

## 이중 중합효소사슬반응을 이용한 인간 면역 결핍 바이러스 탐색에 관한 연구

연세대학교 원주의과대학 비뇨기과학교실, 연세대학교 의과대학 내과학교실\*

김 성 진 · 김 준 명\*

=Abstract=

### Studies on Detection of Human Immunodeficiency Virus Using Double Polymerase Chain Reaction

Sung Jin Kim and June Myung Kim\*

From the Department of Urology, Yonsei University Wonju College of Medicine Wonju, Korea,  
Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine Seoul, Korea\*

**Background:** Serological methods for screening blood and blood products for the presence of antibodies to human immunodeficiency virus(HIV) are efficient and sensitive. In repeatedly reactive cases confirmational tests such as Western blot are available. However, direct viral detection may be needed for a patient in seronegative window period and a newborn from a infected mother. In addition, a direct assay for the virus would provide a means to monitor both latent and actively replicating virus in patients on therapeutic drugs. However, direct detection of HIV in patient samples is difficult and disappointing even with co-cultivation and the successful recovery rate varies from 10 to 75%.

Polymerase chain reaction(PCR) may provide the answer because it can do in vitro amplification of viral genome integrated into human genome(provirus). However, actual results of clinical application of conventional PCR do not show favorable sensitivity especially in samples containing very small amounts of HIV molecule copies.

**Purpose:** We comparatively analyzed the sensitivity of single(primary)PCR and double(secondary) PCR in the detection of HIV to define whether double PCR can overcome the limited sensitivity of single(primary) PCR and if it can be a clinically promising method for detecting HIV.

**Materials and Methods:** Ten peripheral blood samples from individuals who had antibodies to human immunodeficiency virus were prepared and centrifuged in Ficoll-Hypaque to isolate lymphocytes and monocytes. After DNA extraction from the cell, 35 cycles of primary PCR was performed and a part of the PCR product of individual specimen was electrophoresed to elucidate the results of primary PCR. Secondary PCR with the other part of the individual primary PCR product was followed to compare the efficacies of single and double PCR.

**Results:** With primary PCR, only one specimen among 10 showed a suspicious corresponding band on polyacrylamide gel electrophoresis using ethidium bromide. The results of double PCR presented a striking contrast to those of primary PCR, elucidating 100% sensitivity without using radioisotope.

**Conclusions:** This study suggests that double PCR is a very potent method in detection of

\*본 연구는 연세대학교 교내 연구비로 이루어졌음.  
접수일자 1994년 7월 27일

human immunodeficiency virus genome incorporated in human white blood cells.

**Key Words:** Human immunodeficiency virus, Acquired immune deficiency syndrome, Polymerase chain reaction, Double PCR.

## 서 론

현대의 혹사병으로 알려져 있는 인간 후천성 면역결핍증은 Human Immunodeficiency Virus I (HIV I)과 Human Immunodeficiency Virus II (HIV II)에 의해 일어나는 질환으로서 조기진단의 어려움과 치유의 불가능성, 그리고 기학급수적으로 늘고 있는 감염자 숫자로 인해 암과 더불어 현대인을 위협하는 양대 질환으로 불린다.

HIV는 일단 인체내에 들어가면 T-helper 인파구 세포를 포함, 세포표면에 CD4 항원을 가진 세포에 흡착된 뒤 세포내로 들어가며 (endocytosis) 세포내에서 바이러스의 역전사효소 (reverse transcriptase)에 의해, RNA genome은 DNA로 형태가 바뀐다. 이때 2차례의 전사도약(transcriptional jumps)에 의해, 역전사로 만들어진 DNA의 양측 말단에는 각각 1개씩의 LTR(Long Terminal Repeat)이 생긴다. 이 LTRs에는 바이러스 유전자의 전사를 조절하는 조절부위(transcription regulating element)가 있을뿐 아니라 속주세포의 genomic DNA에, 역전사로 만들어진 바이러스 DNA가 결합(Integration)하는데에도 중요한 역할을 한다. 이렇게 속주세포의 염색체에 genome내에 DNA의 형태로 숨어버린 것을 provirus라 하며 크기는 HIV I의 경우 길이가 약 9,200bp, HIV II는 약 9,600bp이다.

