

## 원주지역 설사 환자에서 분리한 Small Round Structured Viruses (SRSV) 염기서열 분석

국립보건원 바이러스질환부 소화기계바이러스과<sup>1</sup>, 감염질환부 역학조사과<sup>2</sup>

지영미<sup>1\*</sup> · 김기순<sup>1</sup> · 천두성<sup>1</sup> · 박정구<sup>1</sup> · 강영화<sup>1</sup> · 정운석<sup>1</sup>  
고운영<sup>2</sup> · 신영학<sup>2</sup> · 윤재득<sup>1</sup>

=Abstract=

### Sequence Analysis of Small Round Structured Viruses (SRSV) Isolated from a Diarrheal Patient in Wonju

Youngmee Jee<sup>1\*</sup>, Ki Soon Kim<sup>1</sup>, Doo Sung Cheon<sup>1</sup>, Jeong Koo Park<sup>1</sup>,  
Young Hwa Kang<sup>1</sup>, Yoon Suck Chung<sup>1</sup>, Unyeong Go<sup>2</sup>,  
Young Hack Shin<sup>2</sup> and Jae Deuk Yoon<sup>1</sup>

*Laboratory of Enteroviruses, Department of Virology<sup>1</sup>, Division of Epidemiology,  
Department of Infectious Diseases<sup>2</sup>, National Institute of Health, 122-701, Seoul, Korea*

Small round structured viruses (SRSV) are the major ethological agents which can cause outbreaks of non-bacterial gastroenteritis or food poisoning both in children and adults. The classification of family *Caliciviridae* to which SRSV belong, is based on the genome encoding three open reading frames. The rotavirus is another major pathogen which causes diarrhea in young children. We examined stool specimens obtained from diarrheal patients in Wonju from which bacterial pathogens were not found. To detect causative viruses from stool specimens of patients, reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) or nested PCR using rotavirus or SRSV specific primers was performed. In this study, RT-nested PCR procedure which can amplify a 330 bp fragment derived from RNA dependent RNA polymerase (RDRP) region within ORF1 was applied for the detection of SRSV. For the detection of rotaviruses, a 877 bp fragment from the VP4 region of rotavirus genome was amplified. As a result, rotavirus was not detected while SRSV sequences were detected from one out of five specimens. The nucleotide and amino acid sequences of the Wonju isolate were compared with other 6 Korean isolates which have been isolated and sequenced in our laboratory. Sequence analysis revealed that the Wonju isolate was rather distinct from other Korean isolates: the Wonju isolate was closer to genogroup I of SRSV while other 6 Korean isolates belonged to genogroup II.

**Key Words:** Small round structured viruses (SRSV), RNA-dependent RNA polymerase (RDRP), Reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR)

## 서 론

SRSV (small round structured virus)는 rotavirus와 함께 설사질환을 일으키는 대표적인 바이러스로서 영국, 네덜란드 그리고 일본 등의 선진국에서 SRSV에 의한 집단 설사 또는 집단 식중독이 발생하는 등 최근 급성 장염의 주요원인 병원체로 부각되고 있다 [25].

과거에 이 바이러스가 알려지기 전에는 winter vomiting disease, hyperemesis hiemis 등의 질병으로 1929년경 처음 보고되었으며 1972년에 와셔야 전자현미경 관찰에 의해 바이러스의 존재가 확인되었다 [24]. 이 바이러스는 처음 집단 발생이 일어난 Norwalk라는 지명을 따라 Norwalk virus라고 명명하였으나 이 후 형태학적으로 상이한 small round virus들을 발견하여 small round structured virus라고 총체적으로 불리우게 되었고 Norwalk virus와 전자현미경 상으로 구별되지 않는 다른 바이러스들은 집단 발생이 일어난 지역의 이름을 따라 Hawaii, Montgomery County, Toronto, Bristol, Southampton, Desert Shield 등의 이름을 붙이게 되었다 [15-19]. 다양한 바이러스 군으로 구성되어 있는 SRSV의 분류 및 명칭은 아직도 많은 연구자들에 혼동을 주고 있어 좀 더 명확한 분류체계가 요구된다.

SRSV는 *Caliciviridae*에 속하는 바이러스로서 prototype Norwalk virus [12], UK 분리주인 Southampton virus [16]와 Lordsdale virus [8]의 경우 바이러스 전체 genome의 염기서열이 밝혀져 있다. SRSV는 7.5~7.7 kb 크기의 single-stranded RNA genome을 가지며 3개의 open reading frame을 가진다 [13, 14, 17]. ORF1은 1,737 amino acids 크기의 polymerase의 precursor protein을, ORF 2는 546 amino acids의 capsid protein을, 그리고 ORF3는 기능이 알려져 있지 않은 211 amino acids의 small basic protein을 coding하고 있다. SRSV의 여러 분리주들 genome의 염기서열을 비교해 보면 divergency가 크며 특히 capsid 부위의 다양성이 높아 이 부위의 sequence를 기준으로 genogroup 1과 2로 분류하며 classical human calicivirus는 같은 *Caliciviridae*에 속하지만 SRSV의 genogroup과는 확실히 구분된다.

SRSV는 보통 급성 설사 또는 구토를 일으키고 감염력이 높아 주위에 급속히 전파되며 흔히 경

구적으로 전파되는 것으로 알려져 있기는 하나 집단 발생의 경우는 이 경로에 의한 전파만으로는 설명하기 어려운 점이 있다. 이 바이러스는 흔히 구토를 일으키므로 구토물 내의 바이러스가 전파의 또 다른 경로로 작용할 가능성이 높은 것으로 알려져 있다.

일본이나 영국에서는 SRSV에 의한 집단 설사 또는 식중독 사례에 대한 보고가 여러차례 있었으며 국내에서는 Human calicivirus 또는 Norwalk virus에 대한 연구가 국내의 연구진에 의해 발표되었다 [1, 2, 3]. 한편 본 연구진은 작년 대전의 한 소아과 환자에서 SRSV를 최초로 분리한 이후 1999년 8월말까지 총 290건의 설사바이러스에 대한 검사를 의뢰 받아 이 중 17.6%인 51건에서 SRSV를 분리하였다. 바이러스 검색을 위해서 Ando 등 [4]이 보고한 SRSV polymerase 유래 primer set을 사용하여 nested PCR을 수행하였다. 바이러스 분리주 중 일부에 대해서 sequencing을 실시하여 genogrouping을 시도하였으며 나머지 분리주에 대한 sequencing도 실시할 예정이다.

