

미생물 분야에서 실시간 중합효소연쇄반응 (Real-time PCR)

중앙대학교 의과대학 진단검사의학교실
이미경

Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) in Microbiology

Mi Kyung Lee, M.D.

Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

Real-time polymerase chain reaction (PCR) is based on the detection and quantification of a fluorescent reporter. The signal increases in direct proportion to the amount of PCR product formed during each cycle in the reaction. Compared to conventional PCR methods, real-time PCR diagnostics are much faster and easier to perform, more sensitive and the possibility of amplified product contamination is lessened. Nowadays, the standard method for diagnosing the presence of pathogens in clinical samples relies on culture techniques. However, conventional method is too slow to provide clinically useful information for the physician to prescribe, only when needed, the appropriate antibiotics. More importantly, faster microbiology diagnostics appears to be an important factor influencing clinical outcome and cost reduction for healthcare. Real-time PCR assays are rapid and sensitive techniques for detecting or quantifying microorganisms and for identifying genes or mutations in pathogens associated with antimicrobial resistance. However, the accuracy of the real-time PCR data is largely depended on several factors such as sample preparation, quality of the standard and choice of housekeeping gene. Therefore, this is the major task for molecular diagnostics to guarantee reliable data in the future. New advances in real-time PCR will insure better management of patients, should reduce health costs, and could impact on the spread of antibiotic resistance.

Key Words : Real-time polymerase chain reaction, microbiology

서 론

1984년 Kery Mullis에 의해 개발되어 의학을 포함한 생명과학 전 분야와 식품, 환경 등의 다양한 분야에서 널리 활용되고 있는 중합효소연쇄반응법(Polymerase chain reaction, PCR)은 주형(template) DNA를 1쌍의 시발체(primer)와 Taq DNA polymerase 등을 사용하여 10^6 에서 10^7 배로 증폭시켜 민감하게 검출할 수 있는 방법이다(1). PCR은 대상 유전자의 증폭 효율에 따라 반응단계를 크게 세 부분으로 나눌 수 있는데(Figure 1), 첫째, 반응 초기인 exponential 혹은 log phase는 PCR의 매 주기

마다 정확하게 PCR 산물이 배가되는 시기로 100%의 반응 효율을 보여 매우 특이적이고 정확한 반응단계이나 기존의 PCR로는 검출이 불가능하다. 둘째, linear phase는 반응성분들이 소모되어 반응이 느려지거나 일부 증폭 산물이 분해되기 시작하여 반응의 효율도가 검체마다 매우 다양하게 나타날 수 있다. 셋째, plateau 또는 end-point phase는 반응성분들의 소모가 진행되고 반응 부산물에 의한 합성반응의 저해 등으로 반응의 효율이 감소하여 증폭반응이 중단되거나 증폭산물의 분해가 나타나, PCR 증폭산물이 원래의 초기 주형량을 반영하지 않을 수도 있다(2, 3).

최근 PCR 산물의 정확한 정량과 보다 신속하고 간편한 결과 확인에 대한 요구가 증가하고 있지만, PCR 반응의 end-point 산물을 검출하는 기존의 PCR은 대상 유전자의 양을 정확하게 정량할 수 없고, 여러 가지 응용된 방법을 도입하여 정량을 시도하더라도 예민도가 떨어지

접수: 2004년 2월 25일, 승인: 2004년 3월 15일
교신저자: 이미경, 서울시 중구 필동 2가 82-1
중앙의대 필동병원 진단검사의학과
Tel: 02)2260-2262, 2099, Fax: 02)6263-6410
E-mail: cpworld@cau.ac.kr

거나 PCR 후에 많은 시간과 추가 과정이 요구되며 오염의 가능성 등으로 인해 제한이 있었다(4).

대상 유전자의 정량시 이러한 기존 PCR의 단점을 보완하기 위하여 1992년 Higuchi 등이 ethidium bromide를 PCR 과정에 첨가하여 반응시킨 후 UV를 조사하고 이때 발광하는 형광을 지속적으로 측정하여 증폭산물의 양을 정량하는 실시간(real-time) PCR을 개발하였고(5,6), 이 기술이 도입되면서 PCR 반응 이후 전기영동과 같은 추가적인 분석과정 없이 초기 주형량을 정확하고 신속하게 정량하는 것이 가능하게 되었다. 그러나 이 방법은 비 특이적인 형광의 발산으로 정확도에 문제가 있었고(7), 이후 이를 보완하기 위한 기술이 개발되어 대상 유전자의 염기서열에 상보적인 소식자(probe)에 형광물질을 붙여 특이적으로 증폭산물을 측정할 수 있게 되었다(8). 이에 최근 미생물학 분야에서도 사용이 크게 증가하고 있는 real-time PCR에 관한 최신 지견의 습득을 통하여 이 분야에서의 연구에 도움이 되고자 한다.

