

## Development of RT-PCR Method to Detect Various Human Enteric Viruses

Sung Ae Oh<sup>1</sup>, Mi Suk Kim<sup>2</sup>, So Young Jang<sup>2</sup>, Sang Jong Kim<sup>3</sup>, Jae In Lee<sup>4</sup>,  
Gyu Cheol Lee<sup>5</sup> and Chan Hee Lee<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioinformation Technique, Chungbuk National University Cheongju,

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju,

<sup>3</sup>School of Life Science, Seoul National University, Seoul, <sup>4</sup>Research Institute of Public Health & Environment, Seoul and <sup>5</sup>Water Analysis and Research Center, K-water, Daejeon, Korea

Human enteric viruses are one of the major causes of acute gastroenteritis outbreaks. A rapid and precise detection of virus is critical for prompt diagnosis. For this purpose, nucleic acid-based techniques such as reverse transcription (RT)-PCR have been developed. Although RT-PCR is a rapid, specific and sensitive method to detect virus, many steps or reactions are required, especially when various types of viruses are targeted. In this study, we developed a quick and effective method to detect human enteric viruses with a few reactions. Our candidate viruses were as follows: one DNA virus (adenovirus: AdV) and seven RNA viruses including poliovirus (PV), coxsackievirus A (CoxA) and B (CoxB), human rotavirus (HRV), hepatitis A virus (HAV), norovirus (NorV), and astrovirus (AstV). With this amount of samples, theoretically, a total of fifteen biomolecular reactions have to be performed, which include seven RT reactions and eight subsequent PCR with specific primers in each case. Specific primers, enterovirus universal primers, and random primers were applied independently to compare the outcomes of RT and PCR steps in each viral sample. We found that random 9-mer is ideal for the RT reactions of RNA viruses with negligible differences in sensitivity and specificity of viral detection except HRV. Hence, HRV cDNA generated by HRV-specific primer and AdV DNA were amplified in a single tube by duplex PCR. The cDNAs generated by RT using random 9-mers were divided into two reaction tubes without losing sensitivity: one duplex PCR detects enteroviruses (PV, CoxA, CoxB) and HAV, the other detects NorV and AstV. In conclusion, it is possible to detect eight enteric viruses with a substantially reduced number of reactions, which are composed of five reactions, two RT and three PCR reactions.

**Key Words:** Enteric viruses, RT, PCR, Multiplex

### 서 론

매년 약 15억명 정도의 사람이 심한 장관염에 의한 설사증을 앓고 있고 이로 인해 광범위한 공중의 건강상

문제가 대두되고 있다 (1). 설사증은 세계적인 전염병성 죽음의 세 번째 주요 원인으로 알려져 있으며, 이로 인해 매년 180만명 정도의 5세 이하 어린이가 사망하고 있다 (2, 3). 이러한 설사증은 세균, 원생동물, 그리고 바이러스에 의해 발생하며, 그중에서 바이러스성 병원체로는 엔테로바이러스 (enterovirus), 로타바이러스 (rotavirus), 노로바이러스 (norovirus), 아스트로바이러스 (astrovirus), 그리고 아데노바이러스 (adenovirus) 등이 있고, 이들을 통칭하여 장바이러스 (enteric viruses)라고 한다 (3, 4). 우리나라의 경우 2003년 3월부터 2007년 6월까지 40개월간 서울 지역 병·의원에서 급성장관염으로 의심되는 환자의 분변가검물을 총 6,788건 조사한 결과, 그 중 43.5%인

Received: January 28, 2009/ Revised: February 19, 2009/

Accepted: February 24, 2009

\*Corresponding author: Chan Hee Lee. 410 Seongbong-Ro, Heungduk-Gu, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea Department of Microbiology, Chungbuk National University.

Phone: +82-43-261-2304, Fax: +82-43-273-2451

e-mail: chlee@cbu.ac.kr

\*\*This work was supported by the Korea Research Foundation Grant funded by the Korean Government (MOEHRD, Basic Research Promotion Fund) (KRF-2006-C00680).

2,955건에서 바이러스가 검출됨으로서 세균에 의한 급성 장관염 (1,389건)에 비해 약 두 배 이상이 바이러스에 의한 장관염이었던 것으로 보고된 바 있다 (5). 바이러스 중에는 로타바이러스가 가장 많이 검출되었지만, 최근 들어 노로바이러스의 검출이 급증하여 현재는 모든 감염성 장관염의 최대 원인이 노로바이러스인 것으로 알려져 있다.

장바이러스들은 주로 오염된 물과 식품에 의해 매개되는데, 물의 경우 오염된 상수원을 적절한 수처리를 거치지 않고 그대로 음용할 경우, 식품의 경우 배설물이나 재래식 분뇨 비료 등에 의해 오염된 식품 또는 오염된 물을 이용하여 씻은 과일을 먹을 경우, 그리고 감염된 조리사에 의해 조리된 식품 등을 섭취할 경우 바이러스성 장관염에 걸릴 수 있다 (6). 장바이러스에 감염되면 구토, 설사, 복통 등의 임상증상을 동반하며 (7), 주로 성인보다는 어린이나 노인 등 면역체계가 약한 사람들에게 치명적일 수 있다 (8~11). 특히 바이러스는 낮은 개체수가 인체에 감염하여도 심각한 급성 질병을 일으킬 수 있으므로 매우 위험하다 (12).

장바이러스의 진단방법으로 전자현미경법, 세포배양법, 항원검출기법, 분자생물학기법 등 다양한 방법이 알려져 있으나 (4), 전자현미경법은 숙련된 실험자와 비싼 장비가 필요하다는 단점이 있으며 (13), 세포배양법은 시간이 오래 소요되고 숙련된 실험자를 필요로 하며, 일부 바이러스의 경우 아직까지 배양조건을 정립하지 못해 분석이 불가능한 경우도 있다 (4). Enzyme-linked immunosorbent assay, immunofluorescence assay, 그리고 immunochromatography 등의 항원검출법은 비교적 빠르고 간단한 방법으로 알려져 있고, 특히 immunochromatography의 경우 임상에서 널리 사용되고 있으나 polymerase chain reaction (PCR) 등의 분자생물학적 방법에 비해 다소 감도가 낮다는 단점이 있다 (14). PCR 등의 분자생물학적 기법은 앞서 언급한 것처럼 항원검출법에 비해 비교적 높은 민감도를 갖고 있으며, 동시에 여러 시료를 분석할 수 있고, 아울러 바이러스의 유전형까지도 분석이 가능하다는 장점이 있다. 그러나 PCR법의 경우 장바이러스처럼 많은 종류의 바이러스를 검출할 필요가 있을 경우 보다 많은 프라이머 (primers)와 추가적인 PCR 단계가 필요하여 분석비용이 증가하고 분석시간이 더 길어진다는 단점이 있다.

