

## Human Immunodeficiency Virus (HIV) 검출을 위한 초고속 이단계 PCR 진단법

이동우 · 김을환 · 유미선 · 김일욱 · 윤병수\*  
경기대학교 자연과학대학 생명과학과

인간면역결핍바이러스(Human Immunodeficiency Virus; HIV) 진단을 위한 초고속 실시간 PCR법을 개발하였다. 검출 대상의 DNA 염기서열은 495염기 HIV-1 특이 *env* 유전자(*gi\_1184090*) 및 294염기 HIV-2 특이 *env* 유전자(*gi\_1332355*)를 사용하였다. 초고속 실시간 PCR은 microchip에 6 $\mu$ l의 PCR 용액을 탑재하는 Genspector™ (Samsung, Korea)을 사용하였으며, PCR의 각 회전 중 단지 두 단계(denaturation, annealing/extension)를 극단적으로 짧은 시간을 주어 수행하게 하였다. 융점분석을 포함한 30회전의 PCR 검색 시간은 총 7분 30초 이내에 완료되었으며, HIV-1 특이 117염기와 HIV-2 특이 119염기의 PCR산물은 최소 2.3 $\times 10^3$ 개의 각 *env* 유전자로부터 30회전의 2단계 초고속 PCR에 의해 성공적으로 증폭시킬 수 있었다. 이러한 초고속 실시간 PCR법은 HIV의 빠른 검색뿐 아니라, 다른 병원체의 빠른 검색에도 유용하게 적용될 수 있을 것이다.

Key words □ HIV, human immunodeficiency virus, two step PCR, ultra-rapid real-time PCR

후천성 면역결핍 증후군(acquired immunodeficiency syndrome; AIDS)은 전 세계적으로 가장 중요한 공중보건문제 중에 하나이다(5). 후천성 면역결핍 증후군의 병원체인 HIV (human immunodeficiency virus)는 retrovirus로써, T 림프구, 마크로파지, 뇌세포 등에 주로 감염되며, 잠복기를 거친 후, 이들 세포의 용해를 일으키고, 결국 면역계의 손상을 야기 시킨다(16). 다른 retrovirus들에 의한 질병과는 달리 피감염자가 상대적으로 긴 생존기간을 가지는 AIDS에서는 피감염자가 감염 사실을 분명히 인지하여 타인에게 전파되는 것을 스스로 차단하게 하는 것이 매우 중요하다.

일반적 바이러스 검색법과 같이 HIV의 검색에서도 바이러스 배양, Immuno Fluorescence Assay (IFA), Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA) 등이 사용되고 있으며, 이 중 바이러스 배양법은 민감도가 높고 정확하지만 상대적으로 배양 등에 많은 시간을 필요로 하고, IFA와 ELISA는 상대적으로 빠른 시간 내에 진단이 가능하지만, 바이러스 배양법에 비해 민감도와 특이성이 떨어지는 것으로 알려져 있다(13). 또한 branched DNA (b-DNA), nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)과 같은 방법들은 HIV 입자의 정량적인 측정을 위해 유용하게 사용되고 있으나(11), 이러한 방법들도 판정까지의 검사시간에 상대적으로 많은 시간을 필요로 한다.

이들에 비해 PCR 방법은 높은 민감도를 가지고 다량의 검체를 특이적이고도 빠르게 진단할 수 있다는 장점이 있으며, PCR

기술이 발달함에 따라 여러 가지 PCR 방법들이 계속 개발되어 왔다(4). 그중 real-time PCR은 PCR 산물의 양적 변화를 형광시약을 이용하여 실시간으로 측정할 수 있기에, 또한 전기영동에 의한 시각적 분석 시간을 줄이고, 보다 민감하게 PCR 산물의 정량적 측정이 가능하기에(15), 근래 바이러스를 포함한 다양한 질병 진단 및 특정 유전자의 검사 등에 real-time PCR의 적용에 의한 검사법이 매우 폭넓게 응용되고 있다(2, 14).

진단에 있어서 검사에 소요되는 시간은 피검사자가 검사결과를 인지하는데 매우 중요한 요소이다. 일반적으로 AIDS감염자의 25~43%만이, 그리고 비감염자의 33~48%만이 그들의 진단 결과를 통보받았다고 보고되고 있다(1). 이러한 AIDS 진단 결과에 대한 피검사자의 낮은 인지도는 검체의 채취부터 진단결과 통보까지 이르는 시간이 현실적으로 매우 긴 것이 주된 원인이며, 이는 주로 1시간 미만의 즉석진단이 기술적 이유로 불가능하기 때문이라 사료된다. 피검사자가 자신의 검사결과, 즉 감염여부를 인지하지 못하는 것은 감염자 자신의 의지 및 공중보건의 지향하는 바와 달리 HIV 감염을 보다 확산시키는 결과를 초래한다. 따라서 신속한 진단 그리고 검사결과와 신속한 통보는 감염된 개개인이 그들의 AIDS 감염여부를 정확하게 인지하게 하며 즉시 진료를 받을 수 있도록 하고, 더 나아가 HIV 전파를 감소시킬 수 있을 것으로 기대되고 있다(6, 12).

이와 같이 즉석진단을 지향하는 신속한 AIDS 진단법의 필요성은 큰 기대를 모으고 있으나, 가장 민감도가 높은 것으로 기대되고 있는 real-time PCR에 근간을 둔 AIDS 진단법에서도 보통 1시간 수준의 PCR 시간을 필요로 하고 있기에 즉석진단에 이르기까지 큰 기술적 장애가 되고 있었다. 이는 기존의 real-time PCR 기기들이 96 well tube에 적합한 thermal-block을 사용하기

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-31-249-9645, Fax: 82-31-243-1707  
E-mail: bsyoon@kyonggi.ac.kr

때문이며, thermal-block은 PCR의 3단계 온도변화에 적정온도로 신속하게 변화하는 것과 block내 균일하게 적정온도를 전달하는 것에 구조적 문제점이 있었기 때문이다. 따라서 상기의 thermal block을 채용한 PCR 기기에서 일반적으로 사용되고 있는 30회전의 PCR 시간을 획기적으로 감소시키는 것은 현실적으로 어려우며, 실제로 PCR 용액 내에 3단계의 PCR 설정 온도를 전달시키기 위하여 thermal-block과 기존의 PCR tube는 일정한 시간적 한계가 있는 것으로 알려져 있다(3).

보다 빠른 실시간 PCR을 수행하기 위하여 열전도성이 우수한 실리콘과 유리재질로 제작된, micro-chip을 기반으로 한 새로운 real-time PCR 기기가 개발되었으며, 이는 1 µl의 PCR 용액을 사용하고, 실험적으로 증명된 빠른 온도변화시간(lamping time)의 구현을 통해 신속한 PCR이 가능하게 하였다(3).