Real-time PCR의 원리

Real-time PCR의 기본 원리는 DNA polymerase와 형광공명 에너지이동(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)의 원리에 의해 PCR의 매 주기마다 실시간으로 시행되는 형광의 검출과 정량에 있다(9). Real-time PCR에서의 정량은 PCR시 매 주기의 진행 상황을

감시하여 exponential phase 범위 내에서 실시간으로 증폭산물을 측정하는 방법으로, 이때 중요한 개념은 threshold cycle (C_T) 또는 crossing point (C_P)라는 수치이다. 이 값은 소식자의 분리에 의해 생기는 형광의 양이 기본값(baseline level)을 넘어서 감지될 수 있을 정도로 두드러지게 증가하는 시점의 주기수이며, 이는 초기 주형량을 비교적 정확하게 반영하는 것으로 알려져 있다(10) (Figure 1).

한편 1997년 real-time PCR에 도입된 melting 곡선 분석은 두 가닥의 DNA (double-stranded DNA, dsDNA) 증폭산물이 한 가닥의 DNA (single-stranded DNA, ssDNA)로 변성되는 melting 온도를 이용한 것으로, 마지막 PCR 주기가 끝난 후 온도를 천천히 올려 증폭산물의 열 변성에 따른 형광의 감소를 인지하게 된다(11). 이 분석은 특이적인 증폭산물을 primer-dimer나 다른 비 특이적인 증폭산물로부터 구별하여 확인할 수 있으며, 소식자(hybridization probe)나 표지된 시발체를 사용하여 DNA의 단일 염기변화를 검출할 수 있어 유전형 검사나 점 돌연변이와 같은 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)의 검출에도 사용되고 있다(Figure 2).

위와 같은 원리를 이용하여 실시간으로 증폭된 산물의 축적량을 감시할 수 있게 된 것은 표지된 시발체나 형광 물질이 붙어 있는 소식자 또는 증폭 산물로 가능해졌으며, 좀 더 예민하고 특이한 결과를 얻기 위하여 현재까지

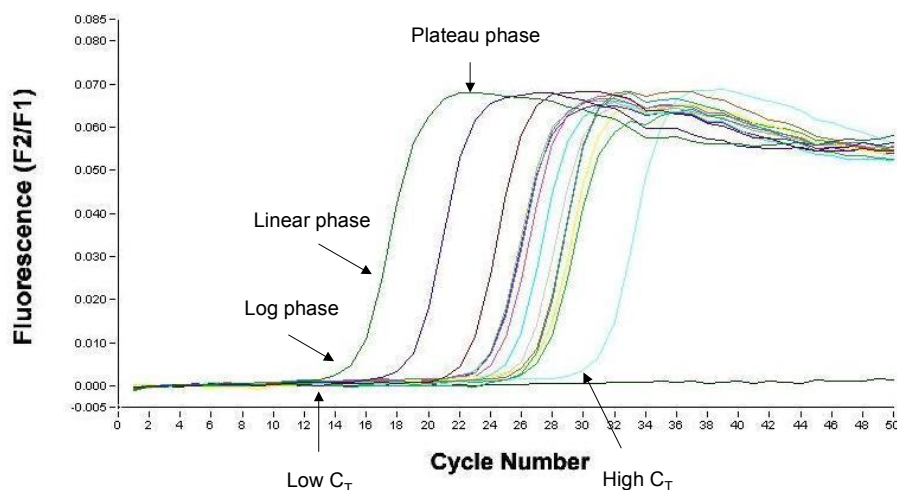


Figure 1. The amplification curve of a real-time PCR, when plotted as fluorescence intensity against the cycle number, is a typical sigmoidal growth curve. Under ideal conditions, the amount of amplicon increases at a rate of approximately one \log_{10} every cycle. As primers and enzyme become limiting and products inhibitory to the PCR accumulates, the reaction slows, eventually the plateau phase where there is little or no further increase in product yield. The point at which the fluorescence passes from insignificant levels to clearly detectable is called the threshold cycle (C_T), and this value is used in the calculation of template quantity during quantitative real-time PCR.

