

Single-strand Conformational Polymorphism을 이용한 Enterovirus의 유전형 분석

김정현*,**, 이정희*, 이재규*, 방원기**, 홍정연***, 김의종****

서울대학교병원 임상의학연구소 바이러스연구소*, 고려대학교 자연자원대학원 생물공학과**, 제주의료원 소아과***, 서울대학교 의과대학 임상병리학교실****

Analysis of Enterovirus Genotypes Using Single-Strand Conformational Polymorphism

Jung-Hyun Kim*,**, Jung-Hee Lee*, Je-Kue Lee*, Won-Ki Bang**,
Jung-Yon Hong***, and Eui-Chong Kim****

Virus Research Center, Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital;
Graduate School of Natural resources, Korea University**; Department of Pediatrics, Jeju Medical
Center***; Department of Clinical Pathology, Seoul National University College of Medicine*****

Background : Epidemics of aseptic meningitis due to enteroviruses has occurred annually in the late spring and early summer season. The early detection of such epidemics is important for the prevention of further infection. Enteroviruses consist of 67 serotypes but one or two serotypes may be the causative agents of epidemics in the year and several different serotypes involve sporadic cases. In order to discriminate epidemics from sporadic infection, the serotype should be determined. We evaluated the significance of the single-strand conformational polymorphism (SSCP) of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) products of 5' -untranslated region (UTR) for the determination of serotypes.

Methods : The specimens of patients were cultured with RD cell and the RT-PCR was performed in case of the positive cytopathic effect. For the amplification of 153-bp of 5' -UTR, primers (EN1: 5' -CTC CGG CCC CTG AAT GCG GCT AAT-3' ; EN2: 5' -ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA-3') were used. The RT-PCR products were denatured with 95% formamide at 95°C for 5 min and SSCP was performed. 12.5% polyacrylamide gel (49/1 acrylamide/bis) was made by using Mighty Small™ SE245 Dual Gel Caster (Hoefer Scientific Instruments Inc., USA). Electrophoresis was done at 10 mA for 1.5 h, and silver nitrate stain was performed. The SSCP patterns were compared with serotypes determined by sequence analysis of VP1 region.

Results : Coxsackievirus A9 (two strains), coxsackievirus A16 (10), coxsackievirus B2 (two), coxsackievirus B3 (two), echovirus 3 (two), echovirus 11 (two), echovirus 16 (seven), echovirus 19 (two), echovirus 30 (three), and enterovirus 71 (six) showed the different SSCP patterns according to their serotypes. The same pattern was observed in the same serotype, except echovirus 30 showing two different patterns.

Conclusions : The SSCP of RT-PCR products of 5' -UTR may be helpful to determine the serotype and discriminate epidemics from sporadic cases. This has the advantage to be able to test the specimens directly without the viral culture. But the serotype should be determined by other method such as neutralization or sequence analysis in case of the first isolate in the epidemic season and the stains showing the new SSCP patterns. (Korean J Clin Microbiol 2001;4(2):134-138)

Key words : Enterovirus, Single-strand conformational polymorphism, RT-PCR

서 론

Enterovirus는 소아마비를 비롯하여, 주로 소아에서 수족구병, 무균성 수막염, 뇌염, 심근염, 심낭염, 급성 출혈성 결막염 등의 원인이 된다. 매년 산발적으로 enterovirus 감염증이 발생하고 있으며, 67종의 혈청형 중에서 몇 가지 혈청형은 그 해의 유행을 유발한다. 최근 enterovirus의 혈청형을 규명하기 위하여, 기존의 중화항체법을 대신하여, VP1 유전자의 염기서열분석법이 소개되었다[1]. 그러나 유행시기에 이 방법에 따라 다수의 양성 검체를 모두 염기서열 분석한다는 것은 경제적이지 못하다. 또한 유행의 원인이 되는 혈청형은 분리되는 바이러스주들의 염기서열이 크게 다르지 않은 혈청형일 것으로 판단할 수 있다. 따라서 저자들은 Fujioka 등이 제안한 SSCP방법[2]을 다소 수정하여 간편한 SSCP법을 확립하고, 이 방법이 enterovirus 혈청형의 규명에 도움이 될 수 있는지를 알아보았다.