Lee 등(9)은 상기의 micro-chip을 기반으로 한 real-time PCR 기기를 사용하고, 합성 HIV DNA를 주형으로 하여, 30회전의 1 µl-PCR로써 12~14분 만에 HIV 특이 유전자의 존재를 진단할 수 있는 방법을 개발하였고, 이런 방식의 빠른 PCR법을 초고속 PCR (ultra-rapid PCR)이라 명명하였다. 또한 avian influenza virus (AIV)를 대상으로 한 Kim 등(8)의 연구는 합성 AIV 특이 염기서열 10<sup>3</sup> 개 DNA분자를 주형으로 하여, 최단 12분 28초 만에 AIV 특이 염기서열에 대한 30회전 PCR 증폭이 가능함을 보여주었다. 이러한 연구들은 우선 일반 PCR에 비하여 초고속 PCR이 실험에 소요되는 시간을 획기적으로 단축시킬 수 있음을 보여 주었고, PCR 용액내의 분자들 또한 초고속에 상응하는 분자의 운동, 즉 DNA 및 primer의 denaturation, annealing, Taq polymerase에 의한 중합반응 등을 충분히 빠르게 수행할 수 있음을 추측하게 하였다. 또한 초고속 PCR을 보다 초고속으로 진보시키기 위하여 PCR 시간 단축을 위한 기기의 성능 개선 뿐 아니라 초고속에 걸맞은 최적 PCR 조건의 확립이 보다 긴요할 수 있음을 시사하였다. 병원체에 대한 유전자 검사로써 초고속 PCR법은 우선 병원체에 대한 즉석검사에 보다 근접할 수 있도록 보다 시간단축을 추구하여야 할 것이며, 정확성과 민감도를 보다 개선할 수 있도록 개발되어야 할 것이다.

따라서, 본 연구에서는 초고속 PCR의 시간을 보다 단축하기 위하여, 합성 HIV-1 및 HIV-2 특이 염기서열을 주형으로 이단계 (two step) PCR법을 초고속 PCR에 적용하였고 이를 최적화하였으며, 이를 통하여 융점분석시간을 포함한 30회전의 HIV 특이 초고속 PCR검출법에서 최소 7분 24초의 검출시간을 기록하였기에 이를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### HIV1 및 HIV2 특이 기질 및 검색용 primers

본 연구에서 사용한 PCR 검사용 기질은 Lee 등(9)의 연구에서 설계 및 합성된 HIV1 및 HIV2 특이 기질인 pBX-HIV1과 pBX-HIV2를 사용하였다. pBX-HIV1과 pBX-HIV2는 HIV가 다양한 유전적 변이를 일으키는 특성을 가지고 있기에 미국 생명공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information)

에 보고된 45종의 HIV1 *env* 유전자와 33종의 HIV2 *env* 유전자의 염기서열을 비교분석하여 가장 상동성이 높은 부분을 선정하는 것이며, 이를 인공 유전자 합성법인 long-nucleotide extension법 (7)을 사용하여 제작하고 클론화한 것이다(9). 또한 상기의 HIV 특이 기질에 대한 검색용 primer들도 이 등의 연구(9)에서 사용한 primer들을 그대로 사용하였으며, 이들 primer에 대한 정보는 Table 1에 나타내었다.

### 초고속 삼단계 PCR에서 annealing 온도 증가의 효과

일반적 PCR에서 사용되고 있는 각 회전(cycle)의 3단계(step), 즉 denaturation, annealing, polymerization을, 2단계 PCR (two steps PCR), 즉 denaturation, annealing 및 polymerization으로 개선하고, 이를 초고속 PCR에 적용시키기 위하여, 본 연구에서는 annealing 온도 상승에 따른 초고속 삼단계 PCR에서 DNA 증폭 효과를 측정하였다.

PCR의 조성은 최종 반응액 6 µl 내에 HIV1에 대한 template DNA인 pBX-HIV1 (2.3×10<sup>5</sup> copies), 10 pmole의 HIV1-dF primer, 10 pmole의 HIV1-dR primer, 2× greenstar master mix (Genetbio, Korea)로 조성하였으며 HIV2에 대하여는 2.3×10<sup>5</sup> copies의 pBX-HIV2, 10 pmole의 HIV2-dF, 10 pmole의 HIV2-dR, 2× greenstar master mix로 조성하였다. Real-time PCR 기기는 Genspector™ TMC-1000 (Samsung, Korea)을 사용하였으며, 차후 모든 real-time PCR 반응은 동일한 기기를 사용하였다. 반응조건은 pre-denaturation 94°C 30초를 수행하고, denaturation 94°C 1초, annealing 56~72°C 1초, extension 72°C 3초 과정을 30회 반복하였으며, 이후 융점분석(melting point analysis)은 75~85°C 구간을 lamping rate 0.1°C/sec의 속도로 1°C 간격으로 측정하여 T<sub>m</sub>값을 결정하였다.

### 초고속 이단계 PCR과 초고속 삼단계 PCR의 비교

HIV1 및 HIV2 특이 기질을 대상으로 annealing 온도를 최적화시킨 이단계 초고속 PCR과 3단계 초고속 PCR을 각각 수행하여 각 초고속 PCR의 특성을 비교하였다.

PCR 조성은 삼단계 PCR과 이단계 PCR 모두 최종 반응액 6 µl 내에 HIV1의 template DNA인 pBX-HIV1 (2.3×10<sup>5</sup> copies), 10 pmole의 HIV1-dF, 10 pmole의 HIV1-dR, 2× greenstar master mix (Genetbio, Korea)로 조성하였으며 HIV2에 대하여는 template로 2.3×10<sup>5</sup> copies의 pBX-HIV2를, primer쌍으로 10 pmole의 HIV2-dF, 10 pmole의 HIV2-dR를 사용하고 나머지는 같은 조성으로 하였다. 반응 조건은 three step PCR의 경우 pre-denaturation 94°C 30초를 수행하고, denaturation 94°C 1초, annealing 67°C (HIV-1의 경우), 68°C(HIV-2의 경우) 1초, extension 72°C 3초 과정을 30회 반복하였으며, two step PCR은 pre-denaturation 94°C 30초를 수행하고, denaturation 94°C 1초, annealing 및 extension으로 67°C (HIV1), 68°C (HIV2) 3초 과정을 30회 반복하였다. Melting point analysis는 삼단계 PCR과 이단계 PCR 모두 75~85°C 구간을 lamping rate 0.1°C/sec의 속도로 1°C 간격으로 측정하여 T<sub>m</sub>값을 결정하였다.

### 이단계 초고속 PCR에서 denaturation 온도 감소 효과

이단계 초고속 실시간 PCR에서 denaturation 온도가 낮을수록 실험 소요 시간을 보다 단축할 수 있을 것으로 판단되었으며, 이 단계 초고속 PCR에서 denaturation 온도의 감소가 DNA 증폭에 미치는 효과를 측정하였다.

PCR의 조성은 최종 반응액 6  $\mu$ l 안에 HIV-1의 특이 template DNA인 pBX-HIV1 ( $2.3 \times 10^5$  copies), 10 pmole의 HIV1-dF, 10 pmole의 HIV1-dR, 2 $\times$  greenstar master mix (Genetbio, Korea)로 조성하였으며 HIV-2에 대하여는  $2.3 \times 10^5$  copies의 pBX-HIV2, 10 pmole의 HIV2-dF, 10 pmole의 HIV2-dR, 2 $\times$  greenstar master mix로 조성하였다. 반응조건은 pre-denaturation 94°C 30 초를 수행하고, denaturation 88~94°C 1초, annealing 및 extension으로 67°C (HIV-1의 경우), 68°C (HIV-2의 경우) 각기 3초 과정을 30회 반복하였으며, 이후 융점분석은 앞의 실험과 같은 조건으로 수행하였다.

### HIV 특이 유전자 검출을 위한 이단계 초고속 실시간 PCR의 최적조건

HIV 특이 유전자 검출을 위한 이단계 초고속 실시간 PCR의 최적조건을 확립하기 위하여 primer 농도별, MgCl<sub>2</sub> 농도별, Taq polymerase 농도별 PCR에 미치는 영향을 측정하였다.

