type C, D, E로 확인되었다. 또한 2개의 시료가 유럽주로 판정되었으며 Type은 유럽주 표준주(Lelystad)와 다른 변이된 바이러스로 확인되었다. 그중 1개 시료는 미국주와 혼합 감염 되어 있음을 확인 하였다.

표 33. PMWS typing DNA Chip 시제품에서 PRRSV Typing 검사결과

PRRSV_ORF6 RT-PCR	No. of samples	DNA Chip Patterns						Sub-total	Negative
		US					EU		
		Standard		Wild			EU		
		a	b	c	d	e			
Positive	95	5	1	2	39	46	2(1)	95	
Doubt	9	1			1	7		9	
Negative	27					3		3	24
Total	131	6	1	2	40	55	2(1)	107	24
% Positive		5.6	0.9	1.9	37.4	51.4	1.9	100	

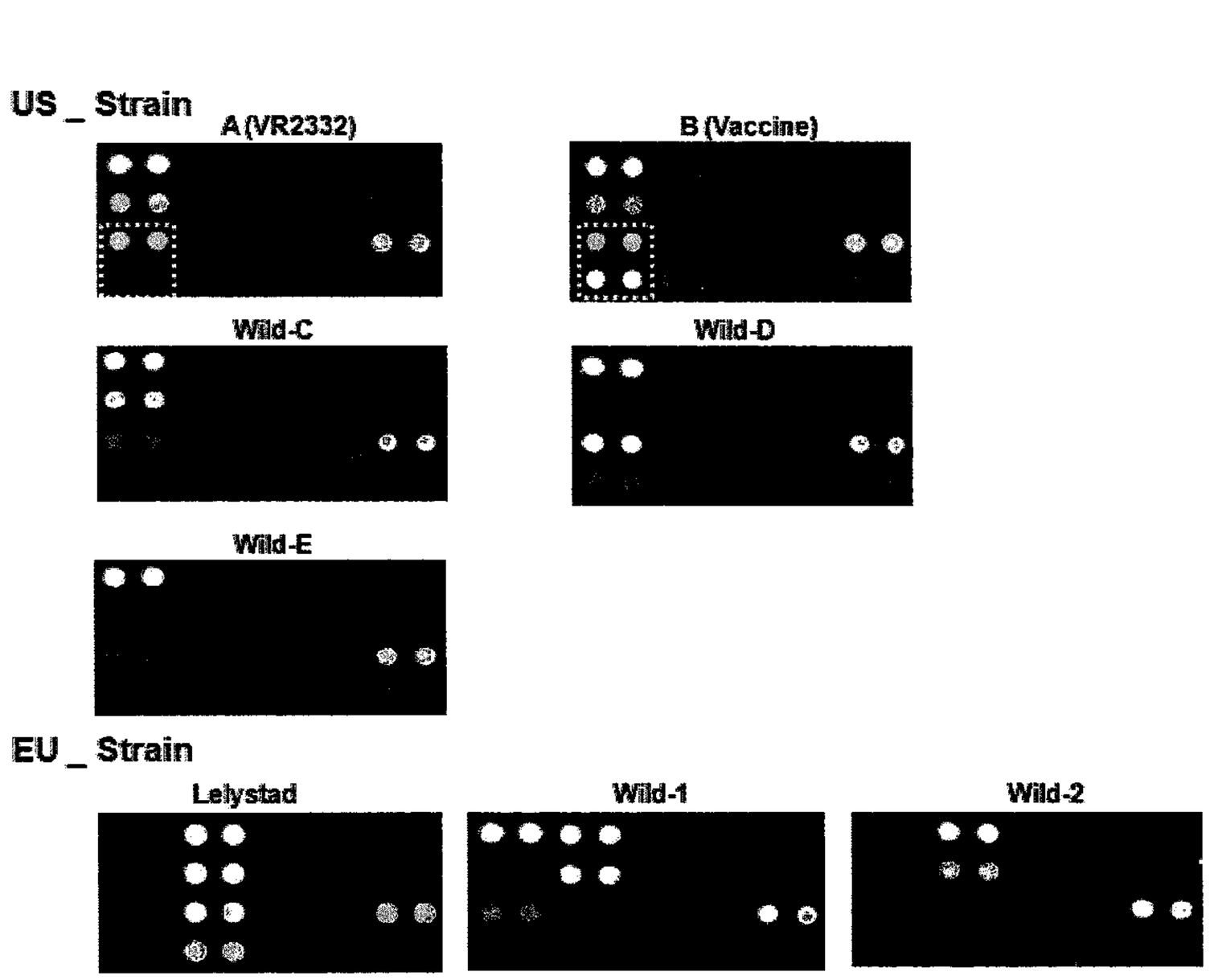


그림 57. PMWS Typing DNA Chip (Ver 1.2)에서 PRRSV의 Typing 반응

○ PCV2의 판정검사 결과

전기영동에서 양성으로 판정된 119개의 시료에서 DNA Chip에서는 모두 양성으로 판정하였으며 전기영동에서 음성판정된 9개의 시료도 양성으로 판정되어 유전자칩의 민감도가 보다 우수함을 확인 하였다.

표 34. PMWS typing DNA Chip 시제품에서 PCV2 검사결과

PCV2/PPV MP PCR	No. of samples	DNA Chip Results	
		Positive	Negative
Positive	119	119	
Negative	12	9	3
Total	131	128	3

* Positive FI > 5,000, Negative FI < 5,000

* Detector : Perkin Elmer Express HT, LP=90,PG=80

PCV2 양성시료의 DNA Chip Typing 유형은 T2형이 57개 시료에서 확인되어 가장 많았으며 T1, T3형도 다수 검출되었다. 또한 유전자 변이로 인하여 untyping되는 시료도 다수 확인되었다. Untyping 시료는 1차 유효성평가 때보다 감소하였으나 Type간 중복감염과 염기서열의 변이에 의한 것으로 유전자 모니터링 시 염기서열 분석대상 시료로 포함 할 필요성이 있는 것으로 확인되었다.

표 35. PMWS typing DNA Chip 시제품에서 PCV2 Typing 검사결과

PCV2/PPV MP PCR	No. of samples	DNA Chip Patterns				Sub-total	Negative
		T1	T2	T3	UT		
Positive	119	38	52	20	9	119	
Negative	12		5	3	1	9	3
Total	131	38	57	23	10	128	3
% Positive		29.7	44.5	18.0	7.8	100	

