

**식품 유래 노로바이러스 신속 검출 및 유전자
추출 기법**

식품 유래 노로바이러스 신속 검출 및 유전자 추출 기법

동국대학교 생명공학과 최원상

우리나라의 식중독 발생은 매년 대형화되는 추세에 있으나 전체의 약 40% 정도는 원인물질이 확인되지 않고 있다 (1). 미국의 경우도 이와 유사한 경향을 보이고 있는데 전체 식중독 중 약 68.1% 정도는 미확인 인 것으로 추정되고 있다 (5). 1996년과 1997년의 조사를 보면 전체 미확인 비세균성 식중독 발생중 약 96%가 노로바이러스와 연관이 있는 것으로 보고 되었다 (2). 바이러스가 원인물질이라고 가정할 경우 가능성이 있는 바이러스로는 노로바이러스, 사포바이러스, 아스트로바이러스, 로타바이러스, 아데노바이러스와 엔테로바이러스 등을 예상할 수 있으나 여러 가지 정황으로 보아 노로바이러스가 가장 중요한 식중독 바이러스가 될 것으로 판단된다 (3).

노로바이러스는 naked, icosahedral, single-stranded, positive sense RNA 바이러스로 유전자의 길이는 7.6-7.7 kb정도이다(3). 일반적으로 식품에는 노로바이러스가 오염되어 있다하더라도 극미량의 바이러스만이 오염되어 있는데다 숙주가 없이는 복제하지 않으므로 무생물의 상태로 존재하다가 가열처리 하지 않고 사람이 이를 섭취하면 체내에서 복제를 하게 된다. 따라서 비열처리 식품 모두가 식중독 바이러스의 원인 식품이 될 가능성을 가지고 있다. 그러나 실험실에서 바이러스를 배양하는데 이용할 수 있는 세포가 현재까지 알려져 있지 않아 세포배양을 이용하여서는 노로바이러스의 오염여부를 확인할 수 없다 (3). 따라서 초기에는 전자현미경을 이용하여 환자의 분변으로부터 노로바이러스의 감염여부를 확인하였다. 그러나 전자현미경은 분변에 1ml당 적어도 백 만개 이상의 바이러스입자가 있어야만 확인이 가능한 단점이 있고 식품의 검사에 활용하기에는 적합하지 못하다. 혈청을 이용한 검출도 바이러스의 변이가 심하여 몇 가지의 혈청형이 존재하는지도 아직 모르는 실정이므로 ELISA등의 방법으로 환자의 분변으로부터 바이러스를 확인하기에도 어려우며 식품의 검사에 적용하기에는 더더욱 부적합하다. 따라서 식품중의 노로바이러스 검출은 유전자 정보를 이용한 방법들을 이용할 수 밖에 없다. 유전자정보를 이용한 노로바이러스의 검출법은 크게 RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction)을 이용한 방법과 NASBA (nucleic acid sequence based amplification)를 이용하는 방법으로 나눌 수 있다. RT-PCR은 다시 2 step RT-PCR (역전사후 일부를 이용하여 다시 PCR을 행함)과 single step

RT-PCR (역전사와 PCR을 같은 tube에서 행함), nest RT-PCR, real time RT-PCR등으로 나눌 수 있으나 기본적으로는 염기서열을 이용한다는 면에서는 같은 원리이다. NASBA는 promoter가 만들어지게 디자인한 primer와 3가지 효소 (reverse transcriptase와 RNase H, T7 RNA polymerase)를 함께 같은 tube에 넣어주어 이때 만들어지는 RNA를 확인하는 방법으로 HIV-1을 포함한 일부 바이러스의 경우 환자로부터 바이러스의 감염여부를 확인하는데 이용되고 있으나 노로바이러스의 경우 이 기술을 개발한 회사를 중심으로 확인에 이용해 보고자 시도중에 있다. 현재로서는 가장 널리 사용되는 방법이 RT-PCR에 의한 검출법이다. 이들 방법은 매우 민감한 방법이지만 하나 두 가지 면에서 검출을 어렵게 하고 있다. 첫째는 식품에 효소반응을 방해하는 물질 (inhibitor)이 존재하여 검출을 방해하는 경우가 많고 둘째는 바이러스의 염기변이가 극심하므로 아직까지는 식품중의 모든 노로바이러스를 검출할 수 있는 primer가 알려져 있지 않다는 점이다. 따라서 현재의 연구들은 식품으로부터 바이러스를 효과적으로 농축하는 연구, 바이러스 RNA를 효과적으로 추출하는 연구, 바이러스 RNA를 검출하기 위한 primer 개발 연구 등에 초점이 맞추어져 있다. 최근 몇 group에서 식품으로부터 바이러스 유전자를 추출하는 방법들에 관해 보고한 바 있으나 (4) 어느 방법이 유용할 지에 관해서는 비교 검정이 필요하다. 이번 발표는 굴, 바지락조개, 돼지고기를 분석 시료로 하여 이들 식품에 인위적으로 바이러스를 감염시킨 다음 RT-PCR을 이용하여 검출한 예를 제시한다.

