

Development of an Automatic PCR System Combined with Magnetic Bead-based Viral RNA Concentration and Extraction

MinJi Choi^{1,*}, Won Chang Cho^{2,**}, Seung Wook Chung^{2,**},
Daehong Kim^{3,***} and Il-Hoon Cho^{1,4,†,***}

¹Department of Senior Healthcare, Eulji University, Seongnam 13135, Korea

²Department of Research Institute of Bitvalue, Guro Digital G Valley Complex, Seoul 08390, Korea

³Department of Radiological Science, College of Health Science, Eulji University, Seongnam 13135, Korea

⁴Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science,
Eulji University, Seongnam 13135, Korea

Human respiratory viral infections such as COVID-19 are highly contagious, so continuous management of airborne viruses is essential. In particular, indoor air monitoring is necessary because the risk of infection increases in poorly ventilated indoors. However, the current method of detecting airborne viruses requires a lot of time from sample collection to confirmation of results. In this study, we proposed a system that can monitor airborne viruses in real time to solve the deficiency of the present method. Air samples were collected in liquid form through a bio sampler, in which case the virus is present in low concentrations. To detect viruses from low-concentration samples, viral RNA was concentrated and extracted using silica-magnetic beads. RNA binds to silica under certain conditions, and by repeating this binding reaction, bulk samples collected from the air can be concentrated. After concentration and extraction, viral RNA is specifically detected through real-time qPCR (quantitative polymerase chain reaction). In addition, based on liquid handling technology, we have developed an automatic machine that automatically performs the entire testing process and can be easily used even by non-experts. To evaluate the system, we performed air sample collection and automated testing using bacteriophage MS2 as a model virus. As a result, the air-collected samples concentrated by 45 times then initial volume, and the detection sensitivity of PCR also confirmed a corresponding improvement.

Key Words: Aerosols, Quantitative real-time PCR, Point-of-care systems, Respiratory viruses, Automation

서 론

COVID-19 사태 이후, 최근 호흡기 바이러스 관리에 대한 관심과 그 중요성이 전 세계적으로 대두되고 있다. 호흡기 바이러스의 전파 경로는 그 방법에 따라 접촉 감염, 비말 감염, 공기 감염으로 구분된다. 숙주 및 감염 개체

와의 직접적인 접촉에 의해 병원체가 전파되는 접촉 감염과 달리, 비말 감염 및 공기 감염은 비말 또는 에어로졸에 의해 전파가 이루어진다. 비말은 감염자의 기침이나 재채기를 통해 퍼지는 5 μm 이상 크기의 분비물을 의미하며, 약 1 m까지만 분사되어 밀접한 상태에서의 전염 가능성이 높다. 에어로졸은 5 μm 이하의 작은 입자들이며, 이를 통해 바이러스가 공기 중에 전파될 경우 그 범위가

Received: December 1, 2023 / Revised: December 7, 2023 / Accepted: December 8, 2023

* Graduate student, ** Researcher, *** Professor.

† Corresponding author: Il-Hoon Cho. Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science, Eulji University, Seongnam 13135, Korea. Tel: +82-31-740-7397, Fax: +82-31-740-7284, e-mail: ihcho@eulji.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

상대적으로 넓기 때문에 비말 감염에 비해 전파력이 매우 높다(Drossionos et al., 2021). COVID-19의 경우에도 사태 초반에는 바이러스의 전파가 비말로만 이루어지는 것으로 판단되었으나, 공기 감염의 가능성이 수 차례 제기된 바 있다(Blocken et al., 2021; Buonanno et al., 2020; Guo et al., 2020; Kutter et al., 2021). 이와 같이 전파력이 강한 공기 중 바이러스를 관리하기 위해서는 지역사회 수준의 신속하고 지속적인 모니터링 시스템이 필요하다. 현재 공기 중 생물학적 유해물질을 검사하는 방법으로는 현장의 공기를 포집한 후 해당 시료를 분석하기 위해 실험실로 운반하는 방식이 적용되고 있다. 이러한 검사법은 현장의 공기 질을 실시간으로 모니터링 하기에 적절하지 않은 방식이며, 이는 신속한 조치의 부재로 이어지게 된다(Puthussery et al., 2023). 예를 들어, 공기 중 부유하는 미생물 또는 바이러스를 분석하기 위해서는 공기 시료 채취기(air sampler)에 필터 또는 배양 배지를 장착하여 이에 공기 시료를 포집한 후 배양 과정을 거쳐 결과를 확인하는 것이 일반적인 방식이다(Pasquarella et al., 2008). 해당 방법은 결과를 확인하기 위해 특정 조건에서 일정 시간 동안 검출 대상을 배양해야 한다는 단점이 존재한다. 또한, 액상으로 공기를 포집하여 시료를 얻는 경우에는 포집된 대상 미생물 및 바이러스의 농도가 매우 낮아 검출의 민감도가 저하될 우려가 있다(Breshears et al., 2022). 본 연구에서는 이러한 문제점을 보완하여 공기 중 호흡기 바이러스를 실시간으로 관리할 수 있는 시스템을 제시하고자 하였다. 해당 시스템은 공기 포집 후 현장에서 바로 시료의 전처리부터 바이러스를 특이적으로 검출하기 위한 PCR 검사까지 가능하도록 하는 것을 목표로 개발되었다. 공기 포집 시료의 낮은 농도를 극복하기 위하여 실리카-자성비드를 이용한 공기 포집 시료의 농축과 바이러스의 핵산 추출 방식을 도입하였으며, 이를 통해 바이러스의 고감도 탐지가 가능하다. 최종적으로, 공기 시료 포집 이후의 전 검사 공정은 자동화 장비를 통해 사용자의 핸들링을 최소화함으로써 유해물질 노출에 대한 위험을 줄이고 검사 결과의 재현성을 향상시키는 것을 목표로 하였다.