UT : Untyped

* Positive FI > 5,000, Negative FI < 5,000

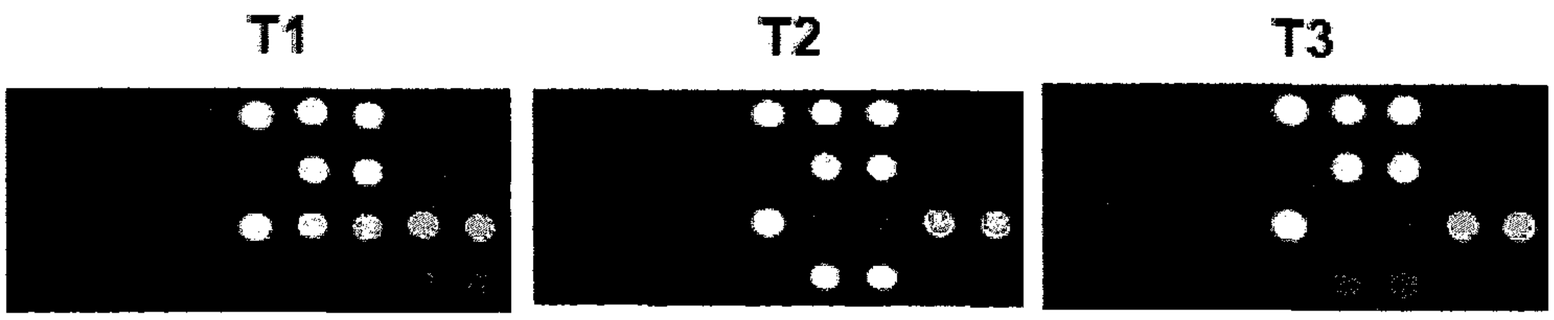


그림 58. PMWS Typing DNA Chip (Ver 1.2)에서 PCV2의 typing 반응

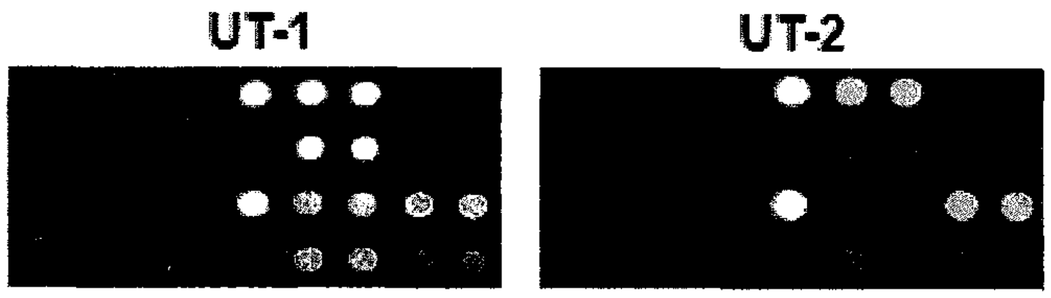


그림 59. PMWS Typing DNA Chip (Ver 1.2)에서 PCV2의 Unytping 시료의 반응

○ PPV의 판정검사 결과

전기영동에서 확인된 3개의 시료에서 DNA Chip에서는 모두 양성으로 판독되었다. 양성시료의 반응 pattern은 표준주인 NADL2와 모두 동일하였으며 PPV 단독감염은 존재하지 않았고 모두 PCV2와 중복 감염시료로 판독 되었다.

표 36. PMWS typing DNA Chip 시제품에서 PPV 검사결과

PCV2/PPV MP PCR	No. of samples	DNA Chip Results	
		Positive	Negative
Positive	3	3	
Negative	128		128
Total	131	3	128

* Positive FI > 5,000, Negative FI < 5,000

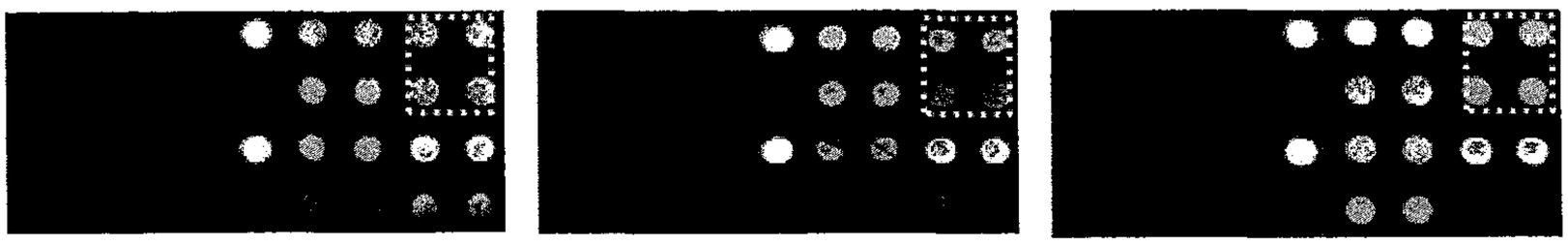


그림 60. PMWS Typing DNA Chip (Ver 1.2)에서 PPV의 반응 패턴

Ⅳ. 종합결과

1. 유전자 칩 설계 최적화

1차년도 연구에서 SNP 검사가 가능한 유전자 칩 고정화기술과 Hybridization 시약개발 및 반응 조건을 완성하였으며, 2차년도에는 유전자 칩의 사용편의성을 위한 slide well의 재설계 및 높은 검사 재현성 확보를 위한 검사도구를 개발하여 유전자 칩 사용방법과 스펙을 최적화하기 위한 연구를 진행하여 유전자 칩 진단시스템을 완성 하였다.

2. CSFV/BVDV Genotyping DNA Chip 개발

가. CSFV/BVDV Genotyping DNA Chip 및 유전자 증폭시약 개발

○ 국립수의과학검역원에서 제공된 유전자 염기서열을 기반으로 CSFV, BVDV에 대한 수십 종의 Probe를 설계하고 유전자 칩에서 유효성을 평가하고 최종적으로 CSFV 양성 및 SNP검사용 프로브, 유전형 확인용 프로브를 포함하여 총 8종, BVDV 3종의 프로브를 선발하였다.

○ CSFV/BVDV multiplex RT-PCR을 위한 Primer를 설계하여 유전자증폭 조건을 적정화 하고 PCR program을 확정하였다.

