

## RT-PCR 기법을 이용한 분변내 소 코로나바이러스 검출

안재문, 조우영, 이종인, 조부제

충청북도 축산위생연구소

### Detection of bovine coronavirus in fecal samples by reverse transcriptase polymerase chain reaction

Jae-Moon Ahn, Woo-Young Cho, Jong-In Lee, Bu-Je Cho

Chungbuk Institute of Livestock and Veterinary Research

#### Abstract

The reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was used for the detection of bovine coronavirus (BCV) in fecal samples by using reverse transcriptase and two primers which flanked M gene sequence of 407bp. RT-PCR detected bovine coronavirus specifically, but did not detect mouse hepatitis virus (MHV), transmissible gastroenteritis virus (TGEV), and bovine rotavirus (BRV). The M gene sequences of MHV are homologous to that of BCV, but minor differences exist in the primer regions, preventing annealing of the primers. Detection of BCV using RT-PCR was compared with ELISA and the agreement of BCV detection by RT-PCR and ELISA was 95.3%. RNA detection in positive clinical specimens was significantly better by PCR than immunological detection of BCV by ELISA.

Key words : Bovine coronavirus, RT-PCR

#### 서 론

소 코로나바이러스는 생후 3~30일령 송아지 소장엔 침입하여 심한 장염으로 설사를 일으키고 탈수와 산성증을 유발하며 때로는 폐사를 일으킨다<sup>1-2)</sup>. 또한 장세포와 호흡기 상피세포에서 증식을 하여 장관에서 뿐 아니라 상부 호흡기도의 감염을 일으키는 것으로 알려져 있

다<sup>3)</sup>. 소 코로나바이러스는 일반적으로 임상형에 따라 설사를 일으키는 신생송아지 설사 (neonatal calf diarrhea)와 성우 설사 (epizootic diarrhea)의 2 유형이 있으며 이외에 최근에는 호흡기에 친화성을 가진 호흡기코로나 (bovine respiratory coronavirus)형이 나타나고 있다<sup>4)</sup>. 소 코로나바이러스는 겨울철에 일어나는 소의 설사증인 winter dysentery (WD)에서도 분리

되었으며 이 바이러스는 소 코로나바이러스 Mebus strain과 형태학적 및 항원적으로 비슷한 것으로 보고되었다<sup>5)</sup>. 소 코로나바이러스는 구형의 피막을 가진 바이러스로서 크기는 80~160nm이며 positive polarity를 가지는 single-stranded RNA genome을 가지고 있다<sup>1)</sup>. 소 코로나바이러스를 구성하는 주요한 구조단백질로서는 spike glycoprotein (S ; 150-200 kDa), membrane glycoprotein (M ; 20-30 kDa), nucleocapsid phosphoprotein (N ; 43-50 kDa), hemagglutinin (HE ; 60-65 kDa) 등 4가지로 구성되어 있다<sup>6)</sup>. S glycoprotein에는 A~D까지 4종의 항원부위가 있는데 중화와 관련된 determinant는 주로 A-B domain에 국한되어 있다<sup>6)</sup>. HE protein은 2개의 65k unit가 결합된 dimer로서 중화와 혈구응집에 관계되는 단백질인데 이것에 대한 단크론항체는 송아지에서 코로나바이러스 감염을 방어하였으며<sup>6)</sup> influenza C virus의 HE protein과 아미노산 배열이나 결합 및 효소작용 등에서 비슷한 것으로 나타났다<sup>7)</sup>. N protein은 virus의 RNA와 결합하여 helical nucleocapsid의 구조적 기초가 되며 세포성 면역에 관여하는 것으로 알려졌다<sup>8)</sup>. M protein은 membrane을 구성하는 성분인데 M gene의 sequence 분석결과 소 코로나바이러스, mouse hepatitis virus (MHV), human coronavirus OC43은 모두 동일한 것으로 나타났다<sup>9)</sup>.

