

## 다양한 PCR용 DNA 추출법에 의한 패류 내 *Megalocytivirus*의 검출

김진우\* · 조미영\* · 진지웅 · 김기홍 · 정현도 · 김광일†

\*국립수산과학원 수산생물방역과, 부경대학교 수산생명의학과

### Detection of *Megalocytivirus* in shellfish using PCR with various DNA extraction methods

Jin Woo Kim\*, Mi Young Cho\*, Ji Woong Jin, Ki Hong Kim, Hyun Do Jeong and Kwang Il Kim†

\*Aquatic life disease control division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea  
Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

In analysis of DNA viruses from the contaminated shellfish using PCR, preparation method of template DNA is an important factor to get enough copy number of viruses. In this study, we evaluated the efficiency of PCR template of *Megalocytivirus* (sT50mg-D) DNA obtained from 50 mg digestive gland homogenate of oyster using commercial method, and compared with that obtained from 5 g of the same tissues (T5g-D) after PEG precipitation procedures of virus. Both templates DNA suspended in the same volume of distilled water showed positive results by primary PCR with 35 cycles, and the presence of *Megalocytivirus* was confirmed in oysters collected from cultured farms in Korea. Moreover, PCR with sT50mg-D allowed us to discriminate the contaminated oyster individually, that can not be done in PCR with T5g-D prepared from the mixture of three different individual oyster to get 5 g digestive gland homogenate. In quantitative analysis with real time PCR, *Megalocytivirus* concentrations in 50  $\mu$ l templates prepared using 0.5~50 mg of one positive sample were appeared in the range  $6.14E+00 \sim 1.2E+02/\mu$ l. We were not able to get positive result using template DNA contained less than  $6.14E+00$  copies. Consequently, 2-step PCR performed with DNA extracts from oyster homogenate of small amount (sT50mg-D) i) was enough to detect the contaminated *Megalocytivirus* in shellfish, ii) allowed us to do the analysis for individual shellfish rather than mixture of several shellfish and iii) showed the presence of *Megalocytivirus* in oyster from Korea.

*Key words* : *Megalocytivirus*, Oyster, Digestive gland, Real time PCR

패류의 먹이섭취 과정인 filter-feeding을 통하여 Norovirus를 포함한 많은 종류의 사람 감염 수권 바이러스가 패류 장내로의 축적이 이루어는 것으로 알려져 있다. 이러한 패류의 위험 인자의 조직 내 축적 가능성 때문에 EU에서는 패류를 수산 생물에 대한

vector로 인정하여 Commission Regulation (EC) No 1251/2008를 제정하였으며, 특히 새우류에 감염되는 Taura syndrome, White spot disease의 경우, 포르투갈 굴 (*Crassostrea angulata*) 등 많은 종류의 패류가 구체적으로 vector로써 지정되고 있다.

우리나라는 어류 양식장과 패류 양식장이 서로 인접하여 존재하는 특성상 어류에서의 특정 질병 발

†Corresponding Author : Kwang Il Kim

Fax : +82-51-629-5938

E-mail : epinep@hanmail.net

병 이후 그 대상 병원체는 패류의 중장선 등에 특이적 또는 비 특이적으로 부착하고 이는 다시 병원체를 외부로 배출할 수 있는 잠재력을 가지고 있기 때문에 패류 자체가 수산 동물 질병 원인체의 reservoir 또는 carrier로서의 가능성이 크다고 할 수 있다.

현재 패류 시료 내에 존재하는 바이러스 분석을 위한 방법은 인간 감염 바이러스인 Norovirus 및 Hepatitis A의 존재 분석을 위하여 개발된 PEG 침전법을 사용하고 있어 대량의 시료와 함께 많은 시간과 노력을 요구하고 있다 (De Medici *et al.*, 2001, Formiga-Cruz *et al.*, 2002). 그러므로 패류에서 나타나는 어류 질병 원인체의 분석을 보다 적은 시료 양으로, 편리하고 쉽게 분석이 이루어지게 하기 위하여 보편적인 분자 생물학적인 방법 도입의 필요가 있으나 이와 관련된 보고는 전혀 이루어지지 않고 있다. 다만, Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata martensii*)에서 폐사를 일으키는 MABV의 분포 조사를 위하여 0.2g의 굴 hepatopancreas를 사용하였으며, 패류의 larve단계에 주로 감염되는 OsHV-1를 검출하기 위해 25mg의 굴의 아가미, 중장선 등의 조직으로부터 일반적인 RNA 분리법을 적용한 결과의 보고는 있다 (Kitamura *et al.*, 2002; Schikorski *et al.*, 2011). 그러나

아직까지 패류내의 어류 질병 바이러스를 소량 시료에 의한 분석을 실시하여 그 결과의 민감도 또는 정확성의 의미를 대량 시료에 의한 PEG 침전법의 결과와 비교한 보고는 이루어지지 않고 있다.