재료 및 방법

실리카-자성비드를 이용한 RNA의 농축 및 추출

대상 바이러스의 RNA를 농축 및 추출하기 위하여 MagListo™ 5 M Viral DNA/RNA Extraction Kit (Bioneer,

Korea)를 이용하였다. 해당 extraction kit는 표면에 실리카가 처리된 자성비드를 적용하여 핵산을 정제하는 방식이다. 실리카-자성비드를 이용한 핵산의 추출 방식은 일반적으로 결합, 세척, 용출의 과정으로 수행된다. 고농도의 chaotropic salts 존재 하에 핵산은 실리카 표면에 결합하게 되며, 이후 알코올 기반의 세척 과정을 통해 핵산 외의 다당류 및 단백질과 같은 비반응물질들이 제거된다(Sun et al., 2014). 최종적으로 낮은 염(salts) 조건에서 핵산을 용출시킬 수 있으며, 이와 같은 방식은 리퀴드 핸들링을 통해 자동화 장비에 보편적으로 적용되고 있다(Adams et al., 2015). 본 연구에서는 이를 이용하여 대용량 시료 내 존재하는 저농도의 RNA를 농축하고자 실리카와 RNA의 반응 단계를 거듭 반복하는 방식을 채택하였다. 해당 공정에서 RNA와 실리카의 결합 효율을 최대화할 수 있도록 일부 적용 조건의 최적화가 이루어졌다.

One-step RT-qPCR

RNA의 농축 및 추출 효율은 AccuPower® Dual-HotStart™ RT-qPCR Master Mix (Bioneer, Korea)를 이용하여 one-step reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR)을 통해 확인되었다. PCR은 본 연구를 통해 제작한 장비를 이용하여 50°C에서 15분간 역전사를 통한 cDNA 합성 후 이를 95°C에서 5분 동안 pre-denaturation 시킨 후, 95°C, 30초 denaturation - 60°C, 35초 annealing의 PCR 단계를 40 cycle 진행하는 조건으로 수행되었다. 해당 PCR은 Taq DNA 중합효소를 적용한 방식으로 5' 말단에 FAM, 3' 말단에 소광제가 각각 표지된 TaqMan 프로브를 이용하여 실시간으로 형광 신호가 측정되도록 하였다(Hoffmann et al., 2016).

박테리오파지 MS2의 lysis

본 연구에서는 인체감염성이 없는 박테리오파지 MS2 (ATCC15597-B1)를 호흡기 바이러스의 모델로 선정하여 테스트를 진행하였다. MS2로부터 RNA를 효과적으로 추출하기 위해서는 충분한 lysis 공정이 이루어져야 한다. 따라서 MS2 lysis 시 적용되는 각 조건들에 대한 조건 테스트를 진행하였으며, 테스트된 변수는 heating 온도 및 시간, proteinase K의 적용, lysis buffer의 적용 조건이다. 각 조건에 따른 lysis 효율에 대한 평가는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 제시한 soft agar overlay plaque assay를 이용하고자 하였다. 이를 위해 MS2의 host bacteria인 *E.coli* (*Escherichia coli* C-3000, ATCC15597)를 17시간 배양한 후 이를 45°C 상태의 0.5% soft agar 50 mL

에 300 μ L 집중한 직후, 37°C로 워밍된 1.5% agar plate (90 mm)에 2.5 mL씩 분주하였다. 해당 agar plate는 20분간 굳힌 후 plaque assay에 사용되었다. Plaque assay는 lysis 조건이 적용되지 않은 MS2 배양액을 대조 표준으로 하여 각 조건에 따라 lysis가 시도된 시료들을 10배수로 계단 희석하여 2 μ L씩 접종하는 방식으로 수행되었다(Reddy, 2007). 이를 37°C, 17시간 배양 후 관찰되는 plaque를 계수하여 활성이 유지된 MS2의 농도를 계산함으로써 각 조건의 lysis 효율을 확인하였다. 농도의 계산은 다음의 식을 통하여 이루어졌다(Boone et al., 2001-2012).