방 법

환자 검체를 RD cell에 배양하고, 세포병변이 관찰되면 RT-PCR을 실시하였다. RT를 위하여 random hexamer를 포함한 1st strand cDNA synthesis kit (Roche, USA)를 사용하고, 42°C에서 60분간 두어 cDNA를 만들었다. 5'-UTR 중 153-bp (Coxsackievirus B1, GenBank accession No. M16560의 448번째 염기부터 600번째 염기까지)를 증폭할 수 있는 primer(EN1: 5'-CTC CGG CCC CTG AAT GCG GCT AAT-3'; EN2: 5'-ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA-3')를 사용하였다[3]. PCR을 위하여 94°C에서 4분을 둔 다음 94°C에서 45초, 60°C에서 45초, 72°C에서 45초를 35회 반복하고, 72°C에서 7분간 반응시켰다. 2% agarose gel 전기영동으로 153-bp의 PCR 양성을 확인하였다[4].

PCR 산물 1 μL를 SSCP buffer (95 % formamide, 10 mM EDTA, 0.05 % bromophenol blue, 0.05 % xylene cyanol) 4 μL과 혼합하고, 95°C에서 5분간 변성시킨 다음 그 중 2 μL로 SSCP을 실시하였다. 12.5% Polyacrylamide gel (49/1 acrylamide/bis)은 Mighty Small™ SE245 Dual Gel Caster (Hoefer Scientific Instruments)를 사용하여, 증류수 3.37 mL, 30% gel stock 3.75 mL, 5X TBE 0.9 mL, 0.5% EDTA 18 μL, 50% glycerol 0.9 mL, ammonium persulfate 48 μL, N,N,N',N'-tetramethylenediamide 30 μL를 순서대로 혼합한 용액 (총 9 mL)으로 만들었다. 전기영동시 온도가 상승함을 방지하기 위하여 전기영동기 내부로 수돗물을 계속 관통시키면서, 10 mA로 xylene cyanol 밴드가 맨 아래에 닿을 때까지 (약 1시간 30분) 전기영동하였다. 겔판을 해체하여 겔을 꺼내고 좌우를 구별할 수 있도록 왼쪽 겔 상부를 소량 잘라내었다. 10% acetic acid로 15분간 고정하고, 증류수로 3분간 2회 세척하였다.

다. 증류수 100 mL에 silver nitrate 0.1g과 formaldehyde 150 μL를 혼합한 질산은 용액에 30분간 담갔다. 증류수로 3분간 1회 세척하였다. 발색 용액 (증류수 100 mL, sodium carbonate 3 g, 1% sodium thiosulfate 20 μL, formaldehyde 150 μL)으로 염색을 하였다. 밴드의 색이 나타나면 10% acetic acid로 반응을 중지시키고, 진공흡인하여 겔을 건조시켰다. 이미 VP1 염기서열분석법으로 혈청형이 확인된 검체의 SSCP 양상과 비교하였다.

결 과

5'-UTR 중 153-bp의 RT-PCR 산물에 대한 SSCP결과는 Fig. 1-3에 도시하였다. Coxsackievirus A9 (2주), coxsackievirus A16 (10주), coxsackievirus B2 (2주), coxsackievirus B3 (2주), echovirus 3 (2주), echovirus 11 (2주), echovirus 16 (7주), echovirus 19 (2주), echovirus 30 (3주), enterovirus 71 (6주) 등 총 11 가지 혈청형의 SSCP 양성이 혈청형에 따라 서로 다르게 관찰되었다. Echovirus 30에서 두 가지 양상으로 나타난 경우를 제외하고, 동일한 혈청형에서는 바이러스 분리주가 다르더라도 동일한 SSCP 양상이 관찰되었다.