본 연구에서는 어류 질병 바이러스 중 국내 담류 양식장에서 매년 발병하여 경제적으로 큰 피해를 주고 있는 돌돔 이리도바이러스 질병 원인체인 megalocytivirus의 패류 내 분석을 위한 패류 시료량의 표준화를 정립한 후 이를 PEG 침전법에 의한 결과와의 비교를 2-step PCR과 real time PCR을 이용하여 정성·정량적 관점에서 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 시료의 채취 및 보관

2007년부터 2010년에 이르기까지 영남권 해안에 서식하고 있는 참굴(*Crassostrea gigas*)에 대해 샘플링을 실시하였다 (Fig. 1). 시기적인 측면에서 겨울을 지난 초봄인 3월 근처의 시기 또는 늦가을인 11월 근처를 조사기간으로 설정하였으며 채취한 패류는 중장선을 따로 분리하여 -70°C에 보관 하면서 사용하였다.

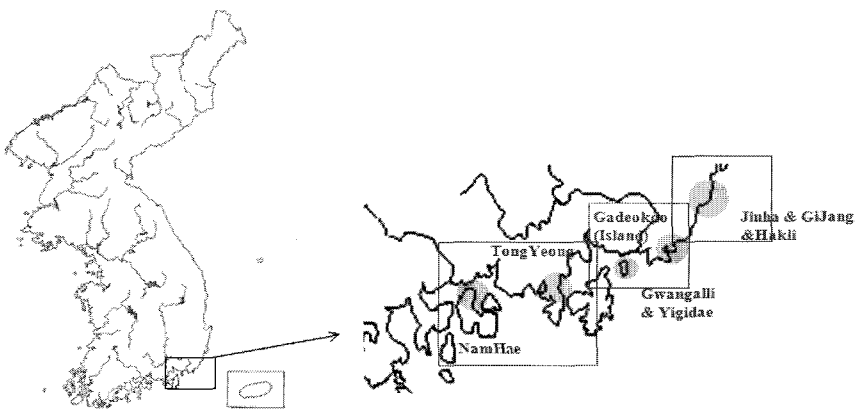


Fig. 1. Sampling sites in the southern coast of Korea.

PEG 침전법에 의한 패류 증장선의 전처리 과정  
패류에 오염된 바이러스를 농축하기 위한 전처리  
과정으로 식약청에서 패류로부터의 노로바이러스 농  
축에 사용하는 표준 시험법을 수정하여 사용하였다.

굴 3개체 이상을 사용하여 분리한 증장선 혼합체  
(5g)에 0.25M Glycine - 0.14M NaCl 완충액 (pH7.5)  
20ml을 넣고 마쇄 후  $10,000 \times g$ 로 15분간 4°C에서  
원심분리 하여 상징액을 취하여 보관하였다. 침전물  
은 0.25M Glycine - 0.14M NaCl 완충액 (pH7.5) 40ml을  
가하여 vortex 후  $10,000 \times g$ 로 15분간 4°C에서 원심분  
리 하여 상징액을 전 단계에서 얻어진 상징액과 합쳤  
다. PEG (polyethylene glycol)을 이용한 바이러스 농  
축을 위해 상징액에 PEG 8000 용액 (최종농도 10%  
[wt/vol] PEG 8000, 0.3 M NaCl)을 가한 후 4°C에서  
16시간 동안 1차 침전을 실시하였다. PEG 1차 침전물  
을  $10,000 \times g$ 로 15분간 4°C에서 원심분리 후, 상징액  
을 버리고 침전물을 0.2% Tween 80-50mM Tris-HCl  
2ml과 1 × PBS 8ml을 가하여 침전물을 현탁 하고  
chloroform 10ml을 가하여 vortex로 강하게 혼합하였  
다. 이후,  $10,000 \times g$ 로 15분간 4°C에서 원심분리 후  
상징액에 PEG 8000 용액 (최종농도 20% [wt/vol] PEG  
8000, 0.3 M NaCl)을 가한 후 4°C에서 3시간 동안  
방치하여 2차 침전을 실시하였다. 이후  $10,000 \times g$ 로  
15분간 4°C에서 원심분리 후 상징액을 제거하고 200  
μl의 멸균 증류수로 pellet을 현탁하였다. 농축된 조  
직은 실험 전까지 -20°C에서 보관하였다.

