



인간 세포거대바이러스의 배양상 및 PCR에 의한 바이러스 DNA 검색

Cultural Characteristics of Human Cytomegalovirus and Detection of Viral DNA by Polymerase Chain Reaction

저자 (Authors)	박건욱, 백성덕, 백원기, 서성일, 박종욱, 서민호, 최병길 Keon-Wook Park, Seong-Duck Paik, Won-Ki Baek, Seong-Il Suh, Jong-Wook Park, Min-Ho Suh, Byung-Kil Choe
출처 (Source)	The Journal of the Korean Society for Microbiology 29(3) , 1994.6, 275-285 (11 pages)
발행처 (Publisher)	대한미생물학회 The Korean Society For Microbiology
URL	http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE01484038
APA Style	박건욱, 백성덕, 백원기, 서성일, 박종욱, 서민호, 최병길 (1994). 인간 세포거대바이러스의 배양상 및 PCR에 의한 바이러스 DNA 검색. The Journal of the Korean Society for Microbiology, 29(3), 275-285.
이용정보 (Accessed)	계명대학교 203.247.13.27 2016/01/11 10:54 (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).

인간 세포거대바이러스의 배양상 및 PCR에 의한 바이러스 DNA 검색*

계명대학교 의과대학 안과학교실, 미생물학교실¹, 면역학교실²

박건욱 · 백성덕¹ · 백원기¹ · 서성일¹ · 박종욱² · 서민호¹ · 최병길²

= Abstract =

Cultural Characteristics of Human Cytomegalovirus and Detection of Viral DNA by Polymerase Chain Reaction

Keon-Wook Park, Seong-Duck Paik¹, Won-Ki Baek¹, Seong-Il Suh¹, Jong-Wook Park²,
Min-Ho Suh¹ and Byung-Kil Choe²

*Departments of Ophthalmology, Microbiology¹, and Immunology², Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea*

In order to understand the cultural characteristics of human cytomegalovirus (HCMV) and to make direct detection of viral DNA during cell culture, the viruses were cultured in MRC-5 fibroblast cell line and culture supernatants were tested by the Polymerase Chain Reaction (PCR).

Characteristic cytopathic effects (CPE) of HCMV infection were detected after 10 days of virus inoculation. Characteristic intranuclear inclusion bodies and large, round or oval shaped cells were clearly seen after 12 days of virus inoculation.

In PCR, oligonucleotide pairs for major immediate early (MIE) gene of HCMV were used as primers. Amplified products were detected by gel electrophoresis and by Southern blot hybridization with digoxigenin-labeled HCMV MIE gene probe. In estimating the sensitivity of PCR, the PCR product starting with 1 μ l aliquot of an infectivity titer of 10^{2.5} TCID₅₀/0.2ml of cell culture mixture was detected by direct agarose gel electrophoresis and Southern blot hybridization. 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 Southern blot hybridization and only HCMV containing specimen was positive. In the sensitivities and the specificities, there were no differences between the PCR with OPC(oligonucleotide purification column) purified primers and the PCR with Speed Vac dried primers(no other purification steps were used).

Culture supernatants were tested for the detection of MIE DNA by PCR. After 4 days of culture, the MIE DNA was detected in culture supernatants by PCR.

In conclusion, I think we can make more rapid and precise diagnosis of HCMV infection by combining virus culture and PCR of culture supernatants.

Key Words: Human Cytomegalovirus (HCMV), Culture, Major Immediate Early gene(MIE), PCR.

*이 연구는 1993년도 계명대학교 율증연구비 및 동산의료원 조사연구비로 이루어졌음.

서 론

최근의 감염병은 특정 병원균이 특정 질병을 일으키던 과거와는 달리, 평소에는 별로 병원성이 없던 미생물이 숙주의 상태가 악화된 틈을 타서 감염을 일으키게 되는, 이른바 기회감염(opportunistic infection)이 중요한 비중을 차지하고 있다^{22,28)}.

그중에서 특히 장기이식을 받은 환자나, 암 환자, AIDS환자 등의, 면역억제상태에 있는 환자에서 폐렴, 간염, 소화기 궤양, 망막염, 뇌손상 등 많은 문제를 초래하고 있는 것이 「인간 세포 거대바이러스(Human Cytomegalovirus, 이하 HCMV)」이다.^{11,12,18,19,24)} 또한 HCMV는 임신중에 선천성 감염을 초래하여 소뇌증, 난청, 백막 망막염 등의 각종 선천성 기형을 일으킨다. 그리고 HCMV감염은 Epstein-Barr virus(이하 EBV) 감염이나 기타 질환과 그 양상이 유사하여 임상적으로는 정확한 진단이 힘들다^{10,14,17)}.

현재 HCMV감염의 가장 정확한 진단법으로서는 Human Foreskin Fibroblast (HFF)나 MRC-5세포주 등의 섬유아세포주를 이용한 배양검사가 있으나 바이러스 성장에 따른 세포병변(cytopathic effect, 이하 CPE)을 면밀히 판독할 수 있는 경험이 있어야 하고, 배양이 매우 느려서 약 2-4주가 소요된다^{32,33)}. 그리고 일반적인 미생물 검사실에서 바이러스를 배양하기는 어려운 실정이다. 그외에는 보체결합반응(complement fixation test, CF)검사, ELISA검사 등의 면역학적 검사법이 사용되고 있으나 예민도가 높지 못하고, 바이러스자체를 검출하는 것이 아닌 간접적 방법에 불과한 등 여러가지 단점이 있다^{6,34)}.

