

# AIDS(Acquired Immunodeficiency Syndrome)의 早期診斷法 開發에 관한 研究 (Ⅲ)

Study on the Establishment of Diagnostic  
Methods for Acquired Immunodeficiency Syndrome(Ⅲ)

研究機關  
國立保健院

科學技術處

一九九一年  
九月五日  
과학기술처

# 提 出 文

科學技術處長官 貴下

本 報告書를 “AIDS 早期診斷法 開發에 관한 研究(Ⅲ)” 課題의 第 三 次年度  
最終報告書로 提出합니다.

1991. 7.

主 管 研 究 機 關：國立保健院

共 同 研 究 機 關：牧岩生命工學研究所

카톨릭 醫大

總括研究責任者：龍 群 鎬

研 究 責 任 者：申榮午 白承福

先 任 研 究 員：李雄洙 李柱實 金泰奎

許淑珍 金聖眞 金泰淑

研 究 員：李鴻來 康 椿 趙泳杰 李榮鍾

白善英 金成順 奇美京 南廷球

金聖俊 丁卿純 楊愛順 盧在薰

崔炳喜 金宗玄 池桂淑 崔鍾武

여 백

# 요 약 문

## I. 제 목

AIDS 의 조기진단법 개발에 관한 연구 ( III )

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

1981 년 미국의 질병관리센터가 처음으로 AIDS 환자를 보고한 이후 전세계적으로 환자 및 감염자가 급속히 증가되어 1991 년 6 월 현재 세계보건기구에 보고된 환자는 37 만여명이며 실제적인 AIDS 환자는 150 만여명, 감염자는 1,000 만여명으로 추산하고 있다. 우리나라는 1985 년에 처음으로 외국인 환자가 발견된 이후에 환자 포함 감염자 수는 해마다 전해의 2-3 배 증가하고 있으며 국내에서 확인된 숫자는 150 여명에 이르게 되었다.

우리나라의 AIDS 환자 및 감염자는 마약중독자, 모성감염 등이 확인되지 않은 반면 성적 전파가 90 % 이상을 차지하는 역학적 특이성을 갖고 있다.

AIDS 는 전세계적인 문제로써 세계 각국에서 백신과 치료제를 개발하고자 활발히 연구가 진행되고는 있으나 아직까지 개발되고 있지 않으며, 따라서 조기 진단을 통하여 AIDS 의 전파를 막는 것이 중요한 과제이다.

AIDS 의 조기진단법 개발에 관한 연구의 목적 및 중요성은 다음과 같다.

- 1) 현재 일차 검사기관 및 최종 판정기관에서 사용하고 있는



진단시약의 감도 및 특이도를 비교 조정하므로써 진단시약의 문제점을 파악하고 개선방향을 제시한다.

- 2) 현재 window period 기간 중에 헌혈된 혈액에 의해 HIV가 전파되는 경우들이 발생됨에 따라 HIV의 조기진단의 필요성이 더욱 증대되고 있다. 따라서 감염자의 혈구세포와 특이세포의 chromosome 내에 미량 존재하고 있는 HIV의 DNA를 증폭시켜 직접 virus 감염을 탐색하는 PCR 방법의 개발이 요구된다.

본 연구에서는 전년도에 확립된 human immunodeficiency virus(HIV)의 polymerase chain reaction(PCR) 반응조건과 검출기술을 기반으로 하여, HIV 진단에 적용할 수 있는 PCR 방법을 확립한다.

- 3) 국내 HIV 감염의 역학적 특성상 외국으로 부터 유입된 경우가 많고, 특히 아프리카 지역을 경유한 외항 선원들이 많으므로 HIV-1 뿐만 아니라 HIV-2 등 여러 변이주가 존재할 것으로 생각된다. HIV-1 과 HIV-2 는 AIDS 로의 진전도 및 질환의 증중에 차이가 있으므로 HIV-1 또는 HIV-2 의 감염 여부를 확인하는 것이 감염자 관리에 중요하며, 또한 이들을 분자 수준에서 연구하는 것이 필요하므로 PCR 을 이용하여 HIV -1/2 의 감염을 진단한다.

- 4) 국내 및 국외에서 성관계, 수혈 등에 의하여 HIV 에 감염된 사람의 lymphocytes 로 부터 바이러스를 분리하므로써 감염경로에 따른 발병 추이 및 질병진전 상태를 파악한다. 또한

AIDS 진단제, 치료제 및 백신개발의 효과적인 연구에 필수적인 유행분리주와 다양한 바이러스 변이주를 확보하고 성상을 분석한다.

5) Western blot, 방사면역침강법 등의 진단시약은 현재 외국으로부터 고가로 수입되고 있으며, 감도와 물량공급, 진단시약 비용 등의 자체개발이 요구되고 있다.

따라서 이러한 문제를 해결하기 위해 western blot, 방사면역침강법의 개발을 시도한다.

6) HIV 감염자는 발병시기가 개인에 따라 상이하여 임상증세 이전에 질병진전 상태를 미리 예지하는 것이 감염자 관리에 중요하므로, 이러한 질병진전 상태를 파악할 수 있는 면역학적, 혈청학적 marker를 찾고, 국내 감염자의 면역학적 상태를 파악하고자 한다.

### Ⅲ. 연구개발의 주요내용 및 범위

본 연구사업의 3차년도 기간중에 연구 수행으로 얻은 주요성과 및 내용은 다음과 같다.

1) 현재 국내에서 AIDS/HIV 진단시약으로 사용하고 있는 HIV 항체 진단시약의 문제점을 파악하고 개선방향을 제시하기 위하여, indirect enzyme linked immunosorbent assay(I.D.ELISA) 2종과 competitive inhibition ELISA 1종, ENV-peptide ELISA 1종, PA 1종등에 대하여 강도 및 특이도를 비교 분

석하였다.

그 결과 99.2 - 93.7 %의 감도를 나타내었으며 특이도는 99.85 - 99.7 % 이어서 수혈 등의 이유로 거의 100 %의 감도와 특이도를 요구하는 AIDS 진단 차원에서는 보다 높은 감도와 특이도의 개발이 요구되었다.

- 2) PCR 을 이용한 AIDS/HIV 조기 진단법을 확립하기 위하여 다양한 sample 처리방법으로 DNA 를 분리한 후, primer 조합 (TAT, VPU, MP1.2 , MP3.4, SK 29, 30과 SK 38, 39, set ) 에 따라 PCR 반응조건을 달리하여 수행하였다.

그 결과 감염자의 lymphocytes 로 부터 HIV DNA 를 PCR 에 의해  $10^6-10^7$  배로 증폭시킬 수 있었으며, 그 검출에 있어서도 liquid hybridization 방법을 도입하여 신속, 정확하게 진단할 수 있는 방법이 확립되어, seronegative 시료 50 종에서 100 %의 seronegativity 를, seropositive 시료에서는 20 종에서 17 종 ( 3 종은 DNA 추출상에 문제가 있었던 것으로 시험됨 ) 이 seropositivity 를 확인함으로써 HIV 감염 위험군이나 항체형성 이전 시기의 검사에 본 PCR 방법을 도입할 수 있는 것으로 평가 되었다.

- 3) 국내인에서도 HIV-1 과 HIV-2 등 여러 바이러스형이 존재할 것으로 추정되어, 이에 대하여 분자 수준에서의 연구를 행하고자, HIV-1 과 HIV-2 의 gag 유전자를 모두 증폭시킬 수 있는 SK100 과 SK104 primer 와 HIV-1 에 특이한 SK19 probe, HIV-2 에 특이한 SK109 probe 를 합성하고 한국인 HIV 항체

양성자의 말초 혈액에서 분리한 DNA 에 대해 이중 PCR 을 수행하여 민감도를 증가시키고, digoxigenin 표지 probe 를 이용하여 HIV-1 과 HIV-2 감염 여부를 조사하였다.

- 4) 국내의 HIV 유행주와 다양한 변이주를 확보하고자 100 명의 HIV 감염자 림프구를 배양한 결과 16 명으로 부터 바이러스 항원이 검출되었으며, 2 명의 plasma ( 1 명은 AIDS 로 사망 ) 에서도 항원이 탐색되었다. AIDS 환자로 부터의 바이러스 분리율 ( 57 % ) 무증상 감염자 ( 15 % ) 보다 훨씬 높았으며, 16 주의 HIV 분리주를 확보할 수 있었다.
- 5) HIV 감염자 53 명과 정상인 21 명을 대상으로 CD4, CD8 세포수를 측정하고, CD4 antigen 과 soluble CD8 level 을 조사하여 CD4 antigen level 과 혈중 soluble CD8 은 HIV 감염자에서 유의하게 높음을 확인하였고 이들을 혈청학적 marker 로 이용할 수 있을 것으로 생각된다.
- 6) HIV 항체양성자 139 명과 19 명의 정상인 두 군을 대상으로 적혈구수, 헤모글로빈, 헤마토크리트, 총백혈구수, 총림프구수 등의 일반 혈액검사와 CD4 림프구수, CD8 림프구수 및 CD4/CD8 비를 조사하였다. 일반 혈액검사에서는 정상인과 HIV 감염자 사이에 유의한 차이가 없었으나, CD4 림프구 수는 정상인 ( 1084 /  $mm^3$  ) 에 비해 감염자 ( 620 /  $mm^3$  ) 에서 감소된 것으로 나타났고 CD8 은 감염자에서 큰 것으로 나타났다. 그 결과 면역기능 상태를 파악하기 위해서는 CD4 림프구수, CD8 림프구수, CD4/CD8 비를 함께 고려함이 적합한 것으로 나타났다.

7) HIV 탐지를 위한 자체 개발 진단제로써 웨스턴 블롯과 방사면역침강법을 개발하였다. 웨스턴 블롯 진단시약 개발을 위하여 HIV 감염자 혈장으로 부터 정제된 항체는 protein G Sepharose 4FF 가 protein A Sepharose CL-4B 보다 2 배 정도 yield 가 높았으며 200 ml의 H9/HTLV-III 배양액으로 부터 정제된 순수한 HIV 단백질 양은 2.355  $\mu$ g 이었다. 이 cell lysate 를 1% SDS/ 1% NP-40 으로 처리한 후의 웨스턴 블롯의 결과에서는 p24, gp41, p51, p55, p66 의 band 가 나타났으며, 1% SDS 로 처리한 경우에는 p24, gp41, p51, p66 gp120, gp160 의 band 가 나타났다. 또한 [<sup>35</sup>S] cystein 으로 표식한 H9/HTLV-III 와의 radioimmunoprecipitate 의 전기영동 결과에서도 p24, gp41, p51, p55, p66 의 band 가 나타나 웨스턴 블롯과 거의 일치된 결과를 나타내었다.

## Summary

I . Title : Study on the Establishment of Diagnostic Methods for Acquired Immunodeficiency Syndrome(AIDS) (Ⅲ)

II . Purpose and importance

The current number of reported AIDS cases world wide exceeds 370 thousands. However, delays in reporting and reluctance to accurate report numbers make this number suspect. It has been estimated that the actual number of individuals with AIDS currently exceeds one million. In addition, it is estimated that there are 8 to 10 million persons presently infected with the human immunodeficiency virus(HIV).

In Korea, the number of HIV infected persons has been increased two or three times more than those of the previous years since the first AIDS patient and HIV infected person were discovered in 1985. As of June 1991, the total numbers of HIV infected persons are more or less than 150 including AIDS patients.

Because there are no vaccine and effective drug for treatment, the development of early diagnostic reagents is very important in prevention now available against HIV/AIDS transmission.

The purpose and importance on the development of early diagnostic methods are as follows :

1) As the results of testing the sensitivity and specificity of HIV diagnostic reagents used in screening test, we found out the problems about diagnostic rea-



gents and showed direction of improvements of reagent qualities.

2) As HIV is transmitted by the donated blood during the window period, the necessity for early diagnosis of HIV is in the increasing trend. Therefore development of Polymerase Chain Reaction(PCR) is requested in which HIV DNA incorporated in the blood cell of the infected person is amplified. In this study, on the basis of PCR condition and detection method of last report, we established PCR method for HIV diagnosis.

3) The etiologic characteristic of HIV infection in our country is that most of the cases are inflow from foreign countries and that there are many sailors passing through Africa. So, we assume that there are many variants of not only HIV-1 but also HIV-2. Because HIV-1 differs from HIV-2 in the progress to AIDS and in the seriousness of disease, it is important to it is necessary to study the virus in the molecular level. So, we diagnosed infection of HIV-1/HIV-2 by PCR.

4) Trends of disease progression depending on transmission routes of HIV and disease status were tried to analyse by virus isolation from lymphocytes of HIV infected persons by sexual contact and transmission etc. in Korea and out of countries. HIV wild isolates were intended to obtain in order to analyse virus mutations essential for vaccine, drug and diagnostic reagent development.

5) The self development of diagnostic reagents in western blot and radioimmunoprecipitation methods for HIV antibody detection is demanded because of those high price, sensitivity and kit supply. To prove these problems, we designed the development of western blot and radioimmunoprecipitation meth-

ods.

6) It is important that we should test the immunological status of HIV seropositive persons prior to development of AIDS symptoms because the period of AIDS development is individually variable. So this study was tried to the immunological and serological marker that can be helpful in order to understand the disease progression and the immunological status of HIV seropositive persons in Korea.

### III. Major contents and scope

The major results and findings that were obtained during the 3rd period of this study are as follows :

1) To find out the problems and improve the quality of diagnostic reagents using the screening test by anti-HIV antibodies, the sensitivity and specificity of two ID ELISA, CI ELISA, env-peptide ELISA and PA methods were evaluated on Korean sera.

The sensitivities of tested reagents were 93.7–99.2%, and their specificities were 99.85–99.97%. Considering HIV infection by blood transmission, the diagnostic reagents should have 100% sensitivity and specificity for the detection of antibodies to HIV. Therefore, it is demanded that we should develop diagnostic reagents having better sensitivity and specificity than those of reagents presently used.

2) For the establishment of early diagnosis of AIDS/HIV by PCR, we extracted DNA by the various methods of sample treatment and performed PCR using many primer sets(TAT, VPU, SK27/30, SK38/39). As the results, we amplified



HIV DNA from the lymphocytes of infected person by  $10^6-10^7$  and established the sensitive diagnosis using liquid hybridization. We acquired 100% negative results for 50 seronegative specimens and 17 positive results for 20 seropositive specimens. 3 positive specimens with negative results are explained as there were some problems for DNA extraction. We expect that PCR should be applied for the diagnosis of HIV in HIV high risk group and during the window period.

3) We assumed the presence of HIV-1, HIV-2 and their variants in our country. So for the molecular biological study of these virus, we synthesized SK100/104 primer common to HIV-1 and HIV-2, HIV-1 specific SK 19 probe and HIV-2 specific SK109 probe. We performed PCR and hybridized with non-radioactive digoxigenin labelled probe for DNA of HIV seropositive persons. We acquired more sensitive results and expected the possibility using PCR for the diagnosis for HIV-1 and HIV-2.

4) HIV antigens were detected from 16 of 100 lymphocyte culture using commercial antigen detection ELISA reagents. 16 HIV wild isolates were obtained and higher HIV isolation rates were shown in AIDS patients(57%) than in asymptomatic seropositive persons(15%).

5) The levels of CD4 antigen and soluble CD8(SCD8) in sera from 21 normal controls and 63 samples from 53 asymptomatic HIV-infected persons were quantitated to determine the probability as serologic markers to be used to monitor progression to AIDS.

The levels of CD4 antigen and SCD8 in control group was  $4.6 \pm 3.8$ U/ml and  $231 \pm 95$ U/ml and in the HIV infected group  $35.5 \pm 58$ U/ml and  $505 \pm 311$ U/ml and the differences were statistically significant, respectively( $p < 0.001$ ).