참고문헌

1. 우건조, 이동하, 박종석, 강윤숙, 김창민, 2002. 식중독 예방과 식품안전관리 방안. *식품산업과 영양* 7 (1), 17-21.
2. **Fraankhauser, R.L., Noel, J.S., Monroe, S.S., Ando, T., and Glass, R. I.** 1998. Molecular epidemiology of 'Norwalk-like viruses' in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Infec. Dis.*, 178, 1571-1578.
3. **Koopmans, M., von Bonsdorff, C., Vinje, J., de Medici, D., and Monroe, S.** 2002. Foodborne viruses. *FEMS Microbiol. Reviews* 26, 187-205.
4. **Lees, D.** 2000. Viruses and bivalve shellfish. *Int. J. Food. Microbiol.* 59, 81-116.
5. **Olsen, S.J., MacKinon, L.C., Goulding, J.S., Bean, N.H. and Slutsker, L.** 2000. Surveillance for foodborne disease outbreaks-- United states, 1993-1997. *MMWR. CDC* 49 (SS01) 1-51.

식품유래 노로바이러스의 신속 검출 및 유전자 추출기법

동국대학교 생명공학과
최원상

바이러스의 개념

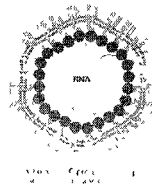
1. **Size: EM 관찰**
2. **여과여부: filterable**
3. **영양배지에서의 증식 여부: 숙주를 필요로 함.**

바이러스의 유전자

- RNA 또는 DNA 중 한가지
not both
- 바이러스의 RNA 또는 DNA는 single 또는 double stranded form임.
not both

Virion: free virus particles

- Genome :
DNA or RNA
- capsid: protein coat
- envelope



Host range

- **animal viruses**
- **Plant viruses**
- **bacteriophages**

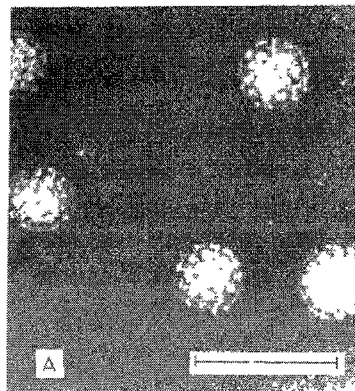
Host range는 어떻게 정해지 나?

- **cell surface에 존재하는 receptor**
- **virion's coat**
- **virus의 복제에 필요한 cellular factor의 availability**

