

굴로부터 오염된 폴리오바이러스 및 노로바이러스의 검출

하숙희 · 우건조¹ · 광효선¹ · 황인균¹ · 최원상*

동국대학교 생명공학과, ¹식품의약품안전청 식품안전평가부

Simplified Procedure for Detection of Poliovirus and Norovirus in Oysters

Sookhee Ha, Gun-Jo Woo¹, Hyo-Sun Kwak¹, In-Gyun Hwang¹, and Weon Sang Choi*

Department of Biotechnology, Dongguk University

¹Center for Food Safety Evaluation, Korea Food and Drug Administration

Simplified procedure was developed for concentrating and detecting poliovirus and norovirus in oysters. Viruses were seeded into oyster tissue homogenates and concentrated through polyethylene glycol (PEG) precipitation, chloroform or Freon extraction, with additional PEG precipitation. Amount of viruses was evaluated using poliovirus plaque assay. Virus recovery during concentration procedure was approximately 16.4-26.0%. For detection, viral RNAs in oysters were examined using one-step RT-PCR after extraction with Trizol. Dilution or capturing of viral RNA using silica gel membrane allowed viruses to be detected by RT-PCR, whereas viruses could not be removed using QIAshredder™ Homogenizer, which is effective in removing RT-PCR inhibitors in lettuce and hamburgers. Freon extraction, generally used to concentrate viruses found in food, could be substituted with chloroform extraction using this procedure; no difference could be observed between detection limits of whole oyster extracts and digestive organ extracts indicating that RT-PCR inhibitors were distributed evenly throughout whole tissues. Nested PCR greatly improved efficiency of this procedure. Overall, this procedure could remove sufficient amount of inhibitors to allow detection of norovirus in oysters.

Key words: poliovirus, norovirus, oyster, RT-PCR

서 론

우리나라의 집단식중독 발생 추이를 보면 2001년 93건에 6,406명이던 것이 2002년 78건에 2,980명으로 줄었으나 이후 2003년 135건에 7,909명, 2004년 165건에 10,338명으로 집계되어 매년 증가추세에 있다. 이중 2003년의 경우를 살펴보면 바이러스가 원인물질로 밝혀진 것이 총 16건에 1,606명 이었으나 이중 노로바이러스(norovirus)에 의한 것이 14건에 1442명으로 전체 7,909명중 18.23%이고 원인물질이 밝혀지지 않은 것이 47건에 2,180명으로 전체의 27.6%를 차지한다. 2004년의 경우도 바이러스에 의한 것이 16건이었으나 이중 13건에 922명이 노로바이러스에 의한 것으로 보고되어 전체의 8.91%를 차지하고 있으나 원인물질이 밝혀지지 않은 것이 52건에 2,926명으로 28.3%를 차지하고 있다(1). 미국의 경우를 살펴보면 1993년부터 1997년 사이에 발생한 2,571건의 식중독 사건 중 세균성은 655건으로 전체의 약 23.8%이고 전체의 68.1%는 미확인으로 보고되고 있으나(2) Kaplan 등(3)이 제시한 기준 즉 섭취부터

발병까지의 시간, 수일간 계속되는 구토 또는 설사, 높은 감염율, 높은 이차 감염율 등의 증세를 고려하면 전체의 32-42% 정도(미확인의 약 50-60%)가 바이러스성 식중독으로 추정되고 있다(4). 영국의 경우도 이와 비슷한 40% 정도가 노로바이러스에 의한 것으로 알려져 있다(5). 따라서 우리나라의 경우도 미확인 비 세균성 식중독 중 적어도 50-60%는 바이러스성일 것으로 추정되고 이를 고려하면 바이러스성 식중독의 전체 발생률은 미국과 비슷한 34-40%에 이를 것으로 보인다.

식품을 통해 전파되는 바이러스는 일반적으로 소화기 계통을 감염하는 바이러스이고 환자의 분변이나 구토 등을 통해 바이러스가 식품에 묻은 것을 섭취함으로써 전파되는데 식중독 바이러스로 가능성 있는 바이러스로는 노로바이러스, 사포바이러스(sapovirus), 아스트로바이러스(astrovirus), 로타바이러스(rotavirus), 아데노바이러스(adenovirus)등을 예상할 수 있으나 여러 가지 정황으로 보아 노로바이러스가 전체 연령층에 장염을 유발하는 가장 공통적으로 흔한 바이러스이며(6) 쌍각류(bivalve)의 연체동물(예로 굴, 대합, 홍합), 시판 얼음, 샌드위치, 제과 집 제품, 샐러드 등에 의한 식중독과도 연관되어 있으나(7) 이중에서도 특히 오염된 해산물로 인한 2차 오염이 문제가 되고 있다. 따라서 외국의 경우 여러 가지 식품 중에서도 특히 쌍각류에 속하는 해산물(굴, 대합, 홍합 등)로부터 노로바이러스를 검출하는 연구가 약 10년 전부터 진행되어 왔고 그 중에서도