근래에 분자생물학 기법이 여러분야의 의학 연구에 적용되기 시작하였고 임상검사에도 DNA 탐지자(probe)를 이용한 분자생물학적 진단법이 응용되고 있다.^{9,20,30,31)} 특히 소량의 시료로 단시간 만에 매우 예민한 검사결과를 얻을 수 있는 Polymerase Chain Reaction (PCR)법이 소개되어 각종 미생물의 조기검출에 적용되고 있다.^{2,8,23,26,27,29)}

이에 저자들은 HCMV감염의 보다 나은 진단법 확립에 도움을 주고자, 먼저 섬유아세포상에서의 HCMV의 세포병변의 특성을 관찰하고, HCMV 주요 극조기 항원 (Major Immedi-

ate Early Antigen;MIE) 유전자 부위에만 특이하게 결합하는 primer를 이용하여 PCR을 통한 바이러스 DNA검색을 실시하여 HCMV 감염에 있어서의 바이러스 배양 및 PCR검사의 진단적 유용성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스 및 DNA

인간세포 거대바이러스(HCMV) AD 169 ATCC VR-538, 수두 대상포진 바이러스 Oka strain(VZV), 인간 단순포진바이러스 ATCC VR-733(HSV), Epstein Barr 바이러스(EBV), λ 박테리오파지 DNA 및 인간 정상 혈액 DNA를 실험에 사용하였다.

2. HCMV 바이러스배양

HCMV의 배양은 인간 폐섬유아세포주인 MRC-5 세포주(ATCC CCL-171)를 10% Fetal bovine serum과 1% antibiotics-antimycotics가 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Media(DMEM)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 T25 Culture flask에 단일세포층으로 배양시키고, 바이러스를 접종하여 배양시키면서 나타나는 세포병변의 정도를 관찰한 후 TCID₅₀(tissue culture infective dose 50)을 계산하여 PCR 실험에 사용하였다^{16,32,33)}.

배양일자별 PCR검사를 위하여 MRC-5 세포주가 90%의 단일세포층을 형성하였을 때 media를 완전히 제거한 후 10^{3.5} TCID₅₀/0.2ml 농도의 HCMV 0.1ml를 접종하고 37°C에서 1시간 방치 후 media 5ml를 넣고 overnight시켰다^{16,33)}. 다음날 media를 제거한 후 새 media 10ml를 넣고 배양시키면서 HCMV접종 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16일후에 배양상층액을 취하여 PCR검색을 실시하였다.

3. DNA시료의 전처리

세포배양된 바이러스액들을 각각 0.5ml microtube에 넣고 95°C에서 10분간 가열한 후 얼음에 3분간 세웠다가 미량고속원심기로 3분간 원심하고 상층액을 새 microtube로 옮긴 후 PCR에 사용하였다. λ 박테리오파지 DNA는 Perkin Elmer Cetus사(U.S.A.)의 상품을 PCR에 사용하였다. 인간 정상혈액 DNA는 정상인 혈액 10ml 채혈 후 Kunkel 등의 방법에 의해 genomic DNA를 분리한 후 PCR에

사용하였다¹⁵⁾.

4. Oligonucleotide primers

미국 Applied Biosystem사의 DNA 합성기 (PCR Mate-EP391)를 이용하여 HCMV의 MIE 유전자 절편에 특이하게 결합하는 25mer의 sense primer와 25mer의 antisense primer를 합성하고 암모니아 처리와 정제과정을 거친 후 PCR에 사용하였다. PCR된 DNA산물은 435bp였고 각 primer의 염기서열은 다음과 같다^{7, 8, 25)}.

Sense primer :5' - CCAAGCGGCCTCT
GATAACCAAGCC-3'
Anti-sense primer:5'-CAGCACCATCCTCC
TCTTCCTCTGG-3'

5. DNA deprotection

합성된 DNA primer가 들어있는 column을 1ml주사기에 연결하고 약 0.5ml의 ammonium hydroxide를 천천히 뽑아올려 20분간 세운 후 튜브에 DNA를 붙어내고 또 다시 ammonium hydroxide를 뽑아올려서 이 과정을 4회 반복하여 DNA를 다 붙여낸 후 튜브를 55℃ 수조에서 15시간정도 세운 후 꺼내서 실온에 15분 방치 후, 4℃에 15분 방치 후 정제하였다⁴⁾.

6. OPC (oligonucleotide purification column)를 이용한 primer정제

먼저 column을 활성화시키기 위해 HPLC급 acetonitrile로 천천히 적신 후 4℃에 보관되어 있던 2M triethylamine acetate로 천천히 적셨다. 활성화된 column에 암모니아 처리가 끝난 oligonucleotide액을 통과시켜 column내에 결합시키고 1:10 희석된 ammonium hydroxide액으로 3회 씻어낸 후 증류수로 2회 씻어내었다. 여기에 2% trifluoroacetic acid를 통과시킨 후 증류수로 2회 씻어내고 1ml의 20% acetonitrile액으로 oligonucleotide primer DNA를 녹여낸 후 SpeedVac 건조기로 2.5시간 건조시키고 최종적으로 500μl의 증류수에 녹여 UV spectrophotometer로 농도 및 순도를 확인하고 PCR에 사용하였다⁵⁾.

7. SpeedVac건조기를 이용한 primer정제

암모니아 처리가 끝난 oligonucleotide액을 1.5ml microfuge 튜브로 옮긴 후 미국 Savant 회사제 SpeedVac 건조기로 2.5시간 건조시켜

암모니아를 완전히 제거한 후 500μl의 증류수에 녹여 UV spectrophotometer로 농도 및 순도를 확인하고 PCR에 사용하였다⁵⁾.

