



# 아데노바이러스를 이용한 바이러스 제거율 평가를 위한 기법 개발

## Development of Techniques for Evaluating the Virus Removal Rate using Adenovirus

조윤정<sup>1</sup>·임재원<sup>1</sup>·백다운<sup>1</sup>·이상훈<sup>2</sup>·이인수<sup>3</sup>·이혜영<sup>1</sup>·박동희<sup>2</sup>·정동주<sup>4</sup>·김태우<sup>1\*</sup>

Yoonjung Cho<sup>1</sup>·Jaewon Lim<sup>1</sup>·Dawoon Baek<sup>1</sup>·Sang-Hoon Lee<sup>2</sup>·In-Soo Lee<sup>3</sup>·Hyeyoung Lee<sup>1</sup>·Donghee Park<sup>2</sup>·Dongju Jung<sup>4</sup>·Tae Ue Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>연세대학교 보건과학대학 임상병리학과, <sup>2</sup>연세대학교 보건과학대학 환경공학과, <sup>3</sup>혜전대학교 임상병리과, <sup>4</sup>호서대학교 생명보건과학대학 임상병리학과

<sup>1</sup>Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Yonsei University, Wonju, Kangwon-do, 26493, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Environmental Engineering, Yonsei University, Wonju, Kangwon-do, 26493, Republic of Korea

<sup>3</sup>Department of Clinical Laboratory Science, Hyejeon College, Hongsung, Chungcheongnam-do, 32244, Republic of Korea

<sup>4</sup>Department of Biomedical Laboratory Science, College of Life and Health Sciences, Hoseo University, Asan, Chungcheongnam-do 31499, Republic of Korea

### ABSTRACT

Waterborne infectious disease is induced by several pathogenic microbes such as bacteria, viruses and protozoans, and the cases caused by viral infection is currently increasing. Water treatment process could reduce the number of virus in the water, but there were many difficulties to completely remove the virus particles from water. Therefore, the membrane separation technology which was reported to effectively remove pollutants from raw water has attracted increasing attention and demand. Since its efficiency has been introduced, demands for evaluation method toward the membrane filtration process are increasing. However, progression of the method development is slow due to the difficulties in cultivation of several waterborne viruses from animal models or cell culture system. To overcome the difficulties, we used adenovirus, one of the commonly isolated pathogenic waterborne viruses which can grow in cell culture system in vitro. The adenovirus used in this study was identified as human adenovirus C strain. The adenovirus was spiked in the raw water and passed through the microfiltration membrane produced by Econity, a Korean membrane company, and then the viral removal rate was evaluated by real-time PCR. In the results, the amount of virus in the filtered water was decreased approximately by 5 log scale. Because coagulant treatment has been known to reduce filtering function of the membrane by inducing fouling, we also investigated whether there was any interference of coagulant. In the results, we confirmed that coagulant treatment did not show significant interference on microfiltration membrane. In this study, we found that waterborne virus can be effectively removed by membrane filtration system. In particular, here we also suggest that real-time PCR method can rapidly, sensitively and quantitatively evaluate the removal rate of virus. These results may provide a standard method to qualifying membrane filtration processes.

**Key words:** Adenovirus, Microfiltration membrane, Real-time PCR, Waterborne viruses

**주제어:** 아데노바이러스, 정밀여과막, 실시간 중합효소 연쇄반응, 수인성바이러스

Received 24 September 2015, revised 27 October 2015, accepted 30 October 2015.

\*Corresponding author: Tae Ue Kim (E-mail: kimtu@yonsei.ac.kr)

pp. 601-608

pp. 609-615

pp. 617-623

pp. 625-632

pp. 633-641

pp. 643-649

pp. 651-657

pp. 659-666

pp. 667-683

pp. 685-692

pp. 693-702

## 1. Introduction

국내의 수도법 규정에 따르면 ‘먹는 물 중에는 병원성 미생물에 오염되었거나 오염될 우려가 있는 물질이 함유되어서는 안 된다’라는 포괄적인 규정이 있다(수도법, 2015). 수인성 전염병을 유발하는 병원성 미생물은 세균(bacteria), 바이러스(virus) 그리고 원생동물(protozoa)이 있으며, 최근에는 바이러스에 의해 발생하는 사례가 증가하고 있는 실정이다(Jung et al., 2009). 현재까지 지속적인 연구 덕분에 수계 내에는 다양한 종류의 감염성 바이러스가 존재하는 것으로 알려졌다. 수인성 장-관계 바이러스는 주로 사람 또는 동물의 장내에서 증식하는 바이러스로 분변과 함께 체외로 방출된다(Dubois et al., 2004, Papaventsis et al., 2005). 사람에게 전파 가능한 수인성 장-관계 바이러스는 엔테로바이러스(enterovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 노로바이러스(norovirus), 로타바이러스(rotavirus), A형간염바이러스(hepatitis A virus), 레오바이러스(reovirus) 등이 있다(Cukor and Blacklow, 1984, Fong and Lipp, 2005). 이러한 수인성 장-관계 바이러스는 주로 물을 통하여 전파되며, 인체에 감염 시 소아마비(polio), 무균성 뇌수막염(aseptic meningitis), 영·유아설사증(infantile diarrhea) 안염(ophthalmitis), 간염(hepatitis) 등 다양한 질병을 유발한다(Gilgen et al., 1995, Abbaszadegan et al., 1999, Fout, et al., 2003). 특히 저항력이 약한 영·유아나 노인, 그리고 면역기능이 저하된 환자 등에 감염되었을 때 치명적이어서 사망까지 초래할 수 있다(Harris et al., 1983, Beller et al., 1997). 구체적 사례에 의한 보고에 의하면 1997년 파키스탄(Pakistan)의 이슬라마바드(Islamabad)에서 E형간염바이러스(hepatitis E virus)에 의한 대규모 감염이 있었으며 이것의 원인은 수처리 공정의 잘못된 운영에 의하여 발생한 것으로 추측한다. 또한 1995년 Knolle의 보고에 의하면 독일에서 폴리오바이러스(polio virus)의 유행이 있었으며 이는 식수에 의하여 전파된 것으로 규명되었다(Knolle, 1995).

