

## Enzymatic RNA amplification과 non-radioactive labeled nucleic acid hybridization 기법을 이용한 enterovirus의 검색

울산대학교 의과대학 미생물학교실  
김 은 순 · 조 영 결 · 김 유 겸

=Abstract=

### The Detection of Enteroviruses using Enzymatic RNA Amplification and Non-radioactive Labeled Nucleic Acid Hybridization Techniques

Eun Soon Kim, Young Keol Cho, and Yoo Kyum Kim

Department of Microbiology, University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical Center

The human enteroviruses (EVs) are responsible for various infections ranging in severity from asymptomatic to fatal. Since the clinical diagnosis of EV infection is complicated by the nonspecific nature of the clinical manifestations, accurate and rapid microbiological diagnosis of EV infection is very important for the management of patients.

This report describes polymerase chain reaction (PCR) and non-radioactive labeled nucleic acid hybridization techniques by which the enteroviral RNA can be amplified to a detectable level. The primer pair, derived from the highly conserved part of the 5'-noncoding region of the enteroviral genome, was selected in an effort to detect many different serotypes of EVs. After optimal conditions for PCR was determined, coxsackievirus B type 3 was detected at the level of  $1 \times 10^3$  50% tissue culture infective doses (TCID<sub>50</sub>). Our results demonstrate the applicability of PCR technique for the detection of enteroviral RNA from the clinical specimens.

Key words: Enterovirus, Diagnosis, Polymerase chain reaction, Nucleic acid hybridization

#### I. 서 론

Enterovirus는 rhinovirus, cardiovirus 및 aphthovirus와 함께 picornavirus family에 속하는 single-stranded RNA virus이다. Enterovirus genus는 poliovirus(types 1-3), coxsackievirus A(types A1-A22, A24), coxsackievirus B(types B1-B6), echovirus(types 1-9, 11-27, 29-33), enterovirus

(types 68-72) 등 70 종에 가까운 serotype을 포함하고 있다.

Enterovirus 감염은 무증상적인 경우가 대부분이나 myocarditis, meningitis 및 encephalitis 등 임상적으로 중요한 질병을 일으킬 수 있다<sup>1</sup>. 또한 enterovirus에 의한 질환과 다른 바이러스나 박테리아에 의한 질환을 구분하는 것은 환자의 예후, 치료 및 역학적인 측면에서 중요하다고 할 수 있다.

이러한 enterovirus 감염의 진단을 위하여 다른 바이러스 질환의 미생물학적인 진단 방법으로 많이 쓰이는 세포배양법이나 혈청학적인 방법의 적용은 양성검증을 위한 소요시간의 장기화, enterovirus에 susceptible한 세포의 지속적 공급의 어려움과 다양한 serotype에 따른 기술적 문제 등의 이유로 많은 어려움을 내포하고 있다. 따라서 상술한 문제점을 해결하기 위한 방편으로 분자생물학적인 방법을 이용한 enterovirus 감염을 검증할 수 있는 진단기술의 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

분자생물학적 연구에 의하면 enteroviral genome은 coxsackievirus의 경우 약 7400 base로 구성되어 있으며<sup>2-4</sup>, coxsackievirus B type 4의 경우 5' terminus에서 743 번째 nucleotide까지는 non-coding region이며 744번째 nucleotide부터 7293번째 nucleotide까지 translation을 하게 된다고 알려져 있다<sup>2</sup>. 최근 수종의 enterovirus에 대한 nucleotide sequence 연구가 활발히 진행되어 혈청학적으로 서로 다른 enterovirus의 genome을 비교 관찰할 수 있어서 enterovirus의 항원성 및 병원성을 규명하는 좋은 자료를 제공하고 있다. 즉 non-coding region인 5' terminus 부근에서 sequence homology를 발견하였으며, 이 conserved region은 enteroviral RNA secondary structure를 결정하는 중요한 요소가 되는 것으로 밝혀졌다<sup>5-6</sup>. 따라서 이 sequence homology를 이용하면, 한 종류의 primer를 사용한 PCR 기법으로 다양한 serotype이 존재하는 enterovirus를 동시에 검증할 수 있을 것이다.

본 연구는 PCR과 non-radioactive labeled nucleic acid hybridization 기법을 이용하여 신속하고도 정확한 enterovirus 감염의 분자생물학적 진단기술 개발 가능성을 조사하고자 하였다.