8. PCR조건

먼저 DNA 시료를 94℃에서 60초간 예열하여 DNA를 변성시킨 후, 다음과 같은 조건으로 40회 PCR을 시행하였다. PCR의 총량은 50μl로 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 μM의 dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Perkin Elmer Cetus, U.S.A.)와 2.5unit의 Taq DNA polymerase (Perkin Elmer Cetus제)를 사용하였다. Primer들은 각각 1μM씩 사용하였으며 최종적으로 40μl의 mineral oil (Perkin Elmer Cetus제)로 덮은 후 PCR을 실시하였다^{1, 2)}. DNA denaturation은 94℃에서 120초, primer annealing은 62℃에서 90초, DNA extension은 72℃에서 60초간 실시하였고 마지막(40cycle) 단계의 extension시간은 450초간 실시하였다⁸⁾. PCR에 사용한 장비는 미국 Ericomp사의 Easy cycler(수냉식)를 이용하였다. 매 실험마다 HCMV AD-169 strain의 DNA를 양성대조군으로 사용하였고, DNA시료를 제외한 모든 것이 함유된 것을 음성대조군으로 사용하였다.

9. 전기영동에 의한 PCR산물의 검색

PCR산물 10μl를 취하여 2μl의 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 Volt로 40분간 수평형 잠수식 전기영동을 실시한 후, UV transilluminator (302nm파장)와 Polaroid camera를 이용하여 사진촬영한 후 435bp 크기의 DNA band 유무를 보아 확인하였다. 이때 DNA size marker로는 미국 Bethesda Research Laboratory사의 123 DNA ladder를 사용하였다²⁾.

10. 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. 그후 gel 상의 DNA를 20X SSC (sodium chloride-sodium citrate)액을 이용하여 nitrocellulose (NC) filter (0.2 μ m pore size, Schleicher & Schuell, Germany)에 실온에서 약 4시간 blotting시킨 후 진공 오븐에서 80°C로 90분간 가열하여 고정시킨 후 비닐봉투에 넣어 밀봉하여 진공 데시케이터에 보관하다가 hybridization을 실시하였다³¹⁾.

11. Digoxigenin-probe를 사용한 hybridization 및 발색

CMV의 MIE 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 denaturation시키고 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 세척하

였다. 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 관독하였다^{1,2)}.

성 적

HCMV의 배양일자별 세포병변의 특성을 파악하기 위해 MRC-5세포주에 HCMV를 접종하고 도립현미경으로 매일 1회씩 세포의 형태를 관찰한 바 배양 10일째에 방추형의 정상 섬유아세포층에서 크고 둥글거나 타원형의 세포들이 관찰되었으며, 세포병변의 형태는 12일째 뚜렷해졌다. Fig. 1은 정상 MRC-5 세포 및 HCMV 감염으로 인해 세포병변이 나타난 배양 12일째의 세포의 형태를 나타낸 것이다. 배양 16일째는 거의 전 시야에서 세포병변이 관찰되었으며, HCMV감염의 전형적인 특징인 intranuclear inclusion body들이 관찰되었다 (Fig. 2).

