

## 혈액의 품질관리를 위한 바이러스탐지 지표개발에 관한 연구

수원대학교 자연과학대학 생명과학과

김윤지 · 이지혜 · 김영호\*

### Studies on the Development of Viral Detection Markers for the Quality Control of Blood

Yunji Kim, JiHye Lee and Youngho Kim\*

Department of Life Sciences, College of Natural Sciences, The University of Suwon,  
Whasung, Kyonggi-do 445-743, Republic of Korea

Received : June 18, 2007

Accepted : August 21, 2007

According to the serological screening methods of antigen-antibody reaction such as ELISA, it has been known that the complete detection of viral infections of HBV, HCV, and HIV-1 viruses in the blood and blood related-products is not much reliable. Therefore, nucleic acid amplification testing methods (NAT) adopted to detect the small quantitative viral nucleic acids could support the basis of using and supplying the blood and its related products safely. This research work is basically designed to describe the simultaneous blood screening system by multiplex or duplex tests for detection of HBV, HCV, and HIV-1 viruses in the blood at one time with low price and labor. It is aimed at easy detection by using the conventional agarose gel electrophoresis. Thus, we tried to detect and identify the viral components in the blood sample according to their different size of PCR products. We decided a set of consensus sequences to recognize each viral DNA fragments after running the multiplex PCR in one tube. This was done by nested RT-PCR using two different RNA viral genomic templates followed by multiplex PCR with addition of viral DNA and their primers after purifying the viral genomic nucleic acids. Those specific primers could be used without any interference to amplify each viral genome in the blood samples. The sensitivities with different viral loads were evaluated on the agarose gel electrophoresis. Three different viral agents in the blood samples could be tested by this multiplex (RT)-PCR with three different primers.

**Key Words:** HBV, HCV, HIV-1, Multiplex (RT)-PCR, Blood sample

## 서 론

HBV, HCV 및 HIV-1 바이러스와 같은 위해요소의 혈액 감염에 의한 수혈 및 혈액제제로부터의 감염위험성

은 HBsAg 항원의 발현, anti-HCV mAb, anti-HIV mAb를 이용한 ELISA 및 rapid dipstick screening 기술의 발전에 힘입어 헌혈자 및 공여자의 혈액 선별, 혈액 원료의 선정 등이 엄정하게 진행되어 크게 감소하여 왔다 (22).

그렇지만, seroconversion되기 전의 window 시기, 면역적으로 변이된 바이러스의 감염, 면역적으로 탐지되지 않는 바이러스 보균자의 헌혈, 숨겨진 보균자 등과 같은 사람의 헌혈 등에 의한 감염위험은 상존하고 있어서, 최근 nucleic acid amplification testing (NAT) 방법에 의한 바이러스 DNA 또는 바이러스 RNA 탐지 방법이 적극

\*교신저자: 김영호. 445-743, 경기도 화성시 봉담읍 와우리 산2-2, 수원대학교 자연과학대학 생명과학과  
Phone: +82-31-222-7632, Fax: +82-31-220-2484,  
e-mail: kimyh@suwon.ac.kr

\*\*본 연구는 식품의약품안전청 관리번호 05092생의평348 사업명: 생물의약품 평가기술개발에 의한 연구비로 수행되었음.

도입되고 있다 (1,3,10,23,27). 따라서, HIV-1의 경우 감염 후 6~14일 이내의 seroconversion 전에도 탐지되고 있으며, HCV의 경우 26일 이내의 seroconversion 시기에도 탐지 가능한 것으로 보고되었다 (13). 미국에서는 현재 80% 이상의 혈액검사가, 그리고 아시아, 일본 및 유럽에서도 다수의 혈액검사에서 자동화된 Procleix-Ultrio Assay 방법으로 HBV 감염 초기 11~20일까지의 window 시기에 바이러스 감염 여부를 탐지해 내고 있다 (2). 이와 같은 NAT 방식의 탐지 장점은 감염성 위해 바이러스의 유전물질을 직접 그리고 바이러스 염기 특이적인 탐지에 있기 때문에 항원-항체 탐지법 또는 직접 바이러스 분리 방법 등보다 상당히 감수성이 높은 것으로 분석되어 왔다.

이와 같이 감염 또는 오염된 시료에서 바이러스를 탐지하는데 상당한 타당성과 감수성이 높은 NAT 방법이 실시되고 있지만, 대개는 필요한 비용이 높기 때문에 여러 시료를 일정량씩 합하여 pooling된 시료를 사용하는 방식을 택하고 있다 (12). NAT 검사 비용을 줄이기 위해서 두 가지 서로 다른 방식을 제안하고 있다. 첫 번째 방식은 일본과 구미 여러 나라 그리고 최근에는 우리나라에서도 검사 시료가 대단히 많은 때 시료를 pooling하는 것이다. 그러나 시료 속에 바이러스의 양이 적게 감염되어 있을 경우 pooling에 의한 희석 배수가 높아져 NAT 방법의 detection limit 이하로 될 경우 양성 판정이 어려워지는 경우가 발생한다 (24). 이때는 NAT system 자체의 민감도가 상당히 좋아야 하거나, 희석 배수에 의한 바이러스 load를 초원심분리 후 검사할 경우 높은 빈도의 의양성 판정이 높아진다는 보고도 있다 (21). 양성 판정된 pool의 경우 그 pool을 구성한 개별 시료에 대한 분석이 시행되어야 하는 단점도 갖고 있다. 두 번째로 접근할 수 있는 방법이 바로 여러 바이러스 감염 여부를 동시에 탐지할 수 있는 multiplex NAT 테스트 방식이 되겠다. Multiplex 측정 방식은 비용효과를 높일 수 있을 뿐 아니라 테스트 효능과 실행 가능성을 손상시키지 않고 시간과 노력을 줄일 수 있다 (8). Multiplex PCR 방법으로 여러 임상 시료에 감염되어 있는 위해 바이러스들을 식별해 내는 실용성이 이미 여러 연구에서 검증되어 보고되었다. 그러나 대단위 숫자의 혈액 스크리닝에 대한 multiplex 방법은 아직 몇몇 연구실에서 연구되고 있다 (7,10,15,16,25). 최근에는 HBV, HCV, HIV를 동시에 검출할 수 있는 상용화된 반자동 multiplex 시스템이 개발되었다. AM-PLINAT MPX test와 전사를 이용한 증폭 방

식인 Procleix Ultrio test 방식 (14), 동시에 세 가지 바이러스의 감염 시료 정량 방식의 Real-Time PCR 방식도 개발되었다 (5). 최근 상용화된 semi-automated multiplex assay system이 개발되어 HBV, HCV, HIV-1를 동시에 스크리닝하게 되었다. 이와 같이 민감도가 높은 multiplex HBV/HCV/HIV-1 reagent를 사용하여 상당히 효과적으로 현혈된 혈액의 스크리닝에서 성공적인 결과를 내놓고 있다. 혈액 내 바이러스 유전물질의 copy 수가  $10^2 \sim 10^6$  copy/ml까지 검출되고 있으며, HBV의 경우 평균적으로  $10^4$  copy/ml이 측정되고 있다.

일본의 경우, HBsAg 스크리닝과 anti-HBcAg 항체 스크리닝 도입, HCV 항원을 결합시킨 적혈구 또는 젤라틴 입자에 의한 응집반응 도입 등으로 현혈된 HBV 및 HCV 감염 사례가 크게 감소하고 있다 (19). 그렇지만, seroconversion되기 전의 window period 기간의 현혈자들의 혈액 검사는 완전히 피할 수 없는 경우가 발생하기도 하였다. 그래서 1999년부터 PCR 방법에 의한 바이러스 유전자 증폭테스트 (NAT) 방법을 도입하여 HBV, HCV, 및 HIV들을 개별적으로 검사하고 있으나, 워낙 스크리닝 샘플이 많아서 pooling system 방식으로 검사하고 있다. 일차로 ELISA 양성 혈액 pool의 경우 multiplex reagent에 의해 HBV, HCV, 및 HIV를 검사하고 있다 (17). 그리하여 1999년 12월부터 NAT 제조 가이드라인과 NAT 관련 제품 허가를 위한 assay 방법의 유효성을 확인하였다 (19). 그러나 아직 항원-항체 검사와 NAT 방법에 의한 테스트가 병행하도록 권고하는 방안을 내놓고 있다.

국내에서는 혈액 및 혈액제에 대한 검사법이 오랫동안 항원-항체 검사법을 위주로 하여 ELISA 검사법이 시행되어 왔다. 항원-항체 검사법에 의한 5개 위해요소 (HIV, HBV, HCV, 말라리아, 매독)에 대한 의무적인 검사로 비교적 안전한 혈액 수급 및 혈액제제가 상용화되고 있고, 점차 혈액 및 혈액제제에 대한 검사를 위한 체계가 수립되어 보다 더 신뢰성 있고 감수성이 높은 검사기술이 확립되고 있다. 현재 혈액원에서는 HCV와 HIV-1에 대한 혈액검사가 연간 약 270만 건 씩 국내 NAT 센터에서 TMA 시스템에 의해 검사가 진행되고 있어서 window period 기간에 함유된 바이러스의 검사가 상당히 효율적으로 이루어지고 있다. 특히 최근에는 혈액검사 및 관리는 신뢰성 높고 감수성도 높은 제품을 도입하여 전량 pooling 시스템 방법에 의해 검사가 이루어지고 있어서 감염되지 않은 혈액의 수급이 원활해지고 있다. 그러나

소규모 혈액제제나 혈액 시료를 다루어야 하는 실험실 또는 연구실 규모에서는 혈액원과 같은 시스템이나 장비가 구비되기 어려워 이에 맞는 소규모 검사 시스템에 의한 효율성 있는 검사를 수행하기 위한 방법이 필요할 것이다.

