

식육가공품 중 E형 간염바이러스 유전자 검출 시험법

1. 전처리

1) 시약 및 시액

가) Phosphate-Buffer saline (pH 7.4)

나) 유전자 추출 키트(Viral RNA Mini Kits)

재현성 및 검출효율 등을 고려하여 QIAGEN-Viral RNA Mini Kits 또는 동등 이상의 제품사용 가능

다) 유전자 증폭 용액

(1) RT-PCR 증폭 용액

- ① OPC (Oligo Nucleotide Purification Cartridge)로 정제된 프라이머를 사용한다.
- ② RT-PCR에 사용되는 One-step RT-PCR mix는 본 시험법에서 제시한 제품(1-Step RT-PCR ReddyMix Kit) 또는 동등 이상의 제품을 사용할 수 있다.
- ③ 2차 PCR(Semi-nested PCR)에 사용되는 *Taq* DNA polymerase, 10X buffer(MgCl₂ 포함), 10 mM dNTPs(each dNTP 2.5 mM)의 필요한 시약을 갖추어 PCR을 실시한다(이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 DNA polymerase, buffer, dNTPs도 사용할 수 있다).
- ④ 증류수는 역삼투압 정제 등에 의해 17 MΩ/cm까지 정제한 초순수로 DNA, DNase 등의 오염이 없는 것을 사용한다.

(2) Realtime PCR 증폭 용액

- ① 프라이머와 프로브는 합성하여 사용한다.
- ② PCR에 사용되는 Realtime PCR mix는 본 시험법에서 제시한 제품

(Agpath ID one-step RT-PCR reagent) 또는 동등 이상의 KIT 제품을 사용할 수 있다.

- ③ 증류수는 역삼투압 정제 등에 의해 17 MΩ/cm까지 정제한 초순수로 DNA, DNase 등의 오염이 없는 것을 사용한다.

2) 장치 및 기구

- 가) 스토마커(Stomacher)
- 나) 원심분리기(Centrifuge)
- 다) 자외선조사기(UV Transilluminator)
- 라) 혼합기(Vortex mixer)
- 마) 전기영동장치(Gel Electrophoresis)
- 바) 유전자증폭장치(PCR machine)
- 사) 실시간유전자증폭장치(RealtimeRT-PCR machine)

3) 바이러스 회수과정

- 가) 멸균 된 가위 또는 수술용 칼과 핀셋 등을 사용하여 검체를 100 g 취한 후 Phosphate-Buffer saline (pH 7.4) 100 mL을 첨가하고 스토마커를 이용해 5분간 균질화 한다.
- 나) 균질화된 전체 검체를 멸균된 비이커에 옮기 후 다시 원심분리용 튜브에 옮기고 10,000 x g로 30분간 4℃에서 원심분리 한다.
- 다) 원심분리를 통해 모아진 상등액은 다시 원심분리용 튜브에 옮긴 후 8,000 x g에서 15분간 원심분리 한다.
- 다) 원심분리 후 1.5 mL 튜브에 상등액 1mL 옮기고 다시 8,000 x g에서 5분간 원심분리 한다.
- 바) 최종 상등액은 RNA 추출을 위한 시료로 사용한다.

2. 유전자 추출법

1) RNA 바이러스 유전자 추출법

※ 시판되는 바이러스 RNA 추출 키트(kit)를 사용하며, 제조사가 제시하는 적절한 실험법에 따라서 실시한다.

※ 재현성 및 검출효율 등을 고려하여 QIAGEN-Viral RNA Mini Kits 또는 동등 이상의 제품 사용이 가능하며, 또한 자동유전자 추출장치를 사용할 경우에도 바이러스 RNA 추출 키트를 사용하여 유전자를 추출 할 수 있다.

가) 바이러스 유전자 추출 시 검체와 동일한 과정으로 음성대조군(negative control)을 사용하여 유전자를 추출하며 검체의 경우 시험 진행 중 오염여부를 확인하기 위해 2개의 RNA를 추출한다.

