

< Original Article >

등온증폭법을 이용한 돼지인플루엔자바이러스 신속 진단법 개발

김은미^{1,3} · 전효성⁴ · 김지정⁴ · 김희정¹ · 신연경² · 송재영² · 여상진¹ · 박취규^{1*}

경북대학교 수의과대학 & 수의전염병제어센터¹, 농림축산검역본부 바이러스과², (주) RAD³, (주)엠모니터⁴

Loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of swine influenza virus

Eun-Mi Kim^{1,3}, Hyo-Sung Jeon⁴, Ji Jung Kim⁴, Hee-Jung Kim¹, Yeun-Kyung Shin²,
Jae-Young Song², Sang-Geon Yeo¹, Choi-Kyu Park^{1*}

¹College of Veterinary Medicine & Animal Disease Intervention Center, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea, ²Virology Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Anyang 430-757, Korea, ³RAD Inc., Daegu 718-913, Korea, ⁴Mmonitor Inc., Daegu 700-842, Korea

(Received 19 May 2015; revised 15 June 2015; accepted 22 June 2015)

Abstract

In this study, we developed a rapid, sensitive and specific reverse-transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for detection of swine influenza virus (SIV) including major subtypes of swine influenza viruses H1N1, H1N2 and H3N2, and a novel subtype of influenza A virus that accidentally infected in pig population. The RT-LAMP was completed in 40 min at 58°C and the sensitivity of the RT-LAMP (1 copy/μL) was 10-fold higher than conventional reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) (10 copy/μL) and the same to real time RT-PCR (1 copy/μL). Also, the result of the RT-LAMP can be confirmed without any detection system. Therefore, the RT-LAMP could be a alternative diagnostic method for SIV detection in national SIV monitoring system and clinical diagnostic laboratory in the future.

Key words : Swine influenza virus (SIV), Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), Real time RT-PCR (rRT-PCR)

서 론

A형 인플루엔자 바이러스(influenza A virus; IAV)는 조류와 포유동물 집단에 교차감염 되면서 유전적 변이가 지속되고 있어, 과거 여러 차례 있어 왔던 pandemic influenza의 발생 예에서 보듯이 인류의 보건을 위협하는 새로운 변이주가 출현할 가능성이 상존한다(Vijaykrishna 등, 2010). 이에 따라 세계보건기구나 세계동물보건기구에서는 사람 및 동물집단에 감염되는 IAV에 대한 지속적인 감시활동의 필요성을 제기하여 왔으며, 특히 2009년 대유행한 2009 pan-

demic influenza virus H1N1 (pH1N1)이 유럽 및 북미 지역의 돼지 집단에서 유행하던 돼지 인플루엔자 바이러스(swine influenza virus; SIV)간 유전자 재조합에 의해 진화되었음이 밝혀진 이후에는 돼지 집단에 대한 SIV 감시활동이 특별히 강화되고 있다(OIE, 2012; Vincent 등, 2014; WHO, 2010). 한국에서도 2009년 이후 국가 가축방역사업의 일환으로 국내 양돈장을 대상으로 SIV에 대한 양돈장 모니터링 사업을 실시해 오고 있으며, 이를 통하여 국내 양돈장 돼지에서 pH1N1 및 유전자재조합 변이주의 감염이 확인된 바 있다(Kim 등, 2014; Kim 등, 2011).

동물집단에 감염되는 IAV에 대한 효율적인 감시활동을 위해서는 특이도와 민감도가 높으면서도 일선

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

실험실에서 편리하게 이용할 수 있는 이용자-친화적인 진단법의 개발 및 적용이 필요하다. 세계보건기구나 세계동물보건기구에서는 IAV 진단법으로 전통적인 바이러스 배양법과 분자생물학적 진단법을 공통적으로 추천하고 있으나, 최근에는 대부분의 실험실에서 역전사-중합효소연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)이나 real-time RT-PCR (rRT-PCR)과 같은 PCR 기반 유전자진단법을 1차적인 진단법으로 이용하고 있다(Kim 등, 2014; OIE, 2012; WHO, 2010). 그러나 현재 상용되고 있는 PCR 기반 진단법들은 검사비용이 많이 들고, 특수한 장비와 시약을 필요로 하기 때문에 전문 진단기관 이외 일선 임상진단실이나 현장에서는 쉽게 적용하기 어려운 단점이 있다. 따라서 이를 극복할 수 있는 새로운 방식의 유전자진단법에 대한 개발이 다각도로 진행되어 왔다(Sakurai와 Shibasaki, 2012).

최근 개발된 등온증폭법(loop-mediated isothermal amplification; LAMP)은 반응 온도에 변화를 주어야 하는 기존의 PCR 기반 진단법과 달리 일정한 온도 조건에서 유전자를 증폭할 수 있는 새로운 방식의 유전자진단법으로써 고도의 특이도와 민감도를 가지면서도 신속하게 목표 유전자를 증폭할 수 있는 것으로 알려져 있다(Notomi 등, 2000). 특히 등온조건에서 반응이 이루어지는 LAMP의 특성상 일정한 온도가 유지되는 항온수조만 있어도 활용이 가능하기 때문에 향후 고가의 특수 장비가 없는 일선 임상 진단실이나 임상 현장에서의 간편 진단법으로도 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

이 연구에서는 돼지집단에 감염될 수 있는 주요 아

형의 SIV를 진단할 수 있으며, hydroxynaphthol blue (HNB) dye를 적용하여 별도의 판독기기 없이도 반응 결과를 육안으로 바로 확인할 수 있는 RT-LAMP 진단법을 개발하였기에 보고한다.

