



PCR을 이용한 인간 세포거대바이러스(HCMV) DNA 중합효소 유전자의 검색

Detection of Human Cytomegalovirus DNA Polymerase Gene by Polymerase Chain Reaction

저자 (Authors)	김현철, 박성배, 조원현, 백원기, 서민호 Hyun Chul Kim, Sung Bae Park, Won Hyun Cho, Won Ki Baek, Min Ho Suh
출처 (Source)	The Journal of the Korean Society for Microbiology 27(2) , 1992.4, 181-188 (8 pages)
발행처 (Publisher)	대한미생물학회 The Korean Society For Microbiology
URL	http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE01487576
APA Style	김현철, 박성배, 조원현, 백원기, 서민호 (1992). PCR을 이용한 인간 세포거대바이러스(HCMV) DNA 중합효소 유전자의 검색. The Journal of the Korean Society for Microbiology, 27(2), 181-188.
이용정보 (Accessed)	계명대학교 203.247.13.27 2016/01/08 15:56 (KST)

저작권 안내

DBpia에서 제공되는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, 누리미디어는 각 저작물의 내용을 보증하거나 책임을 지지 않습니다.

이 자료를 원저작자와의 협의 없이 무단게재 할 경우, 저작권법 및 관련법령에 따라 민, 형사상의 책임을 질 수 있습니다.

Copyright Information

The copyright of all works provided by DBpia belongs to the original author(s). Nurimedia is not responsible for contents of each work. Nor does it guarantee the contents.

You might take civil and criminal liabilities according to copyright and other relevant laws if you publish the contents without consultation with the original author(s).

PCR을 이용한 인간 세포거대바이러스(HCMV) DNA 중합효소 유전자의 검색

계명대학교 의과대학 내과학교실¹, 외과학교실², 미생물학교실³

김현철¹ · 박성배¹ · 조원현² · 백원기³ · 서민호³

= Abstract =

Detection of Human Cytomegalovirus DNA Polymerase Gene by Polymerase Chain Reaction

Hyun Chul Kim¹, Sung Bae Park¹, Won Hyun Cho², Won Ki Baek³ and Min Ho Suh³

Departments of Internal Medicine¹, Surgery² and Microbiology³, Keimyung University School of Medicine, 194 Dong San Dong, Taegu, Korea

Polymerase chain reaction(PCR) amplification was used to detect human cytomegalovirus (HCMV) in MRC-5 cell culture. Oligonucleotide pairs for DNA polymerase gene of HCMV were used as primers and HCMV AD169 strain was used as a control. Amplified products were detected by gel electrophoresis and by Southern blot hybridization with digoxigenin-labeled HCMV DNA polymerase gene probe. In estimating the sensitivity of PCR, a 5 μ l aliquot of an infectivity titer of 10^{2.3} TCID₅₀/0.1ml of cell culture mixture was detected by direct agarose gel electrophoresis; Southern blot hybridization was four-fold more sensitive(10^{1.7} TCID₅₀/0.1ml) than gel analysis.

The specificity of the PCR was evaluated using other members of the herpes family of viruses and various DNAs. No amplification was noted by direct gel analysis or by dot blot hybridization and only HCMV containing specimen was positive.

In conclusion, these results showed that the PCR may be a sensitive and fast tool for the diagnosis of HCMV infections.

Key Words : Human Cytomegalovirus(HCMV), DNA polymerase gene, PCR, Southern blot.

서 론

인간 세포거대바이러스(human cytomegalovirus, 이하 HCMV)는 Herpes virus과에 속하는 DNA 바이러스로서 건강한 사람에서는 무증세 내지는 경증의 감염을 일으킨다^{9,11,16}. 그러나 유아들에 있어서의 선천성 감염이나, AIDS환자, 장기이식을 받은 환자, 항암치료를 받은 환자 등의 면역결핍상태의 환자에 있어서는 간염, 소화기계통 출혈, interstitial pneumonia, 유아에 있어서의 각종 선천성 기형, 정신박약아, 난

청 등의 중증의 전신성 감염을 초래한다^{9,11,16}. HCMV감염의 진단은 임상적으로는 어려우며, 바이러스 배양검사나 항원 항체검사 등의 실험실적 검사에 의존하는 경향이 있다³⁰. 그리고 ganciclovir등의 HCMV 치료제가 개발되어 있기 때문에 조속하고 정확한 진단이 이루어진다면 치료방침결정에 큰 도움을 줄 수 있다^{9,11,19}.

HCMV의 배양검사는 MRC-5 세포주나 WI-38세포주, Human Foreskin Fibroblast(HFF)등, 주로 섬유아세포주를 이용하여 이루어지고 있으나 HCMV는 배양이 매우 느리고, 배양시 대부분의 바이러스가 세포속에 존재하여 유리(cell-free)바이러스를 얻기가 힘들고, 배양이라는 것 자체가 매우 손이 많이고 수가가 높은

본 연구를 위하여 Taq polymerase를 제공해 주신 KIST 유전공학연구소에 감사사를 드립니다.