소 코로나바이러스 감염증은 로타바이러스 감염증과 임상증상이나 발병일령이 비슷하여 감별하기 어렵다. 지금까지 효소면역법이나 전자현미경법 또는 형광항체법 등으로 감별진단하고 있으나<sup>10-12)</sup> 효소면역법과 형광항체법은 비특이적인 반응이 나타나는 경우가 있고, 전자현미경법은 고가의 시험장비가 필요한 단점이 있다. 송아지 설사의 특성상 발생 초기에 신속히 진단하여 치료하는 것이 매우 중요하지만 설사 발생초기의 검사가 가능한 가검물로는 분변 뿐이므로 분변에서 바이러스를 검출하는 것

이 진단법으로서 유용한 방법이다. 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction; PCR)은 열에 저항성이 높은 Taq DNA 중합효소를 도입함으로써 실용화되어 질병진단에도 널리 이용되고 있다. 본 실험에서는 소 코로나바이러스의 신속하고 정확한 진단을 위하여 RT-PCR법을 이용하여 송아지 설사변에서 코로나바이러스의 검출을 시도하였으며 진단법으로서의 가치를 확인하기 위하여 효소면역법과 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 표준바이러스 및 분리주

소 코로나바이러스 표준주(Kakegawa strain)는 국립수의과학검역원에서, mouse hepatitis virus와 transmissible gastroenteritis virus는 충북대학교에서 각각 분양 받아 사용하였고, 소 로타바이러스는 송아지 설사변에서 분리한 A strain을 사용하였다.

RT-PCR에 의한 코로나바이러스 검출용 재료로 송아지 설사변 중 ELISA 방법으로 소 코로나바이러스 양성으로 판정된 43개의 분변과 의 양성으로 판정된 10개의 분변, 그리고 코로나바이러스 음성으로 판정된 28개의 분변을 실험에 사용하였다.

### 바이러스 RNA 추출

소 코로나바이러스의 ssRNA는 phenol/chloroform 법으로 분변 또는 소 코로나바이러스가 감염된 MDBK cell에서 추출하였다. 먼저 분변재료를 Tris-CaCl<sub>2</sub> buffer (0.1M tris, 10mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4)로 1:5배 희석하여 600 $\mu$ l를 취하고 여기에 10% sodium dodecylsulfate (SDS) 60 $\mu$ l와 2M sodium acetate 30 $\mu$ l를 넣었다. 여기에 동량의 phenol을 넣고 15,000rpm으로 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리된 상층액을 취하여 동량의

chloroform을 넣고 같은 조건에서 원심분리하였다. 다시 상층액을 취하여 2M sodium acetate 120 $\mu$ l와 0.7 volume의 isopropanol을 넣고 -20 $^{\circ}$ C에서 overnight 한 다음 15,000rpm으로 4 $^{\circ}$ C에서 20분간 원심분리하였다. 상층액은 버리고 침전된 RNA를 70% ethanol로 세척한 다음 진공농축 원심분리기로 10분간 회전하면서 건조시켰다. 여기에 diethyl pyrocarbonate (DEPC)가 0.1% 첨가된 증류수를 20 $\mu$ l 넣어 RNA를 용해하였다. 소 코로나바이러스가 감염된 세포의 상층액은 Tris-CaCl<sub>2</sub> buffer로 희석하지 않고 위의 방법대로 RNA를 추출하였다.

#### Primer제작

소 코로나바이러스 matrix protein (M) gene 중에서 895-914 nucleotide sequence인 5'-GCCGATCAGTCCGACCAATC-3'를 sense primer로 사용하였고 1301-1283 nucleotide sequence인 5'-AGAATGTCTAGCCGGGGTAT-3'를 antisense primer로 사용하였다. RT-PCR에 의한 증폭산물은 407bp로 예상되었다.

#### 중합효소연쇄반응

cDNA를 합성하기 위하여 추출된 소 코로나바이러스 RNA 10 $\mu$ l에 2 $\mu$ l의 reverse primer를 넣어 95 $^{\circ}$ C에서 5분동안 denaturation한 후 꺼내어 5분동안 얼음에 보관하고 10,000rpm에서 5초 동안 원심분리하여 반응액을 침전시켰다. 여기에 DEPC로 처리된 증류수 20 $\mu$ l, 5 $\times$ PCR buffer 10 $\mu$ l, 0.1M dTT 5 $\mu$ l, 10mM dNTP 2 $\mu$ l, RNasin 1 $\mu$ l, reverse transcriptase 1 $\mu$ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 합성한 다음 이것을 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다. PCR 과정으로는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)로 처리된 증류수 30.5 $\mu$ l, 10 $\times$ PCR buffer 5 $\mu$ l, 25mM MgCl<sub>2</sub> 6 $\mu$ l, 10mM dNTPs 1 $\mu$ l, sense primer 1 $\mu$ l, antisense primer 1 $\mu$ l, cDNA template 5 $\mu$ l, Taq polymerase (5U/ $\mu$ l)를 0.5 $\mu$ l 넣었다.

