

## 닭 뉴캐슬병 바이러스의 특이 검출을 위한 polymerase chain reaction 법

여상건 · 김도경\* · 박선자\*\*

경상대학교 수의과대학 동물의학연구소  
경남축산진흥연구소\* · 경상대학교 대학원 생물학과\*\*  
(1998년 8월 22일 접수)

### Polymerase chain reaction for the detection of Newcastle disease virus

Sang-geon Yeo, Do-kyoung Kim\* , Seon-ja Park\*\*

*Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University  
Kyongnam Livestock Promotion Institute\**

*Department of Biology, Graduate School, Gyeongsang National University\*\**

(Received Aug 22, 1998)

**Abstract** : To study the specific tools for the diagnosis of Newcastle disease virus (NDV) in chicken, polymerase chain reaction (PCR) and its presumable conditions were evaluated for the detection of hemagglutinin-neuraminidase (HN) gene of NDV RNA. For these purposes, Kyo-jeongwon strain of the NDV was propagated in allantoic cavity of SPF embryonating chicken eggs, and viral RNA was extracted from fractionated virus after the allantoic fluids were ultracentrifuged with sucrose gradient. The first-strand cDNA was then made for the HN gene of NDV RNA by reverse transcription at 42°C for 1 hour using specific primer complementary to the HN gene. The single-stranded cDNA was used as template in the PCR of the HN-DNA, and various conditions of the PCR were evaluated to set up method for the specific detection of the HN-DNA.

The PCR conditions promising for the detection of HN gene consist of preheating at 94°C, 5 min, 30 cycles of denaturation at 94°C, 1 min, annealing at 55°C, 1 min and polymerization at 72°C, 2 min, and a cycle of extension at 72°C, 5 min. when NDVs of allantoic fluids without fractionation were applied to the above PCR condition, the HN genes were detected effectively not only from Kyojeongwon but from other velogenic strains such as Herts and a field isolate.

**Key words** : Newcastle disease virus, HN gene, reverse transcription, PCR.

---

이 논문은 한국과학재단 지원 핵심전문연구비(961-0606-051-1)에 의하여 수행되었음.

Address reprint request to Dr. Sang-geon Yeo, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Republic of Korea.

## 서 론

뉴캐슬병은 조류에 발생하는 급성 전염병으로서 병원체는 paramyxovirus에 속하는 Newcastle disease virus(NDV)이며<sup>1</sup>, 영국<sup>2</sup>과 인도네시아<sup>3</sup>에서 최초로 확인되었다. 우리나라에서는 1929년 Konno *et al*<sup>4</sup>에 의하여 닭에서 처음 보고된 후 현재까지 그 발생이 계속되고 있으며 호흡기, 소화기, 신경계의 다양한 증상, 산란율 저하와 함께 전파율과 폐사율이 높아서 양계산업의 주요 피해요인이 되고 있다<sup>1</sup>. 이 병의 방제를 위하여 임상 및 병리학적인 진단이 이루어지고 있으나 전염성 기관지염, 마이코플라즈마병 등 유사한 질병과의 감별이 쉽지 않다. 또한 혈청학적 진단을 위한 항체검출에 중화항체시험<sup>1</sup>, 혈구응집억제반응<sup>5</sup>, 면역확산법<sup>6,7</sup>, 효소표지면역흡수시험<sup>8,9</sup> 등이 이용되지만 혈중항체의 검출만으로는 본병의 확진이 어렵다. 또한 바이러스의 분리동정시험은 정확한 진단법이나 부화계란배양 또는 세포배양을 위하여 장시간이 소요되며 바이러스 중화시험, 혈구응집반응 및 혈구응집억제반응 등을 병행하여야 함으로 신속한 진단이 어렵다.

NDV는 한가닥의 RNA를 핵산으로 가지며, 여기에는 nucleocapsid protein인 L, P, NP와 envelope glycoprotein인 HN, F, M 등의 바이러스 항원물질을 생산하는 유전자가 존재한다<sup>10-15</sup>. 이들중 HN 항원은 숙주세포의 바이러스 수용체에 대한 부착능력을 나타내며, F 항원은 숙주 세포질막과 융합하여 세포질내로 NDV를 침입하게 함으로써 이들 항원물질은 뉴캐슬병의 발병과 밀접한 관계가 있으며 중화항체 산생을 유도한다<sup>13-15</sup>.

근년에 polymerase chain reaction(PCR)<sup>16</sup> 기법에 의하여 세균이나 바이러스로부터 DNA 또는 RNA를 증폭시켜냄으로써 유전자 수준에서의 특이성이 높은 진단법이 개발되고 있다<sup>17-19</sup>. 또한 Seal *et al*<sup>20</sup>은 NDV의 F 및 M 항원유전자를 증폭할 수 있는 primer로써 PCR을 수행하였던 결과 뉴캐슬병의 특이진단이 가능함을 보고하였다. 본 연구에서는 NDV의 구조단백질중 병원성을 나타내며 중화항체 산생을 유도하는 물질인 HN 항원의 유전자를 특이적으로 검출할 수 있는 PCR법을 확립하고자 NDV의 RNA로부터 HN-DNA를 획득하기에 적합한 PCR 조건을 수립하였다.

