

부산지역 노로바이러스의 유전적 분석

김광일 · 진지웅 · 정현도[†]

부경대학교 수산생명의학과

Genetic analysis of noroviruses in Busan

Kwang Il Kim, Ji Woong Jin and Hyun Do Jeong[†]

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, South Korea 619-705, Korea

For detection of noroviruses (NVs), we compared various PCR primer sets based on reverse transcription nested PCR (RT-nested PCR) in the water samples from Dong brook in Busan, South Korea. We designed various new primer sets based on the most conserved sequences of the capsid protein gene that react with diverse NVs found in Korea. Designed primer sets (KG1F/KG1R and KG2F/KG2R, named as PNK) for the respective genogroups of NVs, genogroup I and II (GI and GII), were applied to detect NVs in the water samples from Dong brook concentrated with ultracentrifugation. In the application to the water samples, proportion of GI (76.47%) and GII (70.59%) in water samples of Dong brook in RT-nested PCR with the primer sets of this study. However, no significant differences of the proportion of the positive samples were not found between RT-nested PCRs with reported and newly designed primer sets. From the nucleotide sequencing, GI and GII of NVs present in Dong brook were appeared to be the members of 1/2/4/5/9/10 genotypes, and 3/4/5/11/13 genotypes respectively. Appeared genotype 4 of GII known as an one of main genotype found in patients of many Asian countries warned us to consider the risks of norovirus in aquatic environments in southern part of Korea.

Key words : Norovirus, Water, RT-nested PCR, Genogroup, Genotype

식중독을 유발하는 바이러스 중 노로바이러스는 매우 전염력이 강하며, 10 particles 이하의 소량만으로도 감염이 가능하다. 노로바이러스의 감염경로는 오염된 식수 및 어패류 등의 생식을 통한 감염, 사람과 사람사이의 전파를 통한 감염, 구토에 의한 비말형성 등을 통해 감염이 가능하다고 보고되었다 (Donlin *et al.*, 1972; Kaplikian *et al.*, 1972). 또한 노로바이러스에 오염된 물은 매우 먼 거리로 바이러스를 이동시키고

또한 오염된 물로 생산된 농산품 자체의 오염을 유도하기도 한다. 우리나라에서 노로바이러스로 인한 식중독 발생 비율이 2004년 7.9%에서 2008년 19.5%로 증가하였으며, 노로바이러스에 의한 식중독 환자 비율도 2004년 8.9%에서 2008년 28.1%로 증가하였다 (KFDA, Korea Food and Drug Administration).

노로바이러스는 분자 역학적으로 Caliciviridae에 속하고 형태적으로 크기가 직경 약 27nm로 envelope를 가지고 있지 않으며, 약 7.6kb의 polyadenylated positive single strand RNA로 3개의 open reading frames (ORFs) 가 존재한다. ORF1은 viral 3C-like protease에

[†]Corresponding author : Hyun Do Jeong

Tel : +82-51-629-5941, Fax : +82-51-629-5938

E-mail : jeonghd@pknu.ac.kr

의하여 RNA dependent RNA polymerase (RdRp) 를 포함하여 6개의 단백질로 분리되는 nonstructural polyprotein을 encoding한다 (Belliot *et al.*, 2003). ORF2 와 ORF3은 60kDa의 major capsid proteins (VP1) 과 20kDa의 minor capsid proteins (VP2) 를 encoding한다. VP1 단백질은 P (protruding, P1과 P2) 와 S (shell) 의 두 개의 구조로 구성되어 있는데, P 도메인은 세포 수용체 결합부위를 가지고 세포간의 상호작용과 면역인자의 역할을 수행한다. P2 sub-domain은 바이러스의 표면적을 확장하며 유전자내의 가장 많은 염기서열 차이를 나타낸다. 그리고 VP2는 VP1의 발현과 안정성에 필요하다. 따라서 capsid protein은 바이러스의 shell 구조를 제공할 뿐만 아니라 세포 수용체 결합부위를 가지고 있어 viral phenotype 또는 serotype 을 결정한다고 알려져 있다 (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2003; Chakravarty *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 1990, 1993).

노로바이러스는 유전학적 및 면역학적으로 매우 다양한 바이러스로 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) 와 capsid protein VP1의 서열에 따라 크게 5개의 genogroup G I-G V로 분류되며, 사람에게서는 주로 G I, G II, G IV가 검출된다 (Ando *et al.*, 2000; Katayama *et al.*, 2002).

노로바이러스의 검출방법은 전자현미경 (EM), 면역전자현미경 (Immune electron Microscopy), 효소면역측정법 (ELISA), RT-PCR (Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction), qPCR을 이용한 방법 등이 있다 (Kageyama *et al.*, 2003; Nishida *et al.*, 2003).

최근 노로바이러스를 검출하기 위해 RT-PCR 및 qPCR을 통한 분자생물학적 방법이 일반적인 검출 방법으로 이용되고 있으나 (Kageyama *et al.*, 2004; Richards *et al.*, 2004), 식품 또는 환경 중에 오염된 바이러스양이 극미량이고 시료 내에 존재하는 다양한 물질이 PCR inhibitor로 작용하여 유전자 증폭을 방해

하기도 하며, 노로바이러스의 염기서열의 변이가 심하여 모든 노로바이러스의 검출에 어려움이 있다. 따라서 최근 식품 중 바이러스의 농축 및 추출, PCR inhibitor의 제거 방법이 다양하게 연구되고 있는 실정이다. 특히, 패류 및 물에서부터 viral RNA를 추출 및 농축하기 위해서 polyethylene glycol (PEG) 을 이용한 침전법, antibody capture, Heat release, immunomagnetic separation, positive charged membrane을 이용한 농축 등의 다양한 방법들이 알려져 있다 (Abbaszadegan *et al.*, 1993; Atmar *et al.*, 1995; Katayama *et al.*, 2002; Lewis and Jaykus *et al.*, 1996; Metcalf *et al.*, 1988; Mullendore *et al.*, 2001; Park and Go, 2006).