본 연구진이 분리한 국내 분리주 중 가장 최근에 원주의 집단 설사 환자에서 발견된 바이러스의 sequencing을 수행하여 국립보건원에서 분리한 다른 6개 분리주의 염기서열과 비교 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구대상

1999년 강원도 원주 소재 초등학교 학생들에서 집단으로 160여명의 설사 환자가 발생하여 이에 대한 역학조사를 수행하였으며 환자들 중 5명으로부터 분변 가검물을 확보하여 rotavirus와 small round structured virus에 대한 바이러스 검사를 수행하였다.

### 2. 가검물 처리

의뢰된 분변 가검물로부터 바이러스 검색을 위해 약 1 g의 가검물에 9 ml 정도의 PBS (phosphate buffered saline)를 넣은 후 3~4개의 glass beads를 넣고 10분간 진탕하여 10% stool suspension을 만들었다. 4℃에서 30분간 3,000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 취하였다.

### 3. RNA 추출

위의 상층액 200 µl에 Tri-reagent (Molecular

Research Center) 600  $\mu$ l를 넣고 vortex 한 후 5~10분간 실온에 방치하였다. Chloroform 200  $\mu$ l를 넣고 잘 섞은 후 10분간 방치하고 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 14,000 rpm으로 원심분리하였다. 상층액을 취한 후 500  $\mu$ l의 chloroform을 넣어 다시 extraction하여 얻은 상층액에 동량의 isopropyl alcohol을 넣고 잘 섞은 후 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 또는 overnight 방치하였다. 30분간 4 $^{\circ}$ C에서 14,000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 버린 후 70% ethanol 1 ml를 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 14,000 rpm으로 10분간 원심하였다. 상층액을 버리고 남은 ethanol을 제거한 후 10분간 air-dry시키고 10  $\mu$ l의 DEPC 처리한 증류수를 넣어 잘 섞은 후 사용할 때까지 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

#### 4. 바이러스 cDNA 합성

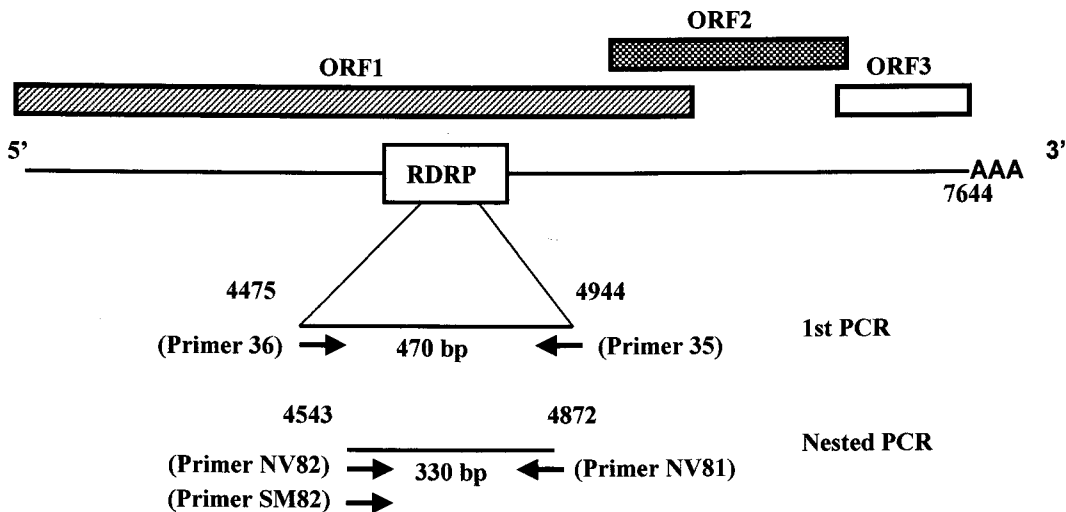
위의 RNA template 5  $\mu$ l에 MgCl<sub>2</sub>를 포함한 5x RT buffer 3  $\mu$ l, SRSV polymerase 부위유래의 antisense primer인 35 primer 1  $\mu$ l (10 pmole), dNTP 4  $\mu$ l (2.5 mM), Reverse transcriptase 0.5  $\mu$ l (100 U, Promega), RNase inhibitor 0.5  $\mu$ l (20 U), distilled water 1  $\mu$ l를 넣어 총 15  $\mu$ l의 mixture를 Perkin

Elmer 480을 사용하여 42 $^{\circ}$ C에서 60분간 incubation 함으로써 reverse transcription을 수행하여 바이러스 cDNA를 합성하였다.

#### 5. PCR (polymerase chain reaction), nested PCR

위의 cDNA template 15  $\mu$ l, 15 mM MgCl<sub>2</sub>를 포함한 10x PCR buffer 3.5  $\mu$ l, 바이러스 증폭을 위한 primer set인 antisense primer 35와 sense primer 36 각각 1  $\mu$ l, Taq polymerase 0.5  $\mu$ l (2.5 U, super therm DNA polymerase, Puretec), distilled water 29  $\mu$ l를 포함한 50  $\mu$ l의 reaction mixture를 Perkin Elmer 480을 사용하여 바이러스 유전자 증폭을 수행하였다. 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 denaturation 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 50 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분의 cycle을 40회 실시하고 마지막 cycle 후 72 $^{\circ}$ C에서 15분간 extension 시켰다.

Nested PCR을 위해 위의 첫 번째 PCR 산물 1  $\mu$ l, 10x PCR buffer, NV 81, NV 82, SMV 82 primer 각각 1  $\mu$ l (10 pmole), dNTP 1  $\mu$ l (2.5 mM), Taq polymerase 0.5  $\mu$ l (2.5 U), distilled water 36.5  $\mu$ l를 포



