

Rotavirus ds-RNA 3'-Termini의 5'-³²P-_pC_p표식법의 사용에 대하여

한양대학교 의과대학 미생물학교실

이 광 섭 · 김 경 희 · 조 양 자

= Abstract =

Labeling of 3'-Termini of Human ds-RNAs by 5'-³²P-_pC_p Using NRA Ligase

Kwang-Sup Lee, M.D., Kyung-Hee Kim, Ph.D. and Yang Ja Cho, M.D.

Department of Microbiology, Hanyang University, College of Medicine, Seoul, Korea

Worldwide, rotavirus (Rv) is the major viral agent of severe diarrhea in children and the current focus of intense research to develop an effective vaccine.

The genome of Rv consists of 11 segments of double-stranded RNA that can be separated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Although detection of Rv in clinical specimens by PAGE has become a routine procedure for a molecular epidemiologic research, it has remained difficult to reveal the migration pattern of 11 Rv segments in the stool specimens with quantities not sufficient.

In this study, some of those specimens with low contents of viral RNA that PAGE with silver staining could not detect (specimens positive by the ELISA but negative by PAGE with silver staining: 24 specimens) were further evaluated by terminal labeling. Purified viral genomic RNA was labeled at the 3'-terminus with cytidine 3', 5'-[³²P] bisphosphate (Amersham, Arlington Heights, Ill.) by using a T4 RNA ligase. The 3'-end-labeled RNA segments were separated by PAGE and visualized by means of autoradiography at -70°C.

Only one tenth amount of purified RNA segments used in a page with silver staining was loaded on a page with a terminal labeling, the page with a terminal labeling demonstrated RNA.

서 론

Family *Reoviridae*에 속하는 Rotaviruses (Rv)는 개 발국, 개발 도상국, 비개발국 모두에서 소아 및 어린 동물에 급성설사 및 장염을 일으키는 주된 원인체로 알려져 있다¹⁾.

세계보건기구의 통계자료²⁾에 의하면 지구상의 5세 이하의 어린이들중 설사증으로 사망하는 숫자가 매년 500만명에 달하며, 이들중 20%에 해당하는 100만여명이 Rv로 인한 설사증으로 사망하고 있다고 한다. 본교실에서는 최근의 29개월동안 서울지역의 설사소아 345명과

비설사대조군 90명을 대상으로 단세포균향체-이용 ELISA를 사용하여 이지역의 Rv 有病力을 조사하였는데³⁾, RV는 소아설사군의 68% 및 비설사대조군의 19%에서 검출되었다($P < 0.001$).

사람과 동물에서 발견되는 Rv에는 항원적으로 서로 다른 6군(A-F)이 있다⁴⁻⁶⁾. RvA군에서 F군에 이르는 6군에 속하는 Rv들의 electropherotype들은 군에 따라 현저하게 다르기에 변이가 일어난 새로운 Rv의 대부분이 polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)로 발견되는 등^{4,5,7,8)} 이는 분리주들의 상호 비교 및 항원변이주들의 검출에 이 방법이 큰 도움이 된다는 것을 제시한다. 김 등³⁾의 연구의 계속으로 이등⁹⁾은 PAGE를 사용하여 서

울지역 Rv 분리주들의 주되는 electropherotype, A군 이외의 Rv 및 변이주들의 출현여부를 평가하여 보았는데 ELISA에서 Rv 양성으로 판명된 가검물들중 PAGE된 가검물들의 77%만이 Rv RNA 형태를 나타내어 현재 사용되고 있는 PAGE의 민감도를 개선할 필요성이 제시되었다.

그러므로, 본연구에서는 PAGE의 민감도를 개선할 목적으로 PAGE후 silver stain으로 viral RNA가 보이지 않을 정도로 소량의 viral RNA가 함유된 것으로 의심되는 가검물들(단세포균항체-이용 FLISA에는 양성이나, PAGE후 silver staining으로는 음성인 가검물들)을 대상으로 Rv의 double-stranded RNA(ds-RNA)의 3' terminus를 cytidine 3', 5'-[5³²P] bisphosphate (Amersham, Arlington Heights, IL)로 표식하여 PAGE후 autoradiography하여 보았으며 재래의 방법인 PAGE후 silver staining의 민감도와 비교평가하여 보았다.