따라서 본 연구에서는 초고속 원심분리를 실시하여 물에 오염된 노로바이러스를 농축하였으며, 이후 우리나라의 수계에서 가장 많이 검출되는 노로바이러스의 유전자 비교에 의하여 한국형 노로바이러스의 검출에 가장 적합한 PCR primer를 선정하였다. 이를 이용하여 도시에 위치한 하천인 동천에 오염된 노로바이러스를 RT-nested PCR을 통해 검출하였다. 또한 PCR primer 차이에 의해 검출 되는 노로바이러스의 variant를 분석하고자 검출된 노로바이러스에 대해 염기서열 분석 및 계통 발생학적으로 비교하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 물은 2006년 12월에서 2009년 7월에 사이에 동천 (부산진구) 에서 500ml을 채수하여 사용하였다. 채수한 물은 4°C에 보관하였으며, 채수 후 24시간 내에 실험에 사용하였다.

물에 오염된 바이러스 농축 및 RNA 추출

채수한 물 500ml을 초고속원심분리기 (Beckman

Coulter Optima™ L-100XP BioSafe Centrifuge System, USA) 를 사용하여 200,000 × g로 1시간 30분간 4°C에서 원심분리하여 상정액을 제거하고, 500µl의 멸균 증류수로 pellet을 현탁하였다. 이후 RNA 추출은 QIAmp viral RNA mini kit (Qiagen Hilden, Germany) 을 사용하였다. 분리된 RNA는 실험 전까지 -20°C에서 보관하였다.

RT-nested PCR

노로바이러스 G I 과II의 variant를 확인하기 위해서 RNA dependent RNA polymerase (RdRp) 와 capsid protein 교차 부위 및 capsid protein gene으로부터 제작 되어 보고된 degenerated primer를 사용하여 cDNA를 합성하였다 (Anderson *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005). 합성된 cDNA을 사용하여 RdRp gene과 capsid protein gene을 target으로 하는, 보고된 primer 및 본 연구실에서 제작한 degenerated primers (PKN primer set) 를 이용하여 RT-nested PCR을 수행하였다 (Table 1).

Table 1. Primers used in this study

Primer	Sequence (5' to 3')*	Amplicon size (bp)	Reference
Norovirus Genogroup I			
COG1R	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	213	Kageyama <i>et al.</i> (2003)
Mon432	TGGACICGYGGICCYAAYCA		Anderson <i>et al.</i> (2001)
Mon434	GAAACGCATCCARCGGAACAT	313	Kim <i>et al.</i> (2005)
GI-F1M	CTGCCCGAATTYGTAAATGATGAT		
GI-F2	ATGATGATGGCGTCTAAGGACGC	196	This study
GI-R1M	CCAACCCARCCATRTTACATYTG		
KG1F	CCRGAGGTTAATAMWGCTGAACC	196	This study
KG1R	GWGGGCCYAATTGCAAATC		
Norovirus Genogroup II			
COG2R	TCGACGCCAYCYCAYCACA	213	Kageyama <i>et al.</i> (2003)
Mon431	TGGACIAGRGGICCYAAYCA		Anderson <i>et al.</i> (2001)
Mon434	GGAYCTCATCCAYCTGAACAT	310	Kim <i>et al.</i> (2005)
GII-F3M	TTGTGAATGAAGATGGCGTTCGART		
GII-F1M	GGGAGGGCGATCGCAATCT	131	This study
GII-R1M	CCRCCIGCATRICCRTTRTACAT		
KG2F	CAACAATGAGGTTATGGCTYTKG	131	This study
KG2R	CTGTGAAYTCTMCASCAGG		

*Degenerate positions B:T/G/C, H:A/T/C, I:Inosine, K:G/T, M:A/C, N:A/T/G/C, R:A/G, S:C/G, W:A/T, Y:T/C

PCR tube에 reverse transcriptase 0.5µl, buffer 2µl, dNTP 2µl, 각각의 specific primer 1µl (GI-R1M, COG1R, GII-R1M, COG2R), total RNA 1µg을 넣고

total volume이 10µl가 되도록 Nuclease-free water를 첨가한 후, 42°C에서 60분, 99°C에서 5분간 반응시켰다. 여기서 만들어진 cDNA는 PCR에서 template로

사용하였다. PCR amplification은 Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler를 사용하였고 아래와 같은 방법으로 실시하였다.

10X PCR buffer 2 μ l, 200 μ M의 각각의 dNTP, 1 μ M의 sense primer와 1 μ M의 antisense primer (노로바이러스 genogroup I은 GI-F1M/GI-R1M, Mon432-COG1R, genogroup II는 GII-F1M/GII-R1M, Mon431/COG2R), Taq DNA polymerase (Taq DNA polymerase, Cosmo, Korea) 및 template 1 μ l를 첨가한 후 distilled water로 최종 volume이 20 μ l가 되도록 했다. PCR 혼합물은 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 pre-denaturation시킨 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30초 denaturation, 54 $^{\circ}$ C에서 30초 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 45초 extension의 반응을 35cycle 수행한 후 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 post-extension시켰다. Nested PCR을 수행하기 위해서는 First-PCR product 1 μ l과 1 μ M의 sense primer와 1 μ M의 antisense primer (genogroup I은 GI-F2/GI-R1M, Mon432/Mon434, KG1F/KG1R, genogroup II는 GII-F3M/GII-R1M, Mon431/433, KG2F/KG2R)를 사용하여 위와 동일한 방법으로 실시하였다.

PCR 후 증폭 산물은 0.5 \times TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA)를 전기영동을 위한 완충액으로 하여, 0.5 μ g/ μ l EtBr (Ethidium Bromide)이 첨가된 2% agarose gel (SeaKem[®] LE Agarose, CMBREX Bio Science Rockland, Inc., USA) 상에서 전기 영동한 후 UV 검출기 (Seoulin Scientific Co., Ltd., Korea)를 이용하여 전기영동상에서 검출되는 band의 길이를 관찰하여 노로바이러스 genogroup을 확인하였다.