이에 본 연구에서는 다양한 종류의 장바이러스들을

보다 빠르고 효과적으로 검출하기 위해 역전사 (reverse transcription, RT) 과정의 수를 줄이고, 다중 PCR (multiplex PCR) 방법을 개발함으로써 보다 빠르고 민감하게 여러 종류의 장바이러스를 검출할 수 있는 방법을 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 바이러스

DNA 장바이러스로는 아데노바이러스 41형 [adenovirus type 41, AdV, strain Dugan, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA]을 사용하였으며, RNA 장바이러스로는 아스트로바이러스 (astrovirus, AstV, 임상분리주), 콕사키바이러스 A9 (coxsackievirus A9, CoxA, strain Bozek, ATCC), 콕사키바이러스 B5 (coxsackievirus B5, CoxB, strain Faulkner, ATCC), A형 간염바이러스 (hepatitis A virus, HAV, 백신주), 사람로타바이러스 (human rotavirus, HRV, 충북대 강신영 교수 제공), 노로바이러스 (norovirus GII, NorV, 임상분리주), 그리고 폴리오바이러스 (poliovirus, PV, Sabin 백신주)를 사용하였다. 이들 장바이러스 외에도 대조군으로 에코바이러스 3 (echovirus 3, EcV, strain Morrissey, ATCC), B형 간염바이러스 (hepatitis B virus, HBV, 임상분리주), 홍역바이러스 (measles virus, MV, strain Edmonston, ATCC), 그리고 볼거리바이러스 (mumps virus, MuV, strain Enders, ATCC)를 사용하였다.

### 바이러스 DNA 및 RNA 추출

AdV와 HBV의 DNA를 추출하기 위해 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하였으며 제조사에서 제공하는 실험방법을 따랐다. 간단히 요약하면, 20 µl의 protease K를 1.5 ml 튜브에 넣고 여기에 200 µl의 시료를 넣은 후 AL buffer 200 µl를 첨가하여 15초간 섞고 56°C에서 10분간 반응시켰다. 100% 에탄올 200 µl를 첨가한 후 15초간 섞은 후 혼합액을 QIAamp spin column에 넣고 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 여과액을 버린 후 AW1 buffer 500 µl를 첨가하여 위와 같은 방법으로 원심분리하여 여과액을 버리고, AW2 buffer 500 µl를 첨가한 후 14,000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 새 1.5 ml 튜브에 column을 옮기고 AE buffer 200 µl를 넣고 1분간 실온에 방치한 후 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 DNA를 추출하였다.

NorV를 제외한 RNA 바이러스의 RNA 추출은 QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)를 사용하였다. 시료 140 µl에 AVL buffer 560 µl를 넣고 섞은 후 상온에서 10분간 방치하였다. 100% 에탄올 560 µl를 넣고 15초간 섞은 후 용액 중 630 µl를 QIAamp spin column에 담고 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. AW1 buffer 500 µl를 넣고 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 여과액을 버린 후 AW2 buffer 500 µl를 넣고 14,000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 마지막으로 QIAamp spin column을 새 1.5 ml 튜브로 옮긴 후 AVE buffer 60 µl를 넣고 실온에서 1분간 반응시키고 나서 8,000 rpm의 속도로 1분간 원심분리하여 RNA를 얻었다. RNA를 실험에 즉시 사용하지 않을 경우 -70℃에 보관하였다가 실험에 사용하였다.

분변으로부터 분리한 노로바이러스의 RNA는 Easy-RED Total RNA Extraction kit (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)를 사용하여 추출하였다. 시료 200 µl를 1.5 ml 튜브에 넣은 후 Easy-RED solution 750 µl를 넣고 15초간 섞은 후 실온에서 5분간 방치하고, chloroform 용액 200 µl를 넣고 15초간 섞은 후 실온에서 5분간 방치한 후 4℃, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상층액 450 µl를 1.5 ml 튜브로 옮긴 후 P-buffer (0.8 M sodium citrate, 1.2 M NaCl) 250 µl를 넣고, 2-propanol 250 µl를 넣은 후 튜브를 5~6번 가볍게 흔들어 준 후 실온에서 10분간 방치하였다. 다시 4℃, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 70% 에탄올 1 ml를 넣어 4~5번 가볍게 흔들어 준 후, 4℃, 1,300 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 조심스럽게 상층액을 제거한 뒤 5분간 실온에서 방치하고 RNA 분해효소가 없는 증류수 50 µl를 넣어 실험에 사용할 때까지 -70℃에 보관하였다.

#### 역전사반응 (reverse transcription, RT)

바이러스의 RNA로부터 Sensiscript RT Kit (QIAGEN)를 사용하여 RT를 수행하여 cDNA를 얻었다. RT 반응은 10 × Buffer RT 2 µl, dNTP (각 5 mM) 2 µl, 10 pmole primer 쌍을 각각 2 µl, RNase inhibitor (10 units/µl) 1 µl, reverse transcriptase 1 µl, 추출한 RNA 용액 5 µl를 넣고 RNase-free water를 넣어 최종적으로 20 µl가 되도록 하여 37℃ 1시간, 94℃ 3분간 반응시켰다. HRV는 추출한 RNA 용액 5 µl와 10 pmole primer 쌍을 각각 2 µl 넣은 후 97℃ 5분, 70℃ 5분, 4℃ 2분 동안 선 반응 시킨 후 위의 조건과 동일하게 나머지 반응 용액을 섞어준 후 37℃ 1시간,

94℃ 3분간 RT를 수행하였다.