## 재료 및 방법

NDV의 배양 및 분리 : NDV 교정원주를 Chambers와 Samson<sup>10</sup>의 방법에 준하여 부화 9~10일령 SPF 발육란의 장노막강내에 0.1ml를 무균적으로 접종한 후 37℃에서 2~3일간 배양하였다. 증식된 바이러스를 함유하는 장노막강액을 무균적으로 채취한 후 5,000rpm에서 30분간 원심분리하여 계태아 유래의 세포를 침전시키고, 상청액을 40,000rpm으로 5시간동안 초원심분리하여 바이러스 침전물을 수확하였다. 이것을 TNE 용액(10mM Tris, pH 7.2, 100mM NaCl, 1mM EDTA)에 100배로 농축되게 용해한 후 30~60%의 sucrose gradient에서 40,000rpm으로 18시간동안 초원심분리하여 바이러스를 분획하였다. 동시에 각 분획의 optical density(OD), 적혈구 응집능력 등의 바이러스의 성상을 조사하였다. NDV의 성상을 유지하는 것으로 확인된 분획의 바이러스액을 40,000rpm으로 4시간동안 초원심분리 및 정제하여 그 침전물을 TNE 용액에 100배로 농축 용해하여 -70℃에 보존하면서 바이러스 RNA의 분리에 사용하였다. 또한 교정원주, Herts주, B1주 및 야외분리 강독주를 SPF 발육란의 장노막강내 배양후 그 장노막강액을 직접 RNA 추출에 사용하였으며, 이들 바이러스는 수의과학연구소에서 분양하여 공시되었다.

NDV에 대한 적혈구 응집반응 : Beard<sup>21</sup>의 베타술식에 따라 공시 NDV주에 대한 적혈구 응집반응을 실시하여 바이러스의 hemagglutination(HA) titer를 조사하였다.

NDV-RNA의 분리 : Chambers *et al*<sup>22</sup>의 방법에 준하여 NDV로부터 RNA를 분리하였다. 즉, 장노막강내에서 배양후 초원심 분획정제된 바이러스액 0.1ml 또는 장노막강 배양액 0.5ml를 각각 RNA 추출액(proteinase K 2mg/ml, 10mM vanadyl ribonucleoside, 0.15M NaCl, 1% SDS, 12mM EDTA, 0.1M Tris-HCl, pH 7.5) 0.5ml 및 1ml와 혼합하여 37℃에서 1시간동안 반응시키고 phenol로 처리하여 단백질을 제거하였다. 이것에 1/10 양의 3M sodium acetate(pH 5.2) 용액과 2배 양의 100% 에틸알코올을 가하고 -70℃에서 2분간 침전시킨 후 15,000rpm으로 15분간 원심분리하여 순수한 NDV-RNA를 추출하였다.

Oligonucleotide primer의 생산 : Schaper *et al*<sup>23</sup>이 보고하였던 Texas GB주의 HN 항원 유전자 RNA의 3' 및 5' 부위에 각각 상보적인 sense primer(5' CTT GTA TAT

AGC ATG GGG 3') 및 antisense primer(5' GAA GCC AGG TCT GGT TAG 3')를 합성하였으며, 이들 primer를 이용하여 PCR를 실시할 때 HN 항원 유전자의 약 1.6kb를 획득할 수 있다.

NDV-RNA에 대한 reverse transcription 반응 : Maniatis *et al*<sup>24</sup>의 방법에 준하여 NDV-RNA에 대한 first-strand cDNA를 생산하였다. NDV-RNA 9 $\mu$ l를 template로 하여 여기에 2 $\mu$ l의 sense primer, cDNA 합성시약 키트(Boehringer Mannheim)중의 2 $\mu$ l의 10mM dNTPs(dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 $\mu$ l의 RNase inhibitor, 4 $\mu$ l의 반응완충액(5X)를 혼합하였다. 이어서 2 $\mu$ l의 reverse transcriptase를 가하여 총 20 $\mu$ l이 시료에 대하여 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 reverse transcription 반응을 하여 first-strand의 cDNA를 만들었다.