**Primer 35 : 5'CTT GTT GGT TTG AGG CCA TAT 3' (21mer)**

**Primer 36 : 5'ATA AAA GTT GGC ATG AAC A 3' (19mer)**

**Primer NV81 : 5'ACA ATC TCA TCA TCA CCA TA 3' (20mer)**

**Primer NV82 : 5'TCA TTT TGA TGC AGA TTA 3' (18mer)**

**Primer SM82 : 5'CCA CTA TGA TGC AGA TTA 3' (18mer)**

**Figure 1.** Diagram of genomic structure of human caliciviruses and primers used for nested PCR to detect SRSV.

지역미 등: Sequence Analysis of SRSV Polymerase

	C A C T A T G A T G C A G A T T A C T C T C G G T G G G A T T C A A C A C A A C				Majority
	10	20	30	40	
2	. . . . .	. . . . . A . A G C T . . . . .	C . . . . .	A	Wonju-99.SEQ
2	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	Pusan-99-2.seq
2	. . . . .	. . . . . A . A . . . . .	. . . . .	C . . . . . G	Seoul-99-2.SEQ
2	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	Pusan-98.seq
2	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	Seoul-99-1.seq
1	. . T . T . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	Taejon-98.seq
2	. . . . .	. . . . . A . . . . .	. . . . .	C . . . . . G	Pusan-99-1.seq
	A G A G G G C C G T G C T G G C A G C A G C C C T A G A A A T C A T G G T T A A				Majority
	50	60	70	80	
42	. C . . . . . A G A . C A . . . A T G . A G T . . . T . T A . C . . . . . T G C . G	Wonju-99.SEQ			
42	. . . . . A . . . . .	. . . . . T . . . . .	. . . . .	. . . . .	Pusan-99-2.seq
42	. . . . . A . . . . .	. . . . . A . . . . .	. . . . .	. . . . . G . . . . . G C G	Seoul-99-2.SEQ
42	. . . . . A . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	Pusan-98.seq
42	. . . . . A . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	Seoul-99-1.seq
41	. . . . . . . . . . . T . . . . .	. . . . . A . . . . .	. . . . . A G T . . . . .	. . . . . A . . . . . G G . . . . . G . . . . .	Taejon-98.seq
42	. . . . . C A . . . . . A . . . . .	. . . . . G G . . . . .	. . . . . C . . . . .	. . . . . T A . . . . . A . . . . . G	Pusan-99-1.seq
	A T T C T C C G C T G A A C C A G A T T T G G C T C A G G T G G T C G C A G A A				Majority
	90	100	110	120	
82	G C . . . . . A . . . . . C A . . . . . C . . . . . C T C C C . . . . . C G C A . . . . . G . . . . . T C . G	Wonju-99.SEQ			
82	. . . . . . . . . . .	. . . . . T . . . . . A . . . . .	. . . . . C . . . . .	. . . . .	Pusan-99-2.seq
82	G . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	Seoul-99-2.SEQ
82	. . . . . . . . . . .	. . . . . T . . . . . A . . . . .	. . . . .	. . . . .	Pusan-98.seq
82	. . . . . . . . . . .	. . . . . C . . . . .	. . . . .	. . . . .	Seoul-99-1.seq
81	. . . . . . . . . . .	. . . . . C . . . . . A . . . . .	. . . . . C . . . . .	. . . . .	Taejon-98.seq
82	. . . . . T . . . . .	. . . . . G . . . . . A C . . . . .	. . . . . C . . . . .	. . . . . A . . . . . T . . . . . C . . . . .	Pusan-99-1.seq
	G A C C T T C T T T C T C C T A G C G T G G T G G A T G T G G G T G A C T T C A				Majority
	130	140	150	160	
122	. . . . . G . . . . . C . . . . . C . . . . . A T C T . A A A . . . . . T . . . . . T . . . . . A T G	Wonju-99.SEQ			
122	. . . . . . . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	Pusan-99-2.seq
122	. . . . . . . . . . .	. . . . . T . . . . . G G . . . . .	. . . . . A . . . . .	. . . . . C A . . . . . C . . . . . A . . . . . T . . . . . C . . . . . T . . . . . T G	Seoul-99-2.SEQ
122	. . . . . . . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	Pusan-98.seq
122	. . . . . . . . . . .	. . . . . C . . . . .	. . . . .	. . . . .	Seoul-99-1.seq
121	. . . . . . . . . . .	. . . . . C . . . . .	. . . . . G . . . . . A . . . . .	. . . . . C . . . . . G T C . . . . . T . . . . . C . . . . . T . . . . . G	Taejon-98.seq
122	. . . . . T . . . . .	. . . . . C . . . . .	. . . . . A G . . . . .	. . . . . C . . . . . C . . . . .	Pusan-99-1.seq
	A A A T C T C A A T T A A T G A G G G T C T G C C C T C T G G G G T G C C C T G				Majority
	170	180	190	200	
162	T G . . . . . A G T G . . . . .	. . . . . A . . . . . T . . . . .	. . . . . C T . . . . .	. . . . . G . . . . . T T . . . . . T . . . . . A . . . . .	Wonju-99.SEQ
162	. . . . . A . . . . .	. . . . . C . . . . .	. . . . .	. . . . .	Pusan-99-2.seq
162	T C . . . . .	. . . . . G . . . . . C . . . . .	. . . . . G . . . . .	. . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . C . . . . . A . . . . .	Seoul-99-2.SEQ
162	. . . . . A . . . . .	. . . . . C . . . . .	. . . . .	. . . . .	Pusan-98.seq
162	. . . . . A . . . . .	. . . . . C . . . . .	. . . . .	. . . . .	Seoul-99-1.seq
161	T C . . . . .	. . . . . C G . . . . .	. . . . . C . . . . . A . . . . .	. . . . . A . . . . . T . . . . . A . . . . . G . . . . . T . . . . . C . . . . .	Taejon-98.seq
162	. . . . . A . . . . .	. . . . . C . . . . .	. . . . . A . . . . .	. . . . . A . . . . . T . . . . .	Pusan-99-1.seq

Figure 2. Alignment of the nucleotide sequence of 330 bp region of Wonju isolate with other Korean isolates.

합한 50 μl reaction mixture를 위의 첫 번째 PCR 한 primer 및 방법을 요약하면 Figure 1와 같다.  
과 같은 조건으로 증폭시켰다. 본 연구에서 사용