○ CSFV/BVDV multiplex RT-PCR을 이용한 유전자 증폭시약을 개발하고 검출한계를 측정한 결과 바이러스 역가 10^1 $TCID_{50}$까지 검출가능함을 확인하였다.

○ CSFV/BVDV Genotyping DNA Chip 의 검출한계 (LOD)를 측정한 결과 바이러스 유전자 1ng/ul, 바이러스 역가로 10^1TCID_{50}/100ul 까지 검출이 가능하였다. 또한 CSFV 백신주와 야외주를 감별할 수 있는 Single Nucleotide Polymorphism (SNP) 수준의 감별검사가 가능하였다.

○ cDNA 표준시료에서 DNA chip의 실험실 유효성을 평가한 결과 Probe별 반응의 변이계수가 PCR 결과물의 농도에 따라 변화하였는데 sample 농도 5ng/ul 이상에서는 평균 0-10%로 양호하였고, 검출한계농도인 1ng/ul에서는 30~40%로 비교적 높게 나타나는 전형적인 정량반응성을 보여 정확한 검사결과를 얻을 수 있었다.

나. CSFV/BVDV Genotyping DNA Chip 시제품 제작 및 야외 실증 유효성 평가

○ CSFV 5'NCR RT-PCR과 CSFV/BVDV MP RT-PCR 시제품은 모두 유전자 칩 검사에 사용이 가능하였고 MP RT-PCR 시제품에서 더 높은 양성시료 검출을 보였다.

○ 유전자 증폭 후 전기영동 판정결과와 유전자칩의 검사결과를 비교하면 전기영동에서 양성으로 판정된 시료는 100% 양성으로 판정하였고 전기영동에서는 육안으로 구분이 어려운 의양성 시료중 일부는 유전자 칩에서 양성으로 판정되었다.

○ Probe에 대한 FI값을 사용하여 TG-ROC 분석을 실시하고 판정기준을 측정한 결과 양성 Probe에 대한 FI값 5,000이상을 판정기준으로 설정할 수 있었으며 진단시약에서 요구되는 판정기준 설정이 가능하였으며 검사재현성을 가지고 있음을 확인하였다.

○ 백신주/야외주 SNP 검사의 경우 검역원의 유전자 염기서열 분석결과와 정확하게 일치하여 완전히 감별검사가 가능함을 확인하였다. 시료의 연도별로는 2004년 까지 전국적으로 야외주가 검출되었으며 2005년도에는 제주지역에 대해 백신주가 검출되었다.

○ MP RT-PCR 증폭시약 및 유전자칩 시제품을 사용하여 BVDV 유전자를 검사한 결과 CSFV 양성시료 중 세포배양 시료에서 CSFV/BVDV 중복 감염 시료가 존재함을 확인 하였다.

○ 117개의 표준주, 분리주 및 야외시료에서 유전형을 검사한 결과 CSFV 양성시료 중 genotype 1형이 57종, 2형이 53종 및 3형이 7종으로 확인 되었으며 유전자 염기서열 분석결과와 정확하게 일치하였다.

○ 2개의 양성 프로브에 반응양상이 다른 시료가 존재했으며 검역원의 염기서열 확인 결과 분리주에 비하여 낮은 수준의 변이가 있는 바이러스로 확인되어 유전자 칩이 바이러스 유전자의 염기서열 변화에 민감하게 반응함이 확인 되어 분자역학적 정밀검사에 효과적으로 사용될 수 있음을 확인하였다.

○ 이로서 기존의 RT-PCR 검사에 비하여 더욱 정밀하고 재현성있게 검사가 가능하며 1회의 검사로 보다 많은 유전정보의 획득이 가능한 CSFV/BVDV 유전형 감별검사용 CSFV/BVDV Genotyping DNA Chip 기술과 제품을 완성하였다.

3. PMWS 관련 바이러스 유전자 칩의 개발

가. PMWS 관련 바이러스 유전자 검사용 DNA Chip 및 유전자 증폭시약 개발

○ PMWS 관련 바이러스 PRRSV, PCV2, PPV에 대한 다양한 유전자 프로브를 설계한 뒤 유효한 PRRSV US주 probe 4종, EU주 3종, PCV2 양성 및 type 확인용 probe 10종, PPV 양성 확인용 2종을 선발하였다.