NDV의 first-strand cDNA에 대한 PCR : Innis *et al*<sup>16</sup>, Jestin *et al*<sup>17</sup>, Schroeder와 Balassu-Chan<sup>18</sup>의 방법에 준하여 NDV의 first-strand cDNA에 대한 PCR 실험을 실시하여 double-strand의 cDNA를 증폭 생산하였다. 즉, 증류수 54.5 $\mu$ l에 PCR 시약 키트(Perkin Elmer)중의 10 $\mu$ l의 반응완충액(10X), 16 $\mu$ l의 1.25mM dNTPs(dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 5 $\mu$ l의 20 $\mu$ M sense primer, 5 $\mu$ l의 20 $\mu$ M antisense primer, 4 $\mu$ l의 25mM MgCl<sub>2</sub>, 5 $\mu$ l의 first-strand cDNA template를 순서대로 혼합하여 총 99.5 $\mu$ l의 반응액을 thermocycler(Hybaid model Omn-E)에서 94 $^{\circ}$ C, 5분간 예비 가열하였다. 이어서 0.5 $\mu$ l(2.5 units/ $\mu$ l)의 Tag DNA polymerase를 혼합하고 100 $\mu$ l의 mineral oil를 가하여 94-95 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 50-60 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing 및 70-74 $^{\circ}$ C에서 1분 또는 2분간의 polymerization 반응을 1회전으로 하여 30회전 실시하였다. 최종적으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 polymerization을 유지한 후 PCR을 종료하였다.

PCR 조건 조사 : PCR 실험에서 denaturation, annealing 및 polymerization 반응의 온도와 지속시간별로 효과를 비교하여 NDV-RNA로부터 HN 항원 유전자를 검출함에 적합한 조건을 조사하였다.

HN 항원 유전자 DNA의 확인 : PCR 실험으로 생산된 DNA를 1% agarose gel에서 전기영동하여 크기를 확인하고, DNA probe로써 hybridization 실험을 실시하여 HN-DNA 여부를 확인하였다.

DNA probe의 생산 : 여 등<sup>25</sup>의 교정원주의 HN-DNA를 추출한 후 random primer labeling 법<sup>26</sup>으로 방사성 동위원소를 표지하여 DNA probe를 생산하였다. 즉, 이들

의 유전자 재조합 DNA를 *Pst*I로 절단하여 HN-DNA중 1.6kb의 분절을 획득하였다. 이 DNA 5 $\mu$ l에 3 $\mu$ l의 dNTP 혼합액(각 0.5mM의 dATP, dGTP, dTTP), 2 $\mu$ l의 hexanucleotide primer(Boehringer Mannheim), 2 $\mu$ l의  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l, Amersham), 증류수 7 $\mu$ l 및 1 $\mu$ l의 Klenow enzyme(3.7 units/ $\mu$ l, GibcoBRL)을 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열하여 DNA probe를 만들었다.

Hybridization 실험 : PCR 실험으로 생산된 DNA를 1% agarose gel에서 전기영동시킨 후 nitrocellulose membrane(0.2 $\mu$ m, Biorad)에 Southern blotting<sup>26</sup> 하였다. 이 membrane에 DNA probe를 가하고 42 $^{\circ}$ C의 hybridization oven (Hybaid)에서 반응을 하여 세척 및 건조시킨 후 autoradiography 하여 HN-DNA 여부를 확인하였다.

## 결 과

NDV의 분획정제 및 RNA 분리 : 교정원주를 SPF 발육란에서 배양한 후 sucrose gradient 상태에서 초원심분리 및 분획, 정제하였던 결과는 Table 1과 같다. 분획 6번은 sucrose buoyant density(SBD)가 1.182로서 OD가 0.42로 가장 높았으므로 완전한 입자의 바이러스 분획인 것으로 확인되었다. 이때의 HA titer도 log 2<sup>11</sup>로서 가장 높았다. 따라서 이 분획의 바이러스를 초원심분리하여 100배 농축 보관하면서 RNA 추출에 사용하였다.

Table 1. Biological properties of Kyojongwon strain of Newcastle disease virus after ultracentrifugation and fractionation

Fraction number	Sucrose Density	Optical Density(A <sub>260</sub> )	Hemagglutination Titers(log 2)
1	0.220	0.02	2 <sup>1</sup>
2	0.216	0.03	2 <sup>1</sup>
3	0.202	0.05	2 <sup>3</sup>
4	1.196	0.15	2 <sup>4</sup>
5	1.188	0.28	2 <sup>7</sup>
6	1.182	0.42	2 <sup>11</sup>
7	1.172	0.25	2 <sup>6</sup>
8	1.168	0.08	2 <sup>4</sup>
9	1.160	0.04	2 <sup>2</sup>

분획정제된 NDV의 RNA에 대한 reverse transcription 반응 및 PCR : 분획정제된 교정원주 RNA의 HN 항원 유전자에 대한 reverse transcription 반응으로 first-strand의 cDNA를 생산한 후 PCR 실험을 하였던 결과는 다음과 같다.

