The Korean Journal of Microbiology, Vol. 38, No. 3, September 2002, p. 186-191
Copyright ⓒ2002, The Microbiological Society of Korea

올리고뉴클레오티드 DNA Chip을 이용한 환경시료에서의 장관계바이러스 검출

김정미[2] · 윤성욱[1,2] · 지영미[3] · 윤재득[3] · 정용석[1]*

[1]경희대학교 생물학과 및 기초과학연구소, [2](주)바이오메드랩, 마이크로어레이센터

[3]국립보건원 바이러스질환부 소화기바이러스과

장내바이러스(enterovirus), 로타바이러스(rotavirus), 그리고 아데노바이러스(adenovirus) 등 물을 통해 전파되는 환경바이러스의 신속한 검출 및 1 차적인 분류를 위해 올리고뉴클레오티드 DNA chip을 이용한 분석 시스템의 유용성에 대하여 연구하였다. BGM 세포배양실험에서 바이러스성 세포병변효과(cytopathic effect) 양성으로 판정된 세포단층으로부터 접종배양 3 일 후 세포내 모든 RNA를 분리하여 중합효소연쇄반응과 DNA chip으로 검출여부 및 유전형을 비교 분석한 결과 세포배양에서 양성으로 판정된 10 개의 시료 중 3 개가 바이러스 음성으로, 7 개가 바이러스 양성으로 나타났다. 중합효소연쇄반응과 DNA chip에 의해 양성으로 나타난 7 개 시료의 유전형은 두 방법에 의해 모두 장내바이러스로 동정되어 DNA chip에 의한 1 차 동정의 유용성도 증명하였다. 세포배양 후 전기영동분석 없이 일차적인 동정과정까지 불과 3~4 시간 이내에 수행해낼 수 있는 DNA chip 분석은 특이성, 신속성, 및 경제성을 고루 갖추어 환경바이러스 검출방법론의 새로운 영역을 구성할 것으로 사료된다.

Key words □ **DNA chip, identification, polymerase chain reaction, waterborne virus**

감염과 질병유발이 가능한 장관계바이러스(enteric virus)로는 poliovirus, coxsackievirus, 그리고 echovirus 등의 장내바이러스(enteroviruses)가 대표적이며 adenovirus, rotavirus, hepatitis A 와 E virus, calicivirus, Norwalkvirus, small round-structured virus, coronavirus 및 astrovirus도 물에서 종종 발견되고 있다(3,5,7). 이 중, coxsackievirus, echovirus, adenovirus 및 calicivirus 등은 미국 환경청(United States Environment Protection Agency: USEPA)에서 물의 미생물학적 오염후보물질로 지정하고 있다(20).

분석대상의 환경시료가 물일 경우는 일반적으로 매우 낮은 물속의 바이러스 농도때문에 정량분석의 신뢰도를 높이기 위해서는 수백-수천 리터에 이르는 물시료를 채취하여야 하며 또한 검출 바이러스의 감염성 여부를 확인하기 위해 수 일~수십 일에 이르는 세포배양과정이 요구된다(9,19). 세포배양과정 후에는 종종 검출 바이러스의 동정작업도 요구된다. 검출방법론의 기본골격은 필터 등을 이용, 물 속에 분포한 저농도의 바이러스를 흡착(adsorption)하는 단계와 흡착된 바이러스 입자의 탈리(elution) 및 농축(concentration) 단계, 시료접종 및 세포배양 단계, 그리고 바이러스 오염의 최적확수(most probable number of infectious unit: MPNIU) 또는 용균반 단위(plaque forming unit: PFU) 산출을 통한 배양성 바이러스의 정량적 판단 등으로 정리된다(17,19).