Cloning

PCR 산물은 GeneAll[®] Ecpin[™] Gel SV (GeneAll Biotechnology, Korea)를 사용하여 정제하였고, 정제된 DNA는 pGEM[®]-T Easy Vector System I (Promega, USA)를 사용하여 ligation을 시킨 후, competent cell

(*E. coli* DH5 α -T1) 100 μ l를 첨가하여 얼음에서 30분간 반응시키고, 42 $^{\circ}$ C에서 40초간 heat-shock시켰다. 바로 얼음에 2~3분간 반응 후 SOC (Tryptone 20 g/L, Yeast extract 24g/L, NaCl₂, 250mM KCl 10mg/L, 10ml of a sterile solution of 1M MgCl₂, 20ml filter sterile 1M glucose/L) 배지 250 μ l 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C, 90분간 진탕 배양시켰다.

배양액을 Ampicillin 50 μ g/ml 과 X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, Sigma, USA) 40 μ g/ml이 첨가된 LB (Luria-Bertani, Difco, USA) 평판배지에 도말하여, 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양시켰다. 파란색과 흰색의 집락이 증식하는 것을 확인하고 흰색으로 나타나는 집락을 선택하여 Ampicillin 50 μ g/ml이 첨가된 LB broth에 접종 후, 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하여, GeneAll[®] Plasmid SV Mini kit (GeneAll Biotechnology, Korea)를 이용하여 plasmid를 분리하였다.

계통발생학적 분석

분리된 plasmid로부터 Big Dye Terminator Cycle DNA Sequencing Kit (ABI PRISM PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 삽입된 염기서열을 밝혔다. Capsid protein gene에 대한 각 노로바이러스의 genogroup의 염기서열은 MACAW program (Version 2.0.5, National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 사용하여 비교하였다.

또한, 본 연구에서 분리한 노로바이러스 genogroup I 과 genogroup II의 capsid protein partial gene을 Mega4 program (Version 4.0 R2., Based on CHAPM, USA)을 사용하여 계통수를 제작하여 계통 발생학적으로 비교, 분석하였다.

결 과

노로바이러스 검출을 위한 primer의 선정

노로바이러스 검출 시 적합한 primer를 선정하기 위하여 노로바이러스 양성 동천시료를 대상으로 RT-nested PCR법을 이용하여 RdRp gene과 capsid protein gene을 증폭하였으며 전기영동을 통해 증폭 산물을 확인하였다 (Fig. 1).

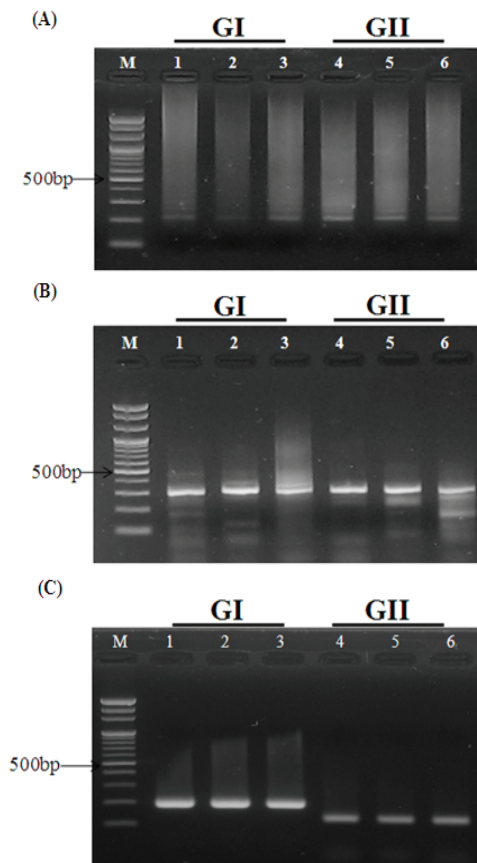


Fig. 1. Gel electrophoresis of amplicons generated by RT-nested PCR for the detection of norovirus genogroup I (Lane 1-3) and II (Lane 4-6) with different primer sets for samples of Dong brook. (A), Reported primer set for RdRp gene; (B), Reported primer set for capsid protein gene; (C), PKN primer set for capsid protein gene in this study. M, 100bp DNA ladder.

RdRp gene을 대상으로 Anderson *et al.* (2001) 이 보고한 primer를 이용하였을 때 213 bp의 G I, II를 각각 확인할 수 있었으며, capsid protein gene을 대상으로 기존에 보고된 primer set (Kim *et al.*, 2005) 를 이용한 경우, 313 bp의 G I, 311 bp의 G II 증폭산물을 각각 확인하였다. 그리고 본 연구에서 제작한 primer set인 PKN primer set (KG1F/KG1R, KG2F/KG2R) 를 사용하였을 때, G I 과 G II에서 각각 196bp 와 131bp 의 증폭산물을 확인하였다 (Fig. 1).

RT-nested PCR의 증폭산물의 전기영동 결과에서 RdRp gene을 target으로 하는 primer를 사용할 경우 band가 상대적으로 옅은 band가 확인되었으나 capsid protein gene을 target으로 하는 primer를 사용할 경우 뚜렷한 band를 관찰할 수 있었다. 결과적으로 노로바이러스의 검출을 위해서는 따라서 본 연구에서는 노로바이러스 검출을 위해서 특이적으로 노로바이러스를 증폭할 수 있는 capsid protein gene을 target으로 하는 primer set를 사용하였다. 또한, 동일한 시료들에 대하여 reported primer set와 본 연구에서 제작한 PKN primer set를 사용하여 PCR을 실시하고 나타난 양성 비율을 서로 비교하였을 때, G I 은 50% (3/6) 와 83.3% (5/6), 그리고 G II는 50% (3/6) 와 83.3% (5/6) 의 양성 비율을 각각 나타냈다 (Fig. 2). 결과적으로 동일한 시료를 대상으로 PKN primer set를 사용할 경우 reported primer set를 사용하는 것에 비해 노로바이러스의 검출빈도가 더 높다는 것을 알 수 있었다.