본 실험에서 제시하였던 PCR의 제반조건중 1차적으로 denaturation에 적합한 조건을 알기 위하여 denaturation 반응의 온도와 시간을 94℃와 95℃에서의 1분간으로 구분하고, 여기에 각각 50℃에서 1분간 annealing 및 72℃에서 1분간 polymerization을 1회전으로 하여 30회 반응하였던 결과는 Fig 1과 같다. Denaturation 반응온도의 2가지 조건에서 각각 1.6kb 및 1.2kb 크기의 2종의 DNA가 생산되었으며, DNA probe와의 hybridization에서 이들은 모두 양성반응을 나타내었다. 공시된 primer들은 HN 항원 유전자중 1.6kb의 DNA 분절을 증폭할 수 있는데 이것 외에 1.2kb의 DNA가 증폭된 것은 denaturation의 온도와 관계없이 비특이적 priming의 결과로 생각되었다.

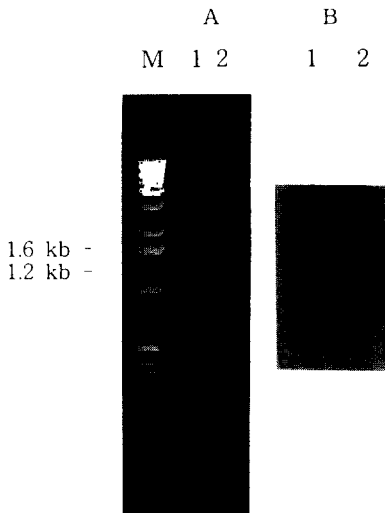


Fig 1. HN gene amplified from fraction-purified Kyojeongwon strain of NDV by different denaturation temperature and hybridized with DNA probe: A, PCR products by denaturation at 94℃, 1 min(lane 1) or 95℃, 1 min(lane 2), annealing at 50℃, 1 min, and polymerization at 72℃, 1 min; B, positive-hybridization of the DNAs with HN-DNA probe: M, 1 kb ladder marker.

이와같은 비특이적 반응성을 제거하고자 상기의 denaturation 및 polymerization 조건에 primer의 annealing 반응

을 각각 50℃, 1분과 55℃, 1분의 2가지로 하여 PCR을 하였던 성적은 Fig 2와 같다. Annealing 온도 50℃에서는 비특이적 priming이 확인되었던 반면 55℃에서는 1.6kb의 HN-DNA가 특이적으로 증폭되었다. 또한 denaturation 온도가 94℃ 보다 95℃일 때 증폭효과는 약간 우세하였으나 큰 차이는 인정되지 않았다.

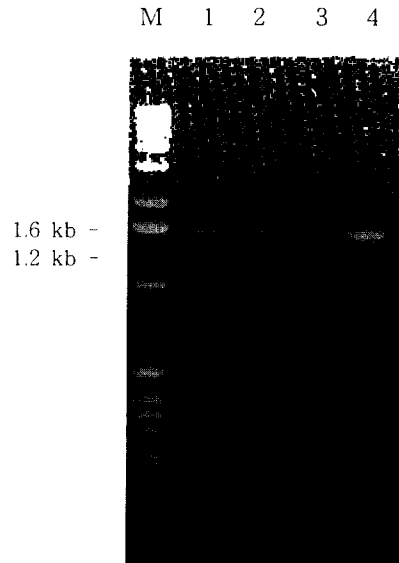


Fig 2. HN gene amplified from fraction-purified Kyojeongwon strain of NDV by different temperature of denaturation and annealing : PCR products by denaturation at 94℃, 1 min(lane 1 and 2) or 95℃, 1 min(lane 3 and 4), annealing at 50℃, 1 min(lane 1 and 3) and 55℃, 1 min(lane 2 and 4), and polymerization at 72℃, 1 min; M, 1 kb ladder marker.

그러므로 annealing에 적합한 조건을 구하고자 94℃에서 1분간 denaturation, 72℃에서 1분간 polymerization의 조건하에서 annealing 반응의 온도와 시간을 50℃, 55℃, 60℃에서 1분간의 3가지 조건으로 하여 PCR을 30회 실시하였다. 그 결과 Fig 3에서와 같이 50℃에서의 annealing시에만 비특이적 priming이 관찰되었으며, 55℃ 및 60℃간에서는 반응성의 차이를 구별할 수 없었다.

한편 polymerization에 적합한 조건을 조사하고자 94℃에서 1분간 denaturation, 55℃에서 1분간의 annealing 조건하에 polymerization 반응을 70℃, 72℃, 74℃에서 1분간의 3가지 조건으로 하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 Fig 4와 같이 polymerization의 온도 72℃ 및 74℃에서는

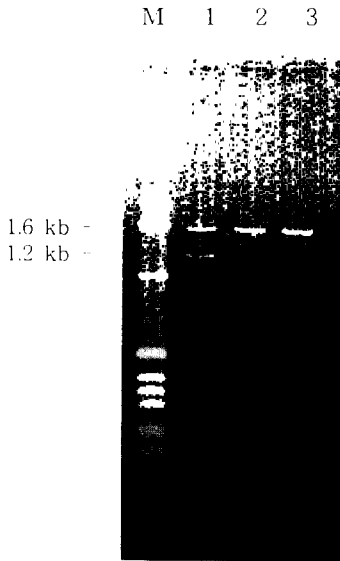


Fig 3. HN gene amplified from fraction-purified Kyojeongwon strain of NDV by different annealing temperature: PCR products by denaturation at 94°C, 1 min, annealing at 50°C, 1 min (lane 1), 55°C, 1 min(lane 2), or 60°C, 1 min(lane 3), and polymerization at 72°C, 1 min; M, 1 kb ladder marker.