#### DNA의 추출

증장선 5g을 사용하여 농축 조제한 시료 200μl  
와 패류의 증장선 50mg을 직접 마쇄 하여 조제한  
마쇄액 200μl를 시료로 하여 상업화된 Kit를 사용하  
여 DNA를 분리하였다. 그리고 패류의 증장선 5g 및  
50mg으로부터 각각 분리된 DNA를 T5g-D 및 sT50mg-D

라고 명명하였다. Viral DNA 분리를 위하여 사용한 Kit  
는 AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer,  
Lorea)을 사용하였으며, 제조사의 protocol에 따라서  
DNA를 분리하여 50μl의 TE buffer에 현탁하였다. 분리  
된 DNA는 분광 광도계 (BioPhotometer, Eppendorf)를  
사용하여 흡광도 측정으로 A260/A280nm값을 구하여  
DNA양을 측정하였으며 실험 전까지 -20°C에서 보관하  
였다.

#### PCR

패류 내 축적되어 있는 megalocytivirus를 검출하  
기 위해서 GenBank에 등록된 염기서열을 비교하여  
모든 subgroup에서 conserved 되어 있는 major capsid  
protein (MCP) gene의 부위에서 제작하였다 (Table  
1). 1-step PCR amplification은 Applied Biosystems  
2720 Thermal Cycler를 사용하였다. Microtube에 10  
x PCR buffer 2μl, 200μM의 각각의 dNTP, 1μM의  
sense primer와 1μM의 antisense primer, Taq DNA  
polymerase (Taq DNA polymerase, Cosmogenetech co,  
Ltd. Korea) 및 template 1μl를 첨가한 후 distilled water  
로 최종액의 volume이 20μl가 되도록 했다. PCR 혼합  
물은 94°C에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 94°C에  
서 30초 denaturation, 55°C에서 30초 annealing, 72°C에  
서 45초 extension의 반응을 30cycles 또는 35cycles  
수행 한 후 72°C에서 7분간 post-extension 시켰다.  
2-step PCR amplification은 1-step PCR product 1μl로  
사용하여 위와 동일한 방법으로 실시하였다.

PCR 후 증폭 산물은 0.5μg/μl EtBr (Ethidium Bromide)  
이 첨가된 2% agarose gel을 이용하고, 1×TAE buffer  
(40mM Tris-acetate, 1mM EDTA)를 전기영동을 위한  
완충액으로 하여 전기영동을 실시하였다. UV 검출  
기에서 나타나는 band를 관찰하여 그 증폭여부를 확  
인하였다.

Table 1. Primers used in this study

Primer name	Sequence (5' → 3')	Target Region	Expected size (bp)
M1F	GCTGCGCATGCC AATCATCT	Major capsid protein gene	401
M1R	ATGCGATGGAGA CCCCTTG		
M2F	AATGACACCGAC ACCTCCTC		
M2R	TGCGATGGAGAC CCACTTGT		

### Real-Time PCR (qPCR)에 사용되는

#### 표준검량곡선의 제조

Megalocytivirus에 감염된 돌돔으로부터 분리된 IVS-1 isolate (Jeong *et al.*, 2003, GenBank accession numbers for ATPase gene : AF487899)의 genomic DNA를 template로 하여 Jun *et al* (2009)에 의해 발표된 primer MC1F (5'-GAGGTGCGCATCCACTTC-3')과 MC1R (5'-CAAGATGATTGGCATGCG-3')을 사용하여 1-step PCR (40cycles)을 실시하였고, 생성된 163bp의 PCR product를 GeneAll® Expin Gel SV kit (GeneAll Biotechnology, Korea)로 agarose gel로부터 분리 및 정제하였다. 정제된 DNA를 pGEM-T Easy vector (Promega, USA)에 ligation 후 *E. coli* DH5α 균주에 transformation 시켰다. Plasmid DNA는 GeneAll® Plasmid SV Mini kit (GeneAll Biotechnology, Korea)를 이용하여 plasmid를 분리하였고, qPCR을 위한 standard로서 사용하였다.

준비된 standard DNA를 Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 제조사의 안내서에 따라서 무게를 측정하고, 이로부터 plasmid copy 값을 결정한 후 각각 10-fold 씩 단계 희석하여  $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10$  copy의 시료를 제조한 후 표준 검량 곡선을 작성하는 데 사용하였다.