저자들이 합성한 oligonucleotide primer를

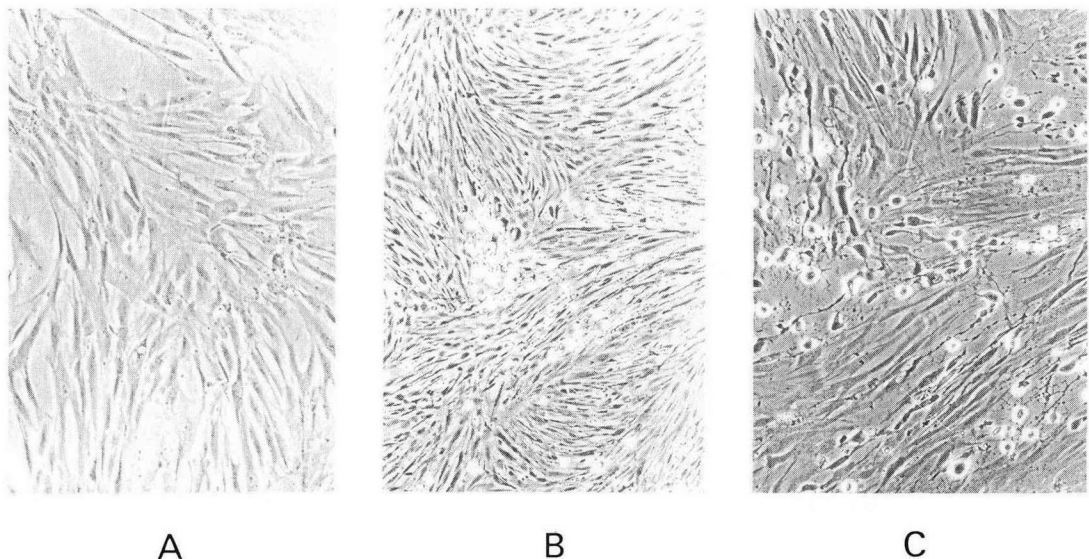
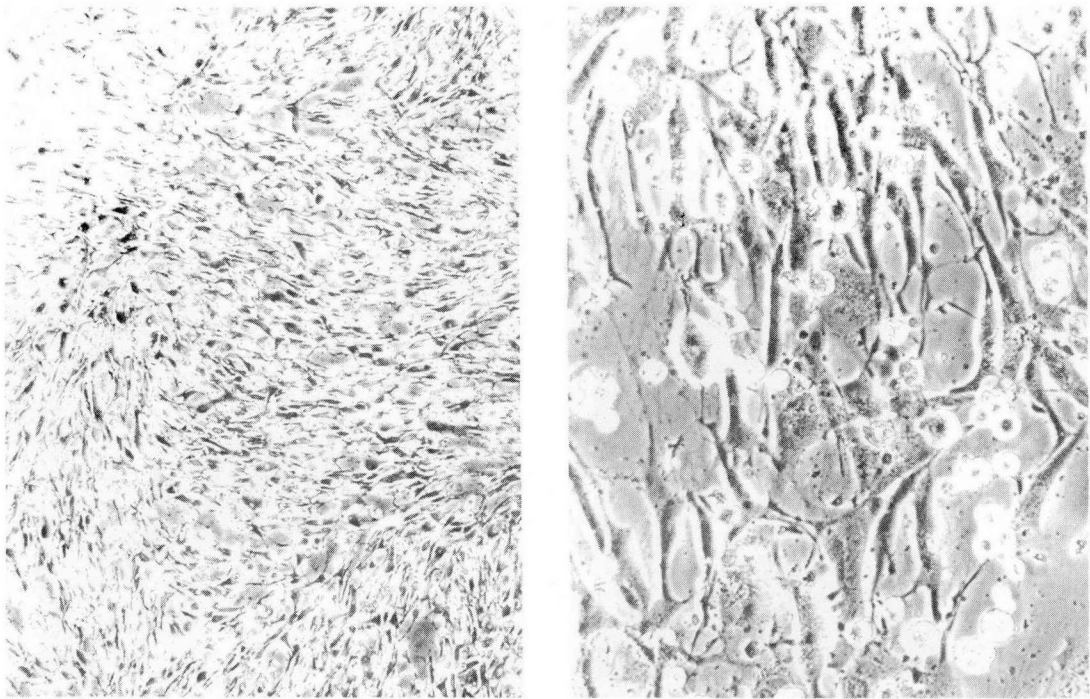


Fig. 1. Cytopathic effects of Human Cytomegalovirus(HCMV) on MRC-5 cells. A) Normal MRC-5 cells(X200):No cytopathic effects are seen. B) MRC-5 cells 12 days after HCMV inoculation (X100):Characteristic cytopathic effects of large, round or oval cells are seen. C) High power detail of B (X200):Large cells with intranuclear inclusions are seen.



A

B

Fig. 2. Cytopathic effects of HCMV on MRC-5 cells. A) MRC-5 cells 16 days after HCMV inoculation (X100): Almost all the cells show the characteristic cytopathic effects. B) High power detail of A (X400): Characteristic large, oval or round cells with intranuclear inclusions are seen.

Table 1. Comparison of the efficiencies of two methods of primer purification

	OPC ¹	SpeedVac
purification time (hour)	8	2.5
handling	labor-intensive	very simple
amount of primer produced (pico-mol)	50,000	100,000
possible test number of PCR (50 μ l PCR)	1,000	2,000
result of PCR	good	good
purity of DNA (OD 260/280 ratio)	1.8	1.7
need of special apparatus	fume hood	No
cost of special apparatus (Won)	1,000,000	No

¹: The abbreviation of oligonucleotide purification column.

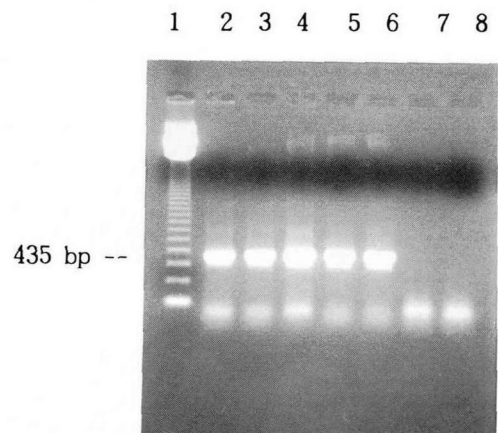


Fig. 3. PCR detection of HCMV major immediate early (MIE) gene from HCMV infected MRC-5 cell culture suspensions. Lane 1: size marker (123 ladder). Lanes 2 and 3: 435bp PCR products using primers purified by oligonucleotide purification column (OPC) method. Lane 4 to 6: 435bp PCR products using primers purified by SpeedVac drying method. Lane 7 and 8: negative controls.

OPC 정제법과 SpeedVac 건조법으로 정제하여 PCR 검사상의 차이를 비교해 보았다. 두 가지 정제법 모두 예민도나 특이도에 있어서 동일하게 우수한 PCR 결과를 나타내었다. PCR용 primer의 가장 효율적인 정제법을 알아보기 위해 OPC 정제법 및 SpeedVac 건조법의 효능을 비교해 보았다(Fig. 1, Table 1).