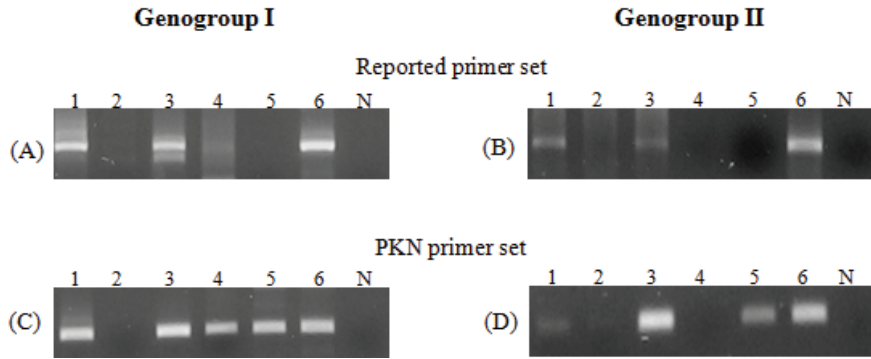


Fig. 2. Detection of cDNA of GI (GI-R1M) and GII (GII-R1M) noroviruses using RT-nested PCR in samples of Dong brook. Nested PCR with different primer sets: (A) GI-F1M/GI-R1M, GI-F2/GI-R1M (B) GII-F1M/GII-R1M, GII-F3M/GII-R1M (C) GI-F1M/GI-R1M, KG1F/ KG1R (D) GII-F1M/GII-R1M, KG2F/KG2R

동천에 오염된 노로바이러스의 검출

2006년 12월부터 2009년 7월 사이 동천시료를 대상으로 reported primer set와 PKN primer set을 이용하여 RT-nested PCR을 수행한 결과, 노로바이러스 G I 과 G II를 모두 검출할 수 있었다 (Table 2). 검출된 노로바이러스의 양성 비율을 비교해 본 결과, 2007년 8월 시료에서 reported primer set를 사용하였을 경우, G I을 검출할 수 있었으나 PKN을 사용하였을 경우 검출할 수 없었다. 그리고 2008년 11월과 12월 시료

에서는 reported primer set를 사용할 경우 G I을 검출할 수 없었지만 PKN primer set를 사용하여 검출할 수 있었다. 전체적인 양성 비율은 reported primer set에서 노로바이러스 G I은 76.47% (13/17), G II는 64.70% (11/17) 로 나타났으며, PKN primer set를 사용하였을 경우 노로바이러스 G I이 76.47% (13/17), G II는 70.59% (12/17) 로 나타났다. 노로바이러스 G I 과 II가 같이 존재하는 비율은 각각의 primer set에 대해서 52.94% (9/17), 58.82% (10/17) 로 나타났다.

Table 2. Detection of NVs with different primer sets in water samples of Dong brook

Sample Time (month/year)	Reported primers ^a		PKN ^b	
	GI	GII	GI	GII
12/2006	++	++	+++	++
03/2007	++	-	++	-
06/2007	-	+	-	-
08/2007	++	+	-	++
11/2007	+	+	+	+
12/2007	+	+	++	++
01/2008	+++	++	+	+
02/2008	+	++	+	+

04/2008	-	-	-	+
06/2008	+	-	+	-
09/2008	+	-	-	-
11/2008	-	-	+	+
12/2008	-	+	++	+
01/2009	+	+	++	++
02/2009	+++	++	++	++
03/2009	++	++	+++	++
07/2009	++	-	+	-
Total	(13/17)	(11/17)	(13/17)	(12/17)

^a First PCR primer set: GI-F1M and GI-R1M for GI/GII-F1M and GII-R1M for GII; NestedPCR primer set: GI-F2 and GI-R1M for GI/GII-F3M and GII-R1M for GII

^b First PCR primer set: GI-F1M and GI-R1M for GI/GII-F1M and GII-R1M for GII; Nested PCR primer set (Dedigned primer set): KG1F and KG1R for GI/KG2F and KG2R for GII

노로바이러스의 오염 비율은 G I 이 G II 에 비해 검출되는 비율이 높았으며, 한 종류의 primer set를 사용할 경우 sample에 오염된 노로바이러스를 검출하지 못하는 경우도 있었으나 두 종류의 primer set를 함께 사용할 시 검출이 가능하였다.

노로바이러스의 계통발생학적 분석

PCR에 사용된 primer의 차이에 의해 검출되는 노로바이러스의 variant를 비교하기 위해, 두 종류의 primer set (reported primer set and PKN primer set)를 사용하여 검출된 노로바이러스 G I 과 G II 의 capsid protein gene sequence와 GenBank에 등재되어 있는 15개의 reference norovirus G I sequence 와 17개의 reference norovirus G II 을 비교 분석하였다. 또한 국내 존재하는 노로바이러스 gene과 비교하기 위해

Lee and Kim (2008) 에서 보고된 노로바이러스 gene 을 reference gene으로 MEGA4 program을 사용하여 계통 발생학적으로 비교 및 분석을 하였다.

Reported primer set를 사용하여 검출된 노로바이러스를 계통 발생학적으로 분석한 결과, 노로바이러스 G I 은 G I /1, G I /2, G I /4, G I /5, G I /9, G I /10 으로 6종류의 genotype으로 분류되었고, 노로바이러스 G II 는 G II /3, G II /4, G II /5, G II /11, G II /13의 5종의 genotype으로 분류되었다 (Fig. 3). 그리고 PKN primer set을 사용하여 검출된 노로바이러스를 계통 발생학적으로 분석한 결과, 노로바이러스 G I 은 G I /1, G I /2, G I /4, G I /5, G I /10 으로 5종류의 genotype으로 분류되었고, 노로바이러스 G II 에서는 G II /4, G II /5, G II /11, G II /13의 4종의 genotype으로 분류되었다 (Fig 4).