## II. 실험방법 및 재료

### 1. Viruses

American Type Culture Collection(Rockville, Md)에서 구입한 coxsackievirus B type 3(CB3, ATCC VR-30)를 vero cell(ATCC CCL 81) monolayer culture 기법을 사용하여 증식시켰다. 간략하게 바이러스 배양 및 분리 과정을 설명하면, minimum essen-

tial medium(MEM)에서 증식한 vero cell의 monolayer에 CB3를 배양하여 cytopathic effect(CPE)가 3+ 이상 관찰되었을 때 freeze, thaw 과정과 원심분리(1000 × g, 5분) 과정을 거쳐 cell debris를 제거한다. 이후 상층액을 90 Ti rotor를 사용하여 2.5 시간 동안 4°C에서 초고속원심분리(Beckman, 252,000 × g)한 후 CB3를 분리하였으며 -70°C에 저장하였다가 필요에 따라 사용하였다.

### 2. Extraction of enteroviral RNA from virion particles

분리된 CB3를 proteinase K(200ug/ml; Promega)와 sodium dodecyl sulfate(SDS, 0.5%; Sigma)로 처리한 후 phenol:chloroform:isoamylalcohol(25:24:1)을 이용하여 enteroviral RNA를 추출하였다. 이후 5 M ammonium acetate로 침전시켜 ethanol 세척과정을 거쳐 Diethylpyrocarbonate(DEPC)-treated sterile distilled water에 용해하여 -70°C에 보관 후 필요에 따라 사용하였다<sup>7</sup>.

때로는 RNazol B™ (Cinna/Biotech, Texas)를 이용하여 enteroviral RNA를 추출하였다. 실험과정을 간략하게 소개하면, 검체당 RNasin(Promega, USA) 40 U, RNazol B 500ul에 chloroform이 10% 되게 첨가하고 약 15초간 흔들어 섞은 후 원심분리(12,000 × g, 15분)하여 RNA를 추출한다. 이후 isopropanol과 yeast tRNA를 이용하여 enteroviral RNA를 침전시킨 다음 75% ethanol로 세척하여 사용하였다.

### 3. Enterovirus titration

우선 CB3를 serial dilution 한 후, 각 diluent 별로 vero cell이 1 × 10<sup>6</sup> cells/ml 부착되어 있는 well에 분주한다. 이 후 37°C에 4-7일간 배양하여 역상현미경으로 CPE를 관찰하여 50% tissue culture infective doses(TCID<sub>50</sub>)를 결정하였다<sup>8</sup>.

### 4. Preparation of primer and probe

DNA synthesizer(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 길이 20 base의 primer를 합성하여 사용하였다. 실험에 사용한 primer와 probe의 염기서열은 figure 1과 같다. Primer는 enterovirus의 conserved region인 5'-noncoding 부위에서 선택하였다.

### 5. Enzymatic amplification of enteroviral RNA

AMV reverse transcriptase(5U/ul; Promega), reverse transcriptase buffer(Promega), dNTP mixture (0.5 mM), downstream primer(50 pmol)를 enteroviral genome과 혼합하여 42°C에서 60분간 반응시켜 cDNA를 생성하였다. 이 reverse transcriptase reaction의 mixture에 다음과 같은 reagents를 추가하여 polymerase chain reaction 과정을 행하였다; PCR buffer(50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 0.2 mM dNTP(각각의 dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pmol/ul primers, 5U/ul Taq polymerase. PCR의 조건은, 94°C에서 1분간, 50°C에서 50초간, 72°C에서 1분간으로 총 30회 반응시키고, 최종적으로 72°C에서 10분 동안 primer extension 시켰다.

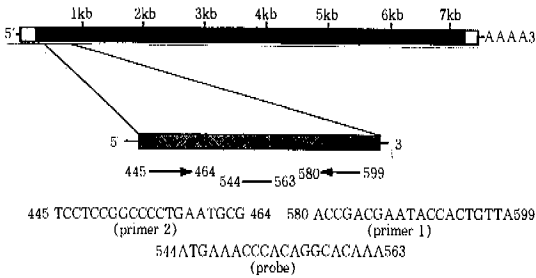


Figure 1. Schematic representation of the location and sequences of primers and probe in relation to the full-length genomes of the enterovirus.