고 찰

Enterovirus에 의한 감염증은 매년 늦봄과 초여름에 주로 소아에서 무균성 수막염, 뇌염 또는 수족구병 등의 증상으로 유행한다. 아시아형의 enterovirus 71을 비롯하여 echovirus 30, coxsackievirus B5, echovirus 11, echovirus 7, echovirus 9, enterovirus 70와 같은 일부 혈청형은 무균성 수막염과 같은 중증의 감염증을 일으키며[5], 이런 혈청형이 산발적으로 발생한 때는 사회문제가 되지 않지만, 집단적으로 발생하는 유행인 경우 매우 심각한 사회문제로 대두된다. 더구나 환경오염이 심화되면서, 최근 수돗물에서 enterovirus가 검출되었다는 주장이 있기 때문에 폭발적인 대유행이 발생할 가능성도 배제할 수 없다. 또한 해마다 그 해에 유행하는 혈청형이 변하기 때문에 지난해에 유행한 혈청형이 올해에도 유행할 가능성보다 새로운 혈청형이 유행할 가능성이 더 높다. 따라서 유행(epidemic)을 산발적인 발생으로부터 감별하려면 혈청형을 정확하게 알아내는 것이 매우 중요하다.

Enterovirus의 혈청형을 알아내는 방법으로는 보체 고정법, 면역 형광법, 효소면역측정법 등이 고안되어 있으나, 이를 대부분이 혈청형에 따른 항혈청을 모두 준비해야하는 등 시간과 노력이 많이 소모되고 다소 정확성이 떨어지는 단점이 있다. 또한, 모든 혈청형을 확실히 분리 동정하는 방법으로 염기 서열 분석법이 이용되고 있지만, 경제적, 시간적인 측면에서 빠르고 정확한 진단을 목적으로 하는 임상에서는 장내바이러스 검출 방법으로 채택하기에 어려운 점이 있다[6]. 특히 유행시기에 많은 수

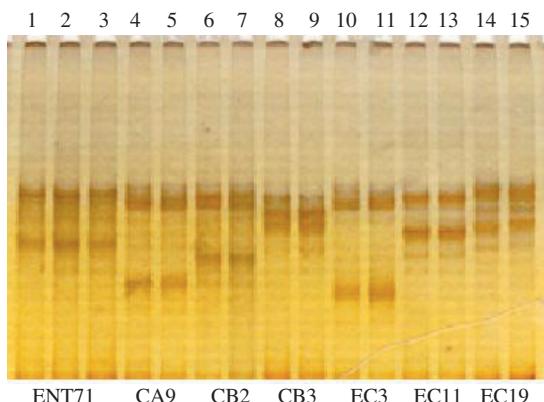


Fig. 1. SSCP analysis of the PCR products of 5'-UTR. The viral ds-cDNA amplified by RT-PCR using EN1 and EN2 primers was divided into two ss-cDNA bands. The PCR products from 7 enterovirus genotypes showed different eletrophoretic mobilities. Lanes 1, 2, and 3: enterovirus 71; 4, 5: coxsackievirus A9; 6, 7: coxsackievirus B2; 8, 9: coxsackievirus B3; 10, 11: echovirus 3; 12, 13: echovirus 11; 14, 15: echovirus 19.

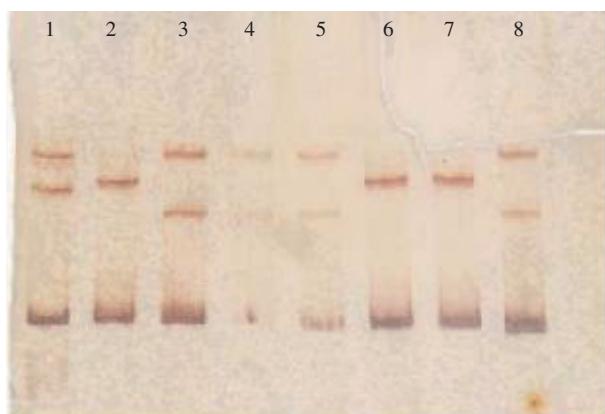


Fig. 3. SSCP analysis of the PCR products of 5'-UTR. Lanes 1, 3, 4, 5, and 8: echovirus 30; lanes 2, 6, and 7: echovirus 16. Among 5 strains of echovirus 30, lane 1 shows different pattern from other 4 strains.