#### 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)

RT 반응 결과 생성된 cDNA를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응의 용액조성은 10 × Buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, Enhancer solution) 5 µl, 10 mM dNTPs (각 2.5 mM) 4 µl, 10~20 pmole의 각각의 정·역방향 프라이머 2 µl, Taq polymerase (5 U/µl, iNtRON Biotechnology) 0.5 µl를 포함한 반응액에 cDNA 주형 5 µl를 넣고 증류수를 채워 최종적으로 50 µl가 되도록 하였다. 각 바이러스 검출을 위한 프라이머의 서열 및 기원이나 참고문헌은 Table 1에 나타내었다. 최종 PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동하여 결과를 확인하였다.

## 결 과

#### 장바이러스의 효과적인 검출을 위한 최적 프라이머 선정

각 장바이러스들을 민감하게 검출하기 위해 각 바이러스별로 기존 문헌에서 제시된 두 가지 이상의 특이 프라이머들 (Table 1)을 이용하여 이들 중 가장 검출감도가 좋은 프라이머를 찾아보았다. NorV의 경우에는 기존의 프라이머 이외에도 본 연구실에서 디자인한 세 쌍의 프라이머 (MUN2-1F/R, MUN2-2F/R, MUN2-3F/R)를 추가하여 검출 민감도가 제일 높은 프라이머를 찾고자 하였다. PCR 반응조건은 기존 참고문헌에서 제시한 바를 그대로 따랐다. 그 결과 AdV의 경우는 hexAA1885/1913, AstV의 경우는 Mon340/Astman-2, HAV의 경우는 16A/6A, HRV의 경우는 aBT1/RVG9, NorV의 경우는 MUN2-2F/R 프라이머 쌍으로 PCR했을 때 가장 검출감도가 좋은 것을 확인하였다 (Table 1). CoxA, B와 PV는 가장 검출 효율이 높다고 알려진 한 종류의 프라이머 쌍만을 비교 대상으로 하였다. 이들 프라이머 쌍에 의한 검출감도는 앞으로의 모든 실험에서 PCR 민감도 비교 실험시 기준으로 사용하였다.

#### RT 과정에서의 특이 프라이머와 무작위 프라이머의 비교

RNA 바이러스를 검출하기 위한 PCR을 하기 위해서는 먼저 RNA를 주형으로 하여 cDNA로 만드는 RT 반응이 필요하다. 이 과정에 역전사효소와 프라이머가 필요하며, 일반적으로 검출하고자 하는 바이러스에 대해 특이적인

**Table 1.** The list of viruses and their specific primers used in this study

Virus	Primer	Sequence (5'→3')	Reference	Detection limit <sup>a</sup>
AdV	hexAA1885	GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC	15	5.3
	hexAA1913	CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT		
	Adhex-1	GCCACCGATACGTACTTCAGCCTG	1	4
	Adhex-2	GGCAGTGCCGGAGTAGGGTTTAAA		
AstV	MON340	CGTCATTATTGTTGTCATACT	1, 16	6
	Astman-2	TCGCTTCATACATCAAACCC		
	MON340	CGTCATTATTGTTGTCATACT	16	4
	MON348	ACATGTGCTGCTGTTACTATG		
Cox	UC52	CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	17	4 (CoxA)
	UC53	TTGTCACCATAACCAGCCA		5 (CoxB)
EcV	Primer 1	CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	18	–
	Primer 3	ATTGTCACCATAAGCAGCCA		
EntV <sup>b</sup>	EV1	AAGCACTTCTGTTTCC	19	5
	EV2	CATTTCAGGGGCCGGAGGA		
	E2	TCCGGCCCCCTGAATGCGG	20	6
	E1	CACCGGATGGCCAATCCAAT		
	Primer 1	CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	18	5.5 (CoxB)~
	Primer 3	ATTGTCACCATAAGCAGCCA		6 (CoxA)
HAV	16A	GTTTTGCTCCTCTTATCATGCTATG	21	6.7
	6A	GGAAATGTCTCAGGTACTTTCTTTG		
	HAVC-L	CAGCACATCAGAAAGGTGAG	22	2
	HAVC-R	CTCCAGAATCATCTCCAAC		
HBV	409	CATCCTGCTGCTATGCCTCATCT	21	–
	703A	CGAACCACTGAACAAATGGCACT		
HRV	aBT1	CAAGTACTCAAATCAATGATGG	23	5.7
	RVG9	GGTCACATCATACAATTCT		
	Con3	TGGCTTCGCCATTTTATAGACA	24	4
	Con2	ATTTCCGACCATTATAACC		
MV	MV1	TTAGGGCAAGAGATGGTAAGG	25	–
	MV2	GTTCTTCCGAGATTCCTGCCA		
MuV	MuV first F	ATGTAATTAATGCCAACTGCAAGG	26	–
	MuV first R	GAAAAGCTTATATCTAACGATGGG		
NorV	NV-GIIF1	GGGAGGGCGATCGCAATCT	27	4
	NV-GIIR1	CCRCCIGCATRICCRTRTACAT		
	JV12	ATACCACTATGATGCAGATTA	28, 29	4
	JV13	TCATCATCACCATAGAAAAGAG		
	MUN2-1F	GATTACTCTCGGTGGGATTCA	This study	4
	MUN2-1R	GGGGTCCTTCAGTTTTGTCA		

Table 1. Continued

Virus	Primer	Sequence (5'→3')	Reference	Detection limit <sup>a</sup>
NorV	MUN2-2F	GGTGGGATTCAACACAACAG	This study	5
	MUN2-2R	GTTCTCCGCAGGAAAGTCAG		
	MUN2-3F	GGCACCGTGGTCACACTACT	This study	3
	MUN2-3R	TGGTTTTCTTGGCAGCTTCT		
PV	PVPCR2	GTCAATGATCACAACCCAC	30, 31	6.4
	2A	AAGAGGTCTCTATTCCACAT		

<sup>a</sup>Detection limit: Limit of detection by (RT)-PCR using specific primer sets for each virus, <sup>b</sup>EntV: enterovirus (PV, CoxA, CoxB) AdV, Adenovirus; AstV, Astrovirus; Cox, Coxsackievirus; EcV, Echovirus; EntV, Enterovirus; HAV, Hepatitis A virus; HBV, Hepatitis B virus; HRV, Human rotavirus; MV, Measles virus; MuV, Mumps virus; NorV, Norovirus; PV, Poliovirus