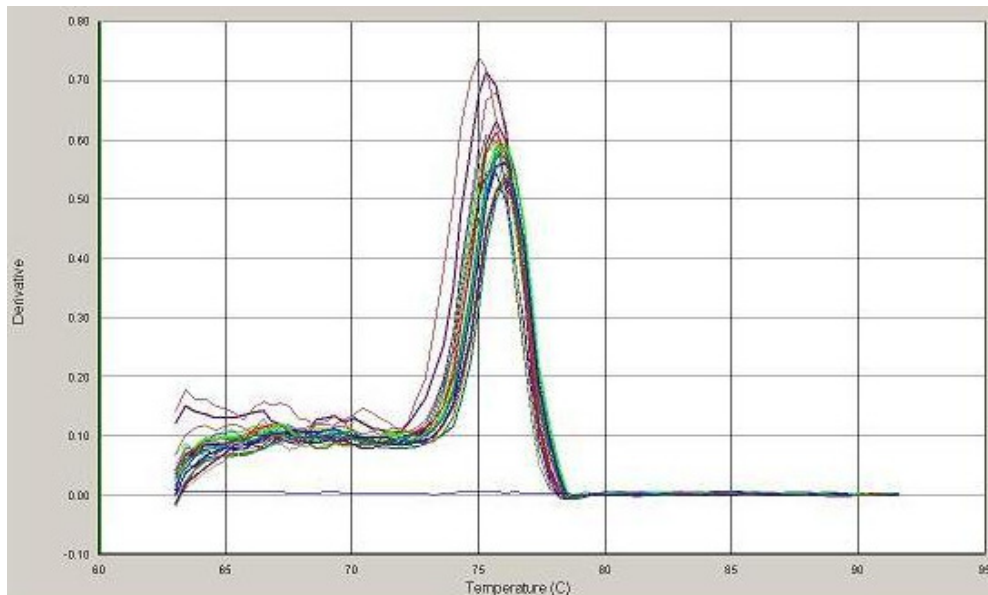


Figure 2. Fluorescent melting curve analysis. After final PCR cycle, the products are denatured at 95°C, annealed, and then slowly heated from annealing temperature to 95°C. During this process the fluorescence (F) in each tube is measured at frequent intervals. As soon as the dsDNA starts to denature, the SYBR Green I dye is released, resulting in a decreased in fluorescence. The melting temperature of this fragment can be easily visualized by taking the first negative derivative ($-dF/dT$) of the melting curve. The turning point of this melting curve results in a peak when plotting $-dF/dT$. This permits easy identification of the fragment-specific T_m .

약 5가지 종류의 화학물질이 사용되고 있다(8). 이것들은 증폭된 산물의 특이적 염기서열이 필요 없는 DNA-binding fluorophores와 특이적 염기서열이 요구되는 linear oligoprobes, 5' nuclease oligoprobes, hairpin oligoprobes, self-fluorescing amplicon 등이 있다(Figure 3).

1. DNA-binding fluorophores

특이적 염기서열이 필요 없는 방법에 속하는 것으로 real-time PCR이 사용되기 시작한 초기부터 간단하게 사용되고 있다. 이 방법에 속하는 화학물질로는 ethidium bromide (5), YO-PRO-1 (12), SYBR[®] green I (3) 등이 있으며, 이들은 dsDNA에 결합되었을 때 형광이 크게 증가하게 되어 검출이 가능하게 된다. 이들은 특이적인 소식자를 고안하는 것에 비해 전문적인 지식이 없이도 가능하며, 경제적이고, 소식자의 보합에 무관하게 다양한 주형에 적용할 수 있는 장점이 있다(13). 그러나 이들 물질들은 PCR시 특이적인 증폭산물과 함께 형성될 수 있는 primer-dimer나 다른 비 특이적인 증폭산물에도 결합하므로, 결과 판독에 혼동을 줄 위험이 있다(7,14). 이런 경우 melting 곡선 분석으로 특이 산물을 확인할 수 있다(11).

2. Linear oligoprobes

형광이 부착된 10개 염기 이내의 근접한 1쌍의 상보적인 소식자로, 상류 소식자의 3' 말단에는 donor dye가 표시되어 있고 하류 소식자의 5' 말단에는 acceptor dye가 표시되어 있다. PCR 과정의 변성과정(denaturation) 동안에는 소식자와 주형 DNA의 보합반응이 일어나지 않으므로 형광이 방출되지 않으며, 결합반응(annealing)을 위해 온도가 내려가면 소식자가 주형 DNA에 결합하게 된다. 이때 상류와 하류 소식자가 근접하게 되면 donor dye가 흥분하여 방출된 에너지가 FRET원리에 의해 하류 소식자에 붙어있는 acceptor dye를 흥분시켜 형광을 방출하게 되어 이를 검출하게 된다. 이들 소식자는 'HybProbes'로 알려져 있고 주로 LightCycler[™] (Roche Molecular Biochemicals, Germany)에서 사용하고 있다(3, 14, 15).

3. 5' Nuclease oligoprobes

20-40개의 염기로 고안된 소식자의 5' 말단에는 reporter dye 그리고 3' 말단에는 quencher dye가 붙어있어, PCR 반응이 없으면 reporter dye로부터 발산된 형광은 quencher dye에 의해 억제되어 측정되지 않는다. 그러나 PCR 주기 동안 DNA polymerase에 의해 상류 시발체의