재료 및 방법

공시 바이러스 및 핵산추출

시험에 사용한 SIV는 한국의 돼지 분리주 4종 즉, A/Korea/D180-2/2009 (H1N1), A/Korea/103/2009 (H1N2), A/Korea/A18/2011 (H3N2) 및 A/Korea/VD01/2009 (H1N1)이며, A/Korea/VD01/2009 (H1N1)은 2009년 한국의 양돈장에서 분리한 pH1N1이다(Table 1). 공시 바이러스를 이용한 모든 실험은 농림축산검역본부에서 수행하였다. 공시 바이러스는 세계동물보건기구에서 추천하는 표준 방법에 준하여 발육란에 접종하여 5일간 배양하였으며, 발육란에서 채취한 뇨막강액에 대하여 혈구응집반응(hemagglutination test; HAT)을 실시하여 바이러스 역가를 측정한다. 다음, -80°C 에 보관하며, 시험에 제공하였다(Kim 등, 2014; OIE, 2012; WHO, 2010). 개발된 RT-LAMP의 특이도 검증을 위하여 경북대학교 수의전염병제어센터에서 보관하고 있는 SIV 이외 돼지 호흡기에 감염되는 바이러스와 세균 배양액으로부터 동일하게 핵산을 추출한다. 다음, -80°C 에 보관하며, 시험에 제공하였다(Table 1).

Table 1. Viral and bacterial strains used in this study

Pathogen*	Strain	Resource [†]
SIV subtype H1N1	A/Korea/D180-2/2009	QIA
SIV subtype H1N2	A/Korea/103/2009	QIA
SIV subtype H3N2	A/Korea/A18/2011	QIA
SIV subtype pH1N1	A/Korea/VD01/2009	QIA
PRRSV genotype 1	Field isolate	ADIC
PRRSV genotype 2	Field isolate	ADIC
Classical swine fever virus	Vaccine strain	-
Porcine circovirus type 2	Field isolate	ADIC
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	Field isolate	ADIC
<i>Pasteurella multocida</i>	Field isolate	ADIC
<i>Hemophilus parasuis</i>	Field isolate	ADIC
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Field isolate	ADIC

*SIV, swine influenza virus; PRRSV, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, pH1N1, pandemic 2009 H1N1 strain isolated from swine farm. [†]QIA, Animal and Plant Quarantine Agency; ADIC, Animal Disease Intervention Center, Kyungpook National University.

RT-LAMP용 프라이머 설계

모든 아형의 SIV를 공통적으로 증폭할 수 있는 primer set를 선별하기 위하여 2012~2014년 사이에 Influenza Sequence Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>)에 등록된 SIV의 matrix 유전자 염기서열 정보를 검색하여 pH1N1을 포함한 H1N1 아형 856개, H1N2 아형 623개, H3N2 아형 736개 및 기타 아형의 SIV 65 개 등 총 2,280개의 matrix 유전자 염기서열 정보를 확보하였다. 확보된 정보를 유전자 염기서열 분석 프로그램인 DNASTAR[®]Lasergene (DNASTAR, Inc, USA)으로 비교분석하여 가장 안정적인 부위를 선별한 다음, LAMP용 primer 설계 프로그램인 Primer-Explorer V3 software (<http://primerexplorer.jp/e/index.html>; Eiken Chemical Co. Ltd, Japan)를 이용하여 2종의 내부 primer [forward inner primer (FIP)와 backward inner primer (BIP)], 2종의 외부 primer (F3와 B3) 및 2종의 loop primer [F loop primer (LF)와 B loop primer (LB)]를 설계하였다(Table 2, Fig. 1). 설계한 primer set를 primer 제조업체(Bioneer Co, Korea)에 의뢰하여 합성하였다.

RT-PCR

RT-PCR은 Shin 등(2011)이 보고한 모든 아형의 SIV를 검출할 수 있는 primer set를 이용하여 시판 one-step RT-PCR kit (Qiagen, USA)를 사용하여 수행

하였다(Table 2). 즉, 5 µL의 5 X RT-PCR buffer (2.5 mM MgCl₂ 포함), 0.4 mM의 dNTPs, 0.5 µM의 각 primer 및 1 µL의 enzyme mix를 첨가한 RT-PCR 반응액에 검사용 RNA template 5 µL를 첨가한 다음, 멸균증류수로 최종 용량을 25 µL로 조정하였다. RT-PCR 반응은 핵산증폭기(Genetech, USA)를 이용하여 50°C에서 30분간의 RT 과정을 거친 다음 95°C에서 15분간 처리하였고, 40 회전의 PCR 과정(denaturation 94°C 40 초, annealing 55°C 40초, extension 72°C 50초)를 거친 다음, 72°C에서 10분간 최종 반응하였다. RT-PCR 증폭산물을 2.0 % agarose gel에 전기 영동한 후 자외선 판독기(Bio-Rad, USA)로 판독하여 242 bp의 특이 밴드를 확인하였다.

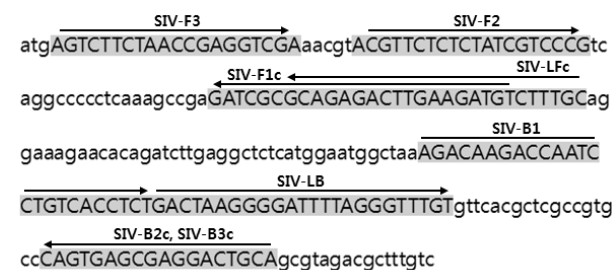


Fig. 1. Location of primers for reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Locations of primer-binding sequences are indicated over the sequence of the matrix gene of Korean reference swine influenza virus isolate A/Korea/VD01/2009 (H1N1) (GenBank accession number JN043432).