○ 유전자 칩에 사용 할 PMWS 관련 바이러스 유전자 증폭시약을 개발하기 위하여 다양한 Primer를 설계하여 평가하였으며 3종 바이러스 Multiplex RT-PCR을 PRRSV 662bp, PCV2 493bp, PPV 330bp를 1차 개발하였고 유전자칩과의 반응성을 개선하기 위하여 PRRSV ORF6 334-367bp로 추가 개발완료 하였다.

○ DNA/RNA 바이러스를 동시에 증폭하는 경우 유전자칩에서는 Hybridization의 재현성이 급격하게 하강하여 불규칙한 반응을 나타낸다는 사실을 확인하여 PRRSV MP RT-PCR과 PCV2/PPV MP PCR로 구분하여 유전자 증폭시약의 개발을 완료하였다.

○ 각 증폭시약의 최저검출한계를 측정한 결과 $1X10^1$ $TCID_{50}$/ml 까지 검출이 가능하여 우수한 성능을 나타내었다.

○ PMWS DNA Chip에 대해 정량된 PCR product 표준시료를 이용하여 각 virus별 검출한계를 측정한 결과 PRRSV US주에 대해 5ng/ul, PRRSV EU주에 대해 1.25ng/ul, PCV2, PPV에 대해 1.25ng/ul의 검출한계를 나타내어 PRRSV EU주, PCV2, PPV에 대한 검출 한계는 우수한 반면, PRRSV US주에 대해 상대적으로 검출한계가 낮음을 확인 하였으나 PRRSV US 주에 대한 pattern은 정확하게 나타남을 확인 하였다.

나. PMWS 관련 바이러스 DNA Chip 시제품제작 및 유효성 평가

○ 국립수의과학검역원에서 구축된 야외시료패널을 사용하여 2회에 걸쳐 유전자 증폭시약과 유전자칩 시제품의 유효성을 검사하였다. 1차검사에서는 159개 시료를 2차검사에서는 그중 131개 시료를 사용하여 평가에 사용하였다. 1차검사에서 나타난 문제점을 보완하고 시제품을 재구성하여 평가하였다.

○ 1차 야외시료(n=159) 검사결과 PRRSV의 검출 민감도가 80%내외로 개선이 필요하였으며 PCV2의 Typing 검사에서 Untyping이 너무 많아 개선이 요구되었다.

○ PMWS Typing DNA Chip의 개선을 위하여 PRRSV에 대한 Probe를 재선발하여 PRRSV US주 probe 4종, EU주 4종, PCV2 probe 4종, PPV양성 확인용 2종을 최종 선발하였고 PRRSV US/EU MP RT-PCR과 PCV2/PPV MP PCR 시제품을 개발완료하였다.

○ 2차 야외시료(n=131)에서의 시제품 유효성 평가결과 PRRSV는 104개 양성시료 중 104개 모두 양성으로 판정하였으며, 전기영동에서 음성으로 판정된 3개의 시료가 양성으로 판정되어 매우 우수한 검출감도를 보였다. 또한 PCV2, PPV에서도 전기영동에 비하여 우수한 검출감도를 나타내었다.

○ PMWS Typing DNA Chip 시제품에서 야외시료의 Typing 결과를 분석한 결과 PRRSV, PCV2의 Typing이 가능하여 유전자 모니터링에 사용가능할 것으로 판단되었다.

○ PRRSV는 대부분 US주가 검출되었고 2개의 EU주 시료가 확인되었다. 유전자 Typing은 대부분이 표준주인 VR2332에 비하여 변이가 많은 바이러스로 확인되었으며 EU주의 경우도 동일한 결과가 확인되었다.

○ PCV2는 국립수의과학검역원의 phylogenetic tree 분류와 동일하게 판독되었으나 10개의 시료는 untyping으로 분류되었다. PCV2 Type간 중복감염이 의심되나 추후 정밀검사가 필요한 것으로 판단되었다.

○ PPV는 표준주인 NADL2와 유전자 pattern이 모두 일치 하였다.

○ 따라서 PMWS Typing DNA Chip 기술과 제품을 모두 완성하였다.

