

## Multiplex RT-PCR에 의한 돼지 바이러스 설사증의 감별 진단

황보원 · 김도경 · 김은경 · 김용환\* · 여상건\*\*<sup>1</sup>

경남축산진흥 연구소, \*경상대학교 수의과대학, \*\*경북대학교 수의과대학

(게재승인: 2006년 8월 16일)

## Differential Diagnosis of Porcine Viral Diarrhea by Multiplex RT-PCR

Bo-Won Hwang, Toh-Kyung Kim, Eun-Gyeong Kim, Yong-Hwan Kim\* and Sang-Geon Yeo\*\*<sup>1</sup>

Gyeongnam Provincial Veterinary Laboratory, Chinju 660-985, Korea

\*College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

\*\*College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

**Abstract :** In the present study, methods of the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were evaluated for the rapid detection and differentiation of transmissible gastroenteritis virus (TGEV), porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) and rotavirus in piglets suffering from diarrhea. For the purposes, the PCR conditions were first confirmed for the amplification of VP7 gene of rotavirus and N gene of TGEV and PEDV using each specific primers and their annealing temperature. Multiplex RT-PCR methods were further determined to distinguish these viral infections and the results are as follows. For the specific amplification of these viral genes, the reliable PCR condition was determined as 30 cycles of reaction consisting each 1 min of denature at 94°C, annealing at 42°C and polymerization at 72°C with 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>. It was able to differentiate these viral infections in the intestines and feces of piglets suffering from diarrhea by duplex PCR for TGEV and PEDV and single PCR for rotavirus with a primer-annealing temperature of 42°C. When the multiplex RT-PCR were undertaken for the field samples, 17 cases of PEDV and 5 cases of rotavirus infections were differential diagnosed in a total of 92 samples of intestines and feces of the piglets with diarrhea.

**Key words :** TGEV, PEDV, rotavirus, PCR.

### 서 론

자돈의 설사증은 양돈 산업에서 가장 큰 피해를 주는 질병으로서 대장균증, 살모넬라증, 적리, Lawsonia 감염증 등 세균성인 것과 전염성위장염(transmissible gastroenteritis, TGE), 유행성설사(porcine epidemic diarrhea, PED), 로타바이러스 감염증 등의 바이러스성, 콕시듐증 등의 기생충성인 것이 알려져 있다. 특히 TGE, PED 및 rotavirus 감염증은 자돈의 높은 폐사율로 큰 경제적 손실을 입히고 있으며, 병태가 유사하여 발생시에는 감별 진단에 어려움이 많다(13).

TGE는 1946년 미국에서 최초로 확인된 세계 여러 나라에서 발생되고 있다. 이 병은 1주일 이하의 자돈에서 구토, 수양성 설사 및 탈수로 인하여 100%에 달하는 높은 폐사율과 이병을 나타내고 있으며, 3주일 이상의 이유자돈이나 육성돈에서는 간헐적인 구토, 설사 및 식욕부진 증상을 보이지만 회복되는 예가 많다(3,11). TGE virus (TGEV)는

Coronaviridae과의 Coronavirus속이며 positive sense의 single-stranded RNA를 소유하는데 이로부터 nucleocapsid (N) protein, membrane protein 및 spike (S) protein 등의 주요 구조단백질이 발현된다(5,12).

PED는 1978년 벨지움에서 처음 발생되어 원인 바이러스가 분리된 이후 유럽, 불가리아, 일본, 중국, 한국 등에서 발생되고 있다. 이 병은 모든 연령의 돼지에서 감수성을 나타내어 구토, 설사, 탈수 증상을 보이며, 특히 생후 1-2주령의 포유자돈에서 90%에 달하는 폐사율을 보인다(10). PED virus (PEDV)는 TGEV와 동일한 coronavirus이며 single-stranded RNA로부터 N, M, S protein 등의 구조단백질이 발현된다(1,2,4,8,14).

Rotavirus에 의한 돼지의 설사증은 주로 3주령 및 이유자돈에서 연중 발생하며, TGE, PED와 비교할 때 감염율은 높지만 폐사율이 낮은 것이 특징이다(17). Reoviridae과에 속하는 rotavirus는 11개의 분절로 된 double-stranded (ds) RNA를 갖는데 이 RNA들로부터 6개의 구조단백질(VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7)이 생산된다(16,17).