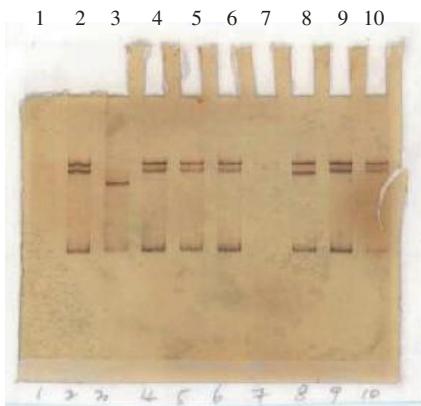


Fig. 2. SSCP analysis of the PCR products of 5'-UTR. Lanes 2, 4, 5, 6, 8, 9, and 10: coxsackievirus A16; lane 3: echovirus 16; Lanes 1 and 7: negative.

의 환자로부터 채취한 다량의 검체를 모두 염기서열분석을 실시하는 것은 비용이 크게 소요된다. 따라서, 본 연구에서는 간단하고 효용성이 높은 SSCP 기법을 이용하여 좀 더 신속하고 정확하게 enterovirus의 혈청형을 규명하고자 하였다.

PCR-SSCP 기법은 분리된 DNA 단일 가닥 내에서의 염기의 재결합으로 인해 형성되는 삼차구조의 형태 구조적 다양성에 의한 전기영동 상의 이동 거리 차이를 찾는 방법으로, 특정 유전자의 일부를 증폭한 후 변성시켜 이를 비변성 겔에 전기영동 하여 증폭된 유전자 배열에 돌연변이나 형태 구조적 다양성이 있는지 확인할 수 있다. 전기영동이 끝난 후 방사성 동위원소를 사용하거나 질산은 염색으로 DNA의 밴드를 확인한다.

이 기법은 간단하고 효용성이 높아 장내바이러스의 RNA를 추출한 후 2일 안에 결과를 알 수 있고, 또 바이러스의 염기 서열에 대한 정보가 없어도 비교적 정확히 혈청형을 진단할 수 있다. 또 아주 적은 양의 cDNA 증폭산물로도 분석이 가능하고, 대량 검체를 분석하기에도 유용하다. 그리고, 만약 2 종류의 장내바이러스에 교차 오염이 일어나면 밴드가 2 쌍씩 같은 위치에 나타나므로 그 관찰이 용이하고, 보존성이 높은 5'-UTR 부위에 어떤 돌

SNUH003	10	20	30	40	50	60	70	80
CCTAACTGCG	GACCGTGCAG	CTTCAACCCA	GCGACTGGCG	CGTCGTAATG	GGTAACCTTG	CAGCGGCACC	GACTACTTTG	
SNUH018G.C....C	..G.....	.T..G.A..AA...
	90	100	110	120	130			
SNUH003	GGTGTCCGTG	TTTCCTTTAC	CTCTTCACTG	GCTGCTTATG	GTGAAAATAA			
SNUH018C...GT...			

Fig. 4. Comparison of nucleotide sequences of 5'-UTR between two strains of coxsackievirus B2, which are lanes 6 and 7 of Figure 1. They show the same SSCP pattern in spite of 12-nucleotide-difference (9.2%) between them.

연변이가 일어났는지도 쉽게 알 수 있다[7].