우선 PCR 조성에서 최적의 primer 농도를 구하기 위하여 해당 primer쌍을 각각 10 pmole, 20 pmole, 30 pmole, 40 pmole로 조정하고, primer를 제외한 나머지 조성은  $2.3 \times 10^5$  copies의 template DNA와 2 $\times$  greenstar master mix로 하여 동일조건에서 초고속 PCR을 수행하였다. 반응조건은 pre-denaturation 94°C 30 초를 수행하고, denaturation 90°C 1초, annealing 및 extension으로 67°C (HIV-1), 68°C (HIV-2) 3초 과정을 30회 반복하였으며 융점분석은 앞의 실험과 동일하게 수행하였다.

최적 MgCl<sub>2</sub> 농도를 구하기 위하여 primer 농도별 이단계 실시간 PCR을 통하여 얻어진 최적 primer 농도를 기준으로, 최종 부피 6  $\mu$ l에  $2.3 \times 10^5$  copies의 template DNA와 각 10 pmole의 forward/reverse primer, 2 $\times$  greenstar master mix로 조성하고, 각각의 반응액에 최종농도 2.0 mM, 2.5 mM, 3.0 mM, 3.5 mM이 되도록 MgCl<sub>2</sub>를 첨가하였다. 반응 온도조건은 primer 최적조건을 구한 실험과 동일한 조건으로 수행하였다.

또한, 얻어진 최적 primer 농도와 MgCl<sub>2</sub> 농도에서 최적 Taq polymerase 농도를 측정하기 위해 최종 부피 6  $\mu$ l에  $2.3 \times 10^5$  copies의 template DNA와 10 pmole 농도의 forward/reverse primer, 2 $\times$  greenstar master mix로 조성하고, 각각의 반응액에 0.6 U, 1.0 U, 1.4 U, 1.8 U의 Taq polymerase가 포함되도록 하였으며, 반응조건은 앞의 실험과 동일하게 수행하였다.

### HIV 특이 유전자 검출을 위한 이단계 초고속 실시간 PCR의 민감도 측정

본 연구에서 확립한 이단계 초고속 실시간 PCR의 제반 최적 조건을 사용하여 HIV 특이 유전자를 검출할 수 있는 최소 한계를 측정하였다.

HIV1 및 HIV2 특이 유전자를 1 pg ( $2.3 \times 10^5$  copies)에서 1 fg ( $2.3 \times 10^2$  copies)까지 단계별 희석하여 각기 PCR용액의 조성에 사용하였으며, 해당 primer쌍 각 10 pmole, 2 $\times$  greenstar master mix를 첨가하여 최종 부피 6  $\mu$ l가 되도록 조성하였다. 이 PCR용액에서 MgCl<sub>2</sub>의 최종농도는 2.0 mM이었으며, 6  $\mu$ l의 PCR용액 중 0.6 U Taq polymerase가 포함되도록 master mix를 새롭게 조성하였다. 반응조건은 pre-denaturation 94°C 30초를 수행하고, denaturation 90°C 1초, annealing-extension으로 67°C (HIV-1), 68°C (HIV-2) 3초 과정을 30회 반복하였으며, 융점분석은 75~85°C 구간을 lamping rate 0.2°C/sec의 속도로 1°C 간격으로 측정하여 Tm값을 결정하였다.

### HIV 특이 유전자 검출을 위한 이단계 초고속 실시간 PCR의 재현성

본 연구에서 확립한 이단계 초고속 실시간 PCR의 제반 최적 조건을 사용하여 HIV 특이 유전자의 농도별 재현성을 측정하였다.

PCR의 조성은 최종 반응액 6  $\mu$ l 내에 10 pg ( $2.3 \times 10^6$  copies)에서 10 fg ( $2.3 \times 10^3$  copies)까지의 pBX-HIV1 DNA를 포함시켰고, 또한 10 pmole의 HIV1-dF, 10 pmole의 HIV1-dR, 2 $\times$  greenstar master mix로 조성하였으며 HIV-2에 대하여는 10 pg ( $2.3 \times 10^6$  copies)에서 1 fg ( $2.3 \times 10^3$  copies)의 pBX-HIV2를 각기 사용하였으며, 10 pmole의 HIV2-dF, 10 pmole의 HIV2-dR, 2 $\times$  greenstar master mix로 조성하였다. 반응조건은 pre-denaturation 94°C 30초를 수행하고, denaturation 90°C 1초, annealing-extension으로 67°C (HIV-1), 68°C (HIV-2) 3초 과정을 30회 반복하였으며, 융점분석은 전의 실험과 동일하게 하였고, 이를 3회 반복하여 Ct값 및 Tm값의 평균을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 초고속 삼단계 PCR에서 annealing 온도 증가의 효과

초고속 실시간 PCR을 사용한 HIV 검출법의 기존 연구(9)는 삼단계 PCR법을 사용하였고, 30회전의 PCR검출에서 12분대의 실험시간이 소요되는 것으로 보고되었다. 초고속 실시간 PCR을 보다 초고속으로 수행하기 위하여 이단계 PCR법의 적용은 보다 효과적인 것으로 예측되었으며, 이를 위하여 삼단계 PCR에서 annealing 온도의 상승이 초고속 실시간 PCR에 미치는 영향을 측정하였다.

HIV-1 특이 유전자를 기질로 한 실험에서 annealing 온도의 설정 범위는 일반적인 extension 온도인 72°C까지, 즉 62°C에서 72°C까지로 측정하였으며, HIV-2 특이 유전자의 경우 56°C에서 72°C까지를 측정하였다.

HIV-1 및 HIV-2 특이 유전자를 증폭시키는 30회전의 초고속 PCR에서 양자 모두 annealing 온도를 증가시킬수록 초고속 PCR에 필요한 총 소요 시간은 크게 단축되는 것이 확인되었다. 그러나 HIV-1의 경우 70°C, 72°C의 annealing 온도에서의 초고속 PCR은 Ct값이 측정되지 아니하였으며, Tm값도 72°C에서는 측정

되지 아니하였다. 또한 HIV-2의 경우 Ct값은 56에서 72°C까지 모두 측정되었으나, annealing 온도 72°C의 초고속 PCR에서 Ct 값이 크게 증가된 것을 볼 수 있었다(Fig. 1).

초고속 PCR에서 annealing 온도를 증가시킬수록 초고속 PCR에 필요한 총 소요 시간은 크게 단축되는 것은 denaturation 온도와 annealing 온도의 차가 좁혀지기 때문에 각 회전에서 온도 이동에 소요되는 시간이 각기 감소되었기 때문으로 해석되었다. 한편, Ct값이 측정되지 아니한 HIV-1의 70°C의 annealing 온도에서의 초고속 PCR은 PCR 생성물의 양을 의미하는 형광강도가 동 실험의 25 cycle 부분에서부터 증가되는 것이 확인되었으나, 72 °C에서의 같은 실험의 경우 30회전 이후에도 형광값의 변화를 확인할 수 없었다(자료 미제시). 이는 실험에 사용된 HIV-1 특이 염기서열과 HIV1-dF 및 HIV1-dR primer 쌍의 염기서열 간 annealing의 강도가 이 온도 및 초고속의 시간 조건에서 효과적인 annealing이 되지 않는다는 것을 의미하는 것으로 해석되었다.