프라이머 (specific primers)를 사용한다. 따라서 검출하려는 바이러스의 종류가 많아지면 그만큼의 프라이머가 추가적으로 필요하며, 본 연구에서처럼 7종의 RNA 바이러스를 대상으로 하면 7개의 프라이머 쌍과 7번의 RT 과정을 거치게 된다. 이러한 복잡성을 줄이기 위해 바이러스 종류에 상관없이 무작위적으로 RNA 주형에 결합함으로써 RT 반응이 가능한 무작위 프라이머 (random primer)를 사용해 보았다. 무작위 프라이머는 random 6-mer와 random 9-mer의 두 종류를 사용하여 검출감도의 차이를 살펴보았다. 그리고 RT 반응을 위해 각 바이러스 특이적 프라이머를 사용한 경우와 무작위 프라이머를 사용한 경우의 검출 민감도를 비교해 보았다. 두 경우 모두 PCR은 각 바이러스에 대한 특이적 프라이머 쌍을 사용하여 수행하였다. 그 결과 모든 바이러스에서 무작위 프라이머 중 random 9-mer가 random 6-mer보다 더 효율적이었다. AstV, HAV 그리고 PV의 경우에는 random 9-mer가 특이적 프라이머에 비해 검출 민감도가 조금 낮았으나 큰 차이를 나타내지는 않았고, NorV의 경우에는 random 6-mer, random 9-mer 그리고 특이적 프라이머에서 모두 같은 검출 민감도를 보였으며, CoxA와 CoxB의 경우 random 9-mer를 사용했을 때 더 좋은 검출 민감도를 보였다 (Table 2). 반면 HRV의 경우는 특이적 프라이머로 RT를 수행하였을 때가 무작위 프라이머를 사용하였을 때 보다 월등히 검출 민감도가 좋았다 (Table 2). 이러한 실험결과를 바탕으로 바이러스 검출 단계를 줄이기 위해 RT 과정에서는 HRV만 특이적 프라이머를 사용하고, 나머지 6종의 바이러스에 대해서는 random 9-mer를 사용하기로 결정하였다. 이렇게 함으로써 7번의 RT 반응 과정을 2번으로 줄일 수 있게 되었다.

Table 2. Comparison of specific and random primers in reverse transcription reactions to detect RNA enteric viruses by RT-PCR

Viruses	Detection limit (-log <sub>10</sub> dilution)		
	Specific primer	Random 6-mer	Random 9-mer
AstV	<u>6</u>	5	5
CoxA	4	4	<u>5</u>
CoxB	5	5	<u>6</u>
HAV	<u>6.7</u>	5	6
HRV	<u>5.7</u>	1	2
NorV	<u>5</u>	<u>5</u>	<u>5</u>
PV	<u>6.4</u>	5.5	6

RT reactions were performed with specific, random 6-mer or random 9-mer and the resulting cDNAs were subjected to PCRs using pairs of specific primers for each viruses. For each virus, the RT primer with the lowest detection limit is in bold type and underlined.

#### 공통 프라이머와 프라이머 조합에 의한 다중 PCR

본 연구에서 검출 대상으로 하는 총 8종의 바이러스 (RNA 바이러스 7종, DNA 바이러스 1종)를 특이적 프라이머를 사용한 PCR 방법으로 검출할 경우 총 8번의 PCR을 수행해야 한다. 이에 따른 시간적, 경제적 부담을 줄이고, 검출 과정을 간단히 하기 위해 공통 프라이머 (universal primer)를 이용하거나 여러 프라이머를 섞어 한번에 여러 바이러스를 검출하는 다중 PCR을 시도해 보았다. 먼저 PV와 CoxA, CoxB는 엔테로바이러스 (enterovirus, EntV)에 속하며, 이들을 동시에 검출하기 위한 공통 프라이머가 알려져 있으므로 세 가지의 공통 프라이머를 사용하여 PV와 CoxA, CoxB의 동시 검출을 시도하였다. RT 과정에서는 공통 프라이머 외에 random 6-mer

와 random 9-mer를 함께 사용하였고, PCR 과정에서는 공통 프라이머를 사용하여 검출 민감도를 살펴보았다. 이때 각 바이러스에서 검출 민감도가 가장 높은 특이적 프라이머를 사용하였을 때의 검출 한계를 비교 대상으로

**Table 3.** Comparison of universal primers to detect enteroviruses by multiplex PCR

Virus	Detection limit (-log <sub>10</sub> dilution)				
	Control <sup>a</sup>	RT primer	Universal primers for PCR		
			EV1/EV2	E1/E2	Primer1/3
PV	6.4	Random 6-mer	4.2	4.7	5
		Random 9-mer	<b><u>6</u></b>	<b><u>6</u></b>	4
		EV1/EV2	5	–	–
		E1/E2	– <sup>b</sup>	<b><u>6</u></b>	–
		Primer1/3	–	–	5.7
CoxA	4	Random 6-mer	5	6	5.5
		Random 9-mer	4.5	<b><u>6.3</u></b>	5
		EV1/EV2	5	–	–
		E1/E2	–	6	–
		Primer1/3	–	–	6
CoxB	5	Random 6-mer	4.25	6.25	5
		Random 9-mer	5	<b><u>6.7</u></b>	5
		EV1/EV2	5	–	–
		E1/E2	–	6	–
		Primer1/3	–	–	5.5

Pairs of RT primers and PCR primers with the lowest detection limit are in bold type and underlined.

<sup>a</sup> Control: Limit of detection by RT-PCR with specific primers for RT and PCR as shown in the Table 2.

<sup>b</sup> –: Not applicable

하였다. 그 결과 실험에 사용한 세 종류의 공통 프라이머 중에서 E1/E2를 사용했을 때 가장 좋은 검출 민감도를 보였으며, RT 반응과 PCR 모두 공통 프라이머를 사용했을 때보다 RT 과정에서 random 9-mer를 사용하였을 때 검출 민감도가 더 좋았다 (Table 3). 따라서 E1/E2 프라이머 쌍을 EntV의 검출에 사용하기로 결정하였고, 이에 따라 8번의 PCR 과정을 6번으로 줄일 수 있게 되었다.

