

Development of UPSR Primer Design Program for Efficient Detection of Viruses

So Young Jang¹, Hyung Woo Yoon², Sung Ae Oh³, Keon Myung Lee^{3,4} and Chan Hee Lee^{1,3*}

¹Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk, Korea,

²Department of Clinical Pathology, Juseong College, Nesu-eup, Chungbuk, Korea,

³Department of Bioinformation Technique and ⁴School of Computer Science and Engineering, Chungbuk National University

Received : November 3, 2008

Revised : December 12, 2008

Accepted : December 12, 2008

PCR is a rapid and sensitive method for detection of viruses from clinical samples and good primers are essential for successful PCR. However, high mutation rate of viral genomes often results in failure in detecting viruses, and there have been attempts to develop primers from multiple viral sequences. Thus, we developed a program called Universal Primers Score Ranking (UPSR) which generates primers from multiple sequences and ranks the quality of primers automatically. The feasibility of the UPSR program was tested using hepatitis B viruses (HBV) isolated from Korean patients. UPSR generated primer candidates with quality score ranks according to two T_m values. We found that T_{m2} values calculated based on the thermodynamics of nearest neighboring bases were better correlated with actual detection rate of HBV from patients' sera. The primer with number 1 rank by T_{m2} values detected more samples than any other primers designed by UPSR, commercial primer, or other reference primers suggested by previous literatures. Thus, UPSR proved to be easy and useful to design primers from multiples sequences in detecting viruses.

Key Words: UPSR program, Hepatitis B Virus, PCR

서 론

수혈을 필요로 하는 사람들에게 혈액 및 혈액제제에서의 병원성 미생물의 오염은 치명적인 결과를 유발한다. 현재 우리나라에서는 헌혈 후 혈액에서 B형 간염바이러스, C형 간염바이러스, AIDS의 병원체인 HIV, 그리고 매독균의 오염여부를 검사하게 되어 있다. 이들 병원체는 항원-항체 반응에 기초한 방법으로 검사하고 있으나, 민

감도가 떨어지고, 특히 감염 직후 항체가 생성되기 전 즉, 잠복기 기간에는 바이러스 오염여부를 검출할 수 없는 문제점을 가지고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 기존의 항원-항체 반응보다 뛰어난 검사방법 중의 하나인 유전자 증폭기술인 nucleic acid amplification technique (NAT)의 대표적인 polymerase chain reaction (PCR) 방법은 민감성과 특이성이 높아 바이러스 입자내의 DNA 또는 RNA를 검사하는 방법으로 제시되고 있다 (3,6,13,18,19).

PCR 방법을 사용하여 혈액 및 혈액제제에서 바이러스들을 검출하기 위해서는 좋은 품질의 프라이머 (primer)의 설계가 필요하다. 하지만 수많은 분리주를 가지는 바이러스를 검출할 수 있는 프라이머를 설계하기 위해서는 분리주 핵산 염기서열들로부터 공통프라이머 (universal primer)의 설계가 필요하며 때때로 수많은 공통프라이머가 설계되어진다. 현재 한 개의 바이러스 서열로부터 프

*Corresponding author: Chan Hee Lee. 410 Seongbong-Ro, Heungduk-Gu, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea. Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Chungbuk National University.
Phone: +82-43-261-2304, Fax: +82-43-273-2451
e-mail: chlee@cbu.ac.kr

**"This work was supported by the grant of the Korean Ministry of Education, Science and Technology" (The Regional Core Research Program/Chungbuk BIT Research-Oriented University Consortium).

라이머를 설계하는 프로그램으로는 Primer3나 이를 개선한 여러 프로그램이 있어 많은 사람들이 사용하고 있지만 (4,9,14,17), 수십 수백 개의 다중 바이러스 핵산 서열로부터 공통적인 프라이머를 설계하는 프로그램은 일반적으로 제공되지 않고 있다. 또한 인터넷상에서 제공하는 프라이머 설계프로그램을 사용하는 데는 다음과 같은 문제점이 있다. 1) 인터넷상의 프라이머 설계프로그램은 하나의 핵산 염기서열에 대한 프라이머만 제공하며 프로그램이 공개되지 않기 때문에 여러 개의 바이러스 서열을 통한 공통프라이머 설계프로그램으로 사용할 수 없다. 2) 인터넷상의 프라이머 설계프로그램에서 요구하는 초기 입력조건 데이터를 모두 정확하게 이해하고 결정하기가 어려워 PCR에 부적합한 프라이머가 다수 설계된다. 3) 하나의 핵산 염기서열에 대해 설계된 수많은 프라이머 (수십 개에서 수천 개)의 품질 값이 제공되지 않기 때문에 프라이머들의 품질을 비교할 수 없어 가장 좋은 품질의 프라이머를 찾기 위해서는 모든 프라이머들을 실험해야 하는 어려움이 발생한다.