*Corresponding author: Weon Sang Choi, Department of Biotechnology, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea
Tel: 82-54-770-2227
Fax: 82-54-770-2210
E-mail: weonsang@dongguk.ac.kr

특히 굴에 대한 연구를 집중해 왔다. 이를 위해 노로바이러스를 직접 사용하기도 하지만 폴리오바이러스(poliiovirus) 같은 enterovirus 등을 모델로 하여 RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)을 이용한 검출 방법을 개발 중에 있다(8-13). 이는 폴리오바이러스의 형태가 노로바이러스와 유사하고, 비슷한 크기와 구조의 RNA를 유전체로 하며, 노로바이러스가 조직배양세포를 이용해 증식이 안되는 반면 폴리오바이러스는 종래의 조직배양법에 의해 배양이 가능하고, RT-PCR법의 민감도가 다른 방법들보다 월등하기 때문이다.

우리나라의 경우도 굴 등에 대해 검출 기술 개발을 시도하고 있고 양식장 등에 적용하고 있으나 연구결과가 문헌으로 보고된 바는 없다. 본 연구에서는 통영산 양식 굴에 폴리오바이러스를 인위적으로 오염시킨 후 이로부터 폴리오바이러스를 검출하는 방법을 개발해보고자 하였다.

재료 및 방법

굴

본 실험에 사용된 굴은 통영에서 양식중인 것을 공급받는 굴전문 음식점으로부터 구입하여 폴리오바이러스 또는 노로바이러스에 감염되지 않은 것을 확인한 후 증류수(Millipore)와 1:1로 섞어 blender로 갈아 분주하여 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

바이러스

폴리오바이러스는 백신주인 Sabin type 1 cDNA를 COS-1 세포에 transfection하여 얻은 다음 계대하여 사용하였다. 폴리오바이러스의 titer는 plaque assay를 하여 결정하였다. 노로바이러스는 국립보건연구원 소화기 바이러스과로부터 PBS(phosphate buffered saline)에 희석된 환자의 분변을 얻어 사용하였다. 노로바이러스의 titer는 바이러스의 RNA를 추출한 후 RT-PCR을 행하여 결정하였다. 노로바이러스의 RNA를 RT-PCR로 증폭한 후 agarose gel(ethidium bromide 염색)로 확인할 수 있는 RNA의 최대 희석배율을 RT-PCR unit로 정의하였다.

시약

ONE-STEP RT-PCR PreMix와 Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA Extraction kit는 인트론바이오테크놀로지(iNTRON Biotechnology, inc.)로부터 구입하였다. TRIzol은 Invitrogen사(Carlsbad, CA, USA)의 제품을, SV Total RNA Isolation System은 Promega(Madison, WI, USA)의 제품을, QIAshredder™ Homogenizer는 QIAGEN사(www.qiagen.com)의 제품을 사용하였다. 나머지 제품은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다.

Primers

본 실험에 사용된 primer는 DG172, DG173, DG213, DG214, NVLIII184U23과 NVLII738L20이었으며 체노텍(주)에서 구입하였다(Table 1).

오염된 굴로부터 바이러스 RNA 추출방법

굴 0.1 g을 사용한 경우: 바이러스를 인위적으로 접종시킨 굴 0.2 mL(약 0.1 g)에 1 mL의 TRIzol을 넣고 vortex한 후 200 µL의 chloroform을 넣고 tumbling을 45 min 동안 행하였다. 원심 분리 후 상등액을 새 tube에 옮겨 chloroform을 1회 더 처리한 후 추출된 바이러스 RNA를 isopropanol을 이용하여 침전시키고 70% ethanol로 세척한 후 diethyl pyrocarbonate(DEPC) 처리한 물에 녹여 이중 1 µL 또는 이에 해당하는 량의 RNA를 사용하여 RT-PCR을 행하였다.

굴 3 g을 사용한 경우: 바이러스를 인위적으로 접종시킨 굴 6 mL(약 3 g)에 PBS 1 mL을 넣고 vortex와 tumbling을 약 10 min 동안 행한 후 Freon 또는 chloroform 7 mL을 첨가하고 vortex와 tumbling을 약 45 min 동안 행하였다. 이후 이를 8,000 rpm에서 원심분리 하여 이중 상등액에 polyethyleneglycol(PEG) 8,000 30%/1.125 M NaCl을 1/3 volume가하고 4°C에서 약 3 또는 16 hr 동안 방치하였다. PEG 처리를 1회 더 할 경우는 pellet을 물 7 mL에 다시 현탁 시킨 후 PEG 8000 30%/1.125 M NaCl을 1/3 volume가하고 얼음에서 3 또는 16 hr 동안 방치하였다. 이후 12,000 rpm에서 원심분리 하여 침전된 pellet을 물 300 µL에 현탁 시킨 후 TRIzol 1 mL을 사용하여 RNA를 추출하였다. 이후 isopropanol로 RNA를 침전시키고 RNA pellet을 물에 녹여 이중 1 µL 또는 이에 해당하는 량의 RNA를 사용하여 RT-PCR을 행하였다.