수인성 장-관계 바이러스는 수개월 동안 안정적으로 병원성이 유지될 수 있으며, 적은 양으로도 인체에 감염이 가능하고, 정수처리과정에서 세균보다 불활성화와 제거에 대한 저항성이 더 크기 때문에 미국을 비롯하여 캐나다, 영국 등 선진국에서 수인성 장-관계 바이러스에 대한 종합적인 조사를 실시하고 있다

(Bitton et al., 1986, Cho et al., 2000). 미국 환경청(environmental protection agency, EPA) 보고에 따르면 수계 내에 배출된 수인성 장-관계 바이러스는 입자의 수가 적어도 인체 내 감염을 유발하며, 실제 정수처리 과정을 거친 먹는 물에서 바이러스가 분리되었다는 보고도 있다(Manula et al., 2005, Vainio and Myrmel, 2006). 또한 외국의 중, 소규모의 정수장 또는 간이 정수장에서 바이러스 오염으로 인하여 질병이 발생한 사례가 보고된 바 있어 음용수에 대한 바이러스 감염 사고 주의가 필요한 실정이다(Bitton, et al., 1986). 따라서 먹는 물에서의 수인성 장-관계 바이러스에 대한 분석을 위해 바이러스의 정량적 분석과 종류에 대한 기초 자료를 확보하는 것은 바이러스의 전파 경로 차단 및 보건 위생 관리에 대한 정보를 제공하며 또한 먹는 물을 생산하는 정수처리 공정의 기술을 향상시켜 최종적으로 수질관리 기준을 확립하는데 중요한 기여를 할 수 있다. 실제로 미국의 경우 기존의 바이러스 표준분석 방법 중 하나인 총 배양성 바이러스 분석법(total culturable virus assay, TCVA) 외에도 실시간 중합효소연쇄반응기법(real-time polymerase chain reaction) 등 여러 가지 분자생물학적 기법을 이용하여 검출 효율을 높이기 위한 노력을 하고 있다(Duizer et al., 2004).

기존의 재래식 정수처리 공정은 부유물질 제거와 소독이 주 목적이었다. 그러나 상수원의 수질 악화, 빈번한 유해물질 출현 및 사용자의 수질에 대한 기대가 증가 함에 따라 기존의 정수처리 방식으로는 높은 수질을 보장할 수 없게 되었다. 기존의 정수처리 공정은 병원성 세균을 포함한 수인성 장-관계 바이러스를 제거하는데 어려움이 많아서 원수로부터 오염 물질을 효과적으로 제거할 수 있는 막분리(membrane separation) 기술에 대한 관심이 급격히 증가하고 있으며 수요도 앞으로 늘어날 전망이다(Taodosiu et al., 1999). 이러한 막분리 기술은 염소와 같은 소독제를 사용하지 않고도 세균, 바이러스, 금속류, natural organic matter(NOM) 및 기타 오염물질 등을 효과적으로 제거할 수 있기 때문에 재래식 수처리 공정에 대한 대안 중 하나로 여겨지고 있다(Cheryan, 1998). 특히 상수도 원수의 수온이 낮은 지역에서는 수온의 변화와 관계없이 세균 및 바이러스 등의 병원성 물질들을 분리 및 제거할 수 있다는 장점이 있어 북미지역, 일본, 호주, 프랑스 등 세계 여러 국가에서는 막공



정에 대한 도입 사례가 증가하고 있다. 특히 일본은 막여과 공정 개발이 활발하게 추진되고 있는 대표적인 국가로써, 1991년 Membrane Aqua Century 21 (MAC 21) 사업을 시작으로 2007년 까지 4년 단위의 4개 사업 (New MAC 21, ACT 21, E-Water, E-Water II) 을 추진하여 막여과 공정 실용화의 발판을 마련하게 되었다 (Ahn, 2007). 또한 유럽의 경우도 고도처리 대상물 제거를 위하여 적용되었던 오존 및 활성탄처리 기술에서 점차 막여과 공정을 조합한 고도처리공정 시설이 1,000여개 이상으로 증가하며 막여과 기술이 확산 및 적용되고 있는 실정이다. 이렇게 선진국에서는 일찍부터 막분리 기술을 차세대 고도정수처리기술로 인식하고 활발한 연구를 수행하였으며 이를 바탕으로 자국의 상황에 가장 적합한 기술들을 개발하고 확보하고 있다.

Madaeni의 보고에 따르면 정밀여과막 (microfiltration, MF)에 의한 바이러스 제거율은 막의 특성에 따라 35% ~ 99%의 범위에 이른다고 한다 (Madaeni et al., 1995). 그리고 국내의 경우, 한국상하수도협회의 보고에 따르면 정밀여과막의 바이러스 제거율은 96.83%에 달하며 그것에 준하는 소독능을 인증해 주고 있다. 그러나 아직까지 구체적인 막공정에 대한 바이러스 제거율 평가는 미미한 실정이다 (Hur et al., 2008). 정밀여과막 공정의 바이러스 제거율 평가가 활발하게 진행되지 못하는 것은 대부분의 수인성 장-관계 바이러스가 배양이 까다로운 것에 기인하며, 이에 따라 중요성에 비해 실증적 연구는 아직까지 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 수질에서 흔하게 발견되는 수인성 장-관계 바이러스 중의 하나인 동시세 포배양에서 증식이 가능한 아데노바이러스로 유전자 진단법 중 하나인 real-time PCR을 이용하여 바이러스 제거율 평가하였다. 아데노바이러스는 HEK-293 (Human Embryonic Kidney cell-293)를 이용해 배양이 가능하며 또한 배양 시간이 48시간 내로 신속하며 노로바이러스의 대체 모델로도 이용되는 등 바이러스 관련 연구에 대해 다양한 장점이 있어 많이 이용되고 있다. 한편으로 바이러스를 분석하는 기존의 방법에는 전자현미경 관찰, 면역학적 탐색, 세포배양법 등이 있는데 이러한 방법들은 1~4주 정도의 오랜 소요기간을 필요로 하고 민감도가 낮으며 바이러스의 정량적 측정이 어렵다는 한계점이 있다 (Schwab et al., 1993). 현재는 기존의 방법이 가지고 있는 한계성을 극복하기 위해