### qPCR을 이용한 바이러스의 검출한계 분석

패류 내 축적되어 있는 바이러스의 검출 한계를 분석하기 위해 Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research, AUS)을 사용하여 qPCR을 실시하였다. qPCR을 실시하기 위한 조건은 10X buffer 2μl, 200μM의 각각의 dNTP, 1μM의 각각의 primer, Hot start Taq (HS prime Taq DNA polymerase, Genet Bio, Korea) 및 template (시료로부터 추출한 DNA, 10-fold씩 희석된 plasmid standard)를 0.2 ml의 tube에 넣은 후 최종적으로 EvaGreen (Biotium, Korea) 1μl를 첨가하였다. qPCR은 95°C에서 10분간 pre-denaturation 시킨 후, 95°C에서 10초 denaturation, 55°C에서 15초 annealing, 72°C에서 20초 extension의 반응을 40 cycles 수행하였다. 40 cycle이 끝난 후 72~95°C에서 1°C/sec의 속도로 T<sub>m</sub> (melting point) 값을 측정하였다.

## 결 과

### 굴로부터 오염된 바이러스의 검출

각 굴 양식장으로부터 채취한 굴 3개체의 중장선을 혼합하여 준비한 시료(통영, 남해, 기장에서 채취한 굴 9개체로부터 3개의 시료 조제 및 광안리에서 채취한 1개체로부터 1개의 시료 조제) T5g-D의 평균 농도는 12.87μg/μl이었으며, 2-step PCR을 각각 실시하여 3개의 양성 시료 와 1개의 음성 시료를 얻었다. 양성 시료는 1-step PCR (35 cycles)에서도 양성으로 확인 할 수 있었으나 30cycles에서는 음성의 결과를 보였다. 2-step PCR (30 - 30 cycles)은 1-step PCR (35 cycles)에 비하여서는 명확한 양성 결과로 나타났으나 (data not shown), 5 cycles을 증가시킨 2-step PCR (35cycles)에서 가장 높은 band density를 전기영동 상에서 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

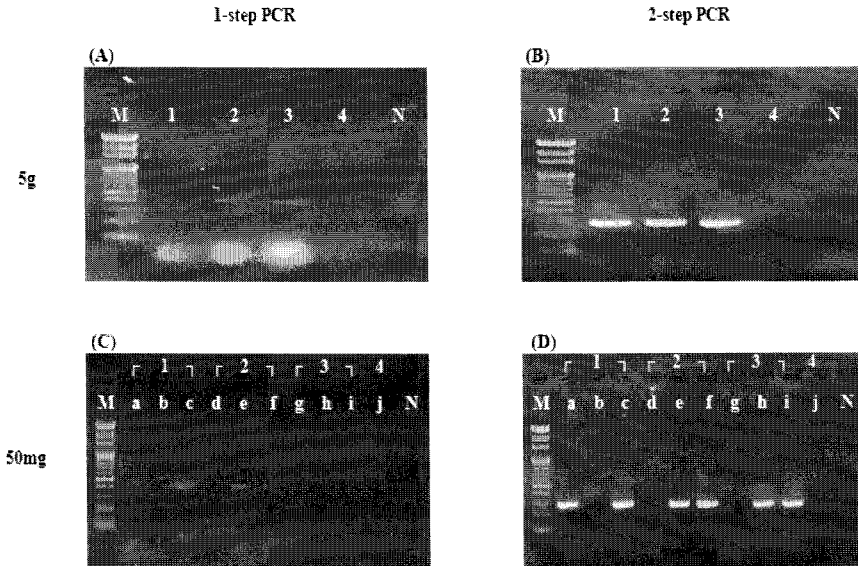


Fig. 2. PCR detection of megalocytivirus in oyster after 35 reaction cycles in PCR. (A) and (C), 1-step PCR with T5g-D and sT50mg-D respectively. (B) and (D), 2 step PCR with T5g-D template and sT50mg-D respectively. Template for lane 1, 2, 3 in (A) was prepared from individuals of lane a/b/c, d/e/f, g/h/i, b/e/i and b/d/g in (C) respectively. Lane 4 and j were used as negative control. Lane N, negative control in PCR without template. Lane M, 100bp DNA ladder.

PEG을 사용한 바이러스의 농축 과정을 거치지 않고 패류의 중장선 50mg을 직접 사용하여 패류 내 오염된 바이러스를 검출 하고자, T5g-D의 제조에 사용한 굴 10개체 (양성 시료용으로 9개체, 그리고 음성 시료용으로 1개체) 각각으로부터 조제된 sT50mg-D (DNA 평균농도, 1 $\mu$ g/ $\mu$ l) 1 $\mu$ l를 template로 한 바이러스 분석의 민감도를 비교 조사 하였다. 1-step PCR을 수행하였을 때, 30cycles에서는 모든 시료에서 음성의 결과를 보여 주었다 (data not shown). 1-step PCR, 35cycles에서는 전기영동 상에서 양성 시료 중 2개의 시료에서는 (총 6개체) 2개체씩 양성의 결과를 보여 주었으나 가장 시료에서는 양성 개체가 확인 되지 않았다. 그리고 음성 시료 (1개체)의 sT50mg-D 1 $\mu$ l의 template는 여전히 음성의 결과를 보여 주었다 (Fig. 2).

