핵산교잡법과 중합효소 연쇄반응을 이용한 감염질환의 진단

전남대학교 의과대학 병리학교실

박 창 수

감염질환의 적절한 진료를 위하여 원인 병원체를 확인하는 것은 필수적이며 이를 위하여 여러가지 검사방법이 이용되고 있다. 병원체에 감염된 환자의 진단을 위하여 흔히 이용되고 있는 검사방법은 혈청학적 검사와 가검물을 이용한 배양법, 그리고 세포진이나 조직절편을 이용한 조직화학적 염색 및 면역조직화학적 염색 등이 있다. 이러한 검사방법중 배양법은 가장 특이성이 높다고 알려져 있지만 많은 노력을 요하며 상당한 시간이 소요되기 때문에 환자의 신속한 치료에 어려운 점이 있다.

최근에는 분자생물학의 눈부신 발전에 따라 핵산교잡법과 중합효소 연쇄반응법(polymerase chain reaction : PCR)이 감염질환의 진단에 활발히 이용되고 있다. 핵산교잡법의 유형은 액체 교잡법(liquid hybridization)과 고형 받침 교잡법(solid support hybridization)으로 대별되며 후자에는 Southern blotting, northern blotting, dot blot, *in situ* hybridization(ISH), PCR-ISH가 있다. 감염질환의 진단에 있어서 핵산 교잡법과 중합효소 연쇄반응법은 병원체의 종류나 핵산의 양에 따라 선별적으로 이용되고 있다. 일반적으로 환자의 진료를 위하여 이용되고 있는 검사방법은 민감성, 특이성, 신속성이 있어야 하는데, 이러한 특성을 모두 갖춘 검사방법은 드물며 이러한 검사방법의 개발을 위한 노력이 계속되고 있다. 아직은 보편화 되지 않고 있지만 PCR-ISH법이 좀더 만족스러운 성적을 얻을 수 있는 검사방법으로 기대되고 있다.

다음은 핵산 교잡법과 중합효소연쇄 반응법의 원리 및 실험과정상의 주의점 그리고 임상적인 적용에 대하여 간단히 기술한 내용이다.

Southern Blotting

Southern blotting은 검체로 부터 DNA를 추출한 후, 각각의 병원체의 DNA에 대한 상보적인 염기서열을 가진 probe와 검체의 DNA 사이의 핵산 교잡반응에 의하여 병원체를 검출하는 방법이다. 검체로 부터 추출된 핵산은 여러가지 종류의 제한 효소로 처리하면 효소의 특성에 따라 절단되어 다양한 크기의 DNA 절편이 생기며, 전기영동을 시행하면 DNA 절편이 분리된다. 전기영동이 끝난 후 한천 겔에 있는 DNA를 흡착지로 이전(transfer)하면, 한천 겔에 있는 DNA 절편이 옮겨진다. 흡착지에 있는 DNA 절편중 찾고자 하는 DNA를 검출하기 위해서는 DNA에 대한 상보적인 서열을 갖는 probe를 이용해야 한다. 흡착지 위의 DNA와 probe 사이의 DNA-DNA 교잡을 시행하면 원하는 DNA 분절을 확인할 수가 있다. 이와같은 Southern blotting법은 미생물 감염의 진단에 효율적으로 이용되고 있다(Table 1).

Probe의 표지를 위하여 부착시킨 표지자는 방사성 동위원소인 ^{32}P 나 비방사성 물질인 바이오틴(biotin) 등을 이용하고 있다.

