

유전성 질환 및 감염성 질환의 진단을 위한 PCR의 적용*

계명대학교 의과대학 가정의학교실¹, 외과학교실², 임상병리학교실³, 미생물학교실⁴, 피부과학교실⁵

신동학¹ · 배옥석² · 전효진³ · 김재룡³ · 서민호⁴ · 이규석⁵ · 박우현²

=Abstract=

PCR Application for Diagnosis of Genetic and Infectious Diseases

Dong-H Shin¹, Ok Suk Bae², Hyo Jin Chun³,
Jae Ryong Kim³, Min Ho Suh⁴, Kyu Suk Lee⁵, and Woo Hyun Park²

*Departments of Family Medicine¹, Surgery², Clinical Pathology³, Microbiology⁴ and Dermatology⁵
Keimyung University, School of Medicine, Taegu, Korea*

Background : For evaluation of rapid and sensitive tools for diagnosis of tuberculosis, leprosy and HBV infection, and reliable tools for prenatal diagnosis and carrier detection of hemophilia A, we have performed polymerase chain reaction(PCR) amplifications using various clinical specimens.

Methods : PCR amplifications were used to detect tuberculosis, leprosy, hepatitis B and hemophilia A from various clinical specimens. In the PCR of tuberculosis, oligonucleotide pairs for *M. tuberculosis* IS6110 DNA were used as primers and *M. tuberculosis* H37Rv strain was used as a positive control, and amplified products of 123 bp fragments were detected. In the PCR of leprosy, oligonucleotide pairs specific for *M. leprae* DNA were used as primers and amplified products of 530 bp fragments were detected. In the PCR of hepatitis B, oligonucleotide pairs specific for HBV DNA(1763-1792 and 2032-2003) were used as primers and amplified products of 270 bp fragments were detected. In the PCR of *Bcl* I-RFLP, oligonucleotide pairs for intron 18 in fator VIII gene were used as primers and after digestion of 142 bp amplified products with *Bcl* I, two alleles i.e. negative allele(142 bp) and positive allele(99 and 43 bp) were identified.

Results : In the *M. tuberculosis* PCR, positive results were obtained in 16 of 20(80.0%) sputums and seven of 10(70.0%) cerebrospinal fluids. In the *M. leprae* PCR, positive results were obtained in four of four(100%) biopsy specimens of Lepromatous leprosy(LL) and three of three(100%) biopsy specimens of Borderline lepromatous leprosy (BL). In the HBV PCR, positive results were obtained in 40 of 40 (100%) HBs antigen positive sera, and four HBs antigen negative sera were all negative by PCR. In the PCR of *Bcl* I RFLP within

*이 연구는 1992년도 동산의료원 특수과제연구비(의료원 제안과제)로 이루어졌다.

factor VIII, gene frequency with negative allele and positive allele were 15.5% and 84.5% respectively, and female heterozygosity rate was 28.1% and heterozygosity rate of hemophilic carrier was 31.1%.

Conclusions : These results showed that the PCR provides very sensitive and effective tools for the accurate and rapid diagnosis of tuberculosis, leprosy, hepatitis B and hemophilia A.

Key Words : PCR, Tuberculosis, Leprosy, Hepatitis B, Hemophilia A

서 론

중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, 이하 PCR)은 특정한 부위의 DNA를 단시간 내에 시험관 내에서 증폭할 수 있는 방법이다[1-4]. 이 반응은 높은 민감도와 특이성이 있어서 증폭을 원하는 단 하나의 염기서열만 있어도 검출이 가능하기 때문에 기초연구 및 임상연구에 널리 응용이 가능하게 되었다. Hemophilia, sickle cell anemia, cystic fibrosis 등과 같은 유전 질환의 기초 연구와 산전 진단, 당뇨병과 같은 유전적 소인이 있는 질환에 대한 연구, 암발생과 관련 있는 유전자 돌연변이에 대한 연구 및 암의 진단과 치료, 각종 세균성 및 바이러스 감염 질환의 진단, 장기이식, 법의학에의 응용, 장기이식, 공중보건학 등 여러 분야에 적용할 수 있다. 또한 direct sequencing, mutation detection, 유전자 발현 검색, restriction fragment length polymorphism (RFLP) 분석, cDNA cloning, gene mapping 등의 기초 연구에도 응용되고 있으며, 앞으로 계속 응용 분야가 확대 발전되어 나갈 것으로 기대하고 있다[3-5].

특히 이러한 PCR기법이 임상적인 유용성이 높을 것으로 기대되는 분야에 대해서는 국내의 현실을 감안한 체계적인 연구가 있어야 되겠다. PCR기법으로 결핵균 및 나균의 동정에 민감도와 특이도를 높이면서 검사기간을 단축시켜 결핵 및 나병을 조기에 발견하고, 적절한 치료 및 예후 판정에 활용할 수 있다[6-17]. 그리고 나균 배양은 아직까지 성공하지 못하여 희균성 나병의 진단에 상당히 어려움이 많아 임상 소견과 여러가지 세균학적 및 조직학적 방법을 이용하여 추정 진단하는 경우가 많았는데, PCR기법을 이용한다면 나병을 조기에 진단하여 전염 예방 및 병의 조기 치료에 효율적인 정보를 얻을 것으로 기대된다. 또한 바이러스,

특히 우리나라 사람에 보유율이 높은 B형간염바이러스와 장기이식 환자 및 면역결핍환자에 문제가 되는 CMV의 준임상적 감염, 내부장기감염, 보균자 발견, 내성균 검색, 재발 방지 등에도 본질적인 자료를 제공하여 환자 진료에 결정적인 도움이 될 것이다[18-22]. 그리고 각종 유전 질환 중에 우리나라에 유병률이 비교적 높은 혈우병과 뒤시엔느형 근이양증의 보인자 검색 및 산전 진단에 사용되고 있는 고전적인 방법인 phenotypic method는 오진의 가능성성이 높기 때문에 PCR에 의한 정확한 진단이 요망되며 나아가 preimplantation 진단에도 활용할 수 있을 것이다[23-31]. 저자들은 이러한 국내외적인 지견을 바탕으로 분자생물학의 첨단 연구 기법인 PCR을 이용하여 결핵균, 나균, B형간염바이러스 등을 단시간 내에 검색할 수 있고, 높은 민감도를 가지는 검사 방법을 모색하고, A형 혈우병의 산전 진단 및 보인자 검색을 위한 진단 체계를 확립할 목적으로 이 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 결핵균의 PCR검색

계명대학교 동산의료원 외래 및 입원 환자 중에서 임상적 및 방사선학적으로 결핵으로 의심되는 환자로 부터 채취한 객담 20예 및 뇌척수액 10예를 실험에 사용하였다.

공시균주는 한국 결핵연구원으로부터 분양 받은 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv를 사용하였으며, 염색체 DNA의 분리를 위하여 균을 Sauton배지에 2-4주간 배양한 후, bead-beater용 튜브에 균액을 넣고 원심하여 침사를 얻은 후, Tris-EDTA-NaCl(TEN) buffer와 Tris saturated phenol과 chloroform-isoamyl alcohol과 zirconium bead (0.1mm 크기)를 넣은 후 bead-beater로 2분간 진탕시켰다.

-신동학 외 유전성 질환 및 감염성 질환의 PCR-

이것을 12,000 rpm에서 10분간 원심 후 상층액을 microfuge tube로 옮긴 후 chloroform-isoamyl alcohol을 넣고 섞은 후 원심하여 상층액을 새 투브로 옮겼다. 여기에 3 M sodium acetate (pH 5.6)과 cold absolute ethanol을 넣고 -20°C에 20분 방치 후, 끝을 굽힌 pasteur pipette으로 DNA를 건져서 cold 70% ethanol이 들어 있는 투브에 넣고 섞은 후 원심하여 상층액을 제거하였다. Speedvac건조기로 침사를 건조시킨 후 소량의 중류수에 녹이고 UV spectrophotometer로 DNA의 순도 측정 및 정량을 실시한 후 PCR에 사용하였다.