There was a significant correlation coefficient only between the CD4 cell and the CD8 cell count in the control group ( $r=0.92$ ,  $p<0.0001$ ), but HIV infected group had a significant correlation coefficient between the CD8 cell count and the SCD8 level ( $r=0.39$ ,  $p<0.01$ ), and between the CD4 antigen and the SCD8 level ( $r=0.42$ ,  $p<0.001$ ). In the control group, the CD4 cell count and CD4/CD8 ratio was  $1140 \pm 605 (1\text{mm}^3)$  and  $1.34 \pm 0.31$ , respectively and in the HIV infected group, it was  $660 \pm 385 (1\text{mm}^3)$  and  $0.54 \pm 0.47$ , respectively ( $p<0.01$ ).

In 9 HIV infected persons, CD4 antigen and SCD8 levels were repeatedly measured with the average interval being 11.8 months. There were no significant differences between the two tests.

6) Whole WBC and lymphocytes, the absolute numbers of CD4, CD8 lymphocytes and CD4/CD8 ratio were measured in 139 HIV seropositive persons and 19 normal controls. The hematological results were not different significantly in two groups. But in HIV infected group, the absolute numbers of CD4 lymphocytes were decreased and those of CD8 lymphocytes were increased significantly in comparison to normal controls. As a result, it is recommended that not only the absolute numbers of CD4 and CD8 lymphocytes but also CD4/CD8 ratio must be conferred together to understand the immunological status of HIV seropositive persons.

7) We developed western blot and radioimmunoprecipitation methods for HIV antibody detection as self-developed diagnostic reagents in this laboratory.

For western blot method, we purified anti-human IgG by Protein G-Sepharose 4FF from the plasma of HIV infected persons and the yield was 2

higher than anti-human IgG purified by Protein A-Sepharose Cl-4B. Pure amount of HIV protein purified from 200ml of H9/HTLV-III cultured medium was 2-355µg. Using H9/HTLV-III cell lysate treated with 1% SDS and 1% NP-40, p24, gp41, p51, p55, p66 bands were appeared on nitrocellulose strips, but in the case of using 1% SDS treated H9/HTLV-III cell lysate, p24, gp 41, p51, p66, gp120 and gp 160 bands appeared.

Radioimmunoprecipitates of [<sup>35</sup>S] cysteine labelled H9/HTLV-III were electrophoresed on SDS-polyacrylamide gel. The pattern of p24, gp41, p51, p55, p66 bands was almost same as western blot method.

# CONTENTS

Chapter I Introduction .....	27
Chapter II Immunological tests of HIV infected persons and evaluation of serological tests for HIV .....	33
Sub – chapter 1. Immunological tests of HIV infected persons .....	35
Section 1. Introduction .....	35
Section 2. Materials and methods .....	37
1. Subjects .....	37
2. Preperation of peripheral blood mononuclear cells .....	37
3. Measurement of T lymphocyte subests .....	37
4. Statistical analysis .....	39
Section 3. Results .....	39
Section 4. Discussion .....	50
Section 5. Conclusion .....	52
Section 6. References .....	54
Sub – chapter 2. Comparson of sensitivity and specificity of diagnostic reagents for detection of antibodies to HIV .....	59
Section 1. Introduction .....	59
Section 2. Materials and methods .....	60

Section 3. Results	61
1. The sensitivities of HIV diagnostic reagents	61
2. The specificities of HIV diagnostic reagents	62
3. The western blot profiles to HIV on sera of seroconverted persons	62
4. Analysis of western blot patterns to HIV on follow – up sera	63
Section 4. Discussion .....	68
Section 5. Conclusion	70
Section 6. References .....	72
 Chapter III Establishment of diagnostic methods for HIV using nucleic acid ...	 75
 Sub – chapter 1. Syudy on the diagnosis of HIV – 1 and HIV – 2 by polymerase chain reaction .....	  77
Section 1. Introduction	77
Section 2. Materials and methods	78
1. Subjects	78
2. DNA extraction from lymphocytes	79
3. Synthesis of primer and oligoprobe .....	81
4. DNA amplification(Polymerase Chain Reaction)	81
5. Agarose gel electrophoresis .....	82
6. Synthesis of digoxigenin labelled probe .....	82
7. Dot blot hybridization	83
Section 3. Results	85
1. Establishment of optimum condition for PCR	85

2. Confirmation of human template DNA by HLA – DQ	
beta primers	87
3. Augmentation of sensitivity by double amplification	
and hybridization	89
4. PCR results of the lymphocytes from HIV seropositive persons	92
5. Identification of HIV – 1 and HIV – 2 by dot blot hybridization	97
Section 4. Discussion .....	99
Section 5. Conclusion .....	103
Section 6. References .....	106
Sub – chapter 2. Estimation of hybridization probe for the detection of	
human immunodeficiency virus	109
Section 1. Introduction .....	109
Section 2. Materials and methods	116
1. Preparation of lymphocyte DNA in whole blood .....	116
2. Preparation of high molecular weigh DNA	117
3. Polymerase chain reaction	118
Section 3. Results	125
1. Test of PCR against TAT, VPU primer set .....	125
2. Test of PCR against MP1.2 and MP3.4 primer set .....	128
3. Test of PCR against SK29, 30 primer set and SK38, 39	
primer set .....	130
4. Establishment of PCR method using premix system and	
UV decontamination	132



Section 4. Discussion .....	184
Section 5. Conclusion .....	186
Section 6. References .....	187
Chapter IV Establishment of diagnostic methods for HIV using protein	191
Sub-chapter 1. Isolation and properties of HIV for seropositive individuals in Korea .....	193
Section 1. Introduction .....	193
Section 2. Materials and methods .....	194
1. Cell and culture .....	194
2. Virus isolation from lymphocytes of HIV seropositive persons .....	194
3. HTLV – I antibody test of plasma of person who is negative in virus isolation test .....	196
4. Susceptibility test of cells to HIV .....	197
5. Immunofluorescence antibody test for p24 antigen detection in culture supernatant of HIV seropositive persons .....	197
6. Comparison of RT activity according to FBS in H9 cells infected with HIV .....	198
7. HIV antigen detection test .....	198
Section 3. Results .....	199
1. Virus isolation from HIV infected persons .....	199
2. Virus isolation from PBL of HIV seropositive persons activated with PHA – p and/or not .....	199

3. HTLV – I antibody test of plasma which is negative in HIV antigen test .....	200
4. Susceptibility test of cells to HIV .....	200
5. Detection of p24 from lymphocytes of HIV infected persons .....	200
6. Comparison of HIV production according to FBS concentration ...	201
Section 4. Discussion .....	205
Section 5. Conclusion .....	206
Section 6. References .....	208
Sub – chapter 2. CD4 antigen and soluble CD8 levels in the HIV infected sera .....	209
Section 1. Introduction .....	209
Section 2. Materials and methods .....	210
1. Subjects .....	210
2. CD4 and CD8 lymphocyte count .....	210
3. CD4 antigen assay .....	211
4. Soluble CD8 assay .....	212
Section 3. Results .....	212
1. CD4 lymphocyte count, CD4 antigen, CD8 lymphocyte count, and SCD8 level, and correlation coefficient .....	212
2. CD4 lymphocyte count and CD4 lymphocyte / CD8 lymphocyte ratio .....	213
3. Follow – up of CD4 antigen and soluble CD8 levels .....	213
Section 4. Discussion .....	218



Section 5. Conclusion .....	221
Section 6. References .....	223
Sub–chapter 3. Development of western blot and radioimmunoprecipitation	
assay for HIV detection .....	227
Section 1. Introduction .....	227
Section 2. Materials and methods .....	228
1. HIV antigen preparation .....	228
2. Serum preparation .....	229
3. Purification of IgG .....	229
4. SDS polyacrylamide gel electrophoresis .....	230
5. Western blot .....	231
6. Enzyme linked immunosorbent assay for antigen detection .....	231
7. Enzyme linked immunosorbent assay for antibody detection .....	232
8. Radioimmunoprecipitation assay .....	232
Section 3. Results .....	233
1. Serum preparation against HIV .....	233
2. Enzyme linked immunosorbent assay for antigen and antibody detection .....	241
3. HIV antigen preparation .....	244
4. Western blot .....	247
5. Radioimmunoprecipitation assay .....	250
Section 4. Discussion .....	256
Section 5. Conclusion .....	257
Section 6. References .....	259

# 목 차

제 I 장 서 론 .....	27
제 II 장 HIV 감염자에 대한 면역학적 시험 및 혈청시험 평가 .....	33
1. HIV 감염자에 대한 면역학적 시험 .....	35
제 1 절 서 설 .....	35
제 2 절 실험재료 및 방법 .....	37
1. 대 상 자 .....	37
2. 말초혈액 단핵세포 분리 .....	37
3. T 림프구 아세포군의 측정 .....	37
4. 통계적 분석 .....	39
제 3 절 실험결과 .....	39
제 4 절 고 찰 .....	50
제 5 절 결 론 .....	52
제 6 절 참고문헌 .....	54
2. HIV 혈청시험에서의 감도 및 특이도 시험 .....	59
제 1 절 서 설 .....	59
제 2 절 실험재료 및 방법 .....	60
제 3 절 실험결과 .....	61
1. HIV 항체탐지를 위한 진단시약의 감도 비교 .....	61

2. HIV 항체탐지를 위한 진단시약의 특이도 비교 .....	62
3. Seroconversion된 혈청들의 western blot 양상	62
4. Band pattern 변화 시험	63
제 4 절 고찰 .....	68
제 5 절 결론 .....	70
제 6 절 참고문헌 .....	72
제 III 장 핵산을 이용한 HIV 진단방법의 개선	75
1. PCR에 의한 HIV-1, HIV-2의 진단에 관한 연구	77
제 1 절 서설 .....	77
제 2 절 실험재료 및 방법	78
1. 검사대상	78
2. 말초혈액에서 DNA 분리	79
3. Primer 및 oligoprobe 합성	81
4. DNA 증폭(Polymerase Chain Reaction)	81
5. 전기영동	82
6. Digoxigenin 표지 probe의 합성	82
7. Dot blot hybridization.....	83
제 3 절 실험결과 .....	85
1. PCR 반응의 적정 조건 확립	85
2. HLA-DQ beta primers에 의한 human template DNA 존재 확인	87
3. 이차증폭 및 hybridization에 의한 민감도의 증가 .....	89
4. HIV 항체 양성자의 말초혈액 DNA에 대한 PCR 결과	92

5. Dot blot hybridization에 의한 HIV-1 및 HIV-2 동정 .....	97
제 4 절 고찰 .....	99
제 5 절 결론 .....	103
제 6 절 참고문헌 .....	106
2. HIV 탐색을 위한 hybridization probe의 제작 및 평가 .....	109
제 1 절 서설 .....	109
제 2 절 실험재료 및 방법 .....	116
1. Whole blood에서 lymphocyte DNA의 준비 .....	116
2. High molecular weight DNA의 준비 .....	117
3. Polymerase chain reaction .....	118
제 3 절 실험결과 .....	125
1. TAT와 VPU primer set에 대한 PCR 검사 .....	125
2. MP1.2와 MP3.4 primer set에 대한 PCR 검사 .....	128
3. SK29, 30 primer set와 SK38, 39 primer set에 대한 PCR 검사...	130
4. Premix system과 U V decontamination을 이용한 PCR 방법의 확립 .....	132
제 4 절 고찰 .....	184
제 5 절 결론 .....	186
제 6 절 참고문헌 .....	187
제 IV 장 단백질을 이용한 HIV 진단방법 개발 .....	191
1. HIV 감염자로 부터의 바이러스 분리 및 성장 .....	193
제 1 절 서설 .....	193
제 2 절 실험재료 및 방법 .....	194

1. 사용세포 및 배양	194
2. HIV 항체양성자 lymphocytes로 부터 바이러스 분리	194
3. CPE 양성이며 HIV-1 항원검사에 음성인 사람의 plasma에 대한 HTLV-I 항체시험	196
4. HIV에 대한 세포 감수성 시험	197
5. HIV 항체양성자 lymphocytes 배양세포내 p24 항원 탐지를 위한 immunofluorescence antibody assay	197
6. HIV 접종된 H9 세포배양액내 FBS 농도에 따른 RT activity의 비교	198
7. 항원탐지시험	198
제 3 절 실험결과	199
1. HIV 감염자로 부터 바이러스 분리	199
2. PHA-p로 activation된 HIV 감염자 PBL과 처리되지 않은 PBL로 부터 바이러스 분리	199
3. HIV 항원 음성인 사람의 plasma에 대한 HTLV-I 항체시험	200
4. HIV에 대한 세포 감수성 시험	200
5. HIV 감염자 lymphocytes로 부터 p24 항원 검색	200
6. FBS 농도에 따른 생성능 비교	201
제 4 절 고찰	205
제 5 절 결론	206
제 6 절 참고문헌	208
2. HIV 감염자 혈청에서 CD4 antigen과 soluble CD8 치	209
제 1 절 서설	209

제 2 절 실험재료 및 방법 .....	210
1. 대 상 .....	210
2. CD4 and CD8 lymphocyte count .....	210
3. CD4 antigen assay .....	211
4. Soluble CD8 assay .....	212
제 3 절 실험결과 .....	212
1. CD4 세포수, CD4 antigen, CD8 세포수와 SCD8 치간의 상관관계	212
2. CD4 세포수 및 CD4/CD8 Ratio .....	213
3. CD4 antigen과 soluble CD8의 반복 측정 .....	213
제 4 절 고 찰 .....	218
제 5 절 결 론 .....	221
제 6 절 참고문헌 .....	223
3. HIV 탐지를 위한 western blot, radioimmunoprecipitation assay의 개발 ...	227
제 1 절 서 설 .....	227
제 2 절 실험재료 및 방법 .....	228
1. HIV 항원정제 .....	228
2. 혈청준비 .....	229
3. IgG 정제 .....	229
4. SDS 전기영동 .....	230
5. 웨스턴 블롯 .....	231
6. 항원검색 효소면역측정법 .....	231
7. 항체검색 효소면역측정법 .....	232
8. 방사면역침강법 .....	232

제 3 절 실험결과 .....	233
1. HIV에 대한 항혈청 준비 .....	233
2. 항체, 항원검색 효소면역측정법 .....	241
3. HIV 항원 준비 .....	244
4. 웨스턴 블롯 .....	247
5. 방사면역침강법 .....	250
제 4 절 고찰 .....	256
제 5 절 결론 .....	257
제 6 절 참고문헌 .....	259

# 제 I 장 서 론

## Introduction



여 백

## 제 I 장 서 론

1981년 미국의 로스앤젤레스 등에서 전혀 새로운 질병이 유행함을 처음 질병관리센터가 보고하여 acquired immunodeficiency syndrome(AIDS)으로 명명된 이후 만 10년이 경과되었다.

1983년에 AIDS의 원인병원체인 human immunodeficiency virus (HIV)가 확인됨으로써 진단과 역학연구 등이 가능하였다.

이후 AIDS 환자 및 감염자는 전세계적으로 급증하여 1991년 6월 7일자 세계보건기구의 공식집계로서는 전세계 AIDS 환자가 366,455명으로 밝혀졌다. 그러나 각국으로부터의 보고지연과 누락, 진단의 어려움 등을 고려할 때 실제 AIDS 환자는 150만명으로 추산하고 있다.

미국이 174,893명으로 가장 환자 수가 많으며, Uganda, Zaire, Kenya 등의 아프리카 국가들과 Brazil, France 등 국가들에서 10,000-20,000명의 환자가 보고되고 있다.

환자이외 HIV 감염자는 전세계적으로 약 1,000만명으로 추산되고 있다.

이러한 환자 및 감염자의 발생 증가는 개발국가에서는 1990년대 중반 이후 부터는 감소될 것이나, 아프리카, 아세아 등 개발도상

국가에서는 이 기간 이 후도 지속적으로 증가될 것으로 전망된다.

우리나라에서는 1985년 이후 환자 및 감염자가 계속 확인되어 1991년 6월 현재 7명의 확인된 환자를 포함하여 150여명의 한국인 감염자와 7명의 외국인 환자 혹은 감염자가 확인되었다.