본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하기 위해 수십 개의 분리주 또는 바이러스를 동시에 검출할 수 있는 PCR용 공통프라이머를 설계하고 수많은 공통프라이머 중에서 PCR 증폭효율이 가장 높은, 즉 품질 값이 가장 높은 순서대로 품질 순위를 단시간 내에 제공하는 Universal Primers Score Ranking (UPSR) 프로그램을 소개하고, 이 프로그램에 의해 B형 간염바이러스 (hepatitis B virus; HBV)를 검출한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. UPSR 프로그램 개발

UPSR 프로그램은 프라이머의 1차 구조, 헤어핀 구조, 다이머 형성, degeneracy 값 등을 감안하여 다중의 염기서열로부터 가능한 모든 프라이머를 제시하도록 설계하였다. 이 때 제시된 프라이머의 수는 매우 많기 때문에 적절한 여과 장치가 필요한데, 이러한 여과 장치를 통하여 프라이머의 품질 값을 계산하도록 하였고, 이에 따른 상위 품질 값을 가지는 프라이머들을 실제 실험에 사용하여 검증하도록 하였다.

프라이머의 PCR에서의 DNA 결합 및 증폭능력을 나타내기 위한 프라이머 품질 값은 다음 식에 의해 계산하였다:

$$R = 100 - dT_m + dG_{\text{forward}}(3'-5') + dG_{\text{reverse}}(3'-5') + \text{Hairpin score} + \text{Dimer score}$$

dT_m 값은 정방향 프라이머와 역방향 프라이머의 T_m 값의 차이 절댓값 [$T_m(\text{forward}) - T_m(\text{reverse})$]으로 계산 방식에는 여러 가지 변형이 있는데, 본 연구에서는 다음의 두 가지 방법을 적용하여 비교해 보았다. 첫 번째 방식 (T_{m1}) 방식은 염기 조성만을 감안한 것으로 $T_{m1} = 4(C+G) + 2(A+T)$ 로 계산된다. 이 때 C, G, A, T는 프라이머에서의 각 염기의 개수이다. 두 번째 방식 (T_{m2})은 Nearest Neighbor Method로 다음의 공식에 의해 계산된다.

$$T_{m2} = (1000 * dH/A + dS + R * \ln(C/4)) - 273.15 + 16.6 \log[Na^+]$$

여기서 dH 와 dS 는 가장 가까운 이웃간의 엔탈피변화와 엔트로피변화이며, 이 값들은 Sugimoto 등에 의해 제시된 바 있다 (16). A는 helix initiation 상수 (-10.8)이고, R은 가스 상수 (1.987 cal/°C * mol)이며, C와 $[Na^+]$ 는 각각 oligonucleotide (primer)와 salt의 농도이다.

$dG_{\text{forward}}(3'-5')$ 와 $dG_{\text{reverse}}(3'-5')$ 은 각각 정방향과 역방향 프라이머의 3' 말단 (5개의 염기) 자유에너지와 5' 말단 (5개 염기)의 자유에너지와의 차를 나타내며 다음과 같다.

$$dG_{\text{forward}}(3'-5') = \Delta G_{\text{forward}}(3') - \Delta G_{\text{forward}}(5')$$

여기에서 $dG = dH - 298.15 * dS$ (H, enthalpy; S, entropy)

Hairpin score 및 dimer score는 헤어핀 또는 다이머가 발생할 경우 자유에너지로 상보적인 3개 이상 염기의 자유에너지를 계산하였다.

이상의 방법으로 설계된 UPSR 프로그램의 단계별 프로그래밍 내역과 그 결과 생성된 파일명은 Table 1에 정리하였다.