<sup>1</sup>Corresponding author.  
E-mail : sgyeo@knu.ac.kr

자돈에서 바이러스성 설사증의 발생으로 인한 피해를 줄이기 위하여는 무엇보다도 조기에 정확한 진단이 이루어져야 하지만 TGE, PED, rotavirus 감염증은 임상 및 병리 소견에 의한 감별이 어려운 실정이며, 원인체의 감별이 진단상 효과적이지만 바이러스 분리배양, 중화시험 등에 많은 시간이 소요되고 있다. 또한 조직에 감염하고 있는 바이러스의 항원 및 유전자의 진단에 immunohistochemistry, in situ hybridization 등이 특이적으로 이용되고 있으나 병리조직 제작에 장시간이 소모되어 신속한 진단에는 어려움이 있다. 최근에 병원체의 유전자를 검출할 수 있는 polymerase chain reaction (PCR)에 의하여 다양한 감염증의 원인체가 진단되고 있으며 반응이 신속하여 효과적으로 이용되고 있다. 따라서 이 PCR을 TGEV, PEDV, rotavirus의 특정 유전자 검출에 적용하면 이들 감염증의 특이진단이 가능할 것으로 생각된다.

이 연구에서는 TGEV, PEDV 및 rotavirus에 의한 설사증의 특이진단 및 신속감별이 가능한 multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (multiplex RT-PCR)법을 수립하고자 하였으며, 야외 재료에 대하여 이 multiplex RT-PCR법을 적용하여 진단특이성을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 바이러스

이 연구를 위하여 국립수의과학검역원으로부터 분양받은 TGEV 대전주와 rotavirus Gottfried주를 사용하였으며, PEDV는 국내 분리주인 Chinju99주(9)를 사용하였다. TGEV는 minimal essential medium (MEM) (Invitrogen)을 사용하여 ST 세포에서 배양하였으며, PEDV는 Hofmann과 Wyler(6)의 방법에 따라 trypsin (10 µg/ml)이 첨가된 MEM을 사용하여 Vero 세포에서 배양하였다. 또한 rotavirus는 Kang 등(7)의 방법에 따라 trypsin (5 µg/ml)이 첨가된 MEM을 사용하여 MA104 세포에서 배양하였다. 이들 바이러스를 세포에 감염시킨 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 배양하여 세포변성효과가 나타나면 -70°C에 보관하면서 RNA 추출에 사용하였다.

### Virus RNA 추출

공시 바이러스 배양액 및 바이러스 검사 대상 야외재료의 유제를 각각 3회 동결, 용해한 후 8,000 rpm에서 3분간 원심 분리하여 상층액 300 µl를 취한 후 RNA 추출에 사용하였다. RNA 추출은 RNeasy<sup>®</sup> Mini kit (Qiagen)를 사용하여 제조사에서 제시하는 술식에 따라 실시하였다. 추출된 RNA는 diethyl pyrocarbonate 액으로 처리된 증류수에 용해하여 -70°C에 보관하면서 cDNA 합성에 사용하였다.

### Oligonucleotide primers

Rotavirus에 대한 primer는 GenBank (National Center for Biotechnology Information, USA)에 등록되어 있는 돼

**Table 1.** Strains of porcine rotavirus A used in comparison of the nucleotide sequences of VP7 gene

Name of isolates	VP7 serotypes	Length of nucleotides (bases)	Accession No. on GenBank data base
CMP034	G2	1,062	DQ534015
CMP039	G3	1,062	AY707788
CMP096	G3	1,062	DQ256502
CMP099	G3	1,062	DQ256503
Gottfried	G4	1,062	X06759
OSU	G5	1,062	X04613
CMP178	G5	1,062	DQ515961
Hokkaido-14	G9	1,061	AB176677
JP3-6	G9	1,061	AB176678
JP13-3	G9	1,061	AB176679
JP16-3	G9	1,061	AB176680
JP29-6	G9	1,061	AB176681
JP32-4	G9	1,061	AB176682
JP35-7	G9	1,061	AB176683
A2	G9	1,061	AB180971
CMP003	G9	1,061	AY707787
ICB2185	G9	1,062	AF192267
O-1	G9	1,063	AB180972
P343	G10	1,062	U35850
RU172	G12	1,062	DQ204743
JL94	Unknown	1,062	AY538665
4F	Unknown	1,062	L10360
4S	Unknown	1,062	L10361
YM	Unknown	1,062	M23194

지 rotavirus group A 분리주 (Table 1)를 대상으로 하여 VP7 유전자의 G 혈청형 (유전형)별 염기서열을 검색하여 ClustalW (version 1.6) program으로 염기의 동질성을 비교한 후 선정하였다. TGEV 및 PEDV에 대한 primer는 그 annealing 온도가 rotavirus에 대한 PCR 시의 annealing 온도와 일치하도록 GenBank 상에서 TGEV 및 PEDV의 N 유전자의 염기서열을 검색한 후 선정하였다. 이렇게 하여 각 바이러스의 해당 유전자에 대하여 상보적인 sense primer와 antisense primer를 제작하였다 (Table 2).