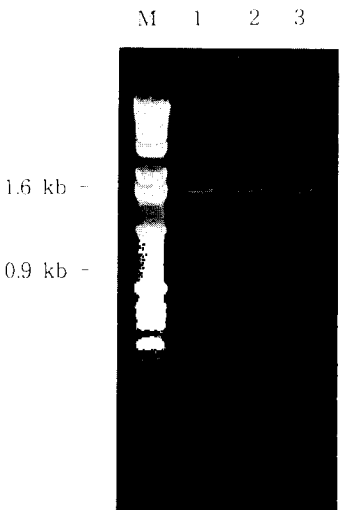


Fig 4. HN gene amplified from fraction-purified Kyojeongwon strain of NDV by different polymerization temperature: PCR products by denaturation at 94°C, 1 min, annealing at 55°C, and polymerization at 70°C, 1 min(lane 1), 72°C, 1 min(lane 2) or 74°C, 1 min(lane 3); M, 1 kb ladder marker.

동일하게 1.6kb의 HN-DNA만이 관찰되었으나 70°C에서

는 약 0.6kb의 DNA가 비특이적으로 생산되었다.

따라서 94°C, 1분간 denaturation 및 55°C, 1분간 annealing으로 조건을 고정하고 polymerization을 72°C에서 1분과 2분으로 반응시간을 달리하였을 때 Fig 5에서와 같이 1.6kb의 HN-DNA를 특이적으로 증폭할 수 있었으며 DNA의 양은 2분간의 polymerization 반응에서 더 많음을 알 수 있었다.

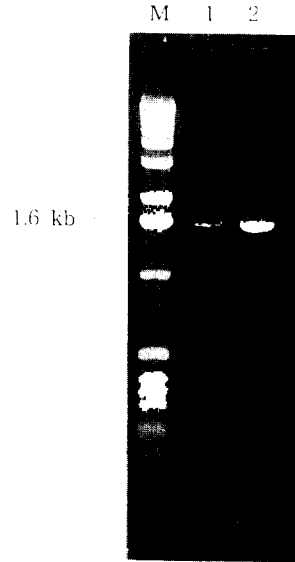


Fig 5. HN gene amplified from fraction-purified Kyojeongwon strain of NDV by different polymerization time: PCR products by denaturation at 94°C, 1 min, annealing at 55°C, 1 min, and polymerization at 72°C, 1 min(lane 1) or 72°C, 2 min(lane 2); M, 1 kb ladder marker.

미정제된 NDV의 RNA에 대한 reverse transcription 반응 및 PCR : SPF 발육란의 장노막강에서 NDV를 배양시킨 후 장노막강액을 초원심분리 및 정제하지 않고 배양액으로부터 직접 HN-DNA를 검출하기 위하여 배양후에 1HA unit가 log 2<sup>7</sup> 수준이었던 교정된 바이러스액을 PBS(pH 7.2)로 2<sup>4</sup>~2<sup>10</sup>배 희석한 후 각 희석액 0.5 ml로부터 RNA를 추출하였다. RNA에 대한 reverse transcription 반응과 94°C, 5분간 예비 가열한 후 94°C, 1분간 denaturation, 55°C, 1분간 annealing 및 72°C, 2분간 polymerization의 반응조건으로 PCR을 30회 실시하고 72°C, 5분간 polymerization을 유지하여 Fig 6과 같은 성적을 얻었다. 2<sup>4</sup>~2<sup>8</sup>의 희석배수에서 1.6kb의 HN-DNA가 증폭되

었으며, 이들은 모두 DNA probe에 의하여 hybridization 양성반응을 나타내었다.

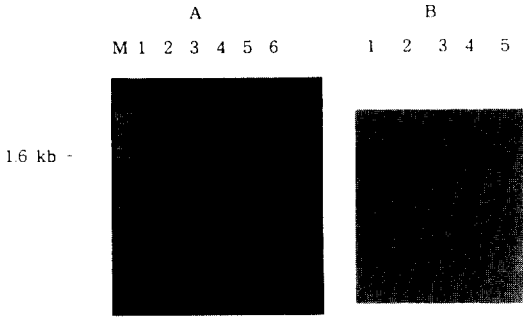


Fig 6. HN gene amplified from kyojeongwon strain in allantoic fluid of different HA titers and hybridized with DNA probe: A, PCR products by denaturation at 94°C, 1 min, annealing at 55°C, 1 min, and polymerization at 72°C, 2 min; dilution rates of the samples 1, 2, 3, 4, 5 and 6 respectively were 1:2<sup>1</sup>, 1:2<sup>2</sup>, 1:2<sup>3</sup>, 1:2<sup>4</sup>, 1:2<sup>5</sup> and 1:2<sup>6</sup> of the allantoic fluid harbouring 1 HA unit in log 2<sup>7</sup>; B, positive-hybridization of the DNAs with HN-DNA probe; M, 1 kb ladder marker.