2. UPSR 프로그램을 이용한 프라이머의 제작

National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank에 등록되어 있는 국내에서 분리된 HBV의 전체 게놈 서열 12개를 얻어 ClustalX를 사용하여 다중 서열 정렬을 시행하였다. 그런 다음 대상 서열에 대한 index를 생성하여 프라이머의 제작 위치 확인과 검색이 용이하도록 해 주었다. HBV의 PCR 생성물 크기의 범위는 모두 100~900 bp 사이의 다양한 크기에서 검출이 가능하도록 조건을 설정해 주었다. 제작된 프라이머의 크기는 최적

Table 1. Programming steps to develop UPSR program

Steps	Programming	Name of files generated
1	Generation of consensus sequences in forward and reverse directions	1_Common_forward 2_Common_reverse
2	Selection of sequences with longer than 20 bases	3_base20_forward 4_base20_reverse
3	Examination of degeneracy, T_m , GC%, 3' Clamp, 5' GC content, and 3' GC content	5_shift_forward 6_shift_reverse
4	Selection of the primer candidates	7_Universal
5	Calculation of the T_m values	8_ T_m
6	Examination of the hairpin generation	9_hairpin
7	Examination of the dimer generation	10_dimer
8	Calculation the quality measures and rank the scores according to T_{m1} , T_{m2}	11_ranking
9	Sorting the primer quality scores based on T_{m1}	12_sort_1
10	Sorting the primer quality scores based on T_{m2}	13_sort_2

20 bases로 맞추어 주었다. T_m 값은 55°C가 최적 수치로 설정하여 주었으며, 적정온도 범위 외에는 50~60°C사이에서 조건이 확립되도록 설정하여 주었다. 50%의 GC%를 최적 값으로 설정하여 주고 45~60%의 값으로 그 범위를 설정하여 주었다 (1,16).

3. HBV DNA 추출

네덜란드 Viral Quality Control (VQC) 실험실의 국제 공동연구 "HBV-DNA proficiency study" 결과 가장 높은 품질을 보이고, 증폭검사의 품질 검증 프로그램을 통한 국제 공동 연구 결과 가장 높은 민감도를 나타낸 QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하여 혈청으로부터 HBV DNA를 추출하였다. 검체 200 µl에 proteinase K 20 µl를 넣은 후 buffer AL을 첨가하여 15초 동안 vortexing하였다. 56°C에서 10분 동안 incubation 시킨 후 200 µl의 absolute ethanol을 넣고 15초 동안 vortexing 후 QIAamp spin column에 옮겨 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 원심분리한 후 여과액을 버린 후 500 µl의 AW1 buffer를 column에 넣고 8,000 rpm에서 1분간 원심분리한 후 같은 방법으로 AW2 buffer 200 µl를 넣고 14,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 마지막으로 추출한 DNA 검체를 보관할 1.5 ml 미세원심분리튜브에 QIAamp spin column을 옮긴 후 50 µl의 elution buffer를 넣어 2분 동안 실온에서 방치하고 8,000 rpm에서 1분간 원심분리한 후 실험에 사용할 때까지 -70°C에서 보관하였다.

4. PCR

환자의 혈청에서 추출한 DNA를 사용하여 UPSR 프로그램으로 제작한 프라이머로 PCR을 실행하였다. 이들 프라이머에 의한 PCR 반응액은 20 mM $MgCl_2$ 가 들어간 10 X buffer 5 µl, 25 mM dNTP 4 µl, DNA 3 µl, 10 pmol의 정방향 및 역방향 프라이머 용액 각 2 µl, Taq polymerase (5 U/µl, Intron, Seongnam, Korea) 0.5 µl를 사용하고 최종 부피가 50 µl가 되도록 증류수로 채워 제조하였다. PCR 반응을 하기 위해 먼저 시료로부터 추출한 DNA를 94°C에서 5분간 변성 (denaturation)시켰다. 이 후 94°C에서 30초간의 변성, 프라이머 종류에 따른 온도 (54~60°C)에서의 annealing, 72°C에서 30초간의 extension을 35회 반복하여 DNA를 증폭시키고, 최종적으로 72°C에서 5분간 처리하였다. 증폭된 DNA 절편은 전기영동시킨 뒤 EtBr (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이나 GelStar (Cambrex, Rockland, MA, USA)로 염색한 뒤 밴드를 확인하였다.