General Morphology of Viruses

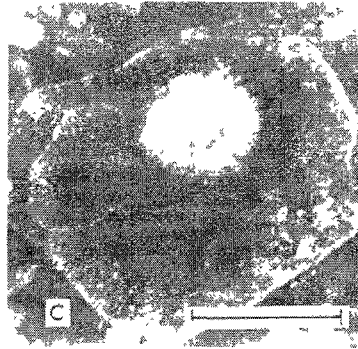
Naked icosahedral virions

- Poliovirus
- Norovirus
- Hepatitis A virus



Enveloped icosahedral virion

- Herpesvirus
 - - Herpes simplex
- Hepadnavirus
 - - Hepatitis B virus



Naked helical virions

- **tabacco mosaic virus**



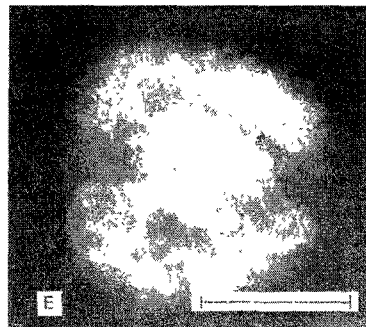
Enveloped helical virions

- influenza virus
- vesicular stomatitis virus



Complex virions

- vaccinia virus



Animal virus의 분류

- DNA virus

1. ds DNA virus
Adenovirus, Herpesvirus,
Poxvirus 등
2. ss DNA virus
Parvovirus

- RNA virus

1. ss RNA virus (positive strand)
picornavirus (poliovirus, HAV 등)
calicivirus (norovirus 등)
coronavirus (SARS virus 등)
2. ss RNA virus (negative strand)
orthomyxovirus (influenza virus)
paramyxovirus (measles, mumps)
3. ds RNA virus
reovirus (rotavirus)
4. Retrovirus
HIV-1 등

Foodborne & Waterborne viruses

- Group I
(Gastroenteritis 를 유발
하는 viruses)

- Rotavirus :
- Adenovirus :
- Astrovirus :
- Norovirus (Norwalk-like
viruses)
- Sapovirus (Sapporo-like
caliciviruses)

- Group II (fecal-orally
transmitted hepatitis
viruses)

- Hepatitis A virus (HAV)
- Hepatitis E virus (HEV)

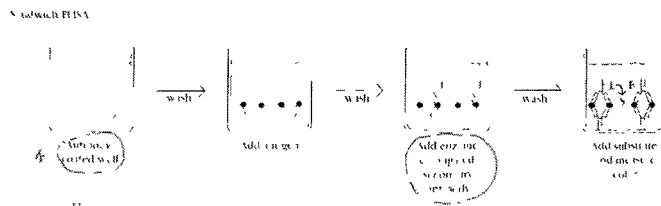
- Group III
(Enteroviruses)

- Poliovirus
- Coxsackie virus
- Echovirus

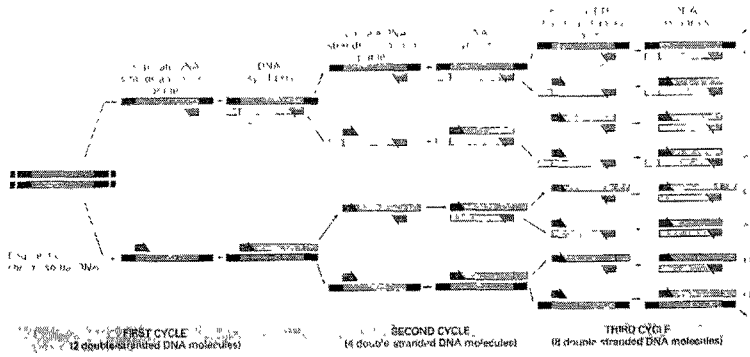
식중독바이러스의 검출 방법

1. EM
2. ELISA
3. RT-PCR
4. RT-PCR & Nested PCR
5. Real-time PCR
6. NASBA
(nucleic acid sequence based amplification)

ELISA의 원리



PCR의 원리



NASBA의 원리

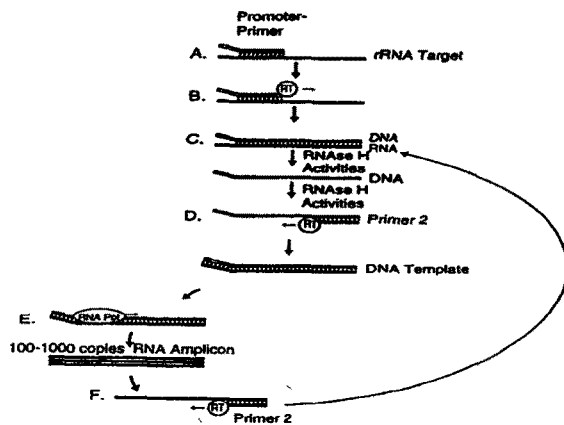


Table: Properties of tests that are used to detect the foodborne viruses

Assay Methods	Principle	Detection limit (particles/g)	Infectivity test
EM	Visualization of particles	10^6	No
ELISA	Detection of viral proteins using Ab	10^5	No
Cell culture	Screen for effect on living cells	10^{0-1}	Yes
Hybridization	Detection of genome	10^4	No
RT-PCR Nested RT-PCR Real-time RT-PCR	Detection of genome	10^{0-3}	No
NASBA	Detection of transcript	?	No

식품중의 식중독 바이러스는 왜 검출이 어려운가?

