

Rapid detection of the hepatitis a virus from fresh lettuce using immunomagnetic separation and quantum dots assay

Hee-Min Lee¹, Joseph Kwon², Jong-Soon Choi², Yong-Gwan Won³, Eun-Sun Kim⁴,
Jae-Keun Chung⁴, Min-Ji Kim⁴, Duwoon Kim^{1*}

¹Department of Food Science and Technology and Agribio Disaster Research Center, Gwangju 500-757, Korea

²Korea Basic Science Institute, Daejeon 305-806, Korea

³Department of Electronics and Computer Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

⁴Health and Environment Institute, Gwangju 502-837, Korea

IMS-QD assay를 활용한 상추에서 간염 A형 바이러스의 신속순수분리 및 형광 검출법 연구

이희민¹ · 권요셉² · 최종순² · 원용관³ · 김은선⁴ · 정재근⁴ · 김민지⁴ · 김두운^{1*}

¹전남대학교 식품공학과 · 기능성식품연구센터, ²한국기초과학지원연구원,

³전남대학교 전자컴퓨터공학부, ⁴광주광역시보건환경연구원

Abstract

Hepatitis A virus (HAV) infection leads to acute liver failure and death through the intake of contaminated food. The polymerase chain reaction (PCR) has been used to detect HAV in food samples. HAV detection takes a long time, however, due to the virus concentration step required before PCR assay. In this study, a rapid method of detecting the HAVs present in lettuce using immunomagnetic separation combined with quantum dots (IMS-QDs) assay was developed. The detection limit of IMS-QDs for HAV was 10 TCID₅₀/mL, similar to the result that was obtained using RT-PCR combined with PEG or IMS. The application of IMS-QDs assay completed the viral detection within one hour, but this was not possible using PEG combined with RT-PCR. In conclusion, IMS-QDs assay is a rapid and efficient method for detecting HAV at a low concentration in agricultural products.

Key words : hepatitis A virus, immunomagnetic separation, quantum dot, RT-PCR

서 론

식품의 섭취로 인하여 인체에 감염성을 일으키는 식중독 사례들은 국민들의 건강에 영향을 미칠 뿐만 아니라 경제적 손실을 초래할 수 있다. 최근 바이러스에 의한 식중독 사례들이 늘어나고 있으며, 이 때문에 식중독 바이러스 검출방법에 대한 많은 연구들이 수행되고 있으나, 현장에서 사용 가능한 고민감도 바이러스 검출방법이 필요한 실정이다(1).

간염 A형 바이러스(HAV)는 식수나 식품의 오염을 통해 발생하는 수인성 식중독 바이러스 중의 하나로(2), 직경은

약 27 nm이고, 막이 없는 Picornavirus 속이며, 7.5 kb의 양성 단일 가닥 RNA 바이러스이다(3). 염기서열 차이에 따라 7개의 유전자형(genotype)으로 분류되며, 그 중 I, II, III, 그리고 VII형이 인체 감염형으로 보고되었으며(4,5), 식품에 의한 감염은 굴, 조개 등 패류의 부적절한 열처리와, 과일류, 채소류 등 신선식품의 섭취에 의해 발생이 되고 있다(6,7)

현재까지 식중독 바이러스 검출기술은 reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)을 통해 바이러스를 검출하고 있으나, 전처리 단계로 식품의 균질화, 식품성분 제거, polyethylene glycol(PEG)을 이용한 바이러스의 농축, RNA 추출과 같은 단계가 공통적으로 요구되고 있다(8,9). 특히, PEG을 이용한 바이러스의 농축과정이 전체 검출시간

*Corresponding author. E-mail : dwkim@jnu.ac.kr
Phone : 82-62-530-2144, Fax: 82-62-530-2149

을 지연시키는 주요 단계로서 신속 검출 시 반드시 개선해야 될 필수적인 단계이다. 또한, 식품 중에 RT-PCR 저해제로 작용 될 수 있는 성분이 다량 존재하기 때문에 검출효율성에 영향을 미치고 있다(10,11).

Immunomagnetic separation(IMS) 기술은 자성비드(magnetic beads)에 특이적인 항체를 부착시켜 항원을 원심 분리 없이 신속히 회수가 가능하며, 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)에서 문제시되는 PCR 반응 저해제를 효과적으로 제거하는데 도움이 되어 바이러스 검출능 개선에 활용되고 있는 기술이다(12). IMS를 활용하여 분리된 항원의 존재여부를 확인하고자 할 때 형광 신호가 높은 quantum dot으로 표지된 항체를 사용하면 다른 발광 표지물질보다 고민감도의 항원 검출력을 제공하고 있기에 바이러스 검출 연구분야에서 활용하고 있다(13-15).