### cDNA 합성

바이러스의 유전자에 대한 first-strand cDNA를 생산하기 위하여 Superscript III reverse transcriptase kit (Invitrogen)를 사용하였다. 즉, 공시 바이러스 또는 바이러스 검사대상 야외재료로부터 추출된 RNA 14.5 µl에 DMSO 2 µl, 1 µl의 antisense primer를 가하고 5분 동안 끓인 후 얼음에서 냉각시켰다. 이어서 5X buffer 6 µl, 0.1 M DTT 3 µl, 10 mM dNTP mixture 2 µl, RNasin 1 µl 및 supRTase 0.5 µl를

**Table 2.** Primers used in the PCR for the amplification of rotavirus VP7, TGEV N and PEDV N genes

Primers	Sequences (5'→3')	Positions of target nucleotides	Sizes of DNA amplified (bp)
Rota-S	GGCTTTAAAAGAGAGAATTC	1-21	1,062
Rota-AS	GGTCACATCATAACAATTCTAA	1042-1062	
TGE-1S	TAGATGGAGTTGTCTGGG	326-343	408
TGE-1AS	CACCTTTACCTGCAGTTC	716-733	
TGE-2S	CAGTGTAGAACAAGCTGTTC	564-583	361
TGE-2AS	GTGTGTGAACGTGACTTCT	906-924	
TGE-3S	CAAACACACCTGGAAGAG	699-716	422
TGE-3AS	CCTGTGTGTCATCAAACAC	1102-1120	
PED-1S	CATTTCTACTACCTCGGAAC	220-239	626
PED-1AS	CTCCACTCTGGGATGTCT	828-845	
PED-2S	ACTACCTCGGAACAGGAC	228-244	625
PED-2AS	AATTCTCCTCCACTCTGG	835-852	
PED-3S	TGAACCTAACACACCTCC	405-422	640
PED-3AS	CTCGTAAGAGTCCGCTAG	1027-1044	
PED-4S	TAACACACCTCCTGCTTC	411-428	635
PED-4AS	TCTCGTAAGAGTCCGCTA	1028-1045	

순서대로 첨가한 후 20°C에서 5분, 50°C에서 40분, 95°C에서 5분간 RT 반응을 시켜 cDNA를 얻었으며 -20°C에 보관하면서 PCR에 사용하였다.

### PCR

바이러스 또는 바이러스 검사대상 야외재료로부터 TGEV, PEDV 및 rotavirus의 유전자를 검출하기 위한 PCR을 다음과 같이 실시하였다. 즉, first-strand cDNA 10 µl에 10× PCR buffer 4 µl, 0.2 mM dNTP mixture 1 µl, 20 pM sense primer 1 µl, 20 pM antisense primer 1 µl, 2.5 unit의 Taq DNA polymerase (Invitrogen) 및 DMSO를 2%되게 넣고 멸균 증류수를 가하여 반응액의 총량을 50 µl로 하였다. 이 혼합액을 94°C에서 5분간 예비 denature 시킨 후 94°C에서 1분간 denature, 42°C, 1분간 annealing, 72°C, 1분간 polymerization 반응을 30회 실시하였고, 최종적으로 72°C에서 5분간 extension 반응을 1회 실시하였다.

또한 이들 바이러스의 유전자를 한 반응계에서 감별 검출할 수 있는 multiplex RT-PCR법을 수립하기 위하여, 한 시험관에 TGEV, PEDV의 cDNA 각 10 µl 또는 TGEV, PEDV, rotavirus의 cDNA 각 10 µl와 이들에 대한 sense primer 1 µl, antisense primer 1 µl 및 상기 시약 중의 나머지를 혼합하여 duplex PCR 또는 triplex PCR을 실시하였다.

### MgCl<sub>2</sub> 적정농도 조사

PCR 반응 시에 MgCl<sub>2</sub>의 농도를 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mM로 하여 비 특이반응을 최소화 할 수 있는 적정 농도를 조사하였다.

### 전기영동

PCR에 의하여 증폭된 DNA 10 µl에 6× loading buffer (0.03% bromophenol blue, 30% glycerol, 30 mM EDTA, 0.03% xylene cyanol) 2 µl를 혼합한 뒤 ethidium bromide가 첨가된 1% agarose gel에서 전기영동 하였다.

### 야외재료에 대한 적용

세포 배양된 바이러스로부터 유전자 검출이 가능하도록 수립된 PCR 조건을 이용하여, 최근 2년간 경상남도 축산진흥 연구소에 설사증 원인 진단을 위하여 의뢰된 설사 자돈의 장 조직 또는 분변 재료 92 예에 대하여 PCR법을 적용하여 진단 특이성을 조사하였다.

### 결 과

TGEV, PEDV 및 rotavirus에 의한 자돈 설사증의 특이 감별진단을 위한 multiplex RT-PCR법을 수립하기 위하여, 일차적으로 TGEV, PEDV 유전자와의 동시 PCR 반응 시에 비 특이반응이 다양하게 나타나기 쉬운 ds-RNA를 가진 rotavirus의 VP7 유전자에 대한 PCR을 실시하였다.