일반적으로 Southern blotting의 실험과정중 DNA-DNA의 교잡에 영향을 미치는 인자는 probe의 농도 및 분자량, 반응시간, DNA 염기의 G+C 비율, 반응온도, 포르마마이드 농도, 이온농도, dextran sulfate 사용여부 등이다. Probe의 농도가 증가되면 핵산의 교잡이 증가될 수 있지만 비특이결합(non-specific binding)이 증가하여 좋은 성적을 얻을 수 없다. 핵산의 교잡 반응시간은 액체 교잡에 비하여 10

Table 1. Infectious Organisms Detected by DNA Probes

Viruese	Bacteria
Hepatitis B	Enterotoxigenic
Hepatitis A	Escherichia coli
Cytomegalovirus	Shigella
Adenoviruses	Salmonella
Herpes simplex	Legionella pneumophilia
Measles	Campylobacter
Epstein-Barr	Mobiluncus
Enteroviruses	Mycobacterium
Varicella zoster	tuberculosis
Human papilloma	Staphylococcus aureus
Rotavirus	
HTLV 1	Others
HIV	Trypanosoma
JC virus	Plasmodium sp.
BK virus	Schistosoma
Rubella	Chlamydia
Rhinovirus	Candida

배 이상의 시간이 걸려 통상적으로 10-20 시간이 소요되며, 반응온도는 65℃ 전후에서 시행하면 결합율이 증가된다고 한다. 그러나 반응액에 포함되는 Na^+ 이온의 농도 및 G+C의 비율에 차이가 있고, 각 실험마다 반응에 영향을 미치는 인자들이 있을 수 있기 때문에 실험을 통하여 반응시간이나 온도를 결정하는 것이 좋다. 포르마마이드는 DNA의 화학적인 변성을 유발하는 약제로서 Tm(melting temperature of the duplex)을 낮추어 주는 효과가 있다. 낮은 온도에서 DNA-DNA 교잡을 시행하면 흡착지의 DNA와 결합된 probe의 상태가 양호하여 결합상태를 잘 유지할 수 있기 때문이다. Dextran sulfate는 5-10% 농도가 되게 반응액에 추가함으로써 probe의 농도를 실제보다 더 높이는 효과를 가져온다.

교잡결합이 끝나면 2x SSC를 이용하여 세척을 한다. 즉 probe와 유전자 서열이 유사하여 나타날 수 있는 교차 교잡(cross-hybridization)을 방지하기 위함이다.

Northern Blotting

일반적으로 RNA의 80-85%는 라이보좀 RNA(rRNA)가 차지하고 있으며 나머지의 대부분은 운반 RNA(tRNA)이다. 반면에 전령 RNA(mRNA)는 전체 RNA의 1-5% 정도만 차지하며 크기나 핵산 서열이 매우 다양하다. Northern blotting은 RNA를 검출하는 교잡법으로서, 원리는 DNA를 분석하는 Southern blotting과 유사하다.

교잡결합은 적당한 온도에서 12시간 이상 시행하며 교잡결합 후 원하는 전령 RNA에만 probe가 결합될 수 있도록 가능한 한 철저하게 세척을 한다. 검체로부터 RNA를 추출하는 작업은 DNA를 추출하는 것보다 복잡하다. RNA는 한가닥으로 되어 있어서 RNA 분해효소(RNase)에 의해 쉽게 분해된다. 더구나 RNA 분해효소는 안정성을 갖고 있어서 그 활성이 주위 조건의 변화에 따라 쉽게 억제되지 않는다. 따라서 RNA를 분해되지 않도록 하는 것이 northern blotting의 가장 중요한 과정이라고 할 수 있다. 이를 위하여 시약이나 초자기구를 RNA 분해효소에 오염되지 않게 준비하는 것이 중요하다. 실험과정에서는 가능하면 멸균된 일회용 플라스틱 제품을 이용하는 것이 좋다. 그러나 일회용 제품이 아닌 초자 기구 및 플라스틱 제품을 사용할 경우에는 이러한 용기들이 RNA 분해효소에 의해 오염되어 있을 수 있기 때문에 특별한 처리를 해야 한다. 즉 고온멸균과 RNA 분해효소 억제제인 diethyl pyrocarbonate(DEPC) 등으로 처리하며, 가능한 한 northern blotting에 사용하는 기구는 다른 종류의 분자생물학적 수기에 함께 이용하지 않는 것이 좋다.