TaqMan probe 등을 이용한 real-time PCR 법이 개발되어 이를 이용한 수종의 바이러스 검출법이 개발되었다. 이러한 real-time PCR은 기존의 방법보다 분석이 빠르고, PCR이 진행되는 각 단계에서 주기마다 형광값을 측정하고 일정량 이상의 형광 값이 발생되는 주기를 확인함으로써 특정유전자 초기농도를 정량적 분석이 가능하고, PCR 후 젤 전기영동 절차가 필요 없어 오염가능성이 적은 장점이 있어 사용되고 있다 (Fong and Lipp, 2005, Gu et al., 2003). 이에 본 연구에서는 HEK-293 세포에 배양한 아데노바이러스를 이용하여 원수에 직접 아데노바이러스를 spiking한 후, 에코니티사에서 생산된 분리막을 이용하여 바이러스 제거율을 SYBR Green을 이용한 real-time PCR 방법으로 측정하고 이를 바탕으로 막여과 공정의 바이러스제거 가능성을 평가하고자 하였다.

## 2. Material and Method

### 2.1 바이러스 배양

아데노바이러스 배양을 위해 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco BRL, USA)배지를 이용하여 HEK-293 (ATCC) 세포를 5% 이산화탄소 존재 하에 37°C에서 배양하였다. 실험에 사용된 아데노바이러스는 100 mm plate에  $2.0 \times 10^6$  의 HEK-293 세포를 37°C에서 배양하였다. 12시간 후 3 mL DMEM에  $2.0 \times 10^7$ 개의 바이러스를 접종하여 골고루 퍼지도록 흔들어준 후, 37°C에서 90분 동안 배양하였다. 그 후, 감염된 세포는 FBS를 포함한 DMEM 7 mL을 plate에 첨가하였다. 42 ~ 48시간 후 세포를 50 mL tube 모아서 -80°C에 2시간 이상 얼렸다 37°C에서 녹이는 과정을 3회 반복하여 아데노바이러스를 세포로부터 방출시켰다. 실온에서 3,000 RPM으로 20분 동안 원심분리 하여 아데노바이러스가 함유된 상층액을 취하여 새로운 tube로 옮겨 바이러스 원액을 -80°C에 보관하였다.

### 2.2 바이러스 정량분석

바이러스의 정량분석을 위해 HEK-293 세포를 24 well에  $2.5 \times 10^5$  세포를 심고 동시에 만들어 놓은 아데노바이러스를  $10^3$ 부터  $10^5$ 으로 각각 50  $\mu$ L에 희석하여 감염시키고 37°C에서 48시간 배양하였다. 그 후

pp. 601-608

pp. 609-615

pp. 617-623

pp. 625-632

pp. 633-641

pp. 643-649

pp. 651-657

pp. 659-666

pp. 667-683

pp. 685-692

pp. 693-702

바이러스 정량은 Adeno-X™ Rapid Titer Kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 정량하였다.

### 2.3 아데노바이러스의 유전자 증폭 및 염기서열 확인

아데노바이러스를 민감하게 검출하기 위해 기존 문헌에서 제시한 아데노바이러스 특이 primer를 사용하였다 (Table 1). 여러 가지 primer 중 아데노바이러스를 PCR 했을 때 증폭효율과 검출감도가 가장 높은 HexAA1885와 HexAA1913 primer를 본 연구에서 사용하여 이후 실험을 진행하였다. 바이러스를 주형 DNA로 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94°C에서 3분간 반응한 후, 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 30초의 반응주기를 30 주기 시행하고 72°C에서 3분간 반응하였다. 증폭산물은 100 bp Molecular Size Marker (Enzynomics, Daejeon, Korea)와 함께 2.0% Tris-borate ethylenediamine tetracetic acid (TBE) agarose gel에 전기영동한 후, ethidium bromide (EtBr)로 염색하여 Gel-doc XR System을 통해 크기가 300 bp인 증폭산물을 확인하였다. 증폭된 밴드는 LaboPass™ Gel Extraction Kit (Cosmo, Seoul, Korea)를 이용하여 정제한 후, 외부기관인 Genotech (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 염기서열 분석을 수행하였다. 염기서열 결과는 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 GenBank와 비교·분석하였다.

### 2.4 아데노바이러스 표준양성 대조군 제작

아데노바이러스 표준양성 대조군 제작을 위하여 PCR 2.1-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 클로닝을 수행하였다. 정제된 아데노바이러스 DNA 증폭산물과 10 ng PCR 2.1 TOPO TA vector로 ligation 혼합액을 만들어 실온에서 30분 반응시킨 후 얼음에 보관하였다. Ligation 혼합액을 *E. coli* DH5a competent cell과 혼합시킨 후, 얼음에 30분 동안 방치하고 42°C에서 90초 간 반응시켰다. 다음으로 액체배지에 배양한 균체를 100 µg/mL ampicillin이 포함된 Luria-Bertani (LB)평판배지 표면에 도말 한 후, shaking incubator에서 37°C, 180 RPM으로 12시간 배양

하였다. 배지 표면에 자란 집락을 100 µg/mL ampicillin이 포함된 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 14시간 진탕 배양 후 배양액으로부터 plasmid DNA를 Plasmid DNA Purification Kit (Intron Biotechnology, Suwon, Korea)를 사용하여 정제하였다. 정제된 plasmid는 염기서열 분석을 통해 표준양성 대조군으로 사용할 수 있는 재조합 plasmid임을 확인하였다. 재조합 plasmid를 표준양성 대조군으로 사용하기 위해 Nanoquant Infinite M200 (Tecan Group Ltd, Mannedorf, Switzerland)를 사용하여 재조합 plasmid DNA의 농도를 측정하고, 각각의 농도를 이용하여 copy 수 계산을 하였다. 재조합 plasmid를 1.0 × 10<sup>10</sup>에서 1.0 × 10<sup>0</sup> copies로 Tris-EDTA (TE) buffer를 이용하여 10진 계열 희석한 후, 이를 주형으로 삼아 SYBR Green을 이용한 real-time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 수행하였다. Real-time PCR 조건은 95°C에서 2분간 반응한 후, 95°C에서 5초, 60°C에서 30초의 반응주기를 35 주기 시행하였다. 마지막 주기 후에는 모든 반응물에 대하여 95°C부터 60°C까지 온도를 낮추며 각 1°C 마다 형광 값을 측정하여 melting curve analysis를 실시하였다.