HIV 감염의 진단은 감염자 혈청에서 항체를 찾는 방법과 항원을 탐색하는 방법으로 나뉘는데 임상에서는 일단 ELISA(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) 방법으로 항체보유 여부를 검사한 뒤 형광 염색법이나 Radio Immune Precipitin Assay 그리고 Western blot으로 항체를 재확인하여 진단한다. 그러나 이상의 방법들은 감염직후부터 항체가 형성되기 전까지의 소위 window period에는 적용이 되지않을 뿐만 아니라 검사방법을 상호간에 결과가 상이하여 진단이 어려울 때가 있다. 따라서 감염초기에 진단이 가능하고, 보다 감도가 예민한 진단방법이 필요한데 이에 부응할 수 있는 것으로서 중합효소사슬반응 (polymerase chain reaction: PCR)을 이용하는

provirus의 유전자증폭이 유력하다.

PCR은 1985년 Saiki<sup>1</sup>에 의해 처음 시작된 이래 유전자를 *in vitro*에서 증폭하는 매우 효과적인 방법으로서 이용도가 매우 높다.

실제로 HIV 감염진단에 PCR을 이용하기 시작한 것은 1987년 Kwok<sup>2</sup>의 보고 부터이고 PCR의 기법이 발전함에 따라 감도(sensitivity)가 제고되고 있으며 nested primer를 이용하는 이중 PCR은 동위원소를 사용하지 않고도 원하는 유전자의 증폭과 확인에 큰 도움을 주고 있다.

HIV 감염진단을 위한 PCR은 provirus의 일정 구역을 *in vitro* 증폭(amplification)하여 대량의 copy를 얻는 과정을 말하며 이렇게 얻어진 DNA 산물을 전기영동하여 확인하게 된다.

그러나 아무리 PCR이 강력한 감도를 갖고 있다 하더라도 검체내에 존재하는 증폭대상 유전자의 copy 수가 적으면 진단적 감도가 떨어지며 감도를 높이기 위해 반응 횟수를 올리면 반대급부로 특이도(specificity)가 저하된다. 이에 본 연구자는 항체 검사에 의해 이환자로 확인된 환자의 말초혈액을 대상으로 단회(single) PCR과 nested primer를 이용하는 이중 PCR을 동시에 시행하여 감도를 비교함으로써 앞으로 HIV 감염의 임상진단에의 적용을 위한 기초자료를 얻고자 한다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

1992년과 1993년에 걸쳐 HIV 항체 보유자로 확인된 10명의 감염자로부터 제취된 10개의 혈액검체를 대상으로 하였다.

### 2. 방법

#### 1) 세포분리 및 DNA 추출

HIV 항체 보유자의 말초혈액 10ml를 채혈하여 0.3ml의 해파린이 들어있는 시험관에 넣었다. 5ml의 Ficoll-Hypaque을 이용, 빌드 기울기 원심분리법(density gradient centrifugation)으로 혈파구 및 단핵구를 분리한 뒤 분리된 cell로 부터의 DNA 추출은 Higuchi<sup>3</sup>의 방법을 따랐으나 추출효율을 제고할 목적으로 연구자 임의로 phenol/chloroform 추출 과정

Table 1. Primers for the amplification and detection of HIV

Oligonucleotide designation (orientation)	Sequence (5'-3')	Virus	Position <sup>a</sup>
SK 38(+)	ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAAT	HIV-1	1541-1578
SK 39(-)	TTTGGTCCTTGCTTATGTCCAGAATGC	HIV-1	1665-1638
SK 19(+)	ATCCTGGGATTAAATAAAATAGTAAGAATGTAT AGCCCTAC	HIV-1	1595-1635
SK 145(+)	AGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT	HIV-1	1366-1395
SK 101(-)	GCTATGTCAGTTCCCTTGTTCTC	HIV-1	1506-1482
SK 102(+)	GAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGAT	HIV-1	1403-1435

<sup>a</sup>HIV-1 isolate SF2, GenBank Accession number K02007.