V. 적 요

○ 결과활용

활용명	제 목	담당자	대상기관	비고
산업재산권	유전자 칩, 이를 이용한 돼지콜레라 바이러스 또는 소바이러스성 설사병바이러스 유전자의 검사방법 및 그를 포함하는 진단키트	검역원 (주)바이오메트릭스테크놀로지 (주)제노바이오텍	특허청	2006. 5
산업재산권	유전자 칩을 이용한 PMWS 관련 바이러스 (PRRSV,PCV2,PPV) 유전자의 유형의 검사방법 및 그를 포함하는 진단키트	검역원 (주)바이오메트릭스테크놀로지 (주)제노바이오텍	특허청	출원예정
기술전수	유전자 칩을 이용한 돼지콜레라 바이러스의 유전자 분석	검역원	논문	개제예정
기술전수	유전자 칩을 이용한 PMWS 관련바이러스의 유전자 유형분석	검역원	논문	재제예정
표준기술 활용	돼지콜레라 바이러스의 유전자 정밀검사기술 워크샵	검역원	방역기관 워크샵	활용예정
표준기술 활용	PMWS 관련 바이러스 유전자 정밀검사 기술 워크샵	검역원	방역기관 워크샵	활용예정
정책건의	돼지콜레라 바이러스의 유전자 정밀검사방법 (개정)	검역원	병성감정 실시요령	활용예정
기술이전	CSFV 및 PMWS 관련 바이러스 유전자칩 검사키트 (제품화, 산업화)	제노 바이오텍	기업체	실시계약 예정

VI. 인용문헌

1) D.J. Paton, A. McGoldrich, I. Greiser-Wilke, S. Parchariyanon, J.-Y. Song, P.P. Liou, T. Stadejek, J.P.Lowings, H. Bjorklund, S. Belak, Veterinary Microbiology, 2000, 73, 137.

2) Yoshihiro Sakoda, Shin-ichi Ozawa, Sudarat Damrongwatanapokin, Mitsuo Sato, Kiyoyasu Ishikawa, Akio Fukusho, Veterinary Microbiology, 1999, 65, 75.

3) Changchun Tu, Zonghi Lu, Hongwei Li, Xinglong Yu, Xiangtao Liu, Yuehong Li, Hongyong Zhang, Zhen Yin, Virus Research, 2001, 81, 29.

4) C. H. Pan, M. H. Jong, T. S. Huang, H. E. Liu, S. Y. Lin and S. S. Lai, Archives of Virology, 2005, 150, 1101.

5) Makoto Nagai, Michiko Hayashi, Shigeo Sugita, Yoshihiro Sakoda, Masashi Mori, Toshiaki Murakami, Tadashi Ozawa, Naoki Yamada, Hiroomi Akashi, Virus Research, 2004, 99, 103.

6) J.S. Park, H.J. Moon, B.C. Lee, W.S. Hwang, H.W. Yoo, D.Y. Kim, B.K. Park, Research in Veterinary Science, 2004, 76, 157.

7) M. Nagai, T .Ito, S. Sugita, A. Genno, K. Takeuchi, T. Oxawa, Y. Sakoda, T. Nishimori, K. Takamura and H. Akashi, Archives of Virology, 2001, 146, 685.

8) S.H. Cha, E.J. Choi, J.H. Park, S.R. Yoon, J.Y. Song, J.H. Kwon, H.J. Song, K.J. Yoon, Veterinary Microbiology, 2006, 117, 248.

9) M. Yoshii, Y. Kaku, Y. Murakami, M. Shimizu, K. Kato and H. Ikeda, Archives of virology, 2005, 2313.

10) Z. Q. Gao, X. Guo and H. C. Yang, Archives of virology, 2004, 149, 1341.

11) S.Y. Kang, S.I. Yun, H.S. Park, C.K. Park, H.S. Choi, Y.M. Lee, Virus Research, 2004, 104, 165.

12) E. Mateu, M. Martin, D. Vidal, Jpornal of General Virology, 2003, 84, 529.

13) T. Stadejek, A. Stankevicius, T. Storgaard, M. B. Oleksiewicz, S. Belak, T. W. Drew and Z. Pejsak, Journal of General Virology, 2002, 83, 1861.

14) C. Boisseson, V. Beven. L. Bigarre, R. Thiery, N. Rose, E. Eveno, F. Madec and A. Jestin, Jounal of General Virology, 2004, 85, 293.

15) R. Larochelle, R. Magar, S. D'Allaire, Virus Research, 2002, 90, 101.

16) C. Huang, J.J. Hung, C.Y. Wu, M.S. Chien, Veterinary Microbiology, 2004, 101, 209.