지금까지는 면역학적인 기술을 이용하여 혈액 검체 내 항원과 항체를 검출하여 소량의 항원과 항체까지도 정확히 검출하여 왔으나, HBV의 경우 혈액 내 항원을 검출하기가 용이하지만, HCV와 HIV의 경우 직접 항원을 검출하기가 쉽지 않다. 그러므로 혈액의 안전성과 혈액제제 (혈장, 알부민, 항체 단백질, 혈액응고 관련 제제) 및 최근의 태반 관련 제제, 제대혈 혈액의 관리 시 virus-free한 시료의 검증 등에 보다 정확한 NAT 테스트와 같은 검사 방법의 도입이 큰 관심을 끌고 있다. 그러나 PCR 방법에 의한 NAT 테스트 방법은 이처럼 많은 장점을 갖고 있으나, 개개의 혈액 시료에 대해 개개의 위해 바이러스에 대한 검사를 수행해야 하는 단점 때문에 ELISA 테스트 후 음성 시료의 일정량의 시료를 pooling하는 방식에 의한 HBV, HCV 및 HIV에 대한 PCR 또는 RT-PCR 검사를 개별적으로 시행해야 하는 번거로움을 피할 수 없게 되었다. 그러므로 혈액 관련 제제를 생산하는 혈액 제제 제조사들도 품질검사에서 HBV, HCV 및 HIV를 각각 NAT 검사해야 할 경우 마찬가지로 고가의 탐지 장비와 숙련된 테크니션이 필요하다.

그러나 한 가지 시료에서 HBV, HCV 및 HIV의 오염 여부를 한 번에 탐지할 수 있는 multiplex PCR/RT-PCR 방식을 도입하면 간단하게 어떤 바이러스에 오염되었는가를 식별해 낼 수 있어서 편리할 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서는 위해 바이러스에 오염되어 있는 혈액 및 혈액제제를 간단히 검출할 수 있는 검출 지표와 검출 조건을 확립할 수 있는 기준을 제시하고자 한다. 특히, HBV, HCV 및 HIV-1 등의 인체 바이러스의 유전자 염기서열에 관한 데이터베이스를 이용하여 혈액 내에 존재하는 바이러스들을 검출하는데 쓰이는 primer를 지표로 활용하였으며, 단일검출 방법보다 세 가지 위해요소를 한 번에 검출할 수 있는 primer 조건을 확립하였으며, multiplex PCR 방법의 민감도 측정 (sensitivity assay), 재현성 (reproducibility), 혈액 내 PCR 반응에 대한 미지의 방해물질 (interference) 존재를 최대한 억제하기 위한 viral DNA 및 RNA 추출 방법의 개선, 유전물질의 증폭 효율을 높이기 위한 방법으로 RNA 바이러스에 대한 nested

RT-PCR의 수행 그리고 소수의 시료에 대한 검출작업이 이루어지는 소단위 실험실에서 시간과 노력을 줄여서 세 가지 바이러스의 감염 또는 오염 여부를 쉽게 판정할 수 있도록 agarose gel 전기영동 방법 등으로 검증 및 활용하였다.

## 재료 및 방법

### 1. PCR Primer

HBV와 HCV, HIV-1의 혈액 내 NAT 탐지를 동시에 RT-PCR에 의한 방법으로 식별해낼 수 있는 방법과 조건의 확립을 위해 유전적 변이가 가장 적은 부위로 알려진 위치에서 각각의 PCR primer로 확정하였다. HBV primer는 표면항원 유전자의 conserved region (26), HCV primer는 5'-UTR region (4)과 HIV primer는 LTR region에서 일반적으로 선택하였다. 또한 세 가지 서로 다른 위해요소 바이러스를 식별하기 위해 각 primer를 이용한 PCR 산물의 크기를 식별 가능한 크기로 나누어 primer sequence를 정하여 제작하였으며, 각 primer간에 서로 유사한 염기서열이 없는 것을 확인하였다 (Table 1).

### 2. 검체준비

음성대조 검체 준비는 HBV, HCV, 및 HIV-1 바이러스 항원이 없는 연구용 음성혈청을 혈액원에서 구하여 음성대조 검체로 사용하기 위해 RNA 및 DNA 추출 방법으로 추출하여 사용하였다. 양성대조 검체 준비는 음성대조 혈청에 세 가지 plasmid DNA를 각각 50 pg/μl가 되도록 첨가하여 양성대조 검체로 사용하기 위하여 RNA 및 DNA 추출 방법으로 추출하여 사용하였다. Viral RNA 추출은 신선한 검체 혈액 (혈장 및 혈액제제) 250 μl에 TRIzol 750 μl 혼합 후 5분 정치한 후 200 μl 클로르포름을 넣고 15초 간 vortexing하였다. 5분 후 원심분리(13,000 rpm, 10분)하여 상층액에 500 μl iso-propanol을 혼합하였다. 원심분리 후 침전물을 건조하여 증류수 10 μl로 바이러스 유전물질을 추출하여 1 μl를 nested RT-PCR 검체로 사용하였다. QIAamp RNA kit를 사용할 경우 30 μl로 RNA를 용출하여 3 μl를 사용하였다. Viral DNA 추출은 QIAamp DNA 추출키트 (Qiagen, Strasse, Germany)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 신선한 혈청 200 μl와 200 μl의 Trizol buffer를 첨가한 후 56℃에서 10분간 처리하고 200 μl의 96~100%의 에탄올을 첨가하여 혼합하였다. 용액

모두를 QIAamp Spin Column에 옮긴 후 8,000 rpm에서 1분 원심분리하여 30  $\mu$ l 멸균증류수로 DNA를 추출하여 Nested RT-PCR 후 multiplex PCR에 3  $\mu$ l를 사용하였다.

### 3. PCR 및 RT-PCR 조건 확립

Clone된 HBV, HCV, 및 HIV-1 DNA의 Plasmid DNA, Viral HBV DNA를 주형으로 증폭하는 조건은 Biocore Taq polymerase (Elkridge, MD, USA)에서 제시된 방법을 변형하여 증폭프로그램은 처음 94°C에서 2분간 주형 nucleic acid를 denaturation시키고 나서, 94°C에서 1분간, 44°C에서 1분, 그리고 72°C에서 1분간의 프로그램을 30회 반복시킨 후, 마지막 회 다음에 72°C에서 5분간 지나도록 하여 수행하였다. HCV 및 HIV RNA의 경우 민감도를 높이기 위하여 1회 nested-RT/PCR을 수행한 후 합성된 DNA 주형으로 multiplex PCR을 다시 수행하여 증폭시켰다. 또한 multiplex-PCR 최적 조건을 확인하기 위하여 서로 다른 annealing 온도에서 두 가지 이상의 프라이머 셋트가 들어간 조건에서도 변화시키면서 확인하였다.

### 4. PCR 기본조건 확립을 위한 민감도 테스트

기본 PCR 조건을 확립하기 위해 사용된 plasmid 주형은 각각 HBV의 middle surface 유전자 600 bp, HCV의 전체 유전자, 그리고 HIV-1의 전체 유전자가 클론된 plasmid DNA들을 사용하였다. 또한 혈청 속의 PCR 증폭을 방해할 수 있는 interference 물질에 의한 민감도를 검증하기 위하여 각 플라스미드를 2배수 희석법에 의해 희석하여 증폭 가능한 최저 DNA copy 수를 계산하였다.

### 5. 지표 Primer에 의한 바이러스 특이도 검사

바이러스에 감염되지 않은 정상 혈청을 이용하여 제시된 PCR 또는 RT-PCR 방법에 사용되는 지표 primer가 바이러스에 특이반응을 보이는가를 확인하였다. 즉, 바이러스 음성혈청에서 바이러스 DNA 또는 RNA를 추출하여 이를 각각의 주형으로 사용하여 PCR 및 RT-PCR을 수행하였다. 사용된 음성혈청은 각각 10개씩을 사용하였다.

### 6. 확립된 PCR 및 RT-PCR 방법에 의한 재현성 검사

Clone된 각 plasmid DNA를 주형으로 사용하여 최저 감수성 농도 이하의 copy 수, 탐지 가능한 최저 농도의 copy 수, 그 농도의 10배수 증가 농도의 copy 수의 주형

으로 1명의 연구자가 연속하여 3회 테스트하였으며, 연구자 3인이 각각 1회씩의 테스트를 하여 재현성에 대한 검증시험을 수행하였다. 또한 세 가지 주형이 탐지 가능한 copy 수가 들어 있는 시료를 이용하여 multiplexed-PCR을 수행하였다.

### 7. 임상 시료의 수집 및 단일 및 다중 (RT)-PCR 테스트

#### 1) 바이러스 감염 또는 비감염 임상 시료의 수집 및 혈청학적인 ELISA 테스트

임상 시료의 경우, 수집된 시기와 수집된 시료의 보관 방법의 차이 등으로 신선한 시료와 신선하지 못한 시료가 있는 것으로 판단되어 모든 시료에 대해서 (주) 에스디 회사 (수원, 한국)에서 항원진단 및 항체진단 ELISA kit를 구입하여 테스트하여 혈청학적인 음양성으로 판정하였다.

#### 2) 단일 (RT)-PCR 테스트

모든 시료에 대해서 200~250  $\mu$ l씩의 시료를 기준으로 바이러스 DNA와 RNA를 추출하여 기본 방법으로 이를 주형으로 사용하여 각각의 바이러스에 대한 primer 지표로 단일 PCR 및 RT-PCR 증폭실험을 수행하였다.