결 과

1. UPSR 프로그램

UPSR 프로그램은 자바 (Java) 언어를 사용하여 개인용 컴퓨터에서 사용할 수 있도록 하였다. 프로그램 편집기는 MS Windows에서 구현되는 EditPlus를 사용하였다. 본 프로그램과 기존 프로그램들과의 차별되는 장점은 다음

과 같다. 1) UPSR은 정렬된 여러 분리주들로부터 컨센서스 서열 (consensus sequence)을 계산하여 이 서열로부터 프라이머를 설계함으로써 여러 분리주 전체에 공통으로 적용될 수 있는 프라이머를 설계한다. 2) 대부분의 프로그램은 프라이머의 1차구조 해석 (T_m 값, GC%비율, degeneracy 값 등)만으로 프라이머를 설계한 후 2차구조 해석 (헤어핀, 다이머 형성)을 위해 별도의 프로그램을 사용해야 하는 어려움이 있는 반면에, UPSR은 1차구조 해석 후 2차구조 해석을 동시에 실현함으로써 프라이머 설계 시간을 대폭 단축시켜준다. 3) 일반적으로 설계되는 프라이머쌍은 수십에서 수백 개가 설계된다. 이 경우 대부분의 프로그램은 프라이머쌍의 품질 값을 나타내지 않아 가장 좋은 프라이머를 선택하기 위해서는 설계된 프라이머쌍을 모두 사용하여 실험에 의해 품질을 확인해야 하는 어려움이 발생한다. UPSR은 프라이머쌍의 품질 값을 자동으로 계산하여 품질 값이 높은 순서대로 프라이머쌍을 나타내어줌으로서 품질 값을 정확하게 수치에 의해 비교 확인할 수 있으며, 실험을 하지 않아도 가장 좋

은 품질을 가진 프라이머를 즉시 선택할 수 있는 장점이 있다 (Fig. 1). UPSR 프로그램과 그 사용법은 독자들의 요청에 의해 제공할 수 있다.

2. 설계된 프라이머의 품질 값

UPSR 프로그램은 T_m 값 계산 방식에 따라 두 가지 방식에 의해 프라이머의 품질 값을 계산하는데, 각 방식에 따라 상위 품질 값을 가지는 프라이머의 종류가 일치하지 않았다 (Table 2). 특히하게도 상위 품질 값을 가지는 프라이머들은 거의 비슷한 위치에 결함하는 것을 알 수 있었다. 역방향 프라이머의 경우 두 가지 T_m 값 계산 방식에 의한 상위 20개 프라이머의 서열의 위치는 모두 458~477 또는 459~478로 단 한 개의 염기만 차이가 있을 뿐이었으며, 정방향 프라이머 역시 상위 순위 20개 프라이머 중 일치하는 것을 여러 개 볼 수 있다. T_{m1} 에 의한 품질 값 순위 1위와 10위의 프라이머는 정방향에서 단 1개의 염기 차이임에도 불구하고 (역방향 프라이머는 같음) 품질 값에 큰 차이를 보이고 있다. T_{m2} 의 경