### 지역미 등: Sequence Analysis of SRSV Polymerase

H Y D A D Y S R W D S T Q Q R A V L A A A L E I M V K F S A E P E L A Q V V A E		Majority
<div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%;"> <span>10</span> <span>20</span> <span>30</span> <span>40</span> </div>		
2	. . . . . T A . . . . . N . E I M M E S F N . . . C R L T . N . S . . A . . . . Q	Wonju-99.SEQ
2	. S . . H . . . . .	Pusan-99-2.seq
2	. S I . S . . M . V . . R . . . . .	Seoul-99-2.SEQ
2	. S . . H . . . . .	Pusan-98.seq
2	. P . . H . . . I . . . . .	Seoul-99-1.seq
1	. F . S . . M . V . . . . .	Taejon-98.seq
2	. H I . G . . . K . . . R . . . . . I . S .	Pusan-99-1.seq
D L L S P S V V D V G D F K I S I N E G L P S G V P C T S Q W N S I A H W L L T		Majority
<div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%;"> <span>50</span> <span>60</span> <span>70</span> <span>80</span> </div>		
122	. . . . . E M . . . . . Y V . . V K D . . . . . F . . . . . V . . . N . . I M .	Wonju-99.SEQ
122	. .	Pusan-99-2.seq
122	. . . A . . Q L . . . . . V . . V Q . I . . . . .	Seoul-99-2.SEQ
122	. .	Pusan-98.seq
122	. . . . . . . . . . . M .	Seoul-99-1.seq
121	. . . A . . R L . . . . . V . . V Q . I . . . . .	Taejon-98.seq
122	. . . A . . . . . . . . . . . T . S . . . I . . . . .	Pusan-99-1.seq
L C A L S E V T G L S P D V I Q A N S L F S F Y G D D E I V		Majority
<div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%;"> <span>90</span> <span>100</span> <span>110</span> </div>		
242	. L Q . Y . . . . .	Wonju-99.SEQ
242	. . . . . . . . . . . N . . . . I .	Pusan-99-2.seq
242	. . . S . M A . . . S . . . . . V . . H . C .	Seoul-99-2.SEQ
242	. . . . . . . . . . . N . . . . I .	Pusan-98.seq
242	. . . . . . . . . . . N . . . . I .	Seoul-99-1.seq
241	. . . S . M . . . S . . . . . E . V . . . C .	Taejon-98.seq
242	. . . I . . . S . . . . . V . T . C .	Pusan-99-1.seq

Decoration 'Decoration #1': Hide (as '.') residues that match the Consensus exactly.  
 Decoration 'Decoration #2': Hide (as '.') residues that match the Consensus exactly.

**Figure 3.** Alignment of the amino acid sequence 330 bp region of Wonju isolate with other Korean isolates.

50~100  $\mu$ l를 37 $^{\circ}$ C에서 overnight incubation하였다.  
 흰색 colony를 골라 ampicillin 50  $\mu$ g/ml을 포함한 LB medium에 overnight 배양한 후 Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System을 사용하여 plasmid DNA를 추출하였다.

#### 7. Sequencing

Sequencing reaction을 위해 DNA template 1~2  $\mu$ l, Dye terminator 4  $\mu$ l, primer (10 pmole, 0.6  $\mu$ l) 및 distilled water를 넣어 최종 volume이 10  $\mu$ l가 되게 하여 96 $^{\circ}$ C에서 30초, 50 $^{\circ}$ C에서 15초, 60 $^{\circ}$ C에서 4분의 cycle을 Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler 480을 사용하여 25회 수행하였다.

Sequencing reaction 산물의 정제를 위해 50  $\mu$ l의 100% ethanol과 3 M Sodium acetate (pH 4.6) 2  $\mu$ l

를 첨가하여 -70 $^{\circ}$ C에서 overnight precipitation한 후 14,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 ethanol을 완전히 제거하였다. 70% ethanol 150  $\mu$ l를 넣어 10분간 washing한 후 5분간 vacuum dry 하였다.

Loading buffer 2  $\mu$ l를 넣어 vortex 한 후 90 $^{\circ}$ C에서 2분간 denaturation시킨 후 1.5  $\mu$ l를 loading하고 6 M urea를 포함한 ABI prism 377 Automatic Sequencer Long Ranger gel에 running 하였다.

#### 8. Sequence Analysis

증폭된 330 bp fragment의 염기서열을 Laser-gene (Copyright $\copyright$  1997 by DNASTAR, Inc)의 MegAlign Programme을 사용하여 다른 분리주와 비교하고 phylogenetic analysis를 통해 상호관계를 알아 보았다. 분석에 사용한 방법은 A manual for the

LASERGENE System, User's Guide의 내용을 참고하였다 [26]. MegAlign은 2개 이상의 DNA 혹은 protein sequence 간의 alignment를 통해 homology, structure, function을 비교할 수 있게 하는 programme으로 alignment의 결과를 alignment display, phylogenetic tree, tubular summaries, percent divergence, percent similarity, residue substitutions 등의 형태로 나타낼 수 있다. Sequence distance table은 각 sequence 쌍 간의 계산된 divergence의 plot을 보여 주며 각 sequence 쌍 간의 percent similarity는 오른쪽 위쪽에 표시되고 percent divergence는 왼쪽 오른쪽에 표시된다. Percent divergence는 MegAlign에

의해 얻은 phylogeny와 관련하여 sequence pair를 비교함으로써 계산되며 similarity index는 phylogenetic relationship에 대한 고려없이 직접 sequence를 비교한다. Phylogenetic tree에서 branch의 각 쌍의 길이는 sequence 간의 거리를, tree 아래쪽의 scale은 sequence간의 거리를, 그리고 unit는 substitution의 수를 나타낸다.

결 과

강원도 원주지역에서 발생한 집단 설사 환자에서 채취한 5건의 분변 가검물에 대한 RT-PCR을

**Table 1.** Comparison of nucleotide sequences of Korean Isolates (% similarity)

		Percentage of similarity/homology						
		Pusan-98	Seoul-99-1	Pusan-99-2	Seoul-99-2	Taejon-98	Wonju-99	Pusan-99-1
Divergency	Pusan-98	***	94.5	100	63.5	67.2	58.1	70.2
	Seoul-99-1	5.4	***	94.5	62.3	69.3	59.3	70.5
	Pusan-99-2	0	5.4	***	63.5	67.2	58.1	70.2
	Seoul-99-2	38.1	39.8	38.1	***	77.8	55.9	68.1
	Taejon-98	36	32.8	36	24.9	***	57.1	68.7
	Wonju-99	48.4	46.1	48.4	51.2	50	***	62
	Pusan-99-1	30.8	30.8	30.8	32.8	32.2	44.9	***

Similarity = 100 x sum of the matches/length-gap residues-gap residues

Divergence = 100 x distance/total distance

Distance = sum (residue distances) + (gaps x gaps penalty) + (gap residues x gap length penalty)