이 PCR에 사용할 primer를 제작하기 위하여 GenBank에 등록되어 있는 돼지 rotavirus A 24주의 VP7 유전자의 염기 서열을 G 혈청형별로 조사하였다. 그 결과 5'말단부의 1~21번에 해당하는 21 bases (5'GGCTTTAAAAGAGAGAATTC3')에서 G10형 1주 (P343)와 G 혈청형 미상의 2주 (4F, 4S)의 염기 동질성이 95.2%이었던 것을 제외하고는 G2형 1주, G3형 3주, G4형 1주, G5형 2주, G9형 11주, G12형 1주 및 G 혈청형 미상의 2주 등 21주에서 혈청형에 관계없이

**Table 3.** Nucleotide sequence homology of 21 bases at 5'-end in VP7 gene of porcine rotavirus A strains with different VP7 serotypes

Name of isolates	VP7 serotypes	Nucleotide sequences at 5'-end GGCTTTAAAAGAGAGAATTC	Homology (%)
CMP034	G2	-----*	100
CMP039	G3	-----	100
CMP096	G3	-----	100
CMP099	G3	-----	100
Gottfried	G4	-----	100
OSU	G5	-----	100
CMP178	G5	-----	100
Hokkaido-14	G9	-----	100
JP3-6	G9	-----	100
JP13-3	G9	-----	100
JP16-3	G9	-----	100
JP29-6	G9	-----	100
JP32-4	G9	-----	100
JP35-7	G9	-----	100
A2	G9	-----	100
CMP003	G9	-----	100
ICB2185	G9	-----	100
O-1	G9	-----	100
P343	G10	-----C-----	95.2
RU172	G12	-----	100
JL94	Unknown	-----	100
4F	Unknown	-----C-----	95.2
4S	Unknown	-----C-----	95.2
YM	Unknown	-----	100

\*Only the nucleotides that mismatched the sequence of 21 bases at 5'-end were included.

염기 동질성이 100%이었다 (Table 3).

또한 3'말단부의 1042~1062번에 해당하는 21 bases (5'TTAGAATTGTATGATGTGACC3')에서 G5형 1주 (OSU) 및 G 혈청형 미상의 2주 (4F, 4S)의 염기 동질성 95.2%와 G10형 1주 (P343)의 염기 동질성 90.5%이었던 것을 제외하고는 G2형 1주, G3형 3주, G4형 1주, G5형 1주, G9형 11주, G12형 1주 및 G 혈청형 미상의 2주 등 20주에서 염기 동질성이 100%이었다 (Table 4).

이와 같이 5'말단부에서 95.2~100%의 동질성을 나타내는 21 bases로 sense primer를 제작하였고 3'말단부에서 90.5~100%의 동질성을 나타내는 21 bases에 대한 상보적인 염기 서열로 antisense primer를 제작한 후 PCR을 수행한 결과, 42°C annealing 조건에서 rotavirus VP7 유전자의 전 길이에 해당하는 1,062 bases 크기의 특이 DNA가 증폭되었다 (Fig 1).

이 PCR 조건에 의한 multiplex PCR 반응 시에 TGEV와 PEDV로부터 특이 유전자를 검출할 수 있는 primer를 선정하고자, TGEV 및 PEDV에 대한 수종의 primer를 이용하여

PCR를 실시하였다. 그 결과 TGEV와 PEDV로부터 각각 422 bases 및 625 bases의 DNA를 증폭할 수 있었으나 대부분의 primer들에 의하여 비 특이 DNA가 동시에 증폭되었다. 이들 중 TGEV에 대한 PCR 1예 (6번)와 PEDV에 대한 PCR 1예 (16번)에서 비 특이반응이 없었다 (Fig 2). 따라서 이들 PCR 반응에서 사용되었던 TGE-3S와 TGE-3AS primer, PED-2S와 PED-2AS primer를 multiplex PCR를 위한 primer로 선정하였다.

한편 TGEV 및 PEDV에 대한 PCR 반응시의 적절한 MgCl<sub>2</sub> 농도를 조사하였을 때, 1.0 mM 농도에서 가장 특이적인 반응을 보였다 (Fig 3).

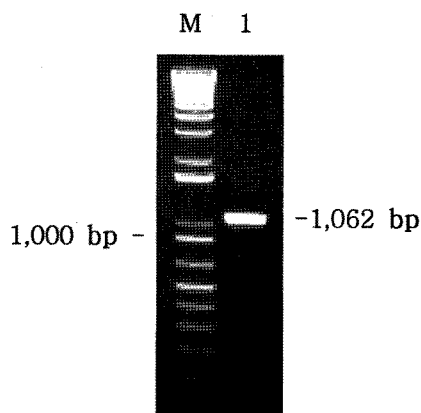
이와 같은 PCR 조건에 따라 TGEV와 PEDV에 대하여 duplex PCR을 실시하였던 결과, 각 바이러스로부터 single PCR에서와 동일한 수준으로 특이 DNA가 검출되었다 (Fig 4).