HIV-1 특이 유전자를 증폭시키는 30회전의 초고속 PCR에서 최적 annealing 온도는 우선 가장 낮은 Ct값과 가장 높은 Tm값을 보여준 65°C로 나타났으나, 본 연구에서는 초고속 PCR의 목적

**Table 1.** Sequence of HIV *env* specific detection primers (Lee *et al.*, 2007)

Name	Sequence (5'-3')	nt <sup>a</sup>	GC%	GC% <sup>3'</sup> <sup>b</sup>	Amplicon
HIV1-dF	cgcctaataagccctcagca	20	60%	70%	117 bp
HIV1-dR	ttgggagcagcaggaagcac	20	60%	60%	
HIV2-dF	cagccagccaacgaaggaac	20	60%	50%	119 bp
HIV2-dR	cccgatcaagaggcgagtca	20	60%	60%	

<sup>a</sup>nucleotides

<sup>b</sup>GC% of half primer in 3' direction

을 추구하기 위하여 annealing 온도 65°C에서 나타난 Ct값보다 0.4 회전이 증가되었으나, 최종 반응시간에서 약 35초를 단축시킨 annealing 온도 67°C를 최적온도로 선정하였다.

한편 HIV-2 특이 유전자를 증폭시키는 30회전의 초고속 PCR에서 최적 annealing 온도는 가장 낮은 Ct값을 보여준 68°C로 나타났으며, 그 이상의 annealing 온도에서 초고속 PCR은 PCR 산물의 생성량이 크게 감소되고 또한 Ct값이 크게 증가하여 초고속 PCR에 적합하지 아니한 것으로 판단되었다.

본 연구에서 사용된 primer들은 염기의 길이, GC% 및 amplicon의 크기가 모두 일정한 primer들이며(Table 1), 이런 primer들도 초고속 PCR에서 HIV-1과 HIV-2의 경우와 같이 다른 annealing 강도를 보이는 것은 primer 쌍의 염기서열간의 차이로 해석되며, 초고속 PCR에 적합한 primer의 염기서열은 더 연구될 필요가 있을 것으로 판단되었다.

**이단계 초고속 PCR과 삼단계 초고속 PCR의 비교**

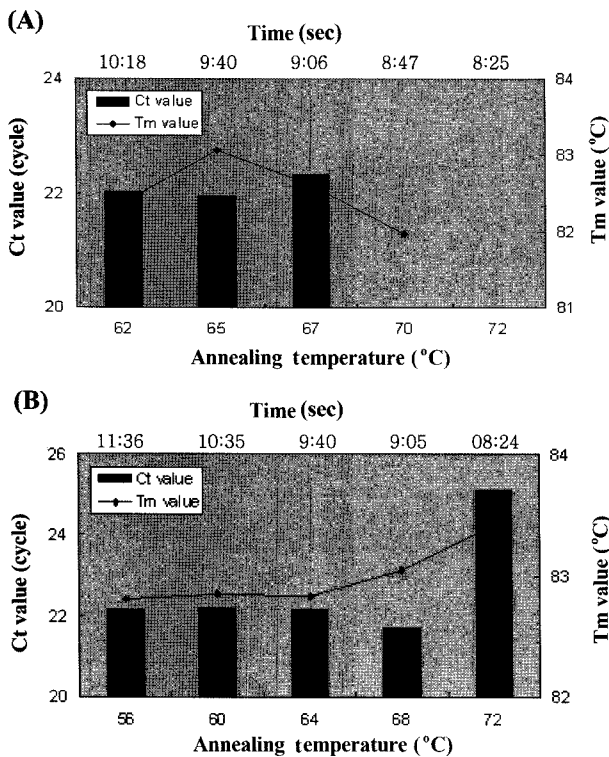
초고속 삼단계 실시간 PCR을 통하여 얻어진 최적의 annealing 온도에서 초고속 이단계 PCR의 결과와 초고속 삼단계 PCR의 결과를 비교하였다.

우선, 융점분석(Melting-temperature analysis)과 30회전의 PCR을 포함한 전체 검색시간에서 초고속 이단계 PCR이 초고속 삼단계 PCR보다 30초 내외의 시간을 단축할 수 있는 것으로 측정되었다. 한편, 반복된 실험에서 동일한 초고속 PCR에서도 총 검색시간이 약 4초 수준의 차이가 나는 것이 발견되었으며, 이는 초고속 PCR 기기의 적정온도 보정과정에서 미세한 시간차가 증폭되기 때문에 발생하는 시간적 오차로 판단되었다.

HIV1 및 HIV2 특이서열을 각기 대상으로 한 실험 모두에서 이단계 초고속 PCR과 삼단계 초고속 PCR의 Ct값은 실험오차 범위의 차이만을 보였으며, 이는 이단계와 삼단계 PCR간의 DNA 증폭효과에서는 차이가 없는 것으로 해석되었다.

한편 Tm값에서도 HIV-1과 HIV-2의 실험 모두, 이단계 초고속 PCR과 삼단계 초고속 PCR은 실험오차 범위의 작은 차이만을 보였으며, 이 역시 이단계 및 삼단계 초고속 PCR에서 DNA 증폭 효과에서는 별다른 차이가 없는 것으로 해석되었다.

본 실험에서 초고속 PCR 기기를 통하여 적용된 삼단계 초고속 PCR과 이단계 초고속 PCR의 차이는, 사실 각 annealing 온도에서 반응시간을 2초에서 1초로 줄인 것이다. 결과적으로 초고



**Fig. 1.** Effects of annealing-temperature in HIV specific ultra-rapid real-time PCR. (A) Annealing-temperature gradient ultra-rapid PCR for HIV1. Ct values could not be calculated with 30 cycled PCR in the annealing temperature between 70°C and 72°C. Tm was also not estimated in 72°C of annealing. (B) Annealing-temperature gradient ultra-rapid PCR for HIV2. Ct values rapidly increased around 72°C of annealing. Optimum temperatures for annealing were determined on 67°C (HIV 1) and 68°C (HIV2) in HIV specific ultra-rapid real-time PCR, respectively.

속 PCR에 이단계 PCR법을 적용시킨 것은 삼단계 초고속 PCR에서 보여준 Ct값과 Tm값의 변화 없이 총 실험시간만을 30초 줄일 수 있었던 것으로 나타났으며, 이는 이단계 초고속 PCR이 총 검색시간의 단축에서 보다 유리함이 확인된 것이다(Fig. 2).

**이단계 초고속 PCR에서 denaturation 온도 감소 효과**

이단계 초고속 PCR에서 보다 검사시간을 단축하기 위하여, 정확한 PCR 증폭이 손상되지 않는 범위에서 가장 낮은 수준의 denaturation 온도를 측정하고자 하였다. 모든 조건은 이단계 초고속 PCR의 기본조건과 동일하게 수행하였으며 denaturation 온도를 88~94°C까지 2°C 간격으로 측정하며 비교하였다.

결과는 HIV1과 HIV2 특이 서열을 대상으로 한 실험 모두에서 94°C, 92°C, 90°C에서는 정상적 PCR산물의 증폭에 의한 형광값의 증가를 확인할 수 있었으나, 88°C에서는 형광값의 증가, 즉 PCR 산물의 증폭을 관찰할 수 없었다.