다음으로 6번의 PCR 과정을 좀 더 줄이기 위해 다중 PCR을 시도하였다. 다중 PCR을 위해서는 각 바이러스의 PCR 증폭산물의 크기가 다르고, annealing 온도가 비슷해야 하며 프라이머 쌍 사이에 cross-dimer와 같은 이차구조형성이 적어야 한다. 이와 같은 조건을 만족시키는 바이러스 조합을 찾기 위해 바이러스 각각의 반응산물 크기와 annealing 온도 및 이차구조형성을 알아보았다. 그 결과 각각의 바이러스의 반응산물 크기가 달라서 구분이 가능하였고, EntV, HAV, NorV와 AstV의 annealing 온도가 비슷하고, AdV와 HRV의 annealing 온도가 비슷하였다 (Table 4). 또한 Netprimer 프로그램을 이용하여 각 프라이머 쌍들의 이차구조형성을 확인한 결과 AdV는 HRV와 NorV, AstV는 NorV와, EntV는 HAV와 cross-dimer 형성이 가장 적은 것을 알 수 있었다 (Table 4).

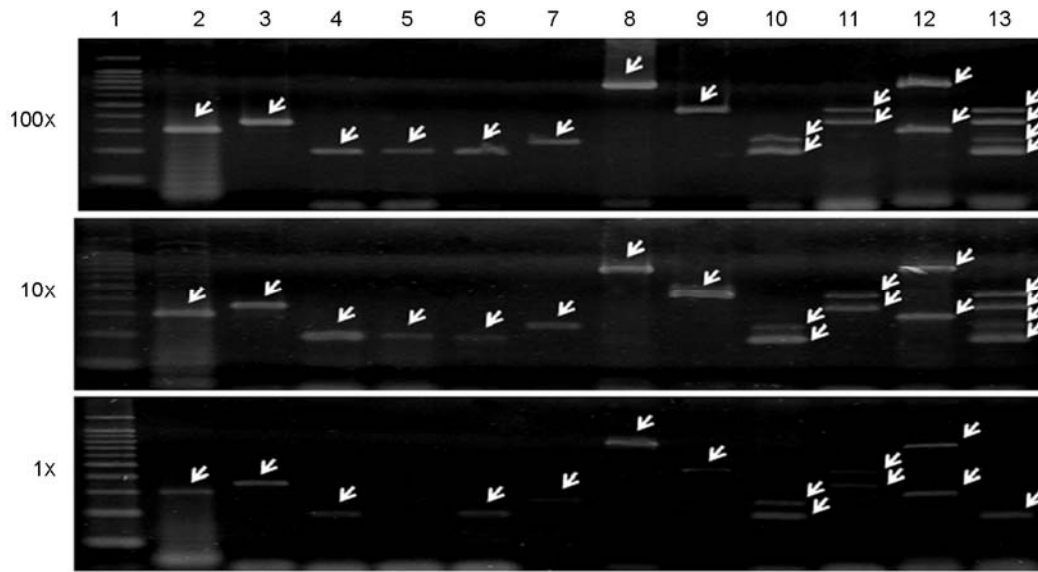
위 결과를 바탕으로 AdV와 HRV, AstV와 NorV, 그리고 EntV와 HAV를 동시 검출할 수 있는 프라이머 조합으로 대상 바이러스를 PCR로 검출할 수 있는지 알아보았다. 각 바이러스를 단일 RT-PCR로 검출하고자 하였을 때 검출되는 최소량을 1 ×로 하고, 이들 8종 바이러스를 각각 1 ×, 10 ×, 그리고 100 × 만큼 섞은 뒤 나누어 DNA와 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 또 다시 나누어 일부는 HRV 특이적 프라이머로, 일부는 random

**Table 4.** Scores of the secondary structure among the primer sets for detection of human enteric viruses

Viruses	Number of cross-dimer formed <sup>a</sup>						AT <sup>b</sup> (°C)	Size (bp)
	AdV	AstV	EntV	HAV	HRV	NorV		
AdV	–	4	7	7	<b><u>1</u></b>	<b><u>1</u></b>	45	308
AstV		–	6	7	6	<b><u>3</u></b>	51	345
EntV			–	<b><u>2</u></b>	4	7	55	195
HAV				–	7	5	55	247
HRV					–	<b><u>3</u></b>	42	749
NorV						–	53	448

Pairs of primers yielding the least number of cross-dimers are in bold type and underlined.

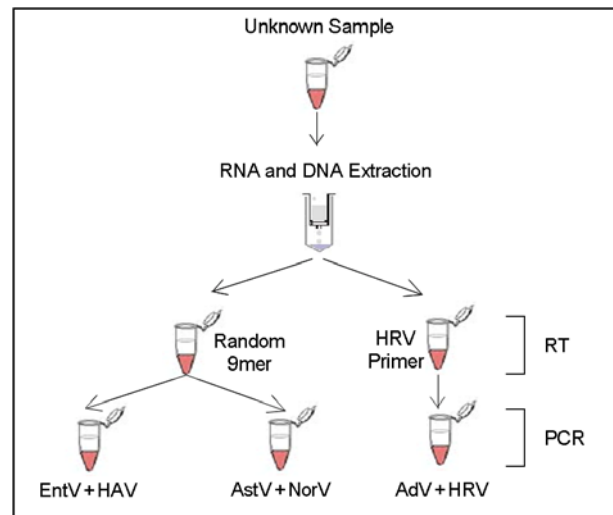
<sup>a</sup> Number of cross-dimer formed: calculated by NetPrimer program. <sup>b</sup> AT: annealing temperature



**Figure 1.** Detection of human enteric viruses by multiplex RT-PCR. DNA or RNA was extracted from a mixture of 8 different human enteric viruses. cDNA was synthesized from RNA sample by RT reaction using specific primers for HRV or random 9-mer. PCR was performed with specific primer sets for each virus (lane 2, AdV; lane 3, AstV; lane 4, PV; lane 5, CoxA; lane 6, CoxB; lane 7, HAV; lane 8, HRV; lane 9, NorV). Multiplex PCR was performed by using combinations of primer sets for two viruses (lane 10, EntV+HAV; lane 11, AstV+NorV; lane 12, AdV+HRV) or four viruses (lane 13, EntV+HAV+AstV+NorV). Lane 1, size marker. AdV, Adenovirus; AstV, Astrovirus; CoxA, Cocksackievirus A; CoxB, Cocksackievirus B; HAV, Hepatitis A virus; HRV, Human rotavirus; NorV, Norovirus; PV, Poliovirus; EntV, Enterovirus, PV+CoxA+CoxB. Arrows indicate the DNA bands corresponding to the expected PCR products.