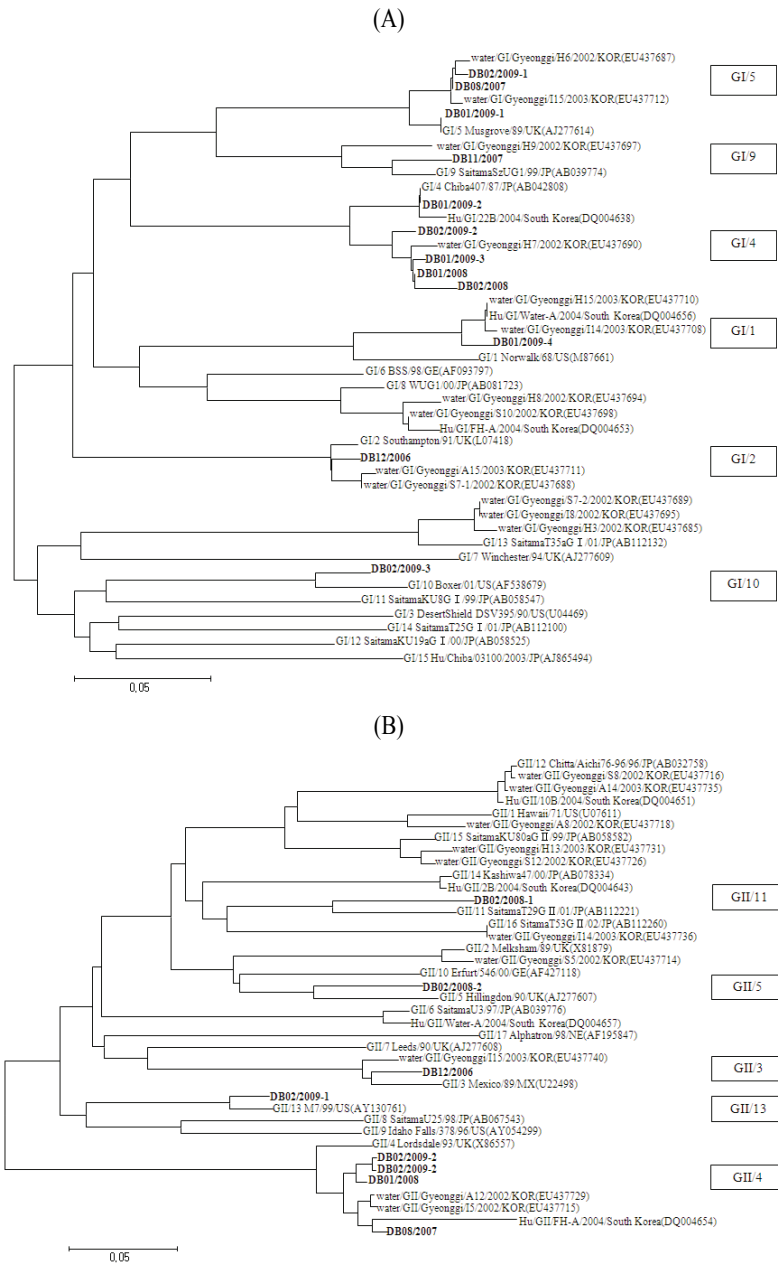


Fig. 3. Phylogenetic tree constructed based on partial sequences of Norovirus genogroup I & II capsid protein gene using the reported primer set obtained from Dong Brook samples. The tree was plotted using the neighbor-joining (N-J) method. (A), Norovirus genogroup I; (B), Norovirus genogroup II

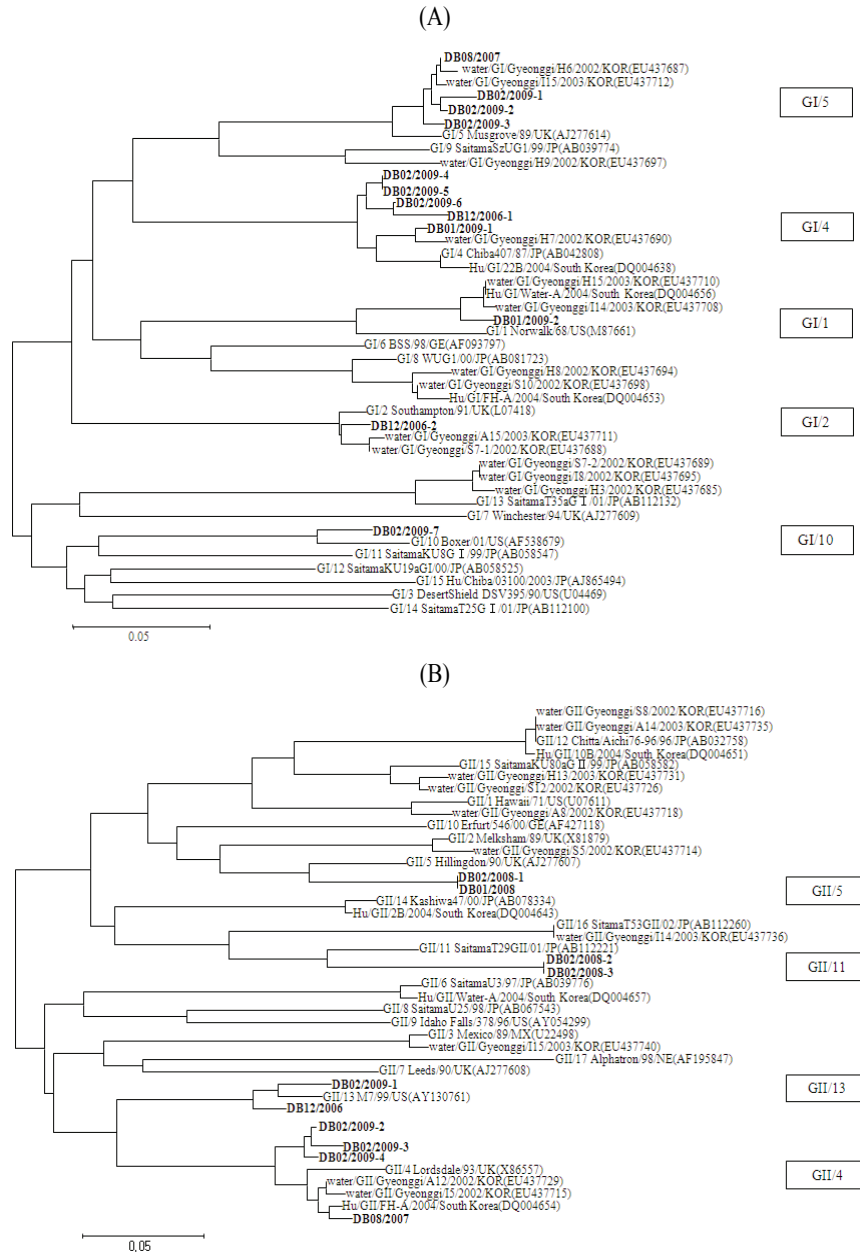


Fig. 4. Phylogenetic tree constructed based on partial sequences of Norovirus genogroup I & II capsid protein gene using PKN obtained from Dong Brook samples. The tree was plotted using the neighbor-joining (N-J) method. (A), Norovirus genogroup I; (B), Norovirus genogroup II.