한편 NDV의 바이러스주별로 장뇨막강 배양액으로부터 직접 바이러스 RNA를 추출한 후 동일한 PCR 방법으로 HN-DNA의 검출을 시도하였던 바 교정원주, Herts주 및 야외분리 강독주의 2<sup>7</sup> 희석액에서 1.6kb의 HN-DNA가 검출되었다(Fig 7). 이에 비하여 B1주에서는 1.6kb의

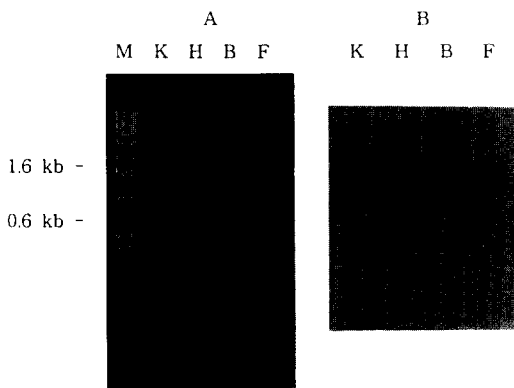


Fig 7. HN genes amplified from NDVs in allantoic fluids and hybridized with DNA probe: A, PCR products by denaturation at 94°C, 1 min, annealing at 55°C, 1 min, and polymerization at 72°C, 2 min; K, Kyojeongwon; H, Herts; B, B1; F, field isolate; B, positive-hybridization of the DNAs with HN-DNA probe; M, 1 kb ladder marker.

DNA외에 약 0.6kb의 DNA가 동시에 증폭되었으며, 이들에 대한 DNA는 hybridization 실험에서 HN-DNA임이 확인되었다.

## 고 찰

이 실험에서는 NDV의 HN 항원 유전자를 검출하기에 적합한 PCR 방법을 확립하고자 하였다. 이를 위하여 일차적으로 교정원주의 RNA를 추출한 후 reverse transcription 및 다양한 조건하에서의 PCR를 실시하였다. 먼저 교정원주로부터 RNA를 순수 추출하기 위하여 SPF 발육란에서 배양한 후 sucrose gradient 상태에서 초원심 분리 및 분획하였을 때 SBD가 1.182이며, OD가 0.42인 바이러스액을 얻을 수 있었다. 일반적으로 NDV의 SBD는 1.18~1.19로 알려져 있는데 SBD가 1.190인 분획에서는 OD가 0.28로 낮아서 완전한 입자의 바이러스가 아닌 것으로 생각되었다. 따라서 SBD 1.182인 분획의 바이러스액을 초원심분리하여 100배 농축시킨 후 이로부터 추출된 바이러스 RNA에 대하여 reverse transcription을 42°C에서 1시간동안 실시하였던 바 이 반응조건은 뒤에 실시되었던 다양한 PCR 실험에서의 성적으로 볼 때 PCR 반응에 사용될 first-strand의 cDNA 생산에 적합함을 알 수 있었다.

생산된 first-strand의 cDNA에 대하여 NDV의 유전자로부터 1.6kb의 HN-DNA를 획득할 수 있는 primer들을 이용하여 여러가지 반응조건하에서 PCR 실험을 수행하였다. 즉, Taq DNA polymerase를 제외한 모든 반응시약을 혼합하여 94°C에서 5분간 예비 가열한 후 Taq DNA polymerase를 첨가하여 denaturation, annealing 및 polymerization 반응의 각 온도와 시간을 달리하여 PCR을 실시하였고, 72°C에서 5분간 polymerization을 유지한 후 PCR을 종료하여 각 반응조건에 따른 성적을 비교하였다.

먼저 denaturation 반응조건을 94°C와 95°C에서 1분간으로 구분하여 각각 50°C에서 1분간 annealing 및 72°C에서 1분간 polymerization을 1회전으로 하여 30회 실시하였을 때 denaturation의 온도에 관계없이 1.6kb 및 1.2kb의 2가지 HN-DNA의 분절이 확인되었으며 1.2kb의 DNA는 비특이적 priming의 결과로 생각되었다. 일반적으로 primer의 annealing 반응온도와 시간은 primer의 크기, 염기구성 비율 및 농도에 따라 다르며, 온도를 높일수록 비특이적인 priming 및 이에 따른 polymerization을 줄일 수 있다<sup>16</sup>.