정제시간은 OPC법이 8시간 소요되었고 SpeedVac법은 2.5시간 소요되었다. 그리고 OPC법의 실험과정은 계속해서 실험자의 손이 요구되었으며, SpeedVac법은 아주 간편하였다. Primer생산량은 OPC법은 약 5만 pico-mol (PCR검사 1,000회분)이었으며, SpeedVac법은 약 10만 pico-mol(PCR검사 2,000회분)

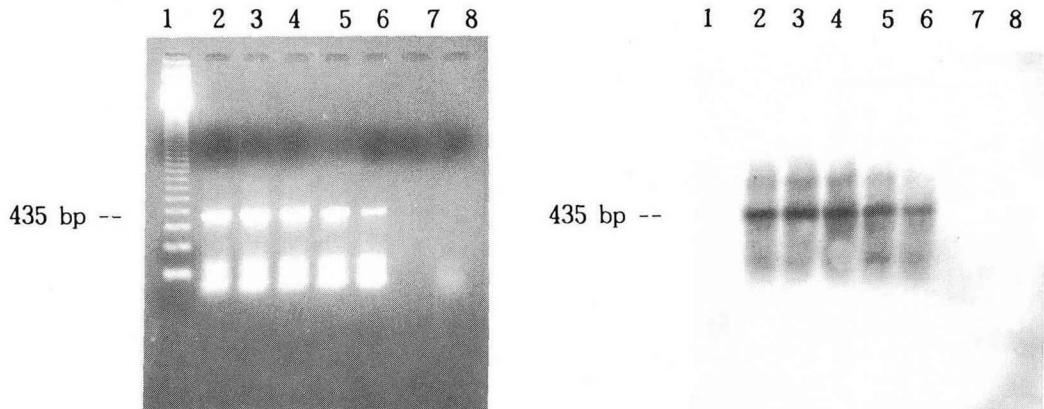


Fig. 4. Sensitivity of PCR detection of HCMV MIE gene from MRC-5 cell culture suspensions. **A)** Separation on agarose gel of PCR products. Lane 1:DNA size marker (123 ladder), lane 2: PCR with 4 μ l of 10^{3.5}TCID₅₀/0.2ml HCMV (about 60 viral particles), lanes 3:PCR with 2 μ l of 10^{3.5}TCID₅₀/0.2ml HCMV (about 30 viral particles), lane 4:PCR with 1 μ l of 10^{3.5}TCID₅₀/0.2ml HCMV (about 15 viral particles), lane 5:PCR with 5 μ l of 10^{2.5}TCID₅₀/0.2ml HCMV (about 7.5 viral particles), lane 6:PCR with 1 μ l of 10^{2.5}TCID₅₀/0.2ml HCMV (about 1.5 viral particles), lane 7:PCR with 1 μ l of 10^{1.5}TCID₅₀/0.2ml HCMV (about 0.2 viral particles), lane 8:negative control. **B)** Southern blotting results of A (Digoxigenin-labeled HCMV MIE gene probe and nitrocellulose filters were used).

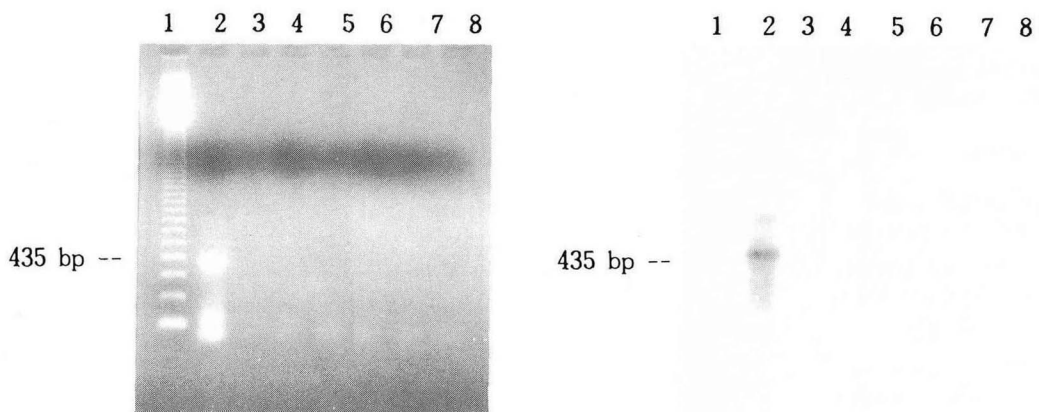


Fig. 5. Specificity of PCR detection of HCMV MIE gene from MRC-5 cell culture suspensions and from various viruses and DNAs. **A)** Separation on agarose gel of PCR products. Lane 1:DNA size markers (123 ladder), lane 2:PCR of HCMV infected cells, lane 3:PCR of Herpes Simplex virus infected cells, lane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