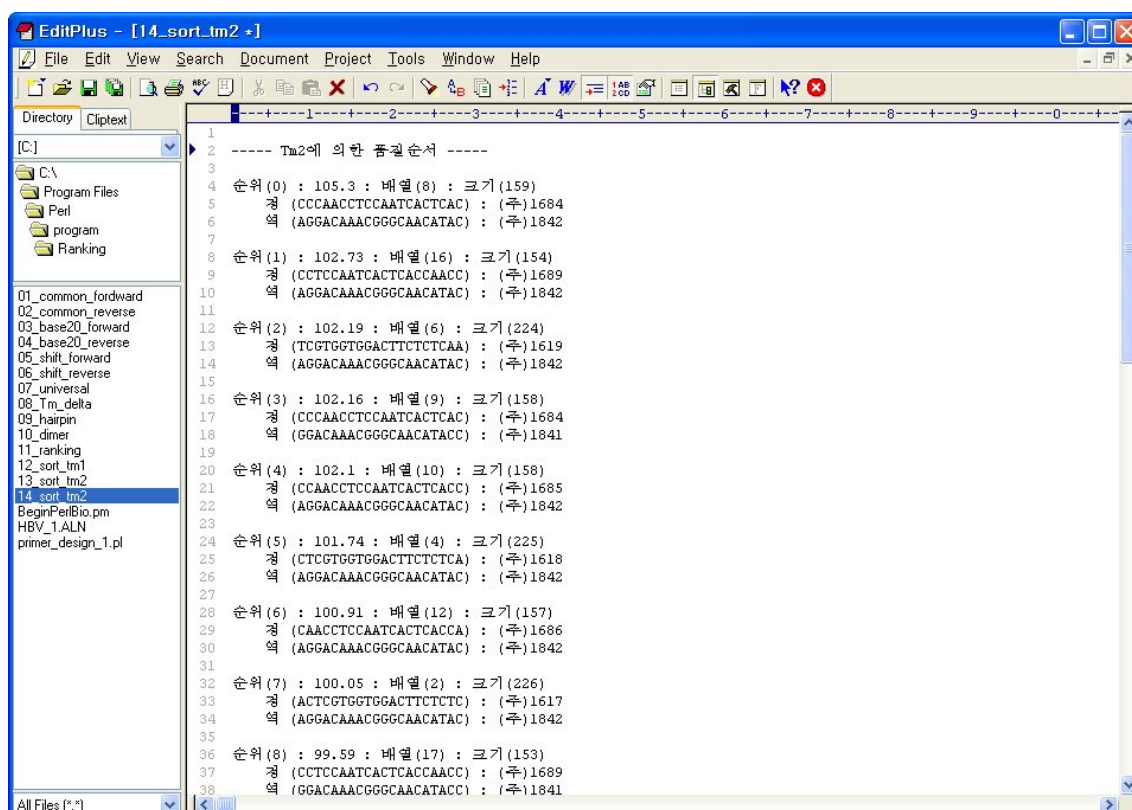


Figure 1. Screen capture of the UPSR program. The captured UPSR screen shot shows the quality ranks and scores for primers designed by UPSR.

우에는 순위 1위와 4위가 역방향 프라이머 서열 하나만이 다르다. 이와 같이 서열 몇 개의 차이에 따라 품질 값에 큰 차이가 발생하는 경우가 다수 관찰되었다.

3. 프라이머를 사용한 HBV 검출

이에 따라 이 두 가지 방식 중 어떤 방식이 실제 실험에서 가장 효율적인 프라이머 품질 값을 제시하는지 알아보기 위해 두 가지 T_m 값 계산 방식에 따라 제시된 프라이머 중 품질 값 순위가 각각 1, 4, 10, 14, 20인 것들을 선정하여 환자의 혈청시료로부터 HBV를 검출하는데 적용하기로 하였다. 이들 프라이머 중 일부는 두 T_m 값 계산 방식에서 모두 상위 순위에 들었는데, 예를 들어 프라이머 CB-1은 T_{m1} 계산 방식에서는 순위 1, T_{m2} 계산 방식에서는 순위 4에 해당되었다. 그 이유는 T_m 값 계산 방식이 서로 달라서 품질 값이 서로 다르게 나오기 때문인 것으로 생각된다 (Table 2).

이들 프라이머를 이용하여 국내 HBV sAg(+) 환자 14 명으로부터 얻은 혈청시료로부터 DNA를 추출한 뒤 PCR 법으로 HBV 검출을 시도하여 보았다. 실험 오차를 줄이기 위해 동일한 시료를 두 명의 실험자가 독립적으로 실험을 수행하였으며, 각각 EtBr과 GelStar의 두 가지 방법으로 전기영동 결과를 확인하도록 하였다. 모든 경우에 PCR 결과를 EtBr 염색으로 확인하는 것 보다는 GelStar로 염색하여 확인하는 방법이 더 높은 검출률을 보였으나 ($p<0.01$), 일반적인 염색법은 EtBr이므로 본 연구에서는 EtBr 염색 결과만 나타내었다. 프라이머별로는 T_{m2} 값 방식으로 선정된 품질 순위 1번 프라이머 CB-6을 사용하였을 때 가장 높은 검출률을 보였다 (Table 3). 앞서 언급한 바와 같이 동일한 프라이머가 두 T_m 값 계산 방식에서 다른 품질 순위를 보이는 경우가 있는데, 이 때 동일한 프라이머이지만 PCR 방식이 달라짐에 따라 검출률에 차이가 나는 것을 볼 수 있다. 예를 들어 CB-1 프라이머