재료 및 방법

1. 대 상

1987년 1월부터 1989년 5월사이의 29개월동안 9세까지의 영아 및 어린이가 345명(전원이 서울 성동구 및 강동구에 위치한 대학병원들에 설사증으로 입원한 환자였음)으로 부터 입원당일 채취된 변 가검물들³⁾중, 단세포균항체-이용 ELISA에는 양성이나 PAGE후 silver stain으로는 음성인 가검물들(PAGE후 silver stain으로 염색해도 viral RNA가 보이지 않을 정도로 소량의 viral RNA를 함유한 가검물들) 24개 및 단세포균항체-이용 ELISA에 음성이나 증상이 Rv와 관련된 것으로 추측되는 가검물 15개가 무작위로 선택되어 아래와 같이 Rv RNA가 추출, 정제되고 이 정제액의 Rv RNA가 3'-terminal labeling으로 평가되었다.

2. Rv RNA추출 및 정제분석

가검물을 phosphate-buffered saline (pH 7.2)에 10%로 희석시킨후 10% 가검물 희석액 0.5 ml를 trichlorotrifluoroethane 0.5 ml로 추출후, 40%(wt/vol) sucrose cushion에 통과시켜 virus 입자들을 모았다¹⁰⁾. 부분적으로 정제된 virus 입자의 capsid protein을 phenol-chloroform으로 제거시킨후 상층액에서 viral

RNA를 ethanol로 一晝夜 -20℃에서 침전시켰다.

3. Rv ds-RNA 3'-Termini의 5'-³²P-_pC_p표식

위의 정제된 RNA 10 μ l와 reaction mixture [2.3 μ M 5'-³²P-_pC_p (specific activity 3,000 Ci/mmol), 6.0 μ M ATP, 50 mM Hepes-buffer (PH 7.5), 20mM MgCl₂, 3.3 mM dithiothreitol, 0.5 μ g bovine serum albumin, 10% (v/v) DMSO, 6.25 unite T₄ RNA ligase] 40 μ l를 혼합하여 4℃에서 一晝夜 보관한후 RNA를 phenol로 추출하였다. 추출된 RNA를 Bio-gel A50 (BioRad, Richmond, CA) column을 사용하여 3'-end가 표식된 RNA만 증류수 30 μ l, 20 μ l로 두번 elute시킨후 0.2M sodium acetate (PH 5)하에서 ethanol로 침전시켰다¹¹⁾.

4. 표식된 RNA의 PAGE 분석

3'-end가 표식된 RNA 절단들을 7.5% polyacrylamide gel (6 cm \times 6 cm)을 사용하여 실온에서 20V/cm로 2시간동안 전기영동하였고 Kodak X-Omat films (Eastman Kodak Co., Rochester, NY)를 이용한 autoradiography로 눈에 보이게 하였다.

전기영동후 gel들을 silver stain kit (Bio-Rad Lab., Richmond, Calif.)로 염색한 방법과 ³²P 표식법과의 정량적인 비교를 위해 위의 2항에서 정제된 Rv RNA원액, 1:1, 1:5 및 1:10의 희석액을 표식하여 표식되지 않은 정제원액의 PAGE후 silver staining한 결과와 비교, 평가하여 보았다.

결 과

김등³⁾의 연구에서 Rv A군 항원-양성으로 관찰된 가검물들 230개 중에서 195개(85%)가 이등⁹⁾에 의해 PAGE후 silver stain으로 재검사되었고 검사된 195개의 가검물들중 총 151개 (77%)가 Rv RNA 형태를 나타내었다⁹⁾. 본 연구에서는 김등³⁾의 연구에서 RvA군에 대한 단세포균-이용 ELISA에서 양성으로 판정되었으나 이등⁹⁾의 PAGE-silver stain으로는 음성으로 관찰된 가검물들중 24개를 무작위로 선택하여 이들 각각의 Rv RNA정제액으로 terminal labeling후 PAGE로 검사하였는데 이들중 3개의 정제액에서 A군 Rv RNA의 형태가 관찰되었다(Fig. 1). 또한 김등³⁾의 연구에서 Rv 항



Fig. 1. Evaluation by terminal labeling of the specimens with low contents of viral RNA that PAGE with silver staining could not detect. Purified viral genomic RNA was labeled at the 3' terminus with cytidine 3', 5'-[^{32}P] bisphosphate (Amersham, Arlington Heights, I 11), by using a T4 RNA ligase.

원-음성 으로 판정된 가검물들중 무작위로 15개를 terminal labeling으로 조사하였더니 이들중 6개가 Rv의 RNA 형태를 나타내었는데 이들 6개가 모두 A군 Rv로 밝혀져 ^{32}P 표식방법의 민감도가 A군 Rv에 대한 단세포균 항체-이용 ELISA의 민감도보다 높게 관찰되었다.