**Table 2.** Comparison of amino acid sequences of Korean Isolates (% similarity)

		Percentage of similarity/homology						
		Pusan-98	Seoul-99-1	Pusan-99-2	Seoul-99-2	Taejon-98	Wonju-99	Pusan-99-1
Divergency	Pusan-98	***	97.2	100	78	80.7	66.1	81.7
	Seoul-99-1	2.8	***	97.2	77.1	79.8	66.1	81.7
	Pusan-99-2	0	2.8	***	78	80.7	66.1	81.7
	Seoul-99-2	26.1	27.4	26.1	***	92.7	67	80.7
	Taejon-98	22.3	23.6	22.3	7.7	***	64.2	78.9
	Wonju-99	45	45	45	43.4	48.4	***	64.2
	Pusan-99-1	21.1	21.1	21.1	22.3	24.8	48.4	***

Similarity = 100 x sum of the matches/length-gap residues-gap residues

Divergence = 100 x distance/total distance

Distance = sum (residue distances) + (gaps x gaps penalty) + (gap residues x gap length penalty)

**Table 3.** Comparison of nucleotide sequences of Korean isolates and related foreign SRSV isolates

Nucleotide	Percentage of similarity																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1 Yuri	***	75.4	67.8	58.5	59.1	59.9	70.6	69.6	68.8	69.3	68.4	69	89.1	69.6	69	67.5	60.8	65.3
2 Desetshield	25	***	78.7	60.8	60.2	64.4	86.6	80.9	90	90.6	73.3	90.9	77.2	90.9	90.9	66.3	66.6	87.1
3 Mexico	34.6	21.9	***	52.6	59.6	53.2	75.7	97	74.2	74.2	65	73.9	67.5	73.6	73.9	58.7	57.1	71.1
4 Norwalk	48.6	43.2	54.4	***	77	74.2	55.8	53.5	56.4	53.8	62.9	56.2	56.2	57.4	56.2	58.4	75.4	54
5 Southampton	46.9	43.8	46	25.9	***	71.7	55.8	61.1	53.6	55.6	56.5	55.9	58.7	56.5	58.1	74.5	53.7	
6 Saratoga	45.4	40.6	55.2	29.1	32.2	***	60.5	54.4	55.6	57.4	56.5	56.5	58.4	56.8	56.5	56.8	87.5	57.6
7 Snowmountain	30.2	13.3	26	48.7	49.2	45.9	***	77.5	82.4	84.5	69	80.9	73.9	83	80.9	64.7	60.5	82
8 Toronto	33.2	19	3.1	52.5	43.8	53.9	23.9	***	75.7	75.7	67.5	75.4	70.2	75.7	75.4	61.4	59	72.7
9 Camberwell	32.5	10.5	27.4	50.4	55.3	53.5	18.7	24.7	***	93.6	66.6	93	68.4	93.6	93	60.8	57.4	87.5
10 Lordsdale	32.2	9.5	27.9	55.1	50.6	50.9	16	25.2	6.8	***	68.4	91.5	69.3	92.7	91.5	61.7	57.4	87.1
11 Taejon-98	34.1	27.6	39.7	42.7	52.4	51.8	33.2	36.6	35.9	34.4	***	67.2	68.7	69.3	67.2	77.8	57.1	68.2
12 Pusan-98	32.6	9.8	27.4	50.6	50.6	52.8	20.1	25.2	7.2	8.9	36	***	70.2	94.5	100	63.5	58.1	85.9
13 Pusan-99-1	11.7	22.9	34.1	50.1	44.3	48.9	25.9	31.3	32.7	31.7	32.2	30.8	***	70.5	70.2	68.1	62	64.3
14 Seoul-99-1	32.2	9.8	28.3	49.4	51.2	51.4	18	25.2	6.4	7.4	32.8	5.4	30.8	***	94.5	62.3	59.3	88.4
15 Pusan-99-2	32.6	9.8	27.4	50.6	50.6	52.8	20.1	25.2	7.2	8.9	36	0	30.8	5.4	***	63.5	58.1	85.9
16 Seoul-99-2	34.7	35.1	46.1	45.9	47.6	50.6	38.7	42.1	41.9	40.8	24.9	38.1	32.8	39.8	38.1	***	55.9	60.1
17 Wonju-99	46.6	37.5	50.1	27.8	28.6	12.8	45.4	46.5	49.6	49	50	48.4	44.9	46.1	48.4	51.2	***	55.9
18 Hawaii	35	13.1	30.3	51.6	52.9	47.9	19.2	28.9	12.9	13.3	32.7	15	36.1	12.1	15	42.3	49.1	***

Similarity = 100 x sum of the matches/length-gap residues-gap residues

Divergence = 100 x distance/total distance

Distance = sum (residue distances) + (gaps x gaps penalty) + (gap residues x gap length penalty)



**Table 4.** Comparison of amino acid sequences of Korean isolates and related foreign isolates

Amino acid	Percentage of similarity																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1 Yuri	***	84.4	82.6	68.2	68.2	69.1	63.3	82.7	85.3	82.7	82.6	79.8	82.6	97.2	82.6	82.6	81.7	64.2	78.6
2 Desetshild	17.5	***	89	66.1	68.8	69.7	93.6	91.7	94.5	94.5	82.6	82.6	94.5	84.4	94.5	94.5	79.8	68.8	92.2
3 Mexico	19.9	11.9	***	61.5	64.2	61.5	89.9	97.2	88.1	88.1	76.1	88.1	82.6	88.1	88.1	75.2	62.4	83.5	
4 Norwalk	41.3	45	53.6	***	95.5	82.6	62.7	63.3	62.7	62.4	67	62.4	67	62.4	62.4	67.9	85.3	61.2	
5 Southampton	39.8	40.3	48.4	4.7	***	84.4	65.5	66.1	65.5	65.1	66.1	65.1	67.9	65.1	65.1	67	87.2	64.1	
6 Saratoga	50.1	38.7	53.6	19.9	17.5	***	64.2	63.3	67	67	65.1	67	62.4	67	67	66.1	94.5	65	
7 Snowmountain	19.7	6.7	10.9	51.2	46.1	48.4	***	92.7	97.3	97.2	78.9	94.5	82.6	97.2	94.5	76.1	63.3	92.2	
8 Toronto	16.4	8.8	2.8	50.1	45	50.1	7.7	***	90.8	90.8	78.9	90.8	85.3	90.8	90.8	78	64.2	86.4	
9 Camberwell	19.7	5.7	13	51.2	46.1	43.4	2.8	9.8	***	100	79.8	97.2	81.7	100	97.2	77.1	66.1	95.1	
10 Lordsdale	19.9	5.7	13	51.8	46.7	43.4	2.8	9.8	0	***	79.8	97.2	81.7	100	97.2	77.1	66.1	95.1	
11 Taejon-98	23.6	19.9	28.8	43.4	45	46.7	24.8	24.8	23.6	23.6	***	80.7	78.9	79.8	80.7	92.7	64.2	77.7	
12 Pusan-98	19.9	5.7	13	51.8	46.7	43.4	5.7	9.8	2.8	2.8	22.3	***	81.7	97.2	100	78	66.1	94.2	
13 Pusan-99-1	2.8	17.5	19.9	43.4	41.8	51.8	19.9	16.4	21.1	21.1	24.8	21.1	***	81.7	81.7	80.7	64.2	77.7	
14 Seoul-99-1	19.9	5.7	13	51.8	46.7	43.4	2.8	9.8	0	0	23.6	2.8	21.1	***	97.2	77.1	66.1	95.1	
15 Pusan-99-2	19.9	5.7	13	51.8	46.7	43.4	5.7	9.8	2.8	2.8	22.3	0	21.1	2.8	***	78	66.1	94.2	
16 Seoul-99-2	21.1	23.6	30.1	41.8	43.4	45	28.8	26.1	27.4	27.4	7.7	26.1	22.3	27.4	26.1	***	67	73.8	
17 Wonju-99	48.4	40.3	51.8	16.4	14.1	5.7	50.1	48.4	45	45	48.4	45	48.4	45	45	43.4	***	64.1	
18 Hawaii	23.9	7.1	17.5	52.3	46.8	45.1	7.1	13.9	4	4	25.2	5	25.2	4	5	30.8	46.8	***	