Table 2. Primers designed and tested in this study

T_m	Rank	Quality Score	Prime sequence ^a (F/R, 5'-3')	Location ^b	Size	Primer name
T_{m1}	1	104.66	CCCAACCTCCAATCACTCAC	319	159	CB-1
			GGACAAACGGGCAACATACC	477		
	4	102.87	ACTCGTGGTGGACTTCTCTC	252	226	CB-2
			GGACAAACGGGCAACATACC	477		
	10	101.46	CCAACCTCCAATCACTCACC	320	158	CB-3
			GGACAAACGGGCAACATACC	477		
	14	100.83	GACTCGTGGTGGACTTCTCT	251	227	CB-4
			GGACAAACGGGCAACATACC	477		
	20	98.36	ACCTCCAATCACTCACCAAC	323	155	CB-5
			GGACAAACGGGCAACATACC	477		
T_{m2}	1	105.30	CCCAACCTCCAATCACTCAC	319	160	CB-6
			AGGACAAACGGGCAACATAC	478		
	4	102.16	CCCAACCTCCAATCACTCAC	319	159	CB-1
			GGACAAACGGGCAACATACC	477		
	10	99.36	CTCCAATCACTCACCAACCT	325	154	CB-7
			AGGACAAACGGGCAACATAC	478		
	14	98.16	ACCTCCAATCACTCACCAAC	323	156	CB-8
			AGGACAAACGGGCAACATAC	478		
	20	94.63	GACTCGTGGTGGACTTCTCT	251	227	CB-4
			GGACAAACGGGCAACATACC	477		

^a Primer sequences are presented in 5' to 3' direction. F, forward primer; R, reverse primer

^b Location of the primer according to the full genomic sequence of HBV reference strain NC_003977

Table 3. Detection of HBV by PCR using primers with different quality ranks designed by UPSR program

Primer quality rank	Percent detected* (\pm SEM)	
	T _{m1}	T _{m2}
1	71 \pm 6	88 \pm 4
4	61 \pm 9	70 \pm 4
10	86 \pm 0	64 \pm 6
14	46 \pm 4	54 \pm 4
20	64 \pm 0	23 \pm 4

*Data are averages of four independent experiments with standard errors of the mean (SEM)

Table 4. Detection of HBV from 38 Korean HBV sAg(+) serum samples by PCR using CB-6 and reference primers

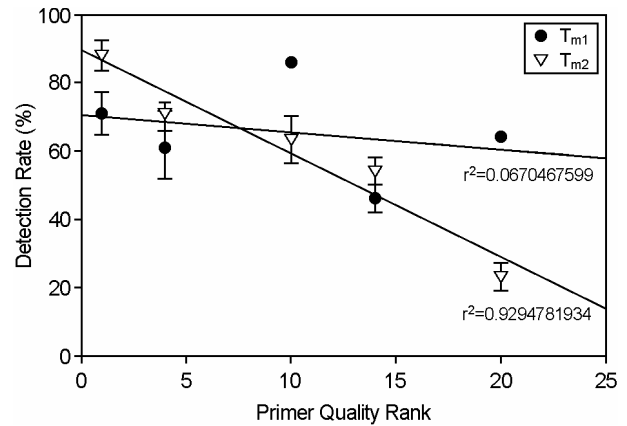
Primer	Detection rate	Source
CB-6	29 (76%)	This study
Commercial	19 (50%)	Company "B"
409.703A	18 (45%)	Reference 10
686.457	17 (45%)	Reference 10
Hamasaki	16 (42%)	Reference 5

는 T_{m1} 방식 (순위 1)보다는 T_{m2} 방식 (순위 4)에서의 순위가 더 낮게 나타나지만 PCR에 의한 바이러스 검출률은 오히려 높게 나타났다.

4. 품질 순위와 검출률과의 관계

다음으로 프라이머 품질 순위와 검출률과의 상관관계를 알아보려고 하였다. T_{m1} 방식에 의해 선정된 프라이머들은 품질 순위와 검출률 간에 큰 상관관계가 없는 것으로 보인다. 품질 순위 10인 CB-3 프라이머가 품질 순위 1인 CB-1 프라이머보다 더 높은 검출률을 보였다. 반면 T_{m2} 방식에 의해 선정된 프라이머들은 품질 순위가 높을수록 검출률이 높고, 품질 순위가 낮아짐에 따라 점점 검출률도 따라서 낮아지는 것을 볼 수 있었다 (Table 3). 이를 회귀분석을 통해 검증해 보았다. T_{m2} 방식에 의해 선정된 프라이머들의 품질 순위와 검출률 간의 관계의 회귀상수 (regression coefficient: R²)는 0.929로 매우 높은 반면, T_{m1} 방식에 의해 선정된 프라이머를 사용하였을 때에는 R²가 0.067로 매우 낮았다 (Fig. 1).

마지막으로 본 연구에서 HBV 검출에 가장 효율적이라고 제안하는 CB-6 프라이머가 얼마나 좋은지 알아보기

**Figure 2.** Relation between the primer quality ranks and HBV detection rate. Primers with high quality scores according to T_{m1} (circle) or T_{m2} (triangle) were selected and applied to HBV detection by PCR from 14 HBV sAg(+) serum samples.