점 등의 여러 문제를 갖고 있다^{15, 30, 31}). 그외에도 HCMV의 진단에 ELISA를 이용한 바이러스 항원검사, 보체결합반응(complement fixation test, CF)등을 이용한 HCMV IgM항체검사 등의 면역학적 검사법이 널리 쓰이고 있으나 예민도가 높지 못하고, 바이러스자체를 검출하는 것이 아닌 간접적 방법에 불과한 등 여러가지 단점이 있어서, 더욱 예민하고 신속한 새로운 검사법이 요구되고 있다^{5, 31, 32}).

최근에 분자생물학의 발달로 인하여 검체로부터 원인 바이러스의 DNA나 RNA를 직접검출하는 여러가지 새로운 진단법이 등장하게 되었다^{8, 18, 27, 28}). 그중에서도 Taq DNA 중합효소와 자동온도 순환장치(Temperature cycler)를 이용하여 연속적으로 DNA 합성반응을 가능케 하는 Polymerase Chain Reaction(PCR)법이 개발되므로써 검사물내에 소량의 DNA만 존재하여도 단시간만에 많은량의 동일한 DNA를 간단히 합성할 수 있게 되어 감염병의 진단, 종양의 분석, 유전자 분석 등 분자생물학적 진단 및 연구에 새로운 가능성을 제시하게 되었다^{2, 12, 20, 22, 24~26}).

이상의 지견을 바탕으로 저자들은 HCMV DNA 중합효소 유전자 부위에만 특이하게 결합하는 primer set를 이용하여 PCR을 통한 HCMV DNA의 검색을 실시하여 그 예민도와 특이도를 조사하므로써 HCMV 감염에 있어서의 PCR의 진단적 가능성을 파악코자 본 연구를 실시하여 그 성적을 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 바이러스 및 DNA

인간 세포거대바이러스(HCMV) AD 169 ATCC VR-538, 수두 대상포진 바이러스 Oka strain, 인간 단순포진바이러스 ATCC VR-733, λ 박테리오파지 DNA, B형간염 바이러스 cDNA 및 인간 정상 혈액 DNA를 실험에 사용하였다.

2. 바이러스배양

각 바이러스들은 인간 폐섬유아세포주인 MRC-5세포주(ATCC CCL-171)를 10% Fetal bovine serum과 1% antibiotics-antimycotics가 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Media를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 T25 culture flask에 단일 세포층으로 배양시키고, 바이러스를 접종하여 배양시키면서 나타나는 세포병변(cyto-

pathic effect, CPE)의 정도를 관찰한 후 TCID₅₀을 계산하여 PCR 실험에 사용하였다^{15, 30, 31}).

3. Oligonucleotide primers

HCMV의 DNA 중합효소 유전자절편에 특이하게 결합하는 23mer의 sense primer와 20mer의 antisense primer를 PCR에 사용하였으며, PCR된 DNA산물은 213bp였고 각 primer의 염기서열은 다음과 같다^{3, 6, 13, 23}).

Sense primer:

5'-GCTATGTTTCAGATGTCGCCGCC-3'

Anti-sense primer:

5'-CCCACCTCGGGCTCAAACAC-3'

4. DNA시료의 전처리

세포배양된 바이러스액들을 각각 0.5ml microtube에 넣고 95°C에서 10분간 가열한 후 얼음에 3분간 세웠다가 미량고속원심기로 3분간 원심하고 상청액을 새 microtube로 옮긴후 PCR에 사용하였다. B형간염 바이러스 cDNA는 Birnboim 및 Doly⁴⁾법으로 cloned plasmid DNA를 분리하고 제한효소 BamHI로 절단후 agarose gel에서 전기영동하여 나타난 3.2Kb band의 gel부위를 잘라내고, 「Gene clean 키트」(BIO 101, La Jolla, U.S.A.)를 사용하여 cDNA를 분리한 후 PCR에 사용하였다¹⁷⁾. λ 박테리오파지 DNA는 Perkin Elmer Cetus사(U.S.A.)의 상품을 PCR에 사용하였다. 인간 정상혈액 DNA는 정상인 혈액 10ml를 채혈후 Kunkel등의 방법에 의해 genomic DNA를 분리한 후 PCR에 사용하였다¹⁴⁾.