PCR 조건은 denaturation과정으로 95 $^{\circ}$ C에서 45초, annealing 과정으로 50 $^{\circ}$ C에서 45초, 그리고 polymerization 과정으로 72 $^{\circ}$ C에서 1분을 설정하여 30 cycle을 거친 다음 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분동안 반응시킨 다음 -4 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

#### PCR 증폭산물의 확인

PCR로 증폭된 산물을 확인하기 위하여 5 $\mu$ l의 PCR 산물을 1 $\mu$ l의 gel loading buffer (0.25% bromophenol blue tracking dye in 25% Ficoll)와 혼합하여 ml당 0.5 $\mu$ g ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel에 loading한 후 100V에서 30분간 TAE buffer (0.04M tris-acetate, 0.001M EDTA)에서 mini-gel electrophoresis unit (MUPID-2)을 사용하여 전개하였다. 그 다음 UV transilluminator로 증폭유무를 확인하였다.

#### 효소면역법 (ELISA)

분변가검물에 대한 코로나바이러스의 존재여부를 간접항체 sandwich ELISA법으로 검사하였다. 96-well ELISA plate에 코로나바이러스에 대한 단클론항체를 coating buffer (pH 9.6)로 1 : 16,000으로 희석하여 100 $\mu$ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양한 다음 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 시킨 뒤 PBS로 3회 세척하였다. 비특이반응을 제거하기 위하여 1% bovine serum albumin (BSA)를 각 well에 150 $\mu$ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 배양하였다. 다시 microplate를 3회 세척하고 희석한 분변 검사재료를 100 $\mu$ l씩 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양하였다. 2차 항체로는 기니픽에 코로나바이러스를 접종하여 만든 고도면역혈청을 사용하였는데 이것을 1 : 2,000으로 희석하여 각 well에 100 $\mu$ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양하였다. conjugate는 peroxidase conjugated anti-guinea pig IgG를 사용하였고 substrate로 ABTS를 사용하였다. ELISA

reader로 450nm에서 판독하였다.

## 결 과

### RT-PCR의 특이성

소 코로나바이러스 표준주와 ELISA에서 양성으로 판정된 가검물에서 RNA를 추출하여 소 코로나바이러스 검출용 primer (sense and antisense)를 사용하여 RT-PCR를 수행하였다. 그 결과 소 코로나바이러스 표준주 kakegawa strain과 분변에서 추출한 RNA에서 약 407bp의 소 코로나바이러스 M gene에 특이적인 유전자 증폭산물이 관찰되었다. 그러나 muose hepatitis virus와 transmissible gastroenteritis virus, 소 로타바이러스 RNA 추출물에서는 특이적인 증폭산물이 나타나지 않아 RT-PCR법이 소 코로나바이러스에 특이성이 있는 것으로 나타났다 (Fig 1).

결과 6개는 양성 나머지 4개는 음성으로 나타나 양성과 음성을 확실히 구분할 수 있었다. ELISA에서 음성인 28개의 가검물은 RT-PCR법에서도 모두 음성으로 나타났다 (Table 1).

### 소 설사증의 감별진단

소 코로나바이러스, 소 로타바이러스, 대장균에 각각 감염된 것으로 판정된 송아지 설사변에서 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행한 결과 소 코로나바이러스에 감염된 것으로 판정된 설사변에서만 특이적인 유전자 증폭산물이 나

타났다. 따라서 이 방법으로 송아지 설사증을 신속하고 정확하게 감별 진단할 수 있는 것으로 나타났다 (Fig 2).

### 진단법의 비교

소 코로나바이러스의 검사법으로 기존에 사용하고 있는 ELISA법과 RT-PCR법을 비교한 결과 ELISA에서 양성을 나타낸 43개의 검사재료 중 41개가 RT-PCR에서 양성으로 나타났으며 2개는 음성으로 나타났다. ELISA에서 의양성인 10개의 가검물을 RT-PCR법으로 검사한 결과 6개는 양성 나머지 4개는 음성으로 나타나 양성과 음성을 확실히 구분할 수 있었다. ELISA에서 음성인 28개의 가검물은 RT-PCR법에서도 모두 음성으로 나타났다 (Table 1).

