

PCR과 SSCP를 이용한 침균콘딜롬의 인체 유두종 바이러스의 검색

서울대학교 의과대학 피부과학교실, 산부인과학교실*

박경찬 · 윤상웅 · 김규한 · 송용상*

인하대학교 의과대학 피부과학교실

이 주 홍 · 이 승 철

= Abstract =

Detection of Human Papillomavirus DNA using PCR and SSCP

Kyoung Chan Park, M.D., Joo Heung Lee, M.D.,** Seung Chul Lee, M.D.**,
Sang Woong Youn, M.D., Kyu Han Kim, M.D. and Yong Sang Song, M.D.*

Department of Dermatology and Obstetrics and Gynecology*, Seoul
National University, College of Medicine, Seoul, Korea and Inha
University**, College of Medicine, Incheon, Korea

Background : A simple and rapid screening procedure for the detection of human papillomaviruses(HPV) DNA using polymerase chain reaction(PCR) and single-strand conformation polymorphism(SSCP), was developed.

Methods : HeLa cell lines, CasKi cell lines, and HPV6 and HPV11 infected condyloma cases were used as control samples. Our method enabled us to reduce the number of PCR experiments for the detection of HPV by using common primers for HPV. SSCP followed for the analysis of PCR products amplified from different HPV.

Results : SSCP and heteroduplex analyses of four types of HPV consistently showed the same pattern of migration. Using this pattern as a control, ten cases of condyloma acuminata were analyzed. Out of ten cases, six were found to be HPV6 and four HPV11.

Conclusions : These results suggest that PCR-SSCP is a simple and sensitive method for the detection and typing of HPV in condyloma acuminata lesions.

Key Words: Human papillomavirus(HPV), Polymerase chain reaction(PCR), Single strand conformation polymorphism(SSCP)

서 론

인체유두종 바이러스는 유전적으로 유사한 많은 종류의 바이러스로 구성되어 있으며 침균콘딜롬, 보웬양 구진, 자궁암 등과의 연관성이 잘 알려져 있다¹⁾. 이중 특이한 바이러스의 형과 자궁암과의 연관성은 표피세포를 악성화하는데 인체유두종 바이러스가 중요한 역

할을 하고 있음을 의미하는데²⁾ HPV6, 11의 형은 침균 콘딜롬이나 후두유두종의 원인으로 알려지고 있으며³⁾ HPV16, 11 등은 성기주위에 발생하는 암과의 관련성이 확인되고 있다^{4,5)}. 특히 HPV 감염증은 잠복되어 있거나 현증이 없이 존재할 수 있어^{6,7)} 임상적인 소견 만으로는 바이러스의 존재 여부를 확인할 수 없다. 그러나 인체유두종 바이러스는 배양이 되지 않는 이유로 인하여 바이러스의 검색은 분자생물학적 방법에 의해

시도될 수밖에 없었으며 이러한 방법들은 각 방법에 따라 노동집약적이고 시간이 많이 필요하여 임상적인 적용이 어려웠다. 이에 연구자들은 간단하고 신속한 바이러스의 검색방법을 PCR과 SSCP를 조합하여 개발하여 보고자 본 연구를 시도하였다.

방 법

1. 연구대상

임상소견상 성기부의 침구름딜롬으로 진단된 예를 대상으로 하였는데 나이는 20세에서 28세이었으며 전부 남성이었다. 발생부위는 coronal sulcus가 10예 중 7예로 흔하였으며 inner prepuce가 2예, 요도구가 1예 이었다.

2. 핵산의 분리

HPV DNA 검색의 양성대조군으로는 HPV16의 감염이 증명되어 있는 Caski 자궁 경부암 세포주 및 HPV18의 감염이 증명되어 있는 HeLa 자궁경부암 세포주에서 DNA를 추출하여 사용하였는데, 이 세포주들은 미국의 American Tissue Culture Company로부터 구입하여 사용하였다.

