

IMS-RT-PCR을 활용한 육성돈 분변으로부터 간염 A형 바이러스의 신속순수분리 및 검출법 연구

이희민 · 김두운*

전남대학교 농업생명과학대학 식품공학과 및 기능성식품연구센터

Use of IMS-RT-PCR for the Rapid Isolation and Detection of Hepatitis A Virus from the Swine Feces

Hee-Min Lee and Duwoon Kim*

Department of Food Science and Technology and Functional Food Research Center, Chonnam National University

Abstract Human pathogenic viruses such as hepatitis A and E virus (HAV and HEV), which lead to acute liver failure and death, are foodborne pathogens associated with the consumption of virus-contaminated meats, filter-feeding bivalves, fruits, and salads. Two of the three swine farms examined in this study had HAV and HEV positive stool samples in a nested RT-PCR assay. The use of the immunomagnetic separation (IMS) facilitated the separation of HAV through interactions between the ligand on the virion surface and the antibody from the swine feces containing both HAV and HEV. The nested RT-PCR analysis was performed for the detection of HAV obtained from hepatocarcinoma cell line (PLC/PRF/5) contaminated with eluent fraction of IMS. This indicated that IMS has the potential to simultaneously isolate and concentrate target viruses by changing antibodies linked on the magnetic beads.

Keywords: hepatitis A virus, hepatitis E virus, immunomagnetic separation, nested RT-PCR

서 론

식품 중 위해요소로 인해 발생한 사건사고들은 국민들의 건강에 심각하게 영향을 미치며 적절한 조기 검출방법 및 제도의 부재로 엄청난 사회적 과장과 더불어 경제적 손실을 초래하는 경우가 많다. 현대도시환경의 위생상태가 많이 개선되고 있음에도 불구하고 최근 청장년층에서는 간염 A형 바이러스에 대한 항체 보유율이 낮아지고 있고 이로 인해 바이러스 감염사례가 증가하고 있는 추세가 보고되고 있으며(1), 아직도 우리나라에 식중독 발병률이 비교적 높은 바이러스인 간염 A형 바이러스(HAV)와 간염 E형 바이러스(HEV)는 수인성 질환으로 식수나 식품의 오염에 의해 산발적 혹은 단독으로 발생될 수 있다(2).

HAV는 양성가닥 RNA 바이러스로 대략 7.5 kb의 염기서열을 가지고 있고(3), HAV의 혈청형은 하나이나 염기서열 차이로 7개의 유전자형(genotype)으로 분류되며, 인체에 감염성을 주는 HAV에는 I, II, III, 그리고 VII형이 보고되었다(4,5). HEV는 양성가닥 RNA 바이러스로 대략 7.2 kb의 염기서열을 가지고 있고(6), HEV의 혈청형은 하나이나(7,8) 염기서열 변이에 따라 4개의 유전자형(genotype)으로 분류되며, 모든 유전자형이 인체 감염을 일으키

는데, 특히 III과 IV형은 인수공통전염성을 보여(8,9), 성인과 노인의 감염 사례가 많이 보고되었다(10-13).

바이러스를 증식시키고 정량화할 수 있는 세포 배양 시스템의 개발은 많이 연구되었으며, 그 방법은 환자의 분변이나 혈청에서 상층액을 분리한 초기 바이러스를 세포주에 접종하여 증식시키는 방식이다(14). 그러나 이러한 세포 배양 시스템은 치료 내 다양한 바이러스를 동시에 증식시키는 결과를 초래할 가능성이 높아졌다. 이러한 단점을 극복하면서 특정 바이러스를 증식 시키거나 동정하는 후 연구에 활용하려면, 세포주에 바이러스를 접종하기 전 단계에서 시료로부터 분리하고자 하는 대상 바이러스만 순수분리하는 기술이 필요하게 되었다.

Immunomagnetic separation(IMS) 기술은 자성비드(magnetic beads)에 특이적인 항체를 부착시켜 분석하고자 하는 항원을 원심분리 없이 회수를 용이하게 하며, 현재까지 검출기술에 있어서 가장 효율적이라는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)에서 문제시되는 PCR 반응저해제를 효과적으로 제거하여 분자생물학적 검출능 개선에 활용될 수 있는 기술이다(15).