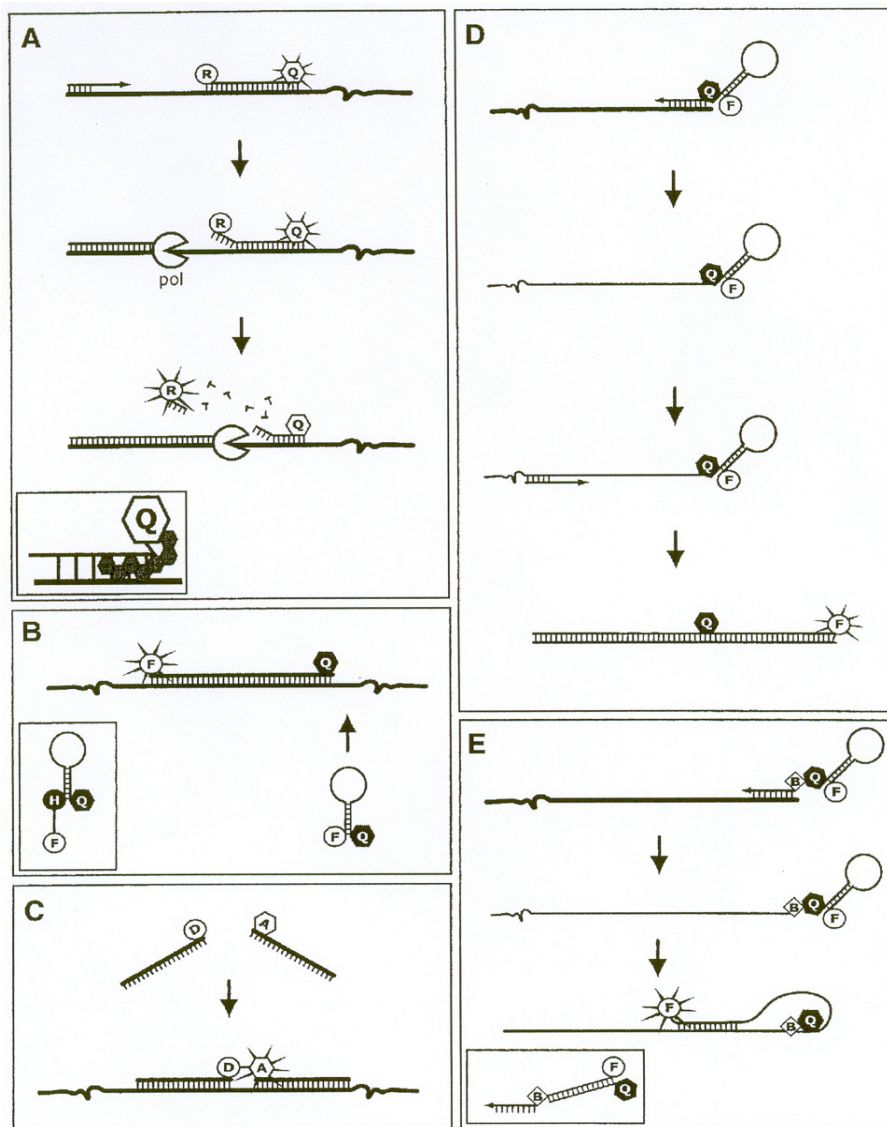


Figure 3. Oligoprobe chemistries. (A) 5' Nuclease oligoprobes. (B) Hairpin oligoprobes. (C) Linear oligoprobes. (D) Sunrise primers. (E) Scorpion primers. R: reporter, Q: quencher, pol: DNA polymerase, F: fluorophore, A: acceptor fluorophore, D: donor fluorophore, B: block (hexoethylene glycol). Adapted from reference (14).

5' 말단으로부터 소식자 방향으로 연장반응이 진행되면 DNA polymerase의 5' nuclease activity에 의한 소식자의 분해가 일어나게 되고, 이때 reporter dye가 quencher dye로부터 분리되므로 형광을 발산하게 된다. 이 소식자는 5' nuclease, hydrolysis, 또는 TaqMan[®] 소식자로 불리며, 주로 ABI PRISM[®] (Applied Biosystems, USA)에서 사용하고 있다(14, 16).

4. Hairpin oligoprobes

머리핀 모양의 구조를 가진 소식자로 고리부분은 대상 주형에 특이적인 염기서열로 이루어져 있고, 5' 말단에는

reporter dye 그리고 3' 말단에는 quencher dye가 붙어있는 양쪽 끝은 서로 상보적인 염기서열로 줄기모양을 하고 있어 소식자가 주형 DNA에 결합하지 않은 경우에는 quencher dye와 근접하게 되므로 reporter dye로부터 형광이 측정되지 않는다. 그러나 PCR 과정의 결합반응 단계에서 소식자가 주형 DNA와 결합하게 되면 머리핀 구조가 풀리면서 quencher dye로부터 떨어진 reporter dye가 형광을 발산하게 된다. 이 소식자는 molecular beacon으로 더 잘 알려져 있다(10, 14).

5. Self-fluorescing amplicon

Hairpin oligoprobes와 유사한 구조의 PCR 시발체로 PCR 증폭산물에 표지된 형광물질이 영구히 남아 있다는 점이 다르며, sunrise와 scorpion으로 불리는 두 종류가 있다. Sunrise 시발체는 3' 말단이 대상 주형에 특이적인 염기서열로 이루어져 있고 5' 말단에는 donor dye와 quencher dye가 줄기모양의 구조로 존재하다가, PCR 과정에서 특이적인 염기서열이 상보적인 가닥과 결합하게 되면 줄기모양의 구조가 풀리면서 두 dye가 떨어지게 되어 형광을 발산하게 된다(8,18). Scorpion 시발체는 hex-ethylene glycol 분자가 있어 시발체의 형광부분까지 복제되는 것을 막고, 5' 말단 부분이 증폭산물에 결합한다는 점을 제외하고는 sunrise 시발체와 유사하다(8,19).