#### 3) Multiplex PCR 테스트

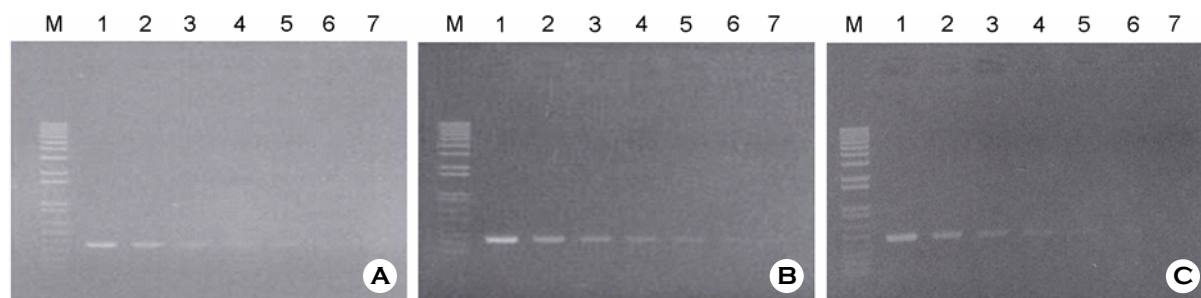
모든 시료에 대해서 250  $\mu$ l씩의 시료를 기준으로 바이러스 DNA 또는 RNA를 10  $\mu$ l씩 추출하여 기본 방법으로 사용하고, 이를 1  $\mu$ l씩 (Qiagen kit 사용시 3  $\mu$ l)의 주형으로 사용하여 세 가지 바이러스에 대한 primer를 지표로 하여 multiplex PCR 증폭실험을 수행하였다.

### 8. Multiplex (RT)-PCR 방법

HCV와 HIV-1 검체의 nested RT-PCR을 위하여 RT-premix 키트 (Intronbiotechnology, Sungnam, Korea)를 사용하여 역전사 반응으로 1차 RT-PCR 반응을 수행하였다. 요약하면, 추출한 RNA 검체 1  $\mu$ l, DEPC 처리 증류수 17  $\mu$ l, 10 pmole external primers 1  $\mu$ l를 premix 키트에 혼합하여 nested RT-PCR을 수행하였다. 이때 사용한 primer들은 Table 1과 같았다. 1차 nested RT-PCR 산물을 이용하여 HCV와 HIV 검체에 대해 2차 PCR을 수행하였으며, 이때 HBV DNA 검체도 넣어서 동시에 multiplex PCR을 수행하였다. 이때 사용한 반응물의 기본구성은 다음과 같았다: DNA 검체 1  $\mu$ l, nested RT-PCR 검체 1  $\mu$ l, 10X 완충액 (Qiagen) 5  $\mu$ l, dNTP 각 1  $\mu$ l, 멸균증류수 42  $\mu$ l, 10 pmole 역방향 primer 1  $\mu$ l, 10 pmole 앞방향 primer 1  $\mu$ l, Taq

**Table 1.** Oligonucleotides sequences used in the PCR and RT-PCR and products size after amplification

Virus	Nested	Orientation	Seuences	Product Size
HCV	Outside	Forward	CAC TCC GCC ATG AAC CAC TCC CCT	250 bp
	Outside	Reverse	TGT GCT CAT GGT GCA CGG TCT ACG AGA	
	Inside	Forward	AAC GAC TGT CTT CAC GCA GAA AGC	
	Inside	Reverse	GCA CCC TAT CAG GCA GTC CCA CAA	
HIV	Outside	Forward	TGG AAG GGC TAA TTC ACT CCC AAC	501 bp
	Outside	Reverse	GAG CTC CCA GGC TCA GAT CTG GTC	
	Inside	Forward	CCC AAC GAA GAC AAG ATA TCC TTG	
	Inside	Reverse	CTG GTC TAA CCA GAG AGA CCC AGT	
HBV	No	Forward	TGC CTC ATC TTC TTG TTG GTT CT	336 bp
	No	Reverse	CCC CAA TAC CAC ATC ATC CAT ATA	



**Figure 1.** Detection limit of HBV (A), HCV (B), HIV-1 (C) DNA plasmid samples using PCR. M, 100 bp DNA ladder; Each lanes was half-diluted from 240 ng/ml (A), 240 ng/ml (B), 1,300 ng/ml (C). Positive PCR product were shown on the 336 bp size (A), 250 bp size (B), and 501 bp size (C), respectively.

enzyme (Qiagen 또는 BioCore) 0.5  $\mu$ l로 multiplex PCR을 하였다.

#### 9. PCR 산물의 탐지: 전기영동 방법

PCR 결과는 특이한 바이러스의 검출이 완성되어야 한다. 일반적으로 특이도를 높이기 위해 합성된 PCR 산물에 특수한 물질이 부착되어 이를 탐지할 수 있는 기기를 사용하지만, 그 장비들의 가격이 높고, 식별 가능한 감수성의 차이에 의한 진단에 오류가 발생할 가능성이 있다. 그러나 본 연구에서는 간편한 방법으로 agarose gel 전기영동 방법을 도입하였다. 즉, 만들어진 PCR 산물의 DNA 크기가 HBV의 경우 336 bp, HCV의 경우 250 bp, 그리고 HIV의 경우 501 bp로 예상되므로 1.2~1.4% agarose gel을 만들어 전기영동하여 식별하도록 하였다. Mini-agarose gel을 만들어 0.5  $\times$  TAE 완충용액으로 전기영동하기 위하여 100 volt에서 20분간 실시하였다. 이때 각 산물의 크기를

비교 검색하기 위하여 100 bp size marker를 동시에 전기영동하였다.

## 결 과

### 1. Control plasmid DNA에 의한 탐지최저 한계선 확인

본 실험에 사용된 control plasmid DNA는 다음과 같다. pTA-HBsAg DNA 2.7 kb로 HBV S gene 600 bp가 클론되어 있다. 그리고 pTA-HCV DNA의 경우 11.1 kb 크기로서 HCV full-sequence가 클론되어 있다. 그리고 pTA-HIV DNA의 경우 11.2 kb로서 HIV full sequence가 클론되어 있다. 각 plasmid DNA를 일정량 Virus-free 혈청에 넣고 다시 추출하여 정량하여 2배수 또는 10배수로 희석하여 사용하였다.

Fig. 1A에서 HBV cloned DNA를 240 ng/ml 농도에서 3.75 ng/ml까지 희석한 후 1  $\mu$ l를 PCR하였다. 그 결과 7.5

ng/ml의 농도의 DNA 1  $\mu$ l 즉 7.5 pg에서 최소 PCR 산물이 검출되었다. 이 경우 2.7 kb DNA 1  $\mu$ g =  $3.4 \times 10^{11}$  분자수에 해당하므로 (아래 계산식 참조), 7.5 pg의 HBV cloned DNA는  $2.533 \times 10^6$  분자이다. 따라서 혈청 250  $\mu$ l를 원래 사용하여 그의 1/10을 PCR에 사용하여야 하므로 25  $\mu$ l에서  $2.533 \times 10^6$  분자가 쓰이려면 혈청 1,000  $\mu$ l (1 ml)에는 40배가 더 있어야 하므로  $1.0132 \times 10^8$  분자 수로 계산되었다.

Fig. 1B를 보면 HCV cloned DNA를 180 ng/ml에서 2.8 ng/ml까지 희석하여 1  $\mu$ l씩을 PCR하였다. 그 결과 최소 탐지 농도는 5.6 ng/ml에서 나타났다. 이때 HCV cloned DNA의 크기는 약 11.1 kb이므로 1  $\mu$ g의 DNA는  $8.5 \times 10^{10}$  분자 수로 환산하여 (아래 계산식 참조), 5.6 pg의 경우 분자 수는  $4.60 \times 10^5$  분자로 계산되었으며, HBV의 분자 수 계산과 마찬가지로 40배로  $1.84 \times 10^7$  분자 수로 계산되었다.

Fig. 1C에서는 HIV의 cloned DNA를 1300 ng/ml에서부터 20 ng/ml까지 희석하여 1  $\mu$ l씩을 PCR하였다. 그 결과 81 ng/ml 농도에서 그 탐지 최저 농도를 보였다. 따라서 HIV cloned DNA 크기가 11.2 kb이므로 그것의 1  $\mu$ g은  $8.4 \times 10^{10}$  분자에 해당되어 (아래 계산식 참조), 실험에 쓰인 분자 수는  $1.63 \times 10^6$  분자 수로 계산되었다.

따라서  $6.52 \times 10^7$  분자 수가 1 ml에 녹아 있어야 한다.

HBV DNA 2.7 kb 7.5 pg의 분자 수 grams/plasmid 분자 수 =

$$\frac{(\text{DNA 염기 수}) \times (\text{평균 염기쌍 분자 수} = 660 \text{ g/mole})}{\text{Avogadro 수} = 6.022 \times 10^{23} / \text{mol}}$$

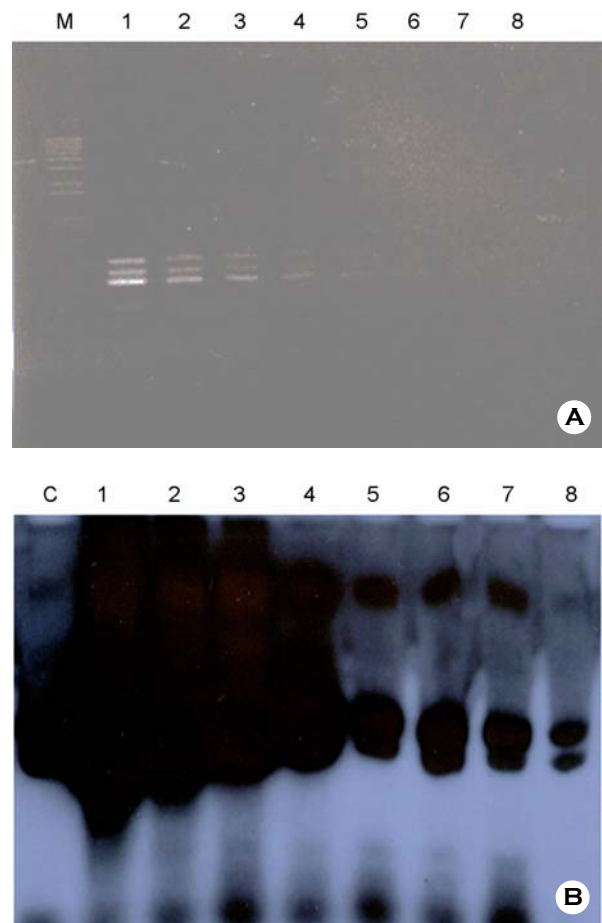
따라서, plasmid 분자 수/ $\mu$ l = (grams/ $\mu$ l)/(grams/plasmid 분자 수에서

$$(2,700) \times (660 \text{ g/mole}) / 6.022 \times 10^{23} / \text{mol} = 2.96 \times 10^{-18}$$

따라서  $7.5 \times 10^{-12} \text{ g} / 2.96 \times 10^{-18} = 2.533 \times 10^6$  분자 수로 계산되었다.