동일한 denaturation 및 polymerization 조건에서 annealing 반응온도를 각각 50℃, 55℃, 60℃로 하였을 때 55℃와 60℃ 조건에서는 반응도의 차이 없이 1.6kb의 HN-DNA 만 특이적으로 증폭되었으며, denaturation 반응온도 95℃에서의 증폭효과가 약간 우세하였으나 94℃에서와 큰 차이는 없었다. 따라서 denaturation 및 annealing 반응을 각각 94℃ 및 55℃에서는 1분간 실시함이 적절한 것으로 판정되었다. 또한 94℃, 1분간 denaturation 및 55℃에서 1분간 annealing을 한 후에 polymerization 반응을 72℃ 또는 74℃에서 1분간 하였을 때 모두 특이적인 1.6kb의 DNA만이 관찰되었다. 이와같은 결과는 polymerization의 온도가 낮을 때 비특이적인 DNA의 합성이 유발될 수 있다는 사실<sup>16</sup>과 일치되었고, 72℃ 및 74℃에서는 동일한 성적을 얻을 수 있었으며 72℃에서 2분간 polymerization을 수행시에 PCR 산물이 더 많았다. 그러므로 HN-DNA의 검출을 위한 PCR 조건으로서 94℃에서 1분간 denaturation, 55℃에서 1분간 annealing 및 72℃에서 2분간 polymerization 반응을 30회 실시함이 적절한 것으로 판정되었다.

Jestin과 Jestin<sup>27</sup>은 LaSoat주를 장노막강에서 배양한 후 정제시킨 바이러스액 또는 미정제된 바이러스액으로부터 F 항원 유전자를 검출하기 위한 PCR을 하였다. 이들은 바이러스 RNA에 대하여 37℃에서 1시간동안 reverse transcription 반응을 한 후 95℃, 1.5분간 denaturation, 51℃, 2.5분간 annealing 및 75℃, 1분간 polymerization을 35회 실시하고 75℃, 2분간 polymerization을 유지하였던 결과 F-DNA를 검출할 수 있었음을 보고하였다. 이와같은 F-DNA의 검출을 위한 PCR의 조건 및 반응성을 본 실험에서의 HN-DNA에 대한 PCR 방법과 비교하기는 어려우나 annealing 및 polymerization 반응의 온도와 시간에서 다소 차이가 있음을 알 수 있었다.

본 실험에서 결정되었던 PCR 조건을 발육란의 장노막강내 배양후 정제하지 않은 교정원주의 HN-DNA 검출에 적용하였을 때 1HA unit가 log 2<sup>7</sup> 수준이었던 바이러스액의 2<sup>4</sup>-2<sup>8</sup>배 희석액에서 HN-DNA가 증폭되었다. 또한 Herts주, B1주 및 야외분리 강독주를 발육란의 장노막강내 배양후 미정제된 바이러스로부터 RNA를 추출하여 동일한 조건의 PCR을 실시하였을 때 1.6kb의 HN-DNA가 검출되었다. 한편 B1주에서는 1.6kb의 DNA외에 약 0.6kb의 DNA가 동시에 증폭되었다. 이와같은 결과는 본 실험에 공시되었던 antisense primer가 강독주인 Tex-

as GB주의 HN 항원 유전자에 특이적인 염기서열로 구성되어 있으며 B1주의 HN 항원 유전자의 해당부위 염기서열<sup>28</sup>과는 약간의 차이가 있기 때문인 것으로 추측되었다. 따라서 B1주 등의 약독주에 대한 공시 primer의 PCR 반응성은 추후 더 조사되어야 할 것이다.

## 결 론

NDV의 HN 항원 유전자를 특이적으로 검출할 수 있는 PCR 방법을 확립하기 위하여 교정원주를 SPF 발육란의 장노막강에서 배양하고 sucrose gradient에서 초원심분리 및 분획, 정제한 후 추출된 RNA의 HN 항원 유전자에 대한 reverse transcription 반응을 42℃에서 1시간 실시하여 DNA의 first-strand를 생산하였다. 이것에 대하여 sense primer 및 antisense primer를 사용하여 PCR 실험을 하였던 결론은 다음과 같다.

HN 항원 유전자의 특이적 검출에 적합한 PCR 조건으로서 94℃, 5분간 예비 가열한 후 94℃에서 1분간 denaturation, 55℃에서 1분간 annealing 및 72℃에서 2분간 polymerization의 반응을 30회 실시하고 72℃에서 5분간 polymerization을 유지하여 HN 항원 유전자중 1.6kb의 DNA를 획득할 수 있었다. 이와같은 reverse transcription 반응 및 PCR 조건을 장노막강내 배양후 미정제된 바이러스액에 적용하였을 때 교정원주, Herts주 및 야외분리 강독주의 RNA로부터 1.6kb의 HN-DNA가 특이적으로 검출되었다.