Real-time PCR 기기

Real-time PCR 기기는 PCR을 위한 자동온도조절기(thermal cycler)와 반응물의 검출을 위한 분광형광광도계를 일체화한 기기로 볼 수 있다. 현재 real-time PCR 기기는 7가지 이상이 개발되어 있는데(Table 1), 이들 기기의 평가와 선택은 PCR의 가장 중요한 요소인 heating/cooling이 정확하고 신속하게 이루어지면서 모든 반응 용기의 조건이 동일하게 유지되어야 하고, 측정할 수 있는 dynamic range가 커야 하며, 결과의 재현성이 우수해야 함은 물론이고 melting 곡선 분석기능이 추가되어 있는지를 확인하여 이루어져야 한다. 최근의 장비들은 반응시간을 더욱 줄여 빠른 시간 내에 결과 확인을 할 수 있으며, 여러 개의 PCR 산물을 동시에 확인할 수 있는 기능까지 가지면서 더욱 빠르게 발전하고 있다(10, 14, 19). 따라서 앞으로 화학분야의 발전과 함께 더욱 진보된 소식자가 저렴한 가격으로 개발되어 사용된다면, real-time PCR이

기존의 PCR 방법을 대체하여 어느 실험실에서나 기본적인 실험으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

미생물 분야에서 real-time PCR의 적용

2004년 1월에 PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/)를 이용한 해외의학 학술정보검색에서 "Real-time PCR"을 핵심단어로 사용하였을 때 약 5,300개의 논문이 검색되었으며, 이중 약 2,500개의 논문은 2003년 1월 이후에 게재된 논문들로 최근에 이 방법을 이용한 연구들이 활발함을 알 수 있다. 또한 "Real-time PCR and microbiology"를 핵심단어로 제시하였을 때 약 320개의 논문이 검색되었다. 국내 의학학술지 검색(www.koreamed.org)에서는 23개의 논문이 "Real-time PCR"로 검색되었고 이중 미생물 분야와 관련된 논문은 5개였으며, 이외에도 미생물 분야와 관련된 2개의 초록이 2003년도 학술대회에서 발표되기도 하였다.

Real-time PCR의 적용분야는 PCR 기법이 사용되는 모든 분야에 해당되며, mRNA 정량을 통한 같은 각종 유전자의 발현, 종양학에서의 minimal residual disease의 확인 및 SNP 검출, 유전자 치료 분야에서 유전자 전이의 평가 등 다양한 분야에서 활용되고 있다. 미생물 분야에서는 바이러스, 세균 및 진균 등의 병원균 검출, 병원균 및 세균의 독성이나 약제 내성에 관여하는 유전자의 정량, 약제 내성과 관련된 유전자내 점 돌연변이 검출 등 다양한 목적으로 이용되고 있다.

1. 각종 시료에서 미생물의 검출

Real-time PCR은 기존의 PCR 방법에 비해 PCR 주기당 시간이 단축되고 폐쇄관 분석(closed-tube system)하에서 시행되며 증폭산물 확인을 위한 PCR 후의 과정을 삭제함으로써, 보다 신속한 결과 확인과 증폭산물에 의한

Table 1. Instruments Currently Available for Real-time PCR

| Instrument name | Manufacturer | Thermal cycling format* | Reaction capacity | Turnaround† | Multiplex |
|-----------------|--------------------|-------------------------|-------------------|----------------|----------------------------|
| iCycler | BioRad | Peltier/air | 96 | -2 hours | 2-6 Colors |
| LightCycler | Roche | Air | 32 | -20 min-1 hour | 3 Colors |
| Mx4000 | Stratagene | Peltier/air | 96 | -90 minutes | 4 Colors |
| Opticon | MJ research | Peltier/air | 96 | | 2 Colors |
| PRISM 7000 | Applied Biosystems | Peltier/air | 96 | -2 hours | 4 Colors |
| PRISM 7700 | Applied Biosystems | Pressure cooler/heating | 96 | -2 hours | 2 Colors |
| PRISM 7900 | Applied Biosystems | Peltier/air | 384 | -2 hours | Detection range 500-660 nm |
| Rotor-Gene | Corbett research | Air | 36-72 | -50 minutes | 4 Colors |
| Smart Cycler | Cepheid | Peltier/air | 16-96 | -40 min-1 hour | 4 Colors |

*Maximum number of samples analyzed simultaneously, †Refers to analytical turnaround time does not include specimen preparation

오염을 줄일 수 있으며 또한 향상된 예민도를 보여(6, 14), 신속한 결과 확인이 필요하거나 배양 기간이 길고 일반 배양방법으로 검출이 어려운 병원균의 검출에 더욱 유용하다(6, 14, 20, 21). 최근에는 급성호흡기 감염증(Severe acute respiratory syndrome, SARS)과(22) 탄저균 감염의(23) 경우처럼 신속한 결과 확인이 필요한 중요한 감염증의 진단, 신생아 수막염 예방을 위해 시행하는 출산중 산모의 질 또는 항문의 면봉도말 검체로부터 B군 연쇄구균의 검출(24), 기관지폐포 세척액(bronchoalveolar lavage, BAL)이나 폐 생검 조직으로부터 *Legionella*의 직접 검출(25), 메티실린 내성 황색포도상구균(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)의 검출(26) 등 다양한 병원균의 검출에 시도되고 있다. 또한 혈액이나 뇌척수액과 같은 무균 검체에서 모든 세균에 공통적인 시발체를 사용하여 신속하게 세균의 유무를 확인함으로써 불필요한 항생제 사용을 줄이려는 시도도 계속되고 있다(27).

2. 미생물 수(number)의 정량

Real-time PCR에서 증폭산물의 양을 측정하는 방법에는 상대정량(relative quantification)과 절대정량(absolute quantification)이 있다.