### 2.5 정밀여과막을 거친 원수의 아데노바이러스 제거 효율 평가

원수에 아데노바이러스를 투입한 후 정밀여과막을 거친 시료를 이용하여 바이러스 제거효율 평가를 실시하였다 (Econity, Young-in, Korea). 본 실험에 사용된 에코니티 사의 정밀여과막은 Polyvinylidene fluoride (PVDF)재질에 100 nm의 pore size와 0.01 m<sup>2</sup>의 면적인 미니모듈이며, 원수는 풍납 취수장에서 채취하였다. 채수한 원수 2 L에 4.0 × 10<sup>8</sup> plaque forming units (pfu)/mL 아데노바이러스를 투입하여 충분히 섞은 후, 정밀여과막 공정을 거쳤다. 다음으로, 막여과 공정에서 응집제의 영향을 확인하기 위하여 정수장에서 주로 사용하는 응집제인 polyaluminum chloride (PAC)를 17% 처리하여 정밀여과막을 거친 아데노바이러스 제거율 평가를 실시하였다. 원수 2 L에 4.0 × 10<sup>8</sup> pfu/mL 아데노바이러스를 투입하여 충분히 섞은 후, 응집제 처리를 하기 위하여 급속혼합,

Table 1. Primer sequences for adenovirus PCR

Primer	Sequence(5'-3')	Reference
HexAA1885	GCC GCA GTG GTC TTA CAT GCA CAT C	Allard et al., 1990
HexAA1913	CAG CAC GCC GCG GAT GTC AAA GT	



완속혼합, 침전과정이 속해있는 Jar test를 실시한 후 정밀 여과막 공정을 거쳤다. 각 공정마다 200 mL을 채수 하였으며, 채수한 시료는 멸균된 1 L 부피의 1 회용 채수병에 담아 ice box에 수송하고 4°C로 유지되는 냉장고에 차광 상태로 보관하여 48시간 이내에 실험하였다.

## 2.6 아데노바이러스 정량검출을 위한 real-time PCR

각 공정 별 채수 시료 내에 존재하는 아데노바이러스를 분리하기 위하여 바이러스용 필터인 Zeta plus Virosorb 1MDS filters (Cuno, Meriden, CT, USA)를 250 mL membrane filter holder (Tarsons Products, Kolkata, India)에 부착시킨 뒤 filtering과정을 거쳐 membrane filter만 취하여 Power Water DNA Isolation Kit (MO BIO, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 전처리 과정을 거친 뒤, 필터 내 바이러스의 DNA를 분리하여 주형으로 사용하였다. 바이러스 정량평가를 실시하기 위하여 real-time PCR을 수행하였다. Real-time PCR 조건은 95°C에서 2분간 반응한 후, 95°C에서 5초, 60°C에서 30초의 반응주기를 35 주기로 시행하였다. 마지막 주기 후에는 모든 반응물에 대하여 95°C부터 60°C까지 온도를 낮추며 각 1°C 마다 형광 값을 측정하여 melting curve analysis를 실시하였다.

## 2.7 통계분석

모든 측정치는 평균 및 표준 편차로 표시하였으며 SPSS (release 12 Standard Version; SPSS INC, Chicago, IL, USA)통계 프로그램을 이용하여 군간의 비교는

Student's *t* test를 시행하였으며, 각 군 내 비교는 paired *t* test로 시행하였고, *p* 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의 있는 것으로 판정하였다.

## 3. Results and Discussion

### 3.1 아데노바이러스 제작

실험에 사용할 아데노바이러스를 제작하기 위해 아데노바이러스를 숙주세포 HEK-293 세포에 접종하고, 세포변성을 확인하였다. HEK-293 세포와 바이러스에 감염된 HEK-293 세포를 비교하여 관찰한 결과 세포 변성이 관찰되었다 (Fig. 1A, 1B). 이는 HEK-293 세포에서는 아데노바이러스가 왕성하게 만들어지고 있음을 의미한다.

### 3.2 아데노바이러스 유전자 염기서열 확인

본 연구에 사용된 아데노바이러스는 연세대학교 임상병리학과 혈액학 연구실로부터 제공받아 실험에 사용하였다. 배양한 아데노바이러스의 유전자 염기서열을 확인하기 위하여 계열 희석한 바이러스 상등액과 아데노바이러스 HexAA1885, HexAA1913 primer로 PCR을 수행하여 300 bp 크기의 증폭산물을 전기영동으로 확인하였다. 증폭산물을 정제하여 분석한 염기서열을 BLAST 프로그램을 이용하여 NCBI에 등록된 바이러스 유전자 데이터베이스와 비교하여 확인한 결과, human adenovirus C strain 유전자임을 확인하였으며, 클로닝을 통해 표준양성 대조군인 재조합 plasmid를