객담에서의 DNA분리는 멸균된 2% NaOH를 객담과 동량이 되게 넣고 강하게 진탕시킨 후 37°C 수조에 15분 방치시키고 3,000 rpm에서 30분간 원심하였다. 상층액을 제거하고 1 mL의 생리식염수로 부유시켜, 그중 200 μL를 bead-beater용 투브에 넣고 microfuge에서 5분간 원심한 후 상층액을 제거하고 100 μL의 TEN buffer, 50 μL의 Tris saturated phenol, 50 μL의 chloroform-isoamyl alcohol을 넣고 zirconium bead (0.5 mm 크기)를 100 μL수준까지 넣은 후 bead-beater로 2분간 진탕시켰다. 이것을 12,000 rpm에서 10분간 원심 후 상층액을 microfuge tube로 옮긴 후 0.1 부피의 3 M sodium acetate (pH 5.6)와 3 부피의 cold absolute ethanol을 넣고 -20°C에 20분 방치 후, 원심하고 상층액을 제거한 후, cold 70% ethanol이 들어 있는 투브에 넣고 섞은 후 원심하여 상층액을 제거하였다. Speedvac 건조기로 침사를 건조시킨 후 20-30 μL의 중류수에 녹여서 PCR에 사용하였다.

뇌척수액에서의 DNA분리는 뇌척수액 2 mL를 bead-beater용 투브에 넣고 12,000 rpm으로 10분간 원심하고 상층액을 제거한 후, TEN buffer, Tris saturated phenol, chloroform-isoamyl alcohol, zirconium bead (0.1 mm 크기)를 넣은 후 bead-beater로 2분간 진탕시켰다. 이것을 12,000 rpm에서 10분간 원심 후 상층액을 microfuge tube로 옮긴 후 3 M sodium acetate (pH 5.6)와 cold absolute ethanol을 넣고 -20°C에 20분 방치 후, 원심하고 상층액을 제거한 후, cold 70% ethanol이 들어 있는 투브에 넣고 섞은 후 원심하여 상층액을 제거하였다. Speedvac 건조기로 침사를 건조시킨 후 20-30 μL의 중류수에 녹여서 PCR에 사용하였다.

Oligonucleotide primers는 *M. tuberculosis* IS6110

DNA절편에 특이하게 결합하는 20mer의 sense primer와 20mer의 antisense primer를 PCR에 사용하였으며, PCR된 DNA산물은 123 bp였고 각 primer의 염기서열은 다음과 같다[6].

Sense primer : 5'-CCTGCGAGCGTAGGGCGTCG-G-3'

Anti-sense primer : 5'-CTCGTCCAGCGCCGCT-TCGG-3'

DNA시료의 전처치는 *M. tuberculosis* H37Rv DNA는 95°C에서 5분간 가열 후 얼음에 5분간 세운 후 PCR에 사용하였다. 예민도 검사를 위해서는 *M. tuberculosis* H37Rv DNA를 50 ng/5 μL에서부터 0.5 fg/5 μL까지 10배씩 계단화석하여 PCR에 사용하였다. 특이도 검사를 위한 각종 DNA들은 다음과 같이 처리하여 PCR에 사용하였다. 즉, pBR322 DNA는 Birnboim 및 Doly 법으로 plasmid DNA를 분리하고 제한효소 *Bam*HI으로 절단 후 PCR에 사용하였고, B형간염 바이러스 cDNA는 Birnboim 및 Doly 법[1]으로 cloned plasmid DNA를 분리하고 제한효소 *Bam*HI으로 절단 후 agarose gel에서 전기영동하여 나타난 3.2 kb band의 gel부위를 잘라내고, [Gene clean 컷트] (BIO 101, La Jolla, USA.)를 사용하여 cDNA를 분리한 후 PCR에 사용하였다. λ 박테리오파지 DNA는 Perkin Elmer Cetus사 (USA)의 상품을 PCR에 사용하였다. 인간 정상혈액 DNA는 정상인 혈액 10 mL를 채혈 후 Kunkel 등[9]의 방법에 의해 genomic DNA를 분리한 후 PCR에 사용하였다.

PCR조건은 먼저 DNA 시료를 94°C에서 60초간 예열하여 DNA를 변성시킨 후, 다음과 같은 조건으로 30회 PCR을 시행하였다. PCR의 총량은 50 μL로 하였고, 0.5 mL microtube(Sarstedt, Germany)를 사용하였다. 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 0.01% (wt/vol) gelatin이 함유된 reaction mixture (Perkin Elmer Cetus사, USA)를 사용하였고, 각각 200 μM의 dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Perkin Elmer Cetus사, USA)와 2.5 unit의 Taq DNA polymerase (Perkin Elmer Cetus사, USA)를 사용하였다. primer들은 각각 1 μM씩 사용하였으며 최종적으로 30 μL의 mineral oil (Perkin Elmer Cetus사, USA)로 덮은 후 PCR을 실시하였다. DNA denaturation은 94°C에서 60초, primer annealing은 60°C에서 120초, DNA extension은 72°C

에서 180초간 실시하였고 마지막(30 cycle) 단계의 extension시간은 600초간 실시하였다. PCR에 사용한 장비는 미국 Ericomp사의 Easy Cycler (수냉식)를 이용하였다. 매 실험마다 *M. tuberculosis* H37Rv DNA를 양성대조군으로 사용하였고, DNA시료를 제외한 모든 것이 함유된 것을 음성대조군으로 사용하였다.

전기영동에 의한 PCR산물의 검색은 PCR산물 10 μL를 취하여 2 μL의 gel loading buffer (Type I)와 섞은 후 ethidium bromide가 함유된 1.5% agarose gel에 접종 후 1 X Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer와 minigel 영동기로 100 volt, 30분간 수평형 잠수식 전기영동을 실시한 후, UV transilluminator (302 nm파장)와 Polaroid camera를 이용하여 사진 촬영한 후 123 bp 크기의 DNA band 유무를 보아 확인하였다. 이때 DNA size marker로는 123 DNA ladder (BRL사, USA)를 사용하였다.

2. 나균의 PCR검색

가검률은 계명대학교 동산의료원 내원환자 중에서 임상 및 병리조직학적으로 나병으로 진단된 Lepromatous leprosy(LL) 4예 및 Borderline lepromatous leprosy (BL) 3예 등 7예의 환자 피부 병변부를 생검하여 냉동조직절편으로 액화질소에 보관하면서 실험에 사용하였다.

PCR에서 양성 대조군으로 사용한 나균은 대한 나균리협회에서 분양 받아 사용하였으며, 나균주에서의 DNA 분리는 나배양된 균주액 100 μL에 100 μL의 lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.5, 0.05% Tween 20, 60 μg/ml proteinase K)를 혼합하고 60 °C에서 18시간 배양한 후 97°C에서 15분간 가열하여 분리된 나균 DNA를 양성대조군으로 PCR에 사용하였다. 생검조직에서의 DNA 분리는 액화질소에 보관한 냉동조직절편 (6 μm)을 lysis buffer 100 μL에 녹인 후, 60°C 수조에서 18시간 배양한 다음 97°C에 15분간 가열하여 DNA를 분리하였다.

Oligonucleotide primers는 *M. leprae* DNA 절편에 특이하게 결합하는 19mer의 sense primer와 18mer의 antisense primer를 PCR에 사용하였으며, PCR된 DNA산물은 530 bp였고 각 primer의 염기서열은 다음과 같다[12].

Sense primer : 5'-CTCCACCTGGACCGGCGAT-

3'

Anti-sense primer : 5'-GACTAGCCTGCCAAG-TCG-3'

PCR조건은 먼저 DNA 시료를 95°C에서 60초간 예열하여 DNA를 변성시킨 후, 결핵균 PCR의 경우와 같은 조건으로 32회 PCR을 시행하였다. DNA denaturation은 94°C에서 120초, primer annealing은 55°C에서 120초, DNA extension은 72°C에서 180초간 실시하였고 마지막 (32 cycle) 단계의 extension 시간은 300초간 실시하였다. 매 실험마다 *M. leprae* DNA를 양성대조군으로 사용하였고, DNA시료를 제외한 모든 것이 함유된 것을 음성대조군으로 사용하였다. 전기영동에 의한 PCR산물의 검색은 결핵균 PCR의 경우와 같은 조건으로 실시하였다.