방사능으로 표지된 올리고뉴클레오티드 탐침자를 농축시료 중의 바이러스 유전물질과 혼성화반응(hybridization)을 시도하여 검출하거나 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction: PCR)을 이용하여 바이러스 유전물질의 일부분을 증폭한 후 혼성화하는 분자생물학적 기술은 전자현미경 관찰, 면역학적 탐색, 또는 세포배양법 등에 비해 월등히 높은 검출민감도를 보이지만 검출된 바이러스의 감염성여부 확인 및 정량이 어렵다(10,12,13,18). 1996 년 Reynolds 등은 PCR을 사용, 세포배양 후 세포 적출물을 대상으로 바이러스 유전물질 검색을 시도하여 감염성 또는 배양성 바이러스 검출기법과 분자생물학적 방법의 검출민감도를 접목하여 'Integrated Cell Culture PCR (ICC-PCR)' 분석법을 제시하였다(14). 이 방법은 위양성(false positivity) 및 정량의 문제점을 완전히 배제하지는 못했지만 감염력을 잃은 바이러스의 유전물질을 검출할 가능성을 크게 줄이고 높은 민감도를 유지하였으며 접종 후 24 시간~7 일 이내에 바이러스 존재유무를 확인할 수 있다는 점을 장점으로 제시하고 있다. 한편 검출된 바이러스의 종 또는 혈청형의 동정(identification) 단계에서는 중화항체법(antibody neutralization)이나 면역형광법(immunofluorescence), 그리고 유전물질의 염기서열결정법(sequencing) 등을 이용하는 것이 일반적이지만 보다 전문적인 기술과 장비, 그리고 짧지 않은 분석기간이 요구된다. 환경시료를 대상으로 한 바이러스 검출에서 높은 민감도의 정성적 판단과 동시에 정확한 정량분석을 성취하는 것은 매우 어렵지만 환경오염의 사전예방을 위한 사전조사는 많은 시료의 신속한 분석으로 바이러스 오염가능성의 판단이 우선되어야 한다(7). 동시에 종 동정에 대한 기초자료도 확보할 수 있다면 오염 바이러스의 잠재적 위해도에 대한 일차적

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-961-0829, Fax: 02-961-0244
E-mail: ysjeong@khu.ac.kr

인 이해까지 가능할 것이다.

본 연구에서는 이 두 가지 목적을 동시에 만족시키는 방법론으로 현대 생명과학의 도구로서 급성장하고 있는 DNA chip에 의한 환경바이러스 분석 시스템의 유용성을 평가하고자 하였다. DNA chip은 올리고뉴클레오티드(11)나 cDNA(16)를 마이크로어레이어(microarrayer)로 슬라이드글라스 위에 고정시켜 수많은 유전자발현의 동시 분석에 많이 사용되는데 최근에는 돌연변이 분석(4,8)이나 유전자 mapping (15)에도 활용되고 있다. 이 시스템의 적용단계는 세포배양 후 적출된 세포내 유전물질을(RT)-PCR로 증폭하고 그 생성물을 직접 DNA chip과 반응시키면서 시작되며 적용범위는 poliovirus, coxsackievirus, echovirus 및 unclassified enterovirus를 포함한 pan-enterovirus 그룹과 rotavirus 그룹 및 adenovirus 그룹 등 환경에서의 검출빈도가 가장 높은 바이러스 종류를 대상으로 한다. 이 DNA chip은 3~4 시간 이내로 특정 바이러스의 유전물질 존재여부를 확인하는 동시에 검출 바이러스의 1 차 동정자료까지 제시할 수 있어 PCR 후 수반되는 전기영동 분석과정은 물론 종 동정에 필요한 항원-항체반응이나 염기서열분석까지 생략시켜준다. 뿐만 아니라 높은 민감도를 가지고 있으므로 시료에서 바이러스를 검출하는데 좋은 장점이 있다. 또한 레이저 스캐너(laser scanner)에 의한 DNA chip의 판독은 방대한 양의 환경시료 분석에 자동화 체계를 도입할 수 있어 향후 관련분야 조사연구 및 학술연구의 효용성 상승에 크게 기여할 것으로 판단된다.

재료 및 방법

세포배양

바이러스 검출용 세포배양에는 African green monkey kidney (BGM) 세포를 사용하였다. 세포배양에는 5~10%의 우태아혈청, penicillin/streptomycin, tetracycline 및 항진균제 fugizone을 첨가한 MEM/L-15 혼합배지를 사용하였다(19). 바이러스 접종 후, 1~5 일 사이에 CPE를 확인하고 세포배양 플라스크를 3 회 반복하여 동결/해동하였다. 배양상층액은 상온에서 15 분 동안 1,000 ×*g*로 원심분리하여 부유물을 제거하고 상층액(바이러스 suspension)은 사용 전까지 −70°C에 보관하였다.