HPV6, 11의 경우에는 감염이 확인된 예의 침구름

딜롬을 HPV6, 11의 양성 대조군으로 사용하였다⁸⁾. 침구름딜롬 10예를 연구의 대상으로 하여 바이러스의 검출을 시도하였다. 모든 시료는 채취후 즉시 영하 70도에 보관하였으며 핵산의 추출은 다음과 같이 시행하였다. 조직을 50°C의 온도에서 100µg/ml 농도의 proteinaseK(0.5% SDS, 10mM Tris-HCl(pH7.4), 10mM EDTA)로 16시간 처리한 후 phenol/chloroform 방법에 의해 처리하고 ethanol로 농축시켜 사용하였다.

3. 핵산의 증폭

실험에 사용된 프라이머의 염기서열은 다음과 같다 5'-CGTCCC(A)AG(A)G(A)GGAT(A)ACTG-ATC-3', 5'-GCC(A)CAGGGT(A)CATAAT(C)AATGG-3'). 증폭은 50µl의 용액(50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH8.3), 1.5mM MgCl₂, 0.01% Tween-20, 0.01% Gelatin, 0.01% NP-40, 0.2mM dNTP, 50pmol of each primer, 1 unit of Thermalase(ABI, New Haven, Conn.))에 핵산 0.5-5µg을 혼합하여 실시하였으며 94도 20초, 55도 1분, 72도 1분의 주기를 35회 반복한 후 72도로 10분간 더 처리하였다. 증폭후 5µl의 반응액을 전기영동하여 증폭여부를 확인하였다.

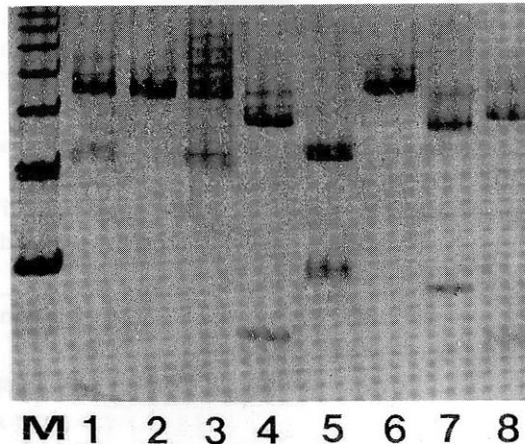


Fig. 1. Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR products from control samples. By digestion with BamH1 and Mval, four types of HPV were readily identified. M: 123 ladder marker. Lane 1: HPV6 digested with Mval(ND), 2: HPV6 digested with BamH1(ND), 3: HPV11 digested with Mval(ND), 4: HPV11 digested with BamH1(D), 5: HPV16 digested with Mval(D), 6: HPV16 digested with BamH1(ND), 7: HPV18 digested with Mval(D), 8: HPV18 digested with BamH1(D) ND: not digested, D: digested

4. RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

증폭된 핵산의 특이성을 확인하기 위하여 5 μ l의 반응액을 BamHI과 MvaI의 두가지 제한효소로 절단하고 전기영동을 실시하였다. 절단 여부는 은염색을 실시하여 확인하였다.

5. SSCP (Single strand conformation polymorphisms)

SSCP 분석은 7 \times 11cm 크기의 전기영동기기로 실시하였다. 젤은 다음과 같은 성분으로 준비하였다(0.5X MDE(AT-Biochem., Malvern, PA), 0.6XTBE). 증폭된 시료를 같은 양의 전기영동버퍼(95% formamide, 10mM NaOH, 20mM EDTA, 0.02% Bromophenol blue)와 혼합하여 열로 변성시키고 즉시 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 은염색을 실시하여 결과를 확인하였다.

결 과

1. 핵산의 증폭과 RFLP 분석

침균콘딜롬 10예, 대조침균콘딜롬 2예 및 CasKi 세포주, HeLa 세포주에서 추출한 핵산을 증폭하여 약 450bp 크기의 핵산을 확인할 수 있었다.

특이성은 두가지의 제한효소로 절단한 결과 4가지의 형을 구분할 수 있어 각형에 다른 특이한 형이 증폭된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

2. SSCP 분석

SSCP 분석은 HPV6, 11, 16, 18의 4가지 형으로 예비실험을 실시한 결과 각형에 따른 특이하고 일정한 결과를 보여주었다(Fig. 2).

3. 침균콘딜롬의 분석

10예의 침균콘딜롬을 분석하였는데 미리 분석한 4가지 형의 HPV를 참고시료로 사용하였다. 전기영동 양상을 비교하여 본 결과 10예의 시료 중 6예는 HPV6으로 4예는 HPV11로 확인할 수 있었다.