3. B형간염바이러스의 PCR검색

가검률은 계명대학교 동산의료원 외래 및 입원 환자 중 HBs antigen 양성환자의 혈청 40예 및 정상 혈청 4예를 실험에 사용하였다. 모든 혈청은 -20°C에 보관하며 사용하였다.

양성대조군으로는 B형간염바이러스 DNA (cloned HBV DNA)를 사용하였으며, 음성대조군으로는 정상혈청, 수두-대상포진바이러스 Oka strain, 엘스타인-바 바이러스(EBV), 인간 세포거대바이러스(HCMV) AD 169 ATCC VR-538, 인간 단순포진바이러스 ATCC VR-733 등을 실험에 사용하였다.

Oligonucleotide primers는 B형간염바이러스 DNA 염기서열 1763에서 1792사이의 30mer를 sense primer로 사용하였고, 2032에서 2003사이의 30mer를 antisense primer로 사용하여 PCR을 실시하였다. PCR 된 DNA산물은 270 bp였으며, 각 primer의 염기서열은 다음과 같다[19].

Sense primer : 5'-GCTTTGGGGCATGGACAT-TGACCCGTATAA-3'

Anti-sense primer : 5'-CTGACTACTAATTCCC-TGGATGCTGGGTCT-3'

DNA시료의 전처치는 혈청 50 μL에 0.2 M NaOH 50 μL를 넣고 37°C에서 1시간 방치 후 0.2 N HCl 50 μL를 가하여 중화시켰다. 이것을 95°C에 600초간 가열하고 원심한 후 상청액 20 μL를 PCR에 사용하였다.

PCR은 결핵균 PCR의 경우와 같은 조건으로 30

- 신동학 외 유전성 질환 및 감염성 질환의 PCR -

회 실시하였다. DNA denaturation은 94°C에서 90초, primer annealing은 42°C에서 90초, DNA extension은 72°C에서 180초간 실시하였다. 매 실험마다 클론된 B형 간염바이러스 cDNA를 양성대조군으로 사용하였고, 음성대조군으로는 DNA시료를 제외한 모든 것이 함유된 것을 사용하였다. 전기영동에 의한 PCR산물의 검색은 결핵균 PCR의 경우와 같은 조건으로 실시하였다.

4. A형 혈우병인자의 PCR검색

동산의료원, 경북대병원 및 영남의료원등 대구지역 3개 대학병원에 등록된 A형 혈우병 31가계 구성원 104명(33명의 혈우병환자를 포함한 남자 40명과 여자64명)을 대상으로 하였다.

피검자의 말초혈액 3-5 mL를 채취하여 heparin으로 전처리한 후에 Ficoll-Hypaque(SG 1.077, Sigma사, USA)용액으로 단핵구를 분리한 다음 DNA를 분리하기 직전까지 -20°C에 보관하였다.

Chaotropic-agent silica법[32]에 의한 DNA분리를 위해 다음과 같은 방법으로 시약을 준비하였다. 1) Lysis buffer(L6) : 60 g의 GuSCN을 56-65°C의 항온수조에서 50 mL의 0.1 M Tris-HCl(pH 6.4)에 용해시켜 11 mL의 0.2 M EDTA용액을 가한 다음 NaOH로 pH 8.0으로 조정하고 2.6 g의 Triton X-100을 가하였다. 2) Washing buffer(L2 : 60 g의 GuSCN을 56-65°C의 항온수조에서 50 mL의 0.1 M Tris-HCl(pH 6.4)에 용해하였다. 3) 용출완충액 (Elution buffer) : pH 8.0의 1 M Tris-HCl과 0.1 M EDTA혼합액을 가압증기멸균한 50배의 stock sol.을 사용하기 직전에 증류수로 50배 회석하였다. 4) Lysis buffer(L8) : 400 μL의 증류수, 50 μL의 5 M NaCl, 100 μL의 10% SDS, 50 μL의 1 M Tris-HCl, 0.1 M EDTA 및 400 μL의 proteinase-K(10 mg/mL)을 가한 다음 50 μL씩 소분하여 사용하기 직전까지 -20°C에 보관하였다. 5) Diatom 부유액 : 10 g의 diatomaceus earth에 50 mL의 증류수와 500 μL의 32% HCl을 가하여 1 mL씩 유리병에 각각 분주하여 가압증기멸균하였다.

검체로 부터 DNA 분리는 다음과 같이 하였다. 1) 소원심관에 50 μL의 검체(세척 단핵구용액)와 50 μL의 L8 용액을 섞어 56°C에서 두시간 반응시킨 다음 12,000 rpm에서 2분간 원침하였다. 2) 소

원심관에 900 μL의 L6 용액과 40 μL의 diatom 부유액을 다시 가하고 vortexer로 강하게 진탕한 다음 실온에 10분간 방치한 후에 12,000 rpm에서 2분간 원침하여 상층액을 제거하였다. 3) 상층액을 제거한 소원심관에 L2 용액을 가하여 1,000 μL이 되도록 하여 vortexer로 강하게 진탕한 다음 12,000 rpm에서 2분간 원침하여 상층액을 제거하는 세척과정을 두번 반복하였다. 3) 세척한 소원심관에 1,000 μL의 70% ethanol을 가하여 vortexer로 강하게 진탕한 다음 12,000 rpm에서 2분간 원침하여 상층액을 제거하는 과정을 두번 반복하였다. 4) 소원심관에 1,000 μL의 acetone을 가하여 강하게 진탕한 다음 12,000 rpm에서 2분간 원침하여 상층액을 제거한 후에 56°C에서 10분간 건조시켰다. 5) 소원심관에 50 μL의 용출완충액을 가하여 56°C에서 10분간 반응시킨 후에 12,000 rpm에서 10분간 원침한 다음 DNA가 용해되어 있는 상층액을 다른 소원심관에 취하여 PCR에 사용하였다.

적절한 DNA분리 유무를 확인하기 위한 β -globin 유전자의 PCR은 다음과 같은 조건으로 실시하였다[33]. PCR에 사용한 장비는 hot-air thermocycler인 한국 대한메디칼(주)사의 FTC-2000을 이용하였으며, 반응용기는 모세관(10 μL volume at 2 inch, Idaho사, USA)을 사용하였다. 반응혼합물의 총량이 1 μL의 피검자 DNA를 가하여 10 μL이 되도록 하였으며, 각각 0.5 μM의 primer PC04 및 GH20, 0.5 units의 Taq polymerase(Promega사, USA), 500 mM Tris-HCl(pH 8.3), 3 mM MgCl₂, 500 μg/mL κ우혈청알부민과 각각 0.2 mM의 dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)가 함유되도록 하였다. 반응혼합물을 모세관에 주입하여 불꽃으로 양 끝을 봉한 다음, 94°C에서 10초간 pre-denaturation을 실시하고 denaturation(94°C, 1초)-annealing(47.5°C, 1초)-elongation(72°C, 10초) 과정을 40회 반복한 다음 post-elongation을 72°C에서 20초간 실시하였다. 증폭산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 268 bp 크기의 DNA band를 관찰하여 DNA 증폭유무를 확인하였다. 이때 DNA size marker로는 repeats of a 100 bp DNA(Gibco BRL, USA)를 사용하였다.