국내에서 보고된 환자 및 감염자의 80.3%가 성관계로 전파되었으며 수혈 및 혈액제제가 각각 2.0 및 2.7%를 차지하고 있다. 선원이 46.9%로서 가장 많으며 외국인 상대 윤락녀 8.2%, 유흥업소 종사자가 8.8%를 차지하고 있다. 남자가 여자보다 약 7배 정도 많으며 평균 연령이 약간 높은 반면 90% 정도가 20-49세의 성활동 연령층이다.

HIV 검사대상인 선원, 등록된 유흥업소 종사자, 헌혈자 등 극히 일부에 제한된 점을 감안할 때 국내의 실상과 상이할 수 있다. 따라서 헌혈 혈액 및 혈액제제에 대해서는 물론 장기이식 환자 진단, 전파예방 등을 목적으로 한 HIV 검사에 대한 수요는 지속적으로 증가하고 있다.

HIV 진단수요의 증가와 아울러 타질병의 진단과는 상이하게 HIV 진단은 거의 완벽한 감도와 특이도를 갖는 진단제와 항체 형성 이전 시기에 대한 진단방법의 개발이 요구되고 있다. 감염 후 항체 형성기간까지의 정확한 기간을 항체시험 할 수 없었으나 gp 160 등 초기 시기부터 완전한 항체형성 시기까지의 3, 4개월이 소요됨을 본 연구원들은 확인하였다.

이에 본 연구자들은 HIV의 정확한 진단방법 개발의 필요성을 인식하고 본 연구사업을 시작하였으며 1, 2차년도 연구기간동안 항원

및 항체탐지 ELISA, 면역형광시험방법의 개발과 아울러 기초연구로써 현재 사용 중인 진단방법의 감도 및 특이도 평가, 감염자발견 시험 및 감염자에 대한 면역학적 시험결과를 보고하였다.

본 보고서에서는 더 많은 감염자에 대한 면역학적 시험, 진단제의 평가와 아울러 polymerase chain reaction(PCR) 방법의 성공적 개발 등 본사업의 마지막 1년간 수행한 연구결과를 보고하고자 한다.

여 백

제 II 장 HIV 감염자에 관한 면역학적 시험 및  
혈청시험평가

Immunological tests of HIV infected persons  
and evaluation of serological tests for HIV

申榮午	李雄洙
金泰淑	金成順
丁卿純	奇美京
白善英	楊愛順
盧在薰	崔炳喜
金宗玄	崔鍾武

여 백

# 1. HIV 감염자에 대한 면역학적 시험

## 제 1 절 서 설

후천성면역결핍증 (Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS) 은 뚜렷한 원인이 없이 면역기능이 저하되어, 중증의 기회감염이나 Kaposi 육종등의 악성종양을 동반한 증후군으로 발견 초기에 임상적 정의를 하였으나<sup>1-3)</sup> 1983년 미국과 프랑스에서 그 원인 병원체가 HTLV-III(Human T cell leukemia virus-III) 와 LAV(Lymphadenopathy virus) 등의 이름으로 분리됨으로써<sup>4,5)</sup> AIDS의 진단과 역학 그리고 발병기전 등의 특성을 규명할 수 있는 계기가 되었으며 현재는 이 바이러스를 HIV(Human Immunodeficiency Virus)로 통일하여 명명하였다<sup>6,7)</sup>

HIV는 retrovirus의 일종으로 Th세포(T helper/inducer) 표면에 있는 CD4와 바이러스의 외피단백질인 gp120이 강한 친화력이 있어 주로 Th세포가 선택적으로 감염되어 파괴되는데, Th세포는 여러 항원에 대한 체액성 면역 반응에 필요한 여러 T세포와 B세포의 상호작용 및 여러 면역반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. HIV는 Th세포의 수와 기능을 점차 감소시킴으로써 기회감염이나 종양 등의 증상이 나타나는데 현재는 일부 B세포와 대식세포들도 감염될 수 있다고 보고되고 있다<sup>8,9)</sup>. 그러나 아



직 이 질환에 대한 백신이나 완전한 치료제는 없고 면역상태를 향상시키며 기회감염의 정도나 빈도를 감소시키는 약제가 개발되어 이용되고 있을 뿐이다.

AIDS 가 발견된 초기부터 림프구 감소가 심하다는 것이 알려져 있으며<sup>10,11)</sup>, 특히 Th 세포의 감소와 기타 T 세포의 기능장애들이 많이 보고되었는데, 예를들면 mitogen 에 대한 림프구 반응의 저하, 혼합림프구 반응의 결함, T 림프구 매개성 세포독성의 결함, 바이러스에 대한 면역반응 및 자연살해세포 활성의 감소 등이다<sup>12-14)</sup>

HIV 항체 양성자는 발병시기가 개인에 따라 상이하므로 임상증세를 나타내기 전에 면역학적 시험방법을 통하여 질병상태를 미리 알아볼 수 있는데, 가장 대표적인 지표로는 CD4 림프구수의 변화와 CD4/CD8 비를 들 수 있다. 그 외에도 p24 핵단백에 대한 항체가  $\beta$ 2-microglobulin, 소변 및 혈청내의 neopterin 양, 혈소판 감소증,  $\alpha$ -interferon, soluble interleukin-2 수용체의 양<sup>15)</sup>, P24 antigenemia<sup>16)</sup> 등이 있으나 본 연구에서는 HIV 항체 양성자에서의 혈액학적 검사와 환자 개개인의 예후를 알기 위한 Walter Reed 분류에 이용되며 면역기능의 지표로 사용되는 CD4 림프구수, CD8 림프구수 및 CD4/CD8 비를 조사하여 정상인 대조군과 비교하였으며, 무증상 HIV 항체 양성자의 매 기간별 검사소견을 조사하였다.

## 제 2 절 실험재료 및 방법

### 1. 대상자

국립보건원에서 실시한 항 HIV 항체 검사 결과 효소면역측정법 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA), 면역형광항체법 (Immunofluorescence Antibody Assay, IFA), Western blot 시험으로 최종 확인된 HIV 항체 양성자 139 명에 대하여 6 개월 간격으로 전혈을 채취하여 혈액검사 및 T 림프구의 아세포군을 측정하였으며 19 명의 정상인 대조군의 혈액 및 면역학적 소견과 비교하였다.

### 2. 말초혈액 단핵세포의 분리

헤파린이 처리된 진공 tube (BD 회사제) 로 10 ml의 전혈을 채취하여 1500rpm 으로 10 분간 원심하여 buffy coat 를 분리한 후 동량의 RPMI-1640 배지로 잘 섞어 Ficoll/Hypaque 비중차 용액 ( $\alpha = 1.077$ ) 위에 서서히 중첩하여 1800rpm 으로 15 분간 원심하여 단핵세포를 분리하였다.

### 3. T 림프구 아세포군의 측정

EDTA 가 첨가된 진공 tube (BD 회사제) 에 3 ml의 전혈을 채취하여 백혈구측정기 (Coulter 회사제) 로 총 백혈구수를 측정하였다.

분리된 단핵세포 ( $2 \times 10^7 / ml$ ) 50  $\mu$ l 에 FITC (fluorescein isothio-

cyanate)가 결합된 항 - Leu-3a(CD4) 단일항체와 PE(phycoerythrin)이 결합된 항 -Leu -2a(CD8) 단일항체가 섞여 있는 용액 (Simultest, BD 회사제) 20 $\mu$ l를 첨가한 후 4°C에서 30 분간 반응시키고 인산완충용액으로 1회 세척한 뒤 원침된 세포에 1% paraformaldehyde 용액 50 $\mu$ l를 첨가하여 4°C에서 고정하였다.

전혈을 이용하여 형광염색을 실시한 경우 100 $\mu$ l의 전혈과 형광표지 단일항체를 30 분간 반응시킨 후 2 ml의 lysing solution (BD 회사제)을 첨가하여 적혈구를 용혈시켰으며 그 후는 위와 동일한 과정에 의해 세척 및 고정하여 T 림프구 아세포군의 측정에 이용하였다. 이와같이 고정된 T 림프구는 Fluorescence Activated Cell Sorter(FACS, BD 회사제)를 이용하여 염색된 CD4 림프구와 CD8 림프구의 백분율을 구함으로써 CD4 림프구수 및 CD8 림프구수를 계산하였다.

$$\text{절대림프구수} = \text{백혈구수} \times \frac{\text{림프구\%}}{100}$$

$$\text{CD4 림프구수} = \text{절대림프구수} \times \frac{\text{CD4 림프구\%}}{100}$$

$$\text{CD8 림프구수} = \text{절대림프구수} \times \frac{\text{CD8 림프구\%}}{100}$$

$$\text{CD4/CD8비} = \frac{\text{CD4 림프구\%}}{\text{CD8 림프구\%}}$$

#### 4. 통계적 분석

실험결과의 통계적 분석은 상용의 통계 program(Abstat Statistics Package)을 이용한 Student's t-test로 검정하여 p값이 0.05 이하인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

### 제 3절 실험 결과

무증상 HIV 항체 양성자의 CD4(Th cell)와 CD8(Ts cell) 세포수, CD4/CD8 비 및 기타 혈액학적 검사를 6개월 간격으로 실시하여 변화를 관찰하였으며 그 결과를 정상인 대조군과 비교하였다.

정상인 대조군과 HIV 항체 양성자의 혈액 및 면역시험 결과는 표 1과 같다. 일반 혈액검사 결과를 비교할 때 적혈구수, 헤모글로빈, 헤마토크리트 모두 정상인 대조군과 HIV 항체 양성자 사이에 유의한 차이가 없었다. 백혈구수와 림프구수는 각 개체에 따라 수치의 변이가 컸으며, 한 HIV 항체 양성자를 대상으로 매 6개월마다 측정하였을 때 한 개체내에서도 시기에 따라 결과의 변이가 크게 나타났으나 이 두 군간에는 유의한 차이를 나타내지 못했다.

CD4 림프구수는 HIV 항체 양성자의 경우  $620/mm^3$ 으로 정상인 대조군에 비해 감소된 것으로 나타났고 ( $1084/mm^3$ ), CD8 림프구수는  $1255/mm^3$ 을 나타내어 정상인 대조군에 비해 유의하게 큰 것으로

로 나타났으며 ( $p < 0.05$ ) CD 4/CD8 비도 유의한 차이를 보였다 ( $p < 0.01$ ).

정상인 대조군과 HIV 항체 양성자의 백혈구 및 림프구수의 성적 분포는 그림 1,2 와 같다. 두 군 모두에서 백혈구는  $5500-6500/mm^3$  에서, 림프구는  $3000/mm^3$  정도에서 높은 빈도를 나타내었으나 두 군간의 차이는 유의성이 없는 것으로 나타났다.

림프구 아세포군의 성적 분포는 그림 3,4 와 같다. 대조군의 CD4 림프구수는  $900-1000/mm^3$ 에서 높은 빈도를 나타내었으나, HIV 항체 양성자군의 경우는  $1000/mm^3$  이상에서도 40 명이 있었고 CD8 림프구수도 각 개체에 따라 변이가 큰 것으로 나타났다. CD4/CD8 비의 성적 분포는 그림 5 와 같다. HIV 항체 양성자군의 수치는 대부분 0.2-0.8 에 분포하는 것으로 나타났다.

HIV 항체 양성자군을 전체적으로 통합하여 평균값을 구할 경우 각 개체에 따른 변이가 큰 것으로 나타났기 때문에 6개월 간격으로 3회 이상 실험이 가능한 증례를 각 실험날짜별로 혈액 및 면역학적 검사의 변화를 살펴 보았다 (표 2). 감염 후 시간의 경과와 상관없이 적혈구수, 헤모글로빈, 헤마토크리트는 비슷한 결과를 나타내었으나 백혈구수, 림프구수, CD4 림프구수, CD8 림프구수는 각 증례에 따라 차이가 있었으며 (그림 6,7) CD4/CD8 비는 일관성있게 감소 양상이 나타났다 (그림 8). 증례 1, 2, 3, 6 은 무증상 HIV 항체 양성자로서 CD4/CD8비가 서서히 감소하였으며, 증례 4, 5 는 CD4 림프구수가  $500/mm^3$  이하로 감소하였고 비는  $0.90 \rightarrow 0.50 \rightarrow 0.44 \rightarrow 0.30$  와  $0.70 \rightarrow 0.40 \rightarrow 0.44$  로 변화하였다.

Table 1. Comparison of hematoimmunologic findings in anti-HIV seronegative and asymptomatic seropositive persons

Tests	Controls	Seropositives	p-Value
RBC( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	4.61 $\pm$ 0.51 (19)	4.81 $\pm$ 0.62 (143)	p>0.05
Hgb(g/dL)	14.1 $\pm$ 1.8 (19)	14.7 $\pm$ 1.8 (138)	p>0.05
Hct(%)	42.4 $\pm$ 5.5 (19)	44.2 $\pm$ 4.9 (141)	p>0.05
WBC(/ $\text{mm}^3$ )	6274 $\pm$ 1425 (19)	5917 $\pm$ 1777 (178)	p>0.05
Lym(/ $\text{mm}^3$ )	3181 $\pm$ 1298 (16)	2704 $\pm$ 1058 (172)	p>0.05
CD4(/ $\text{mm}^3$ )	1084 $\pm$ 546 (14)	620 $\pm$ 347 (158)	p<0.01
CD8(/ $\text{mm}^3$ )	794 $\pm$ 388 (14)	1255 $\pm$ 693 (158)	p<0.05
CD4/CD8	1.42 $\pm$ 0.37 (14)	0.64 $\pm$ 0.47 (184)	p<0.01

RBC: red blood cell, Hgb: hemoglobin, Hct: hematocrit,

WBC: white blood cell, Lym: lymphocyte, CD4: Th cell, CD8:Ts cell

The results are expressed as the mean  $\pm$  S. D.

The numbers in parentheses indicate numbers of the experiments.

Student's t-test was used for statistical analysis of the data.