Similarity = 100 x sum of the matches/length-gap residues-gap residues

Divergence = 100 x distance/total distance

Distance = sum (residue distances) + (gaps x gaps penalty) + (gap residues x gap length penalty)

rotavirus와 SRSV에 대해 수행 한 결과 rotavirus는 분리되지 않았으며, 1건에서 small round structured virus를 확인하여 염기서열 분석을 수행하였다.

증폭된 330 bp의 염기서열과 국립보건원에서 분리되어 확인된 다른 분리주 6개의 동일 부위의 nucleotide 및 amino acid sequence를 비교해 본 결과 (Figures 2, 3) nucleotide level에서의 homology는 55.9~62.0% (Table 1), amino acid level에서의 homology는 64.2 ~67.0% (Table 2)로 보존성이 비교적 높은 부위로 알려져 있는 RNA dependent RNA polymerase 부위에서도 nucleotide 또는 amino acid

가 상당히 다른 것을 알 수 있었다. 국내 분리주 뿐 아니라 해외에서 분리된 바이러스들과 함께 sequence 분석을 실시한 결과 nucleotide level에서는 55.9~87.5% (Table 3), amino acid level에서는 62.4~94.5%의 homology를 보였다 (Table 4).

Pusan-98, Pusan-99-2, Seoul-99-1, Pusan-99-1, Taejon-98, Seoul-99-2, Wonju-99는 국내 분리주로 각각 부산, 서울, 대전, 원주 등지에서 분리되었으며 국외 분리주의 EMBL/GenBank/DBJ Access No.와 참고문헌은 Table 5와 같다.

한편 국내에서 분리된 7개의 분리주를 서로 비

Table 5. 인용된 국외 분리주의 GenBank Access No.와 분리국가명

분리주명	Access No.	분리국	Reference
Camberwell	AF145896	Australia	Seah 등 (23)
Lordsdale	X86557	U.K.	Dingle 등 (8)
Hawaii	U07611	Hawaii	Lew 등 (17)
Desertshield	U04538	U.S.A. (Saudi Arabia)	Lew 등 (16)
Snowmountain	L23831	U.S.A.	Wang 등 (25)
Mexico	U22498	Mexico	Jiang 등 (12)
Toronto	U02030	Canada	Lew 등 (19)
Yuri	AB001929	Japan	Saito 등 (22)
Norwalk	M87661	U.S.A.	Jiang 등 (13)
Southampton	L07418	U.K.	Lambden 등 (16)
Saratoga	U07614	U.S.A.	Lew 등 (18)

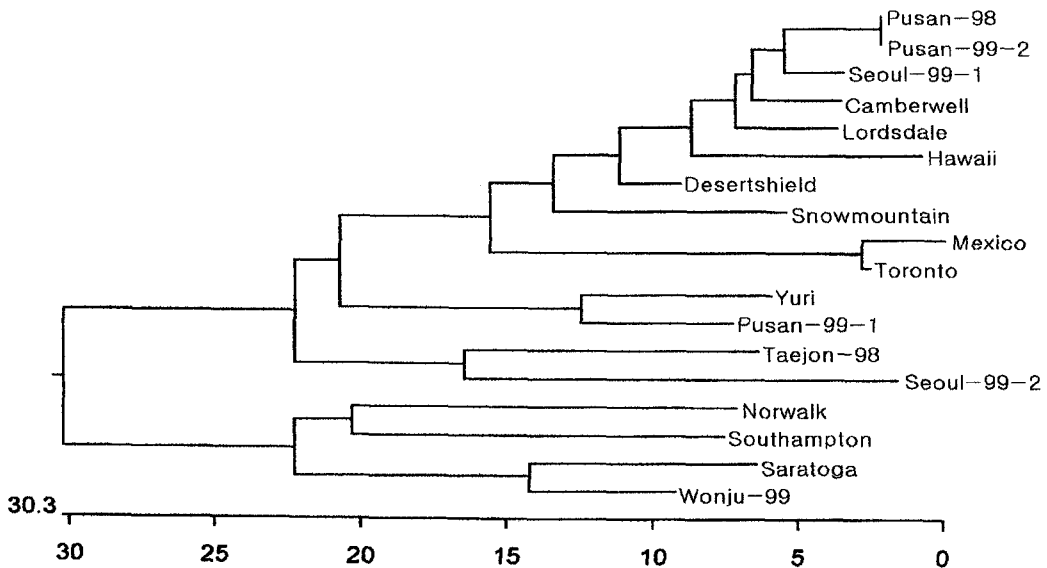


Figure 4. Phylogenetic tree of the RNA dependent RNA polymerase region of Korean isolates and SRSV-related foreign isolates.