In Situ Hybridization

분자생물학적 기법중에서 형태학과 분자생물학을 접목시켜 주는 *in situ* hybridization(ISH)은 감염질환의 진단에 유용하게 이용할 수 있는 검사방법이다. ISH는 probe를 이용하여 염색체나 세포 그리고 조직에서 찾고자 하는 DNA나 RNA를 검출하는 방법으로 세포나 조직의 형태가 보존된 상태에서 양성신호(positive signal)를 확인할 수 있는 특이성이 높은 검사 방법이다. 그러나 ISH법은 Southern blotting이나 중합효소 연쇄반응법에 비하여 민감성이 낮다. 따라서 검체에서 핵산을 좀더 민감하게 검출할 수 있도록 조직의 적절한 고정, 특이성이 높은 oligoprobe의 개발 그리고 신속하고 민감한 검사방법의 개발을 위한 노력이 이루어 지고 있다.

인체의 병소에서 채취한 검체물은 세포나 조직내의 핵산이 잘 보존될 수 있도록 신속하고 적절한 고정이 필요하다. 고정이 끝난 생검 조직은 통상의 방법에 따라 파라핀 절편을 제작한 후 poly-L-lysine으로 처리한 슬라이드나 Probe On plus 슬라이드 위에 조직절편을 붙인다. 이러한 파라핀 절편은 건조기에서 충분히 건조시킨 다음 파리핀을 제거하고 탈수시켜서 실험에 이용한다. 검체는 통상적으로 10% 포르말린에 고정하기 때문에 고정액의 교차결합에 의하여 핵산의 노출이 용이하지 않다. 따라서 probe가 핵산 쪽으로 잘 침투 할 수 있도록 단백분해 효소로 전처치한 후에 교잡을 시행한다. 단백분해 효소는 trypsin, proteinase-K, pronase, pepsin 등이 사용되고 있으며, 반응시간은 검체의 종류나 조직절편의 두께 그리고 효소의 농도에 따라 결정한다.

ISH에 이용되는 probe는 cDNA probe, RNA probe(Riboprobe) 그리고 oligonucleotide probe (Oligoprobe) 등이 있으며 표지자로서 방사성 동위원소나 비방사성 물질인 biotin, digoxigenin, FITC 등을 부착시켜 이용한다. 그러나 동위원소는 취급하는데 주의를 요하고, 폐기물의 처리, 연중 사용량의 규제 및 반감기에 따른 문제점 그리고 검사기간이 오래 걸리기 때문에 동위원소가 부착된 probe를 임상검사에 실질적으로 이용하는데는 다소 어려운 점이 있어서 비방사성 물질을 부착시킨 probe를 이용한 colorimetric ISH법이 통상적으로 이용되고 있다. Colorimetric ISH법은 1 시간내에 끝낼 수 있는 신속하고 간편한 검사방법으로서 교잡반응은 100℃에서 65℃까지 단계적으로 온도를 변화시킴으로서 핵산의 검출이 용이 하도록 한다. Nick translated probe를 이용할 경우에는 한가닥으로 만들기 위한 변성과정이 필요하므로 oligoprobe를 이용할 때와는 다르게 100℃에서 5분이상 부치시킨다. Oligoprobe는 한가닥이며 DNA합성기를 이용하여 비교적 쉽게 합성할 수 있고 20-50 bp (base pair)로 염기서열이 짧아서 세포나 조직을 잘 투과할 수 있으므로 민감성이 높아서 ISH에 유용하게 이용되고 있다. 교잡반응이 끝난 후 비특이적으로 결합한 probe를 제거할 목적으로 2X SSC로 세척한다. 양성 신호를 관찰하기 위한 검출계(detection system)는 바이오틴을 부착시킨 경우 바이오틴과 강한 결합력의 원리를 이용한 streptavidin-alkaline phosphatase나 streptavidin-horseradish peroxidase를 이용하고, digoxigenin은 anti-digoxigenin alkaline phosphatase를, FITC는 anti-FITC alkaline phosphatase를 이용한다. 발색제는 alkaline phosphatase에 대해서는 Fast Red TR salt, BCIP\ INT, BCIP\NBT 등을 horseradish peroxidase는 diaminobenzidine(DAB), aminoethylcarbazole (AEC)를 이용한다. 발색과정이 끝난 후 헤마톡실린으로 대조염색을 시행하고 봉입하여 현미경 상에서 양성 신호를 확인한다.