제 8혈액응고인자 유전자의 *Bcl I*부위의 PCR은 각각 0.5 μM의 primer 8.1(5'-TAA AAG CTT TAA ATG GTC TAG GC-3')와 8.2(5'-TTC GAA

1 2 3 4 5

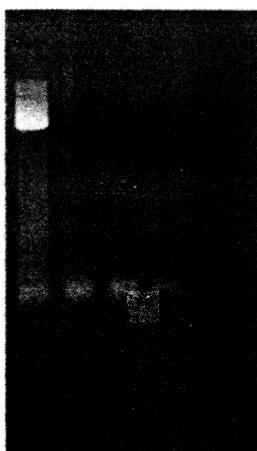


Fig. 1. Gel electrophoresis of the PCR products of *M. tuberculosis* IS6110 DNA amplification. Lane 1 : DNA size marker(123 ladder), lane 2 to 5 : 123 bp PCR products of various concentrations of DNA from *M. tuberculosis* H37Rv(lane 2 : 500 fg/5 μ L, lane 3 : 50 fg/5 μ L, lane 4 : 5 fg/5 μ L, lane 5 : 0.5 fg/5 μ L)

TTC TGA AAT TAT CTT GTT C-3')를 사용하여, β -globin 유전자의 PCR과 동일한 조건에서 실시하였다. 증폭산물을 5 μ L을 취해 전기영동을 실시하여 142 bp 크기의 DNA band 유무를 확인하였다.

Bcl I RFLP를 분석하기 위하여 반응혼합물의 총량이 5 μ L의 증폭산물을 가하여 30 μ L이 되도록 하였으며, 각각 5 mM의 NaCl, 1 mM Tris-HCl(pH 7.9), 1 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT와 5 units의 *Bcl* I 제한효소를 가하여 50°C에서 2시간 반응시켰으며, 위와 같은 방법으로 전기영동하여 *Bcl* I RFLP를 관찰하였다.

성 적

결핵균 PCR 검사의 예민도를 조사하기 위해, *M. tuberculosis* H37Rv균주의 DNA를 분리하여 500 fg/5 μ L에서부터 0.5 fg/5 μ L까지 10배씩 계단회석하여 PCR을 실시하였다. 그 결과 agarose gel 전기영동상에서 5 fg/5 μ L까지 검출가능하였다(Fig. 1). 결핵균 PCR검사의 특이도를 조사하기 위해 pBR322 DNA와 B형간염바이러스(HBV) cDNA, 박테리오파지 DNA 및 정상인 혈액 DNA 등을 대상

1 2 3 4 5 6 7 8

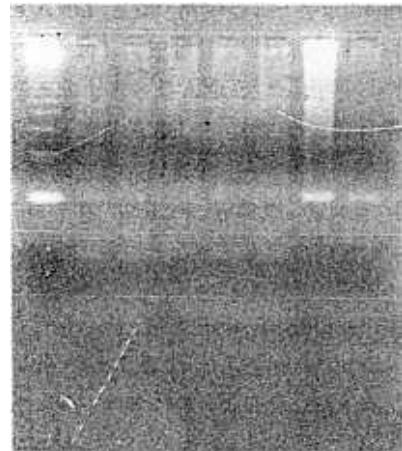


Fig. 2. Gel electrophoresis of the PCR products of *M. tuberculosis* IS6110 DNA amplification. Lane 1 : DNA size marker(123 ladder), lane 2 : PCR of plasmid pBR322 DNA, lane 3 : PCR of cloned Hepatitis B virus DNA, lane 4 : PCR of λ bacteriophage DNA, lane 5 : PCR of human normal blood DNA, lane 6 : negative control, lane 7 : PCR of tuberculosis sputum, lane 8 : PCR of *M. tuberculosis* H37Rv DNA

으로 PCR을 실시하였다. 그 결과 agarose gel 전기영동상에서 결핵균 DNA만이 123 bp의 target DNA band가 검출되었으며, plasmid pBR322, HBV cDNA, λ 박테리오파지 DNA, 정상혈액 DNA 등은 모두 PCR 검사 음성으로 나타났다(Fig. 2). 20예의 객담을 대상으로 하여 bead-beating 방법으로 DNA를 분리 후 PCR을 실시한 결과 16예(80.0%)가 결핵균 DNA 양성이었다(Fig. 3). 뇌척수액 10예를 대상으로 하여 bead-beating 방법으로 DNA를 분리 후 PCR을 실시한 결과 7예(70.0%)가 결핵균DNA 양성이었다(Fig. 4).

나균 PCR 검사의 예민도를 조사하기 위해 나균을 4×10^1 개에서부터 순차적으로 2배수 회석하여 PCR을 실시하였다. 그 결과 agarose gel 전기영동상에서 6.25×10^{-1} 까지 검출 가능하였다(Fig. 5). 나균 PCR검사의 특이도를 조사하기 위해 *M. tuberculosis* DNA, 박테리오파지 DNA, 정상인 혈액 DNA, 정상 피부조직, pBR322 DNA, herpes simplexvirus(HSV) 감염된 섬유아세포 등을 대상으로 PCR을 실시하였다. 그 결과 나균 DNA만이

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

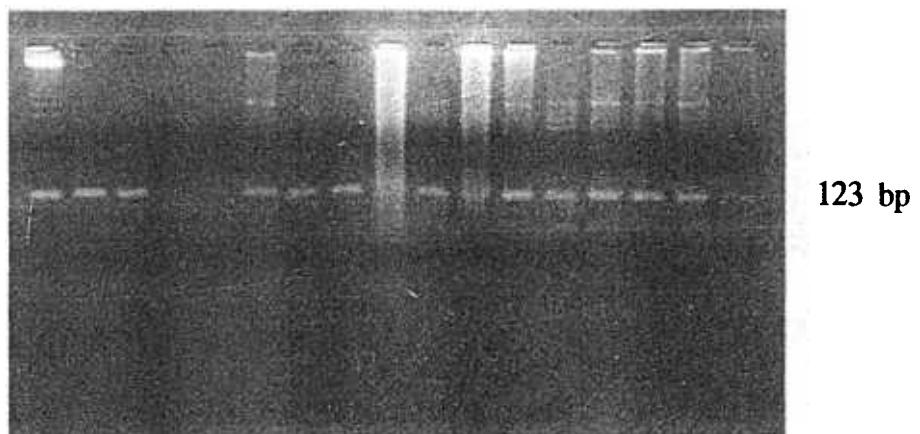


Fig. 3. Gel electrophoresis of the PCR products of *M. tuberculosis* IS6110 DNA amplification. Lane 1 : DNA size marker(123 ladder), lanes 2 and 3 : positive controls, lane 4 : negative control, lanes 5 to 17 : PCR of sputum specimens from patients suspected as tuberculosis

1 2 3 4 5

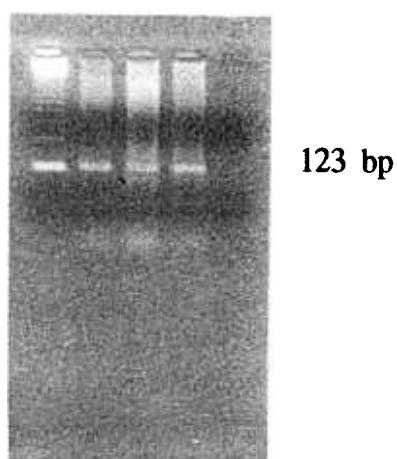


Fig. 4. Gel electrophoresis of the PCR products of *M. tuberculosis* IS6110 DNA amplification. Lane 1 : DNA size marker(123 ladder), lanes 2 to 4 : PCR of CSF specimens from patients suspected as tuberculosis, lane 5 : negative control

bp의 target DNA band가 검출되었으며, 다른 가검 물들은 모두 PCR검사 음성으로 나타났다(Fig. 6). Lepromatous leprosy(LL) 4예 및 Borderline lepromatous leprosy(BL) 3예 등 7예의 나환자 조직생 검표본을 대상으로 하여 PCR을 실시한 결과 7예 모두에서 나균 DNA 양성이었다(Fig. 7).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Fig. 5. Gel electrophoresis of the PCR products of *M. leprae* DNA amplification. Lane 1 : DNA size marker(530 ladder), lane 2 to 10 : 530 bp PCR products of samples containing DNA extracted from 20 μ l of two-fold dilutions of a suspension of *M. leprae*(lane 2 : 4×10^1 bacteria, lane 3 : 2×10^1 bacteria, lane 4 : 1×10^1 bacteria, lane 5 : 5×10^0 bacteria, lane 6 : 2.5×10^0 bacteria, lane 7 : 1.25×10^0 bacteria, lane 8 : 6.25×10^{-1} bacteria, lane 9 : 3.13×10^{-1} bacteria, lane 10 : 1.56×10^{-1} bacteria)