#### 인위 혼합 시료로 부터의 바이러스 검출

다수의 sT50mg-D을 혼합하여 template로 사용하였을 때 굴에 오염된 바이러스의 검출여부를 알아보고자 하였다. 2-step PCR에서 megalocytivirus 오염 음성 또는 양성으로 확인 된 동일 그룹 내 각각의 굴 3개체 (Fig. 2(D)의 lane a,b,c/d,e,f/g,h,i)의 sT50mg-D 혼합물 1 $\mu$ l 또는 다른 T5g-D 조제에 사용된 개체들을 사용하여 조제된 sT50mg-D 3개를 혼합한 시료 1 $\mu$ l를 template로 하여 2-step PCR (35 cycles)을 실시하였을 때 전기영동 상에서 나타난 band density는 T5g-D template 1 $\mu$ l를 template로 사용한 것과 비교하여 뚜렷한 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 3).

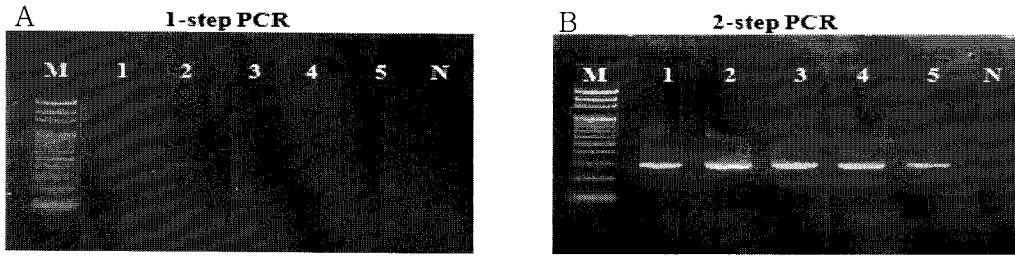


Fig. 3. PCR detection of megalocytivirus using the mixed nucleic acid of three different sT50mg-D, artificially. (A), 1-step PCR and (B), 2 step PCR using the mixed templates of sT50mg-D. Mixed template for each lane 1, 2, 3 and 4 was prepared using sT50mg-D of a/b/c, d/e/f, g/h/i, a/d/i and a/d/g in Fig 2. Lane N, negative control in PCR without template. Lane M, 100bp DNA ladder.

패류의 증장선에 오염된 바이러스의 검출한계  
 굴 시료 중, megalocytivirus에 대한 양성시료 (Fig. 2(C)의 lane 1c)를 사용하여 패류의 증장선에 축적된 virus의 검출한계를 분석하였다. 증장선 50mg에 PBS를 첨가하여 200 $\mu$ l의 homogenate를 조제한 뒤 이를 1/10씩 단계별로 희석한 200 $\mu$ l의 homogenate 시료를 조제하였다. 먼저 분리된 sT50mg-D 1 $\mu$ l를 template로 사용하여 2-step PCR (35cycles)과 qPCR을 실시하였다. 분리된 sT50mg-D의 viral copy는 1.20E+02 copy/ $\mu$ l 이었으며 1-step PCR (35cycles)으로도 검출이 가능하였다. 1/10희석 시료로부터 조제된 template (sT5mg-D) 에서는 1-step PCR (35cycles) 수행 시 전기영동 상에서 연한 band를 확인할 수 있었으나, 1/100희석 (sT500 $\mu$ g-D) 및 1/1000희석 (sT50 $\mu$ g-D) 시료에서는 1-step PCR (35cycles)만으로

는 전기영동 상에서 band를 확인 할 수 없었다 (Fig. 4). 그리고 1/100희석 시료는 2-step PCR (35cycles) 을 수행하였을 때만 전기영동 상에서 검출이 가능하였다. 각각의 희석 시료에 대한 정량적 분석을 실시한 결과, 본 분석에 사용한 양성 template DNA인 sT50mg-D, sT5mg-D 및 sT500 $\mu$ g-D에는 각각 1.20E+02 copy/ $\mu$ l sT50mg-D, 1.21E+01 copy/ $\mu$ l sT5mg-D 및 6.14E+00 copy/ $\mu$ l sT500 $\mu$ g-D의 바이러스 particle이 있음을 확인 할 수 있었다. 그러므로 본 qPCR에서 positive 결과를 보인 바이러스의 최소 농도는 6.14E+00 copy/ $\mu$ l sT500 $\mu$ g-D이었으므로 50mg의 굴조직을 사용하여 조제 한 sT50mg-D를 template으로 하여 패류 내 바이러스의 오염을 분석하는 것은 충분히 정확한 결과를 보일 수 있는 양이라고 할 수 있다 (Fig. 4, Table 2).