본 연구에서는 육성돈 분변 유래 바이러스(HAV 및 HEV)로부터 자성비드 면역침강법 기술을 활용하여 간염 A형 바이러스만을 특이적으로 신속분리하고 세포배양 할 수 있는 기술을 확보하고자 IMS-RT-PCR 방법을 적용하였다.

재료 및 방법

시료

3곳의 돼지축사로부터 육성돈의 분변을 2개씩 채집하였다. 채집한 돼지분변은 멸균된 phosphate buffered saline(PBS) 9mL에

*Corresponding author: Duwoon Kim, Department of Food Science and Technology and Functional Food Research Center, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
Tel: 82-62-530-2144
Fax: 82-62-530-2149
E-mail: dwkim@jnu.ac.kr
Received August 3, 2012; revised September 7, 2012; accepted September 8, 2012

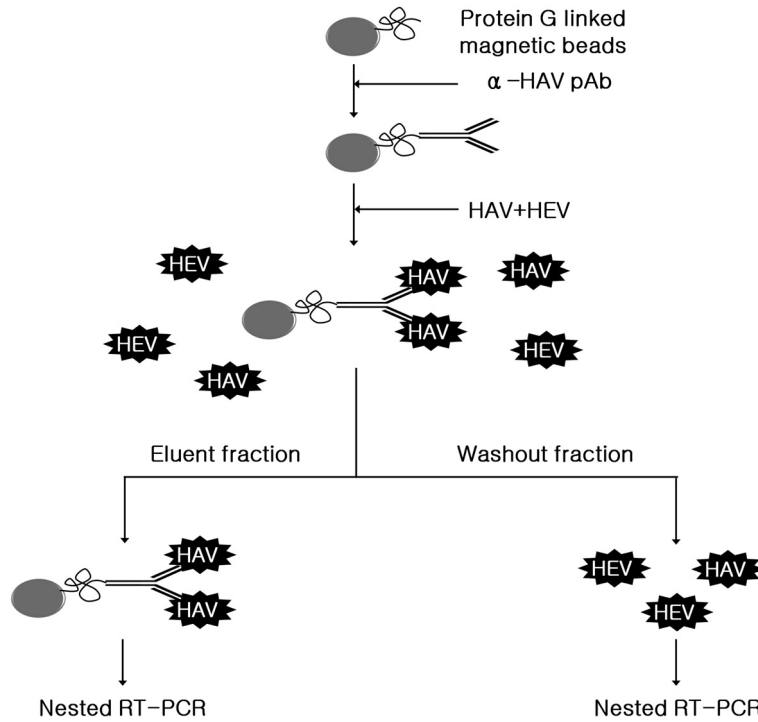


Fig. 1. Specific detection method of hepatitis A virus (HAV) from mixed viruses (HAV and HEV) using immunomagnetic separation (IMS) and nested RT-PCR. α -HAV pAb, anti-hepatitis A virus polyclonal antibody.

1 g씩 부유시켜 3,000 rpm에서 30분간 원심분리를 통해 얻은 상층액을 실험에 사용하였다.

세포 배양 및 바이러스 증식

Hepatocarcinoma 세포주(PLC/PRF/5, no. 28024)는 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, KCLB, Seoul, Korea)에서 구매하였다. PLC/PRF/5 세포를 배양하기 위해 RPMI1640(WelGENE, Daegu, Korea)에 300 mg/L의 L-glutamine(WelGENE), 25 mM HEPES(WelGENE), 1% penicillin streptomycin(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 그리고 10% 열처리된 fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL)이 포함된 배지를 사용하였으며, $36.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 바이러스를 접종하기 위해 T25 세포배양용기(Nunc Inc., Naperville, IL, USA)에 단일층으로 배양된 PLC/PRF/5 세포의 배지를 제거한 후, IMS로 분리된 바이러스액을 접종하고 세포가 마르지 않도록 새로운 배지 1 mL을 넣어주었다. 바이러스 흡착을 위해 60분간 세포배양기에 방치하면서 20분 간격으로 흔들어 주어 흡착과정 동안 배양용기의 세포가 마르지 않도록 하였고, 60분 후에 추가적으로 배지 6 mL을 넣었다. 바이러스 접종 후 총 14일간 증식시켰으며, 3일 마다 한 번씩 새로운 배지로 교환하였다. 순수하게 바이러스 증식이 되는지 확인하기 위해 nested RT-PCR을 실시하였다.