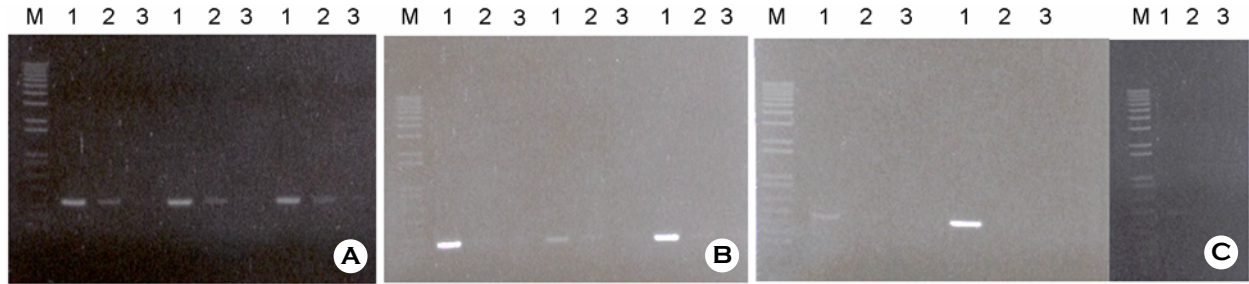
마찬가지로 HCV plasmid DNA와 HIV-1 DNA도 계산하였다. 따라서 HBV에 감염된 혈청을 250  $\mu$ l 추출하여 탐지 가능 분자 수  $2.533 \times 10^6$ 이었다면 혈청 1 ml에는 1,000  $\mu$ l/250  $\mu$ l  $\times 10 \times 2.533 \times 10^6$ 이므로  $1.0132 \times 10^8$  분자는 있어야 탐지되었음을 의미한다. 같은 방법으로 HCV 바이러스의 경우도  $1.84 \times 10^7$  분자가 1 ml에 있어야 탐지될

수 있음을 의미하며, HIV-1의 경우도  $6.52 \times 10^7$  분자 수가 1 ml 혈청 속에 있어야 탐지 가능함을 의미한다. 이 결과는 탐지 기능이 agarose gel 전기영동으로 실시하였기 때문에 탐지 민감도가 자동탐지기를 사용하는 것 또는 labeling 방법에 의한 탐지 민감도보다 훨씬 떨어지는 것으로 보인다. 그러므로 자동탐지 방법과 바이러스 DNA 또는 RNA를 추출하는 방법에 따라 민감도의 차이가 10~100배 정도 낮게 나타나는 것으로서 gel 상의 DNA band를 민감하게 탐지하기가 쉽지는 않다고 사료된다.



**Figure 2.** (A) Detection limit of Multiplex PCR with combination of different plasmid NAs of HBV, HCV, and HIV-1 samples on the 1.4% agarose gel: at the lane 1, HBV (60 ng/ml) plus HCV (45 ng/ml) plus HIV-1 (325 ng/ml) were mixed with 1  $\mu$ l of each into the reaction volume, and lane 2 was used with half of lane 1, lane 3 was used with half of lane 2, and so on; (B) Detection limit of multiplex PCR with labeled with  $^{32}$ P-dTTP was carried on the 5% Polyacrylamide gel: C, positive control; lane 1, 0.1  $\mu$ g/ml of each plasmid DNAs, respectively; lanes 2~8 were used with serial dilution of 10 fold, respectively. The upper bands are shown as HIV-specific DNA (501 bp), middle bands are shown as HBV-specific DNA (336 bp), and lower bands are shown as HCV-specific DNA (250 bp).





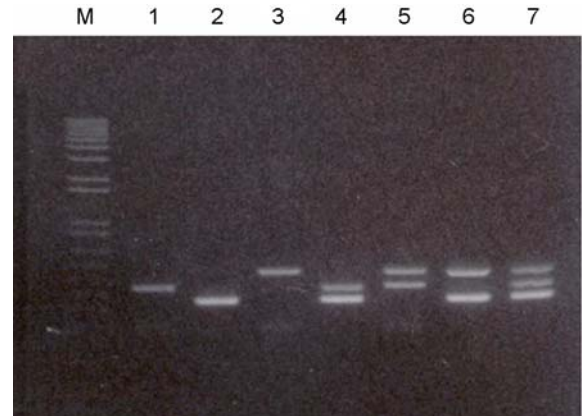
**Figure 3.** Reproducibility of (RT)-PCR methods HBV (A), HCV (B), HIV (C) DNA PCRs were performed three times by three different persons, respectively. 1, higher concentration than detection limit; 2, similar concentration of detection limit; 3, lower concentration than detection limit.

그래서 눈으로 보는 band의 식별에는 한계가 있으나, 동위원소를 표지하면 그 탐지 limit이 훨씬 낮아져 민감도는 높아지리라 사료된다. 따라서 Fig. 2의 (B)에서는 세 가지 plasmid DNA에 대한 multiplex 민감도는 훨씬 높아졌다. 방사성 동위원소  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dTTP 5  $\mu\text{Ci}$ 를 넣어서 세 가지 바이러스 유전자의 증폭 부위에 동위원소를 표지시킨 후 합성된 PCR product를 5% PAGE gel 상에서 검출하였다. HIV-1 DNA의 경우, 0.01 pg, HCV와 HBV의 경우 0.001 pg이 들어간 농도에서부터 검출되지 않았으므로 이를 위에서 계산한 방식으로 계산하였다.

HIV-1 DNA의 경우; 0.01 pg limit에서  $11,200 \text{ bp} \times 660 / 6.022 \times 10^{23} = 1.2275 \times 10^{-17}$ .

따라서  $0.01 \times 10^{-12} / 1.2275 \times 10^{-17} = 8.147 \times 10^2$ . 그러면 1 ml 혈청 속에는  $1,000 \mu\text{l} / 250 \mu\text{l} \times 30 / 3 \times 8.147 \times 10^2 = 3.259 \times 10^4$  분자 수/ml. Agarose gel에서 보다  $6.52 \times 10^7 / 3.259 \times 10^4 =$  약 2,000배 높게 민감도의 차이가 생겼다. HCV DNA의 경우; 0.001 pg limit에서  $11,100 \text{ bp} \times 660 / 6.022 \times 10^{23} = 1.2165 \times 10^{-17}$ . 따라서  $0.001 \times 10^{-12} / 1.2165 \times 10^{-17} = 8.220 \times 10^1$ . 그러면 1 ml 혈청 속에는  $1,000 \mu\text{l} / 250 \mu\text{l} \times 30 / 3 \times 8.220 \times 10^1 = 3.288 \times 10^3$  분자 수/ml. Agarose gel에서 보다  $1.84 \times 10^7 / 3.288 \times 10^3 =$  약 5,600배 높게 민감도의 차이가 생겼다. HBV의 경우; 0.001 pg limit에서  $2700 \text{ bp} \times 660 / 6.022 \times 10^{23} = 2.96 \times 10^{-18}$ . 따라서  $0.001 \times 10^{-12} / 2.96 \times 10^{-18} = 3.378 \times 10^2$ . 그러면 1 ml 혈청 속에는  $1,000 \mu\text{l} / 250 \mu\text{l} \times 30 / 3 \times 3.378 \times 10^2 = 1.3512 \times 10^4$  분자 수/ml. Agarose gel에서 보다  $1.0132 \times 10^8 / 1.3512 \times 10^4 =$  약 7,500배 높게 민감도의 차이가 생겼다.

동위원소로 표지하지 않았을 때 보다  $2 \sim 7 \times 10^3$ 배 이상 민감도가 높게 검출되었다.



**Figure 4.** Multiplex PCR Amplification with each different plasmid DNA template (1, HBV; 2, HCV; 3, HIV-1), with two combined templates (4, HBV + HCV; 5, HBV + HIV-1; 6, HCV + HIV-1), and with three different templates together (7, HBV + HCV + HIV-1).

## 2. 재현성 있는 PCR 방법의 증명

본 연구에서는 탐지 하한 농도보다 높고, 유사하고 그리고 낮은 농도의 DNA 샘플을 이용하여 PCR을 수행하는 경우 각각 실험자의 3회 연속실험에 의해 그리고 3인의 실험자가 1회씩 실험을 수행할 경우 PCR 산물이 재현되고 있는가를 확인하였다. Fig. 3A에서 보여 주는 바와 같이 HBV DNA 주형을 사용하여 3사람이 각각 HBV PCR 테스트를 실시할 경우 336 bp 크기의 PCR 산물이 탐지 한계 또는 그 이상의 높은 DNA 농도에서 검출되었으며, 한계 이하의 주형 농도에서는 검출되지 않았다 (Fig. 3A). 마찬가지로 HCV 및 HIV-1 plasmid DNA 주형에 대해서 3인이 각각 HCV-PCR, HIV-PCR을 수행한 결과 재현성을 보였다 (Fig. 3B와 C). 1인이 3회씩 각각의 실험을 재현한 결과도 방법상의 재현성이 검증되었다.