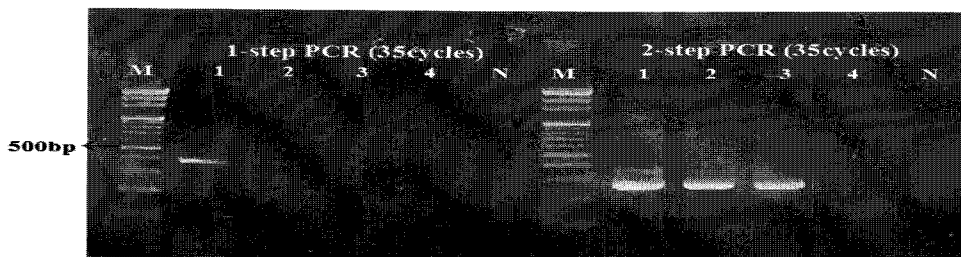


Fig. 4. Detection limit of megalocytivirus in PCR with serially diluted homogenate of digestive gland of oyster (lane 1c in Fig 2 (C) of this study). Lane 1-4, DNA templates were prepared with 50mg, 5mg, 500 $\mu$ g and 50 $\mu$ g tissue homogenate. Lane N, negative control in PCR without template. Lane M, 100bp DNA ladder.

Table 2. Detection of megalocytivirus in various amount of the oyster homogenate of the digestive gland

Dilution ratio	PCR		qPCR	
	1-step	2-step	C <sub>t</sub> <sup>b</sup> Value	Copies no. <sup>c</sup>
10 <sup>0</sup> (sT50mg-D <sup>a</sup> )	+	++	30.88	1.20E+02
10 <sup>-1</sup> (sT5mg-D)	+ <sup>d</sup>	++	34.82	1.21E+01
10 <sup>-2</sup> (sT500μg-D)	-	++	35.98	6.14E+00
10 <sup>-3</sup> (sT50μg-D)	-	-	NT	NT

<sup>a</sup>template were prepared using one positive sample (lane 1c in Fig 2 (C)); <sup>b</sup>cycle threshold; <sup>c</sup>copy number/μl prepared template; <sup>d</sup>weak positive; NT, not tested.

## 고찰

패류의 filter-feeding의 먹이섭취 과정 중 Norovirus 등의 human enteric virus의 패류 내 축적과 이의 분석 방법은 많은 연구에 의해 보고되어져 있다. 또한 굴에서의 MABV, 그리고 갑각류에서의 WSSV와 같은 수생동물에 영향을 줄 수 있는 바이러스의 패류 조직 내에서의 축적에 대한 보고도 이루어지고 있다 (Atmar *et al.*, 1995; Gerba *et al.*, 1978; Goyan *et al.*, 1979; Suzuki *et al.*, 1999; Vazquez-Boucard *et al.*, 2010). 그러나 megalocytivirus를 포함한 어류 질병 바이러스의 패류 내 존재 또는 위험성 분석은 이루어지지 않고 있으며 나아가 패류 내 존재하는 어류 질병 바이러스의 분석을 위하여 사용 될 수 있는 다양한 방법적 측면에서도 표준화된 방법 또는 방법 간의 정밀도에 대한 비교분석은 이루어져 있지 않아 일반적으로 Norovirus 및 Hepatitis A 등의 human enteric virus의 검출기법인 PEG 침전을 통한 농축법을 표준화 방법으로 인정하고 있다.

따라서 본 연구에서는 패류 내 존재하는 megalocytivirus의 존재를 확인하며, 기존의 검출방법에 비해

신속하고 간편하게 적은 양의 시료를 사용하여 패류 내 축적된 바이러스를 검출하기 위한 방법을 PEG 농축법과 비교 검토하고자 하였다. 먼저 megalocytivirus에 오염된 굴의 중장선 5g을 사용한 PEG 농축시료로부터 얻은 DNA (T5g-D)와 농축하지 않고 각각 개체의 중장선 50mg을 직접 사용하여 얻은 DNA (sT50mg-D)로부터 바이러스를 검출한 결과, 모두 1-step PCR (35cycles)에서 오염된 바이러스의 검출이 가능하였다.