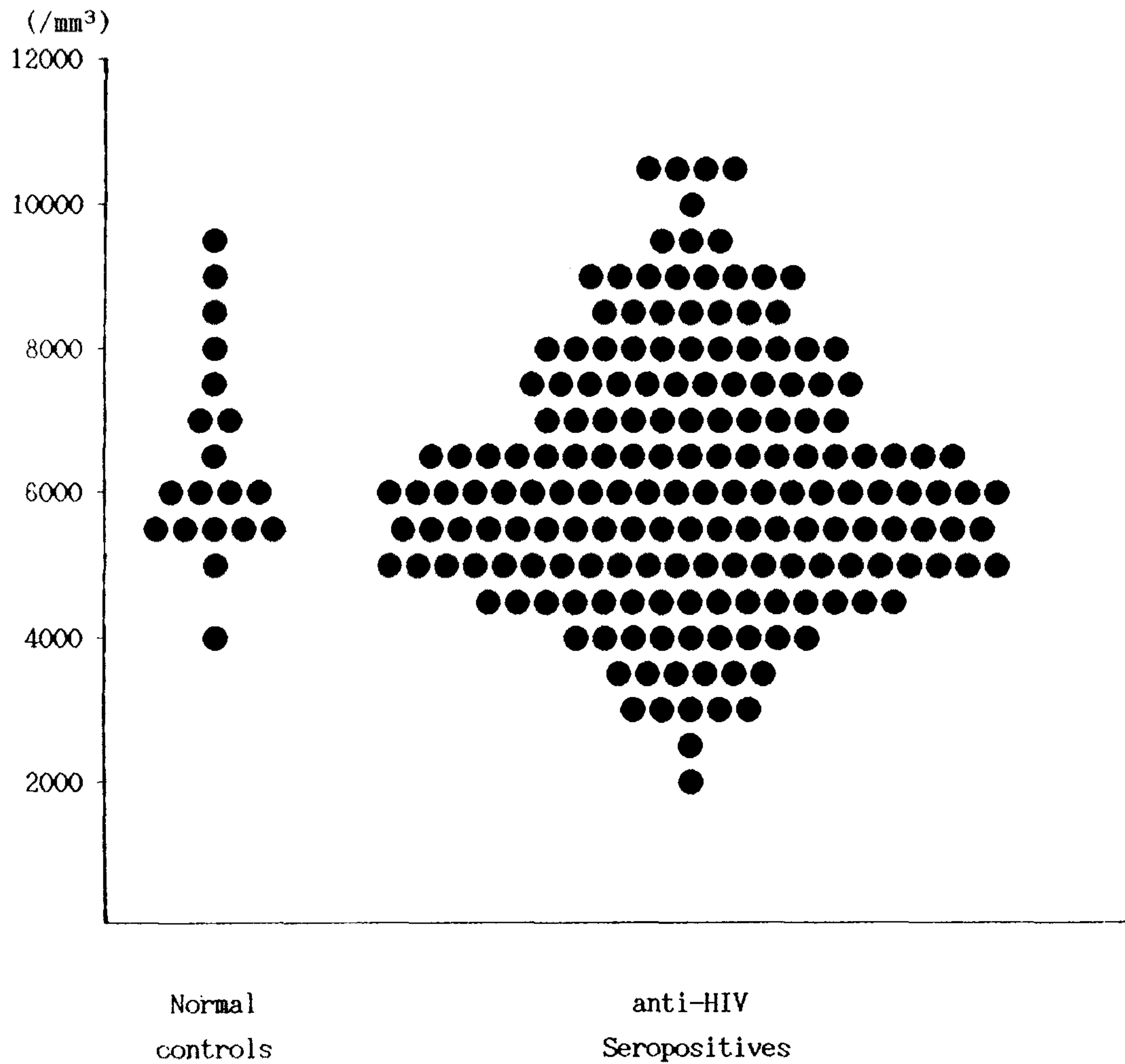


Fig. 1. Comparison of the distribution of white blood cell counts in normal anti-HIV seronegative and asymptomatic seropositive persons



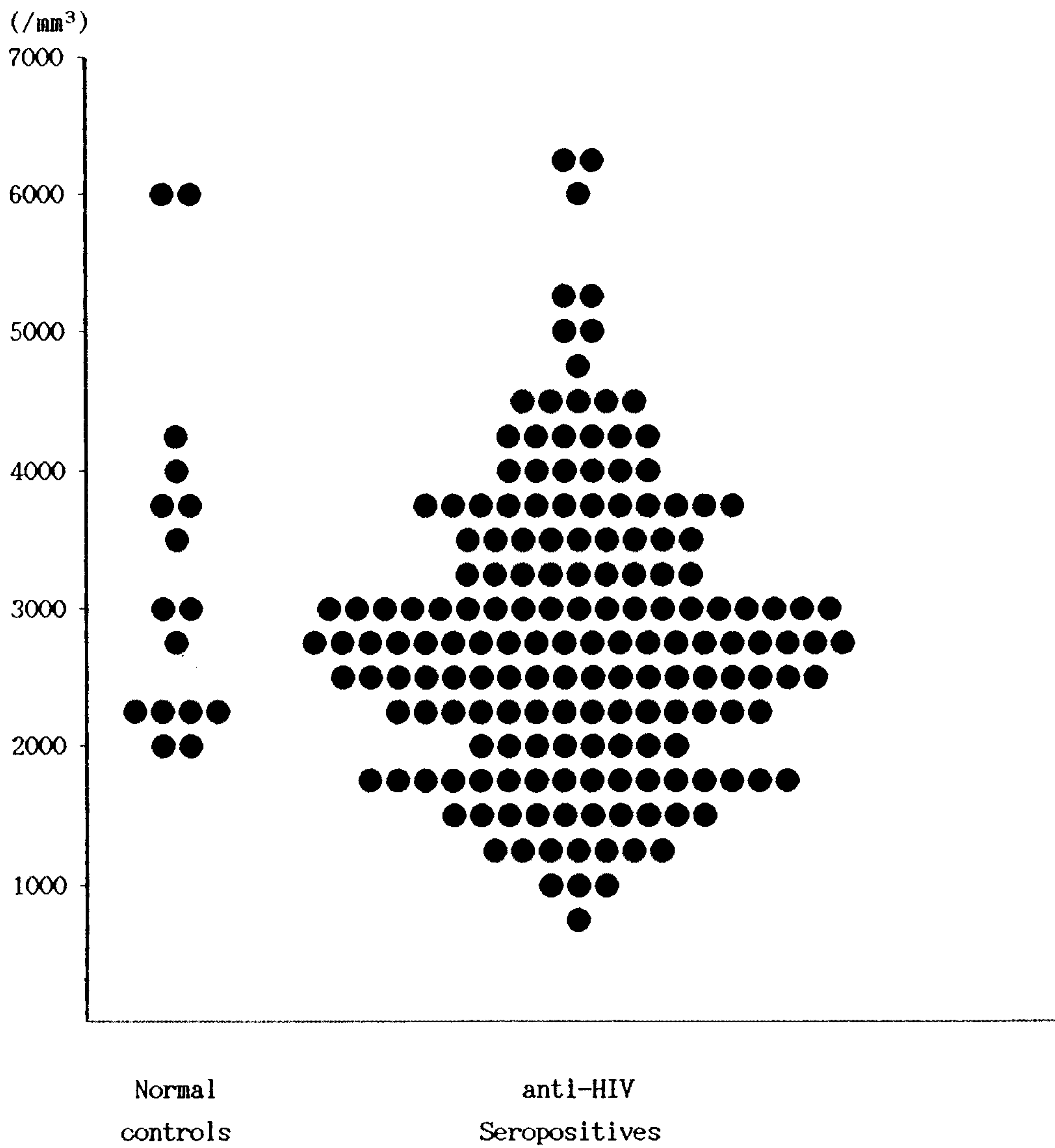


Fig. 2. Comparison of the distribution of lymphocyte counts in normal anti-HIV seronegative and asymptomatic seropositive persons



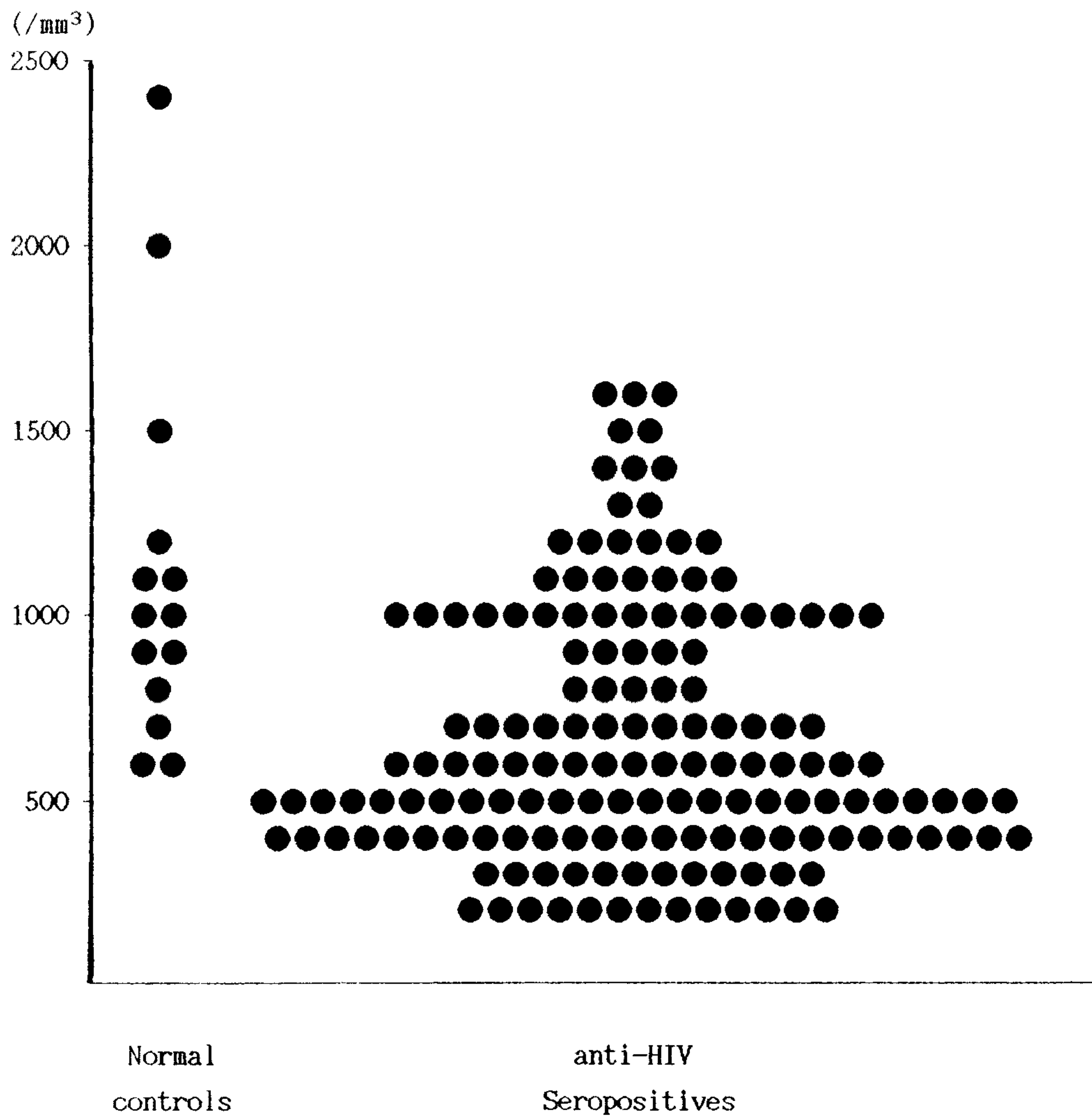


Fig. 3. Comparison of the distribution of helper T cell counts in normal anti-HIV seronegative and asymptomatic seropositive persons

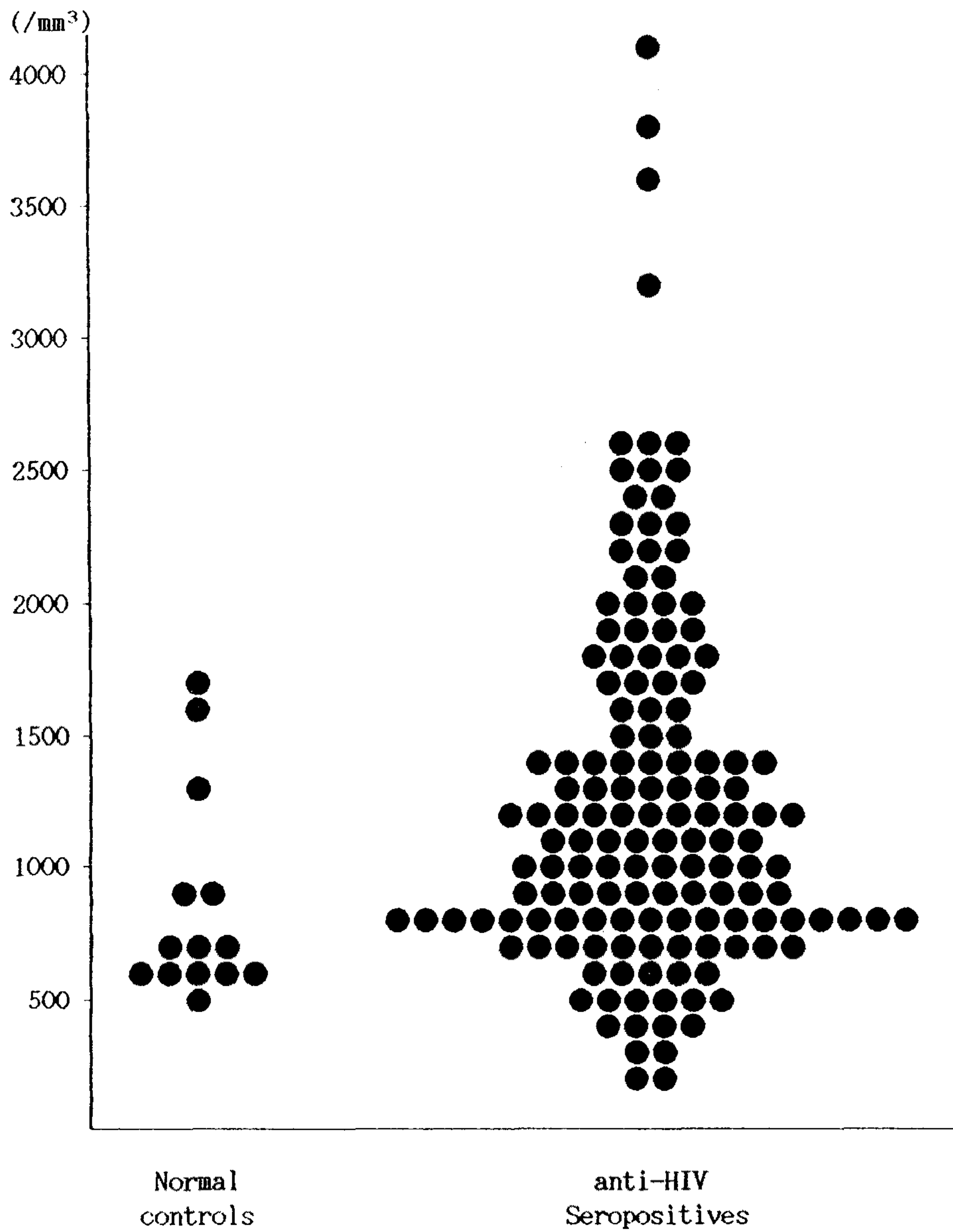


Fig. 4. Comparison of the distribution of suppressor T cell counts in normal anti-HIV seronegative and asymptomatic seropositive persons

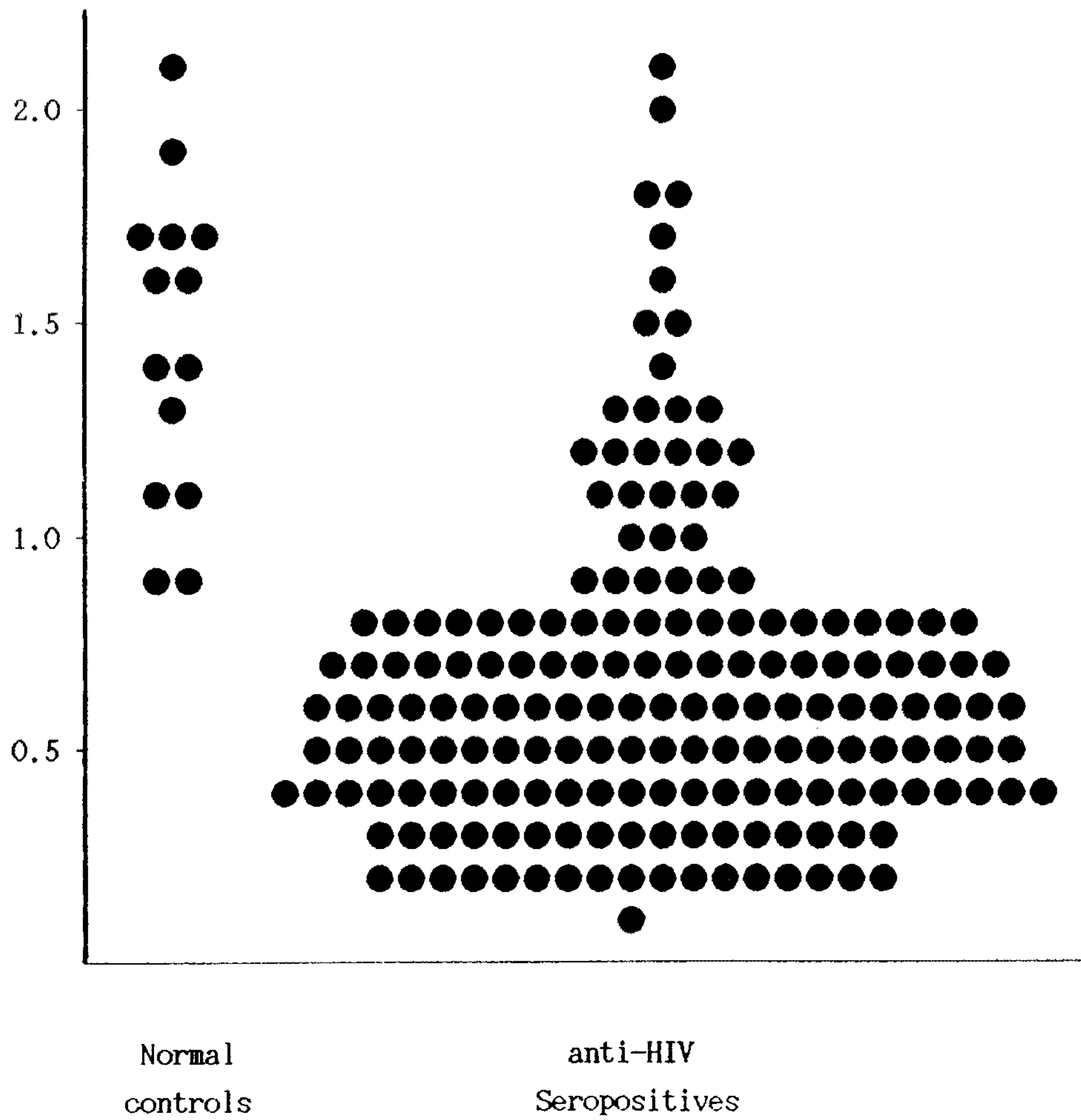


Fig. 5. Comparison of the distribution of CD4/CD8 ratio in normal anti-HIV seronegative and asymptomatic seropositive persons

