

HIV-1 O형 항체 진단시료의 개발

¹주식회사 녹십자 시약제제팀, ²서울대학교 유전공학연구소, ³주식회사 바이로메디카 패시픽,
⁴서울대학교 의과대학 병리학교실, ⁵건국대학교 생물학과, ⁶한림대학교 의과대학 병리학교실
조영식¹ · 유승신^{2,3} · 하건우¹ · 이상국⁴ · 조명환⁵ · 신형식⁶ · 김선영²

=Abstract=

Development of Test System for Detection of Antibody to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype O

Young Shik Cho¹, Seung Shin Yu^{2,3}, Gun Woo Ha¹, Sang Gook Lee⁴,
Myung Hwan Cho⁵, Hyung Sik Shin⁶ and Sunyoung Kim²

¹Korea Green Cross Corporation, ²Institute for Molecular Biology and Genetics, Seoul National University, ³ViroMedica Pacific Limited, ⁴Department of Pathology, College of Medicine, Seoul National University, ⁵Department of Biology, College of Science, Kon Gook University, ⁶Department of Pathology, College of Medicine, Hallym University

In Korea, all domestic made test systems for detecting antibodies in HIV-1 contain the antigens from human immunodeficiency type 1 (HIV-1) subtype B. However, because HIV-1 subtype O is significantly different in amino acid sequences from all other subtypes of HIV-1, there has been a need for developing a test for detecting antibodies in subtype O. For this purpose, the entire nucleotide sequence corresponding to the extracellular domain of the transmembrane glycoprotein of HIV-1 subtype O was synthesized with consideration of *Escherichia coli* codon usage. Various regions of the extracellular domain were cloned into *E. coli* expression vectors and tested for levels of protein production. The nucleotide sequence, named ECTM, that can encode a 129 amino acid-long peptide, was found to be expressed at a high level in *E. coli*. The protein of approximately 17 kDa specifically reacted with sera from individuals infected with HIV-1 subtype O. The ECTM protein was purified to near homogeneity by the CM-T gel chromatography, using concentrated, denatured inclusion bodies. In Western blot analysis, the purified viral antigen reacted with sera from individuals infected with subtype O more efficiently than subtype B. The enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA) system was developed using the subtype O viral protein and compared with the commercially available kit lacking the antigens from subtype O. The ELISA kit containing the subtype O antigen ECTM alone efficiently reacted with sera from individuals infected with subtype O. The subtype O antigen-containing kit produced a positive absorbance even when sera were diluted 512-fold, suggesting a high sensitivity. The commercially available kit also reacted with subtype O sera, but produced a negative result at a dilution of 8-fold. Our results suggest that the currently available kit may not be able to efficiently detect subtype O sera and that the viral protein

developed in this study may be added to the current system to maximize the detection of sera from individuals infected with subtype O.

Key Words: HIV-1 Subtype O, diagnosis, ELISA

서 론

인간에서 후천성 면역 결핍증 (acquired immune deficiency syndrome: AIDS)을 유발하는 human immunodeficiency virus (HIV)는 HIV-1과 HIV-2의 2가지 형으로 나뉘고, HIV-1은 다시 사용되는 표지 유전자에 따라 5~10가지 아형 (subtype)으로 분류된다 [1]. 예를들어 *env*의 V3 부위를 표지 부위로 사용할때는 A, B, C, D, E, F, G, H, O 등 최소한 9가지 아형으로 분류가 된다. HIV-1이 점차 확산되고 데이터베이스로 입력되는 V3 염기서열의 숫자가 증가함에 따라 아형의 수도 늘어날 것으로 예상된다. 대부분의 서로 다른 아형끼리는 10~20%의 염기서열의 차이가 있는데, 이미 국내에서 제조되어 판매되고 있는 진단 시약들은 여러 가지 HIV-1 아형들에 의해 유도된 항체에 대하여 상호반응 (cross-reaction)을 한다. 그러나 최근에 발견된 O형의 경우에는 지금까지 발견된 HIV-1과 (아미노산을 기준으로 할 때) 40~60%가 달라 기존의 항체 진단시약들은 O형 혈청에 매우 약하게 반응하거나 혹은 아예 반응하지 않는 것으로 나타났다 [2, 3, 4, 5].