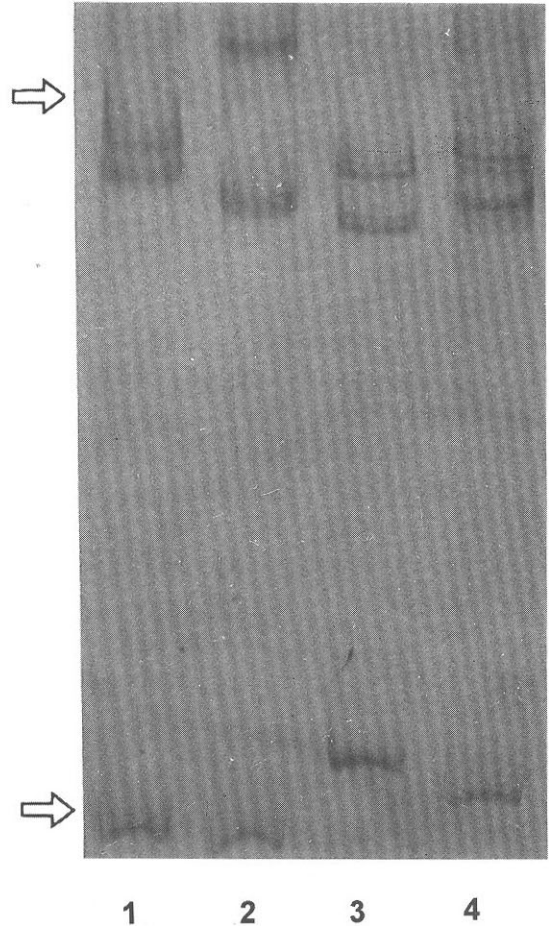


Fig. 2. Single strand conformation polymorphism analysis of control samples. SSCP analysis of HPV6,11,16,18 shows a distinct pattern of migration although the size of PCR fragment was nearly the same. Lane 1: HPV6, 2: HPV11, 3: HPV16, 4: HPV18. Upper arrow : SSCP, Lower arrow: Heteroduplex

고 찰

인체유두종 바이러스는 아직까지 배양이 되지 않기 때문에 바이러스의 검출은 분자생물학적 방법에 의존할 수 밖에 없었다. 물론 근래 많이 활용되고 있는 PCR이 예민하고 비교적 간단한 방법이지만 인체유두종 바이러스의 종류가 70여 가지에 이르기 때문에 임상적인 적용에 어려움이 있었다. 연구자들은 바이러스를 검출하는데 필요한 여러번의 실험과 여러 종류의 프라이머의 필요성을 줄이고 바이러스를 검색하기 위

한 방법을 개발하기 위하여 비교적 염기서열이 형에 따라 크게 다르지 않은 부분을 선택하여 증폭을 시도함으로써 적은 수의 증폭으로 바이러스를 검출하는 한편 이렇게 증폭된 바이러스의 형을 구분할 수 있는 방법의 개발을 위하여 SSCP를 시도함으로써 만족할 만한 결과를 얻을 수 있었다. SSCP는 원래 점돌연변이 등의 작은 크기의 유전자 이상을 검색하기 위한 방법으로 고안되었는데⁹⁾ SSCP는 단섬유의 핵산이 이동할 때 핵산의 길이 보다는 핵산의 3차원적인 구조에 의해 전기영동이 수행되며 따라서 한개의 염기에 변화가 있어도 구조적인 큰 변화로 인하여 전기영동상으로 큰 차이가 있을 수 있음에 이론적 배경을 두고 있다⁹⁾. 이 실험에 사용된 프라이머는 여러가지 형의 바이러스를 적은 수의 실험으로 증폭하기 위하여 비교적 동일한 염기서열을 보존하고 있는 바이러스의 "late region"의 염기에서 준비하였으며 이론상 비교적 동일한 염기서열을 가지고 있다 하더라도 형에 따라 상당한 염기에 차이가 있기 때문에 이러한 염기서열의 차이로 인하여 전기영동상 큰 차이가 있을 수 있으며 각 형에 따른 특이한 구조를 유지한다면 전기영동을 수행하여 바이러스를 구분할 수 있을 것이라는 가정하에 본 실험을 실시하였다. 실험결과 임상시료 및 세포주에서 비슷한 크기의 핵산이 증폭되었으며 형에 따른 크기의 차이가 없어 형을 구분할 수는 없었지만 적은 수의 실험으로 여러종류의 바이러스를 검출하려는 첫번째 목적이 성취되었다. 이렇게 증폭된 핵산은 RFLP 분석결과 서로 다른형의 바이러스로 확인되어 같은 프라이머로 다른 종류의 바이러스를 증폭하였음이 확인되었다. 다음의 실험은 크기가 비슷한 바이러스 핵산을 구분할 수 있는가로서 SSCP 분석결과 이러한 적용은 여러종류의 바이러스를 적은 수의 실험으로 증폭하고 형을 구분할 수 있을 것으로 추정되었다.