T5g-D를 사용하여 2-step PCR에서 양성 결과를 보인 3개의 시료에 대해, T5g-D 조제에 사용된 각 9개체에 대한 개체별 분석 (sT50mg-D)을 2-step PCR을 이용하여 실시하였을 때, 통영, 남해 그리고 가장 굴에서 각각 2개체씩이 양성 결과를 보여 주었다 (Fig 2). 즉, 얻어진 T5g-D 양성 시료에 사용된 개체별 분석에서 최소한 1개체는 2-step 35cycles의 PCR 수행 시 양성으로 나타났으며, 1-step 35cycles의 PCR 수행 시 3 개체 모두 음성의 결과를 보여 가장 낮은 농도의 양성 시료로 추정 되는 가장 굴 시료에서도 동일한 결과를 보여 주었다 (Fig 2). 그러므로 굴의 오염 (또는 그 오염 수준)은 모두 동일한 것이라기보다는 오히려 개체 간에 차이가 있다는 것을 확인할 수 있었으며, 그러한 확인은 50mg의 중장선 조직을 사용한 개체별 분석을 통하여서만이 가능하며 PEG를 사용한 대량의 혼합시료 사용 시에는 얻을 수 없는 결과라는 것을 확인하였다.

이러한 결과는 양성과 음성의 결과를 보이는 sT50mg-D를 혼합하여 template로 사용한 분석에서 양성 sT50mg-D가 한 개체라도 혼합되면 양성으로 나타나는 결과로부터 확인할 수 있었다 (Fig 3).

인위적으로 바이러스 배양액을 첨가하여 중장선 조직 내 존재하는 inhibitor의 영향을 측정 한 결과, 조직 내에 존재하는 inhibitor의 영향으로 인하여 실

질적인 바이러스 particle의 수에 비하여 10배가량 낮은 수치를 보인다는 것을 확인할 수 있었다 (data not shown). 이는 실질적으로 패류의 증장선에는 나타난 qPCR의 결과보다 더욱 많은 양의 virus가 오염되어 있다고 여겨진다. 하지만 정량적 측면에서 보면 패류 개체 각각은 바이러스의 오염 정도가 다양한 수준일 것이므로 50mg homogenate를 1/10씩 단계별로 희석한 후 각각의 total DNA를 분리하여 정량적으로 분석하여 그 검출 한계치를 분석하였다. 이때 분리된 sT50mg-D를 단계별로 희석하는 것보다는 조직 시료 자체를 먼저 각각의 희석비율에 맞게 조제한 후 이로부터 DNA를 각각 분리함으로써 분리과정에서의 DNA 회수율 감소까지 고려한 결과를 얻고자 하였다. 그 결과, 2-step PCR과 qPCR에서 증장선 50mg~500  $\mu$ g을 사용하여 DNA (sT50mg-D~sT500 $\mu$ g-D)를 분리하여도 megalocytivirus의 검출 및 정량은, 개체 패류에 따라서 약간의 차이는 있을 수 있으나, 충분히 가능성을 확인 할 수 있었다 (Fig. 4, Table 2). 이러한 결과는 비록 패류 증장선에 megalocytivirus 가 저 농도로 오염된 시료라고 하더라도 PCR을 위한 template DNA 제조에 50mg의 조직을 사용한다면 정성 및 정량적 검출을 위한 충분한 양이라는 것을 나타낸다. 따라서 megalocytivirus의 패류 내 오염 확인을 위하여 sT50mg-D를 2-step PCR의 template로 사용하는 것은 패류 내 존재하는 어류감염 바이러스의 위험 수준에 비하여 충분한 양을 사용하는 것이라고 추정 할 수 있다.

결론적으로 우리나라에서 양식 (또는 서식)하고 있는 패류의 증장선 내에서 megalocytivirus의 오염 존재를 정성 및 정량적 방법으로 확인할 수 있었으며, 오염된 패류의 증장선에 존재하는 바이러스 검출을 위한 DNA template 조제 시 5g을 사용한 농축 시료 대신에 50mg의 조직을 직접 사용하여도 충분히

megalocytivirus의 오염 검출 한계를 넘는 농도임을 확인할 수 있어 향후 패류 내 오염 바이러스 분석을 위하여 본 연구의 시료 표준화의 개념이 응용 가능함을 확인 할 수 있었다.

