

PCR에 의한 HIV의 진단



국립보건원 면역결핍연구실 강 춘

I. 서 론

인면역결핍바이러스(Human immunodeficiency virus, HIV)는 HIV에 대한 특이 항체의 검출, 순환되는 바이러스 항원의 검출 및 검체로부터의 바이러스 분리 그리고 바이러스 유전물질의 검출에 의해 진단되어진다(1).

Screening test로 이용되는 항체검출을 위한 효소면역분석법(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)에 의한 진단시약들은 93-99%의 감도 및 특이도를 나타내어 위양성 및 위음성 결과를 초래할 가능성을 내포하고 있으므로 확인 검사법이 반드시 요구된다. 확인 검사법으로 사용되고 있는 western blot(WB)의 양성 판정 기준으로, 세계보건기구(WHO)는 적어도 두 개 이상의 *env* bands(precursor, external glycoprotein, transmembrane glycoprotein)를 요구하며(2), 미국 적십자사에서는 *env* (gp 160/gp 120 or gp 41), *pol*(p 31, p 51, or p 66)과 *gag*(p 24/p 55 or p 17)의 세 부위에 해당하는 유전자 산물이 각기 하나씩 존재할 경우 양성으로 판정하도록 권고하고 있다. 그러나 HIV의 특성상 감염 후 얼마동안 immune response가 지연되어 나타나기도 하며, HIV에 대한 순환되는 항체가 완전히 소실되는 경우도 있어 완벽한 진단방법이라고는 할 수 없다.

HIV에 의한 감염 후 혈청내에 항체가 나타날 때까지의 기간이 수 개월에서 수 년으로 일정하지 않다고 알려져 있는데 이 기간 동안 항원 검출 ELISA에 의한 p 24 항원을 검출할 수 있다. HIV의 p 24 core protein에 대한 항체가 나타나게 되면 항원은 갑자기 감소하여 검출되지 않는다. 이와 같이 항원이 일정 기간동안만 혈액내에 존재하는 까닭에

항원 검출에 의한 진단은 감염 초기 및 AIDS 말기에만 가능하다는 제한점을 가지게 된다. 또한 lymphocyte culture로부터 HIV를 분리하는 방법은 오랜 시간과 노력이 많이 들며 바이러스 분리를 역시 10-75% 정도로 일정하지 않아 효율적인 진단 방법이라고 할 수 없다.

HIV는 ELISA나 WB에 의해 항체가 검출되기 수 개월 혹은 수 년전에도 proviral DNA 상태로 감염된 세포의 chromosome내에 존재하는 것이 주지의 사실이다. 그 동안 Southern blot, *in situ* hybridization 등에 의해 이 proviral DNA를 검출하려는 연구가 진행되어 왔으나 lymphocyte 10^4 - 10^6 개 중 1개가 감염되어 있으며 lymphocyte chromosomal DNA에 비해 viral DNA의 양이 미량이므로 검출하기에는 민감도가 낮은 문제점이 있다.

본 고에서는 근래 개발되어 널리 사용되고 있는 polymerase chain reaction(PCR)을 이용한 HIV의 진단에 관해 살펴 보고자 한다.

II. Polymerase chain reaction

PCR은 DNA의 일정 부위를 시험관 내에서 enzymatic amplification 시키는 과정으로, 증폭시키고자 하는 double strand DNA를 denaturation 시킨 후 주변에 인접한 DNA sequence에 상보적인 sense primer와 anti-sense primer의 두 single-strand oligonucleotide primer를 가하여 annealing 하도록 하고 DNA polymerase에 의해 *in vitro* DNA replication을 반복 수행하는 것이다. 증폭하려는 DNA에 비해 과량으로 존재하는 primer는 1 cycle이 끝난 후 새로이 형성된 ds DNA가 denaturation에 의해

ss DNA가 되면 이를 template로 하여 DNA replication을 반복하게 되고 ds DNA의 양은 기하급수적으로 증가하게 된다. 따라서 30 cycles 후에는 10억배로 PCR product가 증가하게 된다(3) (Fig. 1).

위의 이론은 1971년에 Klepper 등에 의해 처음 상술 되었으나(4), 1985년 Mullis 등에 의해 genomic DNA에서 많은 양의 single copy gene을 생성해 내는 방법으로 개발되었다(5, 6).