## 고 찰

소 코로나바이러스 감염증은 우리나라에서도 많이 발생되고 있는데 손 등<sup>13)</sup>은 국내에서 사육중인 소에서 코로나바이러스에 대한 항체가를 조사한 결과 1988년에 93.5%, 1989년에 96.0%, 1990년에 82.6%가 양성으로 나타나 소 코로나바이러스 감염증이 상당히 단연되어 있는 것을 밝혔으며, 이들 설사변에서 3주의 코로나바이러스를 분리한 바가 있다. 또한 정 등<sup>4)</sup>은 성우에서 심한 설사증과 체중감소, 유량 감소를 나타내는 소의 분변으로부터 코로나바이러스를 분리하여 우리 나라에도 신생송아지

Table 1. Comparison of bovine coronavirus detection between ELISA and RT-PCR

Samples	ELISA	RT-PCR	
		Positive	Negative
Positive	43	41	2
Suspect	10	6	4
Negative	28	-	28

설사형 이외에도 성우설사형이 발생됨을 확인하였다. 그러나 외국에서 보고된 호흡기형 코로나바이러스는 아직 보고된 바가 없다.

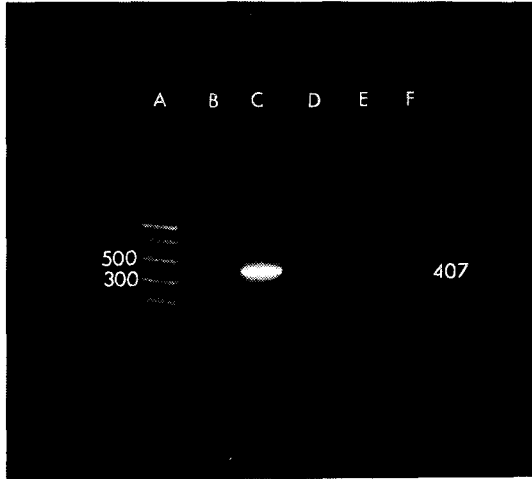


Fig 1. Specificity of RT-PCR for the detection of bovine coronavirus (lane A:PCR marker, B : BRV, C : BCV, D : TGEV, E : MHV, F : control)

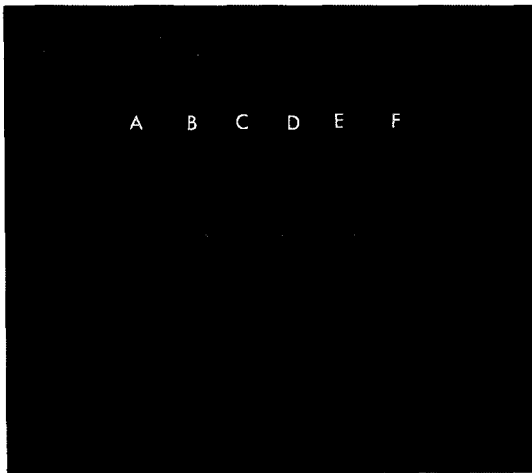


Fig 2. Differential diagnosis of calf diarrhea using RT-PCR (lane A : E coli, B~E : BCV, F : BRV)

소 코로나바이러스의 진단을 위해서 사용하는 방법으로는 분변에서 바이러스를 직접 관찰하는 전자현미경법과 분변에서 직접 바이러스

를 분리하는 방법, 효소면역법, 형광항체법 등이 있다. 전자현미경으로 코로나바이러스를 관찰하기 위해서는 분변 중에 많은 양의 바이러스가 존재하여야 하며<sup>14)</sup>, 또한 고가의 장비인 전자현미경이 갖추어지지 않은 실험실에서는 적용하기가 곤란한 단점이 있다. 분변 가검물로부터 코로나바이러스를 분리할 때에는 분변 중의 바이러스가 항체와 결합된 형태로 존재하기 때문에 바이러스의 분리가 어려운 점이 있다<sup>14)</sup>. 또한 야외 바이러스주는 배양세포에 잘 적응하지 못하기 때문에 바이러스의 분리가 잘 되지 않는다. ELISA방법과 형광항체법은 분변 중의 소 코로나바이러스 항원을 비교적 짧은 시간에 검출할 수 있으나 분변 중에 존재하는 여러 가지 성분들에 의해 비특이적인 반응이 나타나는 경우가 많으며 다른 바이러스 검출에 사용되는 ELISA법과 비교하여 볼 때 민감도가 떨어진다<sup>15)</sup>.