RT-PCR assay

RT-PCR을 위해서는 총 20 µL의 반응액에 ONE-STEP RT-PCR preMix 8 µL, 각 primer 일정량(폴리오바이러스의 경우 DG172 100 pmol과 DG173 200 pmol을, 노로바이러스의 경우 NLVII184U23 200 pmol과 NLVII738L20 100 pmol을 사용함)과 RNA 주형이 함유되도록 하였다. 45°C에서 30분간 역전사 반응 후 증폭 cycle을 시작하기 전에 94°C에서 5분간 DNA를 변성시킨 후 cycle로 진입하게 하였다. 각 cycle은 94°C 45초, 55°C 45초, 72°C 45초로 하였으며 30 cycle 후 72°C 7분간 연장 반응 시킨 후 반응을 종료하였다.

Nested PCR

Nested PCR을 위해서는 총 50 µL의 반응액에 RT-PCR로부터 얻은 DNA 1 µL, 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 2.5 unit의 Taq

Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'-3')	Polarity	T _m value (°C)	Size (bp)	Reference
DG172	GATTACAAGGATGGTACGCTTACA	sense	55.9	524	(12)
DG173	GACTCTATGTAATTGGTGATGCCT	antisense	59.3		
DG213	CTTACACCCCTCTCCACCAAGGAT	sense	64.4	506	
DG214	TTGTCCATGGCTTCTTCTTCGTA	antisense	59.3		
NLVIII184U23	CARYGGAACTCCAYYRCCCACTG (Y=C/T, R=A/G)	antisense	65.1	574	
NLVII738L20	TGCGATCGCCCTCCAYGTG	sense	64.5		

DNA polymerase, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 각 primer 100 pmol(DG213, 214)이 함유되도록 하였다. 증폭 cycle로 진입하기 전에 94°C에서 5분간 DNA를 변성시킨 후 각 cycle로 진입하게 하였다. 각 cycle은 94°C 45초, 55°C 45초, 72°C 45초로 하였으며 30 cycle후 72°C 7분간 연장 반응 후 반응을 종료하였다.

결과 및 고찰

굴로부터 오염된 바이러스의 검출

굴 0.1 g에 폴리오바이러스 20,000 pfu를 접종시킨 후 RNA를 추출하여 이를 20 μL 물에 녹여 이중 1 μL를 사용하여 분석한 결과 폴리오바이러스 RNA를 회석하여 RT-PCR을 행하는 것이 회석하지 않은 RNA를 사용하는 것보다 더 잘 검출되었다(Fig. 1 lanes 3-5). 같은 현상을 굴 0.1 g에 노로바이러스 660 RT-PCR unit를 오염시켜 행한 실험에서도 확인하였고 50배까지 회석하여도 band를 관찰할 수 있었다(data not shown). 이는 이미 보고(8,9,14,10,11)된 바와 같이 굴에는 PCR 방해물질이 존재하여 RT-PCR을 방해했기 때문으로 보인다. 다음으로 굴의 량을 약 3 g(굴의 무게가 통상 3-5 g 정도 되므로 굴 3 g은 작은 굴 1마리에 해당함) 까지 늘려 바이러스의 검출을 실행하여 보았다. 굴 3 g에 660 RT-PCR unit의 노로바이러스를 오염시킨 후 RNA를 추출한 후 분석한 결과도 회석하지 않은 RNA를 사용하는 경우 band가 확인되지 않았으나 이를 5배, 10배, 20배 회석하면 band의 확인이 가능하였으며(Fig. 2A lanes 2-5, Fig. 2B lanes 2-5) 50배 까지 회석하여도 band를 관찰할 수 있었다(data not shown). 바이러스 확인을 위해 필요한 회석 배율은 시행에 따라 다소 차이가 있었으나 일반적으로 5배 정도의 회석으로 band를 확인하는 것이 가능하였고 10배 정도의 회석에서 가장 진한 band를 관찰할 수 있었다.

QIAGEN사의 QIAshredder™ Homogenizer이 상추와 햄버거 등의 식품에 내재하는 PCR 방해물질을 효과적으로 제거할 수 있다는 보고가 있고(13), silica gel membrane이 굴에 존재하는 PCR 방해물질을 효과적으로 제거한다는 보고가 있다(11). 이를 확인해 보기 위해 QIAGEN사의 QIAshredder™ Homogenizer, 인트론바이오테크놀로지사의 Viral gene-spin viral DNA/RNA extraction kit, Promega사의 SV total RNA isolation system을

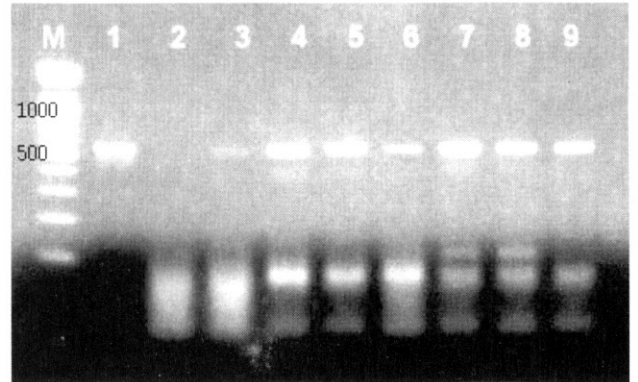


Fig. 1. Comparison of the RNA purification procedure for RT-PCR detection of the poliovirus.