Table 2. Primers used for the detection of matrix gene of swine influenza virus

Method	Name of primer	Sequence (5'-3')	Reference
RT-RAMP	SIV-F3	AGTCTTCTAACCGAGGTCGA	this study
	SIV-B3	TGCAGTCCTCGTCACTG	
	SIV-LF	GCAAAGACATCTTCAAGTCTCTGC	
	SIV-LB	GACTAAGGGGATTTAGGGTTTGT	
	SIV-F1c	ACATCTTCAAGTCTCTGCGCGATC	
	SIV-B1	AGACAAGACCAATCCTGTACCTCT	
	SIV-F2	ACGTTCTCTATCGTCCCG	
	SIV-B2c	TGCAGTCCTCGTCACTG	
	SIV-FIP(F1c+F2)	ACATCTTCAAGTCTCTGCGCGATC- ACGTTCTCTATCGTCCCG	
	SIV-BIP(B1+B2c)	AGACAAGACCAATCCTGTACCTCT- TGCAGTCCTCGTCACTG	
RT-PCR	M30F2/08-1	ATGAGYCTTYTAACCGAGGTCGAAACG	Shin et al. (2011)
	M264R3/08-242	TGGACAAANCGTCTACGCTGCAG	
rRT-PCR	M-Kr forward	AAGACCAATCCTGTACCTCTGA	Kim et al. (2013)
	M-Kr reverse	CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC	
	M-Kr probe	FAM-TTTGTNTTYACGCTACCGTGCC-TAMRA	

Real-time RT-PCR

rRT-PCR은 Kim 등(2013)이 보고한 모든 아형의 IAV를 검출할 수 있는 primer 및 probe set를 이용하여 시판 one-step PrimeScript™ RT-PCR kit (TaKaRa, Japan)를 사용하여 수행하였다(Table 2). 즉, 12.5 µL의 2 X One-Step RT-PCR buffer III, 0.5 µL의 TaKaRa Ex Taq™ HS, 0.5 µL의 PrimeScript™ RT enzyme Mix II, 0.4 µM의 각 primer 및 0.2 µM의 probe를 첨가한 반응액에 검사용 RNA template 5 µL를 첨가한 다음, 멸균증류수로 최종 용량을 25 µL로 조정하였다. Real time RT-PCR 반응은 실시간핵산증폭기(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 42°C에서 5분간의 RT 과정을 거친 다음, 95°C에서 10초간 처리하였고, 40 회전의 PCR 과정(denaturation 95°C 10초, annealing 60°C 20초)을 거친 다음, CT값이 38 이상인 경우 음성으로 판독하였다.

RT-LAMP의 반응조건 확립

RT-LAMP를 위한 반응액의 조성은 Ma 등(2010)이 보고한 반응액의 조성을 준용하였다. 즉, 1 µL의 Bst DNA polymerase (8 U/µL, New England Biolabs, USA), 1 µL AMV reversed transcriptase (10 U/µL, Promega, USA), 2.5 µL dNTPs (10 mM), 8 µL Betaine (250 mM), 1 µL MgSO₄ (150 mM), 1 µL HNB (3 mM, Lemongreen, Shanghai, China) 및 각 primer 1 µL (FIP와 BIP 각 40 pmol/µL; FL와 BL 각 20 pmol/µL; F3와 B3 각 5 pmol/µL)를 첨가하여 반응액을 제조하였으며, 제조한 반응액에 검사시료에서 추출한 RNA 시료 5 µL를 첨가한 다음, 멸균증류수로 최종 용량을 25 µL로 조정하였다. SIV 검출에 적합한 최적 RT-LAMP 조건을 확립하기 위하여 공시 바이러스 (pH1N1) 배양액으로부터 추출한 RNA를 이용하여 반응온도(45~65°C)와 반응시간(20~50분)을 달리하여 RT-LAMP를 실시한 다음, 80°C에서 5분간 처리하여 반응액 내의 효소 활성을 제거하였다. 반응이 끝난 튜브의 반응액을 육안으로 관찰하여 색깔 변화를 관찰하여 양성 여부를 판독하였으며, 동시에 2.0% agarose gel에 전기영동을 실시한 다음, 자외선판독기 (Bio-Rad, USA)를 이용하여 LAMP 반응에서 특이적으로 나타나는 사다리 모양의 유전자 증폭 밴드 형성 여부를 확인하였다.

개발 RT-LAMP의 특이도

개발 LAMP 진단법의 특이도를 확인하기 위하여 Table 1에 제시된 다양한 아형의 SIV 배양액과 공시 돼지 바이러스 및 세균 배양액으로부터 핵산을 추출한 다음, 개발된 RT-LAMP를 이용하여 확립된 조건으로 반응을 실시하였고, 상기 기술된 방법에 따라 각 바이러스 유전자가 특이적으로 증폭되는지 여부를 확인하였다.

진단법간 민감도 비교

개발된 RT-LAMP와 기존 연구자의 RT-PCR과 rRT-PCR간의 민감도를 확인하기 위하여 클로닝한 SIV의 matrix 유전자와 공시 바이러스를 희석하여 각 진단법간 검출한계를 비교하였다. 먼저 공시바이러스 A/Korea/D180-2/2009 (H1N1)의 배양액으로부터 RNA를 추출하여 Hoffmann 등(2001)의 방법대로 1,027 bp의 matrix 유전자를 증폭한 다음, PCR purification kit (Inclone, Korea)를 사용하여 정제하였고, TOPO vector system (Enzynomics, Korea)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 클로닝한 다음, 시판 추출 kit (inclone, Korea)를 사용하여 plasmid를 추출하였다. 추출한 plasmid에 목표 유전자가 올바르게 삽입되었는지 확인하기 위하여 전문업체(Cosmogenetech, Korea)에 유전자염기서열 분석을 의뢰하여 해당 SIV의 matrix 유전자가 정확히 클로닝되었음을 확인하였다. 정제 plasmid의 농도를 Nanodroplite (Thermo Scientific, USA)를 이용하여 측정한 다음, Parida 등(2011)의 방법에 따라 “plasmid의 농도(g/µL)/[(plasmid 길이 X 660) × (6.022 × 10²³)]”의 술식에 의해 matrix 유전자의 copy 수를 측정하였고, 이를 10⁸-10⁰ copy/µL 농도가 되게 10배수 단계 희석한 다음, 각 희석액을 대상으로 RT-LAMP와 RT-PCR 및 rRT-PCR을 각각 실시하여 검출한계를 비교하였다. 또한 공시 SIV에 대한 검출 민감도를 비교하기 위하여 4종의 공시 바이러스를 접종한 발육란으로부터 노막강액을 채취하여 HAT를 실시하여 HA 역가를 2⁶으로 조정한 다음, 4배수 단계 희석하였고, 각 희석액으로부터 추출한 핵산을 이용하여 RT-LAMP와 RT-PCR 및 rRT-PCR을 실시하여 그 결과를 확인하였다.