고 찰

노로바이러스와 같은 enteric virus는 수인성 및 음식을 통해 전파되며 전염력이 매우 강하다. 노로바이러스에 오염된 지하수나 하수는 매우 먼 거리로 바이러스를 이동시키고 또한 생산된 농산물 자체의 오염을 유도하기도 한다. 노로바이러스는 감염된 사람에게 높은 농도로 존재하기 때문에 검출이 용이하나, 환경 중에 오염되었을 경우 낮은 농도로 존재하기 때문에 검출에 한계가 있으며 10 particles만으로도 감염성을 가지기 때문에 많은 문제가 되고 있다 (Kaplikian *et al.*, 1972).

본 연구에서는 부산 근교의 동천에서 채수한 시료를 대상으로 1) 초고속 원심분리를 통해 농축한 후 2) 서로 다른 primer set를 사용한 RT-nested PCR을 실시하여 노로바이러스를 검출하고 3) 검출된 노로바이러스의 유전적 특성을 비교하고자 하였다.

물에 오염된 노로바이러스를 농축하기 위해서 Katayama *et al.* (2002) 에 의해 보고된 charged membrane을 사용하는 방법이 널리 이용되나, 본 연구에서는 membrane 사용으로 인한 바이러스의 소실 및 시약사용의 번거로움을 피하고자 초고속원심분리를 사용하여 500ml의 물로부터 노로바이러스를 농축하였다. 그리고 노로바이러스는 염기서열의 변이가 극심하여 단일 primer로는 모든 노로바이러스가 검출되지 않기 때문에 본 연구에서는 우리나라에서 보고되는 노로바이러스와 GenBank에 등재되어 있는 다양한 variant를 배열하여 capsid protein gene 부위 내에서 variation 부위를 target으로 하는 새로운 degenerated primers set (PKN, KG1F/KG1R, KG2F/KG2R) 를 제작하여 사용하였다. 또한 노로바이러스 검출에 적합한 primer를 선정하기 위해 노로바이러스 양성 동천시료를 대상으로 노로바이러스의 RNA-dependent RNA polymerase gene (RdRp) 을

target으로 하는 primer set (Anderson *et al.*, 2001) 과 capsid protein gene을 target으로 하는 reported primers set (Kim *et al.*, 2005) 와 PKN primer set (This study) 의 두 가지 primer set를 사용하여 RT-nested PCR법을 통해 증폭하였으며 PCR 산물을 전기영동을 통해 확인할 수 있었다 (Fig. 1). RdRp gene을 target으로 하는 primer set를 사용하면 전기영동 상 상대적으로 열은 band가 확인되었으나 capsid protein gene을 target으로 하는 두 가지의 primer set를 사용하였을 때 뚜렷한 band를 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 이는 capsid protein gene을 검출하기 위해 사용된 primer set가 ORF2 5' end의 capsid N/S domain로 highly conserved된 부위를 증폭하기 때문이다. 따라서 본 연구에서는 노로바이러스의 capsid protein gene 부위를 RT-nested PCR를 통해 증폭하는 분석을 실시하였다. 그리고 동일 시료에 대해 capsid protein gene을 target으로 하는 primer들을 비교한 결과, 본 연구에서 제작한 PKN primer set가 reported primer set에 비하여 검출빈도가 높았다 (Fig. 2). 결과적으로 노로바이러스의 유전적 다양성 때문에 동일 시료에 대해서도 primer set간의 검출 비율의 차이가 나타났으며, 또한 노로바이러스의 검출에 있어서 capsid N/S domain을 target으로 하는 primer set가 RdRp gene을 target으로 하는 primer set보다 유전적으로 더욱 다양한 노로바이러스를 검출할 수 있다고 보고한 다른 실험실의 결과와 일치하였다 (Kojima *et al.*, 2001).

2006년 12월부터 2009년 7월 사이의 모니터링 결과에서 reported primer set를 사용할 경우 노로바이러스 G I 은 76.47% (13/17), G II는 64.70% (11/17) 로 나타났으며 PKN primer set를 사용할 경우 노로바이러스 G I 이 76.47% (13/17), G II는 70.59% (12/17) 로 나타났다. 노로바이러스 G I 과 II가 같이 존재하는 비율은 각각의 primer set에 대해서 52.94% (9/17), 58.82%

(10/17) 로 나타났다 (Table 2). 동천에서 검출되는 노로바이러스의 비율은 70% 정도로 Lee and Kim (2008)의 연구에서 경기도 일대의 강에서 검출되는 노로바이러스의 양성비율 55.2%보다 높게 나왔다. 이는 남부지방이 중부지방에 비해 노로바이러스의 오염 정도가 높을 수 있음을 의미한다고 할 수 있다.

노로바이러스는 계절에 상관없이 지속적으로 동천에서 검출되고 있으며 특히 비록 정량적 분석은 아니지만 11월부터 2월 사이의 시료에서 전기영동상의 band density가 가장 높게 나타나 노로바이러스의 계절적 유행시기와 일치함을 확인할 수 있었다 (data not shown). 그러나 여름철에도 노로바이러스가 검출이 되고 있는데 (Table 2), 이는 국내 2004년 5월 제주 지역 및 2006년 6월의 인천, 서울, 경기 지역 및 국외 2006년 5월 홍콩에서 발생한 집단식중독 사고에서 보듯 계절과 관계없이 산발적으로 발생하는 사례를 뒷받침해 주고 있다 (Ho *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2005).