또한 denaturation 온도 90~94°C에서 모든 초고속 PCR의 Ct값 및 Tm값은 큰 차이를 보이지 않았기에, 최소의 PCR 소요시간을 보여준, 가장 낮은 denaturation 온도인 90°C를 HIV1과 HIV2 특이 서열의 검출을 위한 초고속 이단계 PCR의 최적 denaturation 온도로 결정하였다.

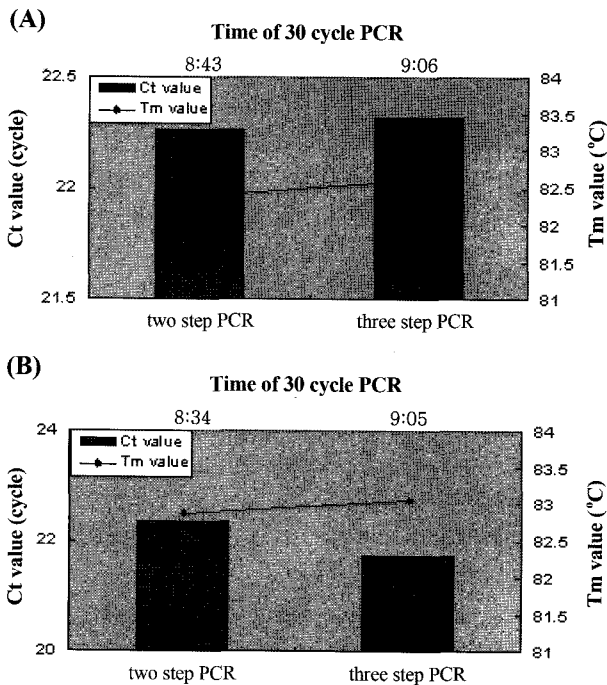
실제로 본 실험에서 90°C를 denaturation 온도로 적용한 초고

속 이단계 PCR은 30회전의 PCR 실험과 융점분석시간을 포함하여, 94°C를 denaturation 온도로 적용한 동일 실험보다 40초 이상 소요시간 감소효과를 보였으며, 최종적으로 HIV1을 증폭대상으로 한 이단계 초고속 PCR의 경우 30회전의 PCR 실험과 융점 분석시간을 포함하여, 7분 32초, HIV-2의 경우 7분 24초에 해당 특이 DNA 검출이 가능하였다(Fig. 3).

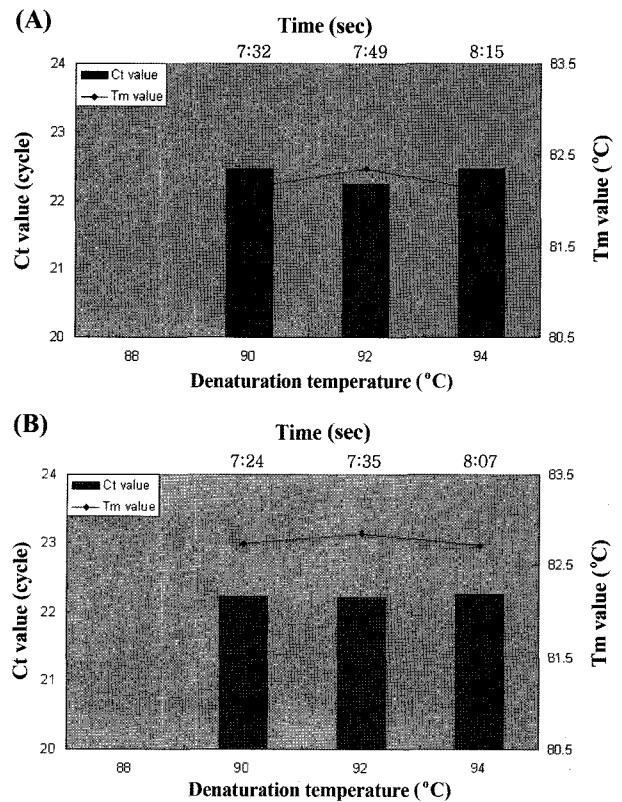
**HIV 특이 유전자 검출을 위한 이단계 초고속 실시간 PCR의 최적조건**

HIV 특이 유전자 검출을 위한 이단계 초고속 실시간 PCR의 최적 온도 및 시간의 조건에서, primer 농도, MgCl<sub>2</sub> 농도, Taq polymerase 농도 등 제반 조성 조건의 영향을 측정하였다(Fig. 4).

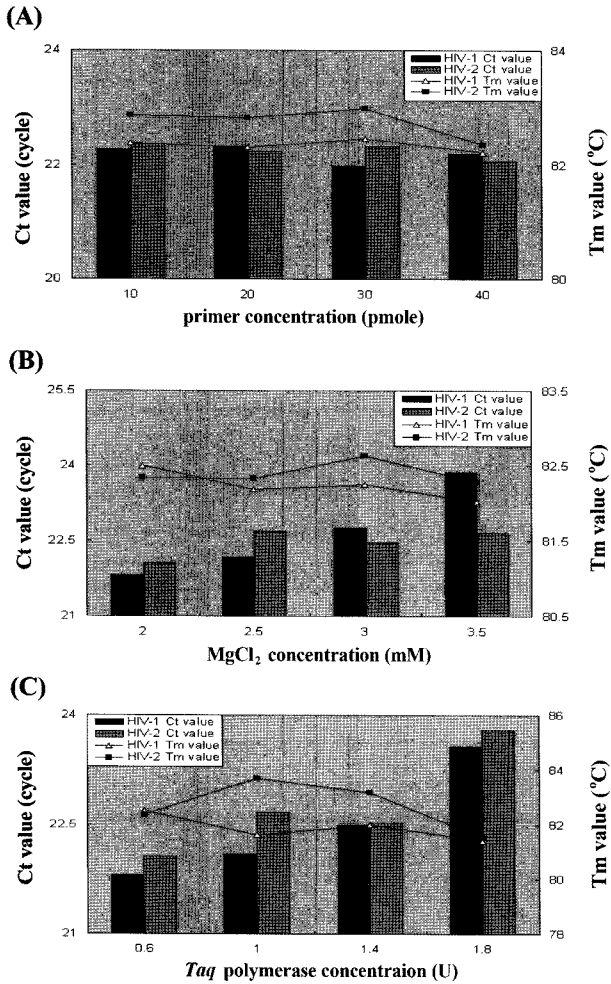
각 실험은 Ct값을 기준으로 특이 DNA의 PCR 증폭 효과의 증감으로 판정하였다. 먼저 primer 농도에 따른 초고속 PCR의 DNA 증폭 효과는 10 pmole에서 40 pmole까지의 범위에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났으나, 30 pmole 이상의 primer 농도



**Fig. 2.** Comparison between three-step PCR and two-step PCR in ultra-rapid real-time PCR. (A) HIV1 ultra-rapid real-time PCR. Differences between two kind of PCRs were 0.06 cycle in Ct value, 0.23°C in Tm and 23 sec in total time of 30 cycled PCR. (B) HIV2 ultra-rapid real-time PCR. Differences between PCRs were 0.65 cycle in Ct value, 0.19°C in Tm and 31 sec in total time of PCR.



**Fig. 3.** Effects of denaturation-temperature in HIV specific ultra-rapid real-time PCR. (A) Denaturation-temperature gradient ultra-rapid PCR for HIV1. Ct values and Tm could not be calculated with 30 cycled ultra-rapid PCR in 88°C of denaturation. (B) Denaturation-temperature gradient ultra-rapid PCR for HIV2. Ct values and Tm were also not calculated in 88°C of denaturation. Optimum temperature for denaturation was determined on 90°C for HIV specific ultra-rapid real-time PCR.