지금까지 개발된 대부분의 HIV-1 항체 진단시약은 HIV-1 B형에서 유래된 Gag 혹은 Env 단백질에서 아미노산 서열이 비교적 잘 보존된 부분들만을 잘라내어 사용하였다. 본 연구에서는 HIV-1 O형에 감염된 사람의 혈청으로부터 gp41의 세포막 바깥부분 (extracellular domain)에 해당하는 염기서열을 합성하고 대장균에서 대량 발현한 후 분리하여, O형 항체에 대한 진단원료로 사용될 수 있는 가능성을 조사하였다. 여러 부위의 세포막 바깥부분을 탐색한 결과 특정 부위가 대장균에서 매우 잘 발현되고 enzyme linked immunoadsorbent assay (ELISA)에서 O형 혈청에 높은 특이성과 민감도로 반응하는 것을 발견하였다. 반면 이미 상업적으로 개발되어 판매되고 있는 ELISA 키트는 O형 혈청과 반응은 하였으나, O형 항원을 이용한 ELISA 방법보다 반응성이 상대적으로 떨어졌다. 이 결과들은 본 연구에서 사용된 O형 항원이 현재의 HIV-1 분석용 키트들

에 첨가된다면 O형 혈청을 더욱 효율적으로 감지할 것이라는 것을 시사한다.

재료 및 방법

1. ECTM 염기서열의 클로닝

HIV-1 O형이 ECTM 부위를 증폭하기 위해 세 종류의 5' 말단 primer와 두 종류의 3' 말단 primer들이 사용되었으며 그 nucleotide sequence는 다음과 같다.

ONde5	5'	CATATGGGCGCAGCGGCAACA3'
OBam5	5'	GGATCCAATGGGCGCAGCGG3'
OBg15	5'	GGATCTGCGGTACAGACCCACACT3'
OXba3	5'	TCTAGAGAATATATGGTGGAGCITAT3'
OTm3	5'	CCCGGGTTACTCATTTTGTTCCTGCTGTAC'

증폭된 PCR 산물을 ZERO Blunt PCR Cloning Kit (Invitrogen)을 이용해 클로닝한 후 pET-17b 혹은 pRSET 벡터로 각각 클로닝 하였다. ONde5, OXba3 primer 쌍을 이용해 증폭된 345 bp 절편과 ONde5, OTm3 primer 쌍을 이용해 증폭된 345 bp 절편은 각각 pET-17b와 pRSETB의 NdeI, EcoRI site에 삽입하였으며 OBam5, OXba3 primer 쌍으로부터 증폭된 345 bp 절편과 OBam5, OTm3 primer 쌍으로부터 증폭된 387 bp 절편은 pET-17b와 pRSET B의 BamHI, EcoRI site로, OBg15/OXba3 primer 쌍으로부터 증폭된 321 bp 절편과 OBg15/OTm3 primer 쌍으로부터 증폭된 363 bp 절편은 pRSET A의 BamHI/EcoRI site로 삽입하였다. 이 발현벡터들은 *E. coli* BL21 (DE)에 형질전환 시킨 뒤 사용하였다.

2. 인간 혈청

HIV-1 O형 혈청 5검체는 카메룬으로부터 입수하였고, B형 혈청은 (주)녹십자의 HIV 1/2 ELISA 3.0 키트에 포함된 양성대조액을 사용하였다. 경기도 적십자 혈액원으로 부터 입수한 헌혈자 혈

청 100검체는 음성 무작위 검사용으로 사용하였다.

3. O형 항원 ECTM의 분리와 정제

HIV-1 O형의 Env 단백질 발현 벡터를 함유하고 있는 대장균을 10리터 배양 후 최종 1mM이 되도록 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside를 첨가하여 O형 gp41 항원을 발현시켰다. 원심분리(8000rpm, 30분, 4°C)하여 얻은 대장균 침전물을 10배 부피의 용해완충액 (20mM Tris 2mM EDTA, 1mM phenyl-methylsulfonyl fluoride, pH 8.0)으로 완전히 용해하였다. 용해물을 가루얼음에 20분간 정치후 5회의 초음파 분쇄를 실시하여 대장균을 파쇄하고 이를 다시 원심분리 하여 균파쇄 침전물을 얻었다. 침전물을 2 M urea용액으로 완전히 용해후 다시 원심분리하여 얻은 침전물을 9 M urea 용액으로 완전히 용해하였다. 이 용액의 pH를 5.6으로 조절한 후 평행용액 (20mM acetic acid, 10mM DTT, 8M urea, pH5.6)으로 평행시킨 CM-T gel (TOSHO:Japan)에 넣어준 후, 평행용액을 칼럼 부피의 3배 이상을 흘려 모니터상에서 평행을 확인하고 0.3 M까지 NaCl gradient를 걸어 목적하는 항원을 분리하였다. 목적하는 항원은 HIV-1 O형 양성 혈청을 이용하여 immunoblot 분석을 실시하여 목적하는 항원임을 확인하였고, SDS-PAGE에 의해 순도가 대략 95% 이상인 목적항원만을 선별 분리하였다.