$$\text{pfu/mL} = \text{average plaque count} / [(\text{dilution factor}) (2 \times 10^{-3} \text{ mL})]$$

공기 포집 시료의 적용

공기 포집은 LMO 2등급 실험실 내에 아크릴로 제작된 1 m³의 cubic을 설치하여 진행되었다. MS2 배양액을 diethyl pyrocarbonate (DEPC) treated water에 1/10,000 희석하여 제작한 시료를 고압 스프레이를 통해 cubic 내에 12초 동안 분사하여 에어로졸을 형성하였으며, 총 분사량은 20 mL이다. Cubic 내에는 bio sampler (SKC, USA)가 위치하여 분사가 시작된 시점부터 가동되어 collection vessel 내 DEPC treated water 20 mL 상에 10분 간 포집이 진행되었다(Puthussery et al., 2023). 각 시료에서 박테리오파지 MS2의 RNA를 농축 및 추출하기 위하여 상기 RNA 농축 및 추출 방식 중 최적화가 수행된 조건을 적용하였다. 시료를 각각 4.5 mL씩 취하여 공정을 수행하였으며, 최종적으로 추출된 용량은 각 100 μ L로 부피 기준 45배 농축된 시료를 얻을 수 있었다. 공기 포집 시료 내의 MS2를 검출하기 위해 앞서 RNA의 농축 효율을 평가한 방식과 동일하게 one-step RT-qPCR을 수행하였다. PCR은 MS2의 mat gene을 타겟으로 하여 수행되었으며, 각 시료 내 MS2의 copy 수를 정량하고자 MS2 RNA (Roche, Germany)를 10배 수로 계단 희석하여 표준 시료로써 적용하였다. 각 공기 포집 시료는 PCR에 template로 적용 시 5 μ L씩 사용되었으며, 농축 및 추출의 전처리 없이 바로 적용하는 경우, MagListo™ 5 M Viral DNA/RNA Extraction Kit의 프로토콜을 따라 정제된 RNA를 적용하는 경우, RNA의 농축 공정을 거친 후 추출된 RNA를 적용한 경우로 비교 평가하였다. 각 시료의 RNA copy 수는 표준 시료의 증폭 결과를 통해 표준 곡선을 작성한 후 Ct (cycle threshold) 값을 대입하여 정량되었다(Bustin et al., 2009).

자동화 장비

본 연구를 통해 개발된 자동화 장비는 비아이티벨류의 보유 기술을 통해 제작되었으며, 크게 농축부와 증폭부로 구분된다. 리퀴드 핸들링 방식을 기반으로 한 자동화 장비 구축을 위해 x축, y축, z축의 세 개의 축으로 구성되어 있는 로봇 모듈을 적용하였으며, z축의 브라켓에 파이펫 모듈을 조립하였다. 이를 통해 파이펫 모듈은 각 방향으로의 이동이 가능하며, 실린지 피스톤이 적용되어 시료의 흡입 및 분주를 수행하게 된다. 농축부의 측면에는 자석을 설치하였으며, 반응 튜브와의 접촉과 분리를 반복하여 자성 분리 공정을 수행할 수 있도록 하였다. 리퀴드 핸들링을 통해 농축 및 추출된 핵산 시료는 이후 증폭부로 이동하게 되며, 프라이머 및 프로브를 비롯해 PCR 수행에 필요한 구성요소들과의 혼합이 이루어진다. 증폭부는 하부에 히트싱크와 냉각팬이 설치된 펠티어소자를 이용하여 온도의 상승 및 하강이 이루어지며, 튜브에 온도를 전달하는 히팅 플레이트에는 온도센서가 장착되어 온도 제어가 가능하도록 하였다. 또한, PCR 과정 중 튜브 내에서 발생할 수 있는 시료의 증발 현상을 최소화하기 위해 튜브의 상부에 히터를 적용하였다. 실시간으로 PCR을 모니터링 하기 위해 발광 다이오드(Light emitting diode, LED)를 광원으로 하고, 부분 방전 방식의 디텍터(Partial discharge detector)를 적용한 형광 광학 모듈을 사용하였다. 해당 광학 모듈은 2개의 형광 파장 측정이 가능하도록 제작하여 동시에 두 가지 유전자를 대상으로 PCR 수행이 가능하다. 형광 측정은 광학계가 튜브의 측면에서 이동하며 스캔하는 방식을 적용하였으며, 이는 스텝모터와 폴리 및 벨트를 이용한 구동부에 의해 수행된다.