TGEV와 PEDV에 대하여 확인된 duplex PCR 조건에 따라 rotavirus를 포함하는 이들 3종 바이러스에 대하여 triplex PCR을 실시하였을 때, 각 바이러스에 대한 single PCR 시에는 관찰되지 않았던 비 특이 DNA가 다수 증폭되어

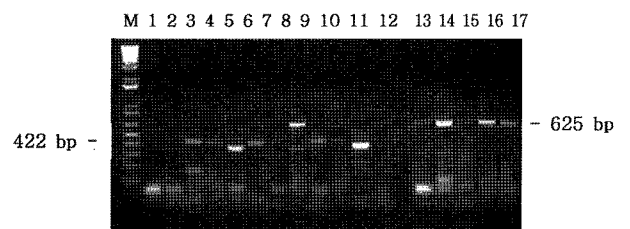
**Table 4.** Nucleotide sequence homology of 21 bases at 3'-end in VP7 gene of porcine rotavirus A strains with different VP7 serotypes

Name of isolates	VP7 serotypes	Nucleotide sequences at 3'-end TTAGAATTGIATGATGTGACC	Homology (%)
CMP034	G2	-----	100
CMP039	G3	-----	100
CMP096	G3	-----	100
CMP099	G3	-----	100
Gottfried	G4	-----	100
OSU	G5	-----C-----	95.2
CMP178	G5	-----	100
Hokkaido-14	G9	-----	100
JP3-6	G9	-----	100
JP13-3	G9	-----	100
JP16-3	G9	-----	100
JP29-6	G9	-----	100
JP32-4	G9	-----	100
JP35-7	G9	-----	100
A2	G9	-----	100
CMP003	G9	-----	100
ICB2185	G9	-----	100
O-1	G9	-----	100
P343	G10	----C-A-----	90.5
RU172	G12	-----	100
JL94	Unknown	-----	100
4F	Unknown	-----G-----	95.2
4S	Unknown	-----G-----	95.2
YM	Unknown	-----	100

\*Only the nucleotides that mismatched the sequence of 21 bases at 3'-end were included.



**Fig 1.** DNA amplified from VP7 gene of rotavirus by PCR. lane 1, VP7 DNA; M, 1kb plus DNA ladder (Invitrogen, USA).

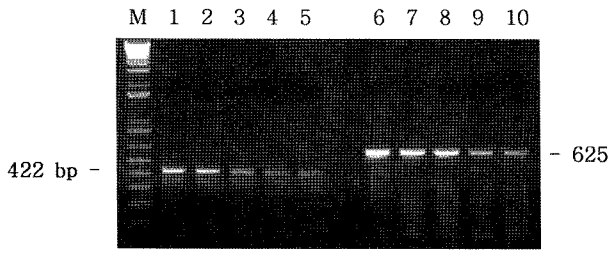


**Fig 2.** DNAs amplified from N genes of TGEV and PEDV by PCR using various primer sets. lanes 1-12, TGEV N DNAs; lanes 13-17, PEDV N DNAs; M, 1kb plus DNA ladder (Invitrogen).

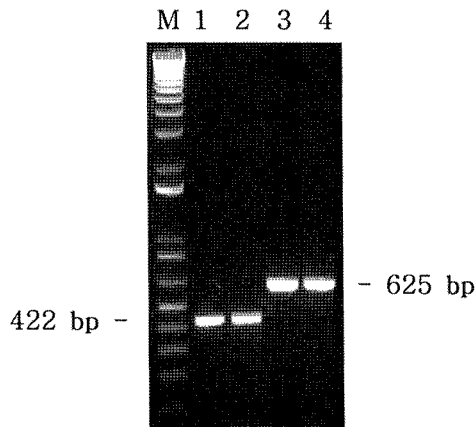
TGEV, PEDV 및 rotavirus에 대한 triplex PCR의 특이 반응성은 인정되지 않았다 (Fig 5).

따라서 이러한 PCR 조건을 적용하여 야외에서 입수된 자돈의 장조직 및 분변 재료를 대상으로 TGEV와 PEDV에 대한 duplex PCR과 rotavirus에 대한 single PCR을 한 PCR 반응기의 동일한 annealing 온도 (42°C)하에서 병행하였을 때, 이들 3종 바이러스의 감별진단이 가능하였다 (Fig 6).