Pan-enterovirus 유전자 검색과 동정

Enterovirus 유전자 검색을 위해서 진화적으로 보존성이 높은 5'-noncoding region (NCR)의 436 bases를 대상으로 RT-PCR을 수행하였다. CPE 양성의 세포배양액 200 μl에 약 600 μl의 Tri-reagent와 chloroform 200 μl를 넣고 잘 섞은 후 상온에 10분간 방치한 다음 15 분간 원심분리(10,000×*g*, 4°C)하였다. 상층액에 동량의 isopropyl alcohol을 섞고 RNA를 침전시킨 다음 10 μl의 DEPC-H_2O에 녹였다. 이 RNA 5 μl에 RNase inhibitor (Promega, Madison, USA) 0.5 μl, dNTP 3 μl, random hexamer (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)나 oligo dT (10 pM) 1 μl, AMV reverse transcriptase (Promega) 0.5 μl를 넣고 최종 부피를 15 μl로 조정하여 42°C에서 90 분간 반응시킨 후 95°C에서 5 분간 역전사효소를 불활성화시켰다. 합성된 cDNA로부터 pan-enterovirus 특이 유전자를 증폭하기 위해 cDNA 1 μl, dNTP 3 μl, forward primer (EntF 10 pM) 1 μl, reverse primer (EntR 10 pM 1 μl), *Taq* polymerse 0.25 μl를 넣고 최종부피를 25 μl로 맞춰 95°C (5 분), 95°C (1 분), 52°C (1 분 30 초), 72°C (1 분 30 초)의 싸이클을 35 회 실시하였다(1,2). 증폭된 436 bp 산물은 agarose gel 전기영동으로 확인하였고 TA 클로닝 후 염기서열을 결정하여 GenBank의 데이터와 비교하였다.

DNA chip을 이용한 바이러스검출 및 유전형 분석

바이러스 검출 및 유전형 분석을 위하여 EVDNAChip™ 키트(BiomedLab, Seoul, Korea)를 제공받아 매뉴얼에서 제시하는 방법을 따랐다. 세포배양에서 RNA/DNA 분리를 위하여 RNAID 키트(Bio101, Carlsbad, USA)와 guanindinium thiocyanate (GITC, Sigma, St. Louis, USA)를 사용하였다. 6 M GITC 250 μl와 세포배양액을 1:1로 섞고 10 μl의 글래스파우더(glass powder)를 첨가하여 상온에서 10 분 동안 교반 시킨 후 30 초간 650×*g*에서 원심분리하였다. 그후 상층액은 제거하고, 침전물은 400 μl의 RNAID 키트의 세척액으로 재부유 시킨 후 850×*g*에서 원심분리하였다. 이 과정을 두 차례 더 반복하고 마지막 원심분리는 10,000×*g*에서 60 초간 실시하였다. 침전물은 완전히 건조시킨 후, 25 μl의 증류수(RNase-free)에 녹인 후 사용하기 전 까지 −20°C에서 보관하였다.

분리된 RNA 20 μl와 random hexamer (Promega)를 넣고 95°C에서 5 분간 가열한 후, 즉시 얼음에서 5 분간 반응시켰다. 21.5 μl의 증류수(RNase-free), 1 μl의 10 mM dNTP, 6 μl의 5X RT buffer (Promega)와 0.5 μl의 AMV 역전사효소 (Promega)를 첨가한 후, 상온에서 20 분간, 42°C에서 40 분간 반응시켰다. 반응산물은 95°C에서 5 분간 가열하여 역전사효소를 불활성화시켰다.

합성된 cDNA를 주형으로 하여 키트에서 제공하는 프라이머세트(enterovirus II, II, VII, rotavirus group A III, IV adenovirus VI, VII)를 이용하여 바이러스를 증폭하였고 β-globin(BG 1, 2)은 DNA 증폭여부를 판단하기 위해 양성대조군으로 사용하였다. 증폭시 사용한 반응액 및 조건은 다음과 같다. 각 프라이머 25 pmole 씩과 2 U *rTaq* DNA 중합효소(Takara, Kyoto, Japan)를 넣어서 다음의 조건에서 PCR을 실시하였다. 90°C에서 1 분, 94°C, 45°C, 72°C에서 각각 30 초씩 3 주기, 94°C, 45°C, 72°C에서 각각 15 초, 15 초, 20 초를 27 주기, 72°C에서 2 분간 유지시킨 뒤 4°C에서 보관하였다. 증폭된 PCR산물은 혼성화반응을 위하여 99°C에서 10 분간 DNase (Amersham, Piscataway, USA)로 처리한 후 3 N NaOH (10% v/v)로 5 분간 실온에서 변성시켰다. 그 후 1 M Tris-HCl (pH 7.2) 2 μl (1/20 vol.)와 3 N HCl 4 μl (1/10 vol.)를 가한 후 얼음 위에서 5 분간 방치하고 12× SSPE (saline-sodium phosphate-EDTA buffer, Sigma) 50 μl, 10% SDS (Sigma) 0.5 μl를 가하여 잘 섞은 후 chip에 주입하여 40°C에서 습도를 유지하며 반응시켰다. 그 후 3× SSPE에서 2 분간, 1× SSPE에서 2 분간 세척하였다. 결과는 레이저 스캐너

(GSI Lumonics, Scanarray Lite, Ottawa, Canada)를 laser power 80-100, PMT 80-100에서 발색된 신호를 확인하여 분석하였다.