B형간염바이러스 PCR 검사의 예민도를 조사하기 위해 클론된 B형간염바이러스 cDNA를 순차적

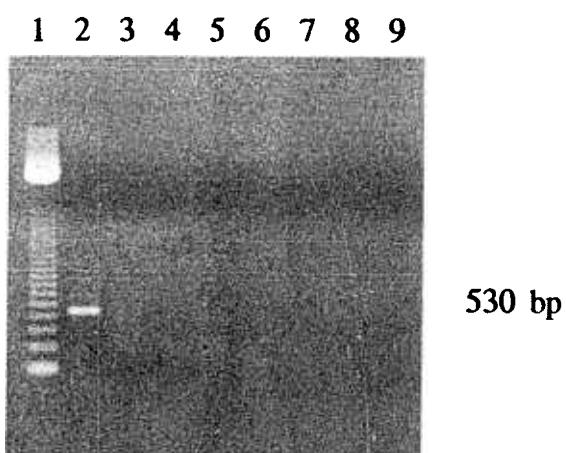


Fig. 6. Gel electrophoresis of the PCR products of *M. leprae* DNA amplification. Lane 1 : DNA size marker(123 ladder), lane 2 : PCR of DNA extracted from *M. leprae*, lane 3 : PCR of purified *M. tuberculosis* DNA, lane 4 : PCR of λ bacteriophage DNA, lane 5 : PCR of human normal blood DNA, lane 6 : PCR of normal skin tissue, lane 7 : PCR of pBR322 DNA, lane 8 : PCR of herpes simplex virus infected cells, lane 9 : negative control

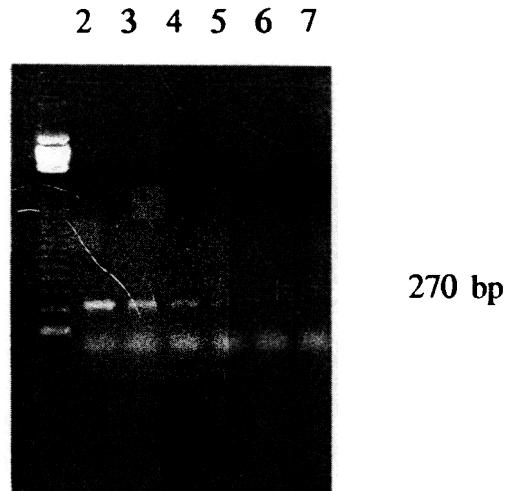


Fig. 8. Gel electrophoresis of the PCR products of cloned HBV DNA amplification. Lane 1 : DNA size marker(123 ladder), lane 2 to 6 : 270 bp PCR products from various concentrations of HBV DNA(lane 2 : 5 pg of HBV DNA, lane 3 : 500 fg of HBV DNA, lane 4 : 50 fg of HBV DNA, lane 5 : 5 fg of HBV DNA, lane 6 : 0.5 fg of HBV DNA), lane 7 : negative control

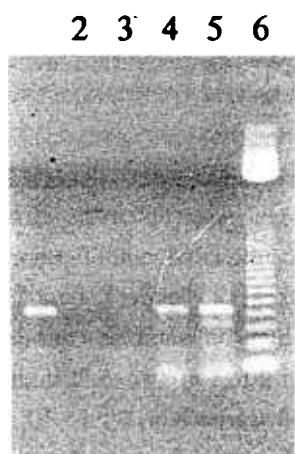


Fig. 7. Gel electrophoresis of the PCR products of *M. leprae* DNA amplification. Lane 1 : positive control, lane 2 : negative control, lanes 3 : normal skin tissue, lane 4 and 5 : PCR of biopsy specimens from patients suspected as leprosy, lane 6 : DNA size marker(123 ladder)

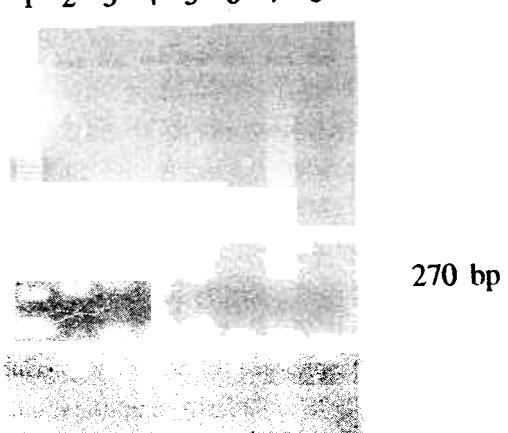


Fig. 9. Gel electrophoresis of the PCR products of HBV DNA amplification. Lane 1 : DNA size marker(123 ladder), lane 2 : positive control (270 bp PCR product from HBV DNA), lane 3 : PCR of normal serum, lane 4 : PCR of Varicella-Zoster virus infected cells, lane 5 : PCR of Epstein-Barr virus infected cells, lane 6 : PCR of Human Cytomegalovirus infected cells, lane 7 : PCR of Herpes Simplex virus infected cells, lane 8 : negative control

2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

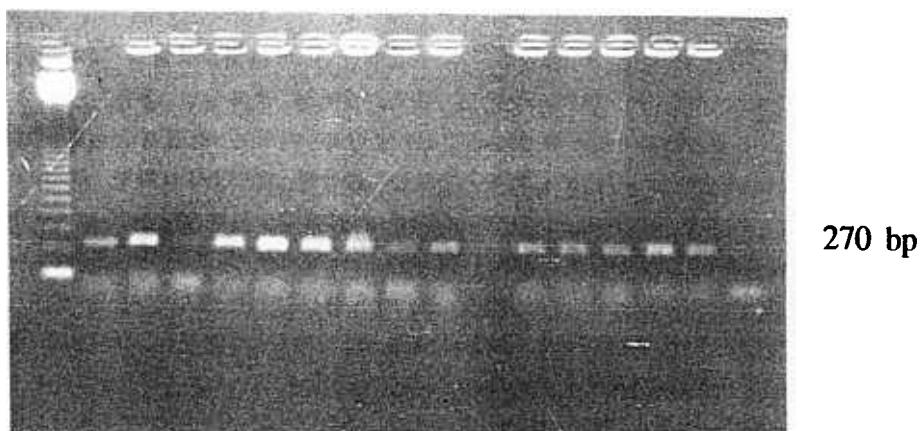


Fig. 10. Gel electrophoresis of the PCR products of HBV DNA amplification. Lane 1 : DNA size marker(123 ladder), lane 2 : positive contro(270 bp PCR product from HBV DNA), lane 3, 5 to 10, 12 to 16 : PCR of HBs antigen positive sera, lane 4 and 11 : PCR of normal sera, lane 17 : negative control.

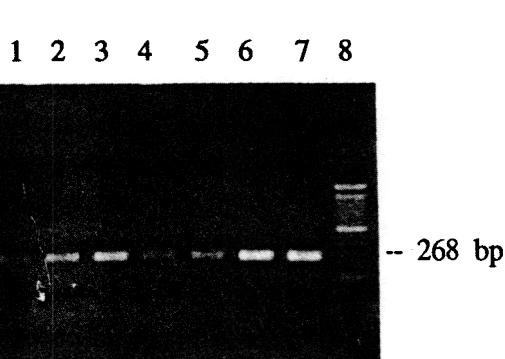


Fig. 11. Gel electrophoresis of the PCR products of β -globin gene. Lane 1 to 7 : 268 bp PCR products from various hemophiliac blood, lane 8 : DNA size marker(repeats of a 100 bp DNA).