본 연구에서는 신선식품 중 하나인 상추에서 HAV를 자성비드 면역침강법 기술을 활용하여 특이적으로 신속하게 분리 및 농축하고 quantum dot을 사용하여 신속 검출 할 수 있는 프로토콜을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

바이러스

본 실험에 사용한 hepatitis A virus(HAV) strain HM-175/18f(VR-1402)는 미국 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양 받아 fetal rhesus kidney(FRHK-4) 세포에 접종 및 배양한 10^4 TCID₅₀/mL 농도의 바이러스를 사용하였으며, Norovirus(NoV) 및 hepatitis E virus(HEV)는 광주 보건환경연구원에서 환자의 분변에서 분리된 바이러스를 사용하였다.

식중독 바이러스의 농축방법

10 g의 상추에 각각 10배씩 희석한 바이러스를 200 μ L 접종한 뒤 1시간 동안 클린벤치에서 흡착시키고, 50 mL의 Tris 용액(100 mM Tris-HCl, 50 mM glycine, 1% beef extract, pH 9.5)을 첨가하여, stomacher bag에 넣은 후 stomacher로 15분간 한 후 10분간 교반하였다. 교반 후 확보한 상층액에서 바이러스를 농축하기 위해 PEG 농축법과 IMS 방법을 사용하여 각각 농축시켰다. PEG 농축법은 탈리액의 2배인 100 mL의 16% PEG 8000(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가한 후 4°C에서 12시간 정치하였다. 이 후, 4°C에서 12,000 \times g에서 30분간 원심분리 후 상등액은 버리고 남은 pellet을 200 μ L의 PBS로 재부유하여 바이러스를 농축하였다.

Immunomagnetic separation(IMS)

이전 논문에서 수행했던 방법인 IMS를 식품에 적용하여 실시하였다(16). 간단히 서술하면, IMS은 자성체인 자성비

드-결합 G 단백질(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 50 μ L에 200 μ L의 0.02% Tween 20이 포함된 PBS에 HAV 항체(mouse anti-HAV monoclonal antibody, Genetex, San Antonio, TX, USA) 5 μ g을 용해하여 상층액을 제거한 자성비드와 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 상층액을 제거하고 200 μ L의 0.02% Tween 20이 포함된 PBS로 3회 세척하여 바이러스 탐침자를 제조하였다. 이 탐침자를 탈리액 50 mL에 혼합하여 넣고 실온에서 10분 동안 반응하였다. 반응이 끝난 후 자석을 붙여 자성비드-결합 G 단백질에 붙어있는 바이러스 항체와 결합하는 바이러스를 분리하며, 결합하지 못한 바이러스가 포함된 상층액은 RT-PCR 분석을 위해 새로운 튜브에 옮겨 PEG 농축을 실시하였다. 항원(바이러스)이 결합된 바이러스 자성 탐침자는 200 μ L의 0.02% Tween20이 포함된 PBS로 3회 씻어내어 불순물을 제거한 후, 100 μ L PBS로 부유시켜 새로운 1.5 mL 튜브에 옮겨 상층액을 제거하였다. 새로운 튜브에 있는 G 단백질에 붙어있는 항원-항체 결합체를 20 μ L의 50 mM glycine 용액(pH 2.8)으로 용리하여 분리하고, 최종적으로 pH 7.5가 되도록 93 μ L의 100 mM Tris 용액(pH 7.5)을 첨가하였다. 그리고 HAV의 순수 분리 확인을 위해 RT-PCR을 실시하였다.