결 과

PCR에 의한 바이러스 검출 및 동정

세포배양에서 배양성 바이러스 양성으로 판정된 총 10 개의 세포배양액 시료로부터 직접 바이러스 유전자를 적출하고 pan-enterovirus 특이적 primer를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 enterovirus 5'-NCR의 비구조적 부위를 특이적으로 증폭하는 PCR을 시도하였고 10 개의 시료 중 7 개의 검체에서 enterovirus 특이 밴드의 증폭이 확인되었다.

각 PCR로 생성된 DNA는 TA-vector에 클로닝하였고 확보된 5'-NCR의 염기서열은 Dye terminator 방법으로 결정하였으며 GenBank에 등록된 장내바이러스 염기서열 분석결과 시료-3에서 coxsackievirus B3 (CB3)와 99%의 homology를 갖는 바이러스가 검출되었다. 시료-4, 시료-6, 시료-7에서 echovirus 30과 94%의 homology를 갖는 바이러스가, 시료-8, 시료-9, 시료-10에서는 각각 CB3와 98%, 94%, 99%의 상동성을 보이는 유전자로 판정되었다(Table 3).

DNA chip 방법에 의한 장내바이러스검출 및 유전형 분석

세포배양에서 바이러스 양성으로 나온 시료에서 바이러스를 검출하기 위하여 DNA chip을 이용하여 검사하였다. 본 연구에서 사용되어진 장내바이러스 검출용 DNA chip의 경우는 세 가지 종류의 바이러스(enterovirus, adenovirus 및 rotavirus) 검출이 가능하고 유전형을 판별할 수 있다. 따라서 DNA chip의 정확도와 특이도를 먼저 확인한 후 시료를 검사하였다. DNA chip 자체에 대한 평가를 하기 위하여 세 종류(enterovirus, adenovirus 및 rotavirus)의 바이러스를 확인할 수 있는 각각의 종류에 속하는 표준(reference)바이러스를 이용하여 DNA chip 검사를 시행하였다. 사용된 DNA chip의 포맷(format)을 보면 4 개의 β-globin 이 있어서 시료의 적정성을 확인함과 동시에 다른 탐침자의 위치를 쉽게 파악할 수 있도록 포지션마커(position marker) 역할을 한다(Fig. 2A). 시료를 적용한 DNA chip의 결과는 Fig. 2와 같다. 음성 대조군의 시료 결과를 보면 포지션 마커인 β-globin 탐침자에서만 양성신호가 나타나고 다른 바이러스 탐침자에서는 음성으로 나타났다. 즉 음성으로 기대되는 결과에서 음성결과를 보여 주었다. 표준바이러스 enterovirus, adenovirus 및 rotavirus를 각각 적용한 결과 해당 탐침자 위치에서 양성 결과를 보여줌으로써 정확한 바이러스 검출 및 검출된 바이러스의 유전형에 해당되는 결과를 보여주었다. 즉 세 개의 표준바이러스 시료 모두

Table 1. Nucleotide sequence of the primers used to amplify 5'-NCR of pan-enteroviruses

Primer	Sequence(5'→3')	Position[a]
1 (EntF)	AAGCACTTCTGTTTCCCCGG	161-180
2 (EntR)	ATTGTCACCATAAGCAGCCA	580-599

[a]Positions of the primers were determined by reference sequence of coxsackievirus B1.

Table 2. Detection of enteric viruses by cell culture, PCR, and DNA chip methods

Sample Number	Cell Culture[a]	PCR	DNA chip		
			Enterovirus	Adenovirus	Rotavirus
1	+	–	–	–	–
2	+	–	–	–	–
3	+	+	+	–	–
4	+	+	+	–	–
5	+	–	–	–	–
6	+	+	+	–	–
7	+	+	+	–	–
8	+	+	+	–	–
9	+	+	+	–	–
10	+	+	+	–	–

[a]Virus-specific CPE shown in cell culture could be induced by other than those three virus groups.

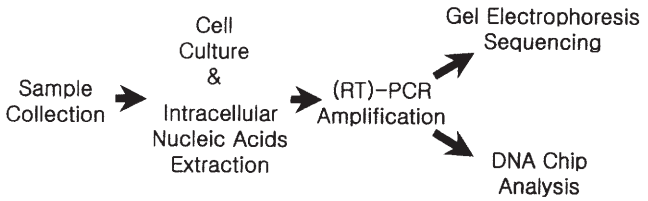

Fig. 1. Flow of waterborne virus analysis by PCR and DNA chip.