[^{32}P] $_p\text{C}_p$ 를 RNA에 표식하여 Rv RNA를 검출하는 방법의 민감도는 PAGE후 silver staining에서 양성으로 판명된 정제원액 0.4 ml (2.2×10^6 viral 입자들/ml)을 PAGE할때 사용한 Rv 입자의 수 (880,000 입자들)의 1/10 (88,000 입자들)에서 나온 viral RNA를 탐지하는 수준이었다(Fig. 2).

고 찰

Rv genome은 11개의 이중 RNA 절단으로 되어있고 PAGE에 의해 각 절단을 분리관찰할 수 있다. PAGE에 의한 Rv의 검출법은 빠르고 손쉬우며 여러종류의 strain을 한꺼번에 비교할 수 있고 각 segment 간의 mobility를 비교하고 이들 상호간의 어떤 segment들이 antigenicity 변이에 관련이 있었는지도 찾아낼 수 있다. Rv 분리주들은 PAGE 상의 migration pattern에 따라 크게 두가지 (short와 long)의 electropherotype을 나타낸다.

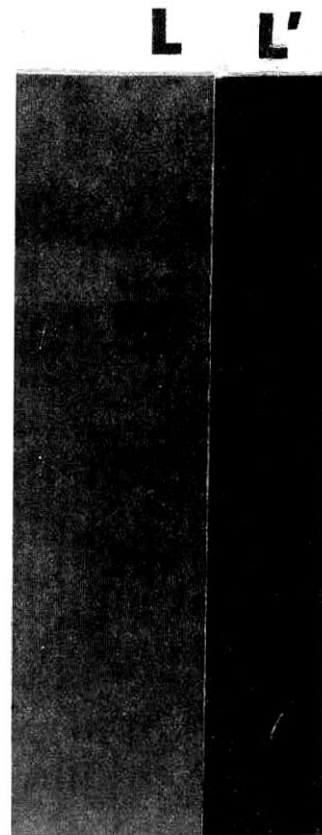


Fig. 2. Although only one tenth amount of purified RNA segments used in a page with silver staining (lane L) was loaded on a page with a terminal labeling, the page with a terminal labeling demonstrated RNA in lane L'.

사람분리주들의 경우, short pattern (S)은 subgroup I 과 serotype 2에 속하고 long pattern (L)은 subgroup II와 serotype 1, 3, 또는 4에 속한다고 보고되어 있다^{12~14}).

마찬가지로 Rv A군에서 F군에 이르는 6군에 속하는 Rv들의 electropherotype들은 군에 따라 현저하게 다르기에, PAGE를 사용하여 단세포균항체-이용 ELISA로 찾을 수 없는 A군 이외의 Rv를 검출할 수 있다. 더구나 1982년 및 1983년에 이웃 중공에서 cholera와 같은 심한 설사 epidemic이 유발되었는데 이의 원인체가 A군이 아닌 B군 Rv로 밝혀지면서^{15~16}) 모든 Rv RNA를 탐지할 수 있는 PAGE 사용의 필요성이 강조되기 시작하였다. 또한 Rv genome은 segmented되어 있기 때문

에 각 serotype 상호간 genome들의 reassortment가 가능하고 실제로 변이가 일어난 새로운 Rv의 대부분이 PAGE로 발견되었음^{4,5,7,8)}은 분리주들의 상호 비교 및 항원변이주들의 검출에 이 방법이 큰 도움이 된다는 것을 제시한다.

그러나, 환자의 stool로부터 virus RNA를 추출하여 electropherotype을 결정하는 방법은 비교적 충분한 양의 Rv RNA가 요구되나 소아들의 경우 stool의 양이 극소한 경우가 대부분이어서 최근 적은양의 가검물분석에는 silver stain법이 사용되어 왔으나 민감도가 만족스럽지 못하여 소아 설사변을 가검물로 사용하는 연구에서는 이 silver stain보다 민감도가 개선된 효율적인 virus 정제법의 확립이 필수적이라 지적되어왔다. 본 연구결과에 의하면 ³²P표식법의 민감도는 silver stain후의 PAGE보다 적어도 10배가 높은 것으로 관찰되었다.

특히 환자의 stool sample size가 100개 이상이고 stool의 양이 극미할 경우 virus의 분리 및 분리주의 electropherotype결정은 매우 어려운 과제이기에, 현재 보고되어 있는 여러 방법들을 토대로 방사능 동위원소인 ³²P를 사용하여 Rv RNA를 표식한 뒤 전기영동하고 autoradiograph하였더니 종래에 사용되어왔던 ethidium bromide나 silver stain으로 감지하지 못하는 적은 양의 Rv RNA도 감지할 수 있었다. 그러므로 이 ³²P표식방법은 장기간에 걸친 지역에 따른 Rv antigenicity 및 electropherotype의 다양성에 대한 조사가 필요한 우리나라에서의 대단위역학조사에 효율적으로 기여할 수 있다고 평가된다.