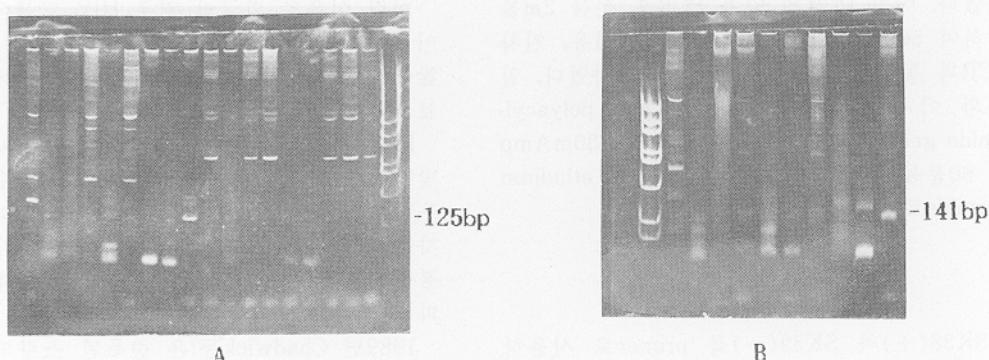


Fig. 1. A) The result of primary PCR: Only the 9th lane from left shows a corresponding band.  
B) The result of primary PCR: Only the 11th lane shows a corresponding band.

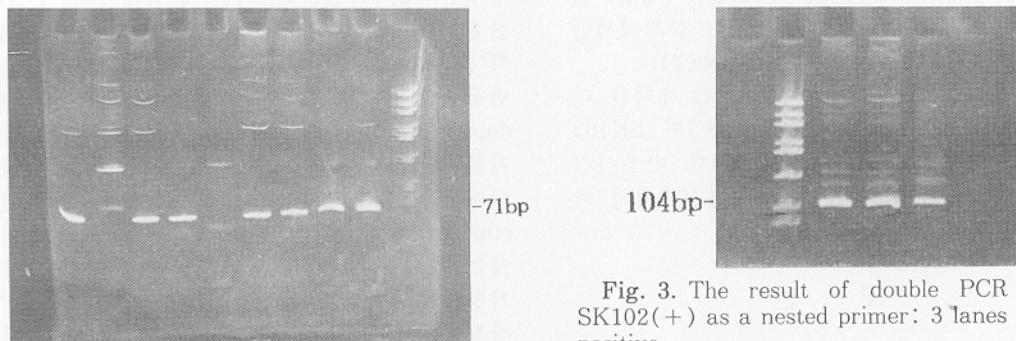


Fig. 2. The result of double PCR using SK19(+) as a nested primer: Second and 5th lanes are negative controls.

을 추가로 거쳤다.

## 2) DNA의 증폭 및 확인

일차 PCR을 위한 primer로 SK38(+), SK39(-), 그리고 SK145(+), SK101(-)을 사용하였다. 이차 PCR을 위해서는 SK38과 SK39로 PCR된 산물(product)에 대해 nested primer로 SK19(+)를, 그리고 SK145와 SK101로

Fig. 3. The result of double PCR using SK102(+) as a nested primer: 3 lanes are all positive.

PCR된 산물에 대해서는 SK102(+)를 사용하였다(Table 1).

이상의 primer들은 한국생공(Korea Biotech INC.)에서 합성, 정제되었다. 일차 PCR의 조건은 다음과 같다. 전체 반응용적은 100 $\mu$ l로 하고 template DNA 50 $\mu$ g과 10mM의 Tris-HCl(pH 8.3), 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 200 $\mu$ M의 각각의 dNTP, 50pmol씩의 upstream 및 downstream primer, 그리고 중합효소로 Taq

Table 2. Results of primary PCR

Primer Pairs	Specimen No.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SK 38(+)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
SK 39(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SK 145(+)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
SK 101(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

polymerase(Pharmacia, Uppsala, Sweden) 2.5 units를 사용하여 Thermal cycler(Pharmacia, Uppsala, Sweden)를 이용, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분으로 하여 35회 증폭하였다. 이차 PCR은 일차 PCR후 산물 2μl를 취하여 50pmol의 nested primer를 이용, 일차 PCR과 동일한 조건으로 30회 증폭하였다. 일차와 이차 PCR 산물 5μl씩을 6% polyacrylamide gel을 이용, 상온에서 150volt, 30mAmp로 60분동안, 전기영동하고 0.5μg/ml ethidium bromide로 염색하였다(Fig. 1, 2, 3).