Immunomagnetic separation(IMS)

IMS은 자성체인 자성비드-결합 G 단백질(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 50 μL 를 취하여 1.5 mL 튜브에 넣고 튜브를 자석에 붙여 상층액을 제거하였다. 그 후 200 μL 의 0.02% Tween 20이 포함된 PBS에 HAV 항체(goat anti-HAV polyclonal antibody, Abcam, Cambridge, UK) 10 μg 을 용해하여 상층액을 제거한 자성비드-결합 G 단백질이 들어있는 1.5 mL 튜브에 넣고 10분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 튜브에 자석을 붙여 상층액을 제거

하고 200 μL 의 0.02% Tween 20이 포함된 PBS로 2회 세척하여 자성비드-결합 G 단백질을 연결한 바이러스 탐침자를 제조하였다. 제조된 바이러스 탐침자가 들어있는 1.5 mL 튜브에 HAV와 HEV가 검출된 돼지분변 상층액 1 mL을 혼합하여 넣고 실온에서 10분 동안 반응하였다. 반응이 끝난 후 자석을 붙여 자성비드-결합 G 단백질에 붙어있는 바이러스 항체와 결합하는 바이러스를 분리하며, 결합하지 못한 바이러스가 포함된 상층액은 nested RT-PCR 분석을 위해 새로운 1.5 mL 튜브에 옮겼다. 항원(바이러스)이 결합된 바이러스 자성 탐침자를 200 μL PBS로 3회 세척하여 불순물을 제거한 후, 100 μL PBS로 부유시켜 새로운 1.5 mL 튜브에 옮겨 상층액을 제거하였다. 새로운 튜브에 있는 G 단백질에 붙어있는 항원-항체 결합체를 20 μL 의 50 mM glycine buffer (pH 2.8)으로 용리하여 분리하고, 최종적으로 pH 7.5가 되도록 93 μL 의 100 mM Tris 용액(pH 7.5)을 첨가하였다. 그리고 HAV의 순수 분리 확인을 위해 nested RT-PCR을 실시하였다(Fig. 1).

바이러스 RNA추출 및 cDNA 합성

1.5 mL tube에 700 μL 의 Trizol-LS (Invitrogen)와 300 μL 의 검체를 가한 후 실온에서 5분간 정치하고, 200 μL chloroform을 가하고 15초간 교반한 후 3분간 정치하였다. 이 후 12,000 \times g로 4 $^\circ\text{C}$ 에서 15분간 원심분리하여 RNA를 포함한 상층액을 취하여 500 μL isopropanol을 가한 후, 실온에서 10분간 정치하여 RNA를 침전시켰다. 이 후 12,000 \times g로 4 $^\circ\text{C}$ 에서 10분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 흰색의 침전물을 75% ethanol 500 μL 로 세척한 후 7,500 \times g로 4 $^\circ\text{C}$ 에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리가 끝난 후, 상층액을 완전히 제거하고 RNase free water 20 μL 로 현탁한다. 이 현탁액을 RT-PCR을 위한 주형으로 사용하였다. cDNA kit (Beams bio., Seongnam, Korea)를 사용하여 37 $^\circ\text{C}$ 에서 60분, 72 $^\circ\text{C}$ 에서 10분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

Table 1. List of primers, sequences, and polymerase chain reaction (PCR) conditions