결 과

RT-LAMP의 반응조건 확립

공시 SIV에서 추출한 핵산을 이용하여 반응시간(20~50분)과 반응온도(45~65°C)를 달리하여 RT-LAMP를 실시한 다음, 육안 및 전기영동 판독을 실시한 결과, 반응시간은 40분 그리고 반응온도는 55~60°C에서 양성반응이 가장 잘 관찰되었다. 그러나 반응온도에 있어서는 전기영동 상으로는 55, 58 및 60°C에서 LAMP 특유의 양성밴드가 관찰되었으나 육안으로는 58 및 60°C에서 가장 뚜렷하게 양성반응의 색상 변화를 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 따라서 이후의 모든 실험은 58°C의 반응온도와 40분의 반응시간으로 반응조건을 고정하여 실시하였다.

RT-LAMP의 특이도

공시 SIV 4종과 돼지 유래 병원체 8종 시료에서 추출한 핵산을 이용하여 개발된 RT-LAMP를 실시한 결과, 공시 SIV 4종에서만 육안 및 전기영동으로 양성 증폭산물이 확인되어 개발된 RT-LAMP가 공시한 4종의 SIV의 matrix 유전자만을 특이적으로 증폭할 수 있음을 확인하였다(Fig. 3).

RT-LAMP과 RT-PCR, rRT-PCR의 민감도 비교

개발된 RT-LAMP의 민감도를 측정하기 위하여 클로닝한 SIV matrix 유전자를 10^8 - 10^0 copy/ μ L로 10배 수 단계 희석한 다음, 동일 유전자 희석액을 대상으로 개발 RT-LAMP와 RT-PCR 및 rRT-PCR을 실시한 결과, 각각 1 copy/ μ L, 10 copy/ μ L 및 1 copy/ μ L까지 검출되어 개발 RT-LAMP가 기존의 RT-PCR보다는

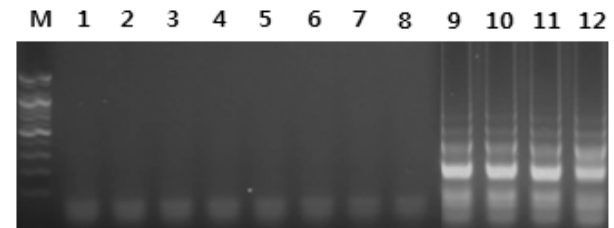


Fig. 3. Specificity of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for amplification of the matrix gene of swine influenza virus (SIV). Lane M; 100 bp DNA marker, Lane 1; genotype 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), Lane 2; genotype 2 PRRSV, Lane 3; classical swine fever virus, Lane 4; porcine circovirus type 2, Lane 5; *Mycoplasma hyopneumoniae*, Lane 6; *Pasteurella multocida*, Lane 7; *Haemophilus parasuis*, Lane 8; *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Lane 9; SIV subtype H1N1, Lane 10; pandemic 2009 influenza virus H1N1, Lane 11; SIV subtype H1N2, Lane 12; SIV subtype H3N2.

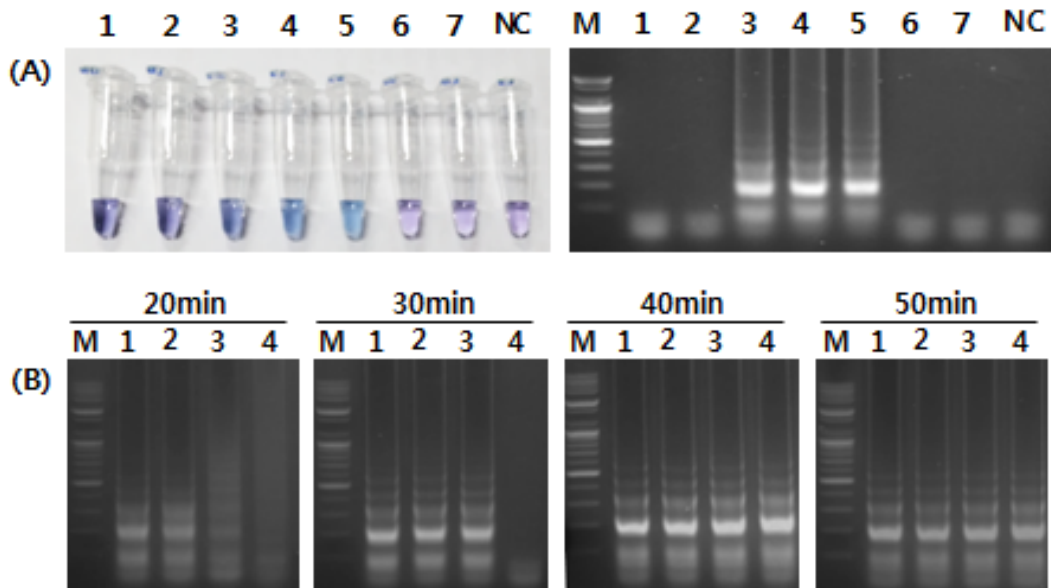


Fig. 2. Optimization of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) condition by different reaction temperatures (A) and reaction time (B). The best results of the RT-LAMP were obtained at 58~60°C and 40 min. (A) Lane M; 100 bp DNA marker. Lane 1-7; different reaction temperature of 45, 50, 55, 58, 60, 62 and 65°C respectively. (B) Lane M; 100 bp DNA marker, Lanes 1 to 4; 2^4 , 2^0 , 2^{-4} and 2^{-8} HA unit/ 25μ L of cultured influenza virus H1N1 (A/Korea/D180-2/2009), respectively.