또한 최저 민감도를 보이는 량보다 높은 량의 plasmid

DNA (HBV, 30 ng/ml; HCV, 180 ng/ml; HIV-1, 1300 ng/ml)를 사용하여 각각의 DNA, 두 개씩 조합으로 되어 있는 DNA, 그리고 세 가지 plasmid DNA가 모두 들어간 plasmid DNA를 multiplex primer를 모두 넣고 PCR하여 확인하였다 (Fig. 4).

### 3. 음성혈청으로 판정된 시료에 대한 특이도 검사

#### 1) ELISA 시험에 의한 검증

20개의 무작위로 선정된 바이러스 free 혈청에 대한 각 바이러스 검출 지표 primer에 대한 특이도 검사는 혈청에서 DNA 또는 RNA 추출 방법으로 추출한 후 이를 주형이 있는 것으로 보고 PCR 및 (RT)-PCR 검사를 각각 수행한 결과, 음성혈청에서는 바이러스가 검출되지 않았으나, 대조군으로 사용한 plasmid DNA가 들어간 샘플에 대해서는 각각의 바이러스 DNA가 검출되었다. 이로써 각 지표 primer는 각 바이러스-특이하게 작용하고 있음이 확인되었다

바이러스 음성인 사람의 혈청 20검체에 대한 무작위 HBV, HCV, HIV ELISA 검사를 시행하여 혈청학적으로 각 바이러스에 대한 음성도를 확인한 후 multiplex PCR에 사용된 방법으로도 음성 결과를 얻는가 확인하였다. HBV ELISA 검사 시약은 SD HBsAg ELISA 3.0을 사용하였고, HCV에 대해서는 SD HCV ELISA 3.0을, HIV에 대해서는 SD HIV 1/2 ELISA 3.0 시약을 사용하였으며, 각 시약의 유효기간은 2006년 12월, 11월, 8월의 것을 사용하였다. ELISA 세척은 Wellwash 4MK2 (Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA)를 사용하였고, 흡광도는 SLP Spectra를 450 nm에서 각각 사용하였다.

결과적으로 음성대조액과 양성대조액 및 검체혈청의 경우 ELISA 및 PCR 결과에 대해 특이적인 검사 결과를 보였다 (Table 2). 본 실험에 사용된 ELISA kit의 민감도는 99.5% 이상, 특이도는 99.9% 이상인 것으로 나타나 있으며, 음성과 양성 판정 cut-off 수치는 kit 제조사 (에스디)에서는 음양성 판정 기준 값 1. HIV 판정 기준 값 = 음성대조액 평균 흡광도 + 0.3 (검체가 판정 기준 값 이상이면 양성, 이하면 음성), 2. HCV 판정 기준 값 = 음성대조액 평균 흡광도 + 0.3 (검체가 판정 기준 값 이상이면 양성, 이하면 음성), 3. HBV 판정 기준 값 = 음성대조액 평균 흡광도 + 0.05 (검체가 판정 기준 값 이상이면 양성, 이하면 음성)으로 판정하였다. 음성대조액 및 양성대조액은 각각 HBV, HCV, 및 HIV가 검출되지 않는 혈청을

**Table 2.** Specificity Tests by RT-PCR using viral-specific primers against non-infected human sera

	HBV 결과		HCV 결과		HIV-1 결과	
	ELISA	PCR	ELISA	PCR	ELISA	PCR
음성대조액 1	0.036	음성	0.020	음성	0.043	음성
음성대조액 2	0.038	음성	0.023	음성	0.041	음성
양성대조액 1	2.748	음성	2.850	음성	2.673	음성
양성대조액 2	2.652	음성	2.871	음성	2.691	음성
검체 1	0.054	음성	0.120	음성	0.049	음성
검체 2	0.054	음성	0.068	음성	0.057	음성
검체 3	0.056	음성	0.094	음성	0.096	음성
검체 4	0.068	음성	0.085	음성	0.056	음성
검체 5	0.064	음성	0.092	음성	0.041	음성
검체 6	0.071	음성	0.085	음성	0.058	음성
검체 7	0.053	음성	0.083	음성	0.064	음성
검체 8	0.054	음성	0.094	음성	0.061	음성
검체 9	0.053	음성	0.100	음성	0.053	음성
검체 10	0.055	음성	0.086	음성	0.058	음성
검체 11	0.061	음성	0.087	음성	0.057	음성
검체 12	0.057	음성	0.093	음성	0.051	음성
검체 13	0.054	음성	0.089	음성	0.065	음성
검체 14	0.054	음성	0.096	음성	0.070	음성
검체 15	0.051	음성	0.106	음성	0.062	음성
검체 16	0.052	음성	0.098	음성	0.058	음성
검체 17	0.053	음성	0.088	음성	0.071	음성
검체 18	0.058	음성	0.079	음성	0.063	음성
검체 19	0.052	음성	0.069	음성	0.054	음성
검체 20	0.056	음성	0.095	음성	0.055	음성

음성대조액으로, 바이러스가 검출되었으나 항체만 남아 있는 혈청을 양성대조액으로 제조된 것을 (주)에스디에서 구입하여 사용하였다. 각 바이러스에 특이적인 지표 primer를 사용하여 혈청 내 특정 바이러스에 대한 검출이 가능해졌다고 본다.

#### 2) PCR 검사에 의한 감염되지 않은 검체의 검증

20가지 혈청에 대한 바이러스 특이-primer를 각각 사용하여 PCR 검사를 수행한 결과 양성대조 plasmid 제조된 HBV, HCV, 및 HIV-1에 대한 PCR은 각각 양성으로 검출되었으나, 무작위 수집된 감염되지 않은 혈청에서는 특이적으로 검출된 바이러스가 없는 PCR 결과를 보



여주었다 (Table 2).

#### 4. HBV, HCV, 및 HIV-1 양성 혈청검체에 대한 단일 PCR 검사

HBV 양성으로 판정되었던 시료를 20검체 수집하였고,

HCV 양성으로 판정되었던 시료 24검체, 그리고 HIV-1 양성검체로 판정되었던 20검체를 수집하여 그들의 보관 상태, 보관기일, 보관 방법, 사용횟수 등이 각각 다르기 때문에 이들에 대한 multiplex-PCR 검사를 수행하기 전에 혈청학적으로 음성과 양성을 확인하려고 각각을 ELISA

**Table 3.** Each sera identified as an infected with each virus were specifically screened by ELISA and (RT)-PCR

	HBV 결과				HCV 결과				HIV-1 결과			
	ELISA *	PCR (그림 7)			ELISA **	PCR (그림 8)			ELISA ***	PCR (그림 9)		
		HBV	HCV	HIV		HBV	HCV	HIV		HBV	HCV	HIV
음성대조액 1	0.056	-	-	-	0.026	-	-	-	0.043	-	-	-
음성대조액 2	0.045	-	-	-	0.022	-	-	-	0.041	-	-	-
양성대조액 1	2.568	-	-	-	2.441	-	-	-	2.776	-	-	-
양성대조액 2	2.527	-	-	-	2.409	-	-	-	2.934	-	-	-
검체 1	2.826	-	-	-	2.516	-	-	-	2.904	-	-	-
검체 2	2.800	양성	-	-	2.841	-	양성	-	2.861	-	-	-
검체 3	2.210	양성	-	-	2.794	-	-	-	2.759	-	-	-
검체 4	2.884	양성	-	-	2.746	-	양성	-	2.884	-	-	-
검체 5	0.475	양성	-	-	2.714	-	-	-	2.884	-	-	-
검체 6	2.842	양성	-	-	2.580	-	-	-	2.673	-	-	-
검체 7	2.735	양성	-	-	2.900	-	-	-	2.858	-	-	-
검체 8	2.331	-	-	-	2.848	-	-	-	2.936	-	-	-
검체 9	2.762	양성	-	-	2.912	-	-	-	2.553	-	-	-
검체 10	1.513	양성	-	-	2.926	-	-	-	2.727	-	-	-
검체 11	2.444	양성	-	-	2.762	-	-	-	2.887	-	-	-
검체 12	2.906	-	-	-	2.492	-	-	-	2.827	-	-	-
검체 13	2.903	양성	-	-	2.685	-	-	-	2.639	-	-	-
검체 14	2.055	-	-	-	2.433	-	양성	-	2.948	-	-	-
검체 15	0.876	-	-	-	2.778	-	-	-	2.830	-	-	-
검체 16	0.811	양성	-	-	1.321	-	-	-	2.738	-	-	-
검체 17	2.294	양성	-	-	2.773	-	-	-	2.973	-	-	-
검체 18	2.581	양성	-	-	2.939	-	-	-	2.909	-	-	-
검체 19	3.138	-	-	-	2.834	-	-	-	2.895	-	-	-
검체 20	2.572	양성	-	-	2.900	-	-	-	2.621	-	-	-
검체 21	0.054	-	-	-	2.407	-	양성	-	0.056	-	-	-
검체 22	0.054	-	-	-	2.931	-	-	-	0.070	-	-	-
검체 23	0.056	-	-	-	3.075	-	양성	-	0.042	-	-	-
검체 24	0.068	-	-	-	2.145	-	-	-	0.087	-	-	-

ELISA 음양성 판정 기준 값: \*HBV 양성판정 기준 값=0.1이상, \*\*HCV 양성판정 기준 값=0.324, \*\*\*HIV-1 양성판정 기준 값=0.342



**Figure 5.** Twenty different sera positively diagnosed by ELISA tests were amplified by multiplex PCR with 6 different primers: M, 100 bp marker; NC, negative control sera without any template DNA; C, three different plasmid DNAs such as HBV (A), HCV (B), HIV-1 (C), were amplified by same PCR for the control; each other lane is shown as each different sera samples amplified by multiplex PCR methods.