결 과

공기 중 바이러스의 핵산을 검출하기 위한 자동화 분석 시스템

공기 중 바이러스를 검출하기 위해 구축한 검사 과정은 다음과 같다. 우선 검사하고자 하는 현장에서 일정시간 동안 bio sampler 내에 액상으로 공기를 포집한다. 이를 위해 음압 펌프가 사용되며, 액상 내 포집된 시료는 이후 자동화 장비에 적용되어 핵산 농축 및 추출과 PCR 검사가 이루어진다. 자동화 장비에는 대용량의 시료를 취급할 수 있는 reservoir가 존재하여 공기 포집 시료를 위치시킬 수 있다. 자동화 장비의 작동이 시작되면 reservoir

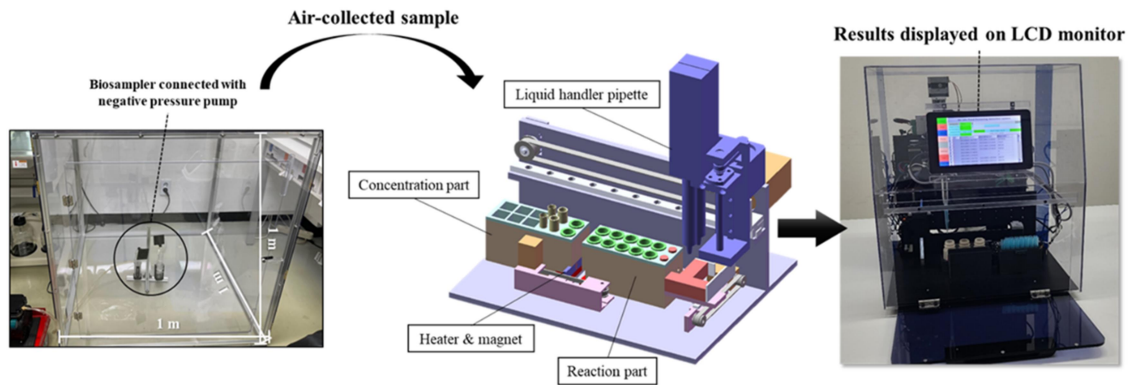


Fig. 1. The automatic system for detecting airborne viruses. The air-collected samples through a bio sampler are transferred to an automatic machine and then undergo sequential process from RNA concentration and extraction to PCR analysis. Finally, the results are displayed on the LCD monitor.

에 위치한 시료는 파이펫을 통해 농축부로 일정량씩 분주되어 농축 공정이 수행된다. 실리카-자성비드를 이용하여 농축 후 추출된 핵산은 이후 증폭부로 옮겨져 one-step RT-qPCR이 이루어진다. 검출 결과는 장비 외부에 설치된 LCD 화면을 통해 확인이 가능하도록 하였다(Fig. 1).

실리카-자성비드를 이용한 RNA 농축

실리카-자성비드를 이용한 RNA의 농축 효율을 확인하기 위하여 Influenza A H1N1 (pdm09) RNA (ATCC#VR-1894DQ)를 대상으로 테스트를 진행하였다. MagListo™ 5 M Viral DNA/RNA Extraction Kit의 기본 프로토콜에서 시료와 실리카-자성비드를 결합시키는 단계를 5회 수행하였을 때, 기존 조건(1회 수행)대비 최종적으로 추출된 RNA의 농도를 비교하였다. 각 결합 단계에서 적용된 RNA의 농도는 1,000 copies/μL이며, 최종적으로 추출된 각 RNA를 one-step RT-qPCR에 template로 사용하여 Ct 값을 비교하였다. 동일 조건의 테스트를 3회 반복 수행한 결과, 기존 방식 대비 실리카-자성비드의 결합 단계를 5회 적용한 조건에서 Ct 값이 2.5~3 cycle의 범위로 단축되는 효과를 확인하였다(Fig. 2). 이는 PCR efficiency (E)가 100%일 경우 RNA copy 수가 5배 이상 높은 것으로 추정할 수 있다.

박테리오파지 MS2의 lysis 효율 비교

박테리오파지 MS2 lysis 효율을 확인하기 위한 변수는 MagListo™ 5 M Viral DNA/RNA Extraction Kit의 기본 프로토콜을 토대로 테스트되었다. 해당 kit에서는 바이러스 lysis 및 실리카와의 결합 조건 조성을 충족하기 위해 VB