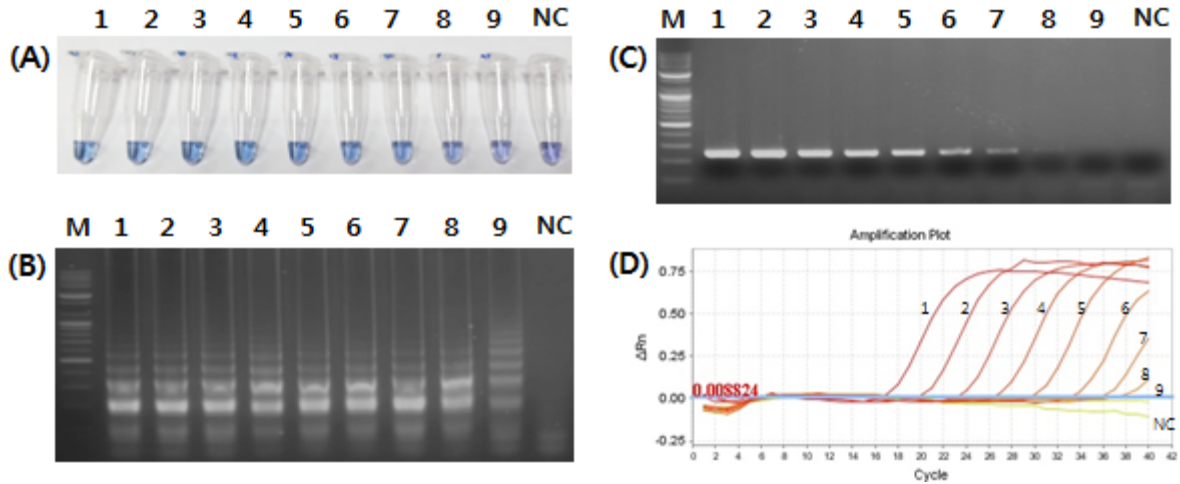


Fig. 4. Amplification results of the matrix gene of swine influenza virus using various molecular diagnostic tools. Detection limit of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (A and B), reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) (C) and real time RT-PCR (D) for amplification of the matrix gene of swine influenza virus (SIV). Lane M; 100 bp DNA marker, Lane 1-9; 10^8 - 10^0 copy/ μ L of matrix gene of SIV subtype H1N1 (A/Korea/D180-2/2009).

Table 3. Comparative sensitivity of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP), reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and real time RT-PCR (rRT-PCR) for swine influenza virus isolates

Virus	Method	Virus titer (HA unit/25 μ L)										
		2^6	2^4	2^2	2^0	2^{-2}	2^{-4}	2^{-6}	2^{-8}	2^{-10}	2^{-12}	2^{-14}
H1N1	RT-LAMP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	rRT-PCR (CT value)	17.07	18.08	20.83	22.33	25.36	26.88	29.6	31.01	32.95	34.09	-
H1N2	RT-LAMP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	rRT-PCR (CT value)	21.99	23.7	26.12	27.77	28.73	31.7	33.2	36.06	-	-	-
H3N2	RT-LAMP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	rRT-PCR (CT value)	20.94	22.99	24.49	26.68	28.48	30.97	32.3	33.74	34.96	-	-
pH1N1	RT-LAMP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	rRT-PCR (CT value)	18.42	20.78	22.67	24.7	26.22	28.81	30.83	31.78	33.7	-	-

10배 이상 민감도가 높고, rRT-PCR와는 동일한 수준의 민감도를 가지는 것으로 확인되었다(Fig. 4). 또한 공시바이러스를 배양한 발육란의 노막강액을 대상으로 개발 RT-LAMP와 RT-PCR 및 rRT-PCR을 실시하여 검출 민감도를 비교한 결과, RT-LAMP에서는 각 바이러스별로 H1N1 아형은 2^{-12} HA/25 μ L, H1N2 아형은 2^{-10} HA/25 μ L, H3N2 아형은 2^{-10} HA/25 μ L, 그리고 pH1N1 아형은 2^{-10} HA/25 μ L까지 명확하게 관찰이 가능하였다. rRT-PCR은 RT-LAMP와 대등한 검출한계를 나타냈으며, RT-PCR은 RT-LAMP보다 공시 바이러스에 따라 4~16배 낮게 검출되었다(Table 3).

고 찰

SIV는 돼지에서 급성 호흡기질병과 임신 모돈의 유산을 유발하지만 일반적으로 돼지에서의 임상증상은 경미하며, 대개 1주일 이내에 회복이 되기 때문에 양돈 산업에서의 피해는 그리 크지 않다(Van Reeth 등, 2012). 그러나 2009년 세계적으로 범유행한 pH1N1의 발생 예에서 볼 수 있듯이 돼지는 조류와 포유류 인플루엔자 바이러스의 재조합이 일어나는 혼합용기 역할을 할 수 있기 때문에 SIV에 대한 감시활동의 필요성이 중요하게 대두되었다(Hass 등, 2011). 한국에서도 2009년 pH1N1 발생 이후부터 정부 차원의 양돈

장 모니터링 및 SIV에 대한 변이 여부에 대한 감시활동을 수행해오고 있다(Kim 등, 2011; Kim 등, 2014).