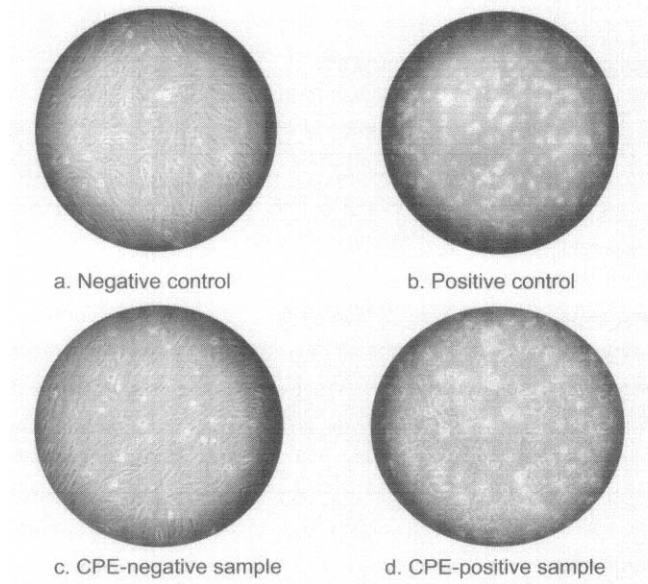

Fig. 2. Cytopathic effect induced by enterovirus. a) negative control (mock infection), b) positive control (inoculated with 200 PFU poliovirus type3), c) and d) 7 day post inoculation with 2 different water samples. BGM cells were used for sample inoculation and culture.

Table 3. Sequence identification of the PCR product

Sample Number	Identification[a]	Homology (%)
1	–	–
2	–	–
3	Coxsackievirus B3	99
4	Echovirus 30	94
5	–	–
6	Echovirus 30	94
7	Echovirus 30	94
8	Coxsackievirus B3	98
9	Coxsackievirus B3	94
10	Coxsackievirus B3	99

[a]Identification of the PCR product sequence was determined by comparison to the GenBank reference data.

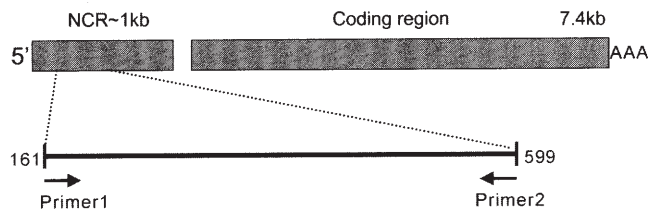

Fig. 3. Genome location of 5'-specific primers for enterovirus detection.

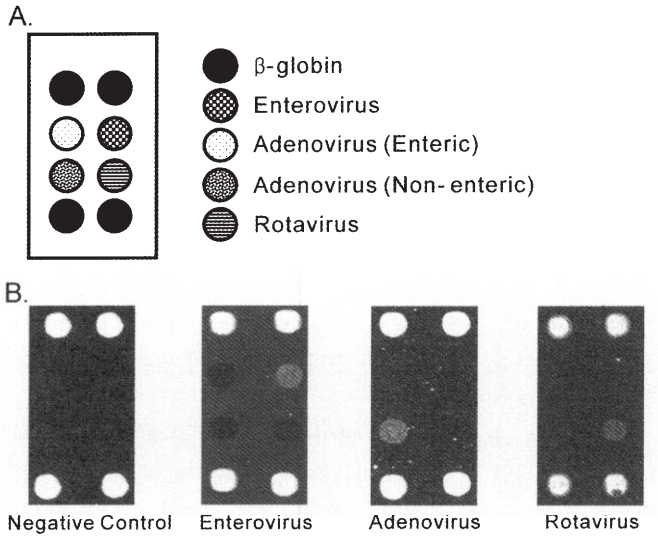

Fig. 4. Detection and genotyping of enteric viruses by DNA chip. A. Schematic illustration of DNA chip format: spots represent different types of oligonucleotide probes. 'β-globin' represents β-globin probe as a position marker for locating probes. Other spots represent enterovirus, adenovirus (enteric), adenovirus (non-enteric) and rotavirus, respectively. B. Validation of DNA chip using reference viruses: three different reference viruses (enterovirus, adenovirus, and rotavirus) and one negative control were tested using the same method described in 'Materials and Method'.