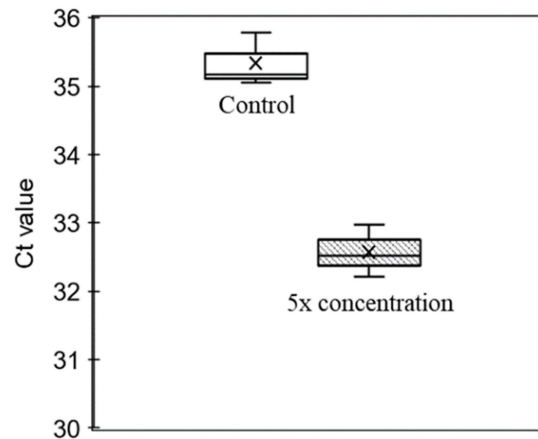


Fig. 2. RNA concentration using silica-magnetic bead. In case of performing silica-RNA binding 5 times, the Ct values decreased by more than 2.5 cycles compared to the control protocol.

buffer를 사용하고 있으며, lysis 단계에서 proteinase K가 함께 적용된다. 이때 proteinase K의 활성화를 위해 60°C에서 10분간 heating이 이루어진다. Proteinase K 적용 여부와 VB buffer 사용량에 따른 lysis 효율을 평가하기 위하여 VB buffer를 MS2 배양액과 1:1의 비율로 사용한 경우와 이에 절반에 해당하는 양만 적용한 경우(0.5:1)로 나누어 테스트하였으며, 여기에 proteinase K를 사용한 경우와 그렇지 않은 경우도 함께 비교하였다. Heating 자체가 MS2의 lysis에 영향을 미칠 수 있으므로, proteinase K의 사용 여부와 관계없이 모든 조건의 시료에 기존 방식과 동일한 heating 조건을 적용하였다. 그 결과, lysis 조건이 적용되지 않은 대조 시료 외에 모든 조건에서 MS2의 증식을

Table 1. Lysis of bacteriophage MS2 according to application conditions of VB buffer and heating temperature

No.	Sample : VB buffer (μL)	Heating (60°C)	pfu/mL
C	-	-	5×10^{12}
①	200:100	X	5×10^{12}
②		O	1.5×10^6
③	200:200	X	5×10^9
④		O	-

확인할 수 없었다. 이와 같은 결과를 통해 heating의 적용이 MS2의 lysis에 지대한 영향을 미친 것으로 사료되었으며, 이를 확인하기 위해 proteinase K는 모두 적용하지 않고 상기 VB buffer 변수에 heating 적용 여부를 추가 변수로 하여 테스트를 진행하였다. Plaque assay를 통해 각 조건에 대한 MS2의 활성을 확인한 결과, 대조 시료는 5×10^{12} pfu/mL의 농도로 확인된 것에 비해 VB buffer:MS2 배양액 = 1:1 조건에 heating을 적용한 시료에서는 증식이 확인되지 않았다. 한편, VB buffer의 사용량이 그대로이며 heating이 적용되지 않은 조건에서는 5×10^9 pfu/mL, VB buffer의 사용량이 절반이나 heating이 적용된 조건의 시료는 1.5×10^6 pfu/mL의 수준으로 계수되었다(Table 1 & Fig. 3). 해당 실험을 통해 박테리오파지 MS2에 가장 큰 영향을 미치는 것은 heating이며, 그 다음으로 중요한 요소는 VB buffer의 적용 조건이라는 것을 확인하였다. VB buffer의 사용량을 본래 프로토콜대로 시료와 동일하게 적용 시 공기 포집 시료의 용량이 매우 커지며 농도 또한 희석될 우려가 있다. 따라서 본 연구에서는 VB buffer를 bio sampler의 collection vessel에 적용 후 이에 바로 공기를 포집하는 방식을 최종적으로 적용하였다. 또한, VB buffer에 바로 공기를 포집할 경우 발생할 수 있는 buffer의 석출 현상을 방지하고자 1/2의 농도로 희석하여 사용하였다.

대용량 시료의 농축

공기 포집 직후의 시료는 대용량의 액상 상태이며, 이를 고농도 저용량 상태로 농축시키는 방식에 대한 연구를 진행하였다. 모델바이러스로써 적용한 박테리오파지 MS2 배양액을 동일한 농도로 하여 200 μL, 2 mL, 4 mL의 용량 상태로 각각 농축을 시도하였으며, 이때 실리카-자성비드와 시료의 반응 단계 및 자성 분리 공정을 모두 한 번에 수행하는 방식(method 1)과 각 단계에서 적용되

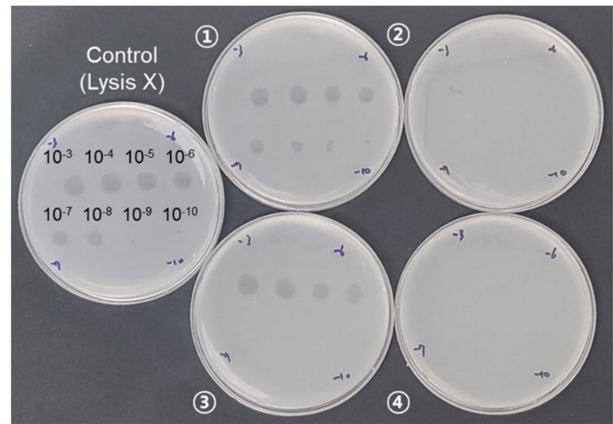


Fig. 3. Lysis of bacteriophage MS2 according to application conditions of VB buffer and heating temperature. The lytic efficiency of bacteriophage MS2 was confirmed by plaque assay. When applying heating to the sample(②, ④), lytic efficiency is increased. Table 1 shows the concentration of live bacteriophage MS2 for each condition.