PCR primer 차이에 의해 검출되는 노로바이러스의 variant를 분석하고자, 시료에서 검출된 노로바이러스에 대해 염기서열을 분석하고 계통발생학적으로 비교하였다. Reported primer set를 사용하여 동천에서 검출된 노로바이러스는 G I/1, G I/2, G I/4, G I/5, G I/9, G I/10, G II/3, G II/4, G II/5, G II/11, G II/13으로 분류되었으며, major genotype은 G I/4 (5/12), G I/5 (3/12), G II/4 (4/8) 으로 확인되었다 (Fig. 3). 그리고 PKN을 사용하여 검출된 노로바이러스의 genotype은 G I/1, G I/2, G I/4, G I/5, G I/10, G II/4, G II/5, G II/11, G II/13으로 분류되었으며, major genotype은 G I/4 (5/12), G I/5 (3/12), G II/4 (6/11) 이었다 (Fig. 4). 이러한 결과를 통해 부산 근교의 하천인 동천에서 검출된 노로바이러스는 다양한 genotype으로 존재하는 것을 알 수 있었고, 그것은 capsid protein gene을 target으로 한 두 종류의 primer

set를 사용한 PCR 결과에서 서로 유사한 genotype이라는 것을 보여 주었다. 그러나 지금까지 알려져 있지 않는 노로바이러스의 유전적 변이주가 상당히 존재하고 있음을 확인할 수 있어 향후 지속적인 새로운 genotype의 출현이 예상된다.

부산 지역의 동천에서 검출되고 있는 노로바이러스 genotype의 종류는 Lee and Kim (2008) 이 보고한 경기도 강 일대에서 검출되는 genotype과도 유사하였으나, major genotype (G I/4, G I/5, G II/4) 은 중부 지방에서 검출되는 major types (GI/1, G I/13, G II/15) 과는 차이가 났다. 이는 경기도 강 일대와 지리적인 차이 및 오염원의 차이 때문이라고 여겨진다.

Gong *et al.* (2008) 의 연구에서 국내에서 노로바이러스로 인한 식중독 사고의 주요 원인 genotype은 2005년에 G II/3, 2006년과 2007년에는 G II/4로 보고하고 있다. 그리고 중국은 G II/4, 일본에서는 G II/3, G II/4가 주요 genotype으로 유행된다고 보고되었다 (Okada *et al.*, 2005; Phan *et al.*, 2007). 특히 G II/4는 2002년과 2003년에 전 세계적으로 유행하는 노로바이러스의 genotype으로 알려져 있다 (Centers for Disease Control and Prevention, 2002). 또한 본 연구에서 동천에서 검출된 major type 중에 G II/4가 약 50%를 차지하고 있어 지금까지 아시아 국가에서 발생한 노로바이러스의 genotype과 유사함을 확인할 수 있었다. 그러므로 남부 수권 환경중의 G II/4 genotype 존재에 의한 빈도 높은 질병 발생은 남부 지역에서도 동일하다고 할 수 있을 것이다.

수중 오염된 노로바이러스의 검출을 위한 여러 종류의 RT-nested PCR의 primer의 비교에서 기존에 보고된 primer set 이외에도 본 연구실에서 한국형 노로바이러스들의 capsid protein gene 부위를 대상으로 새롭게 제작한 primer를 사용하여 노로바이러스의 검출의 특이성을 높였다.

부산 근교의 동천시료를 대상으로 실시된 모니터링 결과, 검출된 노로바이러스의 major genotype은 G I/4, GI/5, G II/4 으로서 중부 지방의 major types인 (GI/1, G I/13, G II/15) 과는 상이함을 확인할 수 있었으며, 아시아 각국에서 많은 문제를 일으키고 있는 G II/4가 major genotype으로 존재하고 있어 노로바이러스에 대한 위험성을 제고하게 하였다.

요 약

본 연구에서는 RT-nested PCR을 수행하여 부산 도심의 하천 중 동천에 존재하는 노로바이러스를 검출하고자 하였다. 기존에 보고되어진 노로바이러스의 capsid protein의 염기서열을 비교하여 노로바이러스 genogroup I, II (G I, II) 를 검출하기 위한 새로운 degenerated primer sets (PNK, KGIF/KGIR and KG2F/KG2R) 를 제작하였으며, 채수한 동천 시료를 초고속원심분리기를 통해 농축 후 물 속에 존재하는 노로바이러스의 검출을 시도하였다. 노로바이러스를 검출하기 위해 PCR primer를 비교한 결과 본 연구에서 제작한 capsid protein gene을 target으로 하는 primer set가 기존에 보고되어 있는 primer set보다 동일 시료에 대한 검출빈도가 우수하였다. 동천에 존재하는 노로바이러스의 오염 수준은 G I과 G II가 각각 76.47% (13/17), 70.59% (12/17) 로 나타났다. 그러나 기존에 알려진 primer와 본 연구에서 제작한 primer를 사용하였을 때 검출된 양성비율이 차이나지 않았다.

검출된 노로바이러스를 염기서열 비교를 통한 계통 발생학적 분석 결과, 동천에서 검출된 G I의 경우 1/2/4/5/9/10의 genotype이 G II의 경우 3/4/5/11/13의 genotype으로 분류되었다. 그리고 본 연구에서 검출된 major type 중 G II/4의 경우, 최근 아시아 각국에서

많은 문제를 일으키고 있는 major genotype으로 알려져 노로바이러스에 대한 위험성을 제고하게 하였다. 또한 이러한 결과는 국내의 강, 호수, 하천 등이 비슷한 노로바이러스의 G I, II의 genotype으로 오염되어 있음을 암시하며 수계환경 중 미생물의 질을 개선하기 위한 지속적인 노로바이러스의 모니터링이 요구된다.