9-mer로 RT 반응을 수행하였다. HRV 특이적 프라이머로 RT 반응을 수행한 cDNA 시료는 추출한 AdV의 DNA와 혼합하여 AdV-HRV 프라이머 조합으로 PCR을 수행하였다. Random 9-mer로 RT 반응을 수행하여 얻은 cDNA는 다시 둘로 나누어 하나는 AstV-NorV 프라이머 조합으로, 다른 하나는 EntV-HAV 프라이머 조합으로 이중 PCR을 수행하였다. 그 결과 모든 이중 PCR 조합에서 단일 PCR을 하였을 때와 크게 차이가 나지 않는 민감도로 바이러스를 검출할 수 있었다 (Fig. 1). 마지막으로 cross-dimer 형성은 비교적 많지만 annealing 온도가 비슷한 AstV-NorV-EntV-HAV 프라이머 조합으로 다중 PCR을 시도해보았는데 민감도에서 단일 PCR 뿐 아니라 이중 PCR보다 대략 10배 정도 감소하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 1, lane 13).

지금까지의 방법은 장바이러스가 DNA 바이러스와 RNA 바이러스를 모두 포함하기 때문에 핵산추출단계에서 RNA와 DNA를 따로 추출해야 하는 번거로움이 있다. 이러한 번거로움을 개선하고자 핵산추출단계에서 RNA와 DNA를 동시에 추출할 수 있는 QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN)를 사용하여 비교해 본 결과 DNA와 RNA를 따로 따로 추출하였을 때와 동일한 결과를 얻었



**Figure 2.** Suggested protocol of the RT-PCR with minimum hands-on steps to detect human enteric viruses from an unknown sample. AdV, Adenovirus; AstV, Astrovirus; EntV, Enterovirus, CoxA+CoxB+PV; HAV, Hepatitis A virus; HRV, Human rotavirus; NorV, Norovirus.

다 (data not shown). 또한 이들 장바이러스 외에도 대조군으로 에코바이러스 3, B형 간염바이러스, 홍역바이러스, 그리고 볼거리바이러스를 사용하였을 때 에코바이러스

이외에는 전혀 검출되지 않았다 (data not shown). 에코바이러스는 호흡기성 바이러스이지만 엔테로바이러스와 비슷한 서열을 가지고 있고, 공통 프라이머에 의해 검출되었다. 따라서 최종적으로 Fig. 2와 같은 최소 단계 RT-PCR (step-minimized RT-PCR)법을 개발하였고, 이것을 수인성장바이러스를 간단하고 효과적으로 검출할 수 있는 방법으로 제시하고자 한다.

## 고 찰

인체 장바이러스의 존재 여부를 판단할 때 RT-PCR은 민감도와 특이성이 높고, 빠른 시간에 결과를 알 수 있기 때문에 임상과 환경분야에서 많이 사용되고 있다 (1, 9, 22). 장바이러스에는 여러 종류가 있기 때문에 이들을 모두 검출하기 위해서는 여러 번의 RT-PCR 과정이 필요하고, 이에 따른 시간과 비용이 부담으로 작용한다. 따라서 RT-PCR 과정을 줄일 수 있는 방법의 개발이 필요하고, 본 연구에서는 RT 과정과 PCR 과정에서 무작위 프라이머와 공통 프라이머 및 다중 PCR 방법을 도입함으로써 단계를 대폭 줄이게 되었다.

먼저 RT 과정에서는 무작위 프라이머의 사용을 도입하여 특이적 프라이머를 사용하였을 때와 비교하였다. 본 연구에서와 같이 7종의 RNA 장바이러스를 대상으로 하기 위해서는 7종의 서열 특이적 프라이머를 사용하여, 7번의 RT 과정을 수행해야 한다. 이 RT 과정을 무작위 프라이머를 적용시켜 본 결과 HRV를 제외한 6종의 RNA 바이러스에서는 서열 특이적 프라이머를 사용하였을 때에 비해 민감도에서 크게 차이가 나지 않았다. 이에 따라 7번의 RT과정을 두 번으로 줄일 수 있게 되었다.

일반적인 RT 과정에서는 서열 특이적인 프라이머를 이용한다. 이 경우 RNA 주형과의 결합력이 중요한 변수이고, 경우에 따라서는 적은 양의 cDNA가 만들어질 수 있다. 이런 이유로 서열 특이적인 프라이머를 대체하여 사용할 수 있는 것이 random 6-mer나 random 9-mer 등과 같은 무작위 프라이머이다 (32~34). Arfin 등 (32)은 서열 특이적인 프라이머와 random 6-mer를 비교한 결과 더 많은 mRNA 종을 검출하여 random 6-mer의 사용을 추천하고 있다. 또한 random 6-mer가 oligo(d)T보다 mRNA로부터의 cDNA 합성에 더 효과적이라는 보고도 있다 (35). 무작위 프라이머는 RNA 주형에 더 많은 부위와 결합할 수 있고, 특히 RNA 바이러스와 같이 게놈의 변이가 심

한 경우에는 서열 특이적인 프라이머 보다는 많은 부위에 결합할 수 있는 무작위 프라이머가 cDNA 합성에 더 효율적일 수 있다 (33). 일반적으로 많이 사용되는 무작위 프라이머는 random 6-mer이지만, 최근에는 random 9-mer도 많이 사용하고 있다. 본 연구에서는 무작위 프라이머 중 random 6-mer보다 random 9-mer가 장바이러스 검출에 더 효율적인 것으로 나타났다. 그 이유는 확실하지 않지만, 마이크로어레이 실험에서와 같이 보다 넓은 범위의 RNA를 검출해야 하는 경우에 random 6-mer보다 random 15-mer가 두 배 이상 더 효율적이라는 보고 (36)에서와 같이 무작위 프라이머 중에서도 길이가 더 긴 것의 효율이 더 좋지 않을까 생각된다.