### 6. Agarose gel electrophoresis and Southern blots

10 ul의 PCR reaction mixture를 3% agarose gel을 사용하여 전기영동 한 후 ethidium bromide를 이용하여 염색하여 관찰하였다. 이 후 Southern blotting을 시행하기 위하여 denaturation solution(0.4 M NaOH, 0.6 M NaCl)과 neutralization solution(1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl)에 gel을 넣어 30분씩 각각 반응시킨 후 transfer solution(10x SSC; 1.5 M NaCl, 0.15 M sodium citrate)에서 30분 동안 흔들어 준 후 nylon membrane(Boehringer Mannheim Biochemicals)에 transfer하였다. 이 후 DNA synthesizer(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 합성한 probe와 DIG Luminescent Detection kit(Boehringer Mannheim Biochemicals Germany)를 제조회사의 지시에 따라 사용하여 실험을 시행하였다.

## III. 결 과

### 1. 155 bp DNA segment 관찰

PCR의 적정 조건을 검색하기 위하여 다양한 농도의 Taq polymerase와 MgCl<sub>2</sub>를 사용한 결과, Taq polymerase는 1-5 unit에서(fig 2), MgCl<sub>2</sub>는 1.5 mM (data not shown)에서 원하는 band를 관찰할 수 있었다.

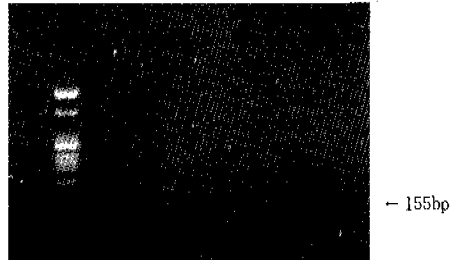


Figure 2. Gel electrophoresis of the PCR products of coxsackievirus B3. Lane 1, size marker(pBR 322 x Hinf 1); lane 2, negative control; lane 3 to 6, 0.5, 1, 2.5, 5 Units of Taq polymerase, respectively.

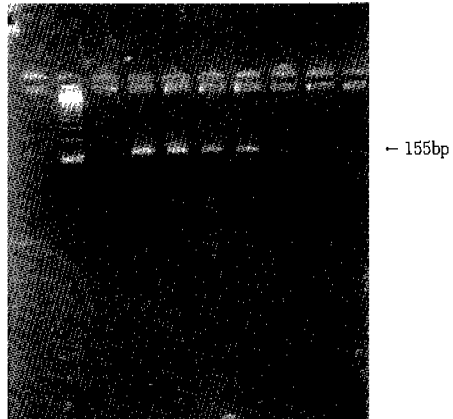


Figure 3. Gel electrophoresis of the PCR products of different TCID<sub>50</sub> of CB3. Lane 2, size marker (123 bp DNA ladder, BRL); lane 3, negative control; lane 4 to 8, 1.6 x 10<sup>4</sup>, 8 x 10<sup>3</sup>, 4 x 10<sup>3</sup>, 2 x 10<sup>3</sup>, 1 x 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>, respectively.

실험에 사용한 primer는 염기서열 445에서 599 번째까지를 증폭할 수 있으므로 정상적으로 증폭된 DNA segment의 크기는 155 bp일 것이다.

#### IV. 고 찰

PCR의 민감도를 측정하기 위하여 TCID<sub>50</sub> titer를 알고 있는 viral stock을 사용하여 serial dilution 하여 reverse transcription reaction 후 PCR을 시행한 결과, Figure 3에서 관찰되듯이 TCID<sub>50</sub> 10<sup>3</sup> 부터 1.6 x 10<sup>4</sup>까지 기대되는 155 bp의 band를 검출할 수 있었다.

#### 2. Detection of specific genotypes following amplification

전기영동에 의해 관찰된 155 bp의 DNA segment가 CB3에서 유래된 것인지를 확증하기 위하여 nonradioactive probe를 사용하여 Southern blotting을 시행한 결과 1 x 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub> 에서 양성반응을 관찰할 수 있었다(fig 4).