**Fig. 4.** Optimum conditions of HIV specific two-step ultra-rapid real-time PCR. (A) Effects of primer concentrations. (B) Effects of MgCl<sub>2</sub> concentration. (C) Effects of Taq polymerase concentration. Optimum conditions of HIV specific two-step ultra-rapid real-time PCR were determined on 10 pmole of each primers, 2.0 mM of MgCl<sub>2</sub> concentration, and 0.6 unit of Taq polymerase.

에서는 형광의 절대값, 즉 PCR 생성물의 양이 상대적으로 조금 감소되는 결과를 보여 주었다. 또한 30 pmole 이상의 primer 농도에서 Tm값들도 상대적으로 조금 낮아진 것이 관찰되었으며, 이는 상대적으로 적게 생성된 PCR 산물들이 과다 투여로 잔류된 primer의 영향을 받아 Tm의 측정에서 상대적으로 낮게 나온 것으로 추론되었다. Primer의 과다 투여가 긍정적 영향을 보이지 아니하는 것을 감안하여 HIV 특이 유전자 검출을 위한 이단계 초고속 실시간 PCR의 최적 primer의 농도는 10 pmole로 결정하였다(Fig. 4A).

또한 MgCl<sub>2</sub> 농도에 따른 초고속 PCR의 Ct값, 즉 DNA 증폭 효과는 MgCl<sub>2</sub> 농도에 따라 Ct값이 크게 변화되는 것으로 관찰되었으며, 특히 HIV-1의 특이 염기서열을 증폭대상으로 하였을 경우, MgCl<sub>2</sub>의 농도를 2 mM에서 그 이상으로 증가시킬수록 Ct

값이 크게 증가하는 것을 볼 수 있었다. HIV-2의 경우는 MgCl<sub>2</sub>의 농도를 2 mM에서 그 이상으로 증가시킬수록 Ct값이 증가하였으나, 그 증가의 정도가 HIV-1의 경우에 비하여 상대적으로 적게 나타났다. 따라서 일반 PCR의 경우와 같이 MgCl<sub>2</sub>의 농도는 초고속 PCR에서도 성공적 PCR을 위한 중요 변수로 판단되었으며, 이는 template와 primer들의 염기서열에 따라 변화될 수 있음을 확인하였다. 본 HIV 이단계 초고속 PCR에서 최적 MgCl<sub>2</sub>의 농도는 모두 2 mM로 결정하였다(Fig. 4B).

한편 Taq polymerase 농도에 따른 초고속 PCR의 Ct값, 즉 DNA 증폭효과에 대한 실험결과는 HIV-1과 HIV-2 모두에서 Taq polymerase의 농도가 0.6 unit 이상으로 증가할수록 Ct값이 높아지는 것으로 나타났으며, 결과적으로 PCR 산물의 생산량이 낮아지는 것으로 나타났다. 이는 본 연구에서 사용된 micro-chip based PCR의 반응액 총량이 6 μl의 소량이기때문에, 0.6 unit이상은 이미 과량으로 기질 및 primer들의 원활한 활동을 제한하기 때문으로 해석되었다(Fig. 4C).

**HIV 특이 유전자 검출을 위한 이단계 초고속 실시간 PCR의 민감도**

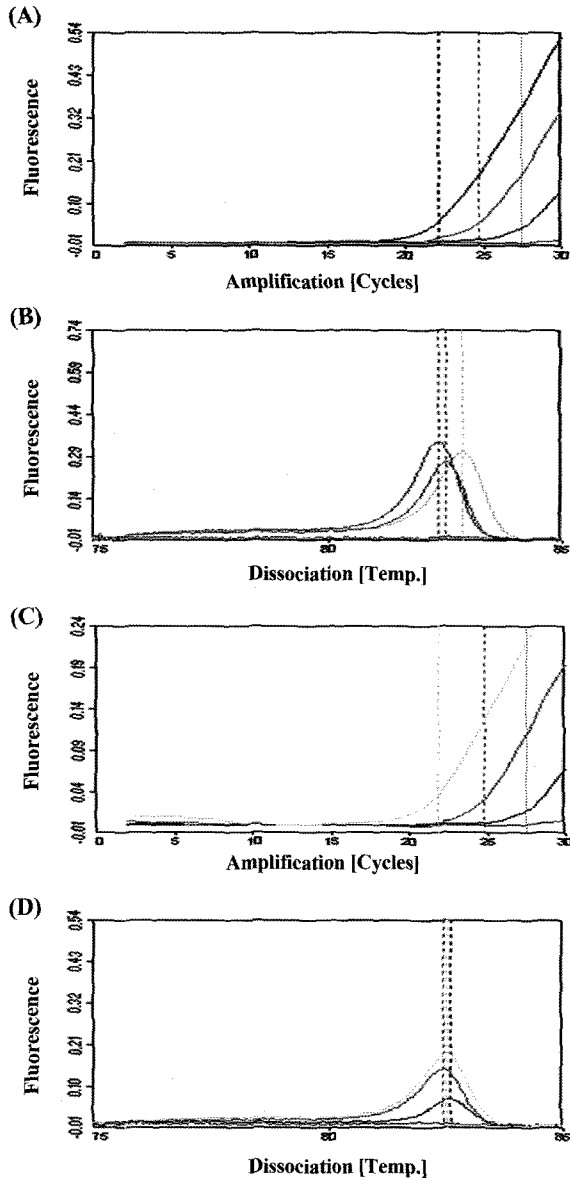
본 연구를 통하여 확립된 HIV 특이 유전자 검출을 위한 이단계 초고속 실시간 PCR의 최적조건을 사용하여 HIV-1 및 HIV-2 특이 유전자의 각 검출한계를 측정하였다. 초기 기질의 양은 각 특이 유전자의 분자량에 따른 분자의 수를 계산하였으며, 이 분자수를 검출 한계의 단위로 사용하였다(Fig. 5).

민감도 측정의 결과, HIV-1 또는 HIV-2 특이 유전자 1 pg (2.3×10<sup>5</sup> copies), 100 fg (2.3×10<sup>4</sup> copies), 10 fg (2.3×10<sup>3</sup> copies)에서 초고속 이단계 PCR은 각각의 유전자를 성공적으로 증폭할 수 있었으며, 각 초기기질의 양에 대한 각 Ct값의 비에서 매우 우수한 정량성을 보여 주었다. 또한 이 초고속 PCR에 소요된 총 검출시간도, 융점분석의 시간을 포함하여, 7분 24초에서 7분 35초로 측정되어 이단계 초고속 PCR의 우수성을 보여주었다. 그러나 HIV1 및 HIV2 각기 1 fg (2.3×10<sup>2</sup> copies)에 대한 30회전의 초고속 PCR에서는 Ct값이 측정되지 아니하였으며, 이는 본 실험의 초기기질의 양에 대한 정량성에 비추어 Ct값이 각기 30회전 이후 나타나기 때문으로 해석되었다. 사실 본 연구의 초고속 이단계 PCR의 조건에서 PCR의 회전수만 40 회전으로 증가시켰을 경우, 총소요시간은 9분대로 증가되나 민감도는 각기 이 등의 연구(9)와 같이 초기 기질 0.01 fg (2.3 copies)의 HIV1 및 HIV2의 유전자를 증폭시킬 수 있었으며, 각기 35회전 이내에서 Ct값이 형성되는 것을 볼 수 있었다(자료 미제시).