위해 상업용 키트와 기존의 논문에서 HBV 검출용으로 제안된 프라이머들과 비교해 보았다. 총 38개의 HBV sAg(+) 시료를 대상으로 PCR을 수행해본 결과 CB-6 프라이머가 29개 시료에서 HBV를 검출하여 76%의 검출률을 보였다 (Table 4). 반면 상용 및 참고 문헌에서 제시된 프라이머들은 16~18개의 시료에서 HBV를 검출하여 검출률이 42~50%에 그쳐 CB-6 프라이머가 월등히 높은 효율로 HBV를 검출할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

고 찰

프라이머 디자인을 위한 소프트웨어로 대중에게 공개된 것으로는, PRIDE (4), Primer Master (11), PRIMO (9), PrimeArray (12), Primer3 (8,14) 등이 있다. 이들 대부분의 프라이머 디자인 소프트웨어 프로그램은 단일 서열로부터 프라이머를 제시한다. 다중의 서열로부터 프라이머를 디자인할 필요가 있을 시에는 일단 컨센서스 서열을 만들어 사용하게 된다. 다중의 서열로부터 프라이머를 디자인하는 프로그램으로 Amplicon (7)이 있는데, 이 프로그램은 다중의 서열을 타깃 집단과 기타 집단으로 나누어 타깃 집단만을 특이하게 선택하는 프라이머를 디자인하는 것을 목적으로 하고 있다. 각 집단의 여러 서열은 다중 정렬을 거친 뒤 컨센서스 서열을 만들어 프라이머를 디자인하는데 사용한다. 본 연구진이 설계한 UPSR 프로그램 역시 다중 서열로부터 컨센서스 서열을 만들어 프라이머를 디자인하지만, 다중 정렬된 .aln 파일을 이용하

기 때문에 degeneracy 값을 계산할 수 있다는 장점이 있다. 이는 다수의 서열로부터 얻은 컨센서스 서열이라 할 지라도 degeneracy 값이 다를 수 있기 때문에 가급적 서열간의 변이가 적은 부위를 프라이머로 선택하여 검출 효율을 높일 수 있는 장점을 주게 된다.

UPSR 프로그램이 기존의 다른 프라이머 디자인 프로그램과 차별되는 것은 제시되는 여러 프라이머들의 품질 값을 나타내는 것이다. Primer3와 같은 대표적인 프로그램은 많게는 수천 쌍의 프라이머를 제시한다. 이들 프라이머 중 어떤 것이 좋은지 알 수 없기 때문에 다이머 형성 등을 조사하는 NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>)와 같은 프로그램의 여과 장치를 거쳐 몇 개의 프라이머를 선정하게 된다. 그러나 이 과정은 Primer3로 제시된 모든 프라이머를 일일이 NetPrimer 프로그램으로 조사하여야 하기 때문에 매우 많은 시간과 노력이 필요하게 된다. 더욱이 NetPrimer를 통과한 프라이머라 할지라도 어떤 프라이머가 더 좋을지에 대한 정보는 제공되지 않는다. 본 논문에서 제시하는 UPSR 프로그램은 프라이머들의 품질 값을 제시하는데, 이 때 활용되는 것이 hairpin loop나 프라이머들 간의 다이머 같은 이차구조 형성이다 (15,16). 따라서 UPSR 프로그램이 제시하는 상위 품질 값의 프라이머 몇 가지만 테스트하면 좋은 프라이머를 얻을 수 있으며, 실제로 본 연구에서 시도한 HBV 검출에서도 예상대로의 결과를 얻을 수 있었다.

성공적인 PCR을 위해 가장 중요한 조건의 하나는 정확한 T_m 값을 계산하는 것이다. 대부분의 프로그램에서 T_m 값은 염기 조성 특히 GC 함량만을 감안하고 있으나, 프라이머의 길이 (2) 또는 인근 염기들 간의 열역학적 관계 (2,15,16) 등도 T_m 값에 영향을 준다고 알려져 있다. 본 연구에서는 염기 조성만을 감안한 방법 (T_{m1})과 인근 염기들 간의 열역학적 관계에 의한 엔탈피 및 엔트로피를 감안한 방법 (T_{m2}) 등 두 가지 방법으로 T_m 값을 계산하여 어떤 방식이 더 좋은지 살펴보았다. 제한된 시료 이기는 하지만 T_{m2} 계산 방식이 품질 값 순위가 높을수록 바이러스 검출률도 높아 열역학적 관계에 의한 엔탈피 및 엔트로피를 감안한 T_m 값 계산 방법 (T_{m2})이 더 현실적임을 알 수 있었다.