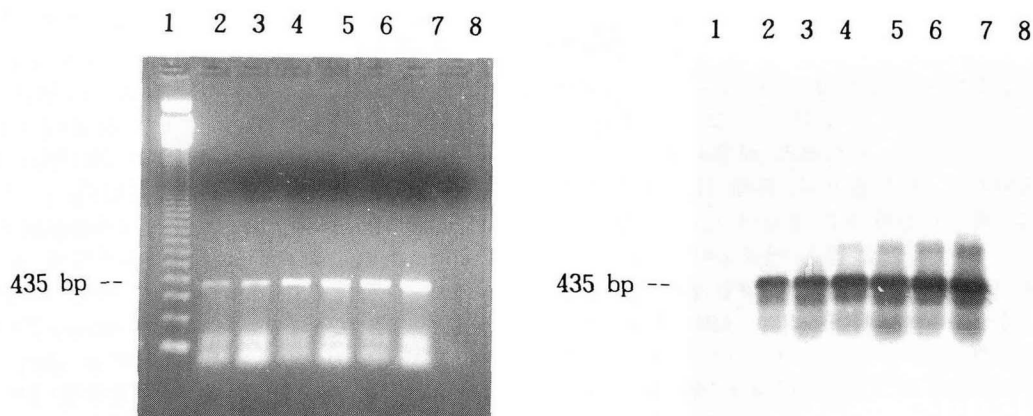


Fig. 6. PCR detection of HCMV MIE gene from HCMV infected MRC-5 cell culture suspensions. **A)** Separation on agarose gel of PCR products. Lane 1: DNA size markers (123 ladder), lane 2: 435bp PCR products from MRC-5 cell culture suspensions 4 days after HCMV inoculation, lane 3: 6 days after HCMV inoculation, lane 4: 8 days after HCMV inoculation, lane 5: 10 days after HCMV inoculation, lane 6: 12 days after HCMV inoculation, lane 7: 16 days after HCMV inoculation, lane 8: negative control. **B)** Southern blotting results of A (Digoxigenin-labeled HCMV MIE gene probe and nitrocellulose filters were used).

이었다. DNA순도는 두 방법 모두 OD 260/280 비율이 1.7-1.8로 우수하였다. 그리고 OPC정제과정에는 여러가지 유독물질이 사용되므로 fume hood와 같은 고가의 안전장치가 요구되었다.

본 PCR 검사의 예민도를 조사하기 위해 배양된 HCMV 농도를 순차적으로 희석하여 PCR을 실시하였다. 그 결과 1 μ l 검체를 기준으로 PCR을 했을 때 $10^{2.5}$ TCID₅₀/0.2ml까지 (즉 바이러스 1.5개까지) 검출 가능하였다. Primer 정제법에 따른 차이는 없었다(Fig. 4).

본 PCR 검사의 특이도를 조사하기 위해 HCMV와, HSV, VZV, EBV, λ 박테리오파지 DNA 및 정상인 혈액 DNA 등을 대상으로 PCR을 실시하였다. 그 결과 agarose gel 전기영동상에서나 Southern blot상 모두에서 HCMV만이 435bp의 target DNA band가 검출되었으며, HSV, VZV, EBV, λ 박테리오파지 DNA, 정상혈액 DNA 등은 모두 PCR 검사 음성으로 나타났다. 그리고 primer의 정제법에 따른 차이는 없었다(Fig. 5).

HCMV 배양시 세포병변이 나타나기 전에도 미량의 MIE 유전자는 검출될 것으로 기대하여 HCMV 배양 상층액을 대상으로 PCR 검색을 실시한 결과 배양 4일경부터 약간의 HCMV DNA가 검출되었으며 배양 6일째 이후에는 분명한 HCMV DNA가 검출되었다(Fig. 6). 그러나 세포병변에 있어서는 배양 12

일 이후부터 분명한 세포병변이 관찰되었다.

고 찰

천연두, 홍역, 소아마비, 페스트, 디프테리아 등 과거에 엄청난 희생을 초래하였던 감염병은 의학의 발전으로 이제 거의 자취를 감추게 되었으나, 인간의 수명이 고령화되고 암환자, 장기이식환자, 대사성 질환자 등이 증가함에 따라 평소에는 별반 병원성이 없던 상재균총이 숙주의 면역체계가 약화된 틈을 타서 병을 일으키는 기회감염이 큰 문제가 되고 있다.^{11, 12, 18, 22, 28)}

그중에서도 장기이식이나 AIDS환자, 암환자 등에서 폐렴, 간염, 망막손상, 뇌손상 등 많은 질병을 초래하는 것이 HCMV이다.^{10, 14, 17, 19, 24)} HCMV는 1881년에 Ribbert가 사산된 아이의 신장에서 원충(protozoa)과 유사한 대형 세포가 있음을 보고한 것이 발단이 되어 그후 cytomegalic inclusion disease로 불려지다가 Smith가 쥐에서 CMV배양에 성공하였고, 그 후 Smith, Rowe, Weller 등이 HCMV 분리에 성공하였으며 현재의 CMV라는 이름은 Weller 등이 명명하였다^{10, 14)}.

HCMV 감염은 EBV나 기타 질환과 유사하여 임상적으로는 진단이 매우 어려우므로 검사실적 소견이 중요하다¹⁰⁾. 현재로서는 가장 좋은 진단법으로서 바이러스 배양법이 있으며

MRC-5 세포 등의 섬유아세포(fibroblast)에 가검물을 접종하고 약 2-4주간 수시로 관찰하여 섬유아세포 단일층에 나타나는 세포병변 현상으로 진단하고 있다^{32,33)}. 그러나 일반 미생물 검사실에서 바이러스 배양시설을 갖추고 유지하기란 쉽지 않으며, 특히 HCMV의 경우는 그 배양기간이 4주 정도의 오랜 기간이 걸리므로 임상적으로 많은 어려움이 있다^{32,33)}.

본 실험에서 HCMV의 배양일자별 세포병변의 특성을 파악하기 위해 MRC-5세포주에 HCMV를 접종하고 도립현미경으로 세포의 형태를 관찰한 바 배양 10일째에 방추형의 정상 섬유아세포층에서 크고 둥글거나 타원형의 세포들이 관찰되었으며, 세포병변의 형태는 12일째 뚜렷해졌다. 배양 16일째는 거의 전 시야에서 세포병변이 관찰되었으며, HCMV 감염의 전형적인 특징인 핵내 봉입체(intranuclear inclusion body)들이 관찰되었다³²⁾. 이와 같은 바이러스의 배양은 오랜 시간이 소요되며 세포병변을 잘 판별할 수 있는 경험이 요구된다.