4. Immunoblot 방법

IPTG 유전자 발현을 유도하기 전후와 정제 전후의 항원을 mini-gel 장치 (Biorad Laboratories)를 이용하여 reducing 조건으로 SDS-PAGE를 수행하였다. IPTG 유도 전후와 정제 전후의 샘플들을 각각 2번씩 분석하였다. 전기 영동 후 항원을 nitrocellulose membrane으로 전기적으로 전달하였다 [6]. Membrane을 봉쇄용액 (PBS로 5% nonfat dry milk)에 40분간 서서히 흔들면서 반응 시킨 후 액을 버리고 O형 혈청 (xo 111)과 B형 혈청을 4% Nomal goat serum이 함유된 봉쇄용액으로 1000배 희석한 반응액을 이용하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이를 0.1% Tween 20 이 함유된 PBS (PBST)로 3회 세척한뒤 2mg/ml의 peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (주식회사 녹십자)를 5% bovine calf serum (BCS)이 함유된 PBST로 1:10⁵배 희석하여 20ml/membrane씩

넣고 실온에서 30분간 반응시켰다. PBST로 5회 세척한 후 기질로 4-chloro-1-naphthol (Sigma)을 함유한 H₂O₂ 용액을 20ml/membrane씩 넣고 실온에서 발색반응 시키면서 적정 밴드를 나타내었을 때 1차 증류수로 씻어 내어 반응정지시켰다.

5. ELISA

역가검사: 정제한 O형의 ECTM 항원을 50mM carbonate byffer (pH9.6)로 25 μ g/ml의 농도가 되도록 희석하여 마이크로플레이트 (Nunc, polysorp U8)에 100 μ l씩 넣고 25°C에서 18시간 정치하고 1% bovine serum albumine (BSA)이 함유된 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)으로 blocking 하였다. Anti-HIV-1 O형 양성으로 판정된 5검체 (카메룬으로 부터 수입)와 경기도 적십자 혈액원으로 부터 입수한 헌혈자 헌청 100검체를 각 well에 0.01ml씩 넣고 5% bovine calf serum (BCS)와 0.1% triton X-100이 함유된 PBS를 0.1ml/well씩 첨가한 후 혼합하여 37°C 항온기에서 1시간 반응시키고 PBST로 3회 세척하였다. 1.3g/L의 peroxidase conjugated rabbit anti-human IgG (DAKO)를 5% BCS이 함유된 PBST로 1:10⁵배 희석하여 0.1ml/well씩 넣고 37°C 항온기에서 30분간 반응시켰다. PBST로 5회 세척한 후 기질로 TMB액을 0.1ml/well씩 넣고 실온에서 30분간 반응시켰다. 2N H₂SO₄액을 0.1ml/well씩 넣고 혼합한 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 기존의 상품화된 시약 (녹십자: G HIV1/2 ELISA 3.0)을 이용하여 O형 혈청 5검체를 검사하였다.

Titration 검사: 정제한 O형의 gp41 항원을 코팅한 마이크로플레이트를 사용하여 각각 O형 양성 검체 (ox 111)와 B형 양성검체를 2배수씩 단계별로 희석하여 0.1ml/well씩 넣었다. 이하 검사는 상기와 같이 수행하였다. 대조군으로 기존의 상품화된 시약 (녹십자: G. HIV 1/2 ELISA 3.0)을 사용하여 같은 실험을 수행하였다.