다중 PCR은 여러 바이러스를 검출할 경우 시간과 비용, 그리고 시료의 양을 절약하기 위하여 개발되었다 (37). 다중 PCR에서 가장 중요한 인자는 적절한 프라이머의 선정인데, 이는 두 가지 방법에 의한다. 그 첫 번째는 여러 바이러스에서 공통적인 서열을 찾아 공통 프라이머를 디자인하는 것이다. 분류학적으로 먼 거리에 있는 바이러스에서는 공통적인 서열을 찾기 어렵지만 분류학적으로 비교적 가까운 바이러스들에서는 가능하다. 그 한 예가 피코르나바이러스에 속하는 PV, CoxA, CoxB 등을 포함하는 EntV의 5'-noncoding region의 서열이 매우 잘 보존되어 있다는 사실에 근거하여 이 부분을 증폭시키는 공통 프라이머를 개발한 경우이다 (19). 이 방법의 변형에 의해 E1/E2 (38, 39)나 EV1/EV2 (40)와 같은 여러 공통 프라이머가 개발되었고, 본 연구에서도 사용되었다.

세 종류의 EntV는 공통 프라이머 (E1/E2)에 의해 동시 검출이 가능하고, 하나의 PCR 산물이 나오게 되지만, EntV를 포함한 6종의 장바이러스 사이에는 서열상 공통적인 부위가 별로 없기 때문에 공통 프라이머를 찾기 어렵다. 따라서 각 바이러스들의 특이적 프라이머들을 적절히 조합하여 한 튜브에서 PCR로 동시 검출하는 다중 PCR이 시도되었다. 이 경우 각 PCR 산물들이 전기영동 상 서로 구분되기 위해서는 산물의 크기가 뚜렷이 달라야 하고, 비슷한 효율로 증폭되기 위해서는 annealing 온도가 비슷하여야 하며 프라이머들간의 유사성이 적어야 한다 (37, 41~43). 이에 본 연구에서는 산물의 크기, annealing 온도를 고려하여 AdV와 HRV를 한 조합으로, 그리고 AstV, EntV, HAV, 그리고 NorV를 또 하나의 조합으로 하였다. 다음으로 고려한 것은 여러 쌍의 프라이머가 존재함으로써 의사 증폭산물이 나오는 경우가 많은



데, 그 주된 이유는 프라이머 쌍 간의 cross-dimer와 같은 이차구조의 형성이다 (37, 44). 이에 따라 가능한 최소의 cross-dimer 형성이 생기는 조합을 찾았고, 그 결과 AstV/NorV, EntV/HAV, AdV/HRV의 세 다중 PCR 조합이 가능하였다.

이와 같이 RT 과정에서 무작위 프라이머로 random 9-mer를 사용하고, 세 종류의 EntV는 공통 프라이머를 사용하며, 각 바이러스별 특이 프라이머를 annealing 온도와 cross-dimer와 같은 이차구조형성을 고려하여 Fig. 2에서와 같이 RT-PCR 프로토콜을 제안하였다. 이 프로토콜은 단일 RT-PCR에 비해 민감도 면에서 크게 뒤지지 않으면서도 단계를 대폭 축소하여 장바이러스 검출에서의 시간과 비용을 줄일 수 있을 것으로 생각된다. 앞으로 본 연구에서 제시하는 프로토콜을 더 효율적으로 하기 위해서 dimethyl sulfoxide, bovine serum albumin, 글리세롤과 같은 첨가물질을 사용하거나 (43), 장바이러스가 분변 시료에서 검출되는 점을 고려하여 분변 시료의 영향을 알아보는 후속 연구가 필요할 것이다. 나아가 최근 활용도가 높아지고 있는 real-time PCR 방법 (45, 46)을 도입하면 민감도와 특이성에서 보다 효율적인 다중 PCR법이 가능할 것이다.

## 참 고 문 헌

- 1) Rohayem J, Berger S, Juretzek T, Herchenroder O, Mogel M, Poppe M, Henker J, Rethwilm A. A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect Norovirus, Astrovirus and Adenovirus in clinical stool samples. *J Virol Methods* 2004; 118:49-59.
- 2) Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE; WHO Child Health Epidemiology Reference Group. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 2005;365:1147-52.
- 3) Finkbeiner SR, Allred AF, Tarr PI, Klein EJ, Kirkwood CD, Wang D. Metagenomic analysis of human diarrhea: Viral detection and discovery. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000011.
- 4) Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauguier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:247-62.
- 5) Lee JI. Molecular characterization of enteric viruses isolated from acute gastroenteritis patients. Ph.D. Thesis 2008.
- 6) Le Guyader FS, Le Saux JC, Ambert-Balay K, Krol J, Serais O, Parnaudeau S, Giraudon H, Delmas G, Pommepuy M, Pothier P, Atmar RL. Aichi virus, Norovirus, Astrovirus, Enterovirus, and Rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. *J Clin Microbiol* 2008;46:4011-7.
- 7) Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972;10:1075-81.
- 8) Beller M, Ellis A, Lee SH, Drebot MA, Jenkerson SA, Funk E, Sobsey MD, Simmons III OD, Monroe SS, Ando T, Noel J, Petric M, Middaugh JP, Spika JS. Outbreak of viral gastroenteritis due to a contaminated well. international consequences. *JAMA* 1997;278:563-8.
- 9) Fout GS, Martinson BC, Moyer MW, Dahling DR. A multiplex reverse transcription-PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69:3158-64.
- 10) Harris JR, Cohen ML, Lippy EC. Water-related disease outbreaks in the United States. 1981. *J Infect Dis* 1983;148:759-62.
- 11) Lawson HW, Braun MM, Glass RI, Stine SE, Monroe SS, Atrash HK, Lee LE, Engender SJ. Waterborne outbreak of Norwalk virus gastroenteritis at a southwest US resort: role of geological formations in contamination of well water. *Lancet* 1991;337:1200-4.
- 12) Haas CN, Rose JB, Gerba C, Regli S. Risk assessment of virus in drinking water. *Risk Anal* 1993;13:545-52.
- 13) Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human Caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:15-37.
- 14) Lee GC, Chong CK, Lee CH, Lee ST. Cell-culture-based immunochromatography for rapid detection of group A human rotaviruses in aquatic environments. *Environ Technol* 2009; 30:37-43.
- 15) Allard A, Girones R, Juto P, Wadell G. Polymerase chain reaction for detection of Adenoviruses in stool samples. *J Clin Microbiol* 1990;28:2659-67.
- 16) Belliot G, Laveran H, Monroe SS. Detection and genetic differentiation of human Astroviruses: Phylogenetic grouping varies by coding region. *Arch Virol* 1997;142:1323-34.
- 17) Siafakas N, Georgopoulou A, Markoulatos P, Spyrou N, Stanway G. Molecular detection and identification of an Enterovirus during an outbreak of aseptic meningitis. *J Clin Lab Anal* 2001;15:87-95.
- 18) Zoll GJ, Melchers WJ, Kopecka H, Jambroes G, van der Poel