5. PCR조건

먼저 DNA 시료를 94°C에서 60초간 예열하여 DNA를 변성시킨 후, 다음과 같은 조건으로 40회 PCR을 시행하였다. PCR의 총량은 50 μ l로 하였고, 0.5ml microtube(Sarstedt, Germany)를 사용하였다. 50mM KCl, 10mM Tris HCl (pH 8.3), 1.5mM MgCl₂, 0.01% (wt/vol) gelatin이 함유된 reaction mixture(Perkin Elmer Cetus, U.S.A.)를 사용하였고, 각각 200 μ M의 dATP, dTTP, dCTP, dGTP(Perkin Elmer Cetus, U.S.A.)와 2.5unit의 Taq DNA polymerase(Perkin Elmer Cetus제 및 KIST 유전공학연구소 생산품)를 사용하였다. Primer들은 각각 1 μ M씩 사용하였으며 최종적으로 30 μ l의 mineral oil(Perkin

Elmer Cetus제)로 덮은 후 PCR을 실시하였다²⁾. DNA denaturation은 94°C에서 90초, primer annealing은 60°C에서 90초, DNA extension은 72°C에서 90초간 실시하였고 마지막(40 cycle) 단계의 extension시간은 300초간 실시하였다. PCR에 사용한 장비는 미국 Savant사의 DNA Temperature cycler(공냉식)를 이용하였다. 매 실험마다 HCMV AD-169strain의 DNA를 양성대조군으로 사용하였고, DNA시료를 제외한 모든 것이 함유된 것을 음성대조군으로 사용하였다.

6. 전기영동에 의한 PCR산물의 검색

PCR산물 10 μ l를 취하여 2 μ l의 gel loading buffer(Type I)와 섞은 후 ethidium bromide가 함유된 1.5% agarose gel에 점종 후 1X Tris-Acetate-EDTA(TAE) buffer로 minigel 영동기로 50 Volt 40분간 수평형 잠수식 전기영동을 실시한 후, UV transilluminator (302nm 파장)와 Polaroid camera를 이용하여 사진촬영한 후 213bp 크기의 DNA band 유무를 보아 확인하였다. 이때 DNA size marker로는 123 DNA ladder(BRL, U.S.A.)를 사용하였다.

7. Southern blot에 의한 PCR산물의 검색

전기영동 후 사진촬영이 끝난 gel을 1.5M NaCl-0.5N NaOH용액(denaturation solution)에 담그고 실온에서 20분 진탕 후 1.5M NaCl-1M Tris-HCl용액(neutralization solution)에 담그고 실온에서 20분 진탕하였다. 그 후 gel상의 DNA를 20X SSC(sodium chloride-sodium citrate)액을 이용하여 nitrocellulose(NC) filter(20 μ m pore size, Schleicher & Schuell, Germany)에 실온에서 약 4시간 blotting시킨 후 진공 오븐에서 80°C로 90분간 가열하여 고정시킨 후 비닐봉투에 넣어 밀봉하여 진공데시케이터에 보관하다가 hybridization을 실시하였다²⁸⁾.

8. Digoxigenin-probe를 사용한 hybridization 및 발색

CMV의 DNA중합효소 유전자 DNA를 random primed DNA labeling법에 의해 digoxigenin-11-dUTP로 labeling시킨 DNA를 probe로 사용하였다⁹⁾. 5X SSC, 1% blocking reagent, 0.1% N-laurylsarcosine, 0.02% SDS가 함유된 prehybridization solution을 넣고 68°C에서 2시간 prehybridization을 실시하였다. HCMV DNA probe를 95°C에 10분간 가열하여 denaturation

시키고 ice에 5분간 세운 후 hybridization solution과 섞어서 NC filter에 넣고 68°C에서 15시간 hybridization을 실시하였다. hybridization이 끝난 NC filter를 2X SSC, 0.1% SDS액으로 실온에서 5분간 2회 세척한 후 0.1X SSC, 0.1% SDS액으로 68°C에서 15분간 2회 세척하였다. NC filter를 100mM Tris-HCl, 150mM NaCl(pH 7.5)액으로 실온에서 1분간 씻은 후 blocking buffer에 30분간 부란 후 alkaline-phosphatase가 결합된 항-digoxigenin-항체액에 30분간 부란시켰다. NC filter를 NBT와 X-phosphate가 함유된 발색액에 담구고 1-2시간 부란하여 발색시키고 TE액을 넣어 발색을 정지시킨 후 사진촬영하여 판독하였다.

성 적

MRC-5 세포 단일층에 배양된 HCMV(농도: 10^{2.7}TCID₅₀/0.1ml) 5 μ l를 대상으로 여러가지 농도의 Taq polymerase를 사용하여 PCR을 실시한 결과 2.5unit-15unit 농도 모두에서, agarose gel 전기영동상에서나 Southern blot상에서 213bp의 target DNA band(HCMV DNA 중합효소 유전자)가 검출되었다(Fig. 1).