농도로 희석하여 PCR을 실시한 결과, agarose gel 전기 영동상에서 50 fg까지는 뚜렷하게 검출되었고, 5 fg에서도 미약하게 검출 가능하였다(Fig. 8). B형 간염바이러스 PCR검사의 특이도를 조사하기 위해 B형간염바이러스 DNA와, 정상혈청, 수두-대상포진 바이러스(VZV), 엔스타인-바 바이러스(EBV), 인간 세포거대바이러스(HCMV), 단순포진 바이러스(HSV)등을 대상으로 PCR을 실시하였다. 그 결과 agarose gel 전기영동상에서 B형간염바이러

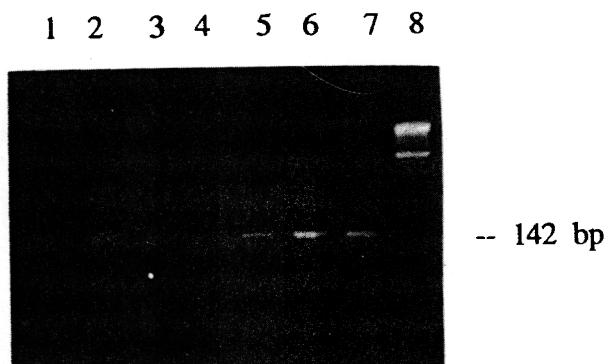


Fig. 12. Gel electrophoresis of the PCR products of β -globin gene. Lane 1 to 7 : 268 bp PCR products from various hemophiliac blood, lane 8 : DNA size marker(repeats of a 100 bp DNA).

스 DNA 만이 270 bp의 target DNA band가 검출되었으며 정상혈액, VZV, EBV, HCMV, HSV등은 모두 PCR 검사 음성으로 나타났다(Fig. 9).

HBs antigen 양성환자의 혈청 40예를 대상으로 PCR을 실시한 결과 40예 모두에서 270 bp의 target DNA band가 검출되어 PCR검사 양성을 나타내었다(Fig. 10).

A형 혈우병의 PCR에 의한 진단을 위하여 chotropic agent-silica법으로 말초혈 단핵구세포의 β -

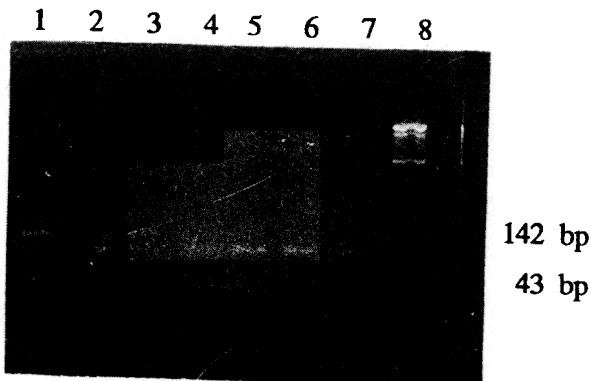


Fig. 13. Gel electrophoresis of the digested PCR products of *Bcl* I site in intron 18 of factor VIII gene. Lane 1 : male hemophilia with negative allele(142 bp *Bcl* I digested product), lane 2 : male hemophilia with positive allele(99 and 43 bp *Bcl* I digested products), lane 3 : female heterozygote carrier of hemophilia(142, 99 and 43 bp *Bcl* I digested products) 4. lane 4-7 : female homozygote carrier of hemophilia with negative allele(142 bp *Bcl* I digested products).

globin 유전자의 PCR을 실시한 결과, 전체 대상인 104명 모두에서 agarose gel 전기영동상 268 bp의 DNA band를 관찰할 수 있었다(Fig. 11). 제 8혈액 응고인자 유전자의 *Bcl* I 부위를 PCR을 실시한 결과 agarose 전기영동상에서 142 bp의 DNA를 관찰할 수 있었으며(Fig. 12), 제한효소 *Bcl* I 제한효소로 처리하고 전기영동을 실시한 결과 142 bp의 절단점이 없는 대립인자(negative allele)와 99 bp와 43 bp로 절단된 대립인자(positive allele)가 관찰되었다(Fig. 13).

두 대립인자의 발현빈도를 보면 104명의 피검자(남자 40명, 여자 64명)의 총 168개의 X-염색체중 *Bcl* I positive allele은 142개(84.5%)였고 *Bcl* I negative allele은 26개(15.5%)였으며, 64명의 여자 중 18명(28.1%)이 이형접합체임을 알 수 있었다. 따라서, 혈우병 보인자인 어머니가 차기 임신시에 혈우병 태아의 진단을 위한 다양성 정보제공율(PIC)은 $1 - [(0.155)2 + (0.281)2] = 0.26$ 이었다.

고 칠

결핵균은 폐결핵, 결핵성 뇌막염, 척추결핵, 신장결핵, 결핵성 임파선염 등을 초래하며 국민 건강에 큰 영향을 미치는 감염병균이다. 결핵의 진단법으로는 임상적 및 방사선학적 검사 이외에도 Ziehl-Neelsen 염색을 통한 Acid-Fast Bacilli(AFB)의 검정, Loewenstein-Jensen media 혹은 Ogawa media를 이용한 결핵균 배양검사 등이 있으나, 검출율이 낮고, 균배양을 위해서는 검사기간이 4-6주나 소요되는 등 많은 어려운점이 있다. 특히 결핵성 뇌막염과 같은 중증 감염증의 경우에는 신속하고도 정확한 진단이 필수적이어서 새로운 진단법이 요망되고 있다. 그리고 나균은 만성 감염성 질환인 나병을 초래하는데, 나균의 검출을 위해 피부도말검사, 조직생검, 면역학적 검사, mouse footpad 배양검사 등을 시행하나 낮은 민감도와 특이도, 높은 검사수가 및 장기간의 검사기간 등의 문제 때문에 그 효율이 낮으며, 특히 희귀성 나병의 조기진단에는 많은 어려움이 있어서 새로운 진단법이 요망되고 있다. 또한 B형간염바이러스는 급만성 간염을 초래하며, 간경변증이나 간암에도 깊이 관여된다고 알려져 있는, 임상적으로 매우 중요한 감염병균이며, 특히 우리나라에서는 B형간염의 발병이 상당히 높아서 많은 사람이 감염되어 있다. B형간염의 관리에 있어서는 무엇보다도 예방적 조치가 가장 중요하며, 원인 바이러스의 조기 발견이 진단 및 예후판정에 매우 중요하다. 현재 임상적으로 널리 쓰이고 있는 B형간염의 진단법으로는 ELISA, RIA, RPHA등의 면역학적 방법이 주종을 이루고 있는데 이들의 효용도 크지만, 이러한 면역학적 검사법만으로는 검출되지 않는 경우도 많고, 원인균을 직접 검사하는 것이 아닌 간접적 검사에 국한되며, 일단 항체가 생긴 후에야 검사할 수 있고, 교차반응이 많은 등 여러 문제점을 갖고 있다.

A형 혈우병은 우리나라에서도 비교적 흔한 유전질환증의 하나로서 대구와 경북지역의 종합병원에 등록된 환자수는 50여명에 달한다. A형 혈우병의 원인은 점상돌연변이(point mutation), 유전자결손(deletion)등의 제 8혈액응고인자 유전자의 손상에 의해 제 8혈액응고인자의 부족으로 혈액응고장애가 일어나는데 있으며, 유전자의 손상정도에 따라

-신동학 외 : 유전성 질환 및 감염성 질환의 PCR-

임상적인 양상에 차이가 많은 질환이다[23-24]. 혈액응고장애는 제8혈액응고인자를 주사함으로써 치료가 가능하며, 최근에는 혈우병환자도 정상인과 동일한 수명을 유지할 수 있게 되었으나, 제8혈액응고인자를 주사함으로서 혈액을 통한 후천성면역 결핍증등 virus질환을 전염시킬 위험이 있고 제8혈액응고인자 방해물질의 생성으로 인한 치료의 실패가 초래될 수 있다. 따라서, 보다 적극적인 차원에서 보인자의 검색 및 혈우병 태아의 산전진단을 통한 혈우병의 예방이 중요시된다. A형 혈우병의 보인자검색 및 산전진단에는 F. VIII:C, F. VIII:Ag 및 vWF:Ag 검사등을 통한 고전적인 phenotypic method[23-24]를 들 수 있다. Phenotypic method에 의한 혈우병의 보인자검색은 6-20% 정도의 감소시킬 수 없는 오진율이 있는데 이는 다음과 같은 이유로 설명할 수 있다[23-24]. 첫째, 혈우병 보인자는 X 염색체의 lyonization현상에 의해 이론적으로는 50%의 혈액응고인자 활성도를 가져야하나 X 염색체의 lyonization은 확률적인 현상이므로 활성도의 개인간의 차이가 매우 심하다. 둘째, ABO 혈액형에 따른 제8혈액응고인자의 활성도 차이를 들 수 있는데 O형 혈액형을 가진 혈우병 보인자 및 정상여성은 다른 혈액형에 비해 제8혈액응고인자의 활성도가 낮다. 셋째, 연령에 따른 제8혈액응고인자의 활성도 차이를 들 수 있는데 연령이 아주 낮거나 고령인 혈우병 보인자 및 정상여성의 제8혈액응고인자의 활성도는 높다.