바이러스 RNA 추출 및 RT-PCR

바이러스의 RNA는 P&C rapid RNA extraction kit (Biosolution, Inc., Suwon, Korea)를 이용하여 30 μ L를 추출하였고, cDNA kit(Beams bio., Seongnam, Korea)를 사용하여 37°C에서 60분, 72°C에서 10분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 HAV(VP1)와 NoV(VP1), 그리고 HEV(RdRp)의 유전자 증폭을 위해 Pre-mix PCR(Bioneer Inc., Seoul, Korea) 튜브에 합성한 cDNA를 1 μ L, 10 pmol의 forward와 reverse primer를 각각 1 μ L씩 넣고 증류수로 최종 용량이 20 μ L로 맞췄다. 실험에 사용한 primer는 HAV_VP1_F (5'-TGG TTT GCC ATC AAC ACT GAG G-3'), HAV_VP1_R (5'-ACC CAA GGA GTA TCA ACG GCA AG-3'), NoV_GII-F1M (5'-GGG AGG GCG ATC GCA ATC T-3'), NoV_GII-R1M (5'-CCR CCI GCA TRI CCR TTR TAC AT-3'), 그리고 HEV_IN_F(5'-GTA TTT CGG CCT GGA GTA AGA C-3'), HEV_IN_R(5'-TCA CCG GAG TGY TTC TTC CAG AA-3')를 이용하여 PCR을 실시하였다(17,18). HAV의 PCR 반응 조건은 95°C 5분간 변성한 후 95°C 30초, 57°C 30초, 72°C 30초로 35회 반응을 실시하였다. NoV와 HEV의 PCR 조건은 annealing 온도만 각각 56°C, 61°C로 변경하고 동일하게 수행하였다(19,20). 유전자 증폭여부를 확인하기 위해 1.5% agarose gel로 전기영동을 실시한 후 증폭된 밴드를 image analyzer(Chemidox XRS; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)로 확인하였다.

Quantum dot을 이용한 바이러스 형광검출

IMS를 통해 분리된 HAV를 형광검출하기 위해서 HAV 항체(goat anti-HAV polyclonal antibody, Abcam, Cambridge, UK) 10 µg을 용해시킨 PBS 용액(400 µL)을 항원(바이러스)이 결합된 바이러스 자성 탐침자가 들어있는 1.5 mL 튜브에 넣고 10분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 튜브에 자석을 붙여 상층액을 제거하고 200 µL의 0.02% Tween 20이 포함된 PBS로 2회 세척하여 불순물을 제거한 후, Quantum dot이 결합된 2차 항체(625 donkey F(ab')₂ anti-goat IgG conjugate (H+L); Invitrogen) 4 µg을 용해시킨 PBS 용액(400 µL)을 넣고 10분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 튜브에 자석을 붙여 상층액을 제거하고 200 µL의 0.02% Tween 20이 포함된 PBS로 3회 세척하여 불순물을 제거하였다. 최종적으로 얻어진 자성비드를 600 µL의 PBS로 부유시킨 후 96 well black plate(SPL Life Sciences, Seoul, Korea)에 200 µL씩 분주하여, Spectra Max GEMINI-XS spectrofluorometer (Molecular Devices Corp, Sunnyvale, CA, USA)를 통해 형광을 측정하였다.

결과 및 고찰

바이러스에 오염된 상추에서 Immunomagnetic separation을 이용한 HAV의 순수분리

HAV와 NoV, 그리고 HEV가 혼합된 바이러스를 상추에 접종하여 이 중 HAV만을 순수하게 농축하기 위해 항원에 특이적인 항체와 자성 비드를 사용하여 신속하게 항원을 분리하고 농축시키는 IMS 방법을 수행하였다. 그 결과, HAV 항체가 결합된 자성비드를 washing buffer로 세척 후 얻은 세척분획물(Washout)과 PBS buffer로 세척된 자성비드를 glycine buffer(pH 2.8)로 바이러스를 용출시킨 후 Tris 용액(pH 7.5)으로 중화 처리 된 용출분획물(Eluent)을 대상으로 RT-PCR을 수행한 결과, 150bp의 HAV 증폭산물이 세척분획과 용출분획에서 모두 검출되었으나(Fig. 1A), 310bp의 NoV와 352bp의 HEV 증폭산물은 세척분획에서만 검출되고 용출분획에서는 검출되지 않았다(Fig. 1B). 이 결과를 통해 여러 바이러스로 오염된 식품에서 특정 바이러스를 순수하게 분리 및 검출하고자 할 때 IMS방법을 이용하