Primers (target virus)	Sequences (5'-3')	Amplicon size (bp)	PCR conditions
HAV_EX(for HAV)	2949_F: TAT TTG TCT GTC ACA GAA CAA TCA G 3192_R: AGG AGG TGG AAG CAC TTC ATT TGA	267	95°C: 15 min 95°C: 30 s 60°C: 1 min 72°C: 1 min 40 cycles
HAV_IN(for HAV)	dkA24_F: CTT CCT GAG CAT ACT TGA GTC dkA25_R: CCA GAG CTC CAT TGA ACT C	200	95°C: 15 min 94°C: 30 s 50°C: 1 min 72°C: 1 min 40 cycles
HEV_EX(for HEV)	HEV_EX_F: CAT GGT AAA GTG GGT CAG GGT AT HEV_EX_R: AGG GTG CCG GGC TCG CCG GA	383	95°C: 15 min 94°C: 30 s 61°C: 30 s 72°C: 30 s 40 cycles
HEV_IN(for HEV)	HEV_IN_F: GTA TTT CGG CCT GGA GTA AGA C HEV_IN_R: TCA CCG GAG TGY TTC TTC CAG AA	352	95°C: 15 min 94°C: 30 s 61°C: 30 s 72°C: 30 s 35 cycles

간염 A형 바이러스와 간염 E형 바이러스 유전자검출

합성된 cDNA를 이용하여 HAV(VP1-P2A) 및 HEV(RdRp)의 유전자 증폭을 위해 Pre-mix PCR(Bioneer Inc., Seoul, Korea) 튜브에 합성한 cDNA를 1 µL, 10 pmol의 forward와 reverse primer를 각각 1 µL씩 넣고 증류수로 최종 용량이 20 µL가 되게 맞춘 후, Kim 등(16)과 Kim 등(17)의 방법에 따라 HAV primer(2949_F, 3192_R)와 HEV의 primer(HEV_EX_F, HEV_EX_R)를 이용하여 PCR을 실시하였다(Table 1). Nested RT-PCR을 위해 Pre-mix PCR 튜브에 멸균 증류수를 17 µL씩 각각 넣고 반응이 종료된 1차 RT-PCR 산물 1 µL, 10 pmol의 forward와 reverse primer를 1 µL 각각 취하여 완전히 혼합하였다. Nested RT-PCR의 HAV의 primer(dkA24_F, dkA25_R)와 HEV의 primer(HEV_IN_F, HEV_IN_R) 정보와 PCR 반응조건은 각각 Kim 등(16)과 Kim 등(17)에 따라 실시하였다(Table 1). HAV와 HEV의 유전자 증폭여부를 확인하기 위해 1.5% agarose gel로 전기영동을 실시한 후 증폭된 밴드를 image analyzer(Chemidox XRS; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)로 확인하였고, DNA 염기서열분석 후 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)의 BLAST 검색을 통해 유전자 database와 비교하였다.

결과 및 고찰

돼지분변 내 HAV 및 HEV 검출조사

Nested RT-PCR을 이용하여 돼지분변시료 내 식중독 유발 바이러스인 HAV와 HEV의 존재여부를 확인하였다. 돼지 축사 중 3곳에서 각각 2개씩 돼지분변 총 6개 분변시료를 채집하였으며, A 축사의 1개의 분변을 제외한 나머지 5개의 분변에서 HAV가 검출되었고, HEV는 B 축사와 C 축사의 각각 1개의 분변에서 검출되었다(Fig. 2). 육성돈의 분변에서 HAV의 검출율에 대한 보고된 논문이 없어 비교할 수 없었으나, HEV의 검출율은 33.3%이었으며, 이는 이전의 보고된 논문의 검출율(38.0%)과 유사하였으며(17), 염기서열 분석결과 사람에게 전염이 가능한 유전자 III형임을 확인하였다(데이터 생략). 검출된 유전자 III형과 같이 인수