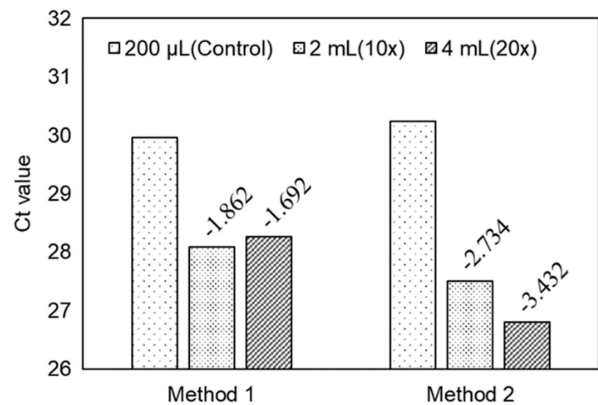


Fig. 4. Concentration efficiency depending on the methods. Method 1: RNA-silica binding and magnetic separation in one-step, Method 2: Perform RNA-silica binding and magnetic separation with multiple split volumes. Method 2 is more effective for RNA concentration due to less magnetic bead loss.

는 시료를 일정 용량으로 나누어 진행하는 방식(method 2)을 비교하였다. 농축 효율에 대한 결과는 각 방식을 통해 추출된 RNA를 one-step RT-qPCR에 template로 적용하여 Ct 값을 비교함으로써 확인하였다. 전자의 경우 시료 200 μL로부터 추출된 RNA를 template로 적용한 Ct 값을 기준으로 하였을 때, 2 mL 시료의 경우 1.862 cycle, 4 mL 시료에서는 1.692 cycle의 Ct 값이 단축되는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 후자의 방식에서는 200 μL 시료 대비 2 mL 시료와 4 mL 시료에서 각각 2.734 cycle, 3.432 cycle

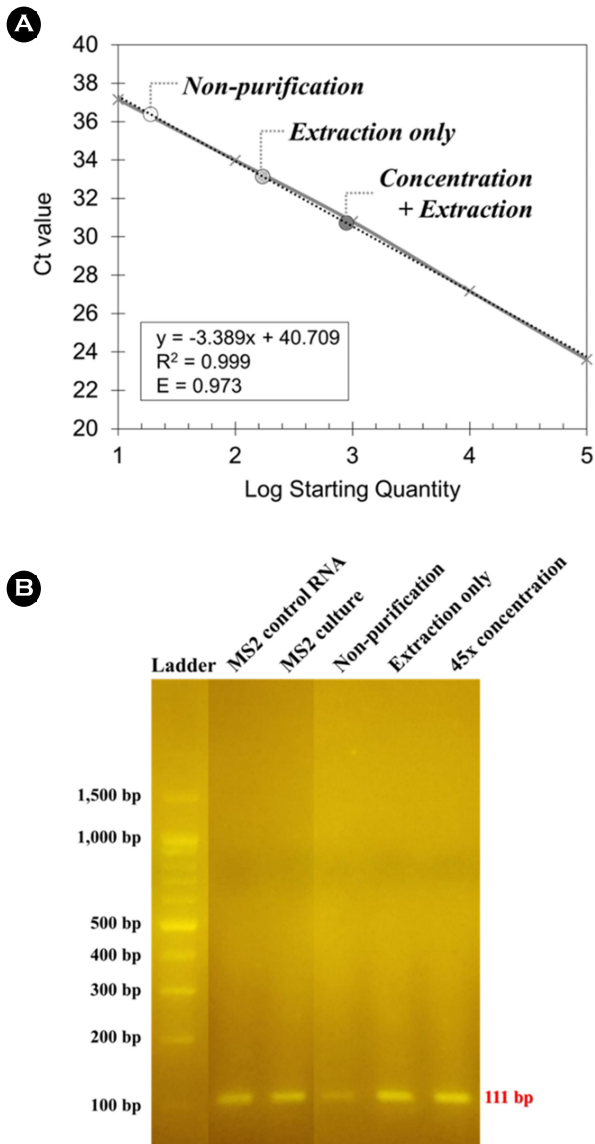


Fig. 5. Detection of bacteriophage MS2 in aerosols. Non-purification: Sample without any treatment after air collection, Extraction only: Sample with RNA extraction only, Concentration + Extraction: Sample extracted after concentrating RNA 45 times. (A) As a result of one-step RT-qPCR for each sample, the RNA copy of the concentration + extraction sample was approximately 45 times more than that of non-purification sample. (B) Each amplification product was confirmed to be specific for mat gene of bacteriophage MS2 through agarose gel electrophoresis.