이론상 하나의 염기가 변이되어도 SSCP 양상이 달라지게 되어있다. 그러나 매우 예민하게 한 개의 변이를 찾아내려면 단일 가닥 DNA의 삼차구조의 형성이 잘 이루어져야 한다. 이를 위해서는 전기영동 시 사용되는 겔의 농도와 온도가 매우 중요하다[8]. 겔의 농도와 온도를 적정하게 맞춰주지 않으면 성상이 크게 달라지고 매 실험마다 다른 결과가 나올 수도 있다. 따라서 재현성 있는 결과를 얻기 위해서는 적정 실험 조건을 찾아 매우 엄격하게 수행해야 한다. 본 연구에서는 이러한 SSCP의 단점을 이용하여 최소한 몇 개의 염기가 바꿨다 하더라도 동일한 양상이 나올 수 있도록 SSCP 실험 조건을 단순화하였다. 예비실험에서 전기영동의 조건에 따라 매우 다양한 결과를 보였는데, 온도가 아주 낮은 경우 (<10°C)와 polyacrylamide 겔의 조성이 적정 조건보다 낮은 경우에는 밴드가 선명하지 않고 흐리게 보였으며, 온도가 27°C 이상으로 올라갔을 경우에는 재결합되어 하나의 밴드로만 나타났다. 또, 증폭 산물을 부하 용액 (loading dye)의 회색 농도가 맞지 않은 경우에는 밴드가 선명하지 않고 너무 진하거나 흐리게 나타났다. Fig. 4에 도시한 바와 같아 10개 내외의 염기가 다르더라도 동일한 양상이 관찰되었다. 박 등도 같은 SSCP 유형을 보이는 경우에도 소폭의 염기서열 변이가 있었다고 보고하였다[9]. 앞으로 여러 혈청형에 대한 5'-UTR의 염기서열분석 결과를 SSCP 양상과 비교함으로써 본 연구에서 제시한 SSCP 조건이 얼마나 상동성 정도를 감별할 수 있는지를 알아내야 할 것으로 생각한다.

위의 결과를 토대로, 각 유전자형에 따라 안정된 분리 형태를 보이는 5'-UTR 부위에서는 유전자형을 정확히 동정할 수 있었다. 이와 같이 enterovirus의 5'-UTR 부위에서 SSCP 기법을 실시하여 결과를 비교적 뚜렷하고 신속하게 알 수 있었으므로, 향후 다량의 장내바이러스 검체를 빠르게 선별하고 진단하는데 이 방법이 쉽게 적용될 수 있을 것으로 예상된다. 또한, 이번 연구에 사용되었던 enterovirus의 혈청형이 몇 가지에 제한되어 있어서 다양한 패턴을 제시하지는 못하였지만 추후 더 많은 양성 검체에 대해서도 본 연구와 같은 실험이 시행된다면 실제 임상에서의 중요한 참고 자료가 될 수 있을 것으로 생각한다.

결 론

유행시기에 다수의 환자로부터 분리되는 enterovirus는 SSCP 양상을 분석하여 신속하고 경제적으로 enterovirus 혈청형을 알아 낼 수 있고, 이를 바탕으로 enterovirus에 의한 무균성 수막염의 산발적 발생과 집단발생을 구별함으로써, enterovirus 감염증의 유행 감시를 할 수 있을 것으로 생각한다. 또한 이 방법은 검체에서 직접 실시한 RT-PCR 산물을 이용하여 혈청형을 유추할 수 있는 장점이 있다. 그러나 유행시기에 처음으로 분리했거나, 최근 분리주의 SSCP 양상과 상이한 enterovirus는 중화항체법이나 VP1 염기서열 분석법으로 혈청형을 규명해야 한다.

요 약

概要 : Enterovirus는 소아에서 수족구병을 일으키며, 간혹 수막염 등의 원인이 된다. 매년 산발적으로 enterovirus 감염증이 발생하고 있으며, 약 70종의 혈청형 중에서 몇 가지 혈청형들은 그 해의 유행을 유발한다. 최근 enterovirus의 혈청형을 규명하기 위하여, 기존의 중화항체법을 대신하여, VP1 유전자의 염기서열분석법이 소개되었다. 그러나 유행시기에 이 방법에 따라 다수의 양성 검체를 모두 염기서열 분석한다는 것은 경제적이지 못하다. 또한 유행의 원인이 되는 혈청형은 분리되는 바이러스주의 염기서열이 크게 다르지 않은 혈청형일 것으로 판단할 수 있다. 따라서 저자들은 Fujioka 등이 제안한 SSCP방법(J Virol Methods 1995;51:253)을 다소 수정하여 간편한 SSCP법을 확립하고, 이 방법이 enterovirus 혈청형의 규명에 도움이 될 수 있는지를 알아보았다.