초기에는 *E. coli* DNA polymerase I의 Klenow fragment를 사용하였다. 그러나 이 enzyme은 denaturation 단계에서 inactivation 되므로 매 cycle마다 enzyme을 첨가시켜야 하는 불편함이 있었다. 그러나 1988년 *Thermus aquaticus*로부터 열에 안정한 Taq DNA polymerase를 발견하여 처음의 반응액내에 enzyme을 첨가하는 것으로 충분하게 되었고 annealing과 extension을 더 높은 온도에서 하게 되어 primer-template hybridization stringency와 product specificity를 높일 수 있게 되었다. 근래에는 Taq polymerase 외에 Pfu polymerase, Vent DNA polymerase 등 열 안정성이 높고 3'→5' proofreading exonuclease 작용이 있는 enzyme이 발견되어 PCR product specificity를 한결 높일 수 있게 되었다. 또한 자동화된 thermal cycler의 개발 이후 더욱 편리하고 쉽게 실험할 수 있어 이 역시 PCR의 적용범위를 넓히는데 일익을 담당하였다.

III. PCR에 의한 HIV 진단의 제반 조건

PCR은 높은 sensitivity와 specificity외에 실험에 사용되는 DNA sample quality가 그다지 높을 필요가 없다는 것이 PCR이 여러 분야에 사용되는 이유이기도 한다. 세포 한 개, 용액 내에서 잠시 끓여 얻은 세포의 crude lysate, 또는 평균 수 백 base pair의 DNA 검체라도 증폭시킬 수 있다. 그러나 적어도 증폭하려는 부위가 손상되지 않고 완전한 상태인 DNA strand가 하나라도 존재하여야 하며 불순물은 충분히 희석하여 polymerization을 방해하지 않도록 하여야 한다. Single copy gene의 DNA는 보통 0.05-1.0 µg이 사용되며 multi copy gene의 경우는 더 적은 양을 실험에 사용한다.

PCR에 있어 매우 중요한 primer는 random base distribution 되도록 하며 polypurine이나 polypyri-

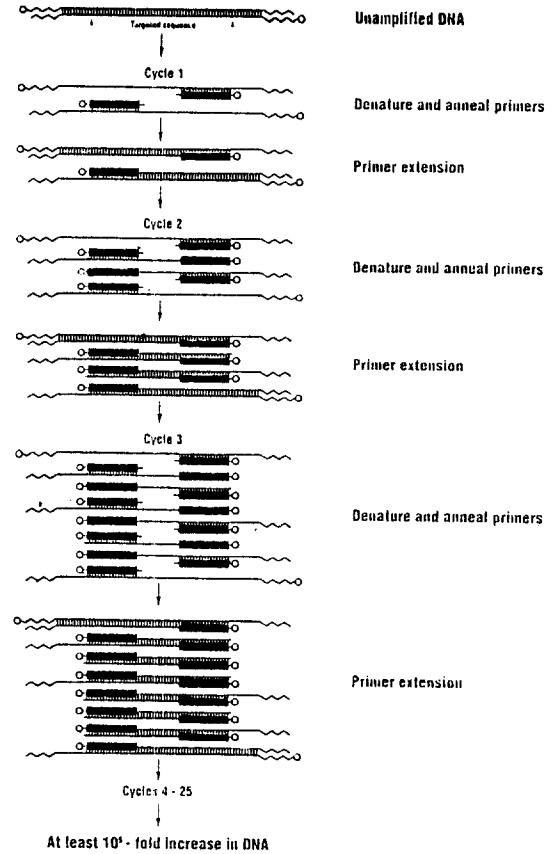


Fig. 1. The principles of the polymerase chain reaction.

midine은 피하도록 한다. 역시 특별한 2차 구조를 가지지 않도록 하며 primer 간에 상보성은 없는지 조사하여야 한다. 대부분의 primer는 20-30 base pair이며 일반적으로 0.1-0.5 µM 농도로 사용되어진다.

HIV-1의 모든 variant를 진단해 내기 위해서는 viral genome 중 가장 conserved region을 증폭시키는 부위로 선택할 필요가 있다. 그런 이유로 HIV-1의 gag region에 해당하는 SK38/SK39 primer가 가장 널리 이용되고 있다. SK38/SK39 이외에 사용되어지고 있는 oligonucleotide primer의 종류는 Table 1과 같다(7, 8). 일반적인 진단에 이용되는 gag region 외에 질병의 진단 및 환자의 예후 측정을 위해 *Vpu*나 *Tat*, *nef* region의 amplification도 많이 수행되고 있다.