Table 2. Changes of Hematologic findings and T cell subsets in asymptomatic anti-HIV seropositive persons

Case	Date tested	RBC	Hgb	Hct	WBC	Lym	CD4	CD8	CD4/CD8
		( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	(g/dL)	(%)	(/ $\text{mm}^3$ )				
1	88. 2	—	—	—	—	—	—	—	1.56
	89. 8	5.06	15.2	46	5000	2475	750	1200	0.63
	90. 6	4.57	14.9	45	5100	3825	958	1733	0.55
	91. 3	5.40	16.6	49	7300	3358	648	1961	0.33
2	88. 9	—	—	—	2200	1276	—	—	—
	89. 6	—	—	—	—	—	—	—	0.77
	90. 6	3.90	14.1	42	5300	3710	1484	2003	0.74
	91. 5	4.20	12.9	38	6100	3538	973	1482	0.66
3	88.12	—	—	—	—	—	—	—	0.77
	89. 2	—	—	—	7400	2664	986	1305	0.80
	89. 5	—	—	—	8300	2905	959	1394	0.70
	89. 8	4.91	14.1	39	7700	2926	936	1492	0.63
	90. 9	4.68	14.1	42	10800	4428	1280	2404	0.53
	91. 3	4.89	14.5	44	8900	4094	1024	2248	0.45
4	88. 6	—	—	—	3000	1470	—	—	—
	89. 3	—	—	—	6050	2360	897	1015	0.90
	89. 8	5.00	13.5	39	4300	2021	485	990	0.50
	90. 6	2.91	9.6	31	3400	1082	425	968	0.44
	91. 3	4.23	12.8	39	6100	1708	327	1079	0.30

Case	Date	RBC	Hgb	Hct	WBC	Lym	CD4	CD8	CD4/CD8
	tested	( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	(g/dL)	(%)		(/mm <sup>3</sup> )			
5	89. 3	—	—	—	4900	1617	455	698	0.70
	89.12	5.29	15.6	46	7800	2496	401	1036	0.40
	90.10	5.40	15.7	48	6500	2665	490	1109	0.44
6	89. 4	—	—	—	5650	2204	661	1036	0.64
	90. 8	4.57	14.6	45	5400	3700	550	945	0.58
	91. 5	4.92	15.7	47	5400	3672	624	1931	0.32

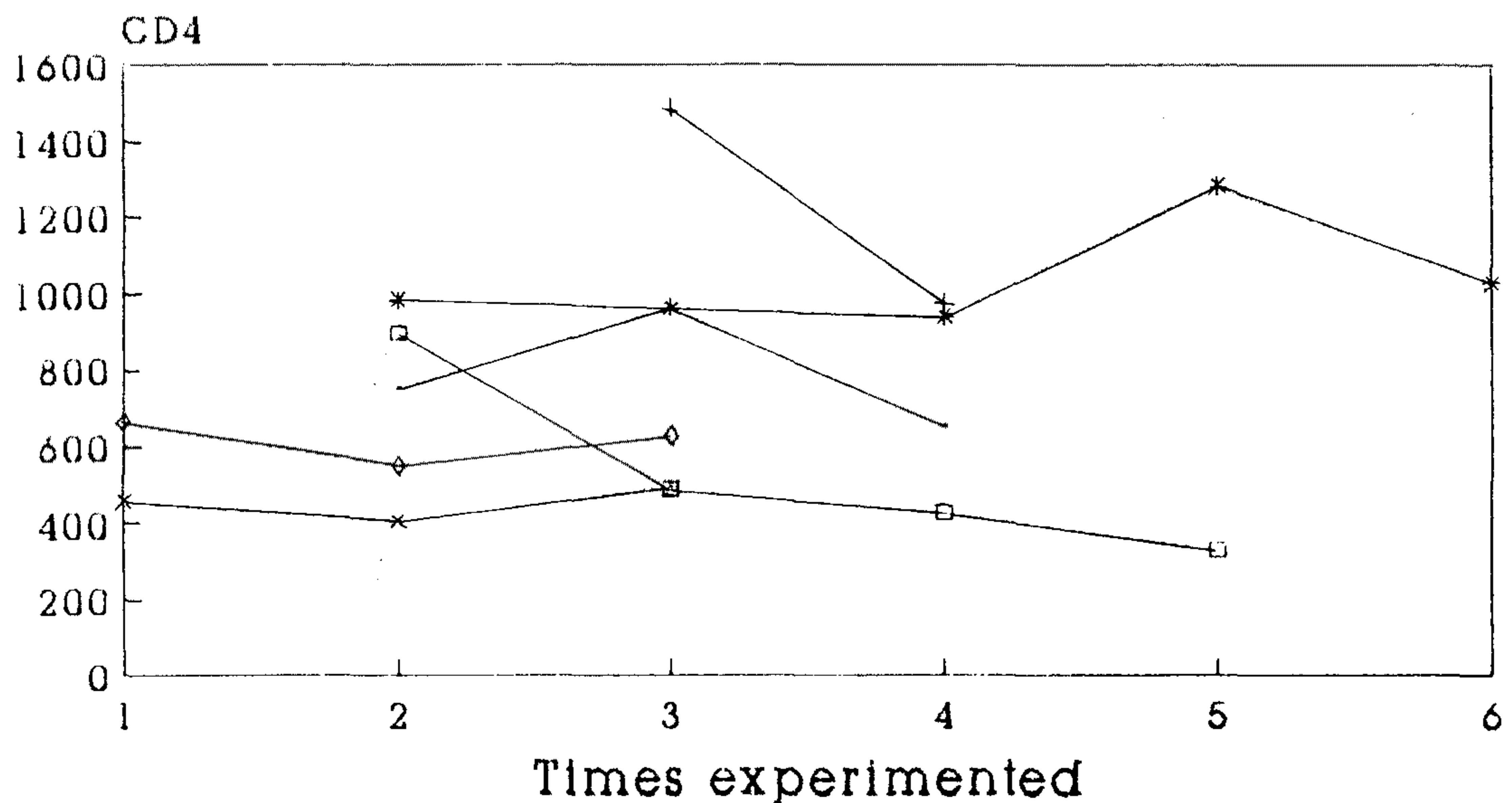


Fig. 6. Changes of helper T cell counts in 6 asymptomatic anti-HIV seropositive persons

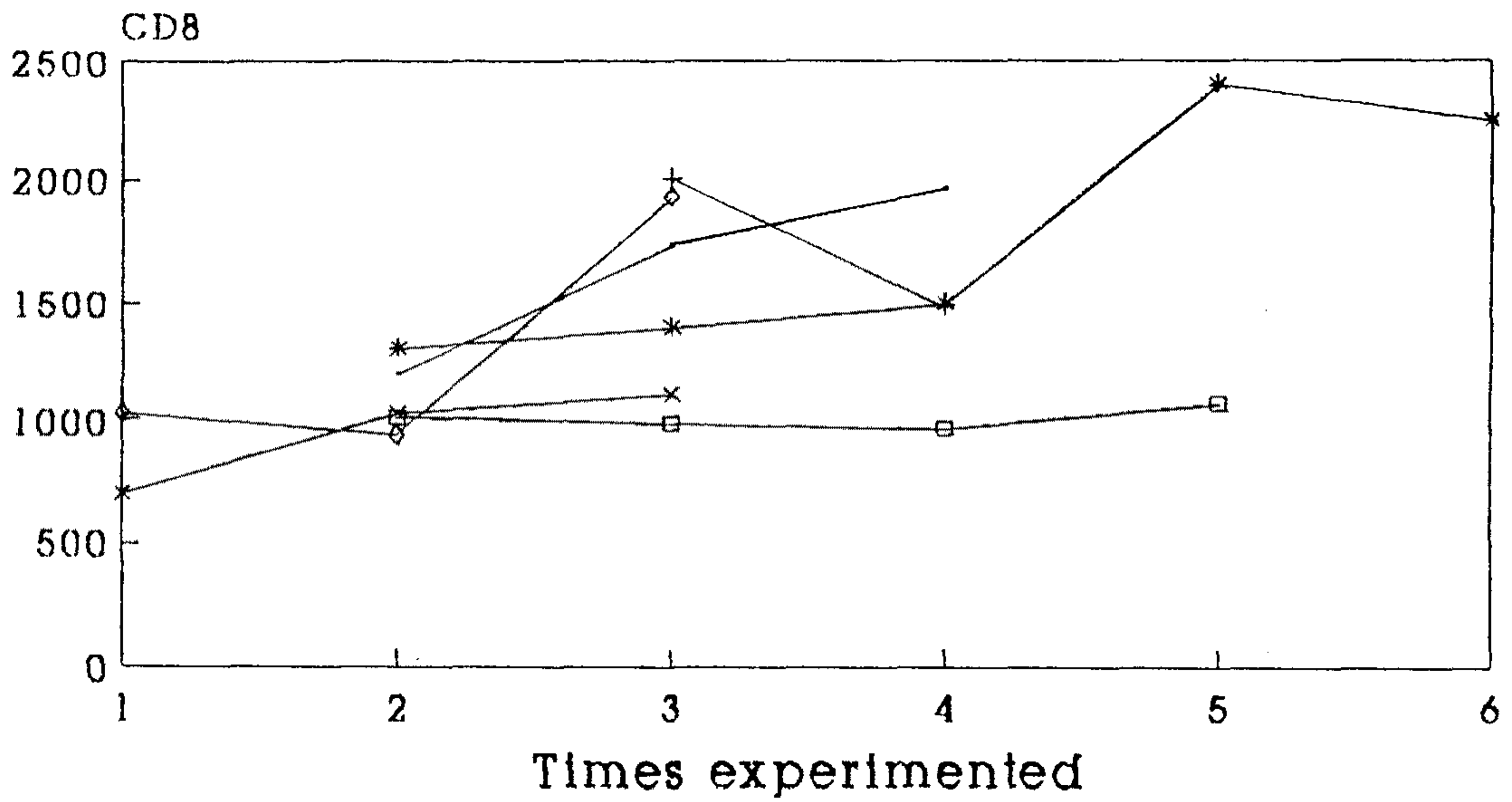


Fig. 7. Changes of suppressor T cell counts in 6 asymptomatic anti-HIV seropositive persons

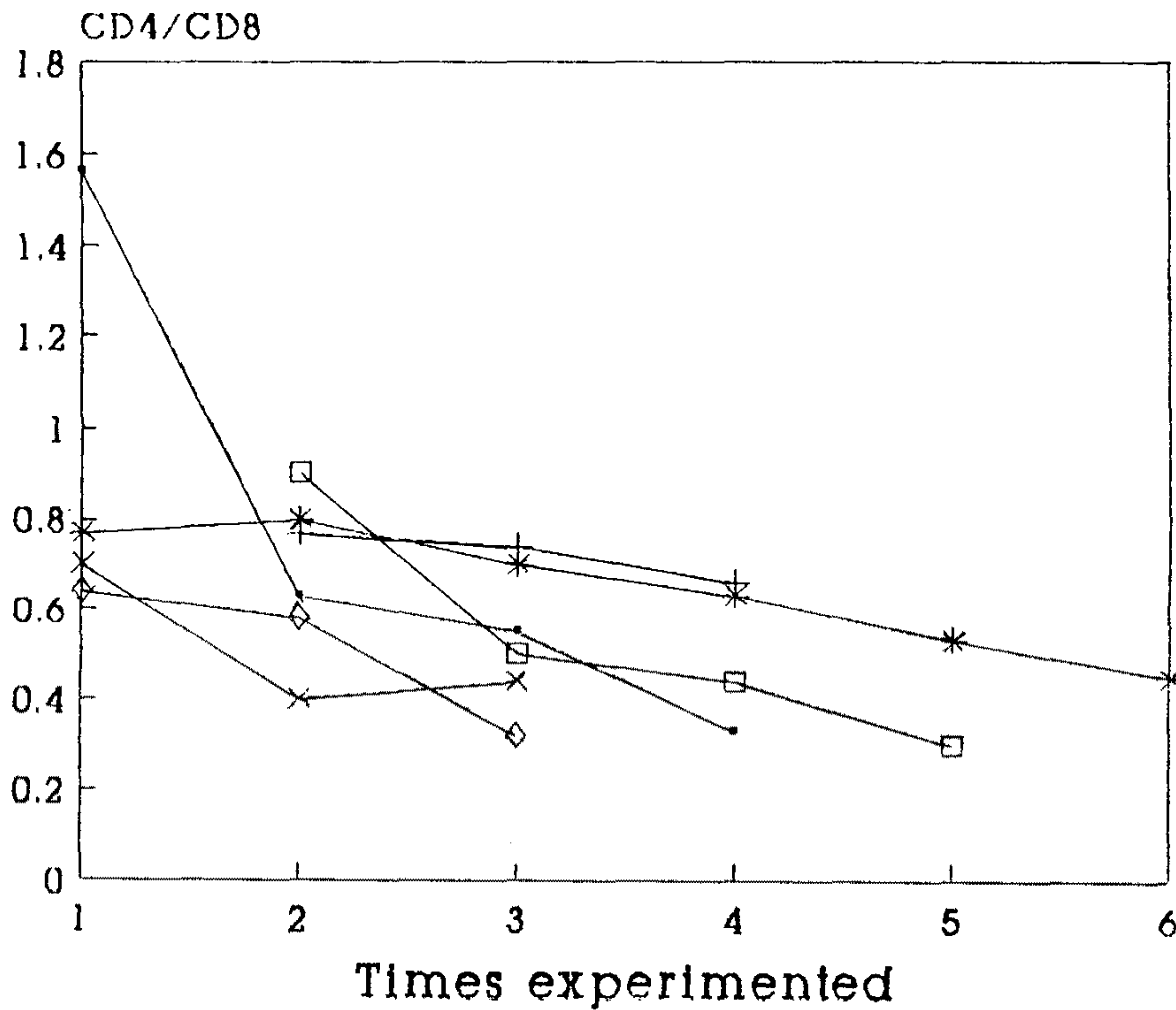


Fig. 8. Changes of CD4/CD8 ratio in 6 asymptomatic anti-HIV seropositive persons

## 제 4 절 고 찰

HIV 감염의 중요한 양상은 HIV가 표현형이 CD4인 Th 세포에 선택적으로 감염되어 나타나는 T림프구의 결핍이다. Th 세포 표면의 CD4 분자가 HIV의 외피단백질에 대해 강한 친화력이 있어 수용체로 작용하며 이러한 사실은 CD4에 대한 단일항체를 이용하여 HIV와의 결합을 방해함으로써 CD4 분자가 감염에 필요하다는 것이 증명되었다<sup>17,18)</sup>. 일부 단핵세포와 대식세포도 CD4 분자를 가지므로 HIV에 결합되어 감염될 수 있으며<sup>8)</sup> 그 외에도 Langerhans 세포<sup>19)</sup> 림프절의 follicular dendritic cell<sup>20)</sup>, promonocytic tumor cell<sup>21-31)</sup> 및 transformed B cell<sup>32)</sup>, endothelial cell<sup>27)</sup>, transformed colon cell<sup>33)</sup> 등에서도 HIV가 감염되었다는 보고가 있다. 그러나 HIV는 Th림프구와 달리 단핵세포에서 세포괴사를 나타내지 않는데 감염된 CD4림프구의 세포표면에 다량의 HIV gp120이 나타나 비감염 Th림프구와 세포융합을 해서 거대다핵세포를 만들어 융합된 세포들이 괴사하며 이것이 순환중인 많은 비감염세포들을 감소시키는 기전으로 여겨진다<sup>4,5)</sup>