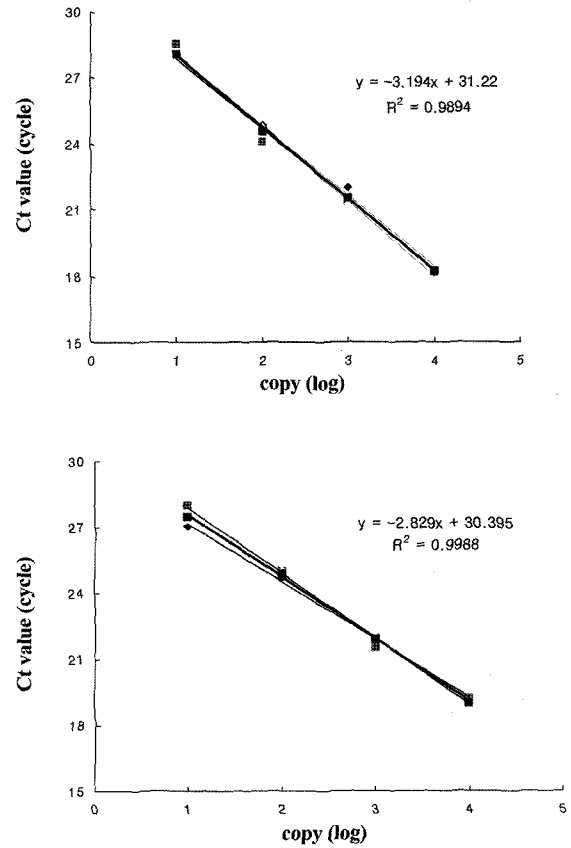
PCR 산물에 대한 정성적 측정의 방법인 융점분석(melting point analysis)에서 Tm값은 HIV1의 경우 82.5(±0.1)°C로 측정되었으며, HIV2는 82.6(±0.3)°C로 측정되어, 각기 동일한 PCR 산물을 증폭시켰음을 확인하였다.

**HIV 특이 유전자 검출을 위한 이단계 초고속 실시간 PCR의 정확성**

본 연구에서 개발된 HIV 특이 유전자 검출을 위한 이단계 초



**Fig. 5.** The sensitivity of HIV specific two-step ultra-rapid real-time PCR. Ultra-rapid real-time PCRs were performed with 10-fold serially diluted initial template ranging from 1 fg ( $2.3 \times 10^2$  copies) to 1 pg ( $2.3 \times 10^5$  copies). (A) The fluorescence (F) curves of each PCRs with initial HIV1 specific templates. The Ct values (vertical dotted lines) were calculated from the curves of  $-dF/dt$ . 21.81 cycles in 1pg of initial template, 24.84 cycles in 100 fg, 27.93 cycles in 10 fg. Ct value in 1 fg could not be determined. (B) Melting temperature analysis between 75°C and 85°C in HIV1-specific ultra-rapid PCR. Tm values (vertical dotted lines) were calculated on  $82.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . Total detection times including 30 cycled PCR and melting temperature analysis was estimated 7 min and  $33 \pm 2$  sec. (C) The fluorescence (F) curves of each PCRs with HIV2-specific templates. The CT values (vertical dotted lines) were calculated, 22.06 cycles in 1 pg of initial template, 24.68 cycles in 100 fg, 27.03 cycles in 10 fg. Ct value in 1 fg was not determined. (D) Melting temperature analysis in HIV2-specific ultra-rapid PCR. Tm values were calculated on  $82.5 \pm 0.3^\circ\text{C}$ . Total detection times were estimated 7 min and  $25 \pm 3$  sec.



**Fig. 6.** Reproducibility of HIV two-step ultra-rapid real-time PCR. (A) HIV1 specific ultra-rapid PCR. PCRs were triplicated with 10-fold serially diluted initial templates. Ct values and error range were calculated  $28.09 \pm 0.32$  cycles in 10 fg ( $2.3 \times 10^3$  copies),  $24.56 \pm 0.30$  cycles in 100 fg,  $21.55 \pm 0.29$  cycles in 1 pg,  $18.25 \pm 0.05$  cycles in 10 pg, respectively.  $R^2$  is coefficient of regression. (B) HIV2-specific ultra-rapid PCR. Ct values and error range were calculated  $27.45 \pm 0.73$  cycles in 10 fg ( $2.3 \times 10^3$  copies),  $24.91 \pm 0.14$  cycles in 100 fg,  $21.91 \pm 0.30$  cycles in 1 pg,  $19.02 \pm 0.21$  cycles in 10 pg, respectively.

고속 실시간 PCR의 정확성을 측정하기 위하여, 동일한 양의 초기 기질을 증폭대상으로 하여 HIV1 및 HIV2의 초고속 PCR을 반복 실험하였다. 사용된 초기 기질의 양은 HIV1 및 HIV2 각기 10 pg ( $2.3 \times 10^6$  copies), 1 pg ( $2.3 \times 10^5$  copies), 100 fg ( $2.3 \times 10^4$  copies), 1 fg ( $2.3 \times 10^3$  copies)이었으며 이를 각기 삼반복 측정하여 그 오차를 계산하였다(Fig. 6).

측정결과 중 HIV-1의 경우, 각 농도별 Ct값의 평균과 오차의 범위는 초기 기질의 양 10 pg에서  $18.25 \pm 0.05$ , 1 pg에서  $21.55 \pm 0.29$ , 100 fg에서  $24.56 \pm 0.30$ , 10 fg에서  $28.09 \pm 0.32$ 로 측정되었으며, 회귀식은  $Y = -3.194X + 31.22$ 로, 회귀상수( $R^2$ )는 0.9894로 계산되었고, Tm값은  $82.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 로 나타났다. 한편, HIV-2의 경우는 회귀식이  $Y = -2.829X + 30.395$ 로, 회귀상수( $R^2$ )는 0.9988로 계산되었으며, Tm값은  $82.5 \pm 0.35^\circ\text{C}$ 로 측정되어 양자 모두에서 우수한 재현성을 보여 주었다.

본 연구는 12분 수준의 진단시간을 보여준 HIV 초고속 PCR에 대한 기존 연구(9)에 새로이 이단계 PCR법을 적용하여 동등의 진단, 즉 융점분석을 포함한 30회전의 HIV 특이 DNA의 PCR 증폭이 7분대 수준에서 가능함을 보여 줄 수 있었다. 사실, 본 연구에서 보여준 7분 24초의 검색시간은 융점분석에 필요한 100초, 즉 1분 40초가 포함된 것이며, 따라서 pre-denaturation을 포함한 30회전의 PCR 증폭에 소요된 시간은 정확히 5분 44초에 불과한 것이다. 5분-PCR을 목표로 한 초고속 PCR은 우선 그 소요시간으로 목표에 거의 근접하고 있으며 관련 기술들의 발전으로 더욱 빠른 초고속 PCR이 가능할 것으로 예상된다.

PCR을 이용한 병원체의 유전자 진단법들은 일반적으로 병원체의 특이 항원을 특이 항체로 검색하는 immunochromatography법에 비하여 현장적용에서 불리한 것으로 평가되어 왔다. PCR법의 민감도는 일반적으로 면역학적 방법에 비하여 크게 우수한 것으로 평가되고 있으나, 특히 별도의 장비가 필요 없는 rapid kit (lateral flow immunochromatography법)들은 그 간편성과 15분 이내라는 짧은 진단시간, 즉 신속성으로 인하여 일반적으로 낮은 민감도를 보임에도 불구하고 현장에서 선호되어 왔다.