양성으로 나타났고, 또한 chip 상에 나타난 유전형 또한 표준바이러스 유전형과 일치한 결과를 보여 주었다(Fig. 2B). 표준바이러스를 이용한 DNA chip 검증실험 후에 세포배양결과 바이러스 양성으로 판정된 총 10 개의 시료를 PCR 후, 유전자 분석법 및 DNA chip 방법으로 검사하고 비교하였다(Table 3). DNA chip 검사결과는 유전자 분석법에 의한 결과와 일치한 결과를 보여주었다. 두 가지 방법 모두 10 개의 시료 중 3 개(시료번호 1, 2, 5)가 바이러스 음성으로, 7 개(시료번호 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10)가 바이러스 양성으로 나타났다. 바이러스 양성으로 나타난 7 개 시료의 유전형은 유전자 분석법 및 DNA chip 방법에 의하여 모두 장내바이러스로 일치하는 결과를 보여주었다.

고 찰

환경시료에 대한 분석과 결과의 유의성은 종종 시료의 수에 의존적이다. 실제 환경에서 분포하고 전파되는 바이러스의 검출 결과에는 강우, 수온, 주변의 인구밀도 및 생활특성 등 다양한 변수들이 개입되어 도출되기 때문이다(5). 따라서 환경시료에서의 바이러스 분석결과가 높은 신뢰도를 수반한 대표성을 갖기 위해서는 통계적 유의성의 확보가 절대적일 수밖에 없으며 대표성에는 시료채취의 적정성이, 그리고 통계적 유의성에는 시료분석의 빈도가 핵심적인 기여인자가 될 것이다(7).

지난 반세기 동안 바이러스의 검출을 위해 사용한 가장 일반적인 방법은 살아 있는 생물체나 감수성이 확인된 배양세포에 감염시키는 것이다. 특히 감수성 있는 배양세포를 감염실험에 사용하는 세포배양법은 윤리적 부담을 제거해주었으며 실험의 경제적 여건도 많이 개선해 주었다. 그러나 배양세포주마다 특정 바이러스에 대한 감수성이 각기 다르고 확정 세포병변효과를 보기 위해서 길게는 2 주 동안 배양기간을 필요로 하여 이로 인한 검출 민감도의 감소와 경제적인 부담도 적지 않다(14,19). 특히 이러한 문제점들은 상대적으로 많은 수의 시료를 제한된 시간 내에 분석해내야 하는 경우에 심화될 수밖에 없어 감염성 확인에 필수적인 세포배양과정을 도입하더라도 배양기간 및 배양 후 실험과정을 최소화하는 것이 바람직하다(19). 이와 같은 목적에서 DNA chip에 의한 검출 시스템은 세포배양-PCR 방법이 제공하는 세포배양기간 최소화의 장점을 그대로 유지하고 동시에 뒤이은 실험과정을 최소화하였다. 시료 접종 후 24 시간부터 3 일 이내에 세포내 핵산을 분리하고 cDNA로 전환하여 불과 3~4 시간 정도면 바이러스 검출 및 유전형 여부를 판단할 수 있다(Fig. 4). DNA chip에 의한 검출은 세포배양액을 대상으로 한 pan-enterovirus 특이 PCR 결과와 100% 일치하여 훌륭한 검출 특이성을 나타내었다(Table 3).

그러나 세포배양에 의한 바이러스 검출결과는 DNA chip 또는 PCR에 의한 검출결과와 완전히 일치하지는 않았으며 10 개의 세포배양 양성시료 중 3 개가 DNA chip과 PCR에서는 음성으로 나타났다(Table 3). 이러한 불일치의 가능한 이유로는 여러 가지가 있을 수 있겠으나 가장 합리적인 근거로는 각 방법에 의한 검출범위의 설정에 차이가 있기 때문인 것으로 판단된다. 세포배

양과정에서는 시료 중에 존재하는 바이러스 종류에 관계없이 세포주에 감수성이 있고 어떤 형태로든 CPE를 나타낸다면 검출 양성으로 판정되지만(19), PCR의 경우 검출하고자하는 대상 바이러스를 증폭할 수 있는 특정 프라이머를 사용하고(12-14) DNA chip의 경우 검출하고자하는 대상 바이러스의 특이 유전자와 선택적으로 결합하는 특정 올리고뉴클레오티드 탐침자를 사용한다. 즉, 두 방법 다 미리 검출범위를 지정하기 때문에 만약 세포배양된 바이러스가 설정된 검출범위를 벗어날 경우 PCR이나 DNA chip 시스템에서는 음성으로 판정될 수 있다.

다음으로 주목될 수 있는 DNA chip 시스템의 장점은 시료의 대량분석 및 자동화가 가능하다는 것이다. Chip의 포맷에서는 염기로 사용되는 슬라이드글라스에 수많은 올리고뉴클레오티드를 집적시킬 수 있으므로 한번에 여러 개의 시료에 대한 동시 혼성화반응이 가능하며 한 번의 스캐닝과정에는 한 개에서 십여 개 이상의 판독이 가능하여 필요하다면 현재의 기술로도 단시간에 수 백 개의 시료분석이 가능하다. 이에 더하여 혼성화반응과 스캐닝과정은 실험조건과 공정이 정형화되어 있어 시료분석의 자동화가 가능하다는 점은 많은 수의 시료분석이 필요한 환경시료 연구에 크게 기여할 것이다.