HIV 항체 양성자에서 Th림프구수의 감소에 의하여 T4/T8비가 역전되는 것도 특징적인 것으로<sup>11,34)</sup> T4/T8비가 역전되는 것은 다른 바이러스성 질환들에서도 나타나는데 이 경우는 T8림프구수가 상대적으로 증가되기 때문으로 HIV 감염자의 경우와는 다르다. HIV 감염자의 경우는 T4림프구의 감소에 의한 것이므로 초기 검사상의 이

상은 T 림프구의 T4/T8 세포 비율로 나타난다. T4/T8 세포비 및 T4 세포의 감소는 어느 정도 질병의 중증도와 비례하기도 하나 T4 세포의 절대수를 더욱 중요시 한다. Walter Reed 분류에서도 T4 세포수  $400/mm^3$  를 기준으로 구분하며<sup>35)</sup> HIV 항체 양성자에서는 T4 세포수가  $200/mm^3$  이하에서는 AIDS 로 진행될 지표로 삼기도 한다<sup>36)</sup>

본 연구에서 T4/T8비는 정상인 대조군에 비하여 HIV 항체 양성자에서 유의하게 감소하였으며, T4 세포수 ( $620/mm^3$ ) 도 현저히 감소하였다 ( $p < 0.01$ ).

T8 세포수도 HIV 감염자에서 변화가 있으며 무증상 HIV 항체 양성자 및 임파절증후군에서 증가되는데 이것은 HIV 및 다른 병원체에 세포독성작용으로 나타난다. AIDS 와 관련 질환들에서 관찰되는 면역기능의 결함은 다양이다. 이것은 HIV 가 감염되는 Th 림프구의 기능이 매우 다양하며 정상 면역기능에 있어 중심적인 역할을 하기 때문이다. Th 세포는 림프구와 비림프구 세포기능의 유도에 관여하는데 대부분의 Th 세포효과는 다른 세포에 선택적, 유도적인 효과를 갖는 인자를 분비하여 이루어진다. 이러한 기능들로는 대식세포 활성화, NK, Ts 및 B 세포의 유도, 그리고 림프구 성장과 혈액조세포에 영향을 주는 인자들을 분비한다<sup>14, 32)</sup>.

본 연구에서는 실험실 자체내에서 정상인 대조군의 CD4 림프구, CD8 림프구 및 CD4/CD8비에 대한 평균수치 및 분포를 확립하였으며 정상인 면역기능과의 상대적인 비교를 통해 HIV 항체 양성자의 면역기능 상태를 판단하게 되었다. 각 증례에 따른 변화를 관찰하였을 때 CD4 림프구수와 CD8 림프구수는 각 증례에 따라 수치



의 차이가 있었으나 CD4/CD8비는 일관성있는 양상을 나타내었으므로 CD4림프구수, CD8림프구수의 절대수치만으로 면역기능 상태를 판단하기는 어려우며 각 증례에 따른 질병진전도를 판단하기 위해서는 CD4/CD8비를 기초로 CD4림프구수, CD8림프구수의 절대수치를 참조하는 것이 적합하리라 사료된다. 따라서 간단히 검사할 수 있는 질병 예후 지표를 발견하거나 기타 보충적인 면역시험 및 임상자료를 통하여 HIV항체 양성자의 분류 및 예후 진단을 하여야 하겠다.

## 제 5 절 결 론

무증상 HIV 항체 양성자와 정상인 대조군의 혈액 및 면역학적 상태를 비교하고 무증상 HIV 항체 양성자의 매 기간에 따른 면역기능의 변화양상을 관찰하기 위하여 HIV 항체 양성자 139명과 19명의 정상인을 대상으로 일반 혈액검사와 CD4림프구수, CD8림프구수 및 CD4/CD8비를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 일반 혈액검사 결과를 비교할 때 적혈구수, 헤모글로빈, 헤마토크리트, 백혈구수 및 림프구수 모두 대조군과 HIV 항체 양성자군 간에 유의한 차이를 나타내지 못했다.
2. CD4림프구수는 HIV 항체 양성자군이 정상인 대조군에 비해 감소된 것으로 나타났고, CD8림프구수는 HIV 항체 양성자군이 유의하

게 증가한 것으로 나타났으며 CD4/CD 8비도 유의한 차이를 보였다 (  $p < 0.01$  ).

- 3 . HIV 항체 양성자군 가운데 6개월 간격으로 3회 이상 실험이 가능한 증례를 대상으로 각 실험날짜별 혈액 및 면역학적 검사의 변화를 살펴본 결과, CD4 림프구수, CD8 림프구수는 각 증례에 따라 차이가 있었으나 CD4/CD 8비는 일관성있게 감소 양상이 나타났다.
- 4 . CD4 림프구수, CD8 림프구수의 절대수치만으로 면역기능 상태를 판단하기 어려우며 각 증례에 따른 질병진전도를 판단하기 위해서는 CD4/CD 8비를 기초로 CD4 림프구수, CD8 림프구수의 절대수치를 참조하는 것이 바람직하다.

## 제 6 절 참 고 문 헌

1. Gottlib MS, Schroff R, Schander HM : Pneumocystic carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. Evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl J Med 305 : 1425, 1981.
2. Meldvan D, Mathur U, Enlow RW : Opportunistic infection and immunodeficiency in homosexual men. Ann Intern Med 96 : 700, 1982.
3. Centers for Disease Control : Update on acquired immunodeficiency syndrome(AIDS) - United States. MMWR 31 : 507, 513, 1982.
4. Barre-Sinoussi F, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Alexr-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzuoux C, Rosenbaum W, Mostanier L : Isolation of a T lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome(AIDS). Science 220 : 863, 1983.
5. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popvic M : Frequent detection and isolation of cytopathic retrovirus(HTLV-III) from patients with AIDS and risk for AIDS. Science 224 : 500, 1984.
6. Seligmann M, Pichig AJ, Rosen FS : Immunology of Human Immunodeficiency virus infection and the Acquired Immunodeficiency Syndrome. An Update. Ann Int Med 107 : 234, 1987.
7. WHO Weekly Epidemiological Record. 16(3) · 229, 1986.
8. McDougal JS, Kennedy MS, Slingh JM, Cort SP, Mawle A, Nicholson JKA : Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. Science 231 : 382, 1986.

9. Montagnier L, Gruest J, Chamaret J : Adaptation of lymphadenopathy associated virus(LAV) to replication in EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines. *Science* 225 : 63, 1984.
10. Fahey JL, Detels R, Gottlib MS : Immune-cell augmentation(with altered T-subset ratio) is common in healthy homosexual men. *N Engl J Med* 308 : 842, 1983.
11. Janet KA Nicholson, Jones BM, Echonberg DF, Spira TJ, McDougal JS : Phenotypic distribution of T cells of patients who have subsequently developed AIDS. *Clin Immunopathol* 48 : 82, 1987.
12. Ciobanu N, Welk K, Kruger G : Defective T cell responses to PHA and mitogenic monoclonal antibodies in male homosexuals with acquired immunodeficiency syndrome and its *in vitro* correction by interleukin-2. *J Clin Invest* 71 : 296, 1983.
14. Rook AH, Masur H, Lane HC : Interleukin-2 enhances the depressed natural killer and CMV-specific cytotoxic activation of lymphocytes from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Invest* 72 : 298, 1983.
15. Lifson AR, Rutherford GW, Jaffe HW : The National History of Human Immunodeficiency Virus infection. *J Infect Dis* 158 : 1360, 1988.
16. Wolf FD, Lange JMA, Houweling JTM : Appearance of predictors of disease progression in relation to the development of AIDS. *AIDS* 3 : 563, 1989.
17. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S : T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312 : 767, 1984.
18. Dalgleish AG, Beverly CL, Clapham PR : The CD4(T4) antigen is an essen-

- tial component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312 : 763, 1984.
19. Belsito DV, Sanchez MR, Baer RL : Reduced Langerhans's cell Ia antigen and ATPase activity in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 310 : 1279, 1984.
  20. Armstrong GA, Horne R : Follicular Dendritic cells and virus like particles in AIDS related lymphadenopathy. *Lancet* 2 : 370, 1984.
  21. Levy JA, Shimabukuro J, McHugh T : AIDS associated retrovirus(ARV) can productively infect other cells besides human T helper cells. *Virology* 147 : 441, 1985.
  22. Ho DD, Rota TR, Hirsch MS : Infection of monocyte/macrophage by human T lymphotropic virus type II. *J Clin Invest* 77 : 1712, 1986.
  23. Nicholson JKA, Cross GD, Callaway CS : *In vitro* infection of human monocytes with human T-lymphotropic virus type III/Lymphadenopathy-associated virus(HTLV-III/LAV). *J Immunol* 137 : 323, 1986.
  24. Salahuddin SZ, Rose RM, Groopman JE : Human T-lymphotropic virus type II infection by human alveolar macrophages. *Blood* 68 : 281, 1986.
  25. Gartner S, Markovits P, Markovits DM : The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science* 233 : 215, 1986.
  26. Koenig S, Gendelman HE, Orenstein JM : Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 233 : 1089, 1986.
  27. Wiely CA, Schrier RD, Nelson JA : Cellular localization of human immunodeficiency virus infection within the brains of acquired

- immunodeficiency syndrome patients. Proc Natl Acad Sci USA 83 : 7089, 1986.
28. Gartner S, Markovits P, Markowitz DM : Virus isolation and identification of HTLV—III/LAV producing cells in brain tissue from a patient with AIDS. JAMA 256 : 2365, 1986.
  29. Stoler MH, Eskin TA, Benn S : Human T cell Lymphotropic virus type III infection of the central nervous system. JAMA 256 : 2360, 1986.
  30. Vazeux R, Brousse N, Jarry A : AIDS subacute encephalitis 126 : 403, 1987.
  31. Rieber P, Riethmuller G : Loss of circulating T4+ monocytes in patients infected with HTLV—III. Lancet 1 : 270, 1986.
  32. Murry HW, Rubin BY, Masur H : Impaired production of lymphokines and immune(gamma) interferon in the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 310 : 883, 1984.
  33. Adachi A, Koenig S, Gendeiman HE : Productive persistent infection of human colorectal cell lines with human immunodeficiency virus. J Virol 61 : 209, 1987.
  34. Kim TG, Suh KI, Hwang ES, Shin YO, Park SH : Selection of immunological parameters related with progression to acquired immunodeficiency syndrome(AIDS) in the Korean Human Immunodeficiency Virus (HIV) seropositives : T cell subsets and mitogen stimulation tests. Korean J Immunol 11 : 185, 1989.
  35. Redfield RR, Wright DC, Tramont EC : The Walter Reed staging classification for HTLV—III/LAV infection. N Engl J Med 314 : 131, 1986.

36. Polk BF, Fox R, Bookmeyer R : Predictors of the acquired immunodeficiency syndrome developing in a cohort of seropositive homosexual men. N Engl J Med 316 : 61, 1987.



## 2. HIV 혈청 시험에서의 감도 및 특이도 시험

### 제 1 절 시 설

국내에서 1985년 처음으로 AIDS 환자가 보고되었으며<sup>1)</sup> 1991년 6월 현재 147명의 HIV 감염자가 발견되었다. 국내의 HIV 감염 양상은 선원 및 외국인 상대업태부가 55.8%, 수혈 및 혈액제제에 의한 감염 4.8%, 동성연애자 7.5%로 미국, 아프리카의 AIDS 유행과는 다른 양상을 나타내고 있다.

HIV 감염 여부에 대한 항체시험은 1985년 보건증 발급자 및 특수업태부 등을 대상으로, 1987년 7월 이후부터는 헌혈자를 대상으로 1988년에는 선원들을 대상으로 항체시험을 확대하여 실시하였다. 연도별 시험 건수는 1985년 3,877건, 1986년 7,781건, 1987년 603,788건, 1988년 809,953건, 1989년 305,000건, 1990년 1,735,300건으로 매년 시험건수가 증가되고 있다. 검역소 및 시·도 보건환경연구원 에서 사용되고 있는 HIV 항체검사의 일차 screening 방법은 Indi-



irect Enzyme linked Immunosorbent Assay(I.D.ELISA 시약)을 일반 병원에서는 Competitive Inhibition(C.I) ELISA, Particle agglutination(P.A) 등이 사용되고 있다. HIV 확인검사로는 C.I.ELISA P.A, Immunofluorescent antibody assay(I.F.A) 및 Western blot 시험법 등이 사용되고 있으나 이들 방법들 간에는 실험 수행시간, 가격 뿐 아니라 감도 및 특이도에서 큰 차이를 나타내고 있다.<sup>2,3,4)</sup>

HIV 항체 진단 시약은 높은 감도 및 특이도가 요구되며 낮은 감도의 진단시약이 사용될 경우, HIV 감염자를 탐지 못함으로, 헌혈시에 수혈자에게 HIV를 전염시킨 사례가 보고 되었으며<sup>5)</sup>, 또한 낮은 특이도는 보류자의 심적 부담 및 타시약의 반복적 사용으로 인한 시간적, 물질적 낭비가 초래된다.

본 연구에서는 헌혈자 screening 및 기타 일차 항체시험에 사용되고 있는 두 종의 I.D.ELISA와 ENV-peptide ELISA, C.I. ELISA, P.A. 시약의 감도 및 특이도를 비교 분석하였고, HIV 감염 후 항체가 형성될 때까지의 seroconversion 기간을 조사하였다.

## 제 2 절 실험재료 및 방법

감도 및 특이도를 측정하기 위해서 5종의 진단시약(I.D. ELISA-1,2, ENV-peptide ELISA, C.I.ELISA, P.A.) 사용되었으며 시험방법은 동 시험 지침서에 따랐다. I.D. ELISA-1,2는 혈청을 각각 50, 100 배 희

석하고 콘쥬게이트는 anti-human IgG-Alkaline phosphatase 와 anti-human IgG-HRP 를 사용하였다. ENV-peptide ELISA 는 항원으로 E. coli 에서 env 에 대해 합성된 항원이 부착되어 있으며, 혈청이 10 배 희석되어 사용된다. C.I.ELISA 제품은 부착항원에 대해 혈청내의 항체와 HRP 가 콘쥬게이트된 표식항체가 경쟁적으로 결합된다. P.A 제품은 미감입자가 16 배 희석혈청에서, 감작입자가 32 배 희석하여 시험하였다. 확인시험으로는 Du pont 사 Western blot 시험법이 사용되었다.

### 제 3 절 실험 결과

#### 1. HIV 항체 탐지를 위한 진단시약의 감도 비교

Table 1 은 HIV 감염자 혈청 및 WHO 정도 관리용 panel 에 대해 두 종의 I.D.ELISA, C.I.ELISA, P.A. 시약을 대상으로 시험을 실시하고 각각의 감도를 측정 한 것이다. I.D.ELISA-1 과 P.A. 상업시약이 99.2 %, 98.0 %로 비교적 감도가 높게 나타난 반면, I.D.ELISA-2 는 93.7 %로 가장 감도가 낮았다.