결 론

본 교실에서는 최근 3년동안 우리나라에 출현하는 Rv들의 항원적, 생화학적, 분자역학적 성격들을 연구해온바 그 연구수단의 일부로 사용되어온 PAGE의 민감도를 개선할 필요를 절실히 감지한 바 Rv RNA의 3'-end에 ³²P를 표식-PAGE-Autoradiography의 terminal labeling방법을 적용하여 보았다. 표식되지않은 Rv RNA의 PAGE후 silver stain하는 방법과 비교평가하여본 결과 terminal labeling의 결과는 PAGE-silver stain의 결과보다 10배 높은것으로 관찰되었다.

REFERENCES

- 1) Kapikian AZ, Chanock RM: *Rotaviruses*. p 863 ~ 906. In Fields BN, Knipe DN, Chanock RM, Melnick JL, Roizman B, Shope RE (Ed.), *Virology*. Raven Press, New York, 1985
- 2) De Zoysa I, Feachem RG: *Interventionls for the control of diarrheal diseases among young children : rotavirus and cholera immunization*. Bull WHO 63: 569 ~ 583, 1985
- 3) 김경희, 양재명, 조영걸 등 : 우리나라에서의 로타바이러스 소아설사증의 중요도 : 항원적, 분자역학적, 임상적 성격의 분석. 대한바이러스학회지 20: in press, 1990
- 4) Bridger JC: *Novel rotaviruses in animals and man*. P 5 ~ 23 In Bock G, Whelan J (Ed.), *Novel diarrhoea viruses*. John Wiley & Sons, Inc, Chichester, United Kingdom, 1987
- 5) Pedley S, Bridger JC, Brown JF, McCrae MA: *Molecular characterization of rotaviruses with distinct group antigens*. J Gen Virol 64:2093 ~ 2101, 1983
- 6) Pedley S, Bridger JC, Chasey D, McCrae MA: *Definition of two new group of atypical rotaviruses*. J Gen Virol 67:131 ~ 137, 1986
- 7) Estes MK, Graham DY, Dimitrov DH: *The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis*. Prog Med Virol 29:1 ~ 22, 1984
- 8) Nakagomi O, Nakagomi T, Oyamada H, Suto T: *Relative frequency of hyman rotavirus subgroups 1 and 2 in japaness children with acute gastroenteritis*. J Med Virol 17:29 ~ 34, 1985
- 9) 이재석 : PAGE에 의한 Rotavirus변이주의 검출. 한양대학교 대학원 석사과정논문, 1990년 12월.
- 10) Theil KW: *Rapid, simple method of preparing double-stranded ribonucleic acid for analysis by polyacrylamide gel*. J Clin Microbiol 14:273 ~ 280, 1981
- 11) Smith RE: *Separation of the plus and minus of cytoplasmic polyhedrosis virus and human reovirus double-stranded genome RNAs by gel electrophoresis*. Nucleic Acids Res 9: 5269 ~ 5286, 1981
- 12) Flores J, Perez-Schaal I, Boeggeman E, White L, Perez M, Purcell R, Hoshino Y, Midthun K, Chanock RM, Kapikian AZ: *Genetic relatedness among human rotaviruses*. J Med Virol 17:135 ~ 143, 1985

- 13) Kalica AR, Greenberg HB, Espejo RT, Flores J, Wyatt RG, Kapikian AZ, Chanock RM: *Distinct ribonucleic acid patterns of human rotavirus subgroups 1 and 2. Infect Immun* 33:958~961, 1981
 - 14) Nakagomi T, Akatani K, Ikegami N, Katsushima N, Nakagomi O: *Occurrence of changes in human rotavirus serotypes with concurrent changes in genomic RNA electropherotypes. J CLIN Microbiol* 26:2586~2592, 1988
 - 15) Hung T, Wang C, Fang Z, Chou Z, Chang X, Liong X, Chen G, Yso H, Chao T, Ye W, Den S, Chang W: *Waterborne outbreak of rotavirus diarrhea in adults in China caused by a novel rotavirus. Lancet* 1: 1139~1142, 1984
 - 16) Chen GM, Hung T, Bridger JC, McCrae MA: *Chinese adult rotavirus is a group B rotavirus. Lancet* ii: 1123~1124, 1985
-