결 과

1. HIV-1 O형 항원 유전자의 선택

본 연구에서 O형 항체를 감지하기 위하여 사용할 항원 단백질로서는 HIV-1 Env 단백질중 세포막 바깥에 위치한 부분을 선택하였다 (이하 ECTM 이라 약칭함). 그 이유는 ECTM이 서로 다른 아형간에도 비교적 잘 보존이 되어 있고 면역

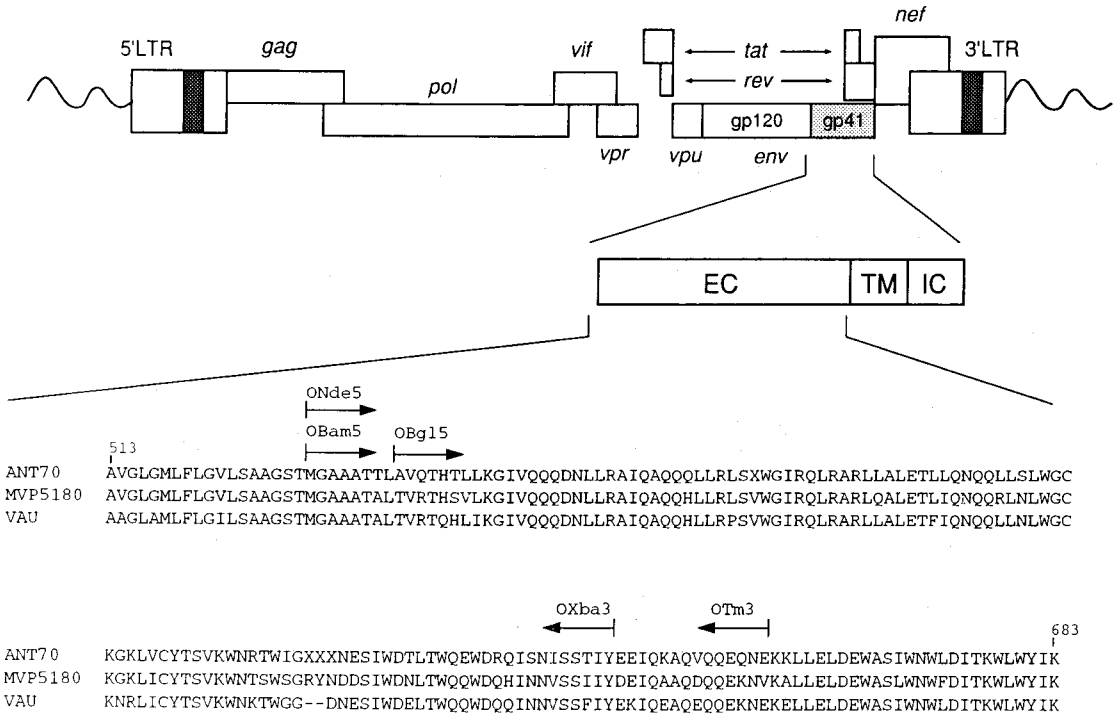


Fig. 1. The relative position and amino acid sequence of the extracellular domain of the transmembrane protein. EC (extracellular domain), TM (transmembrane region), IC (intracellular domain). The amino acid sequences of the three HIV-1 subtype O strains are shown. The relative positions of oligonucleotide primers used for cloning are indicated as arrows. The numbering system is based on Vanden Haesevelde et al [3].

성이 강한 것으로 이미 알려졌기 때문이다 [7]. 이 부위의 계놈에서의 위치와 아미노산 서열은 Fig. 1에 보여지는바와 같다. 1996년 12월 현재 데이터베이스에는 3가지의 O형 염기서열이 입력되어 있는데 항원으로 사용할 ECTM의 아미노산 부분은 그림 1에 표시한 바와 같다. 이 연구에서는 O형의 아미노산 서열들에 기초하여 잘 보존된 부분들을 고르고 대장균의 코돈 편애성 (codon usage)을 감안하여, 먼저 Env 단백질의 세포막 바깥부분에 해당하는 염기서열 전장을 이중선 (double-stranded)으로 합성하고 이를 다시 수개의 부위로 잘라내어 대장균에서 발현량을 확인하였다. 사용된 염기서열의 위치에 따라 대장균에서의 발현량이나 항체 반응성에는 큰 차이가 있었는데 이중 특히 129개의 아미노산으로 구성된 부분 (프라이머 OBam5/OTm3 사용)의 생산량이 가장 높았기 때문에, 본 논문에서는 이 펩타이드를 이용하여 얻은 결과만을 서술하였다.