결론적으로, 본 연구에서 개발된 UPSR 프로그램은 다중 서열로부터 프라이머를 디자인하며, 나아가 프라이머들의 품질 값을 나타내 주어 실제 PCR에 의한 바이러스

검출에 편리하게 응용될 수 있다. 앞으로 본 UPSR 프로그램이 더 많은 사용자에게 도움을 주며, 이로부터 피드백을 받아 더 좋은 프로그램일 될 수 있도록 보완하도록 할 예정이다.

참 고 문 헌

- 1) Breslauer KJ, Frank R, Blocker H, Marky LA: Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 3746-3750, 1986.
- 2) Chen SH, Lin CY, Cho CS, Lo CZ, Hsiung CA: Primer Design Assistant (PDA): A web-based primer design tool. *Nucleic Acids Res* **31**: 3751-3754, 2003.
- 3) Grant PR, Busch MP: Nucleic acid amplification technology methods used in blood donor screening. *Transfus Med* **12**: 229-242, 2002.
- 4) Haas S, Vingron M, Poustka A, Wiemann S: Primer design for large scale sequencing. *Nucleic Acids Res* **26**: 3006-3012, 1998.
- 5) Hamasaki K, Nakata K, Nagayama Y, Ohtsuru A, Daikoku M, Taniguchi K, Tsutsumi T, Sato Y, Kato Y, Nagataki S: Changes in the prevalence of HBeAg-negative mutant hepatitis B virus during the course of chronic hepatitis B. *Hepatology* **20**: 8-14, 1994.
- 6) Huang YC, Chang CF, Chan CH, Yeh TJ, Chang YC, Chen CC, Kao CY: Integrated minimum-set primers and unique probe design algorithms for differential detection on symptom-related pathogens. *Bioinformatics* **21**: 4330-4337, 2005.
- 7) Jarman SN: Amplicon: software for designing PCR primers on aligned DNA sequences. *Bioinformatics* **20**: 1644-1645, 2004.
- 8) Koressaar T, Remm M: Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* **23**: 1289-1291, 2007.
- 9) Li P, Kupfer KC, Davies CJ, Burbee D, Evans GA, Garner HR: PRIMO: a primer design program that applies base quality statistics for automated large-scale DNA sequencing. *Genomics* **40**: 476-485, 1997.
- 10) Nainan OV, Cromeans TL, Margolis HS: Sequence-specific, single-primer amplification and detection of PCR products for identification of hepatitis viruses. *J Virol Methods* **61**: 127-134, 1996.

- 11) **Proutski V, Holmes EC:** Primer Master: a new program for the design and analysis of PCR primers. *Comput Appl Biosci* **12**: 253-255, 1996.
 - 12) **Raddatz G, Dehio M, Meyer TF, Dehio C:** PrimeArray: genome-scale primer design for DNA-microarray construction. *Bioinformatics* **17**: 98-99, 2001.
 - 13) **Roth WK, Weber M, Petersen D, Drosten C, Buhr S, Sireis W, Weichert W, Hedges D, Seifried E:** NAT for HBV and anti-HBc testing increase blood safety. *Transfusion* **42**: 869-875, 2002.
 - 14) **Rozen S, Skaletsky HJ:** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. pp 365-386. In *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, Misener S and Krawetz SA (Ed), Humana Press, Totowa, NJ, 2000.
 - 15) **SantaLucia J Jr, Allawi HT, Seneviratne PA:** Improved nearest-neighbor parameters for predicting DNA duplex stability. *Biochemistry* **35**: 3555-3562, 1996.
 - 16) **Sugimoto N, Nakano S, Yoneyama M, Honda K:** Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes. *Nucleic Acids Res* **24**: 4501-4505, 1996.
 - 17) **Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA:** Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* **35**: W71-74, 2007.
 - 18) **Wang D, Urisman A, Liu YT, Springer M, Ksiazek TG, Erdman DD, Mardis ER, Hickenbotham M, Magrini V, Eldred J, Latreille JP, Wilson RK, Ganem D, DeRisi JL:** Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays. *PLoS Biol* **1**: E2, 2003.
 - 19) **Zaaijer HL, ter Borg F, Cuypers HT, Hermus MC, Lelie PN:** Comparison of methods for detection of hepatitis B virus DNA. *J Clin Microbiol* **32**: 2088-2091, 1994.
-