이러한 배양검사의 단점을 보완코자 ELISA 법이나 CF법 등의 여러가지 면역-혈청학적 검사가 개발되어 있으나, 그 예민도가 떨어지고 직접 바이러스를 검사하는 것이 아닌, 항원-항체반응에 의한 간접적 검사인 점과, 일단 항체가 생긴 후라야 검사가 가능하므로 초기진단이 쉽지 않은 점 등의 단점이 있어서 더욱 신속 정확한 진단법의 필요한 실정이다^{6,34)}.

최근 분자생물학이 급속히 발전하여 의학연구에도 많은 적용이 되고 있으며 이미 DNA hybridization법 등의 몇가지 방법은 임상검사에도 응용되고 있다.^{9,20,30,31)} 그중에서도 극소량의 DNA시료를 이용하여 단시간만에 대량의 DNA를 합성시켜 특정 DNA의 유무를 검사하는 Polymerase Chain Reaction(PCR)법이 개발되어 많은 각광을 받고 있으며 특히 예민성과 신속성에 큰 장점을 가지고 있다.^{2,8,23,26,27,29)}

저자들은 HCMV의 MIE 유전자 부위에만 특이하게 결합하는 Primer들을 제조하여 PCR 검사의 효용성을 조사하였다^{7,8,25)}. 먼저 PCR용 primer의 가장 효율적인 정제법을 알아보기 위해 OPC정제법 및 SpeedVac 건조법의 효능을 비교해 보았는데 정제시간은 OPC법이 8시간 소요되는데 비해 SpeedVac법은 처음과 끝에만 손이 필요하여 아주 간편하였다^{4,5)}. Primer 생산량은 OPC법은 약 5만 pico-mol로

서 50 μ l 규모의 PCR검사, 1,000회 분량을 얻을 수 있었으며, SpeedVac법은 약 10만 pico-mol로서 OPC법의 두배량을 얻을 수 있었다. DNA순도는 두 방법 모두 UV spectrophotometer상에서 optical density(OD) 260/280 비율이 1.7-1.8로서 상당히 깨끗하였다. 그리고 OPC정제 과정에는 acetonitrile, triethylamine acetate, trifluoroacetic acid 등 여러가지 유독 물질이 사용되므로 fume hood와 같은 고가의 안정장치가 요구되었다⁵⁾. 그래서 primer DNA가 합성되다가 도중에서 그쳐버린 oligonucleotide들을 완전히 제거하여 정확한 DNA probe만을 얻고자하는 경우에는 OPC 정제법이나 기타 더 엄밀한 방법이 필요하겠으나 일반적인 PCR을 목적으로 하는 경우에는 그 과정이 훨씬 간단하고 수율이 약 2배나 좋은 SpeedVac 정제법이 매우 유용할 것으로 사료된다.

본 PCR법의 예민도에 있어서는 바이러스 배양 혼합액 1 μ l를 사용하여 40회 PCR했을 경우에 바이러스 1.5개에 해당되는, $10^{2.5}$ TCID₅₀/0.2ml까지 검출가능하여 예민도가 매우 높았으며 국내외의 보고와 유사하였다.^{3,8,13,21,35)} 그리고 특이도 검사를 위해 HCMV 이외에도 단순 포진 바이러스(HSV), Epstein Barr 바이러스, 수두대상포진 바이러스(VZV) 등의 herpesvirus들과 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.

HCMV 배양시 세포병변이 나타나기까지는 오랜시간이 소요되지만 그 이전에도 바이러스는 복제하고 있기 때문에 미량의 MIE 유전자는 검출될 것으로 기대하여 HCMV 배양 상층액을 대상으로 PCR 검색을 실시한 결과 배양 4일경부터 약간의 HCMV DNA가 검출되었으며 배양 6일째 이후에는 분명한 HCMV DNA가 검출되었다. 이러한 사실은 세포병변이 나타나기 훨씬 전에 배양 상층액의 유전자 검색을 통하여 바이러스의 조기 검색이 가능함을 보여주는 것이다.

이상의 사실을 고려해 볼 때 이후 향후 HCMV 진단은 바이러스 배양 검사와 아울러 PCR 검사를 병행함으로써 HCMV 감염여부를 더욱 정확하고 신속하게 검색할 수 있을 것으로 기대되며, PCR 검사에 사용할 oligon-

nucleotide primer는 손쉽게도 경제적인 Speed-Vac 건조법으로도 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

Human cytomegalovirus(HCMV)의 배양상의 특징과, HCMV의 진단에 있어서의 PCR법을 이용한 바이러스 DNA 검색의 효용성을 조사하고자, MRC-5 섬유아세포주를 이용한 바이러스 배양과, HCMV의 major immediate early(MIE) 유전자 부위에만 특이하게 결합하는 primer들을 이용한 PCR을 실시한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 배양세포의 세포병변은 바이러스 접종 후 10일째부터 관찰되었으며, 12일째 뚜렷하였다. 세포병변의 형태는 HCMV 감염의 전형적인 특징인 크고 둥글거나 타원형이었고, 핵 내 봉입체들이 관찰되었다.

2. PCR용 primer의 효율적인 정제법을 알아보기 위해 oligonucleotide purification column(OPC) 정제법 및 SpeedVac 건조법을 비교한 바, 실험 소요시간, 편의성, DNA 생산량, 안전성 등에 있어서 SpeedVac 정제법이 우수함을 알 수 있었다.