0.1 g of crude oyster homogenates was seeded with the poliovirus. The viral RNA was extracted using the method in Materials and Methods. Electrophoresis on 1.5% agarose gel. Poliovirus specific RT-PCR product is shown. Lane M, molecular weight marker (100 bp ladder); lane 1, positive control (poliovirus cDNA was amplified using PCR); lane 2, negative control (oyster that was not seeded with poliovirus); lane 3, oyster that was contaminated with 20,000 pfu poliovirus; lane 4, 10-fold dilution of lane 3 RNA; lane 5, 20-fold dilution of lane 3 RNA; lane 6, RNA extraction followed by QIAshredder™ Homogenizer; lane 7, RNA extraction followed by Viral gene-spin; lane 8, RNA extraction followed by QIAshredder™ Homogenizer and Viral gene-spin; lane 9, RNA extraction followed by a SV RNA extraction kit.

사용하여 PCR 방해물질이 효과적으로 제거될 수 있는지를 0.1 g의 굴에 20,000 pfu의 폴리오바이러스를 접종하여 확인해 보았다(Fig. 1). 그 결과 상지와 햄버거 물질에서는 PCR 방해물질을 효과적으로 제거하는 것으로 알려진 QIAshredder™ Homogenizer가 굴에서는 별로 효과가 없었다(Fig. 1의 lane 3과 6 비교). 그러나 silica gel membrane 계통인 Viral gene-spin viral DNA/RNA extraction kit와 SV total RNA isolation system은 효과적으로 PCR 방해물질을 제거할 수 있었다(Fig. 1의 lane 3, lane 7, lane 9 비교). QIAshredder™ Homogenizer와 viral gene-spin viral DNA/RNA extraction kit를 함께 처리하는 방법도 시도해 보았으나(Fig. 1, lane 8) viral gene-spin DNA/RNA extraction kit만을 단독으로 사용한 것(Fig. 1, lane 7)과 비슷한

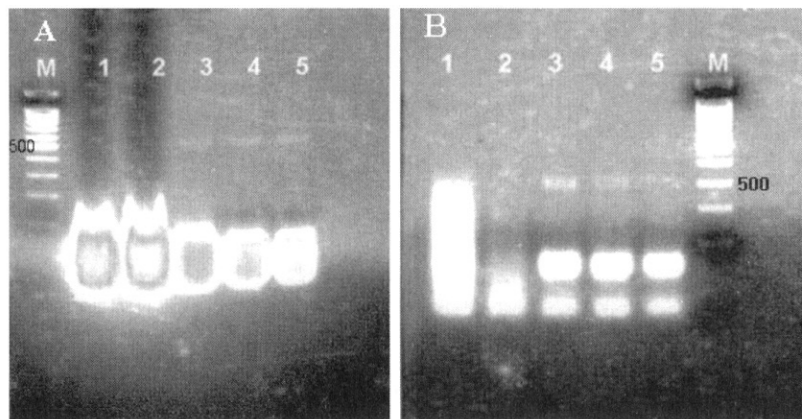


Fig. 2. Comparison of the extraction solvents (Freon and chloroform) for virus recovery.

The crude oyster homogenates were seeded with the norovirus. (A). Freon extraction (B). Chloroform extraction. Lane M, molecular weight marker (100 bp ladder); lane 1, negative control (oyster that was not seeded with norovirus); lane 2, oyster that was seeded with 660 RT-PCR units of the norovirus; lane 3, 5-fold dilution of lane 2 RNA; lane 4, 10-fold dilution of lane 2 RNA; lane 5, 20-fold dilution of lane 2 RNA.

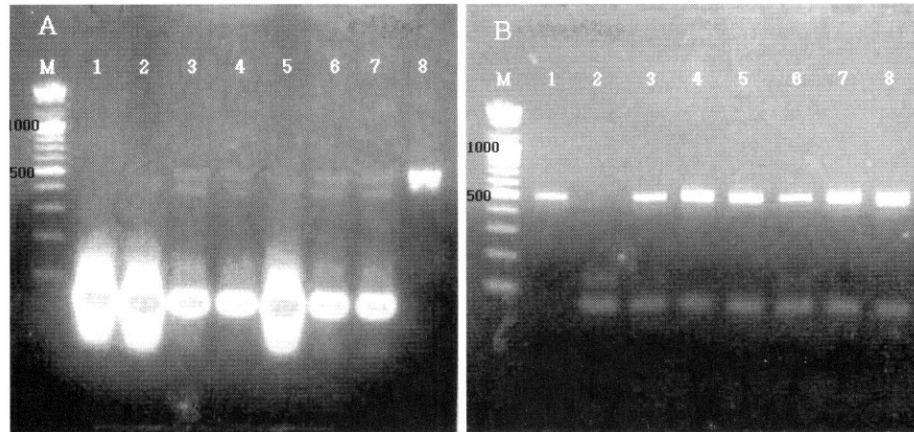


Fig. 3. Detection of the poliovirus in the seeded oyster by RT-PCR and nested PCR.