테스트로 검증하였다 (Table 3). 참고로 kit 제조사에서 제시한 판정 기준 값은 (1) HIV 판정 기준 값=음성대조액 평균 흡광도+0.3 (검체가 판정 기준 값 이상이면 양성, 이하면 음성), (2) HCV 판정 기준 값=음성대조액 평균 흡광도+0.3 (검체가 판정 기준 값 이상이면 양성, 이하면 음성), (3) HBV 판정 기준 값=음성대조액 평균 흡광도+0.05 (검체가 판정 기준 값 이상이면 양성, 이하면 음성)으로 판정하였다. 따라서 HBV 양성 판정 기준 값은  $0.05 + 0.05 = 0.100$ , HCV 양성 판정 기준 값은  $0.3 + 0.024 = 0.324$ , 또한 HIV-1의 양성 판정 기준 값은  $0.3 + 0.042 = 0.342$  이상의 것으로 하였다.

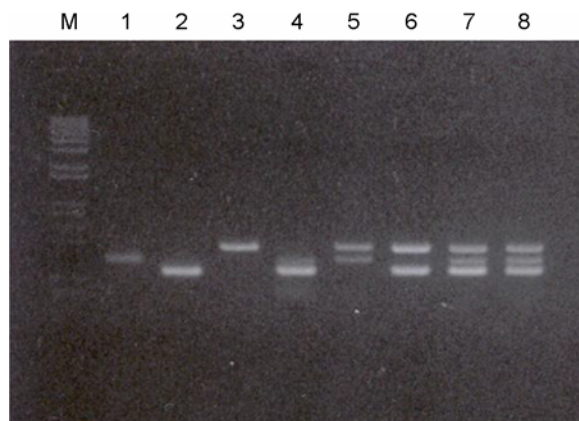
혈청학적 양성 판정이 내려진 검체에 대해서 각 바이러스에 특이한 지표 primer를 사용하여 단일 PCR 및 RT-PCR 검사를 수행하였더니, HBV 감염검체에 대해서는 Fig. 5A, HCV 감염검체에 대해서는 Fig. 5B, 그리고 HIV-1에 대해서는 Fig. 5C로 나타난 바와 같았다. 이에

대한 종합된 결과는 Table 3에 나타내었다.

결과적으로 혈청학적 HBV 양성 20검체 중에서 14검체가 PCR 검사로도 양성검체로 확인되었으며, 혈청학적 HCV 양성 24검체에서 multiplex PCR 방법으로 5검체가 양성으로 판정되었고, HIV-1의 경우 혈청학적 양성 20검체에서 multiplex PCR 검사로 양성검체는 하나도 나오지 않았다 (Fig. 5).

#### 5. HBV, HCV 및 HIV-1의 각 양성 혈청검체에 대한 multiplex-PCR 검사

한 개인의 혈액 시료에서 세 가지 바이러스가 동시에 감염된 케이스가 드물고 시료를 수집하기가 어려워 각 개별 바이러스에 감염된 것이 단일 PCR 증폭 방법으로 확인된 경우, 이들을 조합하여 세 가지 바이러스에 감염된 것으로 보고 본 연구에서 확립된 multiplex PCR 방법을 확인하기 위하여 nested RT-PCR 및 multiplex PCR 방



**Figure 6.** Confirmation of the multiplex (RT)-PCR in one tube. Multiplex-PCR were performed with HBV-, HCV-positive sera, and sera containing HIV-1 plasmid DNA: Multiplex-PCR were performed with HBV-, HCV-positive sera, and HIV-1 plasmid: M, 100 bp size marker DNAs; lane 1, HBV-specific primer; lane 2, HCV-specific primer; lane 3, HIV-1 specific primer with HIV-1 plasmid DNA; lane 4, HBV and HCV specific primers; lane 5, HBV and HIV-1 specific primers; lane 6, HCV and HIV-1 specific primers; lanes 7 and 8, HBV, HCV, and HIV-1 specific primers were used, respectively. HBV sample number 10, HCV sample number 2 were used in the reaction. And also 1  $\mu$ l of 1  $\mu$ g/ml HIV-1 plasmid DNA was added into reaction

법으로 증폭하여 agarose gel 상에서 전기영동하였다.

Fig. 6에서 보여 주는 바와 같이, HBV HCV 및 HIV-1 검체들의 단일 PCR 검사와 HBV와 HCV, HBV와 HIV-1, HCV와 HIV-1, 그리고 HBV, HCV, HIV-1 모두 들어 있는 시료를 조합하여 multiplex-PCR 검사를 수행하여 본 방법을 검증하여 보았다. 예외적으로 HIV-1 검사 시료에서 RT-PCR 양성검체가 하나도 나오지 않은 관계로 이들 실험에서는 HIV-1 plasmid DNA 시료를 넣어서 수행할 수밖에 없었다. 결과적으로 제시된 multiplex-PCR 방법으로 혈액 관련 혈청시료에서 세 가지 위해 바이러스 HBV, HCV, HIV-1를 한 번에 검출이 가능한 것으로 판단된다.

## 고 찰

본 연구에서는 궁극적으로 혈청, 혈장 또는 혈액제제 속에 감염되었거나 오염되었을지도 모르는 HBV, HCV, 및 HIV를 동시에 검출해낼 수 있는 (RT)-PCR 증폭 방법 및 간편한 탐지 방법의 조건을 확립하기 위하여 먼저 각 바이러스의 consensus sequence에서 primer 지표를 선정하였다. 각 바이러스에 특이적인 sequence를 가진 지표를 선정하는데 있어서 첫 번째 고려사항은 서로 다른 sub-

type 바이러스에 대해서도 인식될 수 있는 primer sequence가 되도록 하였다. HBV에 대한 primer는 middle surface antigen 유전자에서 가장 conserved region에서 선별하였으며, HCV의 경우 5'-terminal 근처의 non-translated region에 있는 conserved region을 선별하였고, HIV의 경우 LTR 내에서 가장 conserved region의 sequence를 PCR primer로 선별하였으며, 특히 RNA 바이러스인 HCV와 HIV의 경우 추출된 RNA에 직접 RT-PCR 반응을 할 경우 민감도가 떨어지는 예비실험 결과 민감도를 높이기 위하여 정해진 primer sequence 바깥쪽에서 제2의 primer를 선별하여 nested-RT-PCR 방법을 사용하였다. 두 번째 고려사항은 각 primer 세트에 의해 증폭된 PCR 산물의 크기가 서로 달라서 서로 다른 바이러스를 쉽게 식별할 수 있도록 forward primer와 backward primer 간의 간격을 조정하였다. 세 번째 고려사항은 각 바이러스에 대한 primer들 간의 염기서열에 non-homologous해야 하는 점이었다. Multiplex PCR 사용 시 6개 primer sequence들이 한 번에 들어가기 때문에 서로간의 inter-base pairing이 없어야 하며, 다른 바이러스주형에 대해서 경쟁력이 매우 낮아야 특이도가 높게 나타날 것으로 판단되었다. 실제로 multiplexed PCR 산물을 agarose gel 상에서 전기영동해 보면 단일 PCR 산물보다 감수성이 낮아지는 현상을 볼 수 있었다. 특히, RNA 바이러스 유전체와 DNA 바이러스 유전체를 주형으로 사용하여 동시에 검출하는 경우 RNA 주형은 역전사과정을 거치기 때문에 주형-간 또는 주형-내에서의 변이가 높게 나와 한쪽 주형 감도가 떨어진다는 보고도 있다 (5). 따라서 HCV와 HIV 주형 간에 경쟁적이어서 HIV-1 PCR 산물이 HCV의 PCR 산물보다 약간 지연되어 나타난다는 것이다.

Multiplex PCR 전체과정은 바이러스 유전체 과정과 증폭과정, 그리고 탐지과정에 많은 시간과 노력이 요구되지만 (7), 본 연구에서는 추출과 증폭과정 후 agarose gel 전기영동에서 탐지하도록 하였으므로 간편하고 용이할 수 있다. 그렇지만 agarose gel 전기영동분석 시에 오염된 결과를 가져오는 문제 등이 발생할 수도 있다. 이러한 문제점은 real-time PCR 방법으로 해결할 수 있으나 고가 장비와 시간이 필요하다. 또한 본 연구에서는 PCR 산물의 DNA가 전기영동 상에서 분석되기 때문에 control로서 각 바이러스 유전자가 클론되어 있는 plasmid DNA에서 PCR한 산물을 positive control로서 100 bp size marker DNA와 함께 전기영동하여 식별하였다.

확립된 (RT)-PCR 방법에 대한 민감도를 확인하기 위하여 HBV, HCV, 및 HIV-1 유전물질이 클로닝된 plasmid DNA template를 각각 사용하여 사용된 PCR 방법에 대한 탐지한계선을 copy 수로 확인하였다. 본 연구에서는 miniprep 방법으로 상당히 정제된 plasmid DNA를 주형으로 사용하였으나, Gobbers 등 (11)은 plasmid DNA 또는 혈액 시료에서의 viral DNA template 정제 방법 (extraction)에 따라 PCR 민감도에 차이가 있음을 보고하였다. HBV DNA의 경우 표준회석 배수에 따라 약간의 차이는 있었으나, 80℃에서의 열처리와 QIAamp extraction 방식으로 100~900 geq/ml 농도의 주형까지 탐지 가능 범위를 보였다. 그리고 추출 시작 시료의 양이 0.1 ml일 때보다 1.0 ml일 때 민감도의 수치가 10배 정도 높게 나왔다는 보고가 있다 (4,6). 본 연구 결과를 보면, 최저 측정 가능 plasmid DNA량은 HBV의 경우, single PCR 반응에서  $1.0132 \times 10^8$  분자 수/ml, HCV의 경우,  $1.84 \times 10^7$  분자 수/ml, HIV의 경우  $6.52 \times 10^7$  분자 수/ml의 민감도로 나타났다. Meng 등 (15)의 결과를 보면, 혈액 내 HBV의 경우 22~60 copy/ml, HCV의 경우 61~112 IU/ml, HIV-1의 경우 33~66 copy/ml로 나타났는데, 이는 시료 0.2 ml을 추출하여 얻은 결과로 계산된 것이었다. 그러나 방사성 동위원소로 표지된 PCR 산물을 5% PAGE gel 상에서 검출해 본 결과, HIV-1 plasmid DNA의 경우,  $3.259 \times 10^4$  분자 수/ml에서 최저 탐지 선으로 계산되었고, 그 보다 10배 희석된 농도에서는 탐지되지 않은 결과를 얻었으며, HCV plasmid DNA의 경우  $3.288 \times 10^3$  분자 수/ml에서 최저 농도로 탐지되었고, HBV의 DNA가 들어간 multiplex PCR 실험에서  $1.3512 \times 10^4$  분자 수/ml에서 최저 탐지 농도의 민감도를 보였다. 결과적으로 labeling되지 않은 PCR product를 agarose gel 상에서 ethidium bromide로 염색된 상태에서의 탐지에서 보다 동위원소를 1  $\mu$ Ci 정도를 넣고 labeling시키면 민감도가 훨씬 높게 탐지될 것으로 사료된다.