PCR의 각 단계별 조건은 일반적으로 ds DNA를

Table 1. Sequences of oligonucleotide primer pairs and probes and their locations in the HIV-1 genome.

Primer or probe	Sequences (5'–3')	Location
SK 29 primer	ACTAGGGAACCCACTGCT	<i>LTR</i> 501-518
SK 30 primer	GGTCTGAGGGATCTCTA	<i>LTR</i> 589-605
SK 31 probe	ACCAGAGTCACACAACAGACGGGCACACACTACT	<i>LTR</i> 552-585
SK 38 primer	ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAAT	<i>gag</i> 1551-1578
SK 39 primer	TTTGGTCCTTGTCTTATGTCCAGAATGC	<i>gag</i> 1638-1665
SK 19 probe	ATCCTGGGATTAATAAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTAC	<i>gag'</i> 1595-1635
SK 68 primer	AGCAGCAGGAAGCACTATGG	<i>env</i> 7801-7820
SK 69 primer	CCAGACTGTGAGTTGCAACAG	<i>env</i> 7922-7942
SK 70 probe	ACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGT	<i>env</i> 7841-7875
CO 1 primer	ACAATTATTGTCTGGTATAG	<i>env</i> 7855-7874
CO 2 primer	AGGTATCTTTCCACAGCCAG	<i>env</i> 7970-7989
CO 3 probe	TGAGTTGCAACAGATGCTGTTGCGCCTCAATAGCCCTCAG	<i>env</i> 7895-7934

Table 2. Composition of PCR reaction mixture.

Taq polymerase buffer	1X
upstream primer	50 pmole
downstream primer	50 pmole
dNTPs	0.4 μM
Taq polymerase	2 units
for 50 μl reaction buffer	

Table 3. General condition of PCR using SK38/SK39 for HIV diagnosis.

Denaturation	95°C	30 sec
Annealing	55°C	30 sec
Extension	72°C	1 min
Repeat 30 cycles		
Final extension	72°C	10 min
Storage	4°C	

잠시 90-95°C 로 처리하여 denaturation시키고, 40-60°C 로 냉각시켜서 각기 상보적인 sequence와 annealing하고, 그후 70-75°C 에서 Taq polymerase에 의한 extension 과정이다. 70-75°C 처리시간은 증폭하려는 target의 길이에 따라 달라지는데 1 Kbase sequence에 대해 1분이면 충분하다고 알려져 있다.

115 bp의 PCR product를 얻는 SK38/SK39 primer set의 경우 일반적으로 Table 2와 Table 3과 같은 조건에 의해 실험되어진다(9).

PCR 결과의 판독은 예측 가능한 product의 size에 의하여 일차적으로 이루어진다. 또한 double PCR을 실시하여 specificity를 높이기도 하며(10) labelled oligonucleotide probe를 사용한 dot blot hybridization, Southern blot hybridization 및 solution hybridization과 labelled nucleotide의 *in vitro* incorporation 등이 수행된다(11). 방사성 동위원소를 사용하지 않고, amplified product를 그 product sequence 내에 적당한 restriction site를 가지는 제한 효소를 처리하여 agarose electrophoresis 후 나타난

fragment의 size에 의해 PCR 결과를 판정하는 방법이 있으며(12), biotinylated primer pair를 사용하여 증폭시킨 후 적절한 probe가 coating된 microplate에 amplified product를 처리하여 ELISA와 동일한 방법으로 발색을 시켜 결과를 판정하는 방법도 있다(13).

위의 여러 방법에 의해 PCR은 매우 강력하고 민감한 방법으로 각광받고 있는 하지만 미량의 DNA가 다량으로 증폭된다는 점에서 미량의 오염 물질에 의해서도 false positive가 나타날 가능성이 높다는 단점이 있다. 오염 방지를 위해서는 이미 증폭된 DNA transfer를 막아야 하는데 이를 위해서는 PCR을 위한 준비 장소와 PCR product를 취급하는 장소가 격리되어야 하며 기구 및 파이펫이 분리 사용되어야 한다. 모든 시약은 autoclave 및 그에 준한 처리를 한 후 소분하여 PCR product가 없는 장소에 보관하여야 한다. 검체 취급시에는 용액이 튀어 오르지 않도록 조작해야 하고 만약 튀어

올랐을 경우에는 반드시 장갑을 바꿔 끼도록 한다. 가능하다면 premix 상태로 시약을 제조 후 분주하여 사용함으로써 sample 이동 횟수를 최소화 한다. 그리고 항상 마지막 단계에 DNA를 가하도록 하고 올바른 양성 대조와 충분한 숫자의 음성 대조를 반드시 실험마다 포함시켜 결과를 판독할 때 시약의 오염 여부를 조사하도록 한다(14).