본 PCR검사의 예민도를 조사하기 위해 배양된 HCMV 농도를 순차적으로 희석하여 PCR을 실시하였다. 그 결과 5 μ l 검체를 기준으로 PCR을 했을 때 agarose gel 전기영동상에서는 10^{2.7}TCID₅₀/0.1ml (10²/0.2ml)까지 검출가능하였으며, Southern blot상에서는 10^{1.7}TCID₅₀/0.1ml (10²/0.2ml)까지 검출가능하였다(Fig. 2). 본 PCR검사의 특이도를 조사하기 위해 HCMV와, 단순포진바이러스(HSV), 수두-대상포진 바이러스(VZV), B형간염바이러스(HBV) cDNA, lambda 박테리오파지 DNA 및 정상인 혈액 DNA등을 대상으로 PCR을 실시하였다. 그 결과 agarose gel 전기영동상에서나 Southern blot상 모두에서 HCMV만이 213bp의 target DNA band가 검출되었으며, HSV, VZV, HBV cDNA, λ 박테리오파지 DNA, 정상혈액 DNA등은 모두 PCR 검사 음성으로 나타났다(Fig. 3).

고 찰

HCMV는 건강한 사람에게는 무증상 내지 경증의 감염만을 일으키므로 별문제가 되지 않지만, 유아의 선천성 감염증이나 면역결핍환자

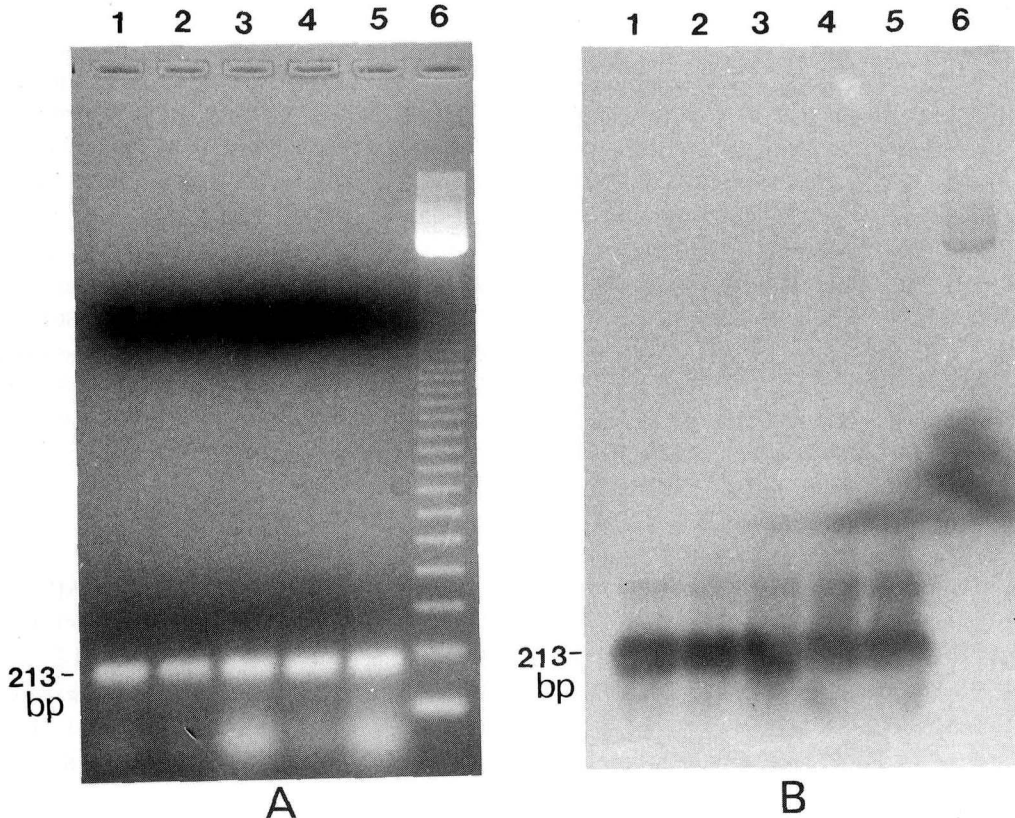


Fig. 1. PCR detection of Human Cytomegalovirus(HCMV) DNA polymerase gene from HCMV infected MRC-5 cell culture suspensions. A) Separation on agarose gel of PCR products. Lanes 1 to 5: 213bp PCR products from HCMV infected MRC-5 cell culture suspensions($5\mu\text{l}$ of 10^3 TCID₅₀/0.2ml) with various concentrations of *Taq* polymerase(lane 2:2.5unit, lane 3:5unit, lane 4:10unit, lane 5: 15unit), Lane 6:DNA size marker(123 ladder). B) Southern blotting results of A(Digoxigenin-labeled HCMV DNA polymerase gene probe and nitrocellulose filters were used).