## 참 고 문 헌

- Alexander DJ. Newcastle diseases and other paramyxovirus infection. In Calnek BW *et al*, ed *Diseases of poultry*. Iowa State University Press, Ames, Iowa:496-519, 1991.
- Doyle TM. A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter-passing virus. *J Comp Pathol Ther*, 40:144-169, 1927.
- Kraneveels FC. A poultry disease in the Dutch East Indies. *Ned Indisch B1 Diergeneesk*, 38:448-450, 1926.
- Konno T, Ochi Y and Hashimoto K. Neue Gefluogelseuche in Korea. *Deut Tieraerztl Wochschr*, 37:515, 1929.

5. Stewart DL, Hebert CN and Davidson I. International reference preparation of anti-Newcastle disease serum. *Bull WHO* , 38:925-928, 1968.
6. Chu HP, Snell G, Alexander DJ, *et al* . A single radial immunodiffusion test for antibodies to Newcastle disease virus. *Avian Pathol* , 11:227-234, 1982.
7. Gelb J and Cianci CG. Detergent-treated Newcastle disease virus as an agar gel precipitin test antigen. *Poult Sci* , 51:1450-1456, 1987.
8. Snyder DB, Marquadt WW, Mallison ET, *et al* . Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. I. Measurement of antibody activity titer against Newcastle disease virus in a single dilution. *Avian Dis* , 27:161-170, 1983.
9. Wilson RA, Perrotta C, Frey B, *et al* . An enzyme-linked immunosorbent assay that measures protective antibody levels to Newcastle disease virus in chicken. *Avian Dis* . 28:1079-1085, 1984.
10. Chambers P and Samson ACR. A new structural protein for Newcastle disease virus. *J Gen Virol* , 50:155-166, 1980.
11. Hightower LE and Bratt MA. Protein synthesis in Newcastle disease virus infected chicken embryo cells. *J Virol* , 13:788-800, 1974.
12. Mountcastle WE, Compans RW, Caligiuri LA, *et al* . Nucleocapsid protein subunits of simian virus 5, Newcastle disease virus and Sendai virus. *J Virol* , 6:677-684, 1970.
13. Choppin PW and Compans RW. Reproduction of paramyxoviruses. In Fraenkel-Conrat H, *et al* . ed *Comprehensive virology* . vol 4. Plenum Press, New York: 95-178, 1975.
14. Homma M and Ohuchi M. Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. III Structural difference of Sendai viruses growth in eggs and tissue culture cells. *J Virol* , 12:1457-1465, 1973.
15. Nagai Y, Klenk HD and Rott R. Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology* , 72:494-508, 1976.
16. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, *et al* . *PCR protocol: A guide to methods and application* . Academic Press, San Diego:3-12, 1990.
17. Jestin A, Foulon T, Pertuiset B, *et al* . Rapid detection of pseudorabies virus genome sequence in biological samples from infected pigs using polymerase chain reaction DNA amplification. *Vet Microbiol* , 23:317-328, 1990.
18. Schroeder BA and Balassu-Chan TC. Specific sequence amplification of bovine viral diarrhea virus nucleic acid. *Arch Virol* , 111:239-246, 1990.
19. Allard A, Grirones R, Juto P, *et al* . Polymerase chain reaction for detection of Adenovirus in stool samples. *J Clin Microbiol* , 28(12):2659-2667, 1990.
20. Seal BS, King DJ, Bennett JD. Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of Sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. *J Clin Microbiol* , 33(10): 2624-2630, 1995.
21. Beard CW. Serologic procedures. In purchase HG *et al* , ed *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens* . Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque, Iowa:192-200, 1990.
22. Chambers P, Millars NS, Bingham RW, *et al* . Molecular cloning of complementary DNA to Newcastle disease virus and nucleotide sequence analysis of the junction between the genes encoding the hemagglutinin-neuraminidase and the large protein. *J Gen Virol* . 67: 475-486, 1986.
23. Schaper UM, Fuller FJ, Ward MDW, *et al* . Nucleotide sequence of the envelope protein genes of a highly virulent, neurotropic strain of Newcastle disease virus. *Virology* , 165:291-295, 1988.
24. Maniatis T, Fritsch EF and Samson J. *Molecular cloning: A laboratory manual* . Cold Spring Harbor, New York:213-214, 1982.
25. 여상건, 김재홍, 권준현 등. 닭 뉴캐슬병 바이러스 유전자 재조합 백신에 관한 연구. 3. 뉴캐슬병 바이러스 HN, F 유전자의 재조합 및 발현. 농촌진흥청 연구보고서, 1-46, 1995.
26. Ausubel F, Brent R, Kingston RE, *et al* . *Short pro-*



- protocols in molecular biology*. 3rd ed, John Wiley & Sons, Inc., USA:3.19-3.20, 2.28-2.32, 1995.
27. Jestin V and Jestin A. Detection of Newcastle disease virus RNA in infected allantoic fluids by *in vitro* enzymatic amplification(PCR). *Arch Virol*, 118:151-161, 1991.
28. Toyoda T, Sakaguchi T, Hiroda H, *et al*. Newcastle disease virus evolutions. II. Lack of gene recombination in generating virulent and avirulent strains. *Virology*, 169:273-282, 1989.
-