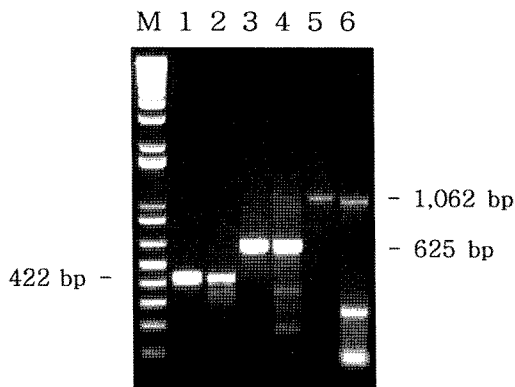
이와 같이 수립된 TGEV와 PEDV에 대한 duplex PCR



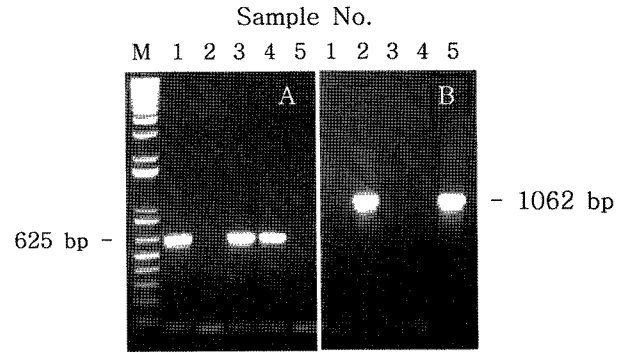
**Fig 3.** DNAs amplified from N genes of TGEV and PEDV by PCR with various MgCl<sub>2</sub> concentration. lanes 1, 2, 3, 4 and 5, TGEV N DNAs by MgCl<sub>2</sub> of 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 mM, respectively; lanes 6, 7, 8, 9, and 10, PEDV N DNAs by MgCl<sub>2</sub> of 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 mM, respectively; M, 1kb plus DNA ladder (Invitrogen).



**Fig 4.** DNAs amplified from N genes of TGEV and PEDV by single and duplex PCR. lanes 1 and 2, TGEV N DNAs by single and duplex PCR, respectively; lanes 3 and 4, PEDV N DNAs by single and duplex PCR, respectively; M, 1kb plus DNA ladder (Invitrogen).



**Fig 5.** DNAs amplified from TGEV, PEDV and rotavirus by PCR with annealing at 42°C: lanes 1 and 2, TGEV N DNAs by single and triplex PCR, respectively; lanes 3 and 4, PEDV N DNAs by single and triplex PCR, respectively; lanes 5 and 6, rotavirus VP7 DNAs by single and triplex PCR, respectively; M, 1kb plus DNA ladder (Invitrogen).



**Fig 6.** Differential diagnosis of PEDV, TGEV and rotavirus by multiplex PCR for the same field samples with annealing at 42°C in a thermocycler: (A) PEDV DNAs were detected from samples 1, 3 and 4 by duplex PCR for TGEV and PEDV; (B) rotavirus DNAs were detected from samples 2 and 5 by single PCR for rotavirus; M, 1kb plus DNA ladder (Invitrogen).

**Table 5.** Results in the differential diagnosis of viral agents in piglets suffering from diarrhea by RT-PCR

No. of samples <sup>a</sup>	Diseases diagnosed by PCR			
	TGEV	PEDV <sup>b</sup>	Rotavirus <sup>c</sup>	Others
92	0	17	5	70

<sup>a</sup>Samples consisted of intestines and feces.

<sup>b</sup>PEDV was distinguished from TGEV by duplex PCR.

<sup>c</sup>Rotavirus was diagnosed by single PCR.

및 rotavirus에 대한 single PCR 조건을 돼지 설사병 진단을 위하여 의뢰되었던 가검물에 적용하였을 때, 총 92예의 설사자돈의 장조직과 분변 재료 중 PEDV 및 rotavirus 감염증이 각각 17예와 5예로 감별진단 되었다 (Table 5).

## 고 찰

Rotavirus는 VP6 항원의 구조에 따라서 A-G의 7가지 혈청형으로 분류되고 있으며 돼지에서는 A, B, C 및 E 형의 감염이 보고 되어 있다. 이들 중 A형은 돼지에서 설사증을 일으키는 rotavirus의 주된 혈청형으로 알려져 있으며, 나아가서 돼지 rotavirus A는 glycoprotein (G) 성분으로 구성되어 있는 VP7 항원의 구조에 의하여 10종의 G 혈청형 (G1~G6, G8~G11)으로 구별되고 있다 (17).