사 사

“이 논문은 2010학년도 부경대학교의 지원을 받아 수행된 연구임 (PK-2010-108)”

참고문헌

- Abbaszadegan, M., Huber, M.S., Gerba, C.P. and Pepper, I.L.: Detection of enteroviruses in groundwater with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:1318-1324, 1993.
- Anderson, A.D., Garrett, V.D., Sobel, J., Monroe, S.S., Fankhauser, R.L., Schwab K.J., Bresee, J.S., Mead, P.S., Higgins, C., Campana, J. and Glass, R.I.: Outbreak Investigation Team. Multistate Outbreak of Norwalk-like Virus Gastroenteritis Associated with a Common Caterer. *American journal of epidemiology*, 154:1013-1019, 2001.
- Ando, T., Noel, J.S. and Fankhauser, R.L.: Genetic classification of “Norwalk-like viruses”. *Journal of Infectious Diseases*, 181 (Suppl. 2): S336-S348. 2000.
- Atmar, R.L., Neill, F.H., Romalde, J.L., Le Guyader, F., Woodley, C.M., Metcalf, T.G. and Estes, M.K.: Detection of Norwalk virus and hepatitis A viruses in shellfish tissues with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 3014-30189, 2005.

- Belliot, G., Sosnovtsev, S.V., Mitra, T., Hammer, C., Garfield, M. and Green, K.Y.: In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in Calicivirus-infected cells. *Journal of Virology*, 77:10957-10974, 2003.
- Bertolotti-Ciarlet, A., Crawford, S.E., Hutson, A.M. and Estes, M.K.: The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *Journal of Virology*, 77:11603-11615, 2003.
- Chakravarty, S., Hutson, A.M., Estes, M.K. and Prasad B.V.V.: Evolutionary trace residues in Noroviruses: importance in receptor binding, antigenicity, virion assembly, and strain diversity. *Journal of Virology*, 79:554-568, 2005.
- Dolin, R., Blacklow, N.R., DuPont, H., Buscho, R.F., Wyatt, R.G., Kasel, J.A., Hornick, R. and Chanock, R.M.: Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 140(2):578-583, 1972.
- Gong, Y.W., Oh, B.Y., Kim, H.Y., Lee, M.Y., Kim, Y.H., Go, J.M. Lee, J.M., Jeong, H.S. and Cheon, D.S.: Molecular Epidemiology Investigation of Norovirus infections in Incheon City, Korea, from 2005 to 2007. *Journal of Bacteriology and Virology*, 38:249-257, 2008.
- Ho, E.C., Cheng, P.K., Lau, A.W. and Lim, W.W.: Atypical norovirus epidemic in Hong Kong during summer of 2006 caused by a new genogroup II/4 variant. *Journal of Clinical Microbiology*, 45:2205-2211, 2007.
- Jaykus, L.A., De Leon, R. and Sobsey, M.D.: A virion concentration method for detection of human enteric viruses in oysters by PCR and oligoprobe hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2074-2080, 1996.
- Jiang, X., Graham, D.Y., Wang, K. and Estes, M.K.: Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 250:1580-1583, 1990.
- Jiang, X., Wang, M., Wang, K. and Estes, M.K.: Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 195:51-61, 1993.
- Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N. and Katayama, K.: Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses Based on Real-time quantitative Reverse Transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41:1548-1557, 2003.
- Kageyama, T., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Kojima, S., Takai R., Oka, T., Takeda, N. and Katayama, K.: Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 42:2988-2995, 2004.
- Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G., Dolin, R., Thornhill, T.S., Kalica, A.R. and Chanock, R.M.: Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Virology*, 10:1075-1081, 1972.
- Katayama, H., Simasaki, A., and Ohagaki, S.: Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Applied and Environmental*

- Microbiology, 68:1033-1039, 2002.
- Katayama, K., Shirato-Horikoshi, H., Kojima, S., Kageyama, T., Oka, T., Hoshino, F.B., Fukushi, S., Shinohara, M., Uchida, K., Suzuki, Y., Gojobori, T. and Takeda, N.: Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* 299:225-239, 2002.
- Kim, S.H., Cheon, D.S., Kim, J.H., Lee, D.H., Jheong, W.H., Heo, Y.J., Chung, H.M., Jee, Y. and Lee, J.S.: Outbreaks of gastroenteritis that occurred during school excursions in Korea were associated with several waterborne strains of norovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9):4836-4839, 2005.
- Kojima, S., Kageyama, T., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Shinohara, M., Uchida, K., Natori, K., Takeda, N. and Katayama, K.: Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *Journal of virological methods*, 100:107-114, 2002.
- Lee, C. and Kim, S.J.: The genetic diversity of human noroviruses detected in river water in Korea. *Water research*, 42(17):4477-4484, 2008.
- Mullendore, J.L., Sobey, M.D. and Shieh, Y.C.: Improved method for the recovery of hepatitis A virus from oyster. *Journal of Virology Methods* 94:25-35, 2001.
- Lewis, G.D. and Metcalf, T.G.: Polyethylene Glycol Precipitation for Recovery of Pathogenic Viruses, Including Hepatitis A Virus and Human Rotavirus, From Oyster, water and Sediment Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 54:1983-1988, 1988.
- Nishida, T., Nishio, O., Kato, M., Chuma, T., Kato, H., Iwata, H. and Kimura, H.: Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. *Microbiology and Immunology*, 51(2):177-184, 2007.
- Okada, M., Ogawa, T., Kaiho, I. and Shinozaki, K.: Genetic analysis of noroviruses in Chiba Prefecture, Japan, between 1999 and 2004. *Journal of Clinical Microbiology*, 43:4391-4401, 2005.
- Park, Y.B. and Ko, G.P.: Development of immunomagnetic separation and receptor-mediated methods for noroviruses. ASM meeting, 2007.
- Phan, T.G., Khamrin, P., Akiyama, M., Yagyu, F., Okitsu, S., Maneekarn, N., Nishio, O. and Ushijima, H.: Detection and genetic characterization of norovirus in oysters from China and Japan. *Clinical Laboratory*, 53:405-412, 2007.
- Richards, G.P., Watson, M.A., Fankhauser, R.L. and Monroe, S.S.: Genogroup I and II Noroviruses Detected in Stool Samples by Real-Time Reverse Transcription-PCR Using Highly Degenerate Universal Primer. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:7179-7184, 2004.
- Center for Disease Control and Prevention. Norovirus activity-United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 52:41-45, 2002.

Manuscript Received : September 27, 2011

Revised : November 25, 2011

Accepted : November 30, 2011