## 결 과

SK38(+)과 SK39(-)를 primer로 사용하여 35 cycle PCR을 시행한 결과 9번 검체에서, 그리고 SK145(+)와 SK101(-)을 primer로 사용하여 35 cycle PCR을 시행한 뒤 ethidium bromide 염색결과 5번 검체에서만 해당되는 band가 확인되었다(Table 2).

상기 primer에 의해 일차 PCR된 용액을 대상으로 nested primer로 SK19(+)와 SK102(+)를 각각 이용하여 30 cycle씩 반응시킨 뒤 ethidium bromide 염색결과 전검체에서 해당 band가 확인되었다(Table 3).

## 고 안

항체 탐지를 통한 HIV 감염의 진단은 분명히 신속하고 신뢰성이 있는 방법이다. 그러나 HIV에 이환된 모체에서 태어난 신생아의 경우 출생후 15개월까지 모체로부터 받은 항체가 남아 있을 수 있어 실제 감염여부를 일정기간 동안 가릴 수 없고, window period에는 진단이 불가능하며, Western blot으로도 판정이 확실하지 않은 경우등이 있어 바이러스의 직접적인 확인이 필요할 때가 있다.

그러나 실제 임상에서 HIV는 혈액과 같은

Table 3. Results of secondary PCR for primary products using nested primers

Primer Pairs	Specimen No.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SK 19(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SK 39(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SK 102(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SK 101(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

가검물내에 매우 적은 숫자로 존재하고 있어 바이러스 배양과 같은 까다로운 방법을 동원해야 하며 이렇게 해도 바이러스의 분리율이 매우 다양하여 진단에 적용하기 어렵다.<sup>4</sup>

이런 이유로 외국의 경우 HIV 탐색에 PCR이 활발히 시도되고 있고 이에 따른 결과가 많이 보고되고 있으나 국내에서는 이에 관한 보고가 많지 않다.

PCR은 매우 예민하고 강력한 유전자 증폭 방법이므로 이론적으로 혈액내 copy 수가 매우 적은 window period나 latent period의 감염자를 찾을 수 있으나, 위낙 copy 수가 적을 경우에는 아무리 PCR의 감도가 높아해도 이의 성공이 어렵다.

1989년 Chadwick 등<sup>5</sup>은 증폭된 소량의 PCR 산물의 확인에 있어 감도를 높이는 방법으로 Southern blot을 변용한 oligomer hybridization 방법을 제시하였는데 이는 용액내에서, PCR 산물에 HIV 특이 oligonucleotide sequence에 <sup>32</sup>P를 end labelling해서 만든 탐색자(probe)를 반응시킨 뒤 탐색자와 교잡된 probe-target duplex를 전기영동으로 분리한 다음 자가방사기록(autoradiography)법으로 확인하는 방법이다. 일반적으로 PCR 증폭 후 전기영동하에 ethidium bromide 염색으로 PCR 산물을 확인하는 것보다 <sup>32</sup>P가 표식된 탐색자를 이용, 자가방사기록법으로 확인할 경우 감도가 약 10<sup>4</sup> 배정도 높을뿐만 아니라 탐색자와 확인하고자 하는 target DNA sequence간에 서로 상보관계의 염기끼리만 교잡하기 때문에 실험의 특이도 또한 높일 수 있는 장점이 있다.

그러나 이 방법은 방사성동위원소를 이용하므로 과정이 복잡하며 시간적, 공간적 제약이 있어 본 연구자는 nested primer를 이용하는 이중 PCR을 시도하였다. 이중 PCR은 일차 PCR로 증폭된 시료를 일차 PCR의 primer와 염기배열이 다른 primer를 이용하여 다시 일정 횟수만큼 PCR하는 방법으로서 sample내

의 목표로 하는 DNA copy 수가 적을 경우 유력한 방법이다<sup>6</sup>. 그러나 PCR의 총 횟수(total cycle number)의 증가로 인해 특이도에 문제 가 있을 수 있고 시료를 손으로 조작하는 과정이 한번 더 추가되므로 오염의 가능성이 높아지는 단점이 있다. 따라서 이중 PCR을 시행하더라도 일차와 이차 PCR의 적정 반응 횟수만큼만 시행하는 것이 필요하다. 그러나 PCR의 적정 반응 횟수는 찾고자 하는 표적의 종류와 상황에 따라 차이가 있을 수 있다. 본 연구에서는 일차 35회, 이차 30회의 반응 횟수를 설정하였는데 이는 특별한 이유에 의한 것 이 아니고 연구자의 경험에 의한 것이므로 향후 이에 관한 연구가 필요하다고 본다.