2. 대장균에서 ECTM의 발현

상기한 HIV-1 O형의 ECTM를 가지는 발현백

터를 대장균에 집어넣고 대량배양하면서 IPTG를 첨가하여 과다 발현을 유도 하였다. "재료 및 방법" 란에 서술된 바와 같이 총 단백질을 만들고 이를 CM-T 겔 크로마토그래피를 이용하여 순수분리를 시도하였다. 크로마토그래피로 분리하기전의 단백질과 분리된 용액을 SDS/PAGE에서 조사한 결과는 그림 3에 보여지는 바와 같다. 그림 3에 보이는 바와 같이 ECTM은 IPTG 첨가 이전에는 매우 소량 발현되다, 첨가 이후에는 전체 단백질의 10~20% 정도를 생산하였다 (Fig. 2, 1열과 2열 비교). Inclusion body를 수집하여 크로마토그래피 분리한 이후에는 거의 단일밴드로 나타나서 순도가 98% 이상임을 시사하였다 (Fig. 2, 3열).

3. ECTM의 HIV-1 O형 항체인지 여부

이와같이 생산된 ECTM이 HIV-1 O형에 감염된 사람의 혈액에 효율적으로 반응하는 지를 조사하였다. 국내에서는 아직 O형에 감염된 사람이 보고된바 없기 때문에 O형 감염자가 비교적 많은 카메룬으로부터 혈액을 입수하여 조사하

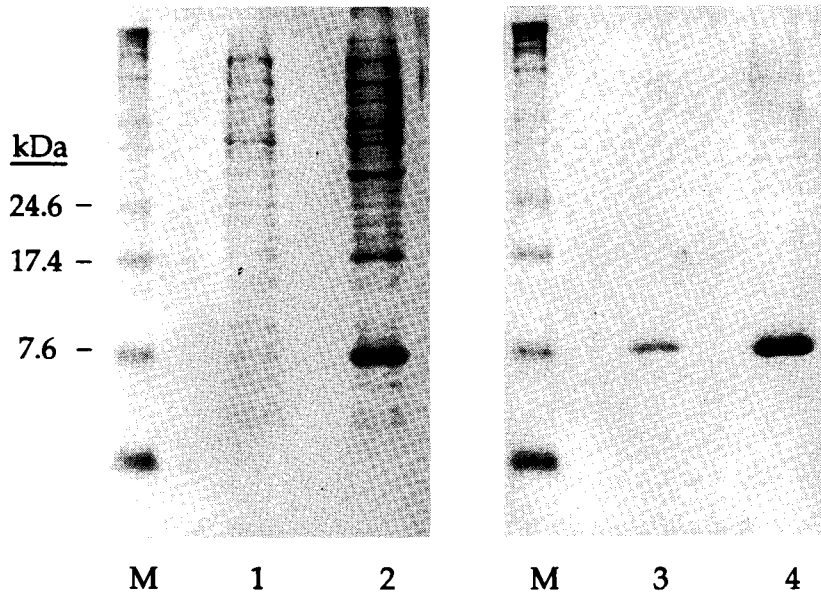


Fig. 2. Expression of ECTM in *E. coli*. Total cell lysates were prepared from *E. coli* before (lane 1) or after (lane 2) IPTG induction followed by SDS/PAGE. Inclusion bodies were collected and subjected to the CM-T gel chromatographic purification as described in Materials and Methods. The protein samples before (lane 4) and after (lane 3) the column purification were loaded.

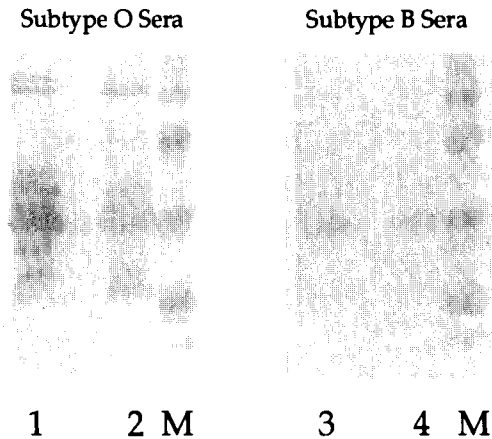


Fig. 3. Efficient interaction of ECTM with subtype O sera. The proteins corresponding to lanes 3 and 4 of Fig. 2 were subjected to the Western blot analysis using sera from individuals infected with subtype B or O as indicated. Lane 1 and 3, chromatography-purified proteins; lanes 2 and 4, proteins from inclusion bodies.