(A). RT-PCR of the poliovirus RNA extracted from the seeded oyster. Lane M, molecular size marker (100 bp ladder); lane 1, negative control (oyster which was not seeded with norovirus); lanes 2 and 5, oyster that was seeded with 5,000 pfu poliovirus; lanes 3 and 6, 10-fold dilution of lanes 2 and 5; lanes 4 and 7, 20-fold dilution of lanes 2 and 5; lane 8, positive control (poliovirus cDNA was amplified using PCR). Lanes 2-4, PEG was treated twice for 3 hr each. Lanes 5-7, PEG was treated twice for 16 hr each. (B). Nested PCR using the DNA from RT-PCR. Lane M, molecular weight marker (100 bp ladder); lane 1, positive control (poliovirus cDNA was amplified using PCR); lane 2, negative control (oyster which was not seeded with poliovirus); lanes 3 and 6, oyster which was seeded with 5,000 pfu poliovirus; lanes 4 and 7, 10-fold diluted RNA of lanes 3 and 6; lanes 5 and 8, 20-fold diluted RNA of lanes 3 and 6. Lanes 3-5, PEG was treated twice for 3 hr each. Lanes 6-8, PEG was treated twice for 16 hr each.

효과를 보였다. 그러나 이 두 가지 silica gel membrane kit 가 PCR 방해물질의 제거에 효과가 있음에도 불구하고 RNA 시료를 10-20배 희석한 경우와 비슷한 band 강도를 보였는데 희석 배율을 감안하면 회수율이 5-10%에 불과한 것으로 판단되었다. 이는 kit의 membrane 용량이 적기 때문으로 보인다. 굴의 량을 늘려 같은 실험을 해 보았으나 3g까지는 0.1g과 마찬가지로 kit 사용 시 희석하지 않아도 band의 관찰은 가능하나 회수율이 5-10% 정도이고 굴의 량을 이보다 더 늘릴 경우는 더 이상 효과를 기대할 수 없었다(data not shown). 이는 Shieh 등 (11)의 보고와도 비슷한 결과이다.

일반적으로 nested PCR을 이용하면 적은 copy의 DNA라도 검출의 가능성을 높일 수 있다. 본 연구에서는 nested PCR을 위해 RT-PCR로 얻어진 DNA의 일부와 제2의 primer set(DG 213/DG 214)를 사용하여 506 bp의 증폭을 확인함으로써 굴로부터 유래하는 비특이적 band들의 희석으로 인한 band의 선택성을 높이고 확인하고자하는 DNA copy수는 많아져 쉽게 바이러스의 확인이 가능하였다(Fig. 3B).

Freon과 chloroform의 비교

현재 굴로부터 바이러스의 RNA추출에 많이 사용되고 있는 프레온(trichlorofluoroethane 즉 Freon)은 환경 파괴 물질이므로 대체가 시급히 요망된다. 굴로부터 바이러스 추출 시 Freon 대신 chloroform을 사용하여 비록 바이러스의 농축율은 Freon보다 낮으나 검출은 더 잘 된다는 보고가 있다(15). 이를 바탕으로 굴 3g으로부터 노로바이러스 농축 과정에 2가지 용매를 사용하여 그 효능을 비교해 보았다. 굴 3g에 660 RT-PCR unit의 노로바이러스를 오염시킨 다음 나머지 과정은 동일하게 하되 프레온 처리(Fig. 2A) 대신 chloroform을 이용하여 RNA를 추출한 다음 RT-PCR을 사용하여 비교한 결과(Fig. 2B) 두 가지 용매 모두 20배 희석한 시료로부터 비슷한 강도의 노로바이러스 band를 확인할 수 있어 굴로부터 바이러스를 검출하는 데에는 두 용매 간에 차이는 없는 것으로 판단되었다.

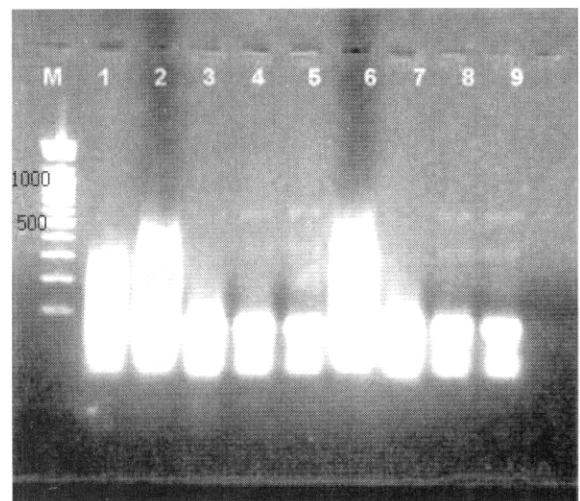


Fig. 4. Effect of the PEG treatment numbers for the detection of the norovirus.