따라서 TGEV, PEDV 및 rotavirus에 의한 자돈 설사증의 특이 감별진단을 위한 multiplex RT-PCR법을 수립함에 있어서, 먼저 rotavirus A의 VP7 항원의 다양한 G 혈청형으로부터 유전자를 검출할 수 있는 PCR 기법이 요구되었다. 이를 위하여 GenBank에 등록되어 있는 돼지 rotavirus A 분리주 24주의 G 혈청형별 VP7 유전자의 염기서열을 확인하여, 95.2~100%의 동질성이 있는 VP7 유전자의 5'말단부 및 90.5~100%의 동질성이 있는 3'말단부에 각각 상보적인 21 bases 크기의 sense primer 및 antisense primer를 제작하여 사용함으로써 VP7 유전자의 전체 크기에 해당하는

1,062 bases의 DNA를 증폭 할 수 있었다.

이와 같은 방법에 의하여 rotavirus의 VP7 유전자를 특이적으로 증폭할 수 있는 PCR 조건이 수립되었다. 하지만 이 rotavirus의 VP7 유전자 검출에 적합하였던 PCR (42°C annealing) 조건을 TGEV와 PEDV에 적용하였을 때, Winiarczyk 등(16)의 보고에서와 같이 다양한 비 특이반응을 관찰할 수 있었다. 따라서 수종의 primer를 사용하여 annealing 온도 42°C에서 TGEV와 PEDV에 대한 PCR을 실시하여, 비 특이반응이 최소화 될 수 있는 sense 및 reverse primer로서 각각 TGE-3S (5'CAAACACACCTGGAAGAG3')와 TGE-3AS (5'CCTGTGTGTCATCAAACAC3') 및 PED-2S (5'ACTACCTCGGAACAGGAC3')와 PED-2AS (5'AATTCTCCTCCACTCTGG3')를 선정할 수 있었다.

한편 PCR 시약 중 MgCl<sub>2</sub>는 template DNA에 대한 primer의 annealing 작용에 영향을 미치는데, Mg<sup>2+</sup> 이온의 농도가 높으면 DNA의 double helix를 안정시켜서 denature가 잘 일어나지 않는다. 반면에 농도가 너무 낮으면 Taq DNA polymerase의 작용을 위한 co-factor의 역할을 제대로 수행하지 못하여 DNA extension이 제대로 일어나지 않는다(18). 그러므로 적정 MgCl<sub>2</sub> 농도가 결정되어야 할 것으로 사료되어, 1.0-3.0 mM 수준으로 TGEV와 PEDV의 유전자 증폭에 적용하였던 결과 1.0 mM 농도에서 가장 특이적인 PCR 반응을 나타내었으며 비 특이 DNA를 제거할 수 있었다(18).

이와 같이 결정된 annealing 온도, primer 및 MgCl<sub>2</sub> 농도를 적용하여 TGEV, PEDV 및 rotavirus에 대한 triplex PCR을 실시하였을 때, single PCR 및 duplex PCR에서는 볼 수 없었던 비 특이 DNA가 다수 나타남으로서 이들 3종 바이러스에 대한 triplex PCR은 실제상의 문제점이 인정되었다. 즉 PCR에 의한 유전자 증폭 시에 흔히 비 특이반응에 의한 DNA가 출현하는데, 감염병의 원인체 진단을 위한 PCR 시에는 이러한 비 특이 DNA가 형성되지 않아야 특이적 진단이 가능한 것으로 생각된다. 이 연구에서 PCR의 최적조건을 찾자 세포배양계에서 증식시킨 바이러스로부터 추출된 RNA에 대한 cDNA를 합성할 때 오염된 세포 RNA에 대하여 primer들이 비 특이적으로 결합하거나, 합성된 바이러스 cDNA의 비 특이적 부위에 primer들이 결합하는 것 외에는 비 특이 반응이 유발될 수 있는 RNA 또는 DNA의 오염이 최소화 되었음에도 불구하고 비 특이 DNA가 관찰되었다. 또한 이들 3종 바이러스의 RNA에 대한 first-strand cDNA 생산시와 PCR 반응에서 각 한 쌍씩 총 6종의 primer가 한 시험관내에서 동시 사용되었기 때문에, 이들 primer들로부터의 비 특이반응이 일어나서 다수의 DNA가 증폭된 것으로 추측되었다(15). 그러므로 야외 가검체료를 대상으로 triplex PCR을 실시할 경우 핵산의 오염기회가 더 높음으로서 비 특이반응에 기인하여 진단 특이성이 더욱 낮을 것으로 생각되었다.

이와 같이 3종의 바이러스에 대한 triplex PCR에서는 반응 특이성의 한계가 있음으로서 annealing 온도를 42°C로 동

일화하여, 설사증 진단을 위하여 의뢰된 야의 재료에 대하여 TGEV와 PEDV의 감별을 위한 duplex PCR과 rotavirus의 진단을 위한 별개의 single PCR 반응을 한 PCR 반응기에서 병행하였을 때 이들 3종 바이러스의 감별진단이 이루어질 수 있었다.