현재 SIV를 포함한 IAV에 대한 감시활동에는 RT-PCR이나 rRT-PCR과 같은 PCR 기반 진단법이 보편적으로 사용되고 있다(OIE, 2012; WHO, 2010). 그러나 PCR 기반 진단법은 고가의 전용 장비와 시약을 필요로 하며, 숙련된 인력이 갖추어진 전문 실험실에서만 활용이 가능하므로 일선 임상실험실이나 현장 진단용으로 사용하기에는 제한이 있어 왔다. 이러한 PCR 기반 진단법의 단점을 극복할 수 있는 방법 중의 하나로 Notomi 등(2000)은 높은 특이도와 민감도를 가지면서도 등온조건 하에서 신속하게 목표 유전자를 증폭할 수 있는 LAMP 기법을 개발하였다. 이 LAMP 기법은 기존의 PCR 기반 진단법에서 사용되는 Taq DNA polymerase와 달리 목표유전자를 strand displacement 방식에 의해 대량 증폭할 수 있는 Bst DNA polymerase를 이용함으로써 유전자 증폭효율이 월등하게 높다. 또한 기존의 PCR 기반 진단법과는 달리 온도 변화가 없는 등온조건에서 유전자 증폭이 이루어지기 때문에 검사시간이 단축될 뿐만 아니라 항온수조와 같은 저가의 장비로도 반응이 가능하다. 따라서 전문 진단실은 물론 고가의 장비와 시약 및 전문인력이 확보되지 않은 소규모의 진단실이나 현장 진단용 등으로 그 응용범위는 더욱 확대될 것으로 예측된다(Dhama 등, 2014).

이러한 LAMP의 장점에 따라 현재 LAMP는 세계적으로 다양한 세균, 기생충 및 바이러스의 진단에 널리 이용되고 있으며, 역전사반응을 결합시킨 RT-LAMP가 개발되면서 IAV 등 다양한 RNA 바이러스의 진단에도 응용되고 있다(Dhama 등, 2014). 한국에서도 최근 수의학 분야의 여러 연구자들이 LAMP 기법을 병원체 진단에 응용한 보고가 있으나 주로 세균성 질병인 결핵(Hwang 등, 2011; Koh 등, 2013), 살모넬라(Cho 등, 2013), 대장균(Dong 등, 2014)에 대하여 적용되어 왔다. 바이러스성 질병에 대해서는 개 홍역(Cho 등, 2005), 낭충봉아부패병(Yoo 등, 2012)에 적용된 바가 있으나 아직 동물이나 조류의 IAV 진단에는 적용된 바가 거의 없는 것으로 파악되며, 이 연구에서 SIV의 진단에 RT-LAMP를 적용한 예를 통하여 향후 LAMP가 국내 수의학 분야에서도 다양한 바이러스성 질병의 진단에 응용되는 계기가 될 것으로 기대된다.

LAMP는 목표유전자 염기서열의 8개 부위를 인식하는 6종의 primer를 이용함으로써 고도의 특이도와 민감도를 가지는 장점이 있지만 오히려 한정된 목표

유전자의 염기서열 내에서 특이적으로 반응하는 여러 쌍의 primer를 설계하기가 곤란하다는 것이 LAMP의 응용 범위를 제한하는 단점으로 작용해왔다(Dhama 등, 2014; Gandelman 등, 2011). 특히 IAV와 같이 유전적 변이가 심한 바이러스를 대상으로 할 경우에는 LAMP용 primer를 설계할 때 더 각별한 주의를 기울여야 한다. 그간 PCR 기반의 유전자 진단법 개발에 있어서 여러 연구자들은 변이가 적은 유전자염기서열 부위를 탐색하여 다양한 아형의 IAV를 공통적으로 진단할 수 있는 특이 primer를 설계하기 위해 노력해왔다. 연구자에 따라 nucleoprotein, polymerase A 또는 HA 유전자를 대상으로 공통 primer를 설계한 경우도 일부 있지만 대부분의 연구자들은 IAV의 유전자 중에서 가장 안정적인 것으로 알려진 matrix 유전자로부터 공통 primer를 설계하여 진단법을 개발해왔다(Chander 등, 2014; Lee 등, 2001; Liu 등, 2012; Phipps 등, 2004; Poon 등, 2005). 이 연구에서도 대부분의 연구자들이 대상으로 하는 matrix 유전자를 대상으로 특이 primer를 설계하기로 하고, 최근 3년간 세계적으로 보고된 2,280개의 SIV matrix 유전자 염기서열을 수집하여 분석한 다음, 가장 안정적인 유전자 부위를 탐색하여 6종의 SIV 검출용 primer set를 작성하였다(Table 2, Fig. 1). 이를 이용하여 SIV의 대표적인 아형인 H1N1, H1N2 및 H3N2, 그리고 주요 감시대상인 pH1N1을 대상으로 RT-LAMP를 실시한 결과, 시험에 제공한 모든 SIV가 특이적으로 증폭됨을 확인하였으며, Table 1에 제시된 돼지 호흡기 및 전신성 질병 원인체 8종을 대상으로 RT-LAMP를 실시한 결과, SIV 이외에는 반응이 일어나지 않아 개발된 RT-LAMP용 primer가 SIV에만 특이적으로 작동함을 확인하였다(Fig. 3). 이러한 결과로 볼 때 개발된 RT-LAMP는 SIV 모니터링 과정 중에서 발육란 또는 세포배양으로 얻어진 배양 바이러스의 확인은 물론 돼지에서 채취한 시료를 대상으로 배양과정 없이 직접 응용할 수 있을 것으로 생각되며, 향후 야외 채취 시료를 대상으로 시험을 확대할 계획이다.

돼지는 조류와 포유류에서 유래한 IAV가 동시에 감염되는 혼합용기로 역할하면서 사람과 돼지 또는 가금류와 돼지의 IAV간 유전자 재조합에 의하여 새로운 유전자 구성을 가지는 변형 바이러스가 출현하기도 한다(Cong 등, 2007; Lekcharoensuk 등, 2006). 또한, 최근 포유동물이 아닌 물새류에서 유래한 H4N6, H3N3 또는 H1N1 아형의 IAV가 돼지에서 분리된 바도 있다(Karasin 등, 2000; Karasin 등, 2004). 따라서