본 연구에서 사용된 혈액은 모두 항체가 확인되어 HIV 감염자로 진단된 이 환자들로부터 체혈된 검체로서 window period나 latent period의 감염자를보다 입파구나 단핵구 세포 내에 존재하는 provirus의 copy 수가 분명히 많을 것으로 추측된다. 그럼에도 불구하고 일차 35 cycle의 PCR 시행 결과 감도가 10%에 불과하였다는 것은 매우 실망스러운 사실로서 HIV 감염진단에 있어 통상적 방법의 PCR의 효용성을 의심하게 한다.

더우기 nested primer를 이용, 해당 band를 찾을 수 없었던 일차 PCR 산물에 2종 PCR 을 시행한 결과 전 검체에서 양성 반응을 얻은 사실로 미루어 볼 때 35 cycle 정도의 일회 PCR로서는 window period 또는 latent period 의 경우는 물론 항체양성기에도 진단 방법으로서 미흡하다고 판단된다.

따라서 PCR을 이용, HIV 탐색을 위해서는 nested primer를 이용하는 이중 PCR이나 Chardwick 등이 이용한 Oligomer Hybridization(OH) 과 같이 감도를 제고할 수 있는 부차적인 방법이 필요하다.

한편 본 연구결과가 상대적으로 provirus의 copy수가 적을 수 있는 window period나 latent period의 HIV 탐색에도 적용될 수 있는지에 대해서는 의견이 있을 수 있다. 그러나 이중 PCR의 횟수를 증가시킨다거나 PCR 산물 확인 방법의 효율의 제고, 예를 들면 Southern blot의 병용등에 의해 해결될 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 향후 이런 대상자에 대한 연구가 필요하다.

## 결 론

HIV 항체 보유자로 확인된 10명의 발초혈액의 입파구 및 단핵구로부터 분리된 DNA를 대상으로 HIV의 provirus genomic sequence에 특이한 두 가지 primer sequence를 이용, 일차 PCR을 시행하고, 일차 PCR 산물을 template로 하여 nested primer를 이용, 이중 PCR을 시행하여 각각의 성적을 비교, 분석하였다. 그 결과 HIV 탐색의 성공률은 일차 PCR이 10% (1/10)인데 비해 2차 PCR의 경우 100% (10/10)로 현격한 차이가 있었다. 따라서 앞으로 PCR을 이용하여 HIV를 탐색하기 위해서는 비교적 용이하고 감도가 높은 이중 PCR을 권하고 싶다. 단 본 연구의 실험대상 수가 제한되어 있다는 점에서 향후 더 많은 HIV 이 환자를 대상으로 본 실험결과의 확인이 필요할 것이다. 또한 window period의 검체에서도 동일한 연구가 필요할 것이며, CD4 count 등 HIV 감염의 진행상황과의 연관성에 대한 분석도 필요할 것으로 판단된다. 본 연구자는 이에 대한 보완실험을 진행중이다.

## REFERENCES

1. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230: 1350-4.
2. Kwok S, Mack DH, Mullis KB, Poiesz B, Ehrlich G, Blair D, et al. Identification of human immunodeficiency virus sequences by using *in vitro* enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. *J Virol* 1987;61:1690-4.
3. Higuchi R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: Erlich H, editor. *PCR technology: Principles and applications for DNA amplification*. New York: Stockton Press, 1989;31-8.
4. Kellogg DE, Kwok S. Detection of human immunodeficiency virus. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninski JJ, White TJ, editors. *PCR protocols: A guide to methods and*

- applications. San Diego: Academic Press, 1990;337-47.
5. Chadwick EG, Yoge R, Kwok S, Sninski JJ, Kellogg DE, Wolinsky SM. Enzymatic amplification of the human immunodeficiency virus in peripheral blood mononuclear cells from pediatric patients. *J Infect Dis* 1989;160:954-7.
6. Lo Y-M D, Patel P, Wainscoat JS, Sampietro M, Gillmer MDG, Fleming KA. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet* 1989;9:1363-6.