HIV 감염자의 임상적 상태에 따른 각 시약별 감도비교에서 Seroconversion 된 감염자 초기혈청 (n = 6) 시험시 P.A. 는 6 건 모두를 양성으로 (100 %), ID ELISA-1 은 6 건 중 5 건을 양성으로 (83.3 %), 그러나 I.D.ELISA-2 는 6 건중 1 건만이 양성으로 시

험되어 초기혈청의 항체탐지에 문제점을 드러냈다. 무증상감염자 혈청시험시 I.D. ELISA-1 및 C.I.ELISA는 각각 100%, 99.3%의 높은 감도를 보였고, AIDS 환자혈청 (n=6), WHO panel (n=6) 혈청에서는 I.D. ELISA-2의 1건 음성을 제외하고는 모든 시약에서 양성반응으로 시험되었다.

## 2. HIV 항체 탐지를 위한 진단시약의 특이도 비교

Table 2는 I.D.ELISA, ENV-peptide ELISA 및 C.I ELISA의 특이도를 비교한 것이다. 두 종 I.D. ELISA-1,2는 99.85, 99.97%로 높은 특이도를 보인 반면 E.coli에서 합성항원이 제조된 ENV-peptide ELISA는 31.45%로 특이도가 낮게 나타나 합성항원의 문제점이 드러났다. 반면 경쟁적 시험법으로 제조된 ELISA는 99.92%로 높은 특이도를 보였다.

## 3. Seroconversion된 혈청들의 Western blot 양상

Table 3은 일차시험시 위음성으로 시험된 혈청들의 Western blot 양상을 나타낸 것이다. Case-1처럼 Glycoproteins (Gp 160/120, 41) 부위에만 반응을 나타낼 때, 사용시약 중 어느 것에서도 항체를 탐지하지 못했다. Case-2, 5에서 볼 수 있듯이 gp41, p31 band가 없거나, 약할 때는 감도가 낮은 시약에서 음성으로 시험되었다.

일차시험 후 2개월 또는 18개월 후, 재시험하여 이차혈청에서 양성을 보인 증례에서 seroconversion 기간을 조사하였다. 2

개월 후 p31 부위에 약한 band가 (case-4), 3개월 후 p31, p41 band 부위에 약한 band가 case-5에서 관찰되었으며, 일차혈청시 gp160,, 120, p24 band만을 나타낸 혈청이 (case-2) 18개월과 10개월 후 모든 band가 검출되었다. gp160, 120, 41 (혈청 5배 농축시 p55,51) band만을 보인 혈청은 10개월 후에도 band 양상에 변화가 없었다 (case-1).

Fig.1은 HIV seroconversion된 감염혈청의 Western blot 양상이다. 일차혈청 시험시 부분 band만이 관찰되었으나, 2-18개월 후에는 env, pol, gag 부위의 모든 유전자 산물에 대한 항체가 나타났다.

#### 4. Band pattern 변화 시험

일차 HIV 항체 screening 시약으로 양성인 혈청을 대상으로 Western blot을 실시하여 band가 관찰된 혈청을 3개월 간격으로 2,3차 확인시험을 실시하고 다음과 같은 결과를 얻었다 (Table 4).

일차시험에서 관찰된 band가 follow-up 후 지속된 예가 70.1%, 관찰 band가 일부 소실된 예가 20.8%, 관찰된 모든 band가 소실된 예가 9.1%로 나타나 이들 관찰 band가 비특이적으로 반응되어 나타난 것임을 알 수 있었다. Follow-up 후 지속된 band는 p24와 p17이 79.7%로 주로 gag 유전자 산물 band가 존재했다.



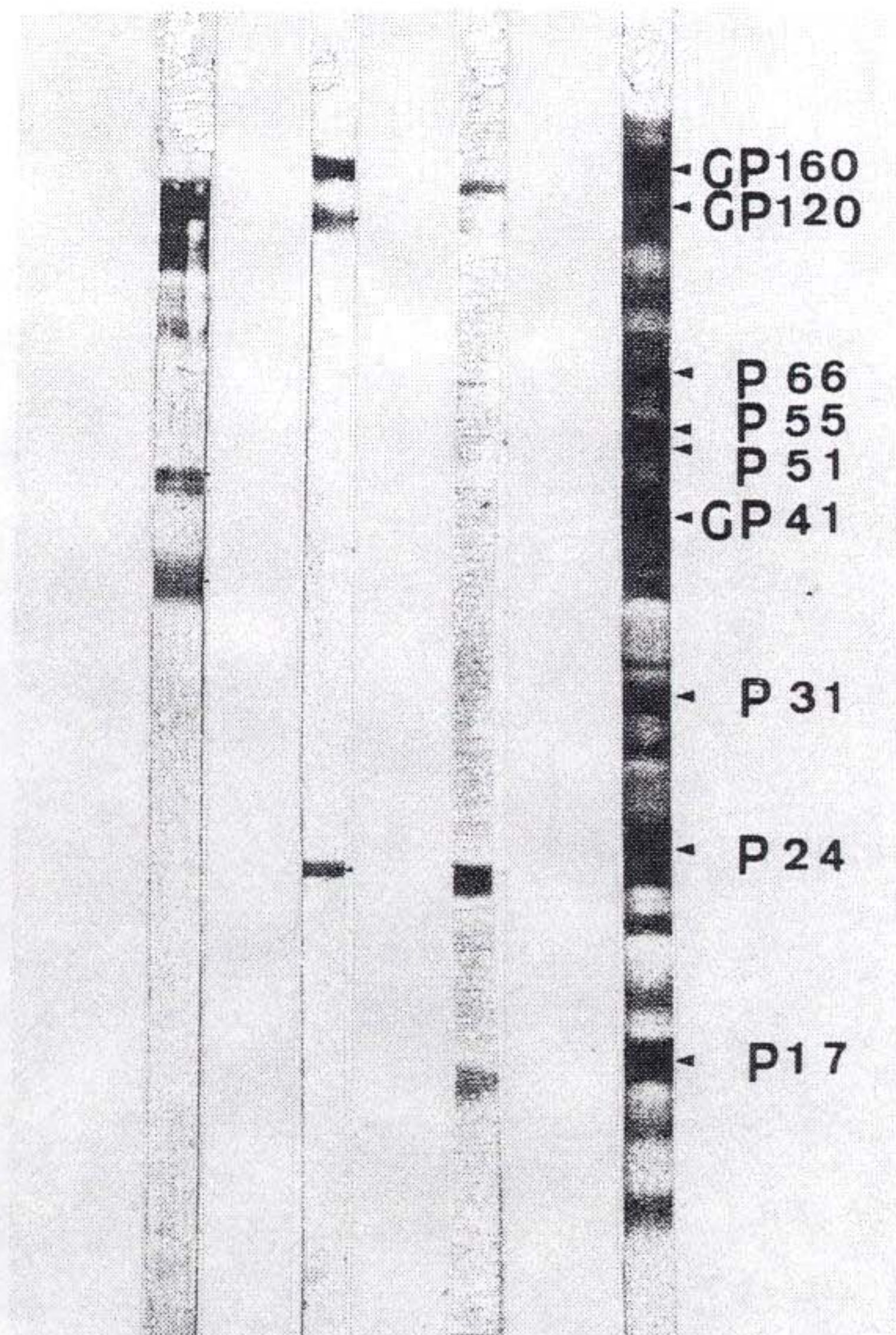


Fig. 1. Western blot profiles of HIV-1 on seroconverted persons. Lane 1, 2, 3 and 4 show for case 1, 3, 5 and positive control, respectively.



Table. 1. Comparison of sensitivities of ID ELISA, CI ELISA, PA for the sera of HIV infected persons and 6 W. H. O. panel

Methods(Pos./Neg.)	Competitive			
	ID ELISA -1	ID ELISA -2	ELISA	PA
Seroconverted persons (n=6)	5/1(83.3)	1/5(16.7)	3/3(50.0)	6/0(100)
Asymtomatic persons	103/0(100)	121/3(97.6)	149/1(99.3)	30/1(96.8)
ARC/AIDS patients (n=7)	7/0(100)	7/0(100)	7/0(100)	7/0(100)
WHO panel (n=6)	6/0(100)	5/1(83.3)	6/0(100)	6/0(100)
Total	121/1(99.2)	134/9(93.7)	165/4(97.6)	49/1(98.0)

Table. 2. Comparison of specificities of 5 commercial reagents using HIV antibodies screening

	ENV – peptide Competitive				
	IDELISA – 1	IDELISA – 2	ELISA	ELISA	PA
No. tested sera	93,988	63,552	337	2484	500
No. reactive sera	147	199	231	107	10
No. confirmed sera (W. B.)	7	4	3	105	7
Specificity (%)	99.85	99.97	31.74	99.92	– *

\* Specificity could not be tested for the lack of sera

Table. 3. The Western blot profiles of 5 seroconverted persons showing negative reactions by commercial ELISA reagents and the duration period of seroconversion after seronegative

Case	Western blot patterns									ELISA1	ELISA2	ELISA3	Duration period (month)
	Gp160	120	41	P66	51	31	P55	24	17				
1	++	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	10
2	++	++	-	-	-	-	-	++	-	+	-	-	18
3	++	++	-	-	-	-	-	++	-	+	-	+	10
4	++	++	+	-	+	-	+	++	+	+	-	-	2
5	+++	+++	-	++	++	-	+	++	+	+	-	+	3

Table. 4. Band patterns of western blot 2 or 3 times on 308 sera positive with ID ELISA but negative with CI ELISA reagents.

Remark	Initial W B patterns	No. follow - upsera	
		(6 or 3 months)	Total
Continued bands	single band : P17/P24/P55	180	
	combination : P24 + 17/P31 + 17/P55 + 17	23	
	band · P 55 + 31/P 55 + 24 + 17 P 31 + 24 + 17	13	216(70.1%)
Partial disapperance of bands	single band : P24 band DL.	20	
	P31 " "	19	
	P55 " "	13	
	P51 " "	1	
	P66 " "	1	
	combination : P 55 + 24/P55 + 31/P 55 + 51 band P55 + 31/P24 + 31 P55 + 31 + 24	10	64(20.8%)
Loss of all band	single band : P17/P24	15	
	combination : P55 + 24/P55 + 17 band P55 + 24 + 17/P55 + 51 + 17	11 2	28(9.1%)

\*DL : deleton



## 제 4 절 고 찰

두종의 I.D.ELISA-1,2 와 P.A., Competitive ELISA 시험에서는 99-85 %, 99-97 %의 높은 특이도를, 합성항원이 부착된 ENV-peptide ELISA 시약은 31.74 %로 특이도에 문제점이 드러났다. 이는 ENV-peptide ELISA의 항원이 우리나라 사람들이 많이 감염되어 있는 E.coli 에서 합성되고, 분리과정시 정제가 덜된 탓으로 여겨지며, 이런 문제점은 국내인의 혈청에서 항체탐지를 위해서는 우리나라에 적합한 진단제 개발이 요구된다.

각 시약의 감도비교시 P.A. 및 I D ELISA-1 법 시약은 98.0%, 99.2%로 높은 감도를, 반면 I.D.ELISA-2 시약은 93.7 %로 감도가 낮아 초기 HIV 감염자 혈청의 항체를 탐지하지 못하는 문제점을 나타냈다. 이는 HIV 감염 초기에 형성된 항체로서 glycoprotein 항체가 형성되거나 또는 AIDS 질병이 진전되어 core, anti-p24 가 소실되는 시기에는<sup>6)</sup> 이를 탐지하지 못할 우려가 있다고 생각된다. 이는 Tribe 등의 보고처럼<sup>7)</sup> ELISA 시약이 주로 HIV gag-coded 항원에 대해서 항체반응을 나타내기 때문이라 사료되며, 향후 시약 제조시에는 glycoprotein 항원 강화가 이루어져야 할 것이다.

낮은 감도의 시약사용으로 인한 위 음성과 항체 미형성 시기 (window period) 에 항체탐지의 문제점<sup>8)</sup> 등이 HIV 진단의 어려움이며, 이 점을 고려할 때 국내에서 헌혈자 screening 시 100 % 감도를 갖는 시약사용이 요구된다. 또한 PCR 같은 항원진단법이 동시에 사용되어야 할 것이다<sup>9)</sup>.

한편 band 의 추이관찰로 미루어 Glycoprotein band 외의 다른 band 관찰은 비특이적 반응으로 간주되며, Western blot 판독시 재해석이 요구된다<sup>10,11</sup>).

I.D.ELISA-1.2 에서 시약 Lot 별로 서로 다른 감도를 나타내며 이는 시약의 대량생산 전 품질관리가 철저히 이루어져야 한다. 또한 시약이 일단 개봉된 후 여러 차례에 걸쳐 실험했을 경우, 시일경과에 따라 낮은 감도를 나타내어 시약의 안정성에도 문제가 있는 것으로 보인다.

## 제 5 절 결 론

HIV 항체 검색용으로 사용되고 있는 시약들의 효능을 평가하고자 2종의 I.D. ELISA 법, ENV-peptide ELISA, C.I. ELISA, P.A. 시약의 감도와 특이도를 상호 비교 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HIV 감염자 혈청 및 WHO Panel에 대한 항체시험 결과, I.D. ELISA-1, P.A., C.I. ELISA, I.D. ELISA-2 시의 감도는 각각 99.2%, 98.0%, 97.6%, 93.7%였으며, HIV 감염자의 임상적 상태에 따른 시약별 감도 비교에서 HIV 감염 초기혈청에 대한 항체시험시 P.A. 시약은 100%로 가장 높은 감도를, I.D.ELISA 시약은 16.7%로 가장 감도가 낮았다.

2. 각 시약들의 HIV 항체 특이도 시험시 I.D.ELISA-1,2, C.I. ELISA 시약이 99.85%, 99.97%, 99.92%로 높은 특이도를 나타낸 반면 ENV-peptide ELISA는 31.35%로 특이도가 낮게 나타났다.

3. HIV seroconversion 된 초기혈청들의 Western blot 양상과 ELISA 시험 결과 비교시, Glycoprotein에 대한 항체만을 나타내거나 gp41과 p31 band가 없을 때는 일차 검색용 ELISA 시약에서 위음성이 관찰되었다. 이는 HIV 감염초기 또는 core 항체가 소실되는 AIDS 질병시기에 위음성이 우려되며, 검색용 시약의 Glycoprotein 항체를 탐지할 수 있는 진단제 개발이 요구된다.

4. HIV 초기감염 혈청의 Western blot 관찰시 p31 band 형성시는 약 2개월, Gp41 과 p31 band 형성은 3개월이 소요되며 gp160/120 p24 band 출현 10개월 후 모든 band가 형성됨으로써, 부분 band 출현 후 최소 3개월 이상이 경과되어야 Western blot에 의해 양성으로 해석될 수 있다고 사료된다.

5. HIV 항체 검색용 시약으로 양성인 혈청을 대상으로 2-3개월 후 follow-up하여 band 추이를 관찰한 결과, band가 지속된 예가 70.1%, 소실된 예가 29.9%로 Glycoprotein을 제외한 pol. gag 부위의 band 반응은 비 특이적으로 나타난 것으로 보인다.