## 요 약

패류 내에 오염되어 있는 바이러스의 검출에 있어서 정성·정량적 분석이 가능하며 신속하고 간편한 방법의 개발을 이루고자 하였다. 5g의 굴 증장선 조직을 Glycine buffer 및 PEG 8000 용액을 사용하여 제조한 농축 시료 (T5g-D)와 50mg의 굴 증장선 조직으로부터 직접적으로 제조한 시료 (sT50mg-D)를 대상으로 2-step PCR을 실시하여 검출감도를 비교하였다. 동일한 1  $\mu$ l의 DNA template T5g-D와 sT50mg-D를 사용하였을 때, 35cycles의 1-step PCR에서 양성의 결과를 얻을 수 있었다. 인위적으로 sT50mg-D 혼합 시료를 사용하여 2-step PCR (35cycles)을 실시하였을 때 T5g-D를 사용한 것과 비교하여 뚜렷한 차이를 나타내지 않았다. 또한 megalocytivirus에 오염된 양성시료 0.5~50mg을 사용하여 조제한 각각 50  $\mu$ l의 template DNA 1  $\mu$ l를 사용하여 qPCR을 하였을 때 6.14E+00~1.2E+02/ $\mu$ l의 농도를 함유하고 있는 것으로 나타났다. 조제한 template DNA에 6.14E+00 copies/ $\mu$ l 이하의 농도가 있을 때는 qPCR에서 positive의 결과를 얻을 수 없었다. 결론적으로, 패류 내 megalocytivirus의 오염 유무 판단을 위한 2-step PCR 및 qPCR에서 50mg의 증장선을 사용하는 것은 i) 굴의 조직으로부터 오염된 megalocytivirus의 정성 및 정량을 위한 최소 검출 한계에 비하여 충분한 양이었으며 ii) 개체별 분석이 가능하다는 장점이 있었으며 iii) 이를 토대로 국내에서 서식하고 있는 굴에서 megalocytivirus의 오염을 확인할 수 있었다.



## 감사의 글

본 연구는 국립수산물과학원 (수산동물전염병방역 및검역체계구축, RP-2011-AQ-047)의 지원에 의해 운영되었습니다.

## 참고문헌

- 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, 1995.
- De Medici D., Croci L., Di Pasquale S., Fiore A., Toti L.: Detecting the presence of infectious hepatitis A virus in molluscs positive to RT-nested-PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 33: 362-366, 2001.
- Formiga-Cruz M., Tofiño-Quesada G., Bofill-Mas S., Lees D.N., Henshilwood K., Allard A.K., Conden-Hansson A.C., Hernroth B.E., Vantarakis A., Tsibouxi A., Papapetropoulou M., Furones M.D., Girones R.: Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12): 5990- 5998, 2002.
- Gerba, C.P. and Goyal, S.M.: Detection and occurrence of enteric viruses in shellfish: A review. *Journal of Food Protection.*, 41: 743-754, 1978.
- Goyan, S.M., Gerba, C.P. and Melnick, J.L.: Human enteroviruses in oysters and their overlaying waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 37: 572-575, 1979.
- Jeong J.B., Jun L.J., Yoo M.H., Kim M.S., Komisar J.L., Jeong H.D.: Chariterization of the DNA nucleotide sequences in the genome of red sea bream iridoviruses isolated in Korea. *Aquaculture*, 220: 119-133, 2003.
- Jun L.J., Jeong J.B., Kim J.H., Nam J.H., Shin1 K.W., Kim J.K., Kang J.H., Jeong H.D.: Influence of temperature shifts on the onset and development of red sea bream iridoviral disease in rock bream *Oplegnathus fasciatus*. *Diseases of Aquatic Organism.*, 84: 201-208, 2009.
- Kitamura S., Tomaru Y., Kawabata Z., Suzukii S.: Detection of marine birnavirus in the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata* and seawater from different depths. *Diseases of Aquatic Organism.*, 50: 211-217, 2002.
- Schikorski D., Faury N., Pepin J.F., Saulnier D., Tourbiez D., Renault T.: Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Reserch*, 155(1): 28-34, 2011.
- Suzuki, S. and Nojima. M.: Detection of a marine birnavirus in wild molluscan shellfish species from Japan. *Fish Pathology*, 34: 121-125, 1999.
- Vazquez-Boucard C., Alvarez-Ruiz P., Escobedo-Fregoso C., Anguiano-Vega G., Duran-Avelar Mde J., Pinto V.S., Escobedo-Bonilla C.M.: Detection of white spot syndrome virus (WSSV) in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 104: 245-247, 2010.

---

Manuscript Received : July 4, 2011

Revised : August 12, 2011

Accepted : August 17, 2011