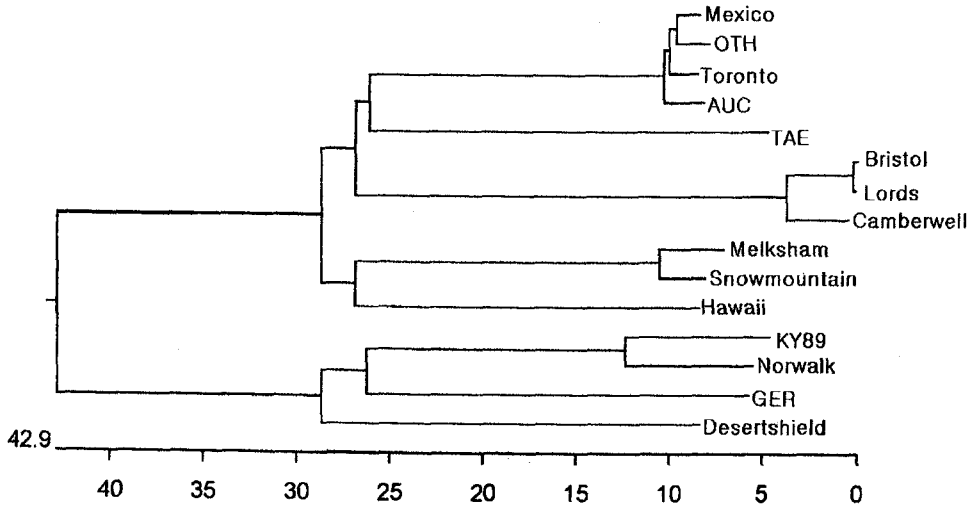


Figure 5. Phylogenetic tree of the capsid region of Korean and foreign isolates of SRSV.

교해 보면 nucleotide와 amino acid level에서 각각 55.9~100%, 64.2~100.0%의 similarity/homology를 나타내었으며 (Tables 1, 2) 국내 분리주 7개를 해외 분리주 11개와 함께 비교해 보면 nucleotide와 amino acid level에서 각각 55.9~93.6%, 62.4~100.0%의 similarity/homology를 보였다 (Tables 3, 4).

Sequence를 한 눈에 비교해 보기 위해 Clustal Method로 phylogenetic tree를 그려본 결과 원주 분리주는 해외 분리주인 Saratoga virus와 가장 근접한 것을 알 수 있었으며 해외 분리주들 보다 국내 분리주 들간에 서로 clustering하는 양상을 보이지 않고 같은 부산지역에서 다른 시기에 분리된 바이러스 분리주라도 sequence가 서로 상이함을 발견하였다 (Figure 4).

본 연구에서 바이러스 검색을 위해 사용한 RNA dependent RNA polymerase (RDRP) 부위 이외에 capsid 부위의 염기서열을 비교하여 genogrouping한 결과를 보면 RNA dependent RNA polymerase의 일부 sequence를 바탕으로 작성한 phylogenetic tree와는 상당히 다른 것을 알 수 있었다 (Figure 5). RDRP의 염기서열은 capsid보다 보존성이 높아 진단에 주로 사용되며 genogrouping은 다양성이 높은 capsid 부위를 사용하는 것이 일반적이다 [10]. 원주 분리주에 대한 capsid 부위의 염기서열 분석은 현재 진행 중이기 때문에 phylogenetic tree에 포함시키지 않았다. 본 연구에서 분리된 원주 분리주는 RNA-dependent RNA polymerase를 비교해 볼 때 발표된 Saratoga virus [13]와

87.5%의 nucleotide level homology와 94.5%의 amino acid level homology를 보여 phylogenetic tree 상에서 가장 근접해 있었으며 서울, 부산, 대전 등지에서 분리한 국내 분리주와는 상이한 sequence를 가지고 있음을 확인하였다.

## 고찰

Small round structured virus를 포함한 family *Caliciviridae*의 분류는 아직 정립되어 있지 않아 많은 연구자들이 혼돈을 겪고 있는 상태이다. 흔히 capsid protein의 sequence를 기준으로 Genus Sapporo-like viruses, Genus Norwalk-like virus 그리고 Genus Vestivirus, Genus agovirus로 구분하며 Genus Norwalk-like virus는 다시 genogroup I과 II로 구분된다.

Capsid 부위를 기초로 Genogroup I에 속하는 것으로 알려져 있는 Desert Shield virus, Norwalk virus, Southampton virus, Saratoga virus와 Genogroup II에 속하는 것으로 알려져 있는 Snowmountain virus, Toronto virus, Camberwell virus, Lordsdale virus 등의 strain이 RNA dependent RNA polymerase 부위를 기초로 작성한 phylogenetic tree에서는 상이한 clustering 양상을 보임을 알 수 있었다 [4-8, 13, 16, 18, 19, 23, 25]. 특히 Desert Shield virus는 genogroup II에 속하는 바이러스들 쪽으로 clustering 하는 양상을 보여 주었다. 이러한 양상은 capsid 부위의 염기서열보다는 RNA dependent

RNA polymerase 부위의 염기서열이 변이가 상대적으로 적어 phylogenetic tree 상에서 genogroup 간에 서로 섞이는 것으로 해석할 수 있을 것이다.

RNA dependent RNA polymerase를 기초로 한 비교에서 원주 분리주는 국립보건원에서 genogroup II에 속하는 것으로 확인한 다른 국내 분리주보다 오히려 미국에서 분리된 Saratoga virus [18]와 가장 근접한 sequence를 가지고 있어 Genogroup I에 속함이 확인되었다. 본 연구에서 분리한 원주 분리주가 genogroup I에 속함이 확인됨으로써 1999년 국내에서는 SRSV genogroup I과 genogroup II가 모두 유행했던 것으로 사료된다.

국내 분리주 중 1999년에 부산에서 분리된 한 분리주는 같은 부산지역에서 1998년에 분리된 strain과 nucleotide sequence가 100% 일치하였으나 1999년에 부산지역에서 분리된 다른 strain과는 nucleotide와 amino acid level에서 각각 70.2%와 81.7%의 일치를 보여 흥미로운 양상을 보였다.

앞으로 본 연구에서 사용한 국내 분리주에 대해 RNA dependent RNA polymerase 부위 외에 capsid 부위의 full sequence를 비교해 보고 더 나아가 국립보건원에서 확보하고 있는 다른 분리주들의 capsid와 RNA dependent RNA polymerase sequence를 해외 분리주들과 비교하여 분석할 계획이다.

## 결 론

1. 원주 소재 초등학교 학생들 중에서 집단으로 발생한 설사 환자 중 5명의 분변 가검물에 대해 rotavirus와 SRSV small round structured virus를 검사한 결과 1명의 가검물에서 SRSV를 검출하였다.