이와같은 colorimetric *In situ* Hybridization은 염색체, 세포도말, 접촉표본, 냉동조직 절편 그리고 파라핀 절편 등의 검체물을 이용할 수 있으며 probe가 준비되어 있으면 한시간 이내에 원하는 결과를 얻을 수 있는 유익한 검사수기이다. RNA를 관찰하는 경우에는 northern blotting과 마찬가지로 모든 용액을 DEPC처리가 된 탈이온수로 만들어야 한다.

PCR-*In Situ* Hybridization(PCR-ISH)

PCR-ISH는 조직절편내에서 중합효소연쇄반응을 실시한 후 이차적으로 ISH를 시행함으로서 민감성과 특이성을 증가시키는 최첨단의 분자생물학적 검사방법이다. 검사방법은 진행과정에 따라 중합효소연쇄반응 후 ISH를 시행하는 간접법과 동시에 두과정을 시행하는 직접법으로 구분되고 있는데 배경염색 등의 문제점 때문에 직접법의 이용도가 점차 증가되고 있는 추세이다. 실험과정은 Probe On Plus 슬라이드에 4μ 두께의 조직절편을 부착시켜 충분히 건조한 후에 파라핀을 제거하고 알코올을 이용하여 함수시킨다. 0.2N HCl과 아주 낮은 농도의 단백분해효소로 처리하여 반응시약들의 침투가 용이하도록 한다.

중합효소 연쇄반응은 슬라이드를 80℃로 가열한 상태에서 직접 반응 혼합물 50μl을 첨가한다. 반응 혼합물로 슬라이드를 덮은 후, 건조를 방지할 목적으로 미네랄 오일을 도포하거나 커버 글라스(cover glass)로 덮고 glass coverslip sealant(Oncor)로 봉입한 후 반응을 시작한다. 반응이 끝난 후 커버글라스를 제거하고 완충액으로 씻은 후 ISH과정을 시행한다. 직접법의 경우 digoxigenin-dUTP를 이용하므로서 반응이 끝난 후 anti-digoxigenin alkaline phospha-

tase를 반응시키고 BCIP/NBT로 발색과정을 시행한다. 가능하면 실험을 할 때마다 양성 및 음성 대조군을 이용하는 것이 좋다.

최근에는 특이성을 좀 더 증대시키기 위하여 RT PCR-ISH(Reverse Transcription Polymerase Chain Reacion-*In Situ* Hybridization)법이 이용되기 시작하고 있다. 이는 조직절편에 DNA 분해효소를 충분히 처리하여 DNA를 분해한 후 남아있는 mRNA를 역전사함으로서 DNA를 합성하고 이를 증폭시키는 원리이다. 앞으로 RT PCR-ISH는 앞으로 감염성 질환의 진단 및 연구에 많은 도움이 될 수 있을 것으로 생각한다.

중합효소 연쇄반응법 (Polymerase Chain Reaction)

중합효소 연쇄반응법은 감염질환의 진단에 가장 활발하게 이용되고 있는 검사방법으로서 한쌍의 primer와 DNA 중합효소(polymerase)의 연속적인 반응을 이용하여 소량의 DNA를 간편하게 대량으로 증폭하는 방법이다. DNA 중합효소는 한 가닥의 DNA를 주형(template)으로 이용하여 이에 상보적인 서열을 갖는 DNA를 합성하게 되는데, 이를 위하여 작은 DNA 조각인 primer가 필요하다. 따라서 적당한 primer를 이용하면 원하는 DNA 영역을 합성 및 증폭할 수 있다. 생체의 DNA는 두 가닥으로 되어 있으므로 분석하려고 하는 DNA영역의 양쪽 끝의 짧은 서열을 포함하는 한쌍의 primer가 필요하다.