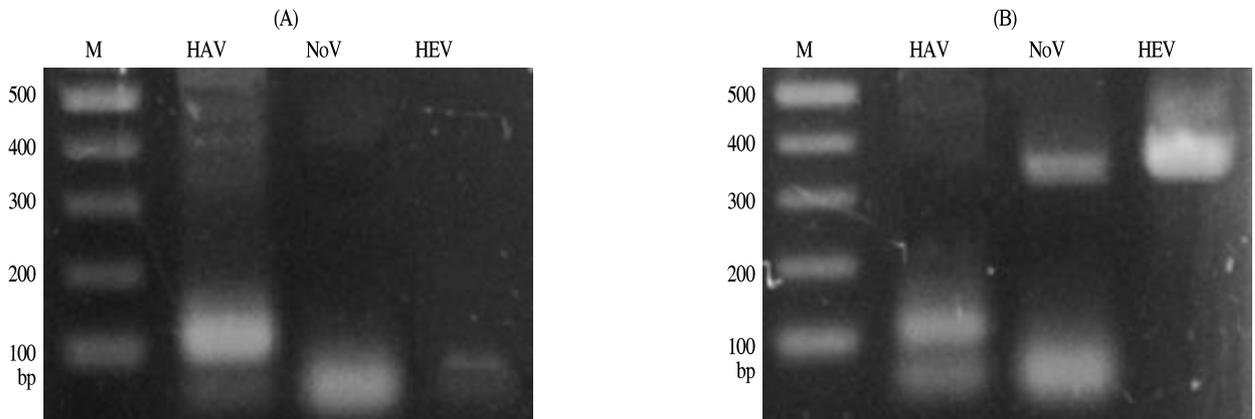


Fig. 1. RT-PCR assay for detecting enteric virus including hepatitis A virus (HAV), norovirus (NoV), and hepatitis E virus (HEV) using immunomagnetic separation (IMS).

The amplified VP1 gene (150 bp) of HAV was only detected in the eluent fraction (A). Three amplified genes, VP1 (150 bp), VP1 (213 bp), and RdRp (352 bp) of HAV, NoV, and HEV, respectively, was detected in the washout fraction (B). M, 100 bp marker.

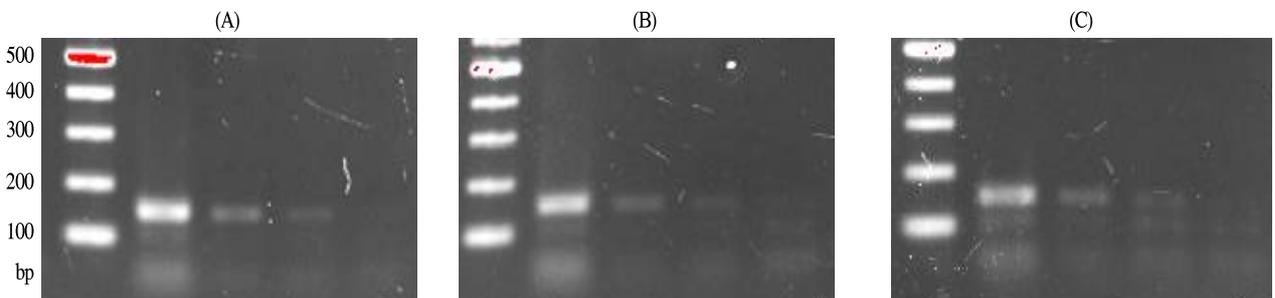


Fig. 2. Comparison of the two methods for concentrating HAV by RT-PCR assay. (A) The limit of detection for the RT-PCR assay was assessed with 10-fold serial dilutions of HAV stock.

The amplified VP1 gene (150 bp) of HAV was detected by RT-PCR after concentration using (B) polyethylene glycol (PEG) and (C) immunomagnetic separation (IMS). M, 100 bp marker; lane 1, 100 µL of 1:10 dilution; lane 2, 100µL of 1:100 dilution; lane 3, 100 µL of 1:1000 dilution; lane 4, 100 µL of 1:10000 dilution.

면 짧은 시간에 바이러스를 농축 및 회수할 수 있음을 확인하였다.