- HJ, Galama JM. General Primer-mediated polymerase chain reaction for detection of Enteroviruses: application for diagnostic routine and persistent infections. *J Clin Microbiol* 1992;30:160-5.
- 19) Hyypiä T, Auvinen P, Maaronen M. Polymerase chain reaction for human picornaviruses. *J Gen Virol* 1989;70:3261-8.
- 20) Chapman NM, Tracy S, Gauntt CJ, Fortmueller U. Molecular detection and identification of Enteroviruses using enzymatic amplification and nucleic acid hybridization. *J Clin Microbiol* 1990;28:843-50.
- 21) Nainan OV, Cromeans TL, Margolis HS. Sequence-specific, single-primer amplification and detection of PCR products for identification of hepatitis viruses. *J Virol Methods* 1996;61:127-34.
- 22) Tsai YL, Tran B, Sangermano LR, Palmer CJ. Detection of Poliovirus, Hepatitis A Virus, and Rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:2400-7.
- 23) Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY. Polymerase Chain reaction amplification and typing of Rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 1990;28:276-82.
- 24) Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK. Identification of group A Rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:1365-73.
- 25) Ray R, Cooper PJ, Sim R, Chadwick N, Earle P, Dhillon AP, Pounder RE, Wakefield AJ. Direct in situ reverse transcriptase polymerase chain reaction for detection of Measles virus. *J Virol Methods* 1996;60:1-17.
- 26) Atrasheuskaya AV, Neverov AA, Rubin S, Ignatyev GM. Horizontal transmission of the Leningrad-3 live attenuated Mumps vaccine virus. *Vaccine* 2006;24:1530-6.
- 27) Kim SH, Cheon DS, Kim JH, Lee DH, Jheong WH, Heo YJ, Chung HM, Jee Y, Lee JS. Outbreaks of gastroenteritis that occurred during school excursions in Korea were associated with several waterborne strains of Norovirus. *J Clin Microbiol* 2005;43:4836-9.
- 28) Van de Peer Y, De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput Appl Biosci* 1994;10:569-70.
- 29) Vinje J, Vennema H, Maunula L, von Bonsdorff CH, Hoehne M, Schreier E, Richards A, Green J, Brown D, Beard SS, Monroe SS, de Bruin E, Svensson L, Koopmans MP. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of Noroviruses. *J Clin Microbiol* 2003;41:1423-33.
- 30) Chezzi C. Rapid diagnosis of Poliovirus infection by PCR amplification. *J Clin Microbiol* 1996;34:1722-5.
- 31) Rico-Hesse R, Pallansch MA, Nottay BK, Kew OM. Geographic distribution of wild Poliovirus type 1 genotypes. *Virology* 1987;160:311-22.
- 32) Arfin SM, Long AD, Ito ET, Toller L, Riehle MM, Paegle ES, Hatfield GW. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of integration host factor. *J Biol Chem* 2000;275:29672-84.
- 33) Radhakrishnan S, Abraham P, Sridharan G. Improved sensitivity of reverse transcriptase polymerase chain reaction for hepatitis C virus using random hexamer primers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;33:153-6.
- 34) Weiner J 3rd, Zimmerman CU, Göhlmann HW, Herrmann R. Transcription profiles of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* grown at different temperatures. *Nucleic Acids Res* 2003;31:6306-20.
- 35) Miller CL, Yolken RH. Methods to optimize the generation of cDNA from postmortem human brain tissue. *Brain Res Brain Res Protoc* 2003;10:156-67.
- 36) Stangegaard M, Dufva IH, Dufva M. Reverse transcription using random pentadecamer primers increases yield and quality of resulting cDNA. *Biotechniques* 2006;40:649-57.
- 37) Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:559-70.
- 38) Egger D, Pasamontes L, Ostermayer M, Bienz K. Reverse transcription multiplex PCR for differentiation between Polio- and Enteroviruses from clinical and environmental samples. *J Clin Microbiol* 1995;33:1442-7.
- 39) Leparc I, Aymard M, Fuchs F. Acute, chronic and persistent enterovirus and poliovirus infections: detection of viral genome by seminested PCR amplification in culture-negative samples. *Mol Cell Probes* 1994;8:487-95.
- 40) Yang CF, De L, Yang SJ, Ruiz Gómez J, Cruz JR, Holloway BP, Pallansch MA, Kew OM. Genotype-specific *in vitro* amplification of sequences of the wild type 3 polioviruses from Mexico and Guatemala. *Virus Res* 1992;24:277-96.
- 41) Cha RS, Thilly WG. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *PCR Methods Appl* 1993;3:S18-29.

- 42) Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS. General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl* 1993;3:S30-7.
  - 43) Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* 1997;23:504-11.
  - 44) Brownie J, Shawcross S, Theaker J, Whitcombe D, Ferrie R, Newton C, Little S: The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3235-41.
  - 45) Molenkamp R, van der Ham A, Schinkel J, Beld M. Simultaneous detection of five different DNA targets by real-time Taqman PCR using the Roche Light Cycler 480: Application in viral molecular diagnostics. *J Virol Methods* 2007;141:205-11.
  - 46) Noordhoek GT, Weel JF, Poelstra E, Hooghiemstra M, Brandenburg AH. Clinical validation of a new real-time PCR assay for detection of enteroviruses and parechoviruses, and implications for diagnostic procedures. *J Clin Virol* 2008;41:75-80.
-