중합효소 연쇄반응법을 이용하면 검체중의 분석하려는 DNA 영역을 수십만 배로 증폭할 수 있는데, 이를 위해서는 중합효소 연쇄반응이 최적의 조건이 될 수 있도록 여러가지 인자들을 알맞게 조절해야 한다(Table 2). 즉 실험과정에 있어서 추출된 DNA의 순도는 반응의 효율에 영향을 미치므로 될 수 있는한 순수한 DNA를 얻는 것이 좋다. Primer는 DNA합성기를 이용하여 합성하는데 대개 15-30 염기의 oligonucleotide를 이용한다. 반응액 중에 주형 DNA에 비해 primer의 농도가 매우 높을 경우에는 두 primer의 3′ 말단 부근끼리 상호작용이 일어날 수 있어서 반응 과오산물(artifact)의 원인이 될 수 있다. dNTP는 Mg^{++}과 결합하므로 마그네슘의 농도는

Table 2. Parameters to Evaluate for PCR Optimization

Primer design and concentration
$MgCl_2$ concentration
Taq polymerase concentration
dNTP concentration
Presence of cosolvents
Cycling Profile
Denaturation temperature and time
Annealing temperature and time
2 versus 3 temperature cycling

dNTP 농도와 관계된다. 따라서 마그네슘 이온의 농도는 매우 중요하다. 효소의 안정화를 위하여 가압멸균한 젤라틴이나 우형 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)을 첨가한다.

Saiki 등에 의해 중합효소 연쇄반응법이 최초로 고안되었을 때는 Klenow 효소가 이용되었고 매 주기(cycle)마다 효소 첨가가 필요하여 매우 번거롭고 비경제적있으나 Thermus aquaticus에서 내열성 중합효소가 발견되어 중합효소 연쇄반응법에 큰 발전을 가져왔다. Taq ploymerase는 94-95℃에서도 안정성을 갖으므로 중합효소 연쇄반응법을 쉽게한다. 최근에는 대장균에서 클로닝한 재조합 Taq polymerase가 많이 이용되며 최적반응 온도는 75-80℃이고, 최적 pH는 8.3-8.8이다.

결합 반응(annealing)은 DNA 주형과 primer의 종류에 따라 결합 온도를 조정하며, 적합한 온도의 설정은 전기영동에서 비특이적 띠의 출현을 방지할 수 있다. 반응 회수는 n회 싸이클의 반복 후 2^n배의 DNA 증폭되는 것으로 계산할 수 있는데, 보통 20-30싸이클의 반응이 이용된다. 그러나 실제로는 중합효소 활성의 소실, 반응의 진행에 따른 기질(주형 DNA와 중합효소의 복합체)의 증가 등 여러인자의 영향으로 실제로 증폭되는 양은 적을 수 있다. 반응 싸이클의 불필요한 증가는 비특이적인 증폭이 일어날 수 있어서 권장되지 않고 있지만 반응 시작 때의 DNA 농도가 매우 적은 경우에는 유용하다.

중합효소 연쇄반응법 자동화장치는 중합효소 연쇄반응법 반응의 온도조절을 자동적으로 반복해 줌으로서 온도의 정확성, 재현성 및 단순성 등을 가능하게 하므로서 양질의 결과를 얻을 수 있다.