였다. 이 혈액들은 이미 O형에 감염된 것이 확실한 사람들로 부터만 입수 한 것이다. 상기항에서와 같이 순수분리된 ECTM 단백질은 O형 감염자의 혈액을 1/1000로 희석한 샘플과 매우 강하게 반응하였다 (Fig. 3). ECTM은 HIV-1 B형 감염

자의 혈액 (1/1000 희석)과도 반응하였지만 같은 실험조건 하에서 반응 밴드의 진한 정도는 O형 보다 10~50배 약하였다 (Fig. 3).

4. O형 ECTM을 이용한 ELISA검사

HIV 감염여부에 대한 진단은 대부분의 경우 ELISA를 이용한 항체 분석을 통해 이루어진다. 따라서 본 항에서는 ECTM 항원이 ELISA의 재료로 사용될 수 있는지를 조사하였다. 정제된 O형 ECTM 항원을 "재료와 방법론"란에 서술된 바와 같이 마이크로플레이트에 코팅하여 ELISA 검사를 수행하였다. 먼저 전혀 희석이 되지 않은 O형 혈액 5개를 샘플로 사용하였고 대조군으로는 기존의 상품화된 키트 (HIV-1/2 ELISA 3.0; 주식회사 녹십자)를 이용하여 비교하였다. 본 연구에서 확립한 O형 항체 ELISA 방법의 판정기준값은 상품화된 기준시약에 있는 음성 대조액의 흡광도값에 0.3을 더한 값으로 하였다. 결과는 혈액샘플의 흡광도와 판정기준값의 흡광도 비율 (Sample OD/Cutoff value; S/CO)로 표시하였는데, 이 비율이 1을 넘으면 양성으로 판정한다. 표 1에 보이는 바와 같이 O형 ECTM 플레이트나 이미 상품화된 키트 모두 O형 감염자의 혈액을 S/CO = 3 이상으로 양성 판정하였다. 그러나 O

Table 1. Comparison of the ELISA kits containing the subtype O antigen ECTM and the subtype B proteins for their reaction with sera

Antigen	Sera	Subtype O				
	Subtype B	xo 101	xo 102	xo 104	xo 106	xo 111
Subtype O	0.0	3.7	3.8	3.9	4.3	4.4
Subtype B	7.9	3.5	3.5	3.3	3.6	3.6

The results are expressed as specimen absorbance to cutoff ratios (S/CO)
A ratio higher than 1.0 is considered reactive

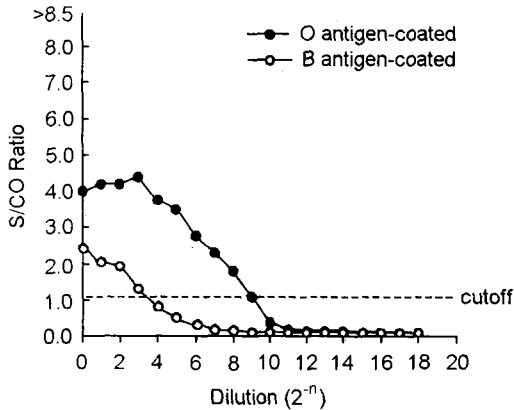


Fig. 4. Sensitivity of ECTM to subtype O sera. The ELISA kit containing the purified ECTM was compared with the commercially available kit consisting of subtype B antigens. Subtype O sera were serially diluted and the immunoabsorbance determined. The results are expressed as specimen absorbance to cutoff ratio (S/CO).

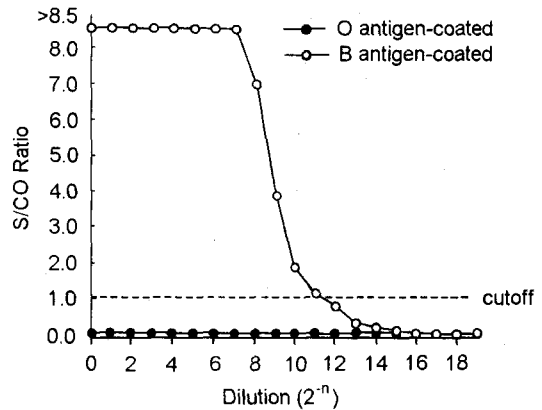


Fig. 5. Sensitivity of ECTM to subtype B sera in ELISA. The ELISA kit containing the purified ECTM was compared with the commercially available kit consisting of subtype B antigens. Subtype B sera were serially diluted and the immunoabsorbance determined. The results are expressed as specimen absorbance to cutoff ratio (S/CO).