상대정량은 기준 유전자(reference gene)와 대상 유전자를 사용하여 각각의 표준곡선을 만들고 이를 이용하여 이들의 증폭정도를 농도로 산출한 후, PCR 간의 변이를 보정하기 위하여 기준 유전자에 대한 대상 유전자의 비율(대상 유전자의 농도/기준 유전자의 농도)을 계산하여 상대적인 정량을 하게 된다. 이때 기준 유전자는 정확한 정량을 위해서 전사가 되지 않는 유전자나 세포의 생존에 필수적이어서 모든 유핵세포에 존재하는 housekeeping 유전자를 사용하여야 한다(10, 28). Real-time PCR을 이용한 상대정량은 주로 병원균의 약제 내성에 관련된 분자생물학적 기전을 연구하거나(29) 치료 효과 판정 시 필요한 병원균의 생존능 평가 및 감염과 관련된 사이토카인(cytokine) 등의 변화를 분석하기 위하여 특정 대상 유전자 표현의 변화를 확인하기 위한 mRNA 정량에 이용되며, 기존에 사용되고 있는 Northern blotting이나 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR) 등의 낮은 예민도와 번거롭고 긴 시간이 소요되는 검사방법 등을 개선하여 신속하고 간편하면서 비교적 정확하고 재현성 높은 결과를 내는 것으로 보고되고 있다(19, 28, 31). 절대정량은 농도를 알고 있는 표준물질(external standard)을 사용하여 표준곡선을 만들고 이를 이용하여 측정하고자 하는 대상 유전자의 농도를 산출해내는 방법으로 대상 유전자와 표준물질의

PCR 효율이 동일하다는 가정 하에서 시행되며, 보다 정확한 정량을 위해서 대상 유전자와 농도를 알고 있는 내부대조 물질을 동시에 증폭시켜 정량하게 된다(10, 14). 감염의 경과를 감시하기 위해서는 세포나 총 RNA 또는 일정 단위당 복사 수(copy number)로 표시할 수 있는 절대정량이 유용하며, 세균이나 바이러스의 load를 측정하여 감염의 활동 정도, 병원균과 숙주의 상호작용 및 치료 효과를 판정하는데 유용한 지표로 이용되고 있다(32-34). 그러나 대부분의 병원균은 높은 빈도의 돌연변이를 보여 절대정량의 결과에 큰 영향을 줄 수 있으므로, 매우 보존적인 부분을 선택하여 검사하는 것이 중요하다(35).

3. 미생물의 유전형 분석, 돌연변이 검출

Real-time PCR을 이용한 돌연변이 검출은 사용하는 소식자의 종류에 따라 분석 원리를 크게 2가지로 나눌 수 있다. 첫째, 'HybProbes'와 같은 linear oligoprobe를 사용하게 되면 melting 곡선 분석을 이용하여 돌연변이를 검출하게 된다. 즉 melting 곡선 분석을 시행하는 동안 ssDNA의 염기서열에 특이한 소식자의 온도 의존적인 보합결합 반응을 감시하여 DNA의 단일 염기변화를 검출하는 것으로, melting 온도가 DNA의 길이, GC 함량 뿐 아니라 두개의 DNA 가닥사이의 상동 정도에도 영향을 받는다는 점을 이용한 방법이다. 따라서 대상 DNA에 돌연변이가 없는 경우 소식자가 대상 DNA와 완전한 보합결합을 하게 되면, 대상 DNA에 돌연변이가 있어 소식자가 불안정하게 보합결합을 한 경우보다 ssDNA로 분리하는데 높은 melting 온도가 요구되어, 이를 melting 곡선 분석에서 구별하게 된다(10, 36). 둘째, 5' nuclease oligoprobes (TaqMan[®])나 hairpin oligoprobes (molecular beacon)를 사용하게 되면, 돌연변이가 있는 경우 소식자가 주형 DNA에 불완전하게 결합하게 되어 PCR의 연장 반응이나 결합반응 중에 reporter dye가 quencher dye로부터 분리되거나 떨어지지 못하게 되므로 형광을 내지 않게 된다. 그러므로 형광이 측정되지 않거나 현저하게 감소되는 현상으로 돌연변이를 검출하게 되며, 이 경우 PCR 과정에 내부대조 물질을 동시에 증폭시켜 증폭 억제에 의한 형광의 감소와 구별하여야 한다(10, 37).

이상의 원리에 의해 real-time PCR은 바이러스의 유전형 검사(38), 결핵균에서 약제 내성과 관련된 *rpoB*, *katG* 및 *inhA* 유전자내의 돌연변이 검출(37), fluconazole 내성 *Candida* 균종에서 내성과 관련된 유전자의 돌연변이 검출(39) 등 각종 병원균에서 내성과 관련된 유전자내 점 돌연변이의 검출에 이용되고 있다.

4. 여러 미생물의 동시 검출

일반적으로 real-time PCR에서 다중(multiplex) 반응의 의미는 여러 개의 증폭산물을 구별하기 위하여 여러 종류의 형광 소식자를 사용하는 것으로 설명되고 있으며, 최근 새로운 형광물질의 결합 뿐 아니라 개선된 시발체와 소식자가 개발되고 있고, 더 나아가 넓은 파장의 빛을 방출할 수 있는 광원이 도입되면서 동시에 구별 가능한 표적 유전자의 수가 증가하고 있다(14). 감염 질환에서는 주로 병원균의 검출을 위하여 다중 real-time PCR을 이용한 방법들이 시도되고 있으며, 단순포진바이러스(herpes simplex viruses, HSV)-1, HSV-2, 수두대상포진바이러스(varicella zoster virus, VZV) 및 장바이러스(enterovirus)의 동시 검출(40), *Escherichia coli* (*E. coli*)의 다른 혈청형으로부터 *E. coli* O157:H7의 구별과 정량(41), 다중 소식자를 이용하여 동시에 세균을 검출하고 균종을 동정하는(42) 등의 보고가 계속되고 있다.