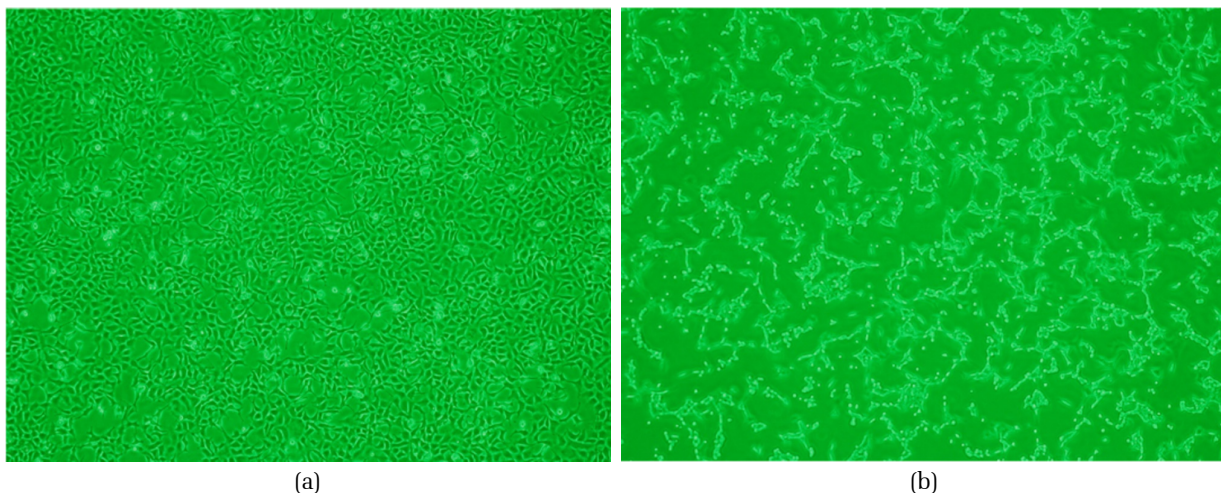
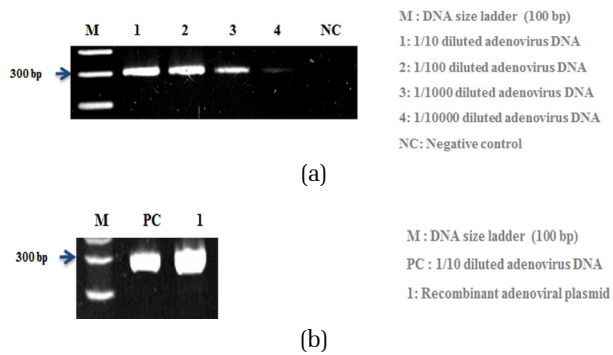


Fig. 1. Morphological changes of HEK-293 cells infected with adenovirus.

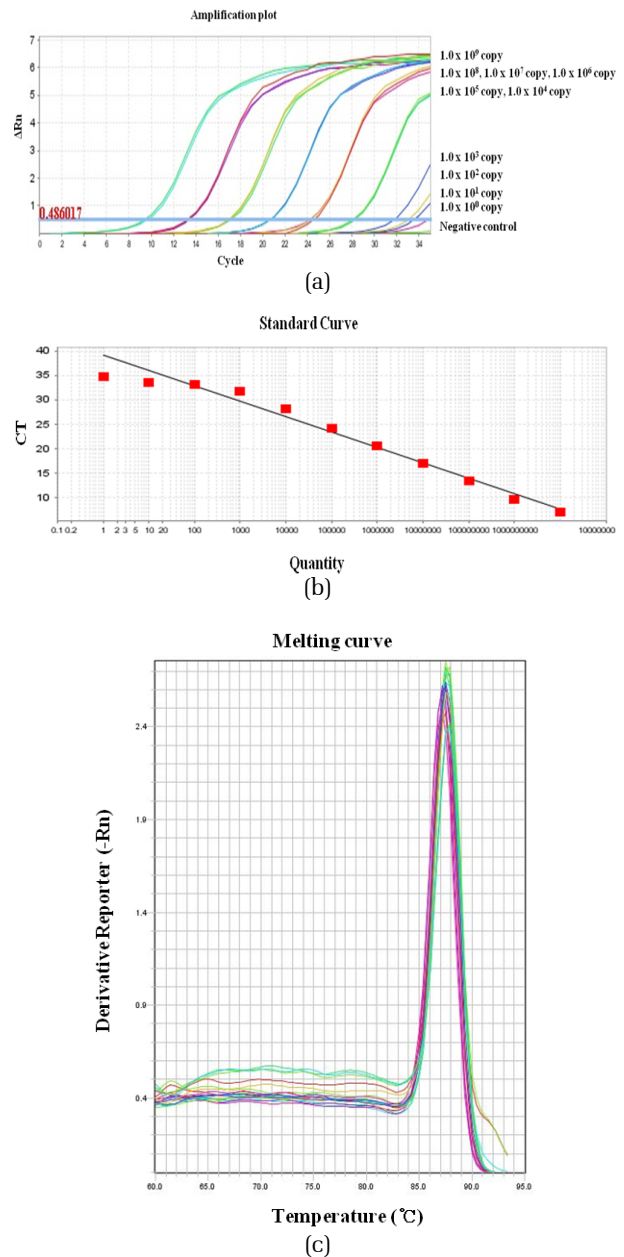


**Fig. 2.** Gel electrophoresis of adenovirus DNA and amplified products of recombinant adenoviral plasmid.

제작하였다. 바이러스 검출 확인 및 최소 검출 농도를 측정하기 위한 분석 평가를 한 결과, 아데노바이러스의 DNA가  $10^4$ 의 희석배수까지 증폭되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2A). 또한 정량평가를 위한 양성대조군인 아데노바이러스 재조합 plasmid에서도 정상적으로 증폭이 되는 것을 확인하였다 (Fig. 2B).

