

— 기술정보 —

## 수인성 바이러스 분석에서 RT-PCR과 IFA를 이용한 수인성바이러스 분석법의 보완

— Technical Information —

### The Complement of Total Culturable Virus Assay Using RT-PCR and IFA for Detection of Enteroviruses

지연숙<sup>1,\*</sup> · 이규철<sup>2</sup>

Jee, Youn Sook<sup>1,\*</sup> · Lee, Gyu Cheol<sup>2</sup>

1 한국수자원공사 경남지역본부 낙동강남부권 수질검사소,  
2 한국수자원공사 수돗물분석연구센터

#### 1. 서 론

수인성 바이러스는 장관계 질병의 주요 원인 중의 하나로 이들 바이러스에 감염된 환자의 분변이 수계로 유입되면 위장염, 심근염, 뇌수막염 등 다양한 질병을 일으킨다(Claudia Chezzi, 1996).

환경에서 수인성 바이러스는 오염된 물을 통해서 분변-구강의 경로로 전염되며 세균에 비해 환경에서 오래 생존하며 매우 적은 양으로도 인간에게 감염되어 질병을 유발하기 때문에 건강에 유해한 요인으로 구분되고 있다.

이러한 수인성 바이러스들이 원수에서 검출되고, 바이러스가 염소 소독에 비교적 높은 저항성을 가져 정수에서도 검출 가능성이 있으며, 시설이 노후된 소규모 정수장에서는 바이러스가 검출될 위험이 높다는 의견이 제시되면서 수인성 바이러스를 정확하게 검출하는 것에 대한 관심이 높아지고 있다.

현재 수인성 바이러스의 검출을 위해서 국내에서는 정수처리기준으로 제시하고 있는 표준시험방법인 총배양성바이러스분석법(Total culturable virus assay)

을 사용하고 있다(Vivier J.C., 2001)

총배양성바이러스분석법은 바이러스의 감염성 확인이 가능하고, 바이러스 정량이 용이하다는 장점이 있는데 비해 분석시간이 많이 소요되고 검출된 바이러스의 동정이 어렵다는 단점이 있다.

본 연구는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction)법과 IFA(Immunofluorescence assay)법을 병행함으로써 총배양성바이러스분석법이 가지는 단점을 보완하여 수인성 바이러스 분석결과에 대한 정확성과 신뢰도를 높이고자 하는데 목적이 있다.

#### 2. 실험방법

##### 2.1. 시료의 채수 및 농축

한국수자원공사에서 운영 관리하고 있는 광역상수도중 10개 상수 원수 지점을 선정하였다. 각 지점에서 상수 원수 200~300L를 정수처리기준의 총배양성 바이러스분석법에 따라 채수를 하고 시료를 농축하였다.

##### 2.2. 세포배양 및 바이러스 증식

바이러스 배양에 사용된 세포는 국립환경과학원에

\*Corresponding author Tel: +82-55-268-7231, FAX: +82-55-268-7237, E-mail: ysjee99@kowaco.or.kr (Jee, Y.S.)

**Table 1.** Primer sequence

바이러스 종류	Primer sequences	bp
Poliovirus	sence 5' -AGA GAG TTC TGC CCA GTG GA- 3' antisense 5' -TGC CCC AGT TGT TGT GTT TA-3	172
Reovirus	sence 5' -GCG CTG CTG TCC TAT TCA AGA CT-3' antisense 5' -TAG TTC ATG AGA AGC TGG TTCAC-3'	534
Coxsackievirus	sence 5' -GAA CTT GCC AAT GGT GAC CT-3' antisense 5' -AGG TGT CCG TCC AGC ATT AC-3'	237

서 분양 받은 BGM(Buffalo Green Monkey) 세포를 사용하였으며, 배지는 5% FBS(fetal bovine serum, Gibco BRL.)가 첨가된 MEM(minimal essential medium, Sigma Co.)/L15(Leibovitz's L-15 medium, Gibco BRL.)을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다.