이러한 자료를 참고로 하여 10예의 임상시료를 분석하여 10예 중 6예는 HPV6으로 4예는 HPV11로 확인할 수 있어 임상적인 유용성까지 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 PCR-SSCP 방법은 임상시료에서 바이러스를 검출하는데 매우 유용하게 사용될 수 있리라 생각되며 이론상 특히 약간의 변종이나 유전적으로 가까운 감염인자를 연구하는데 크게 도움이 되리라 기대한다.

결론적으로 PCR-SSCP 방법은 임상시료로 부터 바이러스를 검출하는 매우 간단하면서도 신속한 좋은 방

법으로 생각된다.

요 약

목 적 : PCR-SSCP 방법을 작용하여 바이러스의 검출방법을 개발하기 위한 목적으로 본 실험을 실시하였다.

방 법 : HeLa 세포주, CasKi 세포주 HPV6과 HPV11 감염 첨구콘딜롬 및 10예의 첨구콘딜롬을 대상으로 PCR을 수행하였으며 SSCP 분석을 통하여 형의 구별을 시도하였다.

결 과 : CasKi 세포주, HeLa 세포주, 2예의 대조군 첨구콘딜롬을 대상으로 약450bp 크기의 핵산을 증폭할 수 있었으며 BamH1과 Mval의 두가지 제한효소로 절단하여 각 절편의 특이성을 확인하였다. 특이성이 확인된 PCR절편을 SSCP로 분석하여 각 형에 특이한 전기영동양상을 확인할 수 있었는데 이러한 결과를 이용하여 첨구콘딜롬 10예를 분석한 결과 6예는 HPV6, 4예는 HPV11로 확인되었다.

결 론 : PCR-SSCP 방법은 바이러스를 검출하는 매우 간단하면서도 신속한 방법으로 생각되었으며 앞으로 감염성인자의 검출이나 변종의 검색 등 여러가지 목적으로 활용될 가능성이 높을 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Howley PM: *Papillomaviridae and their replication*. In Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, Melnick JL, Hirsh MS, Monath TP, Roizman B (eds): "Virology." New York: Raven Press, pp 1625-1650, 1990
- 2) Smith LH, Foster C, Hitchcock ME, Isseroff R: *In vitro HPV11 infection of human foreskin*. J Invest Dermatol 101:292-295, 199
- 3) Gissman L, Wolnik L, Ikenberg H, Koldovsky U, Schnurh HG, zur Hausen H: *Human papillomavirus type 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers*. Proc Natl Acad Sci USA 80:560-563, 1983
- 4) Boshart M, Gissman L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H: *A new type of Human Papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer*. EMBO J 3:1151-1157, 1984

- 5) Durst M, Gissman L, Ikenberg H, zur Hausen H: A papillomavir DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acan Sci USA* 80:3812-3815, 1983
- 6) Ferenzy A, Mito M, Nagai N Latent papillomavits and recurring genital warts. *N Eng J Med* 313: 784-788, 1985
- 7) Barrasso R, de Brux J, Croissant O: High prevalence of papillomavirus-associated penile intraepithelial neoplasia in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *N Eng J Med* 317:916-923, 1987
- 8) Park HJ, Park KC: Detection of human papillomavirus DNA in genital and laryngeal papilloma using the polymerase chain reaction. *Ann Dermatol* 5: 1-4, 1993
- 9) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5:874-879, 1989