따라서 이 연구에서 수립된 TGEV와 PEDV 감별을 위한 duplex PCR법 및 rotavirus 진단을 위한 single PCR법을 이들 설사증의 동시 감별진단을 위한 RT-PCR 방법으로 제시하고자 한다.

## 결 론

이 연구에서는 TGEV, PEDV 및 rotavirus 감염증의 특이적 진단 및 신속감별을 위한 multiplex RT-PCR법을 수립하기 위하여 PCR의 조건 및 반응성을 조사하였다. 또한 수립된 multiplex RT-PCR 방법을 이용하여 야의 재료에 대한 진단 특이성을 확인하였으며 그 결론은 다음과 같다.

1. TGEV와 PEDV의 N 유전자 및 rotavirus의 VP7 유전자의 특이진단을 위한 PCR 조건은 총 30회전의 94°C denature, 42°C annealing 및 72°C polymerization 각 1분 반응이었으며, 이때 최적 MgCl<sub>2</sub>의 농도는 1.0 mM이었다.

2. 이 PCR 조건으로 TGEV와 PEDV에 대한 duplex PCR 및 rotavirus에 대한 single PCR을 병행하였을 때 이들 3종 바이러스의 감별이 가능하였다.

3. 이 multiplex RT-PCR 반응법을 야의 설사 자돈의 장 조직 및 분변 재료에 적용하였을 때, 총 92예의 자돈 장 조직 및 분변 재료로부터 PEDV 17예, rotavirus 감염증 5예가 감별 진단되었다.

## 감사의 글

이 논문은 경상남도 지자체주도 연구개발 지원사업의 연구비 (No. RTI04-03-07)에 의하여 수행되었음.

## 참 고 문 헌

1. Chasey D, Cartwright SF. Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhea. Res Vet Sci 1978; 25: 255-256.
2. Debouck P, Pensaert MB. The pathogenesis of an enteric infection in pigs experimentally induced by the coronavirus-like agent, CV777. Vet Microbiol 1981; 6: 157-165.
3. Doyle LP, Hutching LM. A transmissible gastroenteritis in pigs. J Am Vet Med Assoc 1946; 108: 257-259.
4. Egberink HF, Ederveen J, Callebaut P, Horzinek MC. Characterization of the structural proteins of porcine epizootic diarrhea virus, strain CV777. Am J Vet Res 1988; 49: 1320-1324.
5. Garwes DJ, Pocock DH. The polypeptide structure of transmissible gastroenteritis virus. J Gen Virol 1975; 29: 25-34.
6. Hofmann M, Wyler R. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. J Clin Microbiol 1988; 26: 2235-2239.

7. Kang SY, Saif LJ, Miller KL. Reactivity of VP4-specific monoclonal antibodies to a serotype 4 porcine rotavirus with distinct serotypes of human (symptomatic and asymptomatic) and animal rotaviruses. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2744-2750.
8. Knuchel M, Ackermann M, Muller H, Kihm U. An ELISA for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) based on the specific solubility of the viral surface glycoprotein. *Vet Microbiol* 1992; 32: 117-134.
9. Lee HK, Yeo SG. Biological and physicochemical properties of porcine epidemic diarrhea virus Chinju99 strain isolated in Korea. *J Vet Clin* 2003; 20: 150-154.
10. Pensaert MB, Yeo SG. Porcine epidemic diarrhea. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire SD, Taylor DJ, *Diseases of Swine*. 9th ed. Ames: Blackwell Publishing, 2006: 367-372.
11. Saif LJ, Sestak K. Transmissible gastroenteritis and porcine respiratory coronavirus. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire SD, Taylor DJ, *Diseases of Swine*. 9th ed. Ames: Blackwell Publishing, 2006: 489-516.
12. Spaan W, Cavanagh D, Horzinek MC. Coronaviruses: structure and genomic expression. *J Gen Virol* 1988; 69: 2939-2952.
13. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE. Hagan and Bruner's *Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals*. 8th ed. Ithaca: Comstock Publishing Association, 1988.
14. Utiger A, Tobler K, Bridgen A, Suter M, Singh M, Ackermann M. Identification of proteins specified by porcine epidemic diarrhoea virus. *Adv Exp Med Biol* 1995; 380: 287-290.
15. Williams JF. Optimization strategies for the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 1989; 7: 762-769.
16. Winiarczyk S, Paul PS, Mummidi S, Panek R, Gradzki Z. Survey of porcine rotavirus G and P genotype in Poland and the United States using RT-PCR. *J Vet Med* 2002; 49: 373-378.
17. Yuan L, Stevenson GW, Saif L. Rotavirus and reovirus. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire SD, Taylor DJ, *Diseases of Swine*. 9th ed. Ames: Blackwell Publishing, 2006: 435-447.
18. 황동희, 여상건. 오제스키병 바이러스 검출을 위한 polymerase chain reaction. *대한수의학회지* 2003; 43: 239-246.