3~4일 배양하여 세포가 단층을 형성하면 시료를 접종한 후 37°C에서 1시간 이상 방치하여 바이러스를 감염시킨 후, 유지배지(2% FBS를 첨가한 MEM/L15배지)를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 14일간 배양, 관찰하였다. 이 과정은 표준 시험방법인 총배양성바이러스분석법을 따랐다.

### 2.3. IFA

T25플라스크에 25% 이상 CPE(cytopathic effect)를 보이는 시료에 대하여 0.5mL PBS를 넣고 세포단층을 분리하였다. 분리된 세포를 재 부유 시킨 다음 원심 분리하여 세포만을 얻고, 다시 0.1~0.2mL의 PBS로 재 부유 시켜 슬라이드에 spot을 만들어, 공기 중에서 완전히 건조 시킨 뒤 냉장 보관된 아세톤으로 세포를 10분간 고정하였다.

고정이 끝난 세포는 Pan-enterovirus, Enterovirus, Poliovirus, Echovirus, Coxsackievirus, Adenovirus, Reovirus의 단일클론항체를 각각 적당량 덮은 후 습기가 충분한 용기에 슬라이드를 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 PBS로 5분간 3회 세척하여 남아있는 단일클론항체를 제거하고 여기에 FITC(fluorescein isothiocyanate)가 결합되어 있는 Anti-Mouse IgG를 적당량 덮고 다시 습기가 충분한 용기에 넣고 37°C에서 30분간 반응을 시켰다. 반응 후 위와 동일한 방법으로 세척한 후 고정을 하여 형광현미경을 사용하여 분석하였다.

이때 양성 대조군으로 Poliovirus, Reovirus,

CoxsackievirusB control slide를 사용하였으며, 정상세포를 음성 대조군으로 사용하였다.

### 2.4. 바이러스 RNA 분리

CPE가 관찰되어 바이러스 양성으로 판단되는 시료의 상등액 500μl를 취하여 QIAmp Viral RNA mini kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 바이러스 RNA를 추출하였다. 추출과정은 kit내에 포함되어 있는 실험 방법을 따랐다. 최종적으로 50μl의 RNA를 추출하였다.

### 2.5. RT-PCR

추출한 RNA의 역전사 반응은 반응용기에 시료 10 μl, 100U역전사효소(M-MLV transcriptase, promega Co.), 15mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM DTT, 각 1mM dNTP, 10U RNase inhibitor(RNasin, promega Co.), 25μM random hexamer를 첨가하여 최종부피를 30μl로 맞추었다. 이 혼합물을 99°C에서 4분, 25°C에서 15분, 42°C에서 60분, 99°C에서 5분 동안 반응시키면서 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA template 중 10 μl에 2.5μM Taq DNA polymerase(Promega Co.), sense primer, antisense primer를 각각 0.1μM을 사용하였다. 이때 사용한 primer는 기존 문헌(Li, 2002)을 참고로 작성하였으며, Poliovirus, Reovirus, Coxsackievirus에 대한 각각의 primer쌍을 사용하였다(Table 1). 반응 조건은 94°C 45초, 60°C 45초 72°C 45초의 조건으로 35회 반복하였다. PCR산물은 전기영동으로 확인하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 시료접종