따라서 이번 실험에서는 분변 가검물에서 신속하고 간편하게 소 코로나바이러스를 검출하고자 RT-PCR법을 이용하였다. 그 결과 소 코로나바이러스가 감염된 것으로 확인된 분변 재료에서 코로나바이러스의 RNA의 특이적인 증폭산물을 검출할 수 있었다. 이번 실험에서 사용한 RT-PCR법은 ELISA에서 양성을 나타낸 43개의 가검물 중에서 41개가 양성으로 나타나 95.3%의 일치율을 보였으며 음성을 나타낸 2개는 실험과정이나 보존과정 중에 바이러스의 RNA가 손상되었기 때문으로 생각된다.

ELISA에서 의양성을 나타낸 가검물 10개는 RT-PCR법으로 6개가 양성으로 판정되었으며 정 등<sup>16)</sup>나머지 4개는 음성으로 나타나 이 방법으로 확실히 바이러스의 존재여부를 구별할 수 있었다. 그리고 ELISA에서 음성인 가검물 28개는 RT-PCR법에서도 음성으로 나타났다 (Table 1).

정 등<sup>16)</sup>은 송아지 및 성우의 설사변으로부터 8주의 코로나바이러스를 분리하여 RT-PCR법

으로 S1 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 659bp의 증폭산물을 얻었으며 증폭된 분리주들의 S1 유전자에 대한 제한효소 분석결과 분리주간의 차이는 없었다고 하였다. Verbeek 등<sup>17)</sup>은 소 코로나바이러스 M gene에 특이적인 probe를 PCR법으로 제작하여 다른 바이러스와 감별진단한 결과 IBV, TGEV, HCV-229E는 이 방법으로 검출되지 않았다고 하였으며 Homberger 등<sup>18)</sup> M gene sequence에 대한 primer로 설치류의 코로나바이러스를 검출하기 위하여 RT-PCR을 실시한 결과 항원적으로 비슷한 BCV와 HCV (OC43, 229E)는 검출되지 않았는데 이는 이들 바이러스의 M gene sequence가 MHV와 유사하지만 primer에 존재하는 작은 차이 때문에 primer의 annealing을 방해하기 때문이라고 하였다. 이러한 차이는 Lapps 등<sup>19)</sup>에 의해 MHV와 BCV의 아미노산 유사율이 87%로 상당히 높으며 주요한 차이는 주로 O-glycosylation 부위인 amino-terminus라고 한데서도 밝혀졌다. 이번 실험에서도 소 코로나바이러스와 항원적으로 비슷한 MHV를 RT-PCR법으로 시험한 결과 특이적인 증폭산물이 검출되지 않아 이번 실험에서 제작된 primer는 소 코로나바이러스에만 특이적인 것으로 나타났다. MHV외에 항원적인 차이가 있는 TGEV, BRV도 RT-PCR법으로 검출되지 않아 특이성을 확인할 수 있었다.

이 실험은 설사증을 나타내는 송아지의 분변으로부터 신속하게 코로나바이러스를 검출하고자 primer를 제작하여 RT-PCR법을 수행한 결과 특이적인 증폭산물이 생성되어 특이성을 확인하였고 다른 바이러스에 대한 실험결과 다른 바이러스는 이 방법에 의해 검출되지 않아 비 특이적인 반응은 거의 없는 것으로 나타났다. 따라서 RT-PCR법을 이용할 경우 중전의 방법보다 비교적 신속하고 간편하게 코로나바이러스 감염증을 진단할 수 있다고 판단되었다.