따라서 phenotypic method에 의한 혈우병진단은 항상 확률적일 수밖에 없으며, 6-20%정도의 오진율은 감소시킬 수가 없는 것이다. 또한 phenotypic method로서 혈우병 태아의 산전진단을 위해서는 적어도 5 mL 정도의 태아혈액이 요구되는데 이를 위해서는 임신 5개월에 cordocentesis를 실시해야 하므로 치료적인 목적에서 유산을 계획할 경우 산모에게 초래되는 위험이 매우 높다. 따라서 최근에는 분자생물학적 분석방법이 유전공학과 더불어 급속히 발전되어 감염병이나 유전병, 종양, 내분비질환 등의 광범위한 의학분야에 분자생물학적 연구방법이 응용되고 있으며 보다 정확하고 신속한 검사방법으로 평가되고 있다. 그중에서도 특히 내열성 DNA polymerase와 oligonucleotide primers를 사용하여 온도변환장치로 반복적인 DNA합성을 유도하므로써, 검사물내에 극소량의 DNA만 있어도

단시간만에 대량의 DNA로 증폭시킬 수 있는 획기적인 방법인 PCR이 개발되어, 예민도와 특이도, 그리고 진단의 신속성에 있어서 엄청난 발전이 기대되고 있다[1-5].

본 연구에서도 결핵, 나병, B형간염, A형 혈우병 등의 주요 질환에 있어서 재래적인 진단법이 안고 있는 여러가지 문제점을 극복하고, 더욱 예민하고도 신속한 진단체계를 확립코자 PCR기법으로 각종 가검물을 검색하였다. 결핵균 PCR에서는 5 fg의 DNA까지도 검출가능하여 예민도가 매우 높음을 알수 있었고, 결핵균 이외의 가검물은 모두 음성으로 나타나 특이도 역시 매우 우수함을 알 수 있었다. 특히 결핵성 뇌막염이 의심되는 환자의 뇌척수액검사에서 70%가 PCR양성을 나타내어 향후 결핵성 뇌막염의 진단에 PCR검사가 매우 유용하게 사용될 것으로 사료되었다. 나균의 PCR검사에서는 나균 1마리까지도 검출가능하여 예민도가 매우 높음을 알 수 있었고, 나균 이외의 가검물은 모두 음성으로 나타나 특이도 역시 우수함을 알 수 있어 향후 나균의 진단, 특히 회균성 나병의 조기진단에 PCR검사가 매우 유용하게 사용될 것으로 사료되었다. B형간염 PCR검사는 5 fg의 DNA까지도 검출가능하여 예민도가 매우 높음을 알 수 있었고, B형간염 이외의 가검물은 모두 음성으로 나타나 특이도 역시 우수함을 알 수 있어 향후 B형간염의 진단 및 예후판정에 PCR검사가 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료되었다.

A형 혈우병의 분자생물학적 분석방법인 genotypic method로서는 간접분석방법인 소위 'genetic linkage analysis'를 유전자내의 혹은 그 유전자와 인접해 있는 DNA의 다형성(polymorphism)을 분석하는 실시하는 것이다. A형 혈우병의 진단에 이용되는 제8혈액응고인자 유전자의 DNA 다형성종류는 12종류의 RFLP[26-31]와 2종류의 variable number of tandem repeats(VNTR)[34]가 알려져 있으며 DNA 다형성 종류에 따라 대립형질의 빈도가 인종간에 차이가 있음이 인정되고 있어서 각 인종마다 4-5종류의 다형성을 적절히 선택하여 임상적으로 이용할 것을 권장하고 있다[3]. 가장 일반적인 방법은 제8혈액응고인자 유전자의 intragenic loci에 존재하는 *Bcl I*, *Xba I* 및 *Bgl II* RFLP들과 intron 13 영역의 VNTR인(CA)_n repeat, extragenic loci에 존재하는 *DXS52* VNTR, *DXS15*

RFLP등을 들 수 있겠으나, *Bgl* I RFLP, *DXS52 VNTR* 및 *DXS15 RFLP*는 기술적으로 어려움이 많은 southern blot을 실시해야하고 linkage disequilibrium 및 recombination등의 문제가 있다[25]. A형 혈우병의 진단에 있어서는 PCR 기법을 이용한 제 8혈액응고인자 유전자의 *Bcl* I 및 *Xba* I RFLP와 *intron 13* 영역의 VNTR인(CA)_n repeat의 DNA 다형성분석은 소량의 검체로도 검사가 가능하고 산전진단 및 보인자검색을 위한 정보제공율이 높아서 임상적인 유용성이 높은 것으로 알려져 있으며, 이중 *Bcl* I-RFLP의 한 다형성분석이 정보제공율이 특히 높고 자료의 축적도 많은 편이다[26-31]. 본 연구에서 실시한 *Bcl* I-RFLP 두 대립인자의 발현 빈도를 보면, *Bcl* I(+)은 84.5%였고 *Bcl* I(-)은 15.5%였다. 여성의 이형접합체 빈도는 28.1%였으며, A형 혈우병 보인자인 어머니의 이형접합체 빈도는 31.1%였다. 이러한 한국인 여성의 이형접합체 보유빈도는 중국인의 29-38%와 미국에 거주하는 혹인의 29-32%와 비슷하였고, 백인의 42%, 아시아인과 인디언의 42-44% 및 일본인의 42%와는 상당한 인종간의 차이를 보였다[31]. 따라서 DNA 다형성분석에 의한 한국인의 A형 혈우병을 진단하기 위해서는 앞으로 중합효소연쇄반응을 이용한 *Xba* I 및 *intron 13* 영역의 VNTR인(CA)_n repeat에 대한 분석이 우선적으로 고려되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

임상적 및 방사선학적으로 결핵으로 의심되는 환자로 부터 채취한 객담 및 뇌척수액에서 결핵균을 검출하기 위하여 bead-beating 방법으로 DNA를 분리하고, *M. tuberculosis* IS6110 DNA 절편에 특이하게 결합하는 primer로서 PCR을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 전기영동상 123 bp의 증폭산물은 음성대조로 사용한 pBR322 DNA와, B형간염바이러스(HBV) cDNA, λ 박테리오파지 DNA 및 정상인 혈액 DNA 등에서는 관찰되지 않았으며, 5 fg의 *M. tuberculosis* H37Rv DNA까지 검출 가능한 예민도를 보였다. 20예의 객담 중에는 16예(80.0%)가 결핵균 PCR검사 양성이었고, CSF 10예의 뇌척수액 중에는 7예(70.0%)가 양성이었다.

나병이 의심되는 환자로부터 채취한 피부 생검

조직에서 나균을 검출하기 위하여 *M. leprae* DNA 절편에 특이하게 결합하는 primer로서 PCR을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 전기영동상 530 bp의 증폭산물은 음성대조로 사용한 *M. tuberculosis* DNA, λ 박테리오파지 DNA, 정상 혈액 DNA, 정상 피부조직, pBR322 DNA, herpes simplex virus (HSV) 감염된 섬유아세포 등에서는 관찰되지 않았으며, 6.25×10^{-1} 개의 *M. leprae*까지 검출 가능한 예민도를 보였다. Lepromatous leprosy(LL) 4예 및 Borderline lepromatous leprosy(BL) 3예 등 7예의 나환자의 생검조직은 모두가 나균 PCR검사 양성이었다.