3 g of crude oyster homogenates was seeded with the norovirus. Lane M, molecular weight marker (100 bp ladder); lane 1, negative control (oyster that was not seeded with norovirus); lane 2 and 6, oyster that was seeded with 660 RT-PCR units of the norovirus; lane 3 and 7, 5-fold dilution of lane 2 and 6; lane 4 and 8, 10-fold dilution of lane 2 and 6; lane 5 and 9, 20-fold dilution of lane 2 and 6. Lanes 2-5 show PEG treated once (16 hr), and lanes 6-9 show PEG treated twice (16 hr).

PEG 처리 횟수의 비교

굴로부터 바이러스의 검출을 위해 PEG를 처리하는 것은 바이러스를 농축해주는 효과가 있으나 PEG 단계를 거치면서 바이러스의 손실도 생기고 시간도 많이 걸리는 step이다. 따라서 PEG 처리 횟수를 1회만 할 경우와 2회 할 경우 바이러스 검출에 어떤 영향을 주는 지를 확인해 보았다. 그 결과 PEG 처리횟수와 관계없이 둘 다 약 20배 희석에서 비슷한 강도의 band

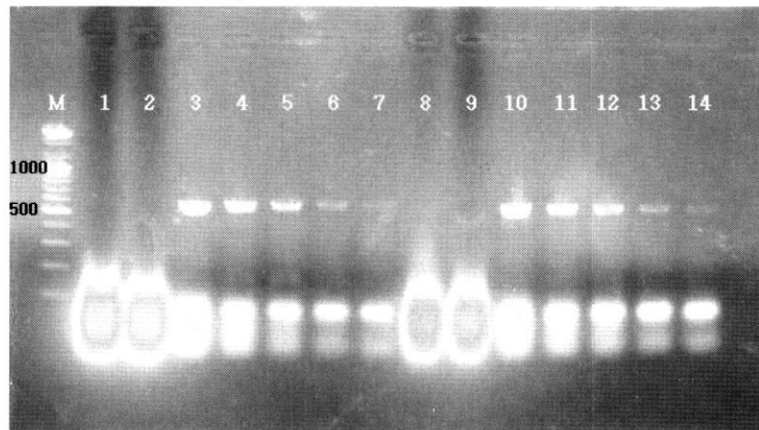


Fig. 5. Comparison of virus detection. Crude oyster homogenates (equivalent to 3 g) of whole oyster tissue (lanes 2-7) or dissected digestive organs (lanes 9-14) were seeded with the norovirus.

Lane M, molecular weight marker (100 bp ladder); lane 1 and 8, negative control (oyster that was not seeded with norovirus); lane 2 and 9, the oyster was contaminated with 3,300 RT-PCR units of the norovirus; lane 3 and 10, 5-fold dilution of lane 2 and 9; lane 4 and 11, 10-fold dilution of lane 2 and 9; lane 5 and 12, 20-fold dilution of lane 2 and 9; lane 6 and 13, 50-fold dilution of lane 2 and 9; lane 7 and 14, 100-fold dilution of lane 2 and 9.

Table 2. Virus recovery according to the concentration steps

Step	Procedure 1 ¹⁾			Procedure 2 ²⁾		
	Trial	Poliovirus recovery ³⁾ (%)	Mean \pm SD ⁴⁾ (%)	Trial	Poliovirus recovery ³⁾ (%)	Mean \pm SD ⁴⁾ (%)
Chloroform	1	20.8	22.7 \pm 9.4	1	35.4	33.4 \pm 5.3
		36.3			36.3	
	2	15.4		25.4		
		18.1		36.3		
First PEG precipitation	1	15.0	20.1 \pm 12.1	1	21.6	27.8 \pm 8.3
		37.3			40.0	
	2	18.7		25.6		
		9.3		24.0		
Second PEG precipitation	1	8.8	16.4 \pm 8.8	1	18.4	26.0 \pm 6.1
		24.0			24.0	
	2	8.8		29.6		
		24.0		32.0		

¹⁾In each PEG precipitation, precipitations were carried out for 3 hr.

²⁾In each PEG precipitation, precipitations were carried out for 16 hr.

³⁾Recovery (%) was calculated using the initial seeding of poliovirus as 100%.

⁴⁾SD means standard deviation.

를 확인할 수 있었다(Fig. 4). 그러나 여러 차례의 실험 결과 PEG를 2회 처리한 것이 일반적으로 더 나은 band를 보였으며 (data not shown) pellet을 물에 녹일 때 2회 처리한 것은 잘 현탁 되는 반면 1회만 처리한 것은 다음 step의 RNA 추출을 위해 300 μ L의 물에 현탁 시키는 것이 용이하지 않아 굴의 량이 현행 3 g보다 많아질 경우 PEG를 2회 처리하는 것이 나은 것으로 판단되었다.