※ 음성대조군으로는 멸균증류수를 사용한다.

나) 검체 농축액과 음성대조군 각 280 μ L에 AVL buffer(guanidine thiocyanate 함유) 1,120 μ L를 각각 혼합하여 실온에서 10분 동안 방치한 후 가볍게 원심분리기를 이용하여 원심분리(spin-down)한다.

다) 여기에 95~100% 에탄올 1,120 μ L를 넣어 혼합한 후 가볍게 원심분리(spin-down)한다.

라) 혼합액 630 μ L을 소량 원심(Mini-spin) 컬럼으로 옮겨 6,000 G에서 1분간 원심분리하고 컬럼을 새로운 회수용(collection) 튜브로 옮긴 다음 남은 혼합액을 630 μ L씩 동일한 방법으로 컬럼에 첨가하여 원심분리한다.

마) 소량 원심(Mini-spin) 컬럼을 새로운 회수용(collection) 튜브로 옮겨 AW1 완충액(guanidine hydrochloride 함유) 500 μ L를 넣고 6,000 G로 1분간 원심분리 후 컬럼을 새로운 회수용(collection) 튜브로 옮긴다.

바) AW2 완충액 500 μ L를 넣고 20,000 G로 3분간 원심분리한 후 컬럼을 새로운 1.5 mL 회수용(collection) 튜브로 옮긴다.

사) AVE 완충액(sodium azide 함유) 60 μ L를 넣고 6,000 G로 1분간 원심 분리하여 PCR을 수행하기 위한 주형(template)으로 사용한다.

3. 유전자 검출법

가) Realtime RT-PCR

- (1) Realtime RT-PCR 증폭을 위한 혼합액의 조성은 RT-PCR buffer 12.5 μ L(2X), Enzyme mix 0.5 μ L(25X), Enhancer 1.5 μ L, 정방향 프라이머 1 μ L(10 pmol), 역방향 프라이머 1 μ L(10 pmol), 프로브 0.5 μ L(10 pmol), D.W 3 μ L를 하나의 튜브에 혼합하고 Realtime PCR plate에 20 μ L씩 분주한다.

※ 혼합액은 분석 시료 수에 따라 제조하여 사용한다.

※ Realtime PCR well에 혼합액 분주 시 거품이 발생하지 않도록 주의한다.

- (2) 유전자 추출과정에서 2개로 추출된 시료의 RNA는 Realtime PCR 증폭액이 분주되어 있는 plate의 well에 5 μ L를 각 각 첨가한다.
- (3) Realtime RT-PCR 반응조건은 42℃에서 30분, 95℃에서 10분 반응 후, 95℃ 15초, 60℃ 60초를 1회로 하여 45회 반응시킨 후 증폭 곡선을 확인한다.

표 1. E형 간염바이러스 Realtime RT-PCR 조성

Component	Volume
2X RT-PCR buffer	12.5 uL
25X Enzyme mix	0.5 uL
Enhancer	1.5 uL
Forward Primer(10 pmol)	1 uL
Reverse Primer(10 pmol)	1 uL
Probe(10 pmol)	0.5 uL
D.W	3 uL
RNA	5 uL
Total	25 uL

(4) E형 간염바이러스 유전자 증폭에 사용하는 프라이머는 표 2와 같다.

표 2. E형 간염바이러스 Realtime RT-PCR의 프라이머와 프로브의 염기서열

primers/probe	Sequence(5'→3')	위 치
정방향 primer	GGTGGTTTCTGGGGTGAC	5256-5274
역방향 primer	CGAAGGGGTTGGTTGGATG	5332-5351
프로브	FAM*-ATTCTCAGCCCTTCGCAATCCCCT-TAMRA**	5284-5308

* VIC 대체 가능, ** BHQ 대체 가능

(5) 결과 확인

- ① PCR 반응이 종료 후 FAM-TAMRA detector로 Realtime 증폭곡선이 확인되면 E형 간염바이러스 검출을 확인한다.
- ② 만일 음성대조군(negative control)에서 증폭곡선이 확인되는 경우 등은 유전자 추출과정부터 재시험을 실시해야한다.
- ③ Realtime RT-PCR에서 E형 간염바이러스로 확인된 RNA 시료는 Conventional RT-PCR을 수행하여 유전자형을 결정한다.