10개 지점의 상수원수를 채수하여 표준시험방법에

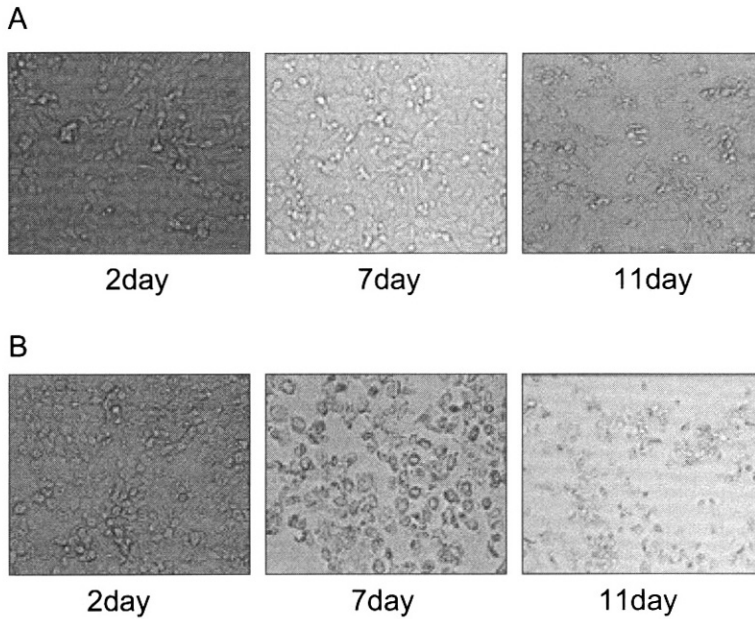


Fig. 1. Total culturable virus assay. A: negative control, B: sample A

따라, 준비한 시료를 BGM세포에 접종한 뒤 14일 동안 관찰하면서 CPE가 나타나는지를 관찰하였다.

이중 2개 지점의 플라스크에서 바이러스 감염을 보여주는 CPE가 관찰되어 세포가 플라스크 바닥으로부터 분리되었다(Fig. 1). CPE가 나타난 2개 지점의 플라스크 중 3개(A, B, C)를 선택하여 다음 실험을 위한 시료로 사용하였다.

### 3.2. IFA

CPE가 나타난 3개 플라스크(A, B, C)의 바이러스 상등액을 새로 배양한 BGM세포에 접종 후 배양하였으며, 배양 후 25% 이상의 CPE가 나타났을 때 IFA를 실시하였다.

Pan-enterovirus, Enterovirus, Poliovirus, Echovirus, Coxsackievirus, Adenovirus, Reovirus의 7종류의 단일클론 항체를 사용하였는데, 3개 시료 모두 Reovirus 항체에 대해서 강한 형광을 나타냈다. 또한 Pan-enterovirus의 항체에 대해서는 비교적 약한 형광이 관찰 되었는데 Pan-enterovirus 단일클론항체가 장관 계 바이러스뿐만 아니라 Reovirus에도 특이적인 반응을 하기 때문이다.

CPE를 나타내지 않은 플라스크의 시료와 세포만

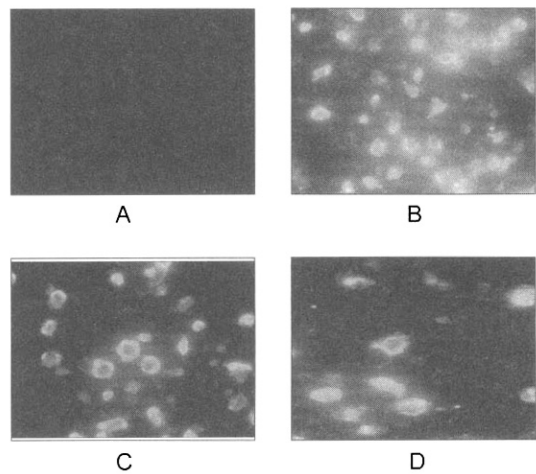


Fig. 2. IFA(Reovirus monoclonal antibody).  
A: negative control B: reovirus positive control  
C: sample A D: sample C

을 배양하여 사용한 음성 대조군에서는 형광을 전혀 관찰할 수가 없었다.

### 3.3. RT-PCR

위 실험에서 사용한 3개의 플라스크(A, B, C)의 상등액에서 RNA를 분리하여 RT-PCR을 실시하였다.

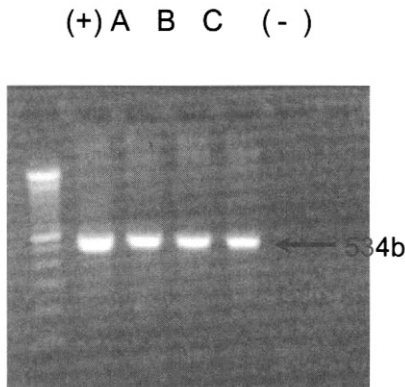


Fig. 3. RT-PCR (reovirus primer)

Lane 1: 100bp market Lane 2: reovirus positive control Lane 3: sample A Lane 4: sample B Lane 5: sample C Lane 6: negative control.

primer는 Poliovirus, Reovirus, Coxsackievirus에 대한 각각의 primer쌍을 사용하였다. 전기영동결과, Reovirus를 제외한 다른 바이러스 primer에서는 PCR 산물을 확인할 수가 없었다(Fig. 3).