PEG 농축 및 IMS 농축법의 효능 비교

Fig. 1을 통해 IMS 방법을 이용하면 짧은 시간 내에 순수하게 HAV의 분리가 가능하다는 것을 확인하였다. 그러나 IMS 방법에 의해 바이러스 농축방법의 농축 효율을 확인하고자 기존의 PEG 농축법과 농축 효율을 비교하였다. 10^4 TCID₅₀/mL의 HAV를 10배씩 단계희석하여 이 중 200 µL를 가지고 RT-PCR을 실시하였을 때 10^3 까지 검출되었으며(Fig. 2A), 이 바이러스를 동일한 양으로 각각 상추 표면에 접종하여 IMS를 통한 농축샘플과 PEG 농축을 통하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 IMS 농축과 PEG 농축 모두 10^{-3} 까지 검출되었다(Fig. 2). 두 농축 방법을 비교하고자 농축을 통한 RT-PCR 결과, 바이러스의 희석됨에 따라 PCR 밴드가 약해지는 것이 확인하였으며, 두 방법 모두 10^3 까지 HAV를 검출할 수 있었다. 기존의 보고된 논문에 의하면, 낮은 수준의 바이러스를 검출 시 PEG 농축에 비해 IMS를 통한 농축방법이 효과적이며, 이는 항체 특이적 바이러스 농축을 통해 다른 PCR 저해물질의 제거가 용이하며 상대적 바이러스 손실이 적기 때문이다(11,20). 이는 소량으로 식품 내에 존재하여 인체에 감염을 일으키는 식중독 바이러스를 검출할 시에 IMS를 통한 바이러스 농축방법은 소량의 바이러스를 10분이라는 단 시간에 농축하여 검출할 수 있으므로 효과적인 농축 방법임을 확인하였다.

IMS-quantum dot assay를 통한 HAV 형광 검출

식중독 바이러스의 정성적 분석을 RT-PCR으로 할 경우 3시간 이상의 분석시간이 소요되는데, 보다 신속하게 HAV를 검출할 수 있는 방법을 고안하고자 본 연구에서는 형광물질인 quantum dot이 결합된 2차 항체를 이용하여 HAV를

형광검출을 실시하였다(15,20). 그 결과 HAV를 형광으로 검출할 수 있었으며, 바이러스가 희석됨에 따라 형광의 세기 또한 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 3). Quantum dot이 라벨링된 항체를 이용하여 간염 A형 바이러스를 검출 시, RT-PCR의 검출한계인 $10^3\sim 10$ TCID₅₀/mL까지 형광 검출치를 확인 할 수 있었다(Fig. 3).

요 약

식중독 유발 바이러스인 HAV는 제 1군 감염병원으로 규정되면서 감염 시 원인식품을 빠르게 분석하게 되었으며 그로 인해 정확하면서 빠른 검출기술을 요구하게 되었다. 본 연구에서는 HAV에 오염된 상추에서 신속하게 바이러스를 검사하기 위해서 IMS를 통하여 신속하게 HAV를 순수 분리 및 농축하였고, 형광물질인 quantum dot을 활용하여 형광검출을 실시하였다. 또한 일반적으로 바이러스 농축에 사용되는 PEG 농축방법과 비교하였을 때 검출능은 유사한 결과를 얻었으나, 농축시간 면에서는 IMS를 통한 방법이 효과적이었다. 또한 IMS 방법으로 확보된 항원을 Quantum dot을 활용하여 10분 이내에 바이러스를 검출할 수 있었다. 본 연구에서 제시된 검출기반은 식품 유통 과정에서 다양한 식중독 바이러스로부터 소비자를 보호 할 수 있는 검사방법으로 활용될 수 있다고 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ008407)과 한국기초과학지원연구원 재난과학(과제번호: C32730) 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

References

1. Kim D, Kim SR, Moon JH, Kim SJ, Oh MJ (2008) Foodborne virus diseases and detection methods. Food Sci Industry, 41, 53-57
2. Rodriguez-Manzano J, Miagostovich M, Hundesa A, Clemente-Casares P, Carratala A, Buti M, Jordi R, Girones R (2010) Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in eastern Spain by testing urban sewage samples. J Water Health, 8, 346-354
3. Hollinger FB, Emerson SU (2001) Hepatitis A virus. In: Fields Virology, Knipe DM, Howley PM (Editor). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, p 799-840

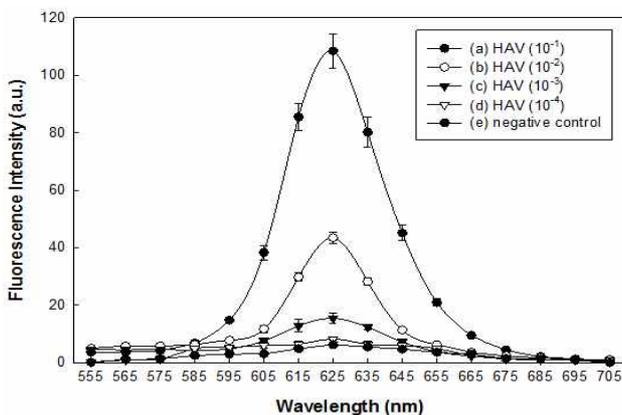


Fig. 3. Detection of HAV using a fluorescent quantum dot (QD) probe.