전형적인 NAT 방법은 (가) 시료 속의 RNA 또는 DNA 주형을 준비하고 (나) 지표 primer가 특이지역 또는 주형을 증폭해야 하고, (다) 여러 탐지 방법으로 양성과 음성 시료임을 판정해야 한다. 시료 속의 RNA 또는 DNA를 추출하는 방법은 QIAamp 추출액, RNAzol 등이 사용되어 상당히 깨끗한 RNA 또는 DNA로 추출이 용이해졌다. 또한 PCR 검사 시 특이 바이러스 염기서열을 표적으로 하는 지표 primer 선정이 많이 개발되어 왔다 (16,

18). Primer 선정의 정확성에 따라 PCR 증폭 시 민감도와 특이도가 높아지거나 낮아진다. 따라서 본 실험에서도 virus-free serum속에서 추출된 대조군으로 사용된 plasmid DNA 주형에 대한 각 지표 primer의 특이성을 검사하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 각 바이러스에 대한 primer들이 각 특이 바이러스 주형에 대해서만 PCR 반응을 보이고 다른 바이러스 주형에 대해서는 PCR 반응이 음성으로 나타났다. 이러한 특이성을 보이는 지표 primer들도 실제 임상 시료에 사용할 경우 primer의 복잡성과 DNA 또는 RNA 시료 준비과정과 정제과정이 일관성 있고 깨끗하게 수행되어야 신뢰할 만한 측정값이 가능하다. 보통은 실험실의 상태, 실험자의 기술적인 차이에 의한 오류 및 PCR 실행 방법의 오류 등에 의한 위양성 또는 위음성 결과가 나타날 수 있다. 이러한 오류의 가능성을 검증하기 위해서 재현성 검사를 실시하였다. 클로닝된 plasmid DNA template를 사용하여 탐지한계선 실험 결과의 최저 탐지 가능 이하의 template copy 수와 탐지 가능 주형의 copy 수 그리고 그보다 10배 정도 높은 농도의 주형 copy 수를 사용하여 1인의 실험자가 연속하여 2~3회 테스트 하였으며, 또한 3인의 실험자가 각각 1회씩의 테스트를 실시하여 재현성 검사를 실시하였다. 그 결과는 Fig. 5에서 각각 확인하였는데, 실험 방법에 대한 재현성은 검증되었다.

임상적으로 ELISA 또는 NAT 검사에서 HBV, HCV, 및 HIV-1 양성으로 판명된 혈액 시료를 수집하여 개별 시료에 대한 각 바이러스 항원 및 항체진단 방법으로 혈청학적인 검사를 우선 실시하였다. 이는 수집된 시료의 신선도 및 보관 상태에 따라 바이러스 음양성이 변할 수도 있으며, 혈청학적인 검사 결과와 NAT 검사 결과의 상이점에 대한 논의가 필요할지도 모르기 때문이었다. 실제로 각 바이러스에 감염된 시료를 수집하기가 매우 어려움이 있었고, 대개는 혈액 시료의 경우 신선한 상태에서 혈청검사 또는 NAT 검사가 이루어져야 정확한 결과를 분석할 수 있는데 비해, 본 실험에 사용된 시료들은 신선한 시료를 즉시 수집하기가 어려웠었다. 그래서 수집된 HBV, HCV, 및 HIV-1 양성검체들을 항원진단 ELISA 또는 항체진단 ELISA 검사를 병행하여 본 연구의 PCR 검사의 결과 분석에 중요한 자료로 사용하였다.

본 연구에서 사용된 혈액 시료들이 이미 오랫동안 보관되었던 시료들이 대부분이어서 특히 RNA 바이러스 시료의 경우 그로 인한 결과가 음성으로 판정되기도 할 수

있으며, 또한 바이러스의 시료 내 load 양이 너무 낮아서 본 연구에서 제시한 agarose gel 상에서의 탐지 민감도에 육안으로 보이지 않을 확률도 배제할 수는 없다고 보았다. 그렇지만 본 연구에서 제시된 multiplex-PCR 방법으로 검출되는 product를 민감한 탐지기에서 탐지하도록 방사선 동위원소로 labeling 하든지, 비방사성 labeling 물질로 표지하여 검출한다면 그 측정 민감도는 상당히 높아지리라 생각한다. 또한 혈청학적으로 anti-HIV-1 Ab가 측정되는 혈청에서도 본 multiplex PCR 측정법으로 양성 결과를 얻기 어려웠던 것은 수집된 HIV 양성혈청이 대부분 항-바이러스 제제를 복용해오던 병원 내원 환자의 혈청이어서 NAT 음성 결과를 보였다고 생각된다.

Multiplex (RT)-PCR 탐지 방법은 궁극적으로 사람의 혈장이나 혈청에서 HBV, HCV, 및 HIV를 동시에 탐지하고, 식별 또는 정량하려는 것이다. 실제로는 하나의 바이러스에 감염된 경우가 대부분으로서 그 바이러스의 유전물질 증폭실험은 다른 두 바이러스의 유전물질에 의해 동시에 영향을 미치지 않는다는. 그렇지만 다른 두 바이러스를 증폭하려고 동시에 들어간 primer들이 실제로 존재하는 하나의 바이러스 유전물질의 증폭을 방해하지 않아야 하므로 지표로 사용되는 primer의 제작이 서로 간섭되는 유사한 염기서열의 부분이 있어서는 안 된다. 또한 본 연구에서 결정된 세 바이러스의 primer들은 각 바이러스의 subtype에도 annealing 될 수 있는 지역의 conserved region에서 primer 염기서열이 결정된 것이다. HBV primer는 HBsAg region에서 선택되었으며, HCV의 primer는 HCV의 non-coding region에서 선별된 염기서열이었으며, HIV의 경우 비교적 conserved region인 LTR region에서 primer 염기서열이 결정된 것이었다. 이러한 바이러스 감염에 대한 일반인의 혈액 내 바이러스 감염 지표로서 병의 징후와 진행 상황을 탐지하는데 사용되었다 (28). 그리고 각 바이러스 forward primer와 reverse primer 간의 거리는 HBV의 경우 336 base pair 길이로, HCV는 250 base pair의 길이로, 그리고 HIV의 경우는 501 base pair의 길이로 PCR product가 생성되도록 고안되었다.

이와 같은 multiplex NAT 개발은 원칙적으로 각 바이러스의 표적유전체가 서로 다르고 서로 다른 효소와 이온 농도가 요구되므로 실제로 얻어지는 산물의 민감도에 문제가 발생할 수 있다. 이러한 어려움을 극복하고 multiplex PCR을 개발하려면 사용하는 시약들에 대한 최적화 실험이 필수적이다. 그리고 기존에 나와 있는 multi-

plex PCR의 경우 대부분 RT를 역전사반응을 먼저 하고 다음에 PCR을 해야 하지만, 본 연구에서의 multiplex는 PCR은 one-step reaction 방식으로 진행하였다. 이는 실제 수많은 혈액에서의 샘플을 탐지하려 할 때 노력과 시간을 줄일 수 있어야 하고, 대부분의 multiplex PCR 방식은 생성물을 탐지해야 하는 값 비싼 도구가 요구되지만, 본 연구에서는 기존 실험실에서 많이 사용하는 agarose gel 전기영동법으로 탐지하고 식별하는 방식을 채택하였다. 그러나 동위원소를 labeling하여 탐지할 경우 PCR product를 agarose gel에서 running하여 gel을 건조시키고 X-ray film에서 autoradiography까지 해야 하는데, 이때 agarose gel보다 polyacrylamide gel을 사용하는 것이 훨씬 좋다고 본다. HCV와 HIV 증폭 사이의 경쟁은 동시에 두 바이러스 유전물질을 주형으로 사용할 경우 감소된다는 보고가 있다 (5). 이러한 경우 multiplex real-time quantitative RT-PCR assay 방법으로 생성된 두 가지 생성물을 계산하는 것이 좋을 것이다. 정제된 plasmid DNA 샘플에 의한 단일 및 이중 PCR 산물의 경우 잘 검출될 수 있었지만, 실제 혈청 속의 바이러스 주형 농도가 크게 미치지 못하게 될 경우 민감도의 차이로 인하여 agarose gel 상에서 검출되지 못하는 경우도 생각해볼 수 있을 것이다. 이러한 경우 RT-PCR의 단계에서 RT 반응 횟수를 1회에서 3~5회 정도 높여서 RT에 의한 DNA 농도를 높이면 문제를 해결할 가능성이 있었다 (20).