돼지집단에 감염되는 IAV를 모니터링 하기 위해서는 SIV의 주요 아형 이외 돼지에 감염될 수 있는 다양한 아형의 IAV를 공히 검출할 수 있는 RT-LAMP의 개발이 필요하다. 그러나 그간 SIV 진단용 RT-LAMP의 개발사례를 살펴보면 Gu 등(2010)은 SIV H3 아형을 특이적으로 진단할 수 있는 RT-LAMP를 개발한 바 있으며, Liu 등(2012)은 SIV의 H1, H3, H5 및 H9 아형을 공통적으로 검출할 수 있는 SIV RT-LAMP를 개발한 바 있다. 그러나 이들 연구자들이 보고한 진단 방법으로는 만약의 경우 Karasin 등(2000)이 보고한 H4 아형 등 다른 아형의 IAV가 돼지에 감염될 경우에는 진단할 수 없게 된다. 이 연구에서는 primer 설계 시에 4종의 주요 아형 이외 최근 3년간 돼지에 감염 보고된 모든 아형의 SIV를 대상으로 하였기 때문에 만약의 경우 이 연구에서 공시한 4종의 아형 이외 다른 아형의 SIV가 검사시료에 포함되어 있더라도 충분히 검출할 수 있을 것으로 생각되며, 이에 대해서는 추후 다양한 아형의 IAV를 대상으로 시험을 진행할 계획이다. 그러나 변이가 심한 IAV의 특성을 고려할 때 향후 이 연구에서 이용한 primer에 해당하는 matrix 유전자의 염기서열에 변이가 있는 새로운 변이주가 출현할 가능성도 배제할 수는 없으므로 앞으로도 이 연구에서 사용한 primer의 유효성에 대하여 지속적인 점검이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

이 연구에서 개발된 RT-LAMP의 민감도를 기존에 보고된 RT-PCR (Shin 등, 2010) 및 rRT-PCR (Kim 등, 2013)과 비교한 결과, RT-LAMP의 검출한계는 1 copy/ μ L로 확인되어 기 보고된 RT-PCR보다 10배 이상 민감도가 높았고, rRT-PCR과는 동일한 수준의 민감도를 가지는 것으로 확인되었다(Fig. 3). 이는 Gu 등(2010)이 H3 아형의 SIV에 대하여 RT-LAMP를 개발하여 적용한 결과, 기존의 RT-PCR이나 rRT-PCR보다 민감도가 높았다는 결과와도 일치한다. 민감도의 차이는 primer도 영향을 미칠 수 있다. 반응시간에 있어서는 기존 RT-PCR과 rRT-PCR은 약 2시간 30분 및 1시간 이상의 시간이 소요되는 반면에 개발 RT-LAMP는 40분 만에 반응이 완료되었고, 이러한 결과는 Gu 등(2010)과 Liu 등(2012)이 개발한 RT-LAMP의 반응시간(45분)보다 더욱 단축된 결과이다. 한편 이 연구에서 개발한 RT-LAMP는 Fig. 2와 같이 별도의 전기영동 확인과정을 거치지 않고도 육안으로 반응 결과의 확인이 가능하기 때문에 향후 유전자 추출 단계를 현장에서 적용 가능한 간이키트형태로 개발하여 접목할 수 있다면 항온수조 형태의 간편한 장비를

를 이용하여 현장 진단용으로도 활용이 가능할 것으로 생각된다.

결론적으로 이 연구를 통하여 민감도와 특이도가 높으면서도 신속한 SIV 진단용 RT-LAMP가 개발되었으며, 개발진단법은 돼지집단에 감염되는 주요 아형의 SIV를 모두 검출할 수 있었다. 따라서 개발된 RT-LAMP는 향후 SIV에 대한 국가 모니터링 사업이나 일선 진단실의 SIV 진단에 있어서 기존의 RT-PCR이나 rRT-PCR을 대체할 수 있는 진단법으로 널리 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

결론

이 연구를 통하여 민감도와 특이도가 높으면서도 신속한 SIV 진단용 RT-LAMP가 개발되었으며, 개발진단법은 돼지집단에 감염되는 주요 SIV 아형 즉, H1N1, H1N2, H3N2은 물론 돼지집단에 우발적으로 감염될 수 있는 다양한 아형의 SIV를 진단할 수 있을 것으로 기대된다. 개발 RT-LAMP는 58°C에서 40분간 반응으로 진단이 완료되기 때문에 기존의 RT-PCR이나 rRT-PCR에 비하여 신속한 검사가 가능하다는 장점이 있다. 개발 RT-LAMP의 민감도는 1 copy/ μ L로 기존의 RT-PCR (10 copy/ μ L) 보다 10배 이상 민감도가 높았고, rRT-PCR (1 copy/ μ L)과는 유사한 수준이었으며, 별도의 검출장비 없이도 육안으로 반응결과를 확인할 수 있었다. 따라서 이 연구에서 개발된 RT-LAMP는 향후 기존의 RT-PCR이나 rRT-PCR을 대체할 수 있는 SIV 진단법으로 널리 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2012학년도 경북대학교 신임교수정착연구비에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

- Chander Y, Koelbl J, Puckett J, Moser MJ, Klingele AJ, Liles MR, Carrias A, Mead DA, Schoenfeld TW. 2014. A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Front Microbiol* 5: 395.