결 론

분자생물학적 기법을 이용한 진단분야에서 real-time PCR의 도입은 핵산 정량을 간단하게 하였고, 감염질환의 진단 영역에서는 1시간 이내의 빠르고 예민한 결과보고와 폐쇄관 분석으로 오염의 위험을 줄일 수 있었다. 특히 임상적으로 감염이 의심되는 경우 미생물 검사결과 보고와의 시간적 차이로 인해 임상자들은 경험적 치료에 의존하게 되어, 바이러스 감염이나 열을 동반하는 비감염 질환의 경우에 불필요한 광범위 항생제의 사용을 초래하게 되고 이는 의료비 증가 뿐 아니라 항생제 내성의 출현에까지도 영향을 미치게 된다. 또한 vancomycin 내성 장구균(vancomycin resistant enterococci, VRE), MRSA 및 환자간 전파가 가능한 병원균에 대한 신속한 real-time PCR의 사용은 불필요한 환자 격리를 막음으로 비용절감의 효과를 더할 수 있다(20). 따라서 신속 또는 응급 미생물 검사는 건강관리 측면에서 치료효과 증대와 비용절감을 위한 매우 중요한 인자로 생각되고 있다(43, 44).

그러나 대부분의 real-time PCR 분석이 높은 정밀도와 재현성을 보이고는 있지만, 결과의 정확도는 검체 처리과정이나 사용한 표준물질과 housekeeping 유전자의 종류와 질 등에 많은 영향을 받고 있어 아직까지는 공인된 다른 방법의 결과와 비교하는 등의 결과 확인 과정이 필요하기도 하다. 그러므로 앞으로 real-time PCR은 검체 처리과정이 증폭과 검출과정에 통합되고, 방법들과 자료

들이 표준화되며, 동시에 여러 가지 병원균을 검출하거나 내성 유전자까지 확인할 수 있는 다중 반응의 개발에 주력할 것으로 기대된다. 그러므로 미생물 검사실은 이러한 기법들의 빠른 변화에 적응하여 병원균의 동정과 그들의 내성 유전자의 검출에 신속하고 예민하며 특이한 real-time PCR을 도입함으로써, 신속한 균종 동정과 항균제 사용의 적절한 지침 제공 등을 통하여 감염질환의 치료에 기여하여야 할 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Mullis KB, Faloona FA: *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol* 155:335-350, 1987
- 2) Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM: *Real time quantitative PCR. Genome Res* 6:986-994, 1996
- 3) Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP: *Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. Biotechniques* 22:130-131, 134-138, 1997
- 4) Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH: *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA* 88:7276-7280, 1991
- 5) Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R: *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology* 10:413-417, 1992
- 6) Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R: *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology* 11:1026-1030, 1993
- 7) Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W: *Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. Nucleic Acids Res* 20:1717-1723, 1992
- 8) Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, Brown T, Little S: *Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. Nat Biotechnol* 17:804-807, 1999
- 9) Clegg RM: *Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. Methods Enzymol* 211:353-388, 1992
- 10) Bustin SA: *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol* 25:169-193, 2000
- 11) Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT: *Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem* 245:154-160, 1997