굴 전체를 사용하는 것과 소화기만을 사용할 경우

굴 등의 패류는 영양물질을 소화기에서 걸러내고 나머지는 바깥으로 배출하기 때문에 바이러스도 소화기에 흡착되어 농축된다고 알려져 있다(8). 따라서 굴에서 소화기만을 분리하여 바이러스를 검출하는 것이 굴 전체를 사용하는 것 보다 바이러스의 검출율을 높일 수 있을 것으로 판단되므로 소화기만을 분리하여 바이러스의 검출에 이용하기도 한다(5,16). 그러나

PCR을 방해하는 물질이 전체 조직과 소화기에 고루 존재하는지 아니면 특정 부위에 농축되어 있는지는 아직 명확하지 않다. 따라서 굴 전체조직을 사용하거나 소화기만을 분리하여 노로바이러스를 인위적으로 접종하여 노로바이러스의 검출에 차이가 있는지를 비교하여 보았다(Fig. 5). 그 결과 굴 전체를 사용할 경우와 소화기 부위만을 사용할 경우 둘 다 비슷한 양상을 보였으며 3,300 RT-PCR unit의 노로바이러스가 seed될 경우 100배 희석까지(Fig. 5 lane 7과 14 비교) 비슷한 강도의 band로 검출이 가능하였다. 따라서 본 결과로부터 PCR 방해물질은 전체조직과 소화기에 고루 존재하는 것으로 판단되었다. 그러나 이는 굴의 소화기관에 PCR 방해물질이 덜 존재하는 것으로 보고한 Atmar 등(14)등의 결과와 상치된다. 이는 Atmar 등(14)이 chloroform이 아닌 Freon을 사용하는 것을 포함하여 바이러스의 농축 및 RNA 추출과정이 본 실험실에서 사용하는 것과 많이 달랐기 때문으로 판단된다.

농축단계별로 살펴본 바이러스의 회수율 및 검출한계

바이러스의 농축정도를 보다 정량적으로 확인하기 위해 plaque assay를 이용하여 확인하여 보았다(Table 2). 이번에 사용된 방법에 의하면 TRIZOL에 의한 RNA 추출 이전 단계까지 처음 집중된 폴리오바이러스 중 16.4-26.0% 가 회수됨을 알 수 있었다. 최종 수율에 있어 2가지 procedure가 16.4±8.8%와 26.0±6.1%로 차이를 보인 것은 chloroform단계에서의 회수율 차이에 의한 것으로 여러 차례의 실험 결과 chloroform 추출 단계의 경우 굴이 수확된 시기에 따라 회수율이 다소 차이를 보였다(data not shown). 그러나 이후의 PEG에 의한 농축의 경우 PEG를 3시간씩만 처리한 것은 직전단계 대비 회수율이 81.6-88.5%이고 PEG를 16시간씩 처리한 것은 직전단계 대비 회수율이 83.2-93.5%를 보여 처리 시간이 길어질수록 회수율이 다소 높아지는 경향을 보였으나 전기영동에 의한 band 확인으로는 큰 차이를 발견할 수 없었다(Fig. 3A). 이는 Shieh 등(11)이 보고한 58%나 Mullendore 등(15)이 보고한 71-78% 보다는 다소 높은 수치였다.

굴 3g에 집중한 660 RT-PCR unit의 노로바이러스를 집중하여 추출한 RNA를 20 µL에 녹여 이중 1 µL를 사용하여 RT-PCR을 행하며 RT-PCR 반응액중 절반만 gel loading에 사용하므로 이를 감안하면 50배 희석하여 RT-PCR을 행하여 확인한 band는 약 0.33 RT-PCR unit에 해당하였다. 이는 굴의 성분들이 바이러스 RNA 분리 시 carrier로 작용하여 RNA 회수율을 오히려 도와주었음을 의미한다. 노로바이러스의 RT-PCR unit와 copy수와의 관계는 1 RT-PCR unit당 10-50 copy에 해당하므로 (17) 본 실험에서 얻은 검출한계 0.33 RT-PCR unit는 약 3.3-16.5개의 입자로 계산된다.