- Cho AR, Dong HJ, Cho SB. 2013. Rapid and Sensitive Detection of *Salmonella* spp. by Using a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay in Duck Carcass Sample. *Korean J. Food Sci. An* 33: 655-663.
- Cho HS and Park NY. 2005. Detection of canine distemper virus in blood samples by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J Vet Med B* 52: 410-413.
- Cong YL, Pu J, Liu QF, Wang S, Zhang GZ, Zhang XL, Fan WX, Brown EG, Liu JH. 2007. Antigenic and genetic characterization of H9N2 swine influenza viruses in China. *J Gen Virol* 88: 2035-2041.
- Dhama K, Karthik K, Chakraborty S, Tiwari R, Kapoor S, Kumar A, Thomas P. 2014. Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review. *Pak J Biol Sci* 17: 151-166.
- Dong HJ, Cho AR, Hahn TW. 2014. Seongbeom Cho. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification assay to detect shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle. *J Vet Sci* 15: 317-325.
- Gandelman O, Jackson R, Kiddle G, Tisi L. 2011. Loop-mediated amplification accelerated by stem primers. *Int J Mol Sci* 12: 9108-9124.
- Gu H, Qi X, Li X, Jiang H, Wang Y, Liu F, Lu S, Yang Y, Liu F. 2010. Rapid and specific detection of H3 swine influenza virus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method. *J Applied Microbiol* 108: 1145-1154.
- Hass J, Matuszewski S, Cieslik D, Haase M. 2011. The role of swine as "mixing vessel" for interspecies transmission of the influenza A subtype H1N1: a simultaneous Bayesian inference of phylogeny and ancestral hosts. *Infect Genet Evol* 11: 437-441.
- Hoffmann, E, Stech J, Guan Y, Webster RG, and Perez DR. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol* 146: 2275-2289.
- Hwang ES, Lee TU, Jung EY, Cho HS. 2011. Development of loop-mediated isothermal amplification method for the rapid and sensitive detection of bovine tuberculosis in Korea native cattle. *Korean J Vet Serv* 34: 333-339.
- Karasin AI, Anderson GA, Olsen CW. 2000. Isolation and characterization of H4N6 avian influenza viruses from pigs with pneumonia in Canada. *J Virol* 74: 9322-9327.
- Karasin AI, West K, Carman S, Olsen CW. 2004. Characterization of avian H3N3 and H1N1 influenza A viruses isolated from pigs in Canada. *J Clin Microbiol* 42: 4349-4354.
- Kim HR, Oem JK, Bae YC, Kang MS, Lee HS, Kwon YK. 2013. Application of real-time reverse transcription polymerase chain reaction to the detection the matrix, H5 and H7 genes of avian influenza viruses in field samples from South Korea. *Virol J* 10: 85.
- Kim SH, Moon OK, Lee KK, Song YK, Yeo CI, Bae CW, Yoon H, Lee OS, Lee JH, Park CK. 2011. Outbreak of pandemic influenza (H1N1) 2009 in pigs in Korea. *Vet Rec* 169: 155a.
- Kim SH, Roh IS, Lee KK, Park CK. 2014. A novel reassortant H1N2 virus related to the pandemic H1N1 2009 influenza virus isolated from Korean pigs. *Virus Genes* 48: 193-198.
- Koh BRD, Kim JM, Sung CM, Ji TK, Na HM, Park SD, Kim YH, Kim ES. 2013. Loop-mediated isothermal amplification assay for differentiation of *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis*. *Korean J Vet Serv* 36: 79-86.
- Lekcharoensuk P, Lager KM, Vemulapalli R, Woodruff M, Vincent AL, Richt JA. 2006. Novel swine influenza virus subtype H3N1, United States. *Emerg Infect Dis* 12: 787-794.
- Lee MS, Chang PC, Shien JH, Cheng MC, Shieh HK. 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J Virol Methods* 97: 13-22.
- Liu Y, Jiang J, Zhang L, Chen L and Ning Y. 2012. Development and application of a rapid detection system for swine influenza virus by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J Food Agri Environ* 10: 196-200.
- Ma XJ, Shu YL, Nie K, Qin M, Wang DY, Gao RB, Wang M, Wen LY, Han F, Zhou SM, Zhao X, Cheng YH, Li DX, Dong XP. 2010. Visual detection of pandemic influenza A H1N1 virus 2009 by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. *J Virol Methods* 167: 214-217.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino and N, Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28: 63-69.
- OIE. 2012. Manual of diagnostic test and Vaccines for terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf
- Parida M, Shukla J, Sharma S, Santhosh SR, Ravi V, Mani R, Thomas M, Khare S, Rai A, Ratho RK, Pujari S, Mishra B, Rao PVL, Vijayaraghavan R. 2011. Development and evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and real-time detection of the swine-origin influenza A H1N1 virus. *J Mol Diagn* 13: 100-107.
- Poon LLM, Leung CSW, Chan KH, Lee JHC, Yuen KY, Guan Y, and Peiris JSM. 2005. Detection of human influenza A viruses by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol* 43: 427-430.
- Phipps LP, Essen SC, I.H. Brown IH. 2004. Genetic subtyping of influenza A viruses using RT-PCR with a single set of primers based on conserved sequences within the HA2 coding region. *J Virol Methods* 122: 119-122.
- Sakurai A and Shibasaki F. 2012. Updated values for molecular diagnosis for highly pathogenic avian influenza virus. *Viruses* 4: 1235-1257.
- Shin YK, Yoon SS, Song JY, Kim JB, Hang DT, Park JW, Kim MY, Kim SH, Park CK, Li OS. 2011. One-step multiplex reverse-transcriptase PCR for detecting pandemic

- (H1N1) 2009 influenza virus. *J Vet Med Sc* 73: 55-63.
- Van Reeth K, Brown IH and Olsen CW. 2012. Influenza virus. pp. 557-571. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ and Stevenson GW (ed.). *Diseases of Swine*, 10th ed. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa.
- Vincent A, Awada L, Brown I, Chen H, Claes F, Dauphin G, Donis R, Culhane M, Hamilton K, Lewis N, Mumford E, Nguyen T, Parchariyanon S, Pasick J, Pavade G, Pereda A, Peiris M, Saito T, Swenson S, Van Reeth K, Webby R, Wong F, Ciacci-Zanella J. 2014. Review of influenza A virus in swine worldwide: a call for increased surveillance and research. *Zoonoses Public Health* 61: 4-17.
- Vijaykrishna D, Poon LL, Zhu HC, Ma SK, Li OT, Cheung CL, Smith GJ, Peiris JS, Guan Y. 2010. Reassortment of pandemic H1N1/2009 influenza A virus in swine. *Science* 328: 1529.
- WHO. 2010. Pandemic (H1N1)2009-update100. http://www.who.int/csr/don/2010_05_14/en/index.html
- Yoo MS, Noh JH, Yoon BS, Reddy KE, Kweon CH, Jung SC, Kang SW. 2012. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for sensitive and rapid detection of Korean sacbrood virus. *J Virol Methods* 186: 147-151.