나) Conventional RT-PCR

(1) One-step RT-PCR 방법은 아래와 같이 수행한다.

- ① PCR 조성조건은 표 3과 같이 Mastermix(2X) 25 μ L, Reverse transcriptase (50 unit/ μ L) 1 μ L , 프라이머(3156N, 3157N)는 각 1 μ L, Enhancer 2.5 μ L, 추출 RNA 5 μ L를 첨가하여 증류수로 총 50 μ L로 맞추고 반응시킨다.
- ② PCR 반응조건은 50℃에서 15분, 95℃에서 2분 DNA를 변성시키고, 95℃ 20초, 52℃ 30초, 72℃ 1분을 1회로 하여 35회 반응시킨 후, 72℃에서 5분간 연장 반응시킨다. 상기 반응 종료 후 PCR 생성물에 대하여 Nested PCR을 실시한다.

표 3. E형 간염바이러스 One-step RT-PCR 반응액 조성

Component	Volume	Primer
Mastermix(2X)	25 uL	-
Reverse transcriptase (50 unit/ μ L)	1 uL	-
D.W.	14.5 uL	-
Forward primer(20 pmol)	1 uL	3156N
Reverse primer(20 pmol)	1 uL	3157N
Enhancer	2.5 uL	-
Extracted RNA, PCR control	5 uL	-
Total	50 uL	-

표 4. E형 간염바이러스 One-step RT-PCR 반응조건

	온도	시간	Cycle
cDNA 합성(cDNA synthesis) 초기변성(predenaturation)	50℃ 95℃	15 min 2 min	1 cycle
변성(denaturation) 결합 (annealing) 확장 (extension)	95℃ 52℃ 72℃	20 sec 30 sec 1 min	35 cycle
최종신장 (post-elongation)	72℃	5 min	1 cycle
보관	4℃	∞	∞

(2) Nested PCR 방법은 아래와 같이 수행한다.

- ① One-step RT-PCR 산물을 주형으로 하여 Nested PCR을 실시한다. 1차 PCR 산물 2 μ L, 10x 완충액(MgCl₂ 포함) 2 μ L, dNTPs (10 mM) 2 μ L, *Taq* DNA polymerase (1 unit/ μ L) 1 μ L, 정방향 (10 pmol) 및 역방향(10 pmol) 프라이머는 각 1 μ L 첨가한 다음 최종 증류수로 총 20 μ L로 맞추고 후 Nested PCR을 실시한다.
- ② PCR 반응조건은 94℃에서 5분간 DNA를 변성시키고 94℃ 30초, 52℃ 30초, 72℃ 30초를 1회로 하여 35회를 반응시킨 후 72℃에서 10분간 연장 반응한다.

표 5. E형 간염바이러스 Nested PCR 반응액 조성

Component	Volume	Primer
dNTPs(10 mM)	2 uL	-
10x Buffer(with MgCl ₂)	2 uL	-
D.W.	11 uL	-
Forward primer(10 pmol)	1 uL	3158N
Reverse primer(10 pmol)	1 uL	3159N
<i>Taq</i> DNA polymerase(1 unit/ μ L)	1 uL	-
1st PCR Product	2 uL	-
Total	20 uL	-

표 6. E형 간염바이러스 Nested PCR 반응조건

	온도	시간	Cycle
초기 변성 (predenaturation)	94℃	5 min	1 cycle
변성(denaturation)	94℃	30 sec	35 cycle
결합 (annealing)	52℃	30 sec	
확장 (extension)	72℃	30 sec	
최종신장 (post-elongation)	72℃	10 min	1 cycle
보관	4℃	∞	∞