## 결 론

RT-PCR법을 이용하여 소 코로나바이러스의 신속한 진단을 하고자 소 코로나바이러스에 반응하는 primer를 합성하여 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 그 결과 RT-PCR법은 다른 바이러스와 교차반응 없이 특이적으로 소 코로나바이러스만 검출할 수 있었다. 또한 송아지 설사증을 일으키는 로타바이러스와 대장균은 검출되지 않아 이 방법을 이용하여 송아지 설사증을 신속하고 정확하게 진단하는 것이 가능한 것으로 나타났다. 이 시험에 사용한 RT-PCR법은 기존의 소 코로나바이러스 항원 검출법인 효소면역법과 95.3%의 일치율을 보였다.

## 참 고 문 헌

1. Saif LJ, Brock KV, Redman DR, *et al.* 1991. Winter dysentery in dairy herds : electron microscopic and serological evidence for an association with coronavirus infection. *Vet. Rec* 128 : 447~449.
2. Dea S, Michaud L, Milane G. 1995. Comparison of bovine coronavirus isolates associated with neonatal calf diarrhea and winter dysentery in adult dairy cattle in Quebec. *J Gen Virol* 76 : 1263~1270.
3. Heckert RA, Saif LJ, Myers GW, *et al.* 1991. Epidemiologic factors and isotype specific antibody responses in serum and mucosal secretions of dairy calves with bovine coronavirus respiratory tract and enteric tract infections. *Am J Vet Res* 52 : 845~851.
4. 정정원, 장미선, 조광현 등. 1997. 성우형 코로나바이러스의 중감염증례 보고. *수의*

- 과학 논문집 39 : 19~23.
5. Tsunemitsu H, Saif LJ. 1995. Antigenic and biological comparisons of bovine coronaviruses derived from neonatal calf diarrhea and winter dysentery of adult cattle. *Arch Virol* 140 : 1303~1311.
  6. Deregt D, Babuik LA. 1987. Monoclonal antibodies to bovine coronavirus : characteristics and topographical mapping of neutralizing epitopes on the E2 and E3 eins. *Virology* 161 : 410~420.
  7. Vautherot JE, Madelaine MF, Boireau P, et. al. 1992. Bovine coronavirus peplomer glycoproteins; detailed antigenic analysis of S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> and HE. *J Gen Virol* 73 : 1725~1737.
  8. Saif LJ. 1993. Coronavirus Immunogens. *Vet Microbiol* 37 : 285~297.
  9. Dea S, Verbeek AJ, Tijssen P. 1990. Antigenic and genomic relationships among turkey and bovine enteric coronaviruses. *J Virol* 64 : 3112~3118.
  10. Crouch CF, Raybould TJG, Acres SD. 1984. Monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine enteric coronavirus. *J Clin Microbiol* 19 : 388~393.
  11. Sato M, Akashi H. 1993. Detection of bovine coronavirus by enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *J Vet Med Sci* 55 : 771~774.
  12. Thorns CJ, Bell MM, Chasey D, et al. 1992. Development of monoclonal antibody ELISA for simultaneous detection of bovine coronavirus, rotavirus serogroup A, and Escherichia coli K99 antigen in feces of calves. *Am J Vet Res* 53 : 36~43.
  13. 손성완, 장정호, 박봉균 등. 1991. 소 코로나바이러스 감염증 발생조사. 시험연구보고서 111~112.
  14. Benfield DA, Saif LJ. 1990. Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows with winter dysentery. *J Clin Microbiol* 28 : 1454~1457.
  15. Smith DR, Tsunemitsu H, Heckert RA. 1996. Evaluation of two antigen-capture ELISAs using polyclonal or monoclonal antibodies for the detection of bovine coronavirus. *J Vet Diagn Invest* 8 : 99~105.
  16. 정정원, 조재진, 조인수 등. 1997. 국내 송아지 및 성우의 설사변으로부터 소 코로나바이러스 분리 및 특성조사. 수의과학논문집 39 : 11~18.
  17. Verbeek A, Dea S, Tijssen P. 1990. Detection of bovine enteric coronavirus in clinical specimens by hybridization with cDNA probes. *Molecular Cellular Probes* 4 : 107~120.
  18. Homberger FR, Smith AL, Barthold SW. 1991. Detection of rodent coronaviruses in tissues and cell cultures by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 29 : 2789~2793.
  19. Lapps W, Hogue BG, Brian DA. 1987. Sequence analysis of the bovine coronavirus nucleocapsid and matrix protein genes. *Virology* 157 : 47~57.