- 12) Tseng SY, Macool D, Elliott V, Tice G, Jackson R, Barbour M, Amorese D: *An homogeneous fluorescence polymerase chain reaction assay to identify Salmonella*. *Anal Biochem* 245:207-212, 1997
- 13) Komurian-Pradel F, Paranhos-Baccala G, Sodoyer M, Chevallier P, Mandrand B, Lotteau V, Andre P: *Quantitation of HCV RNA using real-time PCR and fluorimetry*. *J Virol Methods* 95:111-119, 2001
- 14) Mackay IM, Arden KE, Nitsche A: *Real-time PCR in virology*. *Nucleic Acids Res* 30:1292-1305, 2002
- 15) Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ: *The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control*. *Biotechniques* 22:176-181, 1997
- 16) Lee LG, Connell CR, Bloch W: *Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes*. *Nucleic Acids Res* 21:3761-3766, 1993
- 17) Tyagi S, Kramer FR: *Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization*. *Nat Biotechnol* 14:303-308, 1996
- 18) Nazarenko IA, Bhatnagar SK, Hohman RJ: *A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer*. *Nucleic Acids Res* 25:2516-2521, 1997
- 19) Bustin SA: *Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems*. *J Mol Endocrinol* 29:23-39, 2002
- 20) Boissinot M, Bergeron MG: *Toward rapid real-time molecular diagnostic to guide smart use of antimicrobials*. *Curr Opin Microbiol* 5:478-482, 2002
- 21) Cockerill FR, Smith TF: *Rapid-cycle real-time PCR: a revolution for clinical microbiology*. *ASM News* 68:77-83, 2002
- 22) Ng EK, Hui DS, Chan KC, Hung EC, Chiu RW, Lee N, Wu A, Chim SS, Tong YK, Sung JJ, Tam JS, Lo YM: *Quantitative analysis and prognostic implication of SARS coronavirus RNA in the plasma and serum of patients with severe acute respiratory syndrome*. *Clin Chem* 49:1976-1980, 2003
- 23) Oggioni MR, Meacci F, Carattoli A, Ciervo A, Orru G, Cassone A, Pozzi G: *Protocol for real-time PCR identification of anthrax spores from nasal swabs after broth enrichment*. *J Clin Microbiol* 40:3956-3963, 2002
- 24) Bergeron MG, Ke D, Menard C, Picard FJ, Gagnon M, Bernier M, Ouellette M, Roy PH, Marcoux S, Fraser WD: *Rapid detection of group B streptococci in pregnant women at delivery*. *N Engl J Med* 343:175-179, 2000
- 25) Hayden RT, Uhl JR, Qian X, Hopkins MK, Aubry MC, Limper AH, Lloyd RV, Cockerill FR: *Direct detection of Legionella species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture*. *J Clin Microbiol* 39:2618-2626, 2001
- 26) Fang H, Hedin G: *Rapid screening and identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from clinical samples by selective-broth and real-time PCR assay*. *J Clin Microbiol* 41:2894-2899, 2003
- 27) Millar BC, Xu J, Moore JE: *Risk assessment models and contamination management: implications for broad-range ribosomal DNA PCR as a diagnostic tool in medical bacteriology*. *J Clin Microbiol* 40:1575-1580, 2002
- 28) Pfaffl MW: *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res* 29:e45, 2001
- 29) Lee MK, Williams LE, Warnock DW, Arthington-Skaggs BA: *Drug resistance genes and trailing growth in Candida albicans isolates*. *J Antimicrob Chemother* 53:217-224, 2004
- 30) Okeke CN, Tsuboi R, Ogawa H: *Quantification of Candida albicans actin mRNA by the LightCycler system as a means of assessing viability in a model of cutaneous candidiasis*. *J Clin Microbiol* 39:3491-3494, 2001
- 31) Fronhoffs S, Totzke G, Stier S, Wernert N, Rothe M, Bruning T, Koch B, Sachinidis A, Vetter H, Ko Y: *A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction*. *Mol Cell Probes* 16:99-110, 2002
- 32) Clementi M: *Quantitative molecular analysis of virus expression and replication*. *J Clin Microbiol* 38:2030-2036, 2000
- 33) Limaye AP, Jerome KR, Kuhr CS, Ferrenberg J, Huang ML, Davis CL, Corey L, Marsh CL: *Quantitation of BK virus load in serum for the diagnosis of BK virus-associated nephropathy in renal transplant recipients*. *J Infect Dis* 183:1669-1672, 2001
- 34) Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N: *Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set*. *Microbiology* 148:257-266, 2002
- 35) Klein D, Leutenegger CM, Bahula C, Gold P, Hofmann-Lehmann R, Salmons B, Lutz H, Gunzburg WH: *Influence of preassay and sequence variations on viral load determination by a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for feline immunodeficiency virus*. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26:8-20, 2001
- 36) Aoshima T, Sekido Y, Miyazaki T, Kajita M, Mimura S, Watanabe K, Shimokata K, Niwa T: *Rapid detection of deletion mutations in inherited meta-*

- bolic diseases by melting curve analysis with LightCycler. *Clin Chem* 46:119-122, 2000
- 37) Garcia de Viedma D: *Rapid detection of resistance in Mycobacterium tuberculosis: a review discussing molecular approaches.* *Clin Microbiol Infect* 9:349-359, 2003
 - 38) Jordens JZ, Lanham S, Pickett MA, Amarasekara S, Abeywickrema I, Watt PJ: *Amplification with molecular beacon primers and reverse line blotting for the detection and typing of human papillomaviruses.* *J Virol Methods* 89:29-37, 2000
 - 39) Loeffler J, Hagmeyer L, Hebart H, Henke N, Schumacher U, Einsele H: *Rapid detection of point mutations by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves in Candida species.* *Clin Chem* 46:631-635, 2000
 - 40) Read SJ, Mitchell JL, Fink CG: *LightCycler multiplex PCR for the laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system.* *J Clin Microbiol* 39:3056-3059, 2001
 - 41) Ihekwe AM, Watt PM, Grieve CM, Sharma VK, Lyons SR: *Multiplex fluorogenic real-time PCR for detection and quantification of Escherichia coli O157:H7 in dairy wastewater wetlands.* *Appl Environ Microbiol* 68:4853-4862, 2002
 - 42) Yang S, Lin S, Kelen GD, Quinn TC, Dick JD, Gaydos CA, Rothman RE: *Quantitative multiprobe PCR assay for simultaneous detection and identification to species level of bacterial pathogens.* *J Clin Microbiol* 40:3449-3454, 2002
 - 43) Doern GV, Vautour R, Gaudet M, Lery B: *Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification.* *J Clin Microbiol* 32:1757-1762, 1994
 - 44) Barenfanger J: *Significantly reduced variable costs, mortality, and length of stay with timely microbiologic procedures.* *Am Clin Lab* 20:26-31, 2001