한편, DNA chip 시스템은 바이러스 검출여부에 대한 판정에 더하여 일차적인 종 동정의 자료를 제공한다. 세포배양법에 의한 검출은 우선 plaque 클로닝을 통하여 바이러스를 순수분리하고 이어서 중화항체법, 또는 면역형광법 등을 사용하여 검출 바이러스의 종류를 판단하며 PCR 등에 의해 검출하는 경우에는 염기서열결정 후 데이터베이스의 염기서열 자료와 비교함으로써 세부 종류까지 동정이 가능하다. 그러나 이러한 방법은 바이러스 검출 판정과정과 독립적으로 이루어지며 일반적으로 많은 시간과 경비가 필요한 전문 공정이 필요하다. DNA chip 시스템은 검출여부의 판정과 동시에 환경바이러스 중에서 가장 빈번하게 검출되는 pan-enterovirus, adenovirus, 그리고 rotavirus의 구별이 가능해져 검출과 동시에 1 차적인 동정자료를 제공함으로써 다수의 시료를 분석해야하는 환경시료연구에서 종동정을 위한 부차적인 시간과 경비를 절감할 수 있다. 물론 현재의 기술수준으로 중화항체법이나 염기서열결정법에 의한 단계의 심도 있는 동정은 할 수 없으나 adenovirus의 경우에서와 같이 향후 subgroup 또는 type에 특이한 염기서열을 확보한다면 이를 기반으로 유전형에 특이한 올리고뉴클레오티드 탐침자를 디자인할 수 있어 DNA chip 시스템의 효용성 증가가 기대된다.

환경시료 중의 바이러스 검출공정 중 DNA chip을 비롯, 혼성화반응을 이용하는 시스템은 모두 (RT)-PCR 과정을 거친다(4,12,15). 이 (RT)-PCR 과정은 반응시료의 준비과정 및 수행과정이 번거롭고 중합효소 등 고가의 시약이 필요하여 가능하다면 생략하고 싶은 공정임에 틀림없다. 그러나 ICC (RT)-PCR과 같은 방법을 사용할 경우 PCR 산물을 전기영동으로 분석하여 검출여부를 판정하기 때문에 방법상(RT)-PCR 과정을 반드시 수행해야 하지만 DNA chip을 활용할 경우에는 이 과정의 생략이 가능해진다. 즉 시료가 접종된 배양세포의 세포내 바이러스의 RNA 또는 DNA를 분리하여 DNA chip에 직접 혼성화반응을 하면 시료분석 과정의 수월성은 한층 높아질 것이다. 그러나 분리된 핵산을 DNA chip에 직접 반응시키기 위해서는 7.7 kb에서 수 십 kbp에 달하는 긴 길이의 유전자와 결합하되 종간 교차반응(cross-hybridization)이 없이 유전형분석을 가능하게 하는 종특이 DNA 탐침자의 디자인이 관건이며 또한 이 때 바이러스 subgroup 및 type 1 차 동정의 효용성도 잃지 않아야 한다(6). 따라서 바이러스 검출 및 동정용 DNA chip을 고안할 경우에는 이와 같은 점들이 고려되어야 할 것이다.

결론적으로 환경시료에서의 장내바이러스 검출을 위하여 올리고뉴클레오티드 DNA chip을 이용한 경우 바이러스 검출 및 유전형 분석을 동시에 수행할 수 있으므로 신속하게 결과를 도출할 수 있었으며, 기존의 방법과 일치한 결과를 보여줌으로써 결과의 정확성을 보여 주었다. 더 나아가서 DNA chip의 장점인 고집적성, 고민감도, 고처리량(high throughput) 그리고 자동화의 가능성을 고려한다면 향후 관련분야 조사연구, 학술연구, 산업계에서의 효용성 상승에 크게 기여할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 경희대학교 교비연구지원(정용석, 2000) 및 보건복지부 보건의료기술연구개발사업 (김정미, HMP-02-PJ1-PG11-VN01-SV02-0015)에 의하여 이루어진 것임.