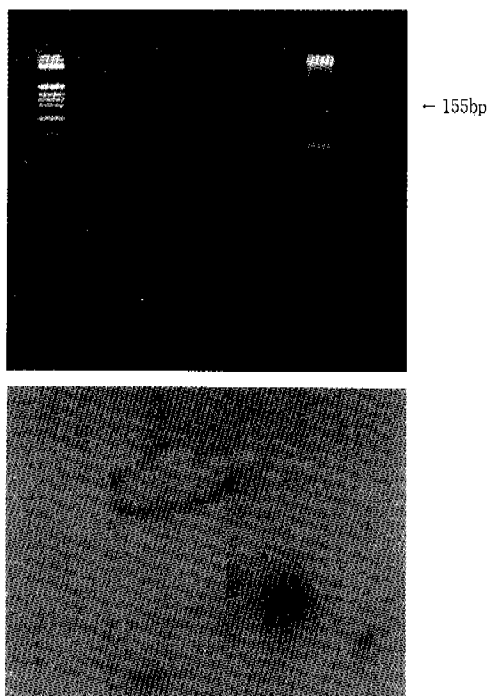


Figure 4. (A) Gel electrophoresis of the PCR products of CB3. Lane 1 & 9, size marker(123 bp DNA ladder, BRL); lane 2 & 8, negative control; lane 3 to 7, 0.625 X 10<sup>2</sup>, 1.25 x 10<sup>2</sup>, 2.5 x 10<sup>2</sup>, 5 x 10<sup>2</sup>, 1 x 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>, respectively. (B) Autoradiogram of the Southern blot of the same gel shown in panel A hybridized with DIG-labeled probe.

Enterovirus 감염에 의한 임상 병변으로는 meningitis(35%), respiratory diseases(25%), encephalitis(11%), nonspecific febrile illness(6%), rash(4%), carditis(2%), paralytic diseases(1%), 기타(22%) 등이 보고되어 있다<sup>9</sup>.

현재 전세계적으로 poliovirus 감염에 대한 효과적 예방에 의해 poliovirus에 의한 병변은 드물지만 다른 enterovirus에 의한 감염은 아직도 임상적으로 중요한 위치를 차지하고 있다. 특히 중추 신경계의 병변은 임상적으로 문제가 되는 enterovirus 감염이다.

Enterovirus 감염의 미생물학적 진단 방법의 개발은 불필요한 항생제의 사용 및 진단 검사의 방지를 통해 환자의 치유에 도움을 줄 수 있을 것이다. 또한 enterovirus의 outbreak를 예측함으로써 유사한 증상의 환자 발생시 신속히 대처할 수 있을 것이다.

현재 많이 사용되고 있는 enterovirus의 진단 방법으로는 세포배양술에 의한 바이러스의 검출 방법이 있다. 가장 고식적 방법인 세포배양술에 의한 enterovirus의 검출은 민감도와 특이도가 비교적 높은 것으로 알려져 있으며, 바이러스 감염진단의 gold standard로 여겨지고 있다. 그러나 enterovirus 검출의 경우 여러 종류의 세포 배양을 하여야만 민감도를 높일 수 있다. 실제로 한 연구논문에 의하면 4종의 세포 배양법을 사용시 2종의 세포 배양법을 사용하였을 때 보다 enterovirus의 분리 동정을 18% 증가시킬 수 있었다<sup>10</sup>. 따라서 enterovirus의 효과적 분리 동정을 위해서는 여러 종류의 세포 배양이 필요하다는 어려움이 있다. 또한 임상적으로 문제가 되는 enteroviral meningitis 경우 세포 배양술에 의한 뇌척수액에서의 enterovirus 검출은 43-77%에 불과하다<sup>11</sup>.

이외에 다른 종류의 바이러스 감염의 진단과는 다르게 enterovirus의 혈청학적 방법에 의한 진단은 극히 제한적이다. 즉 enterovirus genus는 poliovirus, coxsackievirus A, coxsackievirus B, echovirus, enterovirus등 70종에 가까운 serotype을 포함하고 있어 혈청학적 방법을 시행하기에는 group-specific 항원을 발견하기 전에는 현실적으로 불가능하다.

따라서 PCR과 nucleic acid hybridization 기법을

이용한 enterovirus의 미생물학적 진단 방법의 개발이 현재 활발히 연구되고 있다. 이러한 분자생물학적인 기법의 개발에 있어 염두에 두어야 할 사항은 enteroviral meningitis 환자에서 수거한 임상가검물에 존재하는 enterovirus의 양을 측정할 연구 보고에 의하면 뇌척수액에는 약 10-1000 TCID<sub>50</sub> 만이 존재한다는 사실이다<sup>12</sup>. 즉 enterovirus의 검증을 위하여서는 민감도가 뛰어난 기법을 사용하여야 할 것이다. 예를 들어 nucleic acid hybridization 기법으로 enterovirus를 검출하기 위해서는 10<sup>2</sup>-10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>가 필요하다. 따라서 nucleic acid probe를 사용한 뇌척수액에서의 enterovirus 검출은 민감도가 낮은 것으로 현재 알려져 있다<sup>13-16</sup>. 따라서 이러한 기법은 많은 meningitis의 환자에서 위음성 결과를 내게 되므로 실용화 가능성이 적다고 할 수 있을 것이다.