에 있어서는 심각한 전신적 감염을 초래하기 때문에 임상적으로 매우 중요하다^{9,11,16}. HCMV의 임상적 진단은 쉽지 않기 때문에 검사실적 소견이 큰 의미를 가진다. 그중에서도 가장 정확한 진단법이라고 할 수 있는 바이러스 배양법은 MRC-5 세포 등의 인간 이배수체 섬유아세포(human diploid fibroblast)에 가검물을 접종하고 몇주간을 관찰하여 섬유아세포 단일층에 세포병변 현상(CPE)이 발생하는 것을 보아 판정하는 것으로서 최소 21일 이상의 오랜시간이 걸리고 일손이나 비용도 많이 들기 때문에 국내에서는 손쉽게 이루어지지 못하고 있는 실정이다^{3,15,30,31}. 일반적으로 널리 사용되는 ELISA법이나 CF법 등은 시간이 비교적 짧고 손쉬운 장점은 있으나 그 예민도가 떨어지고 직접 바이러스를 검사하는 것이 아닌, 항원-항체반응에 의한 간접적 검사인 점과, 일단 항체가 생

긴 후라야 검사가 가능하므로 초기진단이 쉽지 않은점 등의 단점이 있어서 더욱 신속 정확하고도 간편한 진단법이 요구되고 있다^{5,31,32}.

그런데 최근에 반복적인 DNA합성을 통하여 검사물내의 극소량의 DNA를 단시간만에 대량의 DNA로 증폭시킬 수 있는 Polymerase Chain Reaction(PCR)법의 개발로 인해 HCMV의 진단에 큰 도움을 줄 가능성을 제시하게 되었고, 국내외에서도 HCMV의 immediate early antigen 유전자에 특이하게 결합하는 primer set로 PCR을 실시하여 그 성적을 발표한바 있다^{1,3,7,10,21,29,33,34}. 이들의 보고에 의하면 예민도는 좋았으나 HCMV이외의 Herpesvirus과에 속하는 바이러스 혹은 기타 바이러스와도 반응을 일으켜 특이도에 있어서 개선해야 할 필요가 있었다^{3,7,10,21}.

저자들은 HCMV DNA중합효소 유전자 부위

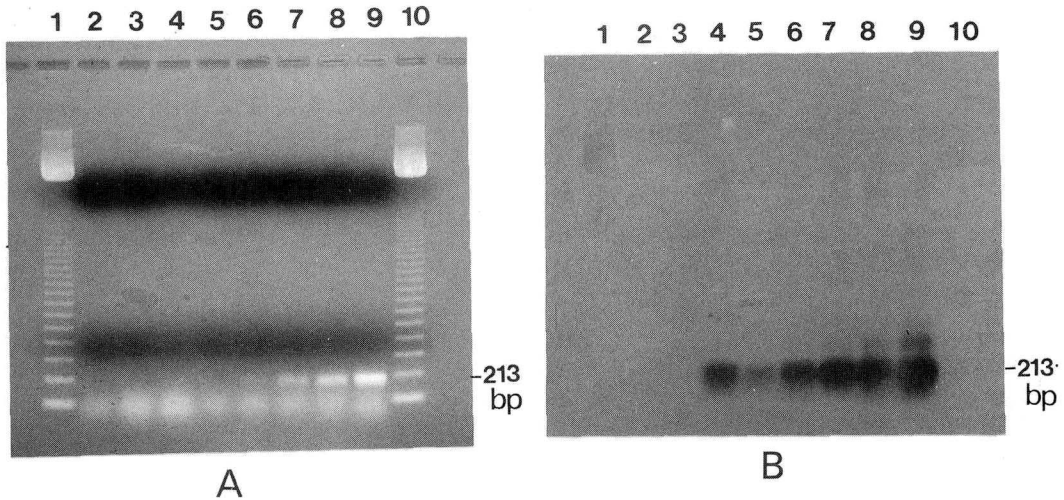


Fig. 2. Sensitivity of PCR detection of HCMV DNA polymerase gene from MRC-5 cell culture suspensions. A) Separation on agarose gel of PCR products. Lanes 1 and 10:DNA size markers(123 ladder), lane 2:negative control, lanes 3 to 9:213 bp PCR products from HCMV infected MRC-5 cell culture suspensions with various concentrations of HCMV(lane 3:5 μ l of 10^1 TCID₅₀/0.2ml, lane 4:5 μ l of 10^2 TCID₅₀/0.2ml, lane 5:1 μ l of 10^3 TCID₅₀/0.2ml, lane 6:2 μ l of 10^3 TCID₅₀/0.2ml, lane 7:3 μ l of 10^3 TCID₅₀/0.2ml, lane 8:4 μ l of 10^3 TCID₅₀/0.2ml, lane 9:5 μ l of 10^3 TCID₅₀/0.2ml). B) Southern blotting results of A(Digoxigenin-labeled HCMV DNA polymerase gene probe and nitrocellulose filters were used).