형의 ECTM 항원으로 코팅된 플레이트는 B형 혈청에 대하여 전혀 반응하지 않아 본 연구에서 사용된 O형 항원이 매우 높은 특이성을 가지고 있음을 보여 주었다. 또한 HIV-1에 감염되지 않은 헌혈자의 혈청 100개 (경기도 적십자 혈액원 제공)를 사용하여 조사한 결과 O형 ECTM은 90개의 샘플과 O.D. = 0.1 미만, 8개의 샘플에서 O.D. = 0.2 미만, 2개의 샘플에서 O.D. = 0.3 미만으로 반응하여 모두 S/CO = 1 미만의 수치를 나타내었다. 이로써 제조된 ECTM항원이 자체의 특이성도 높고 정제 순도도 우수함을 확인하였다.

5. O형 ECTM의 민감도

상기 분석에서는 사용된 ECTM이 O형 혈청에 대하여 매우 높은 반응특이성을 보였다. 그러나 대량 분석용에서는 민감도도 중요하기 때문에 본 연구에서는 O형이나 B형 감염자 혈청을 최

고 2048배 (2¹¹)까지 단계 희석하여 항원의 민감도를 조사하였다. B형 항원을 사용하는 기존의 ELISA 키트는 O형 혈청에 대하여는 8배 희석까지만 양성 반응하였던 반면, O형 ECTM은 512배 (2⁹) 희석까지도 양성반응을 나타내어 높은 민감도를 보였다 (Fig. 4). 또한 O형 ECTM항원은 높은 특이도를 가졌다. Fig. 5에 보이는 바와같이 O형 ECTM은 B형 혈청과는 전혀 반응하지 않았다. 대조군으로 사용한 기존 시약은 2048배 (2¹¹)까지 양성으로 판정하였다. 이는 본 연구에서 만들어진 ECTM이 매우 높은 민감도와 특이도로 O형 혈청과 반응함을 보여주는 것이다.

고 찰

HIV는 복제과정에서 실수가 잦은 반면 이에 대한 수선과정을 별도로 가지고 있지 않아 염기

서열이 매우 다양하게 존재한다. 따라서 *env* 유전자의 V3 부위를 기준으로 할 때에 10가지에 가까운 아형이 존재하고 정보의 축적에 따라 아형의 수는 더욱 증가할 것으로 보인다. 그러나 HIV-1 아형들 간의 아미노산 서열은 70~90%까지 유사하여 한 유형 (일반적으로 B형)의 바이러스로부터 2개 정도의 항원 부위를 사용하여 진단시약을 제조하면 대부분의 아형들은 상호반응을 하게된다. 그러나 HIV-1 O형은 다른 아형들과 염기서열, 따라서 아미노산 서열이 매우 달라 B형 항원들과는 매우 약하거나 거의 반응을 하지 않은 것으로 알려져 있다. 데이터베이스에 있는 HIV-O형의 유전정보수는 다른 아형과는 달리 아직 매우 작아 B형에 기초한 기존의 진단시약에 O형에 어떻게 반응할 지는 불분명하였다.