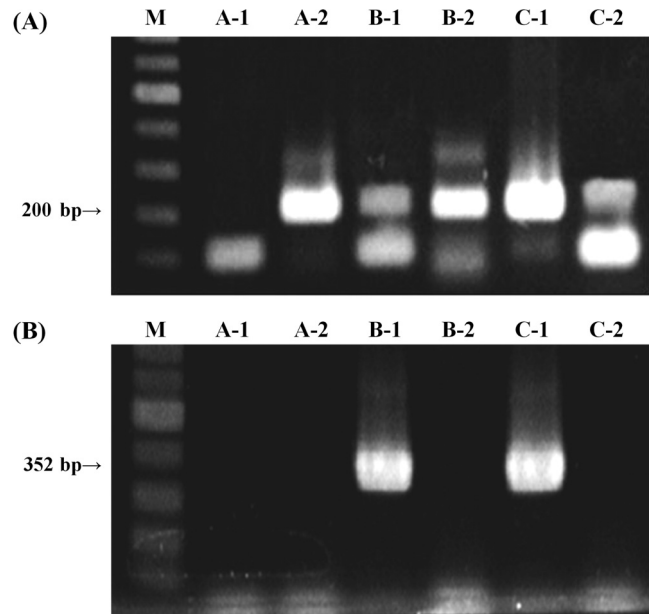


Fig. 2. Detection of hepatitis A and E virus from swine faeces using nested RT-PCR. The amplified gene sizes of VP1-P2A (200bp) and RdRp (352bp) were HAV (A) and HEV (B), respectively. A-1~C-2, fecal samples obtained from three swine local farms A, B, and C, respectively; M, 100 bp marker.

공통전염성을 일으키는 HEV는 발열과 식욕감퇴 및 황달을 동반한 급성간염을 일으키며, 치사율은 1%로 낮으나 임신부의 경우 20%의 치사율로 위험하다(18).

Immunomagnetic separation(IMS)을 이용한 HAV의 순수분리

HAV와 HEV가 모두 존재한 돼지분변 시료가 B-1과 C-1 시료임을 확인한 후(Fig. 2), HAV와 HEV가 모두 검출된 돼지분변에서 HAV만을 순수하게 분리하기 위해 항원에 특이적인 항체와

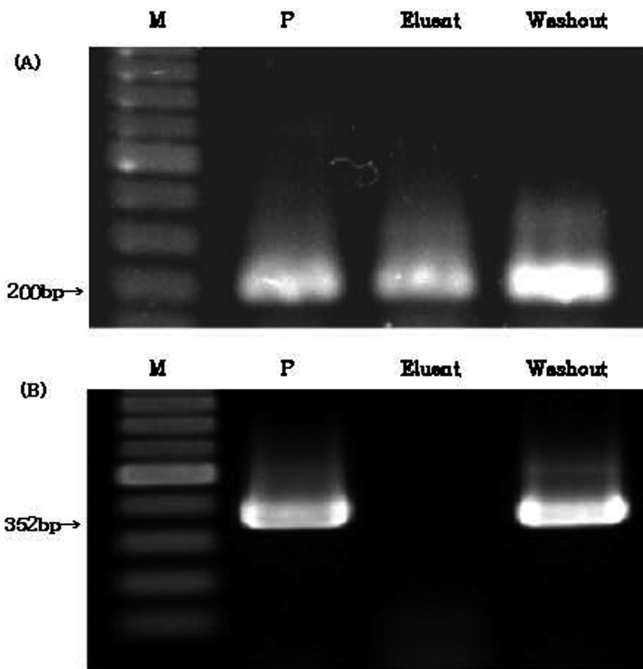


Fig. 3. Specific isolation and detection of hepatitis A virus from fecal samples containing hepatitis A and E virus using immunomagnetic separation (IMS) and nested RT-PCR. P, positive control of amplified HAV gene (VP1-P2A, A) and HEV gene (RdRp, B); Eluent, eluent fraction of the magnetic beads remaining after the washing step; Washout, washout fraction harvested after washing the magnetic beads; M, 100 bp marker.

자성 비드를 사용하여 신속하게 항원을 분리하고 농축시키는 IMS 방법을 Fig. 1의 모식도처럼 수행하였다. 그 결과, HAV 항체가 결합된 자성비드를 PBS buffer로 세척 후 얻은 세척분획물(Washout)과 PBS buffer로 세척 된 자성비드를 glycine buffer(pH 2.8)로 바이러스를 용출시킨 후 Tris 용 (pH 7.5)으로 중화 처리 된 용출분획물(eluent)을 대상으로 nested RT-PCR을 수행한 결과, 200 bp의 HAV 증폭산물이 세척분획과 용출분획에서 모두 검출되었으나(Fig. 3A), 352 bp의 HEV 증폭산물은 세척분획에서만 검출되고 용출분획에서는 검출되지 않았다(Fig. 3B). 이 결과를 통해 노로바이러스와 같은 다른 식중독바이러스를 순수 분리하고자 할 때 분리하고자 하는 바이러스에 특이적인 항체와 IMS 방법을 이용한다면 다수의 바이러스 혼합시료에서 분리하고자 하는 바이러스만을 신속하게 분리할 수 있는 활용성이 있음을 확인하였다.