의 Ct 값 단축의 결과를 보였다(Fig. 4). 이는 후자의 방식에서 시료와 반응하는 실리카-자성비드의 농도가 상대적으로 고농도로 적용되어 결합 효율이 높고, 자성분리 과정에서 자성비드의 손실 우려가 전자에 비해 낮아 나타나는 현상으로 생각된다. 따라서, RNA의 회수 효율이 상

대적으로 우수한 후자의 방식을 농축 방법으로 최종 채택하여 자동화 시스템에 적용하였다.

공기 포집 시료에서의 박테리오파지 MS2 검출 및 정량

공기 포집 시료의 MS2를 정량하기 위해 MS2 RNA $10 \sim 10^5$ copies/reaction 농도 구간에 대한 PCR 표준 곡선을 작성하였으며, 이에 각 검사 시료의 Ct 값을 대입하여 copy 수를 비교하였다. 그 결과 별도의 전처리를 하지 않은 공기 포집 시료와 일반 추출 방식을 통해 얻은 시료의 Ct 값은 각각 36.384, 33.144로 측정되었으며, 농축 공정 이후 정제된 시료의 경우 Ct 값 30.721의 결과를 보였다. 해당 결과를 표준 곡선을 통해 정량 시 각각 19, 171, 885 copies로 추정할 수 있다(Fig 5(A)). 농축 공정이 적용될 경우 전처리가 되지 않은 시료 대비 약 46배, 기존 RNA 추출 방식 대비 약 5배의 RNA 농축 효과를 얻을 수 있었다. 추가로 one-step RT-qPCR의 증폭산물은 TaqMan 프로브에 의해 발생하는 형광신호 및 아가로스겔 전기영동을 통해 서열 특이적으로 증폭되었음을 확인하였다(Fig. 5(B)).

고 찰

본 연구에서는 현존하고 있는 공기 중 생물학적 유해 물질의 관리 방식을 보완할 수 있는 대안을 제시하고자 하였다. 공기 포집 시료는 그 과정에 따라 대상의 불활성화가 발생할 수 있다. 해당 시료를 배양을 통해 결과를 확인하는 경우, 미생물이나 바이러스의 생존률이 낮아 실제 공기 오염도를 과소 평가하게 될 우려가 있다(Hinds, 1999). 따라서 바이러스의 생존과 관계없이 특이적으로 검출이 가능한 RT-qPCR 방식을 본 연구에서의 검출법으로 사용하였다. 현장진단검사(Point-of-care, POCT)에서는 비교적 빠른 분석 방식인 항원-항체 반응의 면역검사법이 유리할 수 있으나 저농도에 시료에서는 위음성 결과를 초래할 수 있으며, 항체의 특이도를 확보하지 못할 경우에는 위양성의 결과가 발생할 수 있다(Cassedy et al., 2021). 공기 중에서 COVID-19의 원인 바이러스인 SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)를 검출하기 위해 수행된 최근 연구들에서도 대부분 PCR 방식을 적용한 것으로 확인되었다(Liu et al., 2020; Moreno et al., 2021; Lednický et al., 2020; Maestre et al., 2021). 이와 같은 사항을 고려해보았을 때, 현장에서 공기 중 바이러스를 검출하기 위한 방식으로 one-step RT-qPCR을 채택하는 것이 적절하다고 사료되었다. Bio sampler를 통해 포집된

공기 시료 내의 바이러스의 초기 농도는 매우 저농도 상태일 가능성이 높다. 리퀴드 핸들링을 통한 실리카-자성 비드 기반의 핵산 농축 방식은 공기 중 부유하고 있는 바이러스를 핵산 수준에서 고농도로 농축하여 고감도로 탐지할 수 있다. 실제 에어로졸 상태의 박테리오파지 MS2를 대상으로 하여 해당 방법을 적용하였을 때, 약 45배 수준의 핵산 농축 효과를 확인할 수 있었다. 이를 통해 공기 중에 에어로졸 상태로 광범위하게 분포되어 있는 바이러스를 액상으로 1차 포집한 후, 이를 핵산 수준에서 2차 농축하여 고감도로 탐지할 수 있는 가능성을 얻을 수 있었다. 또한, 해당 시스템은 자동화를 통한 높은 활용성을 가져 비전문가도 다양한 분야에서 손쉽게 사용 가능하며, 관리 현장에 따라 검출 대상을 유동적으로 변경하여 적용할 수 있다는 장점을 가진다. 대상에 대한 최종 검출은 PCR을 통해 이루어지기 때문에, 검출하고자 하는 바이러스 또는 미생물의 유전자에 특이적인 프라이머 및 프로브를 사용함으로써 다양하게 활용이 가능할 것으로 기대된다. 추가로, 이와 같은 방식은 별도의 배양 공정이나 생화학동정을 필요로 하지 않기 때문에 기존의 검사법에서 요구되었던 검출 시간을 효과적으로 단축하는 것이 가능할 것으로 사료된다.