2. 확인된 바이러스의 nucleotide 및 amino acid sequence를 국내의 다른 분리주 및 해외 분리주와 비교분석해 본 결과 본 연구에서 확인된 SRSV는 다른 6개의 국내 분리주와는 sequence가 상이하고 오히려 미국 분리주인 Saratoga virus와 가장 유사한 sequence를 가지고 있음을 확인하였다.

3. 1999년에 검출된 다른 국내 분리주와 달리 본 검사에서 확인된 원주 분리주는 SRSV genogroup I에 속하며 이러한 근거를 바탕으로 국내에서 검출되는 SRSV의 다양성을 확인하였다.

## 참 고 문 헌

- 1) 강신재, 남기범, 조양자, 김경희: Baculovirus에서 발현된 Norwalk virus 캡시드 항원에 대한 국내인의 혈청학적 반응도. *J Korean Soc Virology* 27: 161-168, 1997.
- 2) 장미운, 양재명, 김경희: Expression and Antigenicity of Replicase 단백질의 발현 및 항원성 평가. *J Korean Soc Virology* 27: 151-160, 1997.
- 3) 한동표, 김지애, 양재명, 김경희: 한국형 Calicivirus의 RNA-dependent RNA polymerase Diversity. *J Korean Soc Virol* 1: 1-8, 1997.
- 4) Ando T, Monroe SS, Gentsch JR, Jin Q, Lewis DC, Glass RI: Detection and differentiation of antigenically distinct small round structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and Southern Hybridization. *J Clin Microbiol* 33: 64-71, 1995.
- 5) Ando T, Mulders MN, Lewis DC, Estes MK, Monroe SS, Glass RI: Comparison of the polymerase region of small round structured virus strains previously classified in three antigenic types by solid-phase immune electron microscopy. *Arch Virol* 135: 217-226, 1994.
- 6) Cauchi MR, Doultree JC, Marchall JA, Wright PJ: Molecular characterization of Camberwell virus and sequence variation on ORF 3 of small round structured (Norwalk-like) viruses. *J Med Virol* 49: 70-76, 1996.
- 7) Cubitt WD, Jiang XJ, Wang J, Estes MK: Sequence similarity of human caliciviruses and small round structured viruses. *J Med Virol* 43: 252-258, 1994.
- 8) Dingle KE, Lambden, Caul EO, Clarke IN: Human enteric *Caliciviridae*: the complete genome sequence and expression of virus-like particles from a genetic group II small round structured virus. *J Gen Virol* 76: 2349-2355, 1995.
- 9) Green SM, Dingle KE, Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN: Human enteric *Caliciviridae*: A new prevalent small round structured virus group by RNA-dependent RNA polymerase and capsid diversity. *J Gen Virol* 75: 1883-1888, 1994.

- 10) **Green SM, Lambden PR, Caul EO, Clarke IN:** Capsid sequence diversity in small round structured viruses from recent outbreaks of gastroenteritis. *J Med Virol* **52:** 14-19, 1997.
- 11) **Jiang X, Graham DY, Wang K, Estes MK:** Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* **250:** 1580-1583, 1990.
- 12) **Jiang X, Matson DO, Velazquez FR, Calva JJ, Zhong WM, Hu J, Ruiz-Palacios GM, Pickering LK:** Study of Norwalk-related viruses in Mexican children. *J Med Virol* **47:** 309-316, 1995.
- 13) **Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK:** Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* **195:** 51-61, 1993.
- 14) **Kapikian AZ, Chanock RM:** Norwalk group of viruses. In: *Virology*, edited by Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, Hirsch MS, Melnick JL, Monath TP, Roizman B (eds): "Virology", Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.
- 15) **Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN:** Sequence and genome organization of a human small round structured (Norwalk-like) virus. *Science* **259:** 516-519, 1993.
- 16) **Lambden PR, Liu B, Clarke IN:** A conserved sequence motif at the 5' terminus of the Southampton virus genome is characteristic of the *Caliciviridae*. *Virus Genes* **10:** 149-52, 1995.
- 17) **Lew JF, Kapikian AZ, Jiang X, Estes MK, Green KY:** Molecular characterization and expression of the capsid protein of a Norwalk-like virus recovered from a Desert Shield troop with gastroenteritis. *Virology* **200:** 319-325, 1994a.
- 18) **Lew JF, Kapikian AZ, Valdesuso J, Green KY:** Molecular characterization of Hawaii virus and other Norwalk-like viruses: evidence for genetic polymorphism among human caliciviruses. *J Infect Dis* **170:** 535-542, 1994c.
- 19) **Lew JF, Petric M, Kapikian AZ, Jiang X, Estes MK, Green KY:** Identification of Minireovirus as a Norwalk-like virus in pediatric patients with gastroenteritis. *J Virol* **68:** 3391-3396, 1994d.
- 20) **Liu BL, Clarke IN, Caul EO, Lambden PR:** Human enteric caliciviruses have a unique genome structure and are distinct from the Norwalk-like viruses. *Arch Virol* **140:** 1345-1356, 1995.
- 21) **Noel JS, Ando T, Leite, JP, Green KY, Dingle KE, Estes MK, Seto Y, Monroe SS, Glass RI:** Correlation of patient immune responses with genetically characterized small round structured viruses involved in outbreaks of non-bacterial acute gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995. *J Med Virol* **53:** 372-383, 1997.
- 22) **Saito H, Saito S, Kamada K, Harata S, Sato H, Morita M, Miyajima Y:** Application of RT-PCR designed from the sequence of the local SRSV strain to the screening in viral gastroenteritis outbreaks. *Microbiol Immunol* **42:** 439-446, 1998.
- 23) **Seah EL, Marshall JA, Wright PJ:** Open reading frame 1 of the Norwalk-like virus Camberrwell: completion of sequence and expression in mammalian cells. *J Virol* **73:** 10531-10535, 1999.
- 24) **Vipond IE, Caul EO, Lambden PR, Clarke IN:** 'Hyperemesis hiemis': new light on an old syndrome. *Microbiology Today* **26:** 110-112.
- 25) **Wang J, Jiang X, Madore HP, Gray J, Desseberger U, Ando T, Seto Y, Oishi I, Lew JF, Green KY, Estes MK:** Sequence diversity of small rotund structured viruses in the Norwalk virus group. *J Virol* **68:** 5982-5990, 1994.
- 26) **User's Guide, Lasergene Biocomputing Software for WINDOWS, A manual for the Lasergene System, October 1997.**