Ten-fold serially diluted HAV was prepared from a stock culture: 1:10 (a), 1:100 (b), 1:1000 (c), 1:10000 (d), and negative control, which was prepared with PBS without HAV (e). The excitation and emission wavelengths were 420 and 625 nm, respectively.

4. Provost PJ, Ittensohn OL, Villarejos VM, Arguedas JA, Hilleman MR (1973) Etiologic relationship of marmoset-propagated CR326 hepatitis A virus to hepatitis in man. *Proc Soc Exp Biol Med*, 142, 1257-1267
5. Rakela J, Fay OH, Stevenson D, Gordon I, Mosley JW (1976) Similarities of two hepatitis A virus strains. *Bull World Health Organ*, 54, 561-564
6. Cuthbert JA (2001) Hepatitis A: old and new. *Clin Microbiol Rev*, 14, 38-58
7. Guevermont E, Brassard J, Houde A, Simard C, Trottier YL (2006) Development of an extraction and concentration procedure and comparison of RT-PCR primer systems for the detection of hepatitis A virus and norovirus GII in green onions. *J Virol Methods*, 134, 130-135
8. Kim DW, Kim SR, Kwon KS, Lee JW, Oh MJ (2008) Detection of hepatitis A virus from oyster by nested PCR using efficient extraction and concentration method. *J Microbiol*, 46, 436-440.
9. Cuthbert JA (2001) Hepatitis A: old and new. *Clin Microbiol Rev*, 14, 38-58
10. Flekna G, Schneeweiss W, Smulders FJ, Wagner M, Hein I (2007) Real-time PCR method with statistical analysis to compare the potential of DNA isolation method store move PCR inhibitors from samples for diagnostic PCR. *Mol Cell Probes*, 21, 282 - 287
11. Shin MH, Jang KI, Kim KY (2007) Rapid detection of feline calicivirus in oyster using immunomagnetic separation and RT-PCR method. *J Agric Life Sci*, 41, 37-43
12. Monceyron C, Grinde B (1994) Detection of hepatitis A virus in clinical and environmental samples by immunomagnetic separation and PCR. *J Virol Methods*, 46, 157 - 166
13. Wang H, Li Y, Wang A, Slavik M (2011) Rapid, sensitive, and simultaneous detection of three food borne pathogens using magnetic nanobead-based immunoseparation and quantumdot - based multiplex immunoassay. *J Food Prot*, 74, 2039 - 2047
14. Wang L, Wu CS, Fan X, Mustapha A (2012) Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in ground beef by a beadfree quantum dot - facilitated isolation method. *Int. J Food Microbiol*, 156, 83 - 87
15. Lee HM, Kwon J, Choi JS, Lee KH, Yang S, Ko SM, Chung JK, Cho SY, Kim D (2013) Rapid detection of norovirus from fresh lettuce using immunomagnetic separation and a quantum dots assay. *J Food Prot*, 76, 707-711
16. Lee HM, Kim DW (2012) Use of IMS-RT-PCR for the rapid isolation and detection of hepatitis A virus from the swine feces. *Korean J Food Sci Technol*, 44, 638-642
17. Kim SH, Cheon DS, Kim JH, Lee DH, Jheong WH, Heo YJ (2005) Outbreaks of gastroenteritis that occurred during school excursion in Korea were associated with several waterborne strains of norovirus. *J Clin Microbiol*, 43, 4836-4839
18. Kim SE, Kim MY, Kim DG, Song YJ, Jeong HJ, Lee SW, Lee JB, Park SY, Song CS, Oh SJ, Yoo HS, Choi IS (2008) Determination of fecal shedding rates and genotypes of swine hepatitis E virus (HEV) in Korea. *J Vet Med Sci*, 70, 1367-1371
19. Haramoto E, Kitajima M, Katayama H, Ohgaki S (2010) Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. *Water Res*, 44, 1747-1752
20. Zhao W, Zhang WP, Zhang ZL, He RL, Lin Y, Xie M, Wang HZ, Pang DW (2012) Robust and highly sensitive fluorescence approach for point-of-care virus detection based on immunomagnetic separation. *Anal Chem*, 84, 2358-2365

(접수 2013년 9월 29일 수정 2013년 12월 24일 채택 2014년 1월 2일)