IV. PCR의 적용 범위

개발된 이래 PCR은 병원체의 검출뿐만 아니라 genomic DNA 혹은 cDNA로부터의 직접적인 cloning과 sequencing, *in vitro* mutagenesis, DNA engineering 그리고 법의학에 있어서 유전자 fingerprinting, 유전적 질병의 출산전의 진단, allelic sequence variation 조사, RNA transcript 구조분석과 같이 광범위하게 사용되고 있다(15).

HIV 진단에 있어서 PCR의 적용범위 역시 다양하다(16). 진단 가능한 경우를 살펴보면 1) window period라고 불리는 감염 후 항체가 형성되기 전까지의 기간 동안의 진단(17, 18), 2) WB으로 판정하기 어려운 intermediate state의 검체 진단, 3) 다른 직접적인 검출방법으로는 음성으로 진단되는 항체 양성자의 진단(19, 20), 4) 태반을 통하여 유입된 IgG 항체가 15개월까지도 존재할 뿐 아니라 HIV antigenaemia도 발견하기 어렵고 IgM 항체에 의한 HIV 감염 여부 판정도 신뢰성이 없는 신생아의 진단(21-23), 5) 존재하는 virus type의 결정 등이다(24, 25).

또한 lymphocyte 내에 integration 된 proviral DNA가 아닌 RNA PCR을 실시하여 cell 내의 HIV-1 RNA expression state를 조사함으로써 antiviral therapy monitoring 및 HIV 감염자의 virus load를 조사할 수 있으며(26) 감염자의 질병 진전 단계를 예측할 수 있다. 그리고 상당한 sequence homology를 가져 혈청학적으로 교차 반응을 나타내는 HIV-1과 HIV-2를 specific primer와 probe를 사용하여 확실히 구분하여 진단 가능하다(27).

V. 결 론

AIDS의 확산이 계속되어 환자 및 감염자의 증가가 급속히 진행되고 있는 현재 상황에서 AIDS에

대한 가장 효과적인 대책은 교육과 홍보에 의한 확산 방지뿐만 아니라 감도가 높은 양질의 진단 방법에 의한 감염예방이다. 신속 정확한 진단에 의해 감염자가 자신도 모르는 상태에서 타인을 감염시키는 것을 방지하고, 수혈이나 장기이식에 의한 선의의 피해자가 생기는 것을 막을 수 있다. 또한 감염자에 있어서는 infected cell load와 cell-free particulate virus를 정확히 조사함으로써 환자의 임상적인 상태를 monitor할 수 있고 새로운 항 바이러스제와 vaccine의 효과를 평가할 수 있다(28).

PCR은 매우 강력하며 효과적인 연구방법으로 혈청학적인 진단이나 배양이 어려운 바이러스성 진단에 특히 효과적이며(29) 개발 이후 짧은 기간동안 특히 HIV 진단에 효과적으로 이용되어 왔다. PCR은 1) 혈청학적으로 음성인 사람의 감염 조사, 2) 환자의 virus load 측정, 3) HIV typing, 4) virus 발현 조사, 5) perinatal transmission의 조기 진단, 6) WB상 indeterminate의 진단 등에 사용되어 왔다(30).

PCR의 제한점인 오염방지 및 감도가 높은 non-isotopic detection system 개발 등의 개선책을 강구하여 적당한 HIV specific primer와 probe를 찾아내어 실험한다면 앞으로 PCR은 AIDS와 HIV 감염 진단에 있어 현재까지보다 더욱 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Phair, J.P. and S. Wolinsky. 1989. Diagnosis of infection with the human immunodeficiency virus. *J. Inf. Dis.* **159**: 320-323.
2. World Health Organization, 1990. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **65**(37): 281-288.
3. Marx, J.L. 1988. Multiplying genes by leaps and bounds. *Science* **240**: 1408-1411.
4. Klepper *et al.* 1971. *J. Mol. Biol.* **56**: 341-361.
5. Saiki, R.K. *et al.* 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
6. Mullis, K.B. and F.A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction *in Methods in enzymology*. Academic Press. Vol. 155: 335-350.
7. Ou, C.-Y. *et al.* 1988. DNA amplification for