List of abbreviations

PCR: Polymerase chain reaction
 qPCR: Quantitative polymerase chain reaction
 RT: Reverse transcription
 DEPC: Diethyl pyrocarbonate
 Ct: Cycle threshold

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Technology development Program (S3194404) funded by the Ministry of SMEs and Startups (MSS, Korea).

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

Adams NM, Bordelon H, Wang KKA, et al. Comparison of three magnetic bead surface functionalities for RNA extraction and

detection. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015. 7: 6062-6069.

Blocken B, van Druenen T, Ricci A, et al. Ventilation and air cleaning to limit aerosol particle concentrations in a gym during the COVID-19 pandemic. *Build Environ*. 2021. 193: 107659.

Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition. 2001-2012. Springer. NY, USA.

Breshears LE, Nguyen BT, Mata-Robles S, et al. Biosensor detection of airborne respiratory viruses such as SARS-CoV-2. *SLAS Technology*. 2022. 27: 4-17.

Buonanno G, Stabile L, Morawska L, et al. Estimation of airborne viral emission: Quanta emission rate of SARS-CoV-2 for infection risk assessment. *Environ Int*. 2020. 141: 105794.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem*. 2009. 55: 611-622.

Cassedy A, Parle-McDermott A, O'Kennedy R. Virus Detection: A Review of the Current and Emerging Molecular and Immunological Methods. *Front Mol Biosci*. 2021. 20: 637559.

Drossinos Y, Weber TP, Stilianakis NI. Droplets and aerosols: An artificial dichotomy in respiratory virus transmission. *Health Sci Rep*. 2021. 4: e275.

Guo ZD, Wang ZY, Zhang SF, et al. Aerosol and surface distribution of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in hospital wards, Wuhan, China, 2020. *Emerg Infect Dis*. 2020. 26: 1583-1591.

Hinds WC. *Aerosol Technology: Properties, Behavior, and Measurement of Airborne Particles*, 2nd Edition. 1999. Wiley. NY, USA.

Hoffmann B, Hoffmann D, Henritzi D, et al. Riems influenza a typing array (RITA): An RT-qPCR-based low density array for subtyping avian and mammalian influenza a viruses. *Sci Rep*. 2016. 6: 27211.

Kutter JS, de Meulder D, Bestebroer TM, et al. SARS-CoV and SARS-CoV-2 are transmitted through the air between ferrets over more than one meter distance. *Nat Commun*. 2021. 12: 1-8.

Lednický JA, Shankar SN, Elbadry MA, et al. Collection of SARS-CoV-2 Virus from the Air of a Clinic within a University Student Health Care Center and Analyses of the Viral Genomic Sequence. *Aerosol Air Qual Res*. 2020. 20: 1167-1171.

Liu Y, Ning Z, Chen Y, et al. Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals. *Nature*. 2020. 582: 557-560.

Maestre JP, Jarma D, Jia-Rong FY, et al. Distribution of SARS-CoV-2 RNA signal in a home with COVID-19 positive occupants. *Sci Total Environ*. 2021. 778: 146201.

Moreno T, Pintó RM, Bosch A, et al. Tracing surface and airborne SARS-CoV-2 RNA inside public buses and subway trains. *Environ Int*. 2021. 147: 106326.

Pasquarella C, Albertini R, Dall'aglio P, et al. Air microbial sampling: the state of the art. *Igiene e Sanita Pubblica*. 2008. 64: 79-120.

Puthussery JV, Ghumra DP, McBrearty KR, et al. Real-time environmental surveillance of SARS-CoV-2 aerosols. *Nat Commun*. 2023. 14: 3692.

Reddy CA. *Methods for general and molecular microbiology*, 3rd Edition. 2007. pp 869-978. ASM Press. Washington D.C., USA.

Sun N, Deng C, Liu Y, et al. Optimization of influencing factors of nucleic acid adsorption onto silica-coated magnetic particles: Application to viral nucleic acid extraction from serum. *J Chromatogr A*. 2014. 1325: 31-39.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2023.29.4.363>

Cite this article as: Choi MJ, Cho WC, Chung SW, Kim D, Cho IH. Development of an Automatic PCR System Combined with Magnetic Bead-based Viral RNA Concentration and Extraction. *Biomedical Science Letters*. 2023. 29: 363-370.