본 연구에서 보여준 7분대의 초고속 PCR 진단법은 PCR이 가지고 있는 높은 민감도를 크게 희생시키지 아니하며, rapid kit에서 보여준 15분대의 진단이라는 신속성을 앞지를 수 있는 가능성을 보여준 것이다. PCR 기기라는 특수기기를 필요로 한다는 단점은 차후 수요에 따른 PCR 기기의 소형화 개발 등의 노력으로 쉽게 극복될 수 있을 것이라 기대하며, 실시간 PCR이 가지고 있는 또 다른 장점인 정량성, 즉 병원체의 정량적 진단이 가능한 점을 감안한다면, 초고속 실시간 PCR 진단법은 간이 진단이 아닌 정밀 진단을 현장에서 바로 적용시킬 수 있는 민감하고도 신속한 진단방법이 될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 초고속 실시간 PCR법의 개발에 집중하여 RNA virus인 HIV의 진단에 필요한 과정인 초고속 역전사 반응(reverse transcription)을 제시하지 아니하였으며, 임상시료를 사용한 검출실험 등의 결과를 보여주지는 못하였다. 이러한 후속실험들은 본 연구의 주제인 HIV에 대한 초고속 PCR 진단법의 현장 적용에 꼭 필요한 과정이며 향후 상기 연구의 정립으로 HIV의 임상진단에 초고속 PCR법이 활용되기를 기대하며 더 나아가 많은 RNA virus에 의한 진단법에도 초고속 실시간 PCR법이 적용되기를 기대한다.

## 감사의 말

본 연구는 농림부 농림기술개발사업(과제번호 105066-03-3-HD120)과 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호 20050301-034-437-007-03-00)의 지원에 의해 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Arens, M.Q., L.M. Mundy, D. Amsterdam, J.T. Barrett, D. Bigg,

- D. Bruckner, B. Hanna, H. Prince, T. Purington, T. Hanna, R. Hewitt, C. Kalinka, T. Koppes, S. Maxwell, A. Moe, M. Doymaz, M. Poulter, M.S. Tehrani, L. Simard, D.W. Carmody, J. Vidaver, C. Berger, A.H. Davis, and M.T. Alzona. 2005. Preclinical and clinical performance of the efoora test, a rapid test for detection of human immunodeficiency virus-specific antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2399-2406.
2. Baczynska, A., H.F. Svenstrup, J. Fedder, and S. Birkelund. 2004. Development of real-time PCR for detection of mycoplasma hominis. *BMC Microbiol.* 35, 1471-2180.
3. Cho, Y.K., J.T. Kim, Y.S. Lee, Y.A. Kim, K. Namkoong, H.K. Lim, K.W. Oh, S.H. Kim, J.I. Han, C.S. Park, Y.E. Pak, C.S. Ki, J.R. Chio, H.K. Myeong, and C. Ko. 2006. Clinical evaluation of micro-scale chip-based PCR system for rapid detection of hepatitis B virus. *Biosens. Bioelectron.* 21, 2161-2169.
4. Ellis, J.S. and M.C. Zambon. 2002. Molecular diagnosis of influenza. *Rev. Med. Virol.* 12, 375-389.
5. Graham, N.M.H. 1997. Epidemiology of acquired immunodeficiency syndrome: advancing to an endemic era. *Am. J. Med.* 102, 2-8.
6. Gupta, A. and V.K. Chaudhary. 2006. Bifunctional recombinant fusion proteins for rapid detection of antibodies to both HIV-1 and HIV-2 in whole blood. *BMC Biotechnol.* 6, 1472-1483.
7. Han, S.H., Y.K. Lim, and B.S. Yoon. 2005. Manual of methods for molecular biology, 3rd (ed.), p. 574. Kyonggi University Press, Suwon, Korea.
8. Kim, E.H., D.W. Lee, S.H. Han, S.H. Kwon, and B.S. Yoon. 2007. Rapid detection method of Avian Influenza subtype H5N1 using quick real-time PCR. *Kor. J. Microbiol.* 43, 23-30.
9. Lee, D.W., E.H. Kim, M.S. Yoo, S.H. Han, and B.S. Yoon. 2007. Ultra-rapid real-time PCR for the detection of human immunodeficiency virus (HIV). *Kor. J. Microbiol.* 43, 91-99.
10. Mello, A.J. 2003. DNA amplification moves on. *Nature* 422, 28-29.
11. O'Shea, J., I. Chrystie, R. Cranston, J. Mullen, K. Corbett, G. Murphy, J.V. Parry, A.D. Ruiter, and J. Banatvala. 2000. Problems in the interpretation of HIV-1 viral load assays using commercial reagents. *J. Med. Virol.* 61, 187-194.
12. Palmer, S., A.P. Wiegand, F. Maldarelli, H. Bazmi, J.M. Mican, M. Polis, R.L. Dewar, A. Planta, S. Liu, J.A. Metcalf, J.W. Mellors, and M. Coffin. 2003. New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4531-4536.
13. Poddar, S.K. 2002. Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis. *J. Virol. Methods* 99, 63-70.
14. Ratti, C., G. Budge, L. Ward, G. Clover, C. Autonell, and C. Henry. 2004. Detection and real-time quantitation of soil-borne cereal mosaic virus (SBCMV) and polomyxa graminis in winter wheat using real-time PCR (Taqman). *J. Virol. Methods* 122, 95-103.
15. Wilhelm, J. and A. Pingoud. 2003. Real-time polymerase chain reaction. *Chem. Bio. Chem.* 4, 1120-1128.
16. Yapijakis, C., V. Panis, N. Koufaliotis, G. Yfanti, S. Karachalios, A. Roumeliotou, and Z. Mantzavinos. 2006. Immunological and molecular detection of human immunodeficiency virus in saliva, and comparison with blood testing. *Eur. J. Oral Sci.* 114, 175-179.

(Received November 29, 2007/Accepted December 17, 2007)



---

**ABSTRACT : Ultra-Rapid Two-Step Real-Time PCR for the Detection of Human Immunodeficiency Virus (HIV)**

**Dong-Woo Lee, Eul-Hwan Kim, Il-Uk Kim, Mi-Sun Yoo, and Byoung-Su Yoon\*** (Department of Life Science, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea)

For the detection of human immunodeficiency virus (HIV), ultra-rapid real-time PCR methods were developed. The target DNA sequences were used 495 bp HIV-1-specific *env* gene (gi\_1184090) and 294 bp HIV-2-specific *env* gene (gi\_1332355). Ultra-rapid real-time PCR was performed by Genspector™ (Samsung, Korea) using microchip-based, 6 µl of reaction volume with extremely short running time in only 2 steps (denaturation, annealing/extension) in each cycle of PCR. Total reaction for 30 cycled ultra-rapid PCR detection including melting temperature analysis was completed in 7 min and 30 sec. The HIV-1-specific 117 bp-long or HIV-2-specific 119 bp-long PCR products were successfully amplified from the minimum of template,  $2.3 \times 10^3$  copies of each *env* gene using 30 cycled two-steps ultra-rapid PCR. This kind of ultra-rapid real-time PCR method would be useful not only for the rapid-detection of HIV, but also rapid-detection of other pathogens.