PCR을 이용한 본 실험에서는 1 x 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>까지 enteroviral RNA를 검출할 수 있었다. 즉 기존의 nucleic acid hybridization 기법보다는 10-100배 민감도가 높았다. 그러나 enterovirus가 10-1000 TCID<sub>50</sub>만 존재하는 enteroviral meningitis 환자의 임상가검물에서 enteroviral RNA를 검출하기에는 아직 민감도가 낮다고 할 수 있다.

이러한 문제점을 해결하기 위하여서는 임상가검물에서의 enteroviral RNA 추출을 극대화하거나 enzymatic RNA amplification 후 non-radioactive 또는 radioactive probe를 사용하여 민감도를 높이는 방법의 개발이 필수적이라 할 수 있을 것이다.

DIG이 부착한 probe를 사용한 본 연구에서는 아직 만족할 만한 민감도를 얻지 못하였으나 이는 Southern blotting의 적정 조건을 결정하지 못한 데 기인한다고 추측된다. DIG을 이용한 nucleic acid hybridization 기법을 적정 조건에서 사용하면 민감도가 약 10배 증가할 것으로 기대된다. 즉 100 TCID<sub>50</sub> 정도까지 민감도를 높일 수 있을 것이다.

결론적으로, enzymatic RNA amplification 기법을 사용하여 1 x 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub> 까지 enteroviral RNA를 검출할 수 있었으며, DIG-labeled probe를 사용하여 이를 확증할 수 있었다.

참고문헌

1. Melnick JL : Enterovirus. In virology. (ed.Fields B), New York, Raven Press, 1990;549-605.
2. Jenkins O, Booth JD, Minor PD, and Almond JW : The complete nucleotide sequence of coxsackievirus B4 and its comparison to other members of the picornaviridae. J Gen Virol 1987; 68:1835-1848.
3. Racaniello VR and Baltimore D : Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. Proc Natl Acad Sci 1981;78:4887-4891.
4. Ilzuka N, Kuge S, and Nomoto A : Complete nucleotide sequence of the genome of coxsackievirus B1. Virology 1987;156:64-73.
5. Tracy S : Comparison of genomic homologies in the coxsackievirus B group by use of cDNA: RNA dot-blot hybridization. J Clin Microbiol 1985;21:371-374.
6. Toyoda H, Kohara M, Kataoka Y, et al. : Complete nucleotide sequences of all three poliovirus serotype genomes: implication for genetic relationship, gene function and antigenic determinants. J Mol Biol 1984;174:561-585.
7. Lindberg AM, Stalhandske POK, and Pettersson U : Genome of coxsackievirus B3. Virology 1987;156:50-63.
8. Prather SL, Dagan R, Jenista JA, and Menegus MA : The isolation of enteroviruses from blood: a comparison of four processing methods. J Med Virol 1984;14:221-227.
9. Grist NR, Bell EJ, and Assaad F : Enteroviruses in human disease. Prog Med Virol 1978;24:114-157.
10. Dagan R and Menegus MA : A combination of four cell types for rapid detection of enteroviruses in clinical specimens. J Med Virol 1986;19:219-228.
11. Chonmaitree T, Baldwin CD, and Lucia HL : Role of the virology laboratory in diagnosis and management of patients with central nervous system disease. Clin Microbiol Rev 1989; 2:1-

- 14.
12. Wilfert CM, Lehrman SN, and Katz SL : Enteroviruses and meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 1983;2:333–341.
13. Rotbart HA, Levin MJ, and Villarreal LP: Use of subgenomic poliovirus DNA hybridization probes to detect the major subgroups of enteroviruses. *J Clin Microbiol* 1984;20:1105–1108.
14. Rotbart HA, Levin MJ, Villarreal LP, Tracy SM, Semler BL, and Wimmer E : Factors affecting the detection of enteroviruses in cerebrospinal fluid with coxsackievirus B3 and poliovirus 1 cDNA probes. *J Clin Microbiol* 1985;22:220–224.
15. Hyypia T, Stalhandske P, Vainionpaa R, and Pettersson U : Detection of enteroviruses by spot hybridization. *J Clin Microbiol* 1984;19:436–438.
16. Tracy S and Latham A : Rapid identification of coxsackie B viruses after immunoprecipitation and nucleic acid hybridization. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1986;4:327–333.