결과적으로, 10개의 상수원수중 2개 지점에서 바이러스성 CPE가 관찰되어 바이러스 양성으로 판단 되었으며, 그 중 3개 플라스크를 RT-PCR로 확인한 결과 Reovirus가 오염되어 있는 것으로 판정되었다.

#### 4. 결론

본 연구에서 총배양성바이러스분석법에 RT-PCR 법과 IFA법을 병행 하여 분석을 실시할 경우 바이러스 감염 여부의 확인과 함께 감염된 바이러스의 동정이 가능함을 확인할 수 있었다.

반드시 RT-PCR법이나 IFA법만이 아니더라도 염기서열 분석법이나, ELISA(enzyme linked immunosorbant assay) 분석법 등 다양한 방법이 총배양성 바이러스분석법과 병행될 때 각각의 분석법이 가지는 단점이 보완되면서 분석 결과에 대해 신뢰도를 높일 수가 있음을 보여주고 있다.

수계에서 바이러스를 검출하는 것은 쉬운 일이 아니다. 하지만 수인성 바이러스가 건강상의 유해한 요인으로 인식되면서, 그것을 검출해 내는 것이 중요한 문제로 제기되고 있다. 따라서 많은 양의 시료에서 감염성이 있는 바이러스만을 선택적으로 검출해 내고

이 바이러스가 어떤 바이러스인지 알아낼 수 있는 검출법의 개발이 꼭 필요한 실정이다. 현 시점에서는 원하는 결과를 얻을 수 있는 단일 실험 방법이 연구 개발 되지 않은 실정이므로, 본 연구에서처럼 여러 가지 방법을 같이 사용하여 분석함으로써 효과적인 결과를 얻을 수 있다.

#### 참고문헌

1. 이승훈, 김상중(1999) 수계바이러스검출에 PCR을 이용하기 위한 효과적인 농축기법. *The Korean Journal of Microbiol*, **35**, pp. 41-46.
2. Claudia C. (1996) Rapid diagnosis of poliovirus infection by PCR amplification. *J. Clinic Microbiol*, **34**, pp. 1722-1725.
3. Denise E., Luis P., Marianne O., and Kurt B. (1995) Reverse transcription multiplex PCR for differentiation between polio- and enteroviruses from clinical and environmental samples. *J. Clinic Microbiol*, **33**, pp. 1442-1447.
4. Greening G.E., Woodfield L., Lewis G.D. (1999) RT-PCR and chemiluminescent ELISA for detection of enteroviruses. *J. Virol Methods*, **82**, pp. 157-166.
5. Jun Wen Li, Xin Wei Wang, Chang-Qing Yuan, Jin Lai Zheng, Min Jin, Nong Song, Xiu-Quan Shi, Fu Huan Chao (2002) Detection of enteroviruses and hepatitis a virus in water by consensus primer multiplex RT-PCR. *World J Gastroenterol*, **4**, pp. 699-702.
6. Lewis, G.D. Molloy S.L., Greening G.E. and Dawson J. (2000) Influence of environmental factors on virus detection by RT-PCR and cell culture. *J. Appl Microbiol*, **88**, pp. 633-640.
7. Michael L. Spinner and George D. Di Giovanni (2001) Detection and identification of mammalian reoviruses in surface water by combined cell culture and reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol*, **67**, pp. 3016-3020.
8. Morteza A., Peter S. and Mark L. (1999) A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Appl Environ Microbiol*, **65**, pp. 444-449.
9. Vivier J.C., Ehlers M.M., Grabow W.O.K. (2001) Detection of enteroviruses in treated drinking water. *Water Research*, pp. 1-7.
10. Jun Wen Li, Xin Wei Wang, Chang-Qing Yuan, Jin Lai Zheng, Min Jin, Nong Song, Xiu-Quan Shi, Fu Huan Chao (2002) Detection of enteroviruses and hepatitis a virus in water by consensus primer multiplex RT-PCR. *World J Gastroenterol*, **4**, pp. 699-702.