Immunomagnetic separation를 이용하여 분리한 HAV의 증식
 Fig. 3을 통해 IMS 방법을 이용하면 순수하게 HAV의 분리가 가능하다는 것을 확인하였다. 그러나 IMS 방법에 의해 순수 분리된 용출분획(eluent fraction)내 HAV만이 존재하는지를 nested RT-PCR로 검증하고자, 간염 A형 및 E형 바이러스 배양이 가능한 세포주(PLC/PRF/5)를 활용하여 바이러스 감염 후 증식된 바이러스를 확보하였다. 그 결과 Fig. 4에서 세척과 용출과정을 거친 후 확보한 IMS 유래 용출분획을 접종한 세포배양액에서만 HAV가 검출되었으며(lane 1), 이 증폭된 HAV VP1/P2A의 200 bp에 대한 NCBI의 BLAST search를 통한 유전자 database 비교분석결과 hepatitis A virus(GenBank accession no. M14707)와 99%의 상동성이 있음을 확인하였다(테이터 생략). 그러나 HEV의 유전자(RdRp)는 증폭되지 않았다(lane 2). 또한 HAV(lane 3) 및 HEV primer(lane

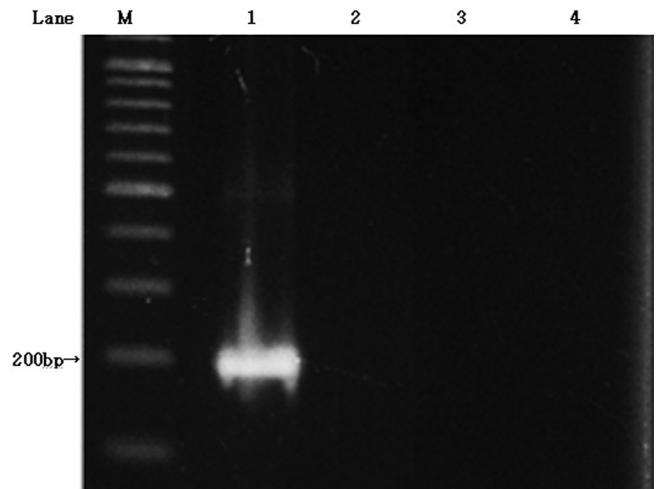


Fig. 4. Detection of hepatitis A virus obtained from cell culture infected with eluent fraction of IMS. Amplified RT-PCR products of virus obtained from cell culture infected with eluent fraction of IMS using HAV primer (Lane 1) and HEV primer (Lane 2); Amplified RT-PCR products from mock-infected cells using HAV primer (Lane 3) and HEV primer (Lane 4); M, 100 bp marker.

4)를 각각 활용하여 nested RT-PCR을 수행 시, 바이러스를 접종하지 않은 음성대조구로서 사용된 세포배양액에서는 바이러스가 불검출 되었다. 본 연구를 통해 IMS 방법은 혼합된 바이러스에서 짧은 시간에 사용자가 원하는 바이러스를 분리하고 배양할 수 있는 기술에 응용될 수 있는 기술이며 다른 식중독바이러스의 신속검출에 응용될 수 있는 장점이 있음을 확인하였다.

요 약

돼지축사에서 채집해온 6개의 육성돈의 분변에서 식중독 유발 바이러스인 HAV와 HEV를 검출하였으며, HAV는 88.3%의 검출율을 보였으며, HEV는 33.3%의 검출율을 보였다. 결과에는 제시하지 않았으나, 염기서열 분석결과 HEV는 사람에게 전염이 가능한 유전자형인 III형이었으며, 실험적으로 사람의 간세포인 PLC/PRF/5에 접종하였을 때 증식이 됨을 확인하였다. 식중독 유발 바이러스인 HAV와 HEV는 오염된 식품이나 물을 섭취하거나 교차오염에 의해 전염이 가능하기 때문에 돼지축사에서 위생상태의 개선뿐만 아니라 육류를 섭취하기 전인 운송 및 가공과정까지 식중독 유발 바이러스에 의한 교차오염을 막는 노력이 필요하다.