### 3.3 아데노바이러스 표준양성 대조군 시료 확인 및 민감도 테스트

다음으로 표준정량곡선을 이용한 정량적 평가가 가능한지와 검출한계 농도가 어느 정도 인지 확인하기 위해 제작한 표준 양성 아데노바이러스 재조합 plasmid를 단계별 희석하여 정량곡선을 작성하고 검출한계농도를 측정하였다. 재조합 plasmid를 주형으로 삼아  $1.0 \times 10^{10}$ 에서  $1.0 \times 10^0$  copies로 계열 희석한 후 SYBR Green을 이용한 real-time PCR을 수행하였다. 그 결과,  $1.0 \times 10^{10}$ 에서  $1.0 \times 10^0$  copies의 범위에서는 기질이 10배씩 희석됨에 따라 standard curve의 기울기는 대략 3 ~ 4 주기로 유지하였고, 아데노바이러스에 대한 최소 검출한계 (limit of detection, LOD)는  $1.0 \times 10^3$ 으로 확인되었다 (Table 2). 그리고 회귀상수 (regression coefficient)는  $R^2 = 0.974$ 로 매우 우수한 직선성을 보였다 (Fig. 3A, 3B). 이를 통해 본 연구에서 제작한 표준양성 대조군은 정량적 평가가 가능하다는 것을 확인하였다. Mid-point of melting temperature ( $T_m$ ) 값은 반응이 끝난 후 65 ~ 90°C까지 온도를 올려주게 되면 DNA의 이중나선이 단일가닥으로 떨어지면서 SYBR Green이 방출되게 되는데 염기서열에 따라 방출되는 온도가 다르다. 이 특정온도를 이용하여 원하는 DNA가 맞는지 확인할 수 있다. 그리하여 본 연구에서 같은 증폭



**Fig. 3.** Real-time PCR of recombinant adenoviral plasmid.

산물임을 확인하기 위하여 melting curve analysis를 수행한 결과,  $1.0 \times 10^{10}$ 부터  $1.0 \times 10^4$  copies까지 주형산물들은 모두 같은 온도인 87°C의  $T_m$ 를 갖는 것으로 측정되었으며, curve가 모두 일치한 형태로 나타나는 것으로 보아 동일한 증폭산물임을 확인하였다 (Fig. 3C). 본 실험 결과를 바탕으로 연구팀이 고안한 분자생물학적 바이러스 정량평가 기법이 효용성을 지닌다는 것을 입증하였고, 또한 본 기법이 매우 높은 민감도를 가지는 것을 확인할 수 있었다.



**Table 2.** Mean Ct value of serially diluted recombinant adenoviral plasmid using real-time PCR

Concentration(copies/μL)	Mean Ct
1.0×10 <sup>10</sup>	7.80
1.0×10 <sup>9</sup>	10.39
1.0×10 <sup>8</sup>	14.41
1.0×10 <sup>7</sup>	18.13
1.0×10 <sup>6</sup>	21.80
1.0×10 <sup>5</sup>	25.64
1.0×10 <sup>4</sup>	29.25
1.0×10 <sup>3</sup>	32.34

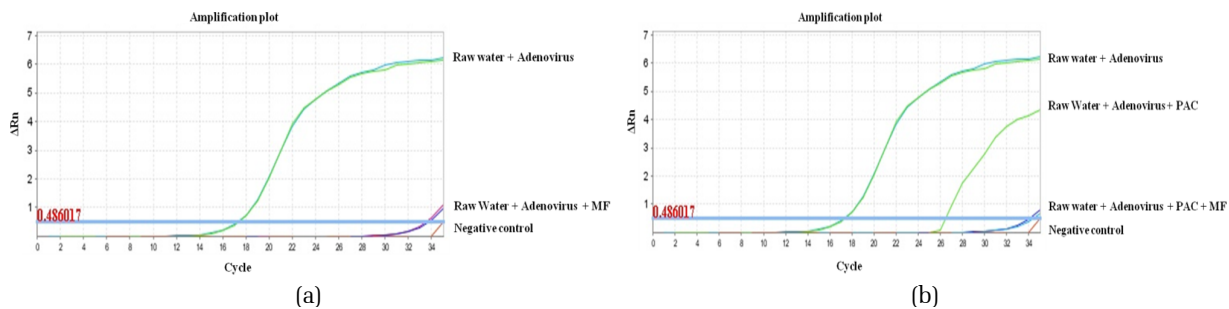
### 3.4 아데노바이러스 제거율 정량 평가

정밀여과막에 의한 바이러스 제거율, 원수의 특성에 따른 바이러스 검출률 및 전처리에 의한 영향을 확인하기 위해 real-time PCR을 이용하여 실험을 진행하였다. 원수에 아데노바이러스를 spiking 하였을 경우 8.1 × 10<sup>6</sup> copies/μL 농도의 바이러스가 막공정 처리 시 5.1 × 10<sup>1</sup> copies/μL로 약 5 log scale 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 4A, Table 3). 그리고 막여과공정에 있어서 문제가 되는 것으로 응집제 (PAC) 처리 시 파울링 (fouling, 부착물)에 의해 막의 여과기능이 저하하게 된다는 보고가 있다 (Defrance and Jaffrin, 1999). 이에 따라 본 연구에서도 막공정에 의한 바이러스 제거 시 응집제 (PAC)에 의해 바이러스 제거율이 감소하는지 확인하였다. 원수에 아데노바이러스를 spiking 후 막공정을 거친 경우 5.1 × 10<sup>1</sup> copies/μL 농도의 바이러스가 원수에 아데노바이러스를 spiking 후 응

집제 (PAC) 처리한 다음 막공정을 거친 경우 3.4 × 10<sup>1</sup> copies/μL 농도로 거의 차이가 없는 것으로 보아 정밀여과막에서 바이러스 제거 시 응집제 (PAC)에 의한 간접효과가 일어나지 않는 것을 확인하였다 (Fig. 4B, Table 3). 이와는 별개로 응집제 (PAC) 만을 처리하였을 때 원수의 아데노바이러스 농도가 처리 전 농도인 8.1 × 10<sup>6</sup> copies/μL 에서 1.1 × 10<sup>4</sup> copies/μL로 약 2 log scale 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 4B, Table 3). 이를 통해 응집제 (PAC) 만으로도 바이러스가 일부 제거됨을 확인하였다. 이 실험결과를 바탕으로 본 연구팀이 고안한 분자생물학적 바이러스 정량분석 기법이 실제 막공정에 의한 바이러스 제거율 평가에 적용이 가능한 것을 알 수 있었다. 막공정을 통한 바이러스 제거 시 응집제 (PAC)에 대한 바이러스 제거율 감소는 나타나지 않았고, 오히려 응집제 (PAC) 만으로 바이러스 일부가 제거됨을 확인하였다.