참고문헌

1. Burrleson, F.G., T.M. Chambers, and D.L. Wiedbrauk. 1992. Virology: A Laboratory Manual, p. 74. Academic Press Inc., San Diego, California.
2. Chapron, C.D., N.A. Ballester, J.H. Fontaine, C.N. Frades, and A.B. Margolin. 2000. Detection of astroviruses, enteroviruses and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the Information Collection Rule and an integrated cell culture nested PCR procedure. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2520-2525.
3. Cooper, J.I. 1995. Viruses in aquatic environments, pp.130-139. *In* Viruses and the Environment, 2nd ed. Chapman & Hall, London
4. Fais, R., J.P. Day, Npgerry, C. Phelan, S. Narod, and F. Barany. 2000. Universal DNA array detection of small insertions and deletions in BRCA1 and BRCA2. *Nat. Biotechnol.* 18, 561-564.
5. Geldenhuys, J.C. and P.D. Pretourius. 1989. The occurrence of enteric viruses in polluted water, correlation to indicator organisms and factors influencing their numbers. *Wat. Sci. Tech.* 21, 105-109.
6. Gentsch, J.R., R.I. Glass, P. Woods, V. Gouvea, M. Gorziglia, J. Flores, B.K. Das, and M.K. Bhan. 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1365-1373.
7. Gerba, C.P. and J.B. Rose. 1990. Viruses in source and drinking water, p. 385-401. *In* G.A. McFeters (ed.) Drinking Water Microbiology. Springer-Verlag, New York.
8. Gerry, N.P., N.E. Witowski, J. Day, R.P. Hammer, G. Barany, and F. Barany. 1999. Universal DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations *J. Mol. Biol.* 292, 251-262.
9. Keswick, B.H., C.P. Gerba, H.L. DuPont, and J.B. Rose. 1984.

Detection of enteric viruses in treated drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 1290-1294.
10. Ma, J-F., C.P. Gerba, and I.L. Pepper. 1995. Increased sensitivity of poliovirus detection in tap water concentrates by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 55, 295-302.
11. Pease, A.C., E.J. Sullivan, M.T. Cronin, C.P. Holmes, and S.P. Fodoer. 1994. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 5022-5026.
12. Pina, S., M. Puig, F. Lucena, J. Jofre, and R. Girones. 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3376-3382.
13. Puig, M., J. Jofre, F. Lucena, A. Allard, G. Wadell, and R. Girones. 1994. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted water by nested PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2963-2970.
14. Reynolds, K.A., C.P. Gerba, and I.L. Pepper. 1996. Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture-PCR procedure. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1424-1427.
15. Shalon, D., S.J. Smith, and P.O. Brown. 1996. A DNA microarray system for analyzing complex DNA sampling using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res.* 6, 639-645.
16. Schena, M.D., R.W. Davis, and P.O. Brown. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.
17. Schwab, K.J., R. De Leon, and M.D. Sobsey. 1995. Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A virus and Norwalk virus by reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 531-537.
18. Schwab, K.J., R. De Leon, and M.D. Sobsey. 1996. Immunoaffinity concentration and purification of waterborne enteric viruses for detection by reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2086-2094.
19. USEPA. 1996. Virus monitoring protocol for the information collection requirements rule. EPA/814-B-95-002.
20. USEPA. 1998. Current drinking water standards: microbiological contaminants in drinking water contaminant candidate list.

(Received: August 12, 2002/Accepted: August 26, 2002)

ABSTRACT: Enteric Virus Detection from Environmental Sample by Oligonucleotide DNA Chip
Jeongmi Kim[2], Sung Wook Yoon[1,2], Youngmee Jee[3], Jaeduk Yoon[3], and Yong Seok Jeong[1]* ([1]Department of Biology and Research Institute of Basic Science, Kyunghee University, Seoul 130-701, [2]Microarray Center, BiomedLab Co., Seoul 110-744, [3]Department of Viruses, Gastroenteric Virus Division, National Institute of Health, Seoul 122-701, Korea)

The usefulness of oligonucleotide DNA chip was evaluated for detection and primary level identification of major waterborne viruses in environmental samples. The enteric waterborne viruses included enterovirus, adenovirus, and rotavirus. Total intracellular RNA of 10 BGM cell plates showing virus-specific cytopathic effects was extracted at the third day after inoculation. The intracellular RNA was then subjected to either enterovirus-specific RT-PCR followed by sequencing analysis, or the DNA chip. Seven out of 10 positive samples in cell culture were positive but the other three sample were turned out to be negative by both RT-PCR and DNA chip analyses. Nucleotide sequencing results and the DNA chip hybridization results of the RT-PCR product were in complete agreement in the identification of the 7 positive samples as enteroviruses. Using the DNA chip, it took only 3~4 hr to complete detection and primary level identification of target viruses and additional procedures such as gel electrophoresis or nucleotide sequencing were not necessary. We believe that the DNA chip system can be employed as a highly effective and new detection methodology for environmental viruses.