方法 : 환자 검체를 RD cell에 배양하고, 세포병변이 관찰되면 RT-PCR을 실시하였다. 5'-UTR 중 153-bp를 증폭할 수 있는 primer(EN1: 5'-CTC CGG CCC CTG AAT GCG GCT AAT-3'; 8EN2: 5'-ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA-3')를 사용하였다. Agarose gel 전기영동으로 PCR 양성을 확인한 후 PCR 산물을 95% formamide에 넣고 95°C에서 5분간 변성시킨 다음 SSCP을 실시하였다. 12.5% Polyacrylamide gel (49/1 acrylamide/bis)은 Mighty Small™ SE245 Dual Gel Caster (Hoefer Scientific Instruments)를 사용하여 만들었다. 10 mA로 1시간 30분 전기영동하고, 질산은 염색을 하였다. 이미 VP1 염기서열분석법으로 혈청형이 확인된 검체의 SSCP 양상과 비교하였다.

結果 : Coxsackievirus A9 (2주), coxsackievirus A16 (10주), coxsackievirus B2 (2주), coxsackievirus B3 (2주), echovirus 3 (2주), echovirus 11 (2주), echovirus 16 (7주), echovirus 19 (2주), echovirus 30 (3주), enterovirus 71 (6주) 등 총 10 가지 혈청형의 SSCP 양상이 혈청형에 따라 서로 다르게 관찰되었다. Echovirus 30에서 두 가지 양상으로 나타난 경우를 제외하고, 동일한 혈청형에서는 바이러스 분리주가 다르더라도 동일한 SSCP 양상이 관찰되었다.

結論 : 따라서 유행시기에 다수의 환자로부터 분리되는 enterovirus는 SSCP 양상을 분석하여 신속하고 경제적으로 enterovirus 혈청형을 알아 낼 수 있을 것으로 생각한다. 또한 이 방법은 검체에서 직접 실시한 RT-PCR 산물을 이용하여 혈청형을 유추할 수 있는 장점이 있다. 그러나 유행시기에 처음으로 분리했거나, 최근 분리주의 SSCP 양상과 상이한 enterovirus는 중화항체법이나 VP1 염기서열 분석법으로 혈청형을 규명해야 한다.

참 고 문 헌

- Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. *Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1*. *J Clin Microbiol* 1999;37:1288-93.
- Fujioka S, Koide H, Kitaura Y, Duguchi H, Kawamura K. *Analysis of enterovirus genotypes using single-strand conformational polymorphism of polymerase chain reaction product*. *J Virol Methods* 1995;51:253-8.
- Iizuka N, Kuge S, Nomoto A. *Complete nucleotide sequence of the genome of coxsackievirus B1*. *Virol ogy* 1987;156:64-73.
- 김의종, 이정희, 정현진, 이영준. 1998년 봄 제주도에서 유행한 hand-foot-mouth disease 환아에서 분리한 coxsackievirus A16. *대한임상미생물학회지* 1999; 2(2):172-176.
- Rorbart HA. *Meningitis and encephalitis*. In : Rotbart HA, ed. *Human enterovirus infections*. Washongton, D.C.:ASM press, 1995:271-89.
- 이정희, 안병윤, 반성환, 김상현, 김의종. 무균성 수막염 환자에서 분리한 enterovirus의 혈청형 및 계통발생학적 분류. *대한임상미생물학회지* 2000;3(2):121-131.
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. *Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction*. *Genomics* 1989;5:874-9.
- Hayashi K. *PCR-SSCP: A method for detection of mutations*. *Genet. Anal. Tech. Applic.* 1992;9:73-9.
- 박영철, 남정현, 주철현, 문미선, 정경원, 이희란, et al. 무균성 뇌막염 환자에서 분리된 장내 바이러스의 5' -nontranslating region의 염기서열 변이 분석. *J Bacteriol Virol* 2001;31(1):85-94.