폴리오바이러스로 실험한 결과는 굴 3g에 5,000 pfu 집중하여 회수한 RNA를 20 µL에 녹여 이중 1 µL를 이용하여 RT-PCR을 행하면 50-125배까지 희석하여 RT-PCR을 행하여도 band의 관찰이 가능하고(data not shown) RT-PCR 반응액 중 절반만 gel loading에 사용하는 것을 감안하면 이 band는 1-2.5 pfu에 해당한다. 폴리오바이러스 1 pfu당 30-300 입자라고 추정하면(8) nested PCR에 의존하지 않고 RT-PCR에 의한 검출한계는 굴 3g 당 30-750입자에 해당한다. 이는 이미 보고된 검출한계(8-10)인 굴 g당 2-20 pfu보다 나은 결과이다. 또 A형 간염 바이러스의 결과와 직접 비교하기는 어렵지만 굴 g당 8 pfu(18)에 비해서도 현저히 좋았다. 따라서 새로 개발된 이 방법은 굴로부터 효과적으로 노로바이러스를 검출할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

굴로부터 오염된 바이러스를 농축하고 검출하는 방법이 개발되었다. 바이러스를 인위적으로 굴 추출물에 집중시킨 후 polyethylene glycol(PEG) 로 침전시키고 chloroform 또는 Freon으로 추출한 후 다시 PEG로 침전시켜 바이러스를 농축하였다. 각 단계별로 회수되는 폴리오바이러스의 양을 plaque assay를 이용하여 측정한 결과 처음 집중한 바이러스의 16.4-26.0%가 회수됨을 알 수 있었다. 검출을 위해서는 농축된 바이러스를 TRIZOL로 추출한 후 바이러스의 RNA를 희석하거나 silica gel membrane을 이용하여 capture한 후 RT-PCR로 확인할 수 있었다. 그러나 상추와 햄버거에서 RT-PCR 방해물질을 효과적으로 제거하는 QIAshredder™ Homogenizer는 굴에 존재하는 방해물질을 제거하지 못하였다. 식품에 오염된 바이러스 농축을 위해 Freon이 일반적으로 사용되나 chloroform으로 대체가 가능하였다. 검출한계

에 있어 굴 전체의 추출물을 사용하는 것과 소화기만을 분리하여 사용하는 경우 차이가 없으므로 RT-PCR 방해물질이 굴 전체 조직에 고루 분산되어 있다고 판단된다. nested PCR은 이 방법의 효율을 높여주었다. 전체적으로 이 방법을 사용하면 굴로부터 오염된 노로바이러스의 검출이 가능하다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 대한민국 식품의약품안전청의 2004년과 2005년 용역연구사업의 연구지원에 의하여 이루어진 연구결과이며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Korea Food and Drug Administration homepage (www.kfda.go.kr)
2. Olsen SJ, Maackinon LC, Goulding JS, Bean NH, Slutsker L. Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States, 1993-1997. *MMWR*. CDC 49: (SS01) 1-51 (2000)
3. Kaplan JE, Feldman R, Campbell DS, Lookabaugh C, Gary GW. The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *Am. J. Publ. Health* 72: 1329-1332 (1982)
4. Koopmans M, von Bonsdorff C-H, Vinje J, de Medici D, Monroe S. Foodborne viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 187-205 (2002)
5. Lees D. Viruses and bivalve shellfish. *Int. J. Food Microbiol.* 59: 81-116 (2000)
6. Koopman M, Duizer E. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int. J. Food Microbiol.* 90: 23-41 (2004)
7. Jaykus L-A. Enteric viruses as 'emerging' agents of foodborne disease. *Irish J. Agric. Food Res.* 39: 245-255 (2000)
8. Atmar RL, Metcalf TG, Neill FH, Estes MK. Detection of enteric viruses in oyster by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 631-635 (1993)
9. Lees DN, Henshilwood K, Dor WJ. Development of a method for detection of entericviruses in shellfish by PCR with poliovirus as a model. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2999-3005 (1994)
10. Jaykus L-A, De Leon R, Sobsey MD. A virion concentration method for detection of human enteric viruses in oysters by PCR and oligoprobe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2074-2080 (1996)
11. Shieh Y-S, Calci KR, Baric RS. A method to detect low levels of enteric viruses in contaminated oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4709-4714 (1999)
12. Legeay O, Caudrelier Y, Cordevant C, Rigottier-Gois L, Lange M. Simplified procedure for detection of enteric pathogenic viruses in shellfish by RT-PCR. *J. Virol. Methods* 90: 1-14 (2000)
13. Sair AI, D'Souza DH, Moe CL, Jaykus L-A. Improved detection of human enteric viruses in foods by RT-PCR. *J. Virol. Methods* 100: 57-69 (2002)
14. Atmar RL, Neill FH, Romalde JL, Le Guyader F, Woodley CM, Metcalf TG, Estes MK. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3014-3018 (1995).
15. Mullendore JL, Sobsey MD, Shieh, YC. Improved method for the recovery of hepatitis A virus from oysters. *J. Virol. Methods* 94: 25-35 (2001)
16. Romalde JL, Estes MK, Szucs G, Atmar RL, Woodley CM, Metcalf TG. In situ detection of hepatitis A virus in cell cultures and shellfish tissues. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1921-1926 (1994)
17. Le Guyader FS, Neill FH, Dubois E, Bon F, Loisy F, Kohli E, Pommepuy M, Atmar RL. A semiquantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak. *Int. J. Food Microbiol.* 87: 107-112 (2003)
18. Cromeans TL, Nainan OV, Margolis HS. Detection of hepatitis A virus RNA in oyster meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2460-2463 (1997)