B형간염이 의심되는 환자의 혈청에서 B형간염 바이러스 DNA를 검출하기 위하여 혈청을 0.2 M NaOH와 0.2 N HCl로 전처리하고 B형간염바이러스의 DNA 염기서열 1763에서 1792사이의 sense primer와 2032에서 2003사이의 antisense primer로서 PCR을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 전기영동상 270 bp의 증폭산물은 음성대조로 사용한 수두-대상포진 바이러스(VZV), 앱스타인-바 바이러스(EBV), 인간 세포거대바이러스(HCMV), 단순포진바이러스(HSV) DNA 등에서는 관찰되지 않았으며, 5 fg의 HBV DNA까지 검출가능한 예민도를 보였다. 40예의 HBs Ag 양성환자의 혈청은 모두가 HBV PCR검사 양성이었으며, 4예의 정상인의 혈청은 모두가 HBV PCR검사 음성이었다.

A형 혈우병 31가계 구성원 104명(33명의 혈우병환자를 포함한 남자 40명과 여자64명)을 대상으로 PCR에 의한 제8혈액응고인자 유전자의 *intron 18*영역의 *Bcl* I RFLP를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 혈액응고인자 유전자의 *Bcl* I부위의 primer 8.1 및 8.2로서 PCR을 실시하고 *Bcl* I 체한효소로 처리한 다음 전기영동을 실시한 결과 절단점이 없는 142 bp의 대립인자(negative allele)와 99 bp와 43 bp로 절단된 대립인자(positive allele)를 관찰할 수 있었다. 두 대립인자의 발현 빈도를 보면, 104명의 피검자의 총 168개의 X-염색체중 *Bcl* I positive allele은 142개(84.5%)였고 *Bcl* I negative allele은 26개(15.5%)였으며, 64명의 여자 중 18명(28.1%)이 이형접합체임을 알 수 있었다. 따라서, 31예의 혈우병가계 중 10예(31.3%)에서 혈우병 보인자인 어머니가 차기 임신을 할 경우 혈우병 태아의 산전 진단이 가능할 것으로 사료되며, *Bcl* I

신동학 외 유전성 질환 및 감염성 질환의 PCR-

RFLP의 다양성 정보제공율(PIC)은 0.26이었다.

참 고 문 헌

1. Birnboim IC, Doly J. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* 1979;7:1513-23.
2. Innis MA, Gelfond DH, Sninsky JJ, ed. *PCR protocols : Sample preparation from blood, cells, and other fluids*. San Diego: Academic Press Inc, 1990:146-52.
3. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-91.
4. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-4.
5. Persing DH : Polymerase chain reaction. Trenches to benches. *J Clin Microbiol* 1991;29: 1281-5.
6. Eisenach KD, Cave MD, Bate JH, Crawford JT. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1990;161:977-81.
7. Eisenach KD, Crawford JT, Bate JH. Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1988;26:2240-5.
8. Kaneko K, Onodera O, Miyatake T, Tsuji S. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction(PCR). *Neurology* 1990;40:1617-8.
9. Kunkel LM, Smith KD, Boyer SH, Borgaonkar DS, Wachtel SS, Miller OJ, Breg WR, Jones HW, Rory JM. Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74: 1245-9.
10. De Wit D, Steyn L, Shoemaker S, Sogin M. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 1990;28:2437-41.
11. De Wit MYL, Faber WR, Crieg SR. Application of polymerase chain reaction for the detection of *M. leprae* in skin tissue. *J Clin Microbiol* 1991;29:906-10.
12. Clark-Curtiss JE, Docherty MA. A species-specific repetitive sequence in *Mycobacterium leprae* DNA. *J Infect Dis* 1989;156:7-15.
13. Hartskeerl RA, de Wit MYL, Klaster PR. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J Gen Microbiol* 1989; 135:2357-64.
14. Wood SA, Cole ST. A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies, a novel application of PCR. *FEMS Microbiol* 1989;65:305-10.
15. Williams DL, Gillis TP, Booth RJ. The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J Infect Dis* 1990;162:193-200.
16. Plikaytis BB, Gelber RH, Shinnick TM. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. *J Clin Microbiol* 1990;28:1913-7.
17. Diana LW, Thomas PG, Roger JB. The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J Infect Dis* 1990;162:193-200.
18. Fujiyama A, Miyanohara A, Nozaki C, Yoneyama T, Ohtomo N, Matsubara K. Cloning and structural analysis of hepatitis B virus DNAs, subtype adr. *Nucleic Acids Res* 1983; 11:4601-10.
19. Kaneko S, Feinstone SM, Miller RH. Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique. *J Clin Microbiol* 1989;27: 1930-3.
20. Kaneko S, Miller R, Feinstone S, Unoura M, Kobayashi K, Hattori N, Purcell R. Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with

- chronic hepatitis utilizing the polymerase chain reaction assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 86:312-6.
21. Kido S, Ozaki T, Asada H, Higashi K, Kondo K, Hayakawa Y, Morishima T, Takahashi M, Yamanishi K. Detection of varicella zoster virus (VZV) DNA in clinical samples from patients with VZV by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991;29:76-9.
22. Puchhammer-Stockl E, Popow-Kraupp T, Heinz FX, Mandl CW, Kunz C. Detection of varicella zoster virus DNA by polymerase chain reaction in the cerebrospinal fluid of patients suffering from neurological complications associated with chickenpox or herpes zoster. *J Clin Microbiol* 1991;29:1513-6.
23. Graham JB, Rizza CR, Chedisk J, Mannucci PM, Briet E, Ljung R, Kasper CK, Essien EM, Green PP. Carrier detection in hemophilia A : A cooperative international study(I. The carrier phenotype). *Blood* 1986;67:1554-9.
24. Green PP, Mannucci PM, Briet E, Ljung R, Kasper CK, Essien EM, Chediak J, Rizza CR, Graham JB. Carrier detection in hemophilia A : A cooperative international study(II. The efficacy of a universal discriminant). *Blood* 1986;67:1560-7.
25. Graham JB, Green PP, McGraw RA, Davis LM. Application of molecular genetics to prenatal diagnosis and carrier detection in hemophiliacs : Some limitations. *Blood* 1985;66:759-64.
26. Moodie P, Liddel MB, Peake IR, Bloom AL. Carrier detection in 50 haemophilia A kindred by means of three intragenic and two extragenic restriction fragment length polymorphisms. *Br J Haematol* 1988;70:77-84.
27. Kogan SC, Matine Dohery BS, Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic disease by analysis of amplified DNA sequence : Application to hemophilia A. *N Engl J Med* 1987;317:985-90.
28. Sarker G, Evans MI, Kogan SC, Lusher J, Sommer SS. Accurate prenatal diagnosis with novel polymerase chain reaction primers in a family with sporadic hemophilia A. *Obstet Gynecol* 1989;74:414-7.
29. Ball J, Warnock LJ, Preston FE. Rapid assessment of haemophilia A carrier state by non-invasive techniques using the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 1990;43:505-7.
30. Wadelius C, Blomback M, Goonewardena P, Anvert M, Lindsedt M, Gustavson KH, Petersson U. Evaluation of DNA-based diagnosis for hemophilia A. *Scand J Clin Lab Invest* 1991;51:625-33.
31. Peake I. Registry of DNA polymorphisms within or close to the human factor VIII and factor IX genes. *Thrombosis and Hemostasis* 1992; 67:277-280.
32. Boom R, Sol CJA, Heijtink R, Wertheim-van Dillen PME, van der Noordaa J. Rapid purification of hepatitis B virus DNA from serum. *J Clin Microbiol* 1991;29:1804-11.
33. 전효진, 박현찬, 전동석, 김재룡. 결핵균 검출을 위한 모세관중합효소 연쇄반응의 적정조건. *계명의대논문집* 1993;12:520-30.
34. Laloz MR, McVey JH, Pattinson JK, Tuddeham EGD. Hemophilia A diagnosis by analysis of a hypervariable dinucleotide repeat within the factor VIII gene. *Lancet* 1991;338:207-11.