- direct detection of HIV DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science* **239**: 295-297.
8. Valee, M. *et al.* 1991. in PCR topics: Usage of polymerase chain reaction in genetic and infectious diseases, ed. A. Rolfs, D.C. Schumacher, and P. Marx. Springer-Verlag. pp. 171-177.
 9. Kellog, D.E. and S. Kwok. 1989. in PCR protocols: A guide to methods and applications, ed. M.A. Innis. Academic Press. pp. 337-347.
 10. Simmonds, P. *et al.* 1990. Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers. *J. Virol.* **64**: 864-872.
 11. Carman, W.F. and C. Williamson. 1989. Detection of enzymatically amplified human immunodeficiency virus DNA by oligonucleotide solution hybridization and by incorporation of radiolabeled deoxynucleotide. *J. Clin. Micro.* **27**: 2570-2573.
 12. Carman, W.F. and A.H. Kidd. 1989. An assessment of optimal conditions for amplification of HIV cDNA using *Thermus aquaticus* polymerase. *J. Virol.* **23**: 277-290.
 13. Jackson, J.B. *et al.* 1991. Non-isotopic polymerase chain reaction methods for the detection of HIV-1 in Ugandan mothers and infants. *AIDS* **5**: 1463-1467.
 14. Kowk, S. and R. Higuchi. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* **339**: 237-238.
 15. ed. F.M. Ausubel *et al.* 1990. in Current protocols in molecular biology. Wiley. Chapter 15.
 16. Kwok, S. and J. Sninsky. 1989. in PCR technology: Principles and applications for DNA amplification, ed. H.A. Ehrlich. Stockton. pp. 235-244.
 17. Wolinsky, S.M. *et al.* 1989. Human immunodeficiency virus type 1(HIV-1) infection a median of 18 months before a diagnostic western blot. *Annals of Internal Medicine* **111**: 961-972.
 18. Imagawa, D.T. *et al.* 1989. Human immunodeficiency virus type 1 infection in homosexual men who remain seronegative for prolonged periods. *New Eng. J. Med.* **320**: 1458-1462.
 19. Karpas, A. *et al.* 1990. Polymerase chain reaction evidence for human immunodeficiency virus 1 neutralization by passive immunization in patients with AIDS and AIDS-related complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 7613-7617.
 20. Psallidopoulos, M.C. *et al.* 1989. Integrated proviral human immunodeficiency virus type 1 is present in CD4+ peripheral blood lymphocytes in healthy seropositive individuals. *J. Virol.* **63**: 4626-4631.
 21. Laure, F. *et al.* 1988. Detection of HIV1 DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction. *Lancet* Sep. **3**: 538-540.
 22. Williams, P. *et al.* 1990. The polymerase chain reaction in the diagnosis of vertically transmitted HIV infection. *AIDS* **4**: 393-398.
 23. Chadwick, E.G. *et al.* 1989. Enzymatic amplification of the human immunodeficiency virus in peripheral blood mononuclear cells from pediatric patients. *J. Inf. Dis.* **160**: 954-959.
 24. Donehower, L.A. *et al.* 1990. The use of primers from highly conserved *pol* regions to identify uncharacterized retroviruses by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* **28**: 33-46.
 25. Simmonds, P. *et al.* 1990. Analysis of sequence diversity in hypervariable regions of the external glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Viro.* **64**: 5840-5850.
 26. Hart, C. *et al.* Direct detection of HIV RNA expression in seropositive subjects. 1988. *Lancet* Sep. 10596-599.
 27. Weiss, S.H. *et al.* 1988. AIDS due to HIV-2 infection. *Morbidity and Mortality Wkly. Rep.* **37**: 33.
 28. Ou, C.-Y. and G. Schochetman. 1989. in Current communications in molecular biology: Polymerase chain reaction. ed. Erlich, H.A. Stockton. pp. 165-170.
 29. Schochetman, G., C.-Y. Ou, and W.K. Jones. 1988. Polymerase chain reaction. *J. Inf. Dis.* **158**: 1154-1157.
 30. Schochetman, G. and J.J. Sninsky. 1992. in AIDS testing, ed. G. Schochetman and J.R. George. Springer-Verlag. pp. 90-100.