1. 식품 중에 극미량 오염되어 있다.
2. 식품은 무생물이면서 숙주가 아니므로 식품에 존재하는 동안은 증식되지 않음.
3. 식품중의 물질이 검출을 방해함 (inhibitor).
4. 확인을 위해 배양할 경우 cell culture system에서 바이러스가 자라지 않거나 아주 천천히 자란다.
5. 마땅한 animal model이 없음. (검출방법 개발을 위한 surrogate model 이용)

식품중의 바이러스검출법의 요건

- 1. **Extraction of virus particles (nucleic acid) from the food matrix**
- 2. **Simple: as few steps as possible**
- 3. **Efficient: in terms of recovery of viruses**
- 4. **Reproducible**

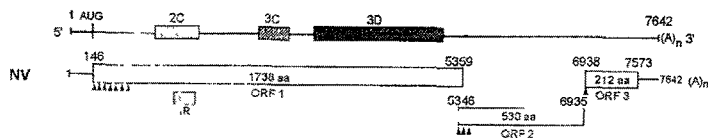
식품중의 바이러스 유전자추출법

- 1. 현재까지는 대부분 shellfish에 focused.
- 2. 몇 group에서 다소 다른 protocol을 개발한 바 있으나 어느 방법이 나올지는 비교 연구가 필요함.
- 3. 최근 일부 다른 식품에서도 바이러스의 검출을 보고한 바 있음.

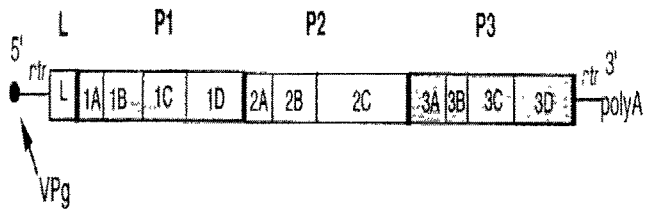
Norovirus & Poliovirus

- naked
- icosahedral
- single-stranded
- positive-sense RNA virus
- genome size: 약 7.6-7.7 kb

Genomic organization of norovirus



Genomic organization of picornavirus



식품중의 바이러스 검출

실험방법

재료

- 돼지고기: 돈까스용 돼지고기 100g
- 증류수 100ml
- stomacher로 분쇄 후 사용

- 굴: 생굴 100g
- 증류수 100ml
- blender로 분쇄 후 사용

- 바지락조개: 바지락 100g
- PBS 100ml
- blender로 분쇄 후 사용

Extraction of viral RNA from food

200 l extract

inoculation of poliovirus or norovirus

1ml Trisol or Easy-Blue

vortex & tumbling

200 l chloroform

vortex & tumbling

centrifuge & transfer supernatant to new tube

precipitate with isopropanol

wash with 70% ethanol

resuspend the pellet in DEP-treated water

Assay of Virus

- **Poliovirus**
- **plaque assay**

- **Norovirus**
- **RT-PCR assay**

Table: Primers used in this study

Name	Sequence (5' 3') ^c	Region	Length of amplicons
poliovirus DG172 DG173	GATTACAAGGATGGTACGCTT GACTCTATGTAATTGGTGATGCCT	VP1 2B	524bp
Norovirus DG179 ^a DG180 ^a DG185 ^b DG186 ^b	CARYGGAACTCCAYYRCCCACTG TGGGATCGCCCTCCCAAYGTG TWCTCYTTYTATGGTGATGATGA TTWCCAAACCAACCGCTG	RNA pol RNA pol	574bp 203bp

Primers used in this study

- DG179 (NVLII184U23) & DG180 (NVLII738L20)
- ^a Legeay et al. 2000. J. Virol. Meth, 90, 1-14.

- DG185 (SRII-2) & DG186 (SRII-3)
- ^b Hafliger et al. 1997. Int. J. Food Microbiol. 27-36.

- ^c Mixed bases in degenerated primers:
- W=A/T, Y=C/T, K=G/T, R=A/G