국내에서 이성접촉을 통해 HIV-1에 감염된 사람들중의 상당수는 아프리카 지역과 교류가 빈번했던 것으로 알려져 있어 O형의 국내 유입이 전혀 불가능하다고는 볼 수 없다. 반면 기존의 HIV 진단시약은 O형 항원을 재료로 사용하지 않았고, 비교적 낮은 효율성으로 O형 혈청과 반응하기 때문에 O형 특이 항원의 개발이 시급하였다. 본 연구에서는 HIV-1 O형의 *env* 유전자중 특히 ECTM 부위를 항원으로 개발하였다. 선택된 재조합 유전자는 대장균에서 대량의 항원을 생산하였고 1~2단계의 겔 크로마토그래피로서도 높은 순도로 정제되는 것을 발견하였다. 이와 같은 정제된 항원은 웨스턴 블랏 분석을 통하여 O형 혈청과 반응하는 것을 확인하였다. 대량 진단용으로 사용할 수 있는 가능성을 조사하기 위해 마이크로웰 플레이트에 항원을 코팅하여 ELISA를 실시한 결과 B형 감염자 혈청과는 전혀 반응하지 않는 반면, O형 감염자 혈청을 512배까지 희석하여도 양성판정을 하여 O형 혈청에 대하여 높은 민감도를 가지고 있음을 확인하였고, 100명의 음성대조군을 모두 음성 판정하여 높은 특이도를 보였다. 본 연구에서 제조된 O형 ELISA 플레이트는 O형 항원 ECTM만 함유하고 있었기 때문에 기존의 진단시약과 같이 Gag 항원도 첨가한다면 민감도는 보다 증가할 것으로 사료된다.

B형 항원에 기초하여 제조한 상업용 ELISA 키트들도 O형 혈청들과 반응하였는데, 이는 이 분석키트에 O형과 약하게나마 반응할 수 있는 B형 항원이 있었기 때문인 것으로 사료된다. 그러나

이 키트들은 연쇄 희석 분석 방법에서 비교적 낮은 희석배수인 8배까지만 O형 혈청에 대하여 양성 반응을 나타냈다. 이는 O형 감염자들을 위음성으로 판정할 가능성이 있음을 시사하므로 국내에서도 기존의 HIV 진단시약에 O형 항원을 첨가하여 감염 혈청에 대한 감지 효율성을 최대한 높이는 것이 필요하다고 생각된다.

결 론

1. HIV-1 O형의 *env* 유전자중 세포막 바깥 부분을 여러 부위로 클로닝하여 발현량을 비교 분석하고, 그중 생산량이 높은 ECTM을 항체 감지용 항원으로 선택하였다.

2. ECTM은 웨스턴블랏에서 HIV-1 O형 감염자와 효율적으로 반응하였다.

3. ELISA에서 ECTM은 O형 혈청과 매우 강하게 반응하는 반면 B형 혈청과는 전혀 반응하지 않았으며, 100개의 음성대조군과도 양성 반응하지 않아 높은 특이도를 보여 주었다.

4. ELISA에서 ECTM은 O형 혈청의 512 희석배수까지도 양성반응을 보였다.

5. HIV-1 B형 항원을 재료로 사용한 기존의 ELISA 키트는 O형 혈청 원액의 8배 희석 배수까지만 양성반응을 나타냈다.

6. 이 결과들은 O형을 사용하지 않은 국내 제조 ELISA 혹은 기타 분석 키트들에 O형 항원을 첨가하는 것이 필요하다는 것을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 (KOSEF 92-2400-0101-3, 92-2400-0103-3), 주식회사 녹십자, 주식회사 바이로메디카 패시픽의 지원아래 수행되었다.

참 고 문 헌

1. Myers G, Korber B, Wain-Hobson S, Smith RF, Pavlakis GN: Human Retroviruses and AIDS 1994; A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, USA, 1993.
2. Gurtler LG, Hauser PH, Eberle J, von Brunn A, Knapp S, Zekeng L, Tsague JM, Kaptue L: A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. J Virol

- 68: 1581-1585, 1994.
3. Vanden Haesevelde M, Decourt JL, de Leys RJ, Vanderborcht B, van der Groen G, van Heuverswijn H, Saman E: Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J Virol* 68: 1586-1596, 1994.
 4. Charneau P, Borman AM, Quillent C, Guetard D, Chamaret S, Cohen J, Remy G, Montagnier L, Clavel F: Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of a new HIV-1 group. *Virology* 205: 247-253, 1994.
 5. Loussent-Ajaka I, Ly TD, Chaix ML, Ingrand D, Saragosti S, Courouce AM, Brun-Vezinet F, Simon F: HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 Subtype O infected patients. *Lancet* 343: 1393-1394, 1994.
 6. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354, 1979.
 7. Burke DS, Brandt BL, Reifield RR, Lee TH, Thorn RM, Beltz GA, Hung CH: Diagnosis of human Immunodeficiency virus infection by immunoassay using a molecularly cloned and expressed virus envelope polypeptide. *Annals of Internal Medicine* 106: 671-676, 1987.
-