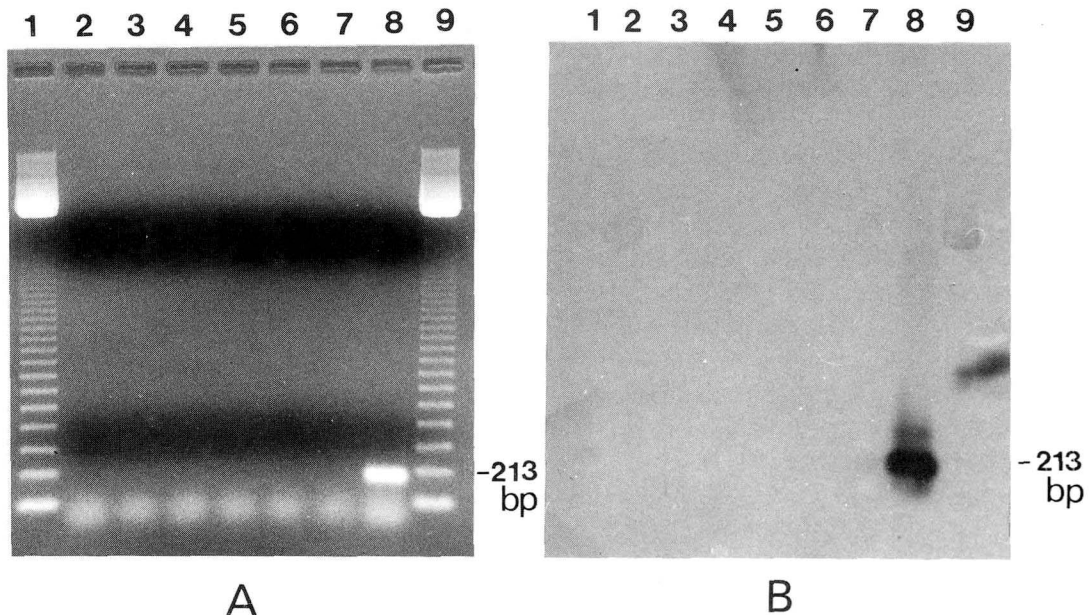


Fig. 3. Specificity of PCR detection of HCMV DNA polymerase gene from MRC-5 cell culture suspensions infected with various viruses and from various DNAs. A) Separation on agarose gel of PCR products. Lanes 1 and 9:DNA size markers(123 ladder), lane 2:negative control, lane 3:PCR of Herpes Simplex virus infected cells, lane 4:PCR of Varicella-Zoster virus infected cells, lane 5:PCR of cloned Hepatitis B virus DNA, lane 6:PCR of λ bacteriophage DNA, lane 7:PCR of human normal blood DNA, lane 8:213bp PCR product from HCMV infected cells. B) Southern blotting results of A (Digoxigenin-labeled HCMV DNA polymerase gene probe and nitrocellulose filters were used).

에만 특이하게 결합하는 primer set로 PCR을 실시하여 213bp의 target DNA band의 유무를 보아 그 예민도와 특이도를 조사하였다^{3,13}. 예민도에 있어서는 바이러스 배양 혼합액 5 μ l를 사용하여 40회 PCR했을 경우에 agarose gel 전기영동으로 10^{2.3}TCID₅₀/0.1ml까지 검출가능하여 예민도가 매우 높았으며 외국의 보고와 유사하였다^{7,10,19}. 영동된 gel을 Southern blot시켜 비동위원소성인 Digoxigenin으로 표식된 DNA probe를 사용하여 hybridization을 실시한 결과 10^{1.7}TCID₅₀/0.1ml까지 검출가능하여, 단순 전기영동법보다 4배 이상 예민도가 높음을 알 수 있었다. 그러나 10^{1.3}TCID₅₀/0.1ml까지 검출가능했다는 외국의 보고⁷)에 비해서는 2-3배 낮았는데 그 이유는 외국의 보고자들은 ³²P 동위원소로 표식된 probe를 사용하였기 때문에 예민도가 더 높이 나타난 것으로 추정된다. 그러나 동위원소법의 경우 4-10일 정도의 시간이 걸리는 점을 감안하면, 예민도는 약간 낮지만 2-3일 이내에 결과를 판독할 수 있고 동위원소의 위험성이 없으며, probe의 수명도 동위원소(³²P)의 경우 2주 이내에 사용해야 하지만 digoxigenin probe의 경우 40주 이상 사용할 수 있는 등의 많은 편리성과 안정성이 있어서, PCR검사가 일상적인 임상진단 목적으로 사용될 경우 비동위원소성 DNA probe법이 더 유용하리라고 생각된다^{1,2}.

그리고 HCMV PCR검사에 사용하는 Taq polymerase의 농도는 2.5unit에서 15unit의 여러가지 농도가 모두 좋은 결과를 보였으나 Taq polymerase의 농도가 높을수록 target DNA의 band는 선명하나 primer끼리 결합하여 생기는 primer dimer가 많이 나타나고, 특히 Southern blot상에서 비특이적 band가 나타나는 단점이 있었고, 2.5 혹은 5unit 농도가 primer dimer가 적으며, 비특이적 band가 없고도 경제적이어서 가장 적합하다고 생각되었다.