### 4. Conclusion

수인성 장·관계 바이러스는 다양한 경로를 통하여 결과적으로 지하수를 포함한 수계환경에 도달하게 되며 이러한 환경에서 일반적으로 적은 입자 수가 존재한다. 그러나 단지 몇 개의 감염성 입자가 체내로 유입되더라도 인간에게 질병을 일으킬 수 있다. 정수처리에서 바이러스를 상당수 감소시키는 것이 가능하지만 완전히 제거하는데 어려움이 많아서 원수로부터 오염물질들을 효과적으로 제거할 수 있는 막분리 기술에



**Fig. 4.** Adenovirus removal efficiency by real-time PCR from different processes.

**Table 3.** Clearance efficiency of adenovirus by each condition of processes

Processes	Mean Ct	Average of copy numbers
Raw water + Adenovirus	17.36	8.1 × 10 <sup>6</sup>
Raw water + Adenovirus + MF	33.65	5.1 × 10 <sup>1</sup>
Raw water + Adenovirus + PAC	26.32	1.1 × 10 <sup>4</sup>
Raw water + Adenovirus + PAC + MF	34.23	3.4 × 10 <sup>1</sup>

pp. 601-608  
pp. 609-615  
pp. 617-623  
pp. 625-632  
pp. 633-641  
pp. 643-649  
pp. 651-657  
pp. 659-666  
pp. 667-683  
pp. 685-692  
pp. 693-702

대한 관심과 수요가 급격히 증가하고 있다. 따라서 바이러스를 제거하기 위하여 막여과 공정을 도입하여 수인성 바이러스를 대상으로 바이러스 제거효율 평가에 대한 연구 필요성이 커지고 있다. 하지만 일부 수인성 바이러스는 *in vitro* 배양법이 개발되지 못해, 연구가 활발하게 진행되지 못하는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 원수에 직접 바이러스를 spiking 한 후, 에코니티사에서 생산된 정밀여과막을 이용하여 바이러스 제거율을 측정하였고, 다음과 같은 결론을 얻었다.

첫번째로 배양이 어려워져서 활발한 연구가 진행되지 못하였던 기존의 바이러스 제거율 평가 방법의 한계점을 극복하기 위해 본 연구에서는 재조합 아데노바이러스를 HEK-293 세포에서 배양하는 방법을 이용하여 *in vitro* 에서 바이러스를 만들고 이를 바이러스 제거율 평가에 도입한 결과 *in vitro* 배양법을 통해  $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^9$  pfu/mL 의 높은 농도로 아데노바이러스를 얻을 수 있었고, 특히 HEK-293 세포에서만 증식하는 재조합 아데노바이러스를 이용하였기 때문에 실험과정이 안전하였다.

두번째로 아데노바이러스를 검출하기 위한 방법으로 사용한 real-time PCR 방법은 재조합 plasmid를 이용해 얻은 표준곡선에 대입하여 아데노바이러스를 절대정량까지 할 수 있었고, 아데노바이러스의 DNA가  $10^4$ 의 희석배수까지 미량으로 희석된 시료까지 검출이 가능하여 민감도가 매우 높았으며, 또한 수인성 바이러스 측정 시 다른 논문에서 대부분 사용한 TaqMan Probe를 이용한 것이 아니라 SYBR Green을 이용하여 진행했기 때문에 SYBR Green의 장점인 가격이 저렴하며, melting curve를 이용하여 비특이적 산물의 유무가 확인 가능하다는 장점이 있었으며, 6 시간 안에 결과를 얻을 수 있어 신속한 검출이 가능하였다.

세번째로 원수에 spiking한 아데노바이러스의 양과 막여과 공정을 거친 후 아데노바이러스의 양을 real-time PCR 방법으로 검출한 결과 공정 전 아데노바이러스의 양은  $8.1 \times 10^6$  copies/μL에서 막여과 공정 후  $5.1 \times 10^1$  copies/μL로 약 5 log scale 감소하는 것을 확인 하였다. 그리고 막여과 공정 시 문제가 되는 것으로 응집제 (PAC) 처리시 막에 의해 배제된 물질들로 인해 플럭스가 감소하는 파울링이 발생하게 되고, 이러한 파울링에 의해 막의 여과기능이 저하되고, 막의 수명을 감소시키는 등 막공정의 경제성을 저하시키는 작용을 한다. 본 연구에서도 막공정에 의한 바이러스 제거 시

응집제인 (PAC)에 의해 바이러스 제거율이 감소하는 지 여부를 확인한 결과 원수에 아데노바이러스를 spiking 후 막공정을 거친 경우  $5.1 \times 10^1$  copies/μL 농도의 바이러스가 응집제 (PAC) 처리한 경우  $3.4 \times 10^1$  copies/μL로 정밀여과막에서 바이러스 제거 시 응집제 (PAC)에 의한 간섭효과가 일어나지 않는 것을 확인하였다. 이와는 별개로 응집제 (PAC)만을 처리하였을 때 원수의 아데노바이러스 농도가 처리 전 농도인  $8.1 \times 10^6$  copies/μL 에서  $1.1 \times 10^4$  copies/μL로 약 2 log scale 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 바이러스의 감소는 응집제 (PAC)에 의한 바이러스 흡착효과가 나타난 것으로 예상된다. 그러나 직접적인 바이러스 흡착 효과를 확인하기 위해 추가적인 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

이러한 결과들을 바탕으로 *in vitro*에서 배양한 아데노바이러스와 real-time PCR 방법을 이용함으로써 막여과 공정 중 바이러스 제거율을 민감하고, 신속하고, 정량적으로 평가 할 수 있을 것으로 사료된다.