3. MIE 유전자를 대상으로 한 PCR 검사의 예민도는 1 μ l 검체를 기준으로 했을 때 10^{2.5}TCID₅₀/0.2ml까지 (즉 바이러스 1.5개까지) 검출가능하여 높은 예민도를 가짐을 알 수 있었다.

4. PCR 검사의 특이도는, 단순포진 바이러스, 수두대상포진 바이러스, Epstein Barr 바이러스, λ 박테리오파지 DNA 및 정상인 혈액 DNA 등에는 agarose gel 전기영동상에서나 Southern blot상에서 모두 음성이었고 HCMV만이 양성으로 나타나서, 특이도가 매우 높음을 알 수 있었다.

5. 바이러스 접종 후 배양세포 상층액에 유리되는 바이러스 MIE 유전자를 PCR로 검색한 결과 배양 4일경부터 검출이 가능하였다.

이상의 사실을 종합해 볼 때 향후 HCMV 진단은 바이러스 배양검사와 아울러 PCR 검사를 병행함으로써 HCMV 감염여부를 더욱 정확하고 신속하게 검색할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) 김현철, 박성배, 조원현, 백원기, 서민호 :
- 12) Ho M, Dummer JS, Peterson PK and

- PCR을 이용한 인간세포 거대바이러스 (HCMV) DNA 증합효소 유전자의 검색. 대한미생물학회지 27:181-188, 1992.
- 2) 서민호, 백원기, 이규석 : 임상검체에서 PCR을 이용한 수두-대상포진 바이러스 DNA의 검색. 대한미생물학회지 26:479-486, 1991.
- 3) 손영모, Pass RF: 증합효소 연쇄반응으로 검출된 거대세포바이러스 DNA에 대한 평가. 대한의학협회지 33:282-291, 1990.
- 4) Andrus A: Evaluating and isolating synthetic oligonucleotides, Appendix p13-14. Applied Biosystems, Foster City, 1987.
- 5) Andrus A: Evaluating and isolating synthetic oligonucleotides, p5.1-5.8. Applied Biosystems, Foster City, 1987.
- 6) Boppana S, Smith RJ, Stagno S and Britt WJ: Evaluation of a microtiter plate fluorescent-antibody assay for rapid detection of human Cytomegalovirus infection. J Clin Microbiol 30:721-723, 1992.
- 7) Davison AJ and Wilkie NM: Location and orientation of homologous sequences in the genomes of five herpesviruses. J Gen Virol 64:1927-1942, 1983.
- 8) 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.
- 9) Feinberg AP and Vogelstein B: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem 132:6-11, 1983.
- 10) 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.
- 11) Ho M and Dummer JS: Risk factors and approaches to infections in transplant recipients, p2284-2291. In Mandell GL, Douglas RG Jr., and Bennett JE(ed), Principles and practice of infectious diseases. 3rd ed. Churchill Livingstone Inc., New York, 1990.

- Simmons RL: Infections in solid organ transplant recipients, p2294-2303. In Mandell GL, Douglas RG Jr., and Bennett JE(ed), Principles and practice of infectious diseases. 3rd ed. Churchill Livingstone Inc., New York, 1990.
- 13) 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.
- 14) Jordan MC: Cytomegalovirus infections, p805-811. In Hoeprich PD and Jordan MC (ed), *Infectious Diseases*. 4th ed. J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1989.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) Lehrman SN: Herpesviruses, p790-801, In Joklik WK, Willett HP, Amos DB and Wilfert CM(ed), *Zinsser Microbiology*. 19th ed. Appleton & Lange, East Norwalk, 1988.
- 18) Meunier F: Infections in patients with acute leukemia and lymphoma, p2265-2275. In Mandell GL, Douglas RG Jr., and Bennett JE(ed), Principles and practice of infectious diseases. 3rd ed. Churchill Livingstone Inc., New York, 1990.
- 19) Meyers JD: Infections in marrow transplant recipients, p2291-2294. In Mandell GL, Douglas RG Jr., and Bennett JE(ed), Principles and practice of infectious diseases. 3rd ed. Churchill Livingstone Inc., New York, 1990.
- 20) 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.
- 21) Olive DM, Simsek M and Al-Mufti S: Polymerase Chain Reaction assay for detection of human cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 27:1238-1242, 1989.
- 22) Pizzo PA: Empirical therapy and prevention of infection in the immunocompromised host, p2303-2312. In Mandell GL, Douglas RG Jr., and Bennett JE(ed), *Principles and practice of infectious diseases*. 3rd ed. Churchill Livingstone Inc., New York, 1990.
- 23) 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.
- 24) Reitz, Jr. MS and Gallo RC: Human Immunodeficiency Virus, p1344-1352. In Mandell GL, Douglas RG Jr., and Bennett JE(ed), *Principles and practice of infectious diseases*. 3rd ed. Churchill Livingstone Inc., New York, 1990.
- 25) Ruger R, Bornkamm GW and Fleckenstein B: Human cytomegalovirus DNA sequences with homologies to the cellular genome. *J Gen Virol* 65:1351-1364, 1984.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) Schimpff SC: Infections in the compromised host-an overview, p2258-2265, In

- Mandell GL, Douglas RG Jr., and Bennett JE(ed), Principles and practice of infectious diseases. 3rd ed. Churchill Livingstone Inc., New York, 1990.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-517, 1975.
- 32) Straus SE and Smith HA: Cytomegalovirus, Varicella-Zoster virus, and Epstein-Barr Virus. p401-416. In Specter S and Lancz GJ(ed), *Clinical Virology Manual*. 1st ed. Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York, 1986.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) 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.
-