결과적으로 적은 양의 혈액제제에서 위해요소 바이러스 검출이 multiplex-PCR로 가능하였다. 다만 탐지기를 agarose gel 상에서 육안으로 합성된 각 바이러스에 특이한 크기의 DNA band를 확인하기 때문에 민감도에서 다소 떨어졌지만, 동위원소로 labeling하여 autoradiography를 이용할 경우 탐지 가능 범위가 훨씬 높아져 민감도가 높은 결과를 얻게 되었다. 그 밖에 방사선 동위원소, 또는 특정한 형광물질을 가진 dye를 합성되는 PCR 산물에 표지시켜 탐지기 또는 scintillation counter 등에 사용하면 짧은 시간 내에 민감도가 훨씬 높은 결과를 확인할 수 있을 것으로 본다. Real-time multiplex PCR 방법에 의한 탐지 가능한 민감도를 측정된 여러 보고서를 보면 평균적으로  $10^3 \sim 10^4$  copies/reaction에서 측정치가 보고되었다 (5). 이는 본 연구에서의 방사성 동위원소 labeling법으로 계산된 민감도와 큰 차이는 없다는 것으로 사료된다.

혈청 시료에서 추출된 바이러스 유전물질을 template로 multiplex PCR을 수행한 결과, HBV 및 HCV의 경우

비교적 NAT 시험법이 정확도 및 seroconversion 시기의 탐지도가 안정적이었지만, HIV-1의 경우 혈청학적 항체 검사 결과와 NAT 검사가 일치하지 않는 경우가 대부분이었다. 그 이유로는 병원에서 검사받은 에이즈 환자의 혈청은 대개가 항-바이러스 제제의 복용으로 일시적 또는 잠재적 항원 수치가 크게 떨어져 있어서 NAT 검사로 양성을 보이지 않고 있다는 생각이다. 또한 본 연구에서 사용한 HIV-1 cDNA가 클론된 plasmid DNA를 template로 하였을 경우에도 민감도에 있어서 다른 바이러스 HBV 또는 HCV plasmid 주형에서 보다 약간 떨어지고 있음을 알 수 있었다.

결과적으로 agarose gel 상에서 증폭된 PCR의 DNA band를 육안으로 식별해서 음양성을 판정해야 하는 방법은 민감도에서 크게 떨어지고, 이를 보정하기 위해 방사성 동위원소를 labeling하여 사용할 경우 민감도가 크게 개선되는 결과를 보였다. 따라서 민감도를 높이는 문제는 더 많은 연구가 필요하다고 본다.

#### 감사의 글

성빈센트병원 감염내과의 위 성헌 박사, 그리고 서울 아산병원 소화기내과의 정 영화 박사 등의 아낌없는 시료 제공에 깊은 감사를 드린다.

#### 참 고 문 헌

- 1) Allain J-P, Hewitt PE, Tedder RS, Williamson LM: Evidence that anti-HBc but not HBV DNA testing may prevent some HBV transmission by transfusion. *Br J Hematol* **107**: 186-195, 1999.
- 2) Biswas R, Tabor E, Hsia CC, Wright DJ, Laycock ME, Fiebig EW, Peddada I, Smith R, Schreiber GB, Epstein JS, Nemo GJ, Busch MP: Comparative sensitivity of HBV NATs and HBsAg assays for detection of acute HBV infection. *Transfusion* **43**: 788-798, 2003.
- 3) Candotti D, Adu-Darkodie, Y, Davies F, Baldrich-Rubio E, Strirups F, Lee H, Allain J-P: AIDS in an HIV-seronegative Ghanaian women with intersubtype A/G recombinant HIV-1 infection. *J Med Virol* **62**: 1-8, 2000.
- 4) Candotti D, Sarkodie F, Allain J-P: Frequent recovery and broad genotype 2 diversity characterize HCV infection in Ghana, West Africa. *J Virol* **77**: 7914-7923, 2003.
- 5) Candotti D, Temple J, Owusu-Ofori S, Allain J-P: Multiplex real-time quantitative RT-PCR assay for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus type 1. *J of Virol Methods* **118**: 39-47, 2004.
- 6) Cuypers HTM, van Dijk R, Viret J-P, Schottstedt V, Lankinen M, Da Silba Cardoso M, Lelie PN: European multi-centre validation study of NucliSens Extractor in combination with HCV Amplicor 2.0 assay for HCV-NAT screening of plasma pools. *Biologicals* **27**: 303-314, 1999.
- 7) Defoort J-P, Marin M, Casano M, Prato S, Camilla C, Fert V: Simultaneous detection of multiplex-amplified HIV-1 RNA, HCV RNA, and HBV DNA using a flow cytometer microsphere-based hybridization assay. *J Clinical Microbiol* **38**: 1066-1071, 2000.
- 8) Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE: Multiplex PCR optimization and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiol Rev* **13**: 559-570, 2000.
- 9) FDA: Guideline for the manufacture of in vitro diagnostic products. 1994.
- 10) Giachetti C, Linnen JM, Kolk DP, Dockter J, Gillotte-Taylor K, Park M, Ho M, McCormick MK, Minnes LT, McDonough ST: Highly sensitive multiplex assay for detection of HIV-1 and HCV RNA. *J Clinical Microbiol* **40**: 2408-2419, 2002.
- 11) Gobbers E, Oosterlaken TAM, van Bussel MJA, Melsert R, Kroes ACM, Class ECJ: Efficient extraction of virus DNA by Nuclisens extractor allows sensitive detection of HBV virus by PCR. *J of Clinical Microbiol* **39**(12): 4339-43, 2001.
- 12) Jackson BR, Busch MP, Stramer SL, AuBuchon JP: The cost-effectiveness of NAT for HIV, HCV, and HBV in whole blood donations. *Transfusion* **43**: 721-729, 2003.
- 13) Kolk DP, Dockter J, Linnen J, Ho-Sing-Loy M, Gillotte-Taylor K, McDonough SH, Mimms L, Giachetti C: Significant closure of the human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus preseroconversion detection windows with a transcription-mediated-amplification-driven assay. *J Clin Microbiol* **40**(5): 1761-6, 2002.
- 14) Linnen J, Broulik A, Umali A, Kolk D, Dockter J, McDonough S, Mimms L, Giachetti C: Analytical sensitivity of the TMA-based Procleix Ultrio assay and effect of assay sensitivity on closing the HBV detection window. *Transfusion* **42**: 8S, 2002.
- 15) Meng Q, Wong C, Rangachari A, Tamatsukuri S, Sasaki M, Fiss E, Cheng L, Ramankutty T, Clarke D, Yawata H,



- Sakakura Y, Hirose T, Impraime C: Automated Multiplex assay system for simultaneous detection of HBV DNA, HCV RNA, HIV-1 RNA. *J of Clinical Microbiol* **39(8)**: 2937-45, 2001.
- 16) Mercier B, Burlot L, Ferec C: Simultaneous screening for HBV DNA and HCV RNA genomes in blood donations using a novel TaqMan PCR assay. *J Virol Methods* **77**: 1-9, 1999.
- 17) Mine H, Emura H, Miyamoto M, Tomono T, Minegishi K, Murokaa H, Yamanak R, Yoshikawa A, Nishioka K, Japanese red Cross NAT Research Group: High throughput screening of 16 million serologically negative blood donors for HBV, HCV, HIV-1 by NAT testing with specific and sensitive multiplex reagent in Japan. *J of Virol Methods* **112**: 145-151.
- 18) Miyachi H, Masukawa A, Ohshima T, Hirose T, Impraime C, Ando Y: Automated specific capture of HCV RNA with probes and paramagnetic separation. *J of Clinical Microbiol* **38**: 18-21, 2003, 2000.
- 19) Ohnuma H, Tanaka T, Yoshikawa A, Murokawa H, Minegishi K, Yamanaka R, Lizuka HY, Miyamoto M, Satoh S, Nakahira S, Tomono T, Murozuka T, Takeda Y, Doi Y, Mine H, Yokoyama S, Hirose T, Nishioka K; Japanese Red Cross NAT Screening Research Group. The first large-scale nucleic acid amplification testing (NAT) of donated blood using multiplex reagent for simultaneous detection of HBV, HCV, and HIV-1 and significance of NAT for HBV. *Microbial Immunol* **45(9)**: 667-672, 2001.
- 20) Polz ME, Cavanaugh CM: Bias in template-to product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3724-3730, 1998.
- 21) Roth WK, Weber M, Seifried E: Feasibility and efficacy of routine PCR screening of blood donations for HCV, HBV, and HIV-1 in a blood-bank setting. *Lancet* **353**: 359-363, 1999.
- 22) Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ: The risk of transfusion-transmitted viral infection. The retrovirus epidemiology donor study. *New Eng J Med* **334**: 1685-1690, 1996.
- 23) Soldan K, Barbara JA, Ramsey ME, Hall AJ: Estimation of the risk of HBV, HCV and HIV infectious donations entering the blood supply in England. *Vox Sang* **84**: 274-286, 2003.
- 24) Stramer SL, Waldman KT, Brodsky P, Davis JT: Comparison of HIV-1/HCV nucleic acid test reactivities of diluted and undiluted donations. *Transfusion* **40**: S94-040A, 2000.
- 25) Vet JA, Majithia AR, Marras SAE, Tyagi S, Dube S, Poiesz BJ, Kramer FR: Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using molecular beacons. *PNAS USA* **96**: 6394-6399, 1999.
- 26) Weinberger KM, Widenmann E, Bohm S, Jilg W: Sensitive and accurate quantitation of HBV DNA using kinetic fluorescence detection system (TaqMan PCR). *J Virol Methods* **85**: 75-82, 2000.
- 27) Widell A, Edmund H, Persson MH, Jonsson M: Transmission of HCV via both erythrocyte and platelet transfusions from a single donor in serological window-phase of HCV. *Vox Sang* **71**: 55-57, 1966.
- 28) Yates S, Penning M, Goudsmit J, Frantzen I, Weije B, Strijp D, Gemen B: Quantitative detection of HBV DNA by real-time NA sequence-based amplification with molecular Beacon detection. *J of Clinical Microbiol* **39**: 3656-3665, 2001.