중합효소 연쇄반응법은 높은 민감성 때문에 검체

Table 3. Use of PCR for Detection of Microorganisms

Microorganisms	Tissues
BK and JC virus	Urine, Paraffin-embedded tissue
Chlamydia trachoma	Elementary bodies, conjunctival samples
CMV	Urine, peripheral blood, paraffin-embedded tissue, necropsy tissue from skin, lung, throat swabs
EBV	Tissue biopsy, necropsy tissue, throat swabs
HIV	Peripheral blood, endoscopy swabs, various tissue samples
Human B-lymphotrophic virus	Peripheral blood, tumor tissue
HTLV-I	Peripheral blood, tumor tissue
HTLV-II	Peripheral blood
HBV	Peripheral blood, cord blood, colostrum, liver, paraffin-embedded tissue, aspirates and biopsy of numerous tissues
HPV	Cervical smear and lavage, paraffin-embedded tissue, aspirates and biopsy of numerous tissues
HSV	Paraffin-embedded skin punch biopsies
Measles	Paraffin-embedded material
Mycobacteria	Sputum, lymph node biopsy, gastric and abscess aspirates
Mycoplasma	Throat wsabs, bronchoalveolar lavages
Parvovirus B19	Sera, placenta, fetal tissue, paraffin-embedded tissue
Rhinovirus	Various
Rickettsia, rickettsii	Pufified rRNA
Toxoplasma	Peripheral blood, crude cell lysates
Trypanosoma cruzi	Insect vectors, various cell isolates

자체가 아닌 외부의 다른 검체에서 유래된 DNA가 동시에 증폭될 경우 위양성을 보일 수 있으며 증폭시킬 검체의 양이 적을수록 가능성은 더 높다. 따라서 이러한 오염을 방지하려면 우선 증폭된 산물간에 서로 DNA의 이동이 일어나지 않게 하고, 또한 양성(positive) 및 음성(negative) 대조를 병행하는 것이 필요하다. 특히 파라핀 블록을 이용하여 실험을 할 경우에는 박절용 칼이 청결하여야만 DNA의 이월(carry over)현상이 나타나지 않는다. 중합효소 연쇄반응에서 발생할 수 있는 이월현상이나 위양성을 감소시키기 위하여 asymmetric PCR, inverse PCR, anchored PCR법 등이 시도되고 있다.

중합효소 연쇄반응법은 인체 병원균을 검출하는데 이용되고 있는데, human papilloma virus, HIV-1 and -2, HTLV-1 and -II, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, Herpes simplex virus, human herpesvirus-6, hepatitis B virus, hepatitis C virus, JC and BK viruses, rubellar virus, mycobacteria, Toxoplasma gondii, Trypanosoma cruzi 등에 관한 보고가 많다(Table 3). 현재 중합효소 연쇄반응법이 적용되는 인형유두종 바이러스의 아형은 6, 11, 16, 18, 32 등이며 primer 합성은 E6 영역에 가장 많이 이용되며 E1, E2, E5, E7 영역을 이용하기도 한다. 중합효소 연쇄반응법에 의한 HPV DNA 검출의 민감성은 매우 높아서 Southern blotting으로 검출이 불가능한 경우에도 검출이 가능하다. 따라서 유두종 바이러스의 검출과 동정에 중합효소 연쇄반응법은 가장 강력한 연구수단이다.

실험실에서 중합효소 연쇄반응법을 시행하는 데는 검사비, 속도(speed) 그리고 고식적인 배양법과 혈청학적 방법의 신뢰성 등에 좌우된다. 연구목적에 따라 DNA가 아닌 RNA를 이용한 RT-PCR을 시행하는 경우도 있다. 또한 핵산을 증폭하거나 복제할 수 있는 방법으로 ligation amplification reaction, transcription-based amplification reaction 및 α β amplification 등이 소개되고 있다.

이와같이 PCR은 분자생물학 분야에서 이용되고 있는 검사방법중 가장 많이 쓰이는 기법의 하나이며, 단순성, 높은 감수성 및 광범위한 이용성 등 여러 장점이 있지만, DNA 오염이나 이월 등의 문제점도 갖고

있다. 실험실에서 중합효소 연쇄반응을 간편하게 이용할 수 있도록 자동화된 기계, 양질의 시약 및 상세한 검사수기 등이 소개되고 있으며 새롭게 변형된 방법을 통하여 실험과정에서 발생되고 있는 문제점들이 개선되어 가고 있다.