③ PCR 반응종료 후 PCR 증폭 반응액 5 μ L를 전기영동 완충액(gel loading buffer) 1 μ L와 혼합한 다음 젤(gel)의 각 홈에 검체를 조심스럽게 넣고 나머지 한 홈에 PCR 증폭산물의 크기를 식별하기에 적당한 표식 DNA(marker DNA) 7 μ L를 넣는다. 1.5% 아가로스 젤(agarose gel) 상에서 100V로 전기영동한 후 Ethidium Bromide(EtBr) 염색액으로 30분간 염색하고 증류수로 10분간 탈색하고 자외선 조사기(UV transilluminator)로 조사하여 증폭된 DNA 밴드를 관찰한다.

④ E형 간염바이러스 유전자 증폭에 사용하는 프라이머는 표 7과 같다.

표 7. E형 간염바이러스 PCR 프라이머 염기서열

Primer	Sequence (5'→3')	위치	적용	Size
Forward 3156N	AATTATGCCCAGTACCGGGTTG	5663-5684	one step	731bp
Reverse 3157N	CCCTTATCCTGCTGAGCATTCTC	6371-6393		
Forward 3158N	GTTATGCTTTGCATACATGGCT	5948-5969	Nested /Sequencing	348bp
Reverse 3159N	AGCCGACGAAATCAATTCTGTC	6274-6295		

(3) 1차 결과 확인

- ① 아가로스 젤(agarose gel)상에서 시료에 348 bp의 밴드가 있을 경우 E형 간염바이러스로 일차 확인한다.
- ② 만일 음성대조군(negative control)에서 PCR 밴드가 확인되는 경우 등은 재시험을 실시해야한다(표 8 참고).
- ③ E형 간염바이러스가 일차 확인된 경우 최종 확인을 위하여 아가로스 젤(agarose gel)상에서 해당부위를 절취하여 PCR 산물을 정제한 후 염기서열(DNA sequencing)을 분석하여 판정한다.

표 8. E형 간염바이러스 PCR 결과판정 (예시)

	추출 RNA(시료)	음성대조군	1차 판정
1	+	-	PCR 검출
	+		
2	+	-	PCR 검출
	-		
3	+	+	재 실험
	+		
4	-	-	PCR 불검출
	-		

+ : E형 간염바이러스 PCR 밴드 확인됨, - : 밴드가 확인되지 않음

(4) 최종 검출 판정

- ① 염기서열 분석(DNA sequencing)을 위하여 (3)의 ③에서 정제된 DNA 1 μ L를 주형으로 3158N과 3159N 프라이머를 사용한다.
- ② 염기서열 분석(sequencing) 반응을 위한 혼합 조건은 각 유전자형 nested 프라이머(1 pmol)를 독립된 각각의 튜브에 2 μ L, dye-terminator 2 μ L, 정제 DNA 2 μ L를 첨가하여 증류수로 최종 10 μ L가 되도록 하고 96℃에서 1분간 DNA를 변성시킨 후, 96℃에서 10초간, 50℃에서 5초간, 60℃에서 4분간을 1회로 하여 25회 반응시킨 다음 60℃에서 10분간 연장반응을 시킨다.
- ③ PCR 산물은 직접 염기서열 분석(DNA sequencing)하되, 2종 이상의 유전자가 혼합되어 있는 경우에는 클로닝 염기서열 분석(Cloning DNA Sequencing)을 재 실시 한다. 염기서열 분석(DNA Sequencing)에 의해 결정된 염기서열은 E형 간염바이러스 유전자 데이터베이스 (Reference sequence 및 NCBI blast)와 비교하여 E형 간염바이러스로 확인되었을 경우 검출된 것으로 최종 확인한다.