본 PCR 실험의 특이도 검사를 위해 HCMV 이외에도 단순 포진 바이러스(HSV), 수두대상포진 바이러스(VZV)등의 herpesvirus들과, B형간염 바이러스 cDNA, λ 박테리오파지 DNA 및 정상인 혈액 DNA를 검사하였는데, 그 결과 전기영동상에서나 Southern blot상에서나 HCMV만이 PCR양성이었으며 그 외에는 모두 음성으로 나타나서, 본 PCR법이 매우 특이도가 높은 것을 알 수 있었다^{3,7,10}. 이와같이 HCMV의 DNA중합효소 유전자부위에 결합하는 primer

set를 사용한 PCR법이 예민도나 특이도가 매우 높고, 검사기간도 Southern blot을 포함하여 3일 정도로 매우 짧고, 직접 바이러스를 검출할 수 있다는 점으로 볼때 향후 HCMV감염병의 새로운 진단법으로서 널리 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

인간 세포거대바이러스(HCMV)의 새로운 검출법으로 소개되고 있는 PCR법의 의의를 조사하고자 HCMV의 DNA중합효소 유전자 부위에만 특이하게 결합하는 primer set로 PCR을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 여러가지 농도의 Taq polymerase를 사용하여 PCR을 실시한 결과 2.5unit-15unit사이의 농도 모두에서 213bp의 Target DNA band가 검출되었는데, 경제적이고도 primer dimer가 적게 나타나는 2.5unit 농도가 가장 적합함을 알 수 있었다.

2. 본 PCR검사의 예민도를 조사한 결과 5 μ l 검체를 기준으로 했을때 agarose gel 전기영동으로는 10^{2.3}TCID₅₀/0.1ml까지 검출가능하였고, PCR산물에 대한 Digoxigenin probe를 이용한 Southern blot상에서는 10^{1.7}TCID₅₀/0.1ml까지 검출가능하여, 본 검사법이 높은 예민도를 가짐을 알 수 있으나, PCR산물에 대한 동위원소 표식 probe에 의한 Southern blot을 실시한 외국의 보고에 비해서는 예민도가 2-3배 정도 낮았다.

3. 본 PCR검사의 특이도를 조사한 결과 단순포진 바이러스, 수두대상포진 바이러스, B형간염 바이러스 cDNA, λ 박테리오파지 DNA 및 정상인 혈액 DNA등에는 agarose gel 전기영동상에서나 Southern blot상에서 모두 음성이었으며 HCMV만이 양성으로 나타나서, 본 검사법의 특이도가 매우 높음을 알 수 있었다.

4. 이상과 같이 HCMV의 DNA중합효소 유전자 부위에 대한 PCR검사법은 예민도나 특이도가 매우 높고 검사기간이 1-3일 밖에 걸리지 않으며, 면역학적 검사법과는 달리 바이러스를 직접 검색할 수 있다는 점으로 볼때, 앞으로 선천성 및 후천성 HCMV감염의 진단에 하나의 새로운 방법으로서 널리 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) 김태규, 유문간, 김금용, 한 훈:중합효소 연쇄반응(PCR)에 의한 소변내 인형 거대 세포바이러스(HCMV)탐지법 개발. 대한미생물학회 제67차 춘계 학술대회 초록집 p28, 1991.
- 2) 서민호, 백원기, 이규석:임상검체에서 PCR을 이용한 수두-대상포진 바이러스 DNA의 검색. 대한미생물학회지, 26:479-486, 1991.
- 3) 손영모, Pass RF:중합효소 연쇄반응으로 검출된 거대세포바이러스 DNA에 대한 평가. 대한의학협회지, 33:282-291, 1990.
- 4) Birnboim IC and Doly J:Arpid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Reser* 7: 1513-1523, 1979.
- 5) Boppana S, Smith RJ, Stagno S and Britt WJ:Evaluation of a microtiter plate fluorescent-antibody assay for rapid detection of Cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 30:721-723, 1992.
- 6) Davison AJ and Wilkie NM:Location and orientation of homologous sequences in the genomes of five herpesviruses. *J Gen Virol* 64:1927-1942, 1983.
- 7) Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM and May RA:Detection of Cytomegalovirus in urine from newborns by using Polymerase Chain Reaction DNA amplification. *J Infect Dis* 158:1177-1184, 1988.
- 8) Feinberg AP and Vogelstein B:A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6-11, 1983.
- 9) Ho M:Cytomegalovirus, p1159-1172. In Mandell GL, Douglas RG Jr. and Bennett JE(ed), Principles and practice of infectious diseases. 3rd ed. Churchill Livingstone Inc., New York, 1990.
- 10) Hsia K, Spector DH, Lawrie J and Spector SA:Enzymatic amplification of human cytomegalovirus sequences by Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* 27:1802-1809, 1989.
- 11) Jordan MC : Cytomegalovirus infections, p805-811. In Hoeprich PD and Jordan MC (ed), Infectious Diseases. 4th ed. J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1989.
- 12) Kido S, Ozaki T, Asada H, Higashi K, Kondo K, Hayakawa Y, Morishima T, Takahashi M and Yamanishi K:Detection of varicella zoster virus(VZV) DNA in clinical samples from patients with VZV by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 29:76-79, 1991.
- 13) Kouzarides T, Bankier AT, Satchwell SC, Weston K, Tomlinson P and Barrel BG:Sequence and transcription analysis of the human cytomegalovirus DNA polymerase gene. *J Virol* 61:125-133, 1987.
- 14) Kunkel LM, Smith KD, Boyer SH, Borgaonkar DS, Wachtel SS, Miller OJ, Breg WR, Jones HW and Rory JM:Analysis of human gamma-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:1245-1249, 1977.
- 15) Landry ML and Hsiung GD:Primary isolation of viruses. p31-51. In Spector S and Lancz GJ(ed), Clinical Virology Manual.1st ed. Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York, 1986.
- 16) Lehrman SN:Herpesviruses, p 790-801, In Joklik WK, Willett HP, Amos DB and Wilfert CM(ed), Zinsser Microbiology. 19th ed. Appleton & Lange, East Norwalk, 1988.
- 17) Moriarty AM, Hoyer BH, Shin JWK, Gerin JL and Hamer DH:Expression of the hepatitis B virus surface antigen gene in cell culture by using a simian virus 40 vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:2606-2610, 1981.
- 18) Musiani M, Zerbini M, Gentilomi G, Gallinella G, Venturoli S, Gibellini D and La Placa M:Rapid detection of cytomegalovirus DNA in urine samples with a dot blot hybridization immunoenzymatic assay. *J Clin Microbiol* 28:2101-2103, 1990.
- 19) Olive DM, Simsek M and Al-Mufti S:Polymerase Chain Reaction assay for detection of human cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 27:1238-1242, 1989.