## 사 사

본 연구는 환경부의 “The Eco-Innovation project (Global Top project)” 연구비 지원에 의해 수행 되었습니다. (GT-SWS-11-01-006-0)

## References

- Waterworks Law., <http://www.law.go.kr/ lsInfoP.do?urlMode=lsInfoP&lsId=001818#0000> (June 4, 2015).
- Abbaszadegan, M., Stewart, P., LeChevallier, M. (1999). A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR, *Appl Environ Micorbiol.*, 65, 444-449.
- Ahn, H.Y. (2007). Case studies and R&D on membranes in K-water, *J Kor Soc Environ Eng.*, 29, 1318-1325.
- Allard, A., Girones, R., Juto, P., Wadell, G. (1990). Polymerase chain reaction for detection of Adenoviruses in stool samples, *J Clin Microbiol.*, 28, 2659-2667.
- Beller, M., Ellis, A., Lee, S.H., Drebot, M.A., Jenkerson, S.A., Funk, E., Sobsey, M.D., Simmons III, O.D., Monroe, S.S., Ando, T., Noel, J., Petric, M., Middaugh, J.P. and Spika, J.S. (1997). Outbreak of viral gastroenteritis due to a contaminated well. International consequences, *JAMA.*, 278, 563-568.





- Bitton, G., Farrah, S.R., Montague, C.L., Akin, E.W. (1986). Viruses in drinking water, *Environ Sci Technol.*, 20, 216-222.
- Cheryan, M. (1998). *Ultrafiltration and microfiltration handbook* 2nd Ed., Technomic Publishing Company, New York.
- Cho, H.B., Lee, S.H., Cho, J.C., Kim, S.J. (2000). Detection of adenoviruses and enteroviruses in tap water and river water by reverse transcription multiplex PCR, *Can J Microbiol.*, 46, 417-424.
- Cukor, G., Blacklow, N.R. (1984). Human viral gastroenteritis, *Microbiol Rev.*, 48, 157-179.
- Defrance, L., Jaffrin, M.Y. (1999). Reversibility of fouling formed in activated sludge filtration, *J Membrane Sci.*, 157, 73-84.
- Dubois, E., Merle, G., Roquier, C., Trompette, A.L., Le Guyader, F., Cruciere, C., Chomel, J.J. (2004). Diversity of enterovirus sequences detected in oysters by RT-heminested PCR, *Int J Food Microbiol.*, 92, 35-43.
- Duizer, E., Bijkerk, P., Rockx, B., De Groot, A., Twisk, F., Koopmans, M. (2004). Inactivation of caliciviruses, *Appl Environ Microbiol.*, 70, 4538-4543.
- Fong, T.T., Lipp, E.K. (2005). Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 69, 357-371.
- Fout, G.S., Martinson, B.C., Moyer, M.W., Dahling, D.R. (2003). A multiplex reverse transcription-PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater. *Appl Environ Microbiol.*, 69, 3158-3164.
- Gilgen, M., Wegmuller, B., Burkhalter, P., Buhler, H.P., Muller, U., Luthy, J., Candrian, U. (1995). Reverse transcription PCR to detect enteroviruses in surface water. *Appl Environ Microbiol.*, 61, 1226-1231.
- Gu, Z., Belzer, S.W., Gibson, C.S., Bankowski, M.J., Hayden, R.T. (2003). Multiplexed, real-time PCR for quantitative detection of human adenovirus. *J Clin Microbiol.*, 41, 4636-4641.
- Harris, J.R., Cohen, M.L., Lippy, E.C. (1983). Water-related disease outbreaks in the United States, 1981. *J Infect Dis.*, 148, 759-762.
- Hur, H.C., Rhee, O.J., Lee, K.J., Kim, K.H., Choi, Y.J., Lee, J.H., Hong, S.W. (2008). Analysis of Membrane Integrity and Removal Efficiency Considering Membrane Defect and Pore size. *J Korean Soc Water Qual.*, 24, 423-429.
- Jung, E.Y., Park, H.G., Cha, D.J., Jung, M.E., You, P.J. (2009). Removal Efficiency in Water Treatment Process and Characteristic of Cell Sensitivity of Waterborne Enteric Viruses, *J Life Sci.*, 19, 373-377.
- Knolle, H. (1995). Transmission of poliomyelitis by drinking water and the problem of prevention, *Gesundheitswesen*, 57, 351-354.
- Madaeni, S.S., Fane, A.G., Grohmann, G.S. (1995). Virus removal from water and wastewater using membrane, *J Membrane Sci.*, 102, 65-75.
- Maunula, L., Miettinen, I.T., Von Bonsdorff, C.H. (2005). Norovirus outbreaks from drinking water, *Emerg Infect Dis.*, 11, 1716-1721.
- Papaventsis, D., Siafakas, N., Markoulatos, P., Papageorgiou, G.T., Kourtis, C., Chatzichristou, E., Economou, C., Levidiotou, S. (2005). Membrane adsorption with direct cell culture combined with reverse transcription-PCR as a fast method for identifying enteroviruses from sewage, *Appl Environ Microbiol.*, 71, 72-79.
- Schwab, K.J., De Leon, R., Sobsey, M.D. (1993). Development of PCR methods for enteric virus detection in water, *Wat Sci Tech.*, 27, 211-217.
- Taodosiu, C.C., Kennedy, M.D., Straten, H.A., Schippers, J.C. (1999). Evaluation of secondary refinery effluent treatment using ultrafiltration membranes, *Water Res.*, 33, 2172-2180.
- Vainio, K., Myrnel, M. (2006). Molecular epidemiology of norovirus outbreaks in Norway during 2000 to 2005 and comparison of four norovirus real-time reverse transcriptase PCR assays, *J Clin Microbiol.*, 44, 3695-3702.

pp. 601-608

pp. 609-615

pp. 617-623

pp. 625-632

pp. 633-641

pp. 643-649

pp. 651-657

pp. 659-666

pp. 667-683

pp. 685-692

pp. 693-702