HAV와 HEV 모두 검출된 분변에서 HAV를 순수분리하고 빠르게 검출하기 위해 IMS-RT-PCR을 적용하였으며, 항원-항체 반응에 의해 순수하게 HAV만을 분리할 수 있었다. 또한 HAV만이 순수분리 되었는지 재확인하기위해 세포감염을 통해 증식된 바이러스를 확보한 후 nested RT-PCR을 수행한 결과, HAV만을 순수 분리할 수 있음을 확인하였다. 이는 IMS 활용기술이 단순히 항체를 교체함으로써 다른 특정 식중독 유발 바이러스의 다양한 시료에서 바이러스 순수분리 및 검출에 활용 가능성이 있음을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ008407)의 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Jung YK, Kim JH. Epidemiology and clinical features of acute hepatitis A: from the domestic perspective. *Korean J. Hepatol.* 15: 438-445 (2009)
2. Rodriguez-Manzano J, Miagostovich M, Hundesa A, Clemente-Casares P, Carratala A, Buti M, Jardi R, Girones R. Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in eastern Spain by testing urban sewage samples. *J. Water Health* 8: 346-354 (2010)
3. Hollinger FB, Emerson SU. Hepatitis A virus. Vol. 1, pp. 799-840. In: *Fields Virology*. Knipe DM, Howley PM (eds). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA (2001)
4. Provost PJ, Ittensohn OL, Villarejos VM, Arguedas JA, Hilleman MR. Etiologic relationship of marmoset-propagated CR326 hepatitis A virus to hepatitis in man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142: 1257-1267 (1973)
5. Rakela J, Fay OH, Stevenson D, Gordon I, Mosley JW. Similarities of two hepatitis A virus strains. *Bull. World Health Organ.* 54: 561-564 (1976)
6. Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang C, Bradley DW, Fry KE, Reyes GR. Hepatitis E virus(HEV): Molecular cloning and sequence of the full-length viral genome. *Virology* 185: 120-130 (1991)
7. Takahashi M, Kusakai S, Mizuo H, Suzuki K, Fujimura K, Masuko K, Sugai Y, Aikawa T, Nishizawa T, Okamoto H. Simultaneous detection of immunoglobulin A(IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus(HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J. Clin. Microbiol.* 43: 49 - 56 (2005)
8. Lu L, Li C, Hagedorn CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: Genetic diversity, subtypes, and zoonosis. *Rev. Med. Virol.* 16: 5-36 (2006)
9. Okamoto H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res.* 127: 216-228 (2007)
10. Lewis HC, Wichmann O, Duizer E. Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: A systematic review. *Epidemiol. Infect.* 138: 145-166 (2010)
11. Meng XJ. Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet. Microbiol.* 140: 256-265 (2010)
12. Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T. Features of hepatitis E virus infection in Japan. *Internal. Med.* 42: 1065-1071 (2003)
13. Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J. Hepatol.* 48: 494-503 (2008)
14. Tanaka T, Takahashi M, Kusano E, Okamoto H. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for hepatitis E virus. *J. Gen. Virol.* 88: 903-911 (2007)
15. Monceyron C, Grinde B. Detection of hepatitis A virus in clinical and environmental samples by immunomagnetic separation and PCR. *J. Virol. Methods* 46: 157 - 166 (1994)
16. Kim DW, Kim SR, Kwon KS, Lee JW, Oh MJ. Detection of hepatitis A virus from oyster by nested PCR using efficient extraction and concentration method. *J. Microbiol.* 46: 436-440 (2008)
17. Kim SE, Kim MY, Kim DG, Song YJ, Jeong HJ, Lee SW, Lee JB, Park SY, Song CS, Oh SJ, Yoo HS, Choi IS. Determination of fecal shedding rates and genotypes of swine hepatitis E virus(HEV) in Korea. *J. Vet. Med. Sci.* 70: 1367-1371 (2008)
18. Emerson SU, Purcell RH. Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.* 13: 145-154 (2003)