- 20) Persing DH:Polymerase chain reaction: Trenches to benches. *J Clin Microbiol* **29**: 1281-1285, 1991.
- 21) Porter-Jordan K, Rosenberg EI, Keiser JF, Gross JD, Ross AM, Nasim S and Garrett CT:Nested polymerase chain reaction assay for the detection of cytomegalovirus overcomes false positive caused by contamination with fragmented DNA. *J Med Virol* **30**:85-91, 1990.
- 22) Puchhammer-Stockl E, Popow-Kraupp T, Heinz FX, Mandl CW and 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* **29**:1513-1516, 1991.
- 23) Ruger R, Bornkamm GW and Fleckenstein B:Human cytomegalovirus DNA sequences with homologies to the cellular genome. *J Gen Virol* **65**:1351-1364, 1984.
- 24) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA:Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491, 1988.
- 25) Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N:Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1350-1354, 1985.
- 26) Shibata D and Klatt EC:Analysis of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus infection by polymerase chain reaction in the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med* **113**:1239-1244, 1989.
- 27) Shibata D, Martin WJ, Appleman MD, Causey DM, Leedom JM and Arnheim N: Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patient infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* **158**:1185-1192, 1988.
- 28) Southern EM:Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**:503-517, 1975.
- 29) Stanier P, Taylor DL, Kitchen AD, Wales N, Tryhorn Y and Tyms AS:Persistence of cytomegalovirus in mononuclear cells in peripheral blood from blood donors. *British Med J* **299**:897-898, 1989.
- 30) Straus SE and Smith HA:Cytomegalovirus, Varicella-Zoster virus, and Epstein-Barr Virus. p 401-416. In Specter S and Lancz GJ(ed), *Clinical Virology Manual*. 1st ed. Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York, 1986.
- 31) West PG, Hartwig RA and Baker WW: Comparison of sensitivities of three commercial MRC-5 cell lines grown in shell vials to cytomegalovirus and responses to enhancing agents. *J Clin Microbiol* **30**:557-560, 1992.
- 32) Yamanaka T, Kiyotani K, Sokaguchi T, Fukuda Y, Dohi K, Yamada M, Yoshida M, Nii S and Yoshida T:Detection of cytomegalovirus in urine samples by an enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody against the viral 150-kilodalton protein. *J Clin Microbiol* **30**:685-690, 1992.
- 33) Zaia JA, Gallez-Hawkins G, Churchill MA, Morton-Blackshere A, Pande H, Adler SP, Schmidt GM and Forman SJ:Comparative analysis of human cytomegalovirus a-sequence in multiple clinical isolates by using Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism assays. *J Clin Microbiol* **28**:2602-2607, 1990.
- 34) Zipeto D, Revello MG, Silini E, Parea M, Percivalle E, Zavattoni M, Milanese G and Gerna G:Development and clinical significance of a diagnostic assay based on the Polymerase Chain Reaction for detection of human cytomegalovirus DNA in blood samples from immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* **30**:527-530, 1992.