## 제 6절 참 고 문 헌

1. Shin Y. O., Yoon J. D., Lee, H. R. Kang C., and Choi J. H.. 1987 Studies on HTLV—III(AIDS) and related virus infection, The report of NIH republic of Korea, p 536—550
2. Henry L. F., Kabeua M., Kafuama N., Riggins C., Colebunders R., Ryder R., Curran J., Izaley L., and Thomas C. Q.. 1988 comparison of sensitivities and specificities of latex agglutination and an Enzyme—Linked Immunosorbent assay for detection of antibodies to the human immunodeficiency virus in african sera, J. Clinical Microbiology vol. 126, No. 11 p2462—2464
3. James R.C., Yee J. Steven H.H., Martin L.B., Murray, B.G., and Niels C.P.. 1987 Comparison of indirect immunofluorescence and western blot for detection of anti—human immunodeficiency virus antibodies, J. Clinical Microbiology, vol. 125, No.3 p494—497
4. The Lancet editorial.. 1986 Sensitivity of western blotting (compared with ELISA and Immunofluorescence) during seroconversion after HTLV—III infection, p1151—1152
5. Paul D. C., Edward L.W., Julian B. S. and Roger U. D.. 1989 Exposure of patients to HIV through the transfusion of blood components that test antibody—negative. The new England Journal of medicine, vol.321, No. 14
6. Thomas M.M., Daniel P., Michael D. B., John F. K., Raphael B. S., Harry H. 1988 Relation of circulating levels of HIV antigen, antibody to p24, and HIV—containing immune complex HIV—infected patients, The J. of infec.

- diseases, vol. 158, No. 5 p1088–1091
7. Tribe D. E., Reed D. L., Lindell P., Kenedly W. R., Ferguson B. Q., Cybulski R., Winslow D., Waselefski D. M., and Petteway S. R. JR. 1988 Antibodies reactive with HIV gag-coded antigens (gag reactive only) are a major cause of enzyme-linked immunosorbent assay reactivity in a blood donor population, *The J. of Infect. Diseases*, vol. 26, No. 4 p641–647
  8. The Lancet editorial. 1988 Transmission of HIV by blood from seronegative donors. *The Lancet*, p1248–1249
  9. Young Karen K.Y., James B.P., and Robert E.W. 1990 Detection of HIV DNA in peripheral blood by the polymerase chain reaction : a study of clinical applicability and performance, *AIDS* 4 p389–391
  10. Stephen L.J., Norman S.S., Michael T.R., and William J.H. JR., 1989 Investigation of atypical western blot (immunoblot) reactivity involving core proteins of human immunodeficiency virus type-1, *J. of Clinical Microbiology*, vol 27, No. 5 p932–937
  11. Zolla-Pazner S., Mirosław K.G., William J.H., Abraham P. 1989 Reinterpretation of human immunodeficiency virus western blot patterns, *The New England Journal of Medicine*, vol. 320, No. 19 p1280–1281

여 백

제 Ⅲ 장 핵산을 이용한 HIV 진단방법의 개선

Establishment of diagnostic methods  
for HIV using nucleic acid

白承福  
金聖眞  
康 椿

金泰奎  
金聖俊  
池桂淑



여 백

## 1. PCR에 의한 HIV-1, HIV-2의 진단에 관한 연구

### 제 1 절 서 설

인형면역결핍바이러스 (Human Immunodeficiency Virus : HIV)에 감염된 사람의 진단은 주로 HIV에 대한 항체나 바이러스 항원의 측정 혹은 직접 바이러스를 분리함으로써 이루어져 왔으며 또한 지난 수년동안 HIV에 대한 유전적 정보를 얻기 위하여 분자생물학적 시도가 널리 이루어져 왔다. 그러나 항체양성자에게 감염된 세포의 수가 매우 적기 때문에 Southern blot과 같은 종래의 방법으로는 HIV 유전자의 동정과 특성 규명에 이용되기에 민감도가 낮아 문제가 있었다<sup>3,11)</sup> 최근 polymerase chain reaction(PCR)이 개발되어 HIV 분리배양에서 HIV proviral DNA를 감지하는데 처음 응용되기 시작하여, 이어서 감염자의 말초혈액임파구에서 직접 HIV proviral DNA를 감지할 수 있게 되었으며, 또한 역전사효소를 이용한 PCR을 함으로써 혈액내에 분리되어 존재하는 바이러스의 RNA도 감지할 수 있게 되었다<sup>4,6,7,8,9,10,14)</sup>. 현재 PCR은 HIV DNA를 증폭하는 중요한 분자생물학적 수단으로서 진단과 아울러 여러가지 바이러스의 특성 규명에 널리 이용되고 있다. 실제 PCR은 숙련된 실험 방법과 아직은 고가의 재료 및 설비 등이 필요하므로 일반

적으로 사용되기에는 난점이 있다. 그러므로 PCR은 HIV감염의 직접적인 진단보다는 혈청학적 진단의 보완 내지는 보조 수단으로 HIV-1과 HIV-2의 구분, 감염자에서 HIV의 혼합감염 내지 변이형의 발생에 대한 연구, 모체 감염이 예상되는 신생아나 감염 위험군에서 항체 생성이전에 감염여부 진단, 혈청학적 진단 결과가 명확치 않는 경우 등에 적절히 활용될 수 있다 (5,8,12,13,15,16).

국내 HIV감염의 역학적 특성상 대부분 외국의 여러나라에서 감염되어 국내로 유입된 경우가 많으므로 전형적인 후천성면역결핍증의 원인체로 규명된 HIV-1과 임상적 예후가 다를 것으로 추정되는 HIV-2 등 여러 바이러스 변이형이 존재할 것으로 생각되나 이에 대한 분자생물학적 연구가 이루어져 있지 않다 (1,2). 본 연구에서는 HIV-1과 HIV-2의 gag 유전자를 모두 증폭시킬 수 있는 SK100과 SK104 primers와 HIV-1에 특이한 SK19 probe, HIV-2에 특이한 SK109 probe를 합성하고 한국인 HIV 항체양성자의 말초혈액에서 분리한 DNA에 대해 이중 PCR을 시행하여 민감도를 증가시키고 Digoxigenin 표지 probe를 이용하여 HIV-1과 HIV-2 감염 여부를 조사하였다.

## 제 2 절 실험재료 및 방법

### 1. 검사대상

HIV 혈청학적 검사 (ELISA, IFA, Western blot) 결과 HIV 항체

양성자로 판정된 45명에서 헤파린으로 처리된 전혈을 채혈하여 일부는 직접 DNA 분리에 사용하고, 나머지는 Ficoll-Hypaque를 이용하여 임파구를 분리한 후 DNA를 분리하였다.

## 2. 말초혈액에서 DNA 분리

### 1) Whole blood에서 lymphocyte DNA의 준비

Peripheral blood mononuclear cell(PBMC-Lymphocyte, macrophage 등 포함)를 혈액에서 분리하기 위해 Ficoll-plaque method를 이용하였다.

Anticoagulant인 EDTA로 처리된 혈액 1ml을 Ficoll-plaque solution(10 mM, Tris-HCl(pH 8.0), 50mM EDTA, 0.14mM Ficoll 400, 0.15M Sodium diatrizoate) 1ml 위에 혼합되지 않도록 하면서 조심스럽게 엷은 후, 2500rpm(Dynad II, table top centrifuge)에서 15분간 원심분리한다. 원심관 밑에 가라앉아 있는 RBC 층이 따라 올라오지 않도록 하면서 Ficoll solution과 상층의 경계면에 층을 이루고 있는 lymphocyte 층을 따내서 새로운 시험관으로 옮긴다. 분리해낸 lymphocyte 층에 3ml의 balanced saltion(0.09%, glucose, 0.045ml CaCl<sub>2</sub>, 0.9mM MgCl<sub>2</sub>, 0.45mM KCl, 130 mM Tris-HCl (pH 7.6), 14mM NaCl)을 첨가하여 혼합시켜 세척한 후에 2200rpm에서 5분간 원심분리하여 lymphocyte cell을 침전시키고 상층액을 버린다. 다음, lysis buffer 100ul에 녹인다 (SDS-based lysis buffer: 10mM Tris-HCl(pH 8.0), 1mM EDTA, 0.001% Triton X-100, 0.001% SDS 또

는 NP-40-based lysis buffer: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/ml gelatin, 0.45 % NP-40, 0.45 % Tween 20).

Lysis buffer 에 녹인 cell 용액을 eppendorf tube 로 옮긴 후, Proteinase K 를 200-300  $\mu$ g 더한 후, 55 °C (또는 60 °C) 에서 1 시간 반응시킨 다음 boiling water bath 에서 15 분간 끓인 뒤에 -20 C 에서 보관하였다.

## 2) High molecular weight DNA 의 준비

.위에서 lysis 시킨 혈액시료를 그대로 PCR 에 사용하였으나 경우에 따라 DNA 만을 분리하여 사용하기도 하였다. 먼저 분리된 lymphocyte 나 eukaryotic cell 을 SDS-based lysis buffer 에 녹여 proteinase K 를 처리한 후, 동량의 phenol:chloroform:iso-amylalcohol(25:24:1)로 2 번 추출한 후 1/10 부피의 3M sodium acetate 를 더하고 alcohol precipitation 을 하여 DNA 만을 분리하였고 template-dissolving buffer(10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA) 에 녹여서 사용하였다.

한편, DNA 시료 준비과정의 오염여부를 검사하기 위하여 상업적으로 판매하고 있는 mini-column 을 구입하여 (A.S.A.P genomic DNA isolation kit: Boehringer Mannheim) DNA 를 추출하였는데 Ficoll-solution 을 이용하여 분리한 WBC fraction 에 Solution I (lysis buffer) 을 처리하고 Rnase 와 proteinase K 를 처리한 후, A.S. A. P genomic DNA isolation column 을 통과시켜 elution buffer 로 DNA 를 뽑아낸 후, ethanol precipitation 하여 분리하였다.

양성대조로는 HIV-1 full length DNA 가 삽입된 recombinant plasmid DNA pNL432 를 일본 NIH로부터 제공받아 사용하였다.

### 3. Primer 및 oligoprobe 합성

HIV의 gag(p24) 유전자 부위에 위치하며 HIV-1 과 HIV-2를 동시에 증폭시킬 수 있는 SK100, SK104 primer와 HIV-1 과 HIV-2에 각각 특이한 SK19, SK109 oligoprobe를 DNA 합성기 (Cyclone Plus, Milligen/Biosearch, U.S.A.)로 합성하고, 또한 분리된 유전자의 확인 검증을 위한 HLA-DQ beta 유전자부위에 대한 primer도 합성하였다. 합성된 DNA는 NH<sub>4</sub>OH로 추출하고 Speedvac(Savant U.S.A.)로 증발시키고 농축한 후 증류수에 녹이고 phenol/chloroform 과 ethanol로 침전시켜 분리하였다. 합성된 DNA의 농도는 260nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다. SK38 primer는 일본 NIH에서 합성한 것을 제공받아 사용하였다. 합성된 DNA의 염기서열은 표 1과 같다.

### 4. DNA 증폭 ( Polymerase Chain Reaction )

PCR을 위한 반응은 최종농도가 10mM Tris-HCl(pH 8.3), 50mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin, 200 uM 각 dNTPs, 10ng 각 primers, 0.5U Taq DNA polymerase인 반응액 18ul을 0.5ml tube에 넣은 후 mineral oil을 떨어뜨리고 template DNA를 2ul 최종 첨가하여 시행하였다. 증폭반응은 Thermal cycler(Ericomp, U.S.A.)

를 이용하여 denaturation 은 94°C에서 20 초, anealing 은 72°C에서 30 초, extension 은 72°C에서 30 초로 35 회 반복하고 최종 72°C에서 5 분간 반응시켰다. 이차증폭은 일차증폭 DNA 를 template DNA 로하여 동일한 primer 로 상기한 조건으로 반복 시행하였다.

## 5. 전기영동

증폭산물 8ul 와 2ul 의 stop mixture(5M Urea, 10% Glycerol, 0.5% SDS, 0.025% Xylene Cyanol, 0.025% Bromphenol Blue)를 혼합 후 1.5% agarose gel (medium EEO) 상에서 minigel 전기영동장치 (Bethesda Research Lab., U.S.A.) 를 사용하여 TBE buffer 로 100V 에서 40 분간 전기영동한 후 1% ethidium bromide 로 염색하여 증폭된 DNA 를 관찰하였다. 크기는 DNA molecular weight marker V (pBR 322 DNA/Hea III, Boehringer Mannheim, Germany) 를 사용하여 측정하였다.

## 6. Digoxigenin 표지 probe 의 합성

### 1) 3' 말단부위 표지법

SK19 와 SK109 oligoprobe 의 합성은 10ul potassium cacodylate/Tris buffer( $\times 5$ ), 20ul  $\text{CoCl}_2$  (5mM), 3.5ul dATP/Tris buffer (2.5mM), 1ul Digoxigenin-dUTP (1mM, Boehringer Mannheim, Germany) 100pM oligonucleotide, 1ul Terminal transferase (50U/ul, Boehringer Mannheim, Germany) 를 순서대로 혼합하여 37°C 에서 15 분 반응



시킨 후 4°C로 냉각하고 EDTA를 첨가해 반응을 중지시킴으로써 Digoxigenin을 oligoprobe의 3' 말단부위에 표지하였다.

## 2) PCR에 의한 probe의 합성

SK38/SK104와 SK100/SK104 primer을 이용한 Digoxigenin 표지는 최종농도 100µM dGTP/dATP/dCTP, 65µM dTTP, 0.35mM Digoxigenin-dUTP, 50ng each primers/assay, 0.5 U Taq DNA polymerase/assay, 0.01% gelatin, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH 8.3)의 조건으로 PCR를 시행하여 합성하였다.

## 7. Dot blot hybridization

증폭된 DNA를 TE buffer로 5배 희석하여 nylon membrane (Hoefler, U.S.A.)에 2µl씩 점적하고 80°C에서 1시간 preincubation하였다. SK38/SK104, SK100/SK104 probe는 95°C에서 5분간 변성시킨 후 hybridization solution으로 200배 희석하여 68°C에서 하루밤 반응시켰다. 0.1% SDS를 포함한 2×SSC로 세척하고 0.1% SDS의 0.1×SSC로 68°C에서 15분간 2회 세척한 후 1% blocking reagent를 포함한 0.15M NaCl, 0.1M Tris-HCl (pH 7.5)으로 blocking하였다. 이후 Alkaline phosphatase conjugated anti-digoxigenin antibody(Boehringer Mannheim, Germany)로 반응시키고 nitroblue tetrazolium salt, 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate에 의해 발색시켜 관찰하였다.

SK19와 SK109 oligoprobe는 50°C에서 hybridization하고 60°C에서 세척하였으며 나머지 과정은 동일하게 시행하였다.

Table 1. Oligonucleotide primers & probes

Primer or probe	Sequences (5'→3')
SK100	ATCAAGCAGCCATGCAAAT (19mer)
SK38	ATAATCCACCTATCCCAGTACCACAAAT (28mer)
SK104	CCTTTGGTCCTTGTCTTATGTC (22mer)
SK19	ATCCTGGGATTAAATAAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTCC (41mer)
SK109	AGATAGGATTGCAGAAGTGTGTCAGGATGTACAACCGACC (40mer)
DQb/R	CTGGTAGTTGTGTGTCTGCACAC (23mer)
DQb/L	CATGTGCTACTTCACCACGG (21mer)

## 제 3 절 실험 결과

### 1. PCR반응의 적정 조건 확립

PCR 반응의 적정 조건을 확립하기 위하여 우선적으로 합성한 SK 100, SK104 primer 의 농도를 조사한 바에 의하면 각 50ng/20ul reaction mixture가 가장 비특이 반응이 적으면서 강한 양성반응을 나타내었으며 dNTP 의 농도를 200 uM 로 사용시  $MgCl_2$  의 농도는 2mM 이 적합하였다. 일반적으로 PCR 을 tube 당 100ul 로 시행하고 있으나 tube 당 반응량은 10ul 까지 축소하여 실시하여도 반응 결과에 영향을 주지 않았으므로 시행상의 오차와 관찰에 필요한 양을 고려해 20ul 로 정하였다. 반응 온도는 denaturation 94 °C, anealing 55 °C, extension 72 °C 로 하고 반응시간은 각 1 분, 2 분, 3 분으로 하는 long cycle 과 각 20 초, 20 초, 30 초로 하는 short cycle 을 비교한 바 유의한 차이를 보이지 않으므로 신속하게 결과를 판정하기 위하여 short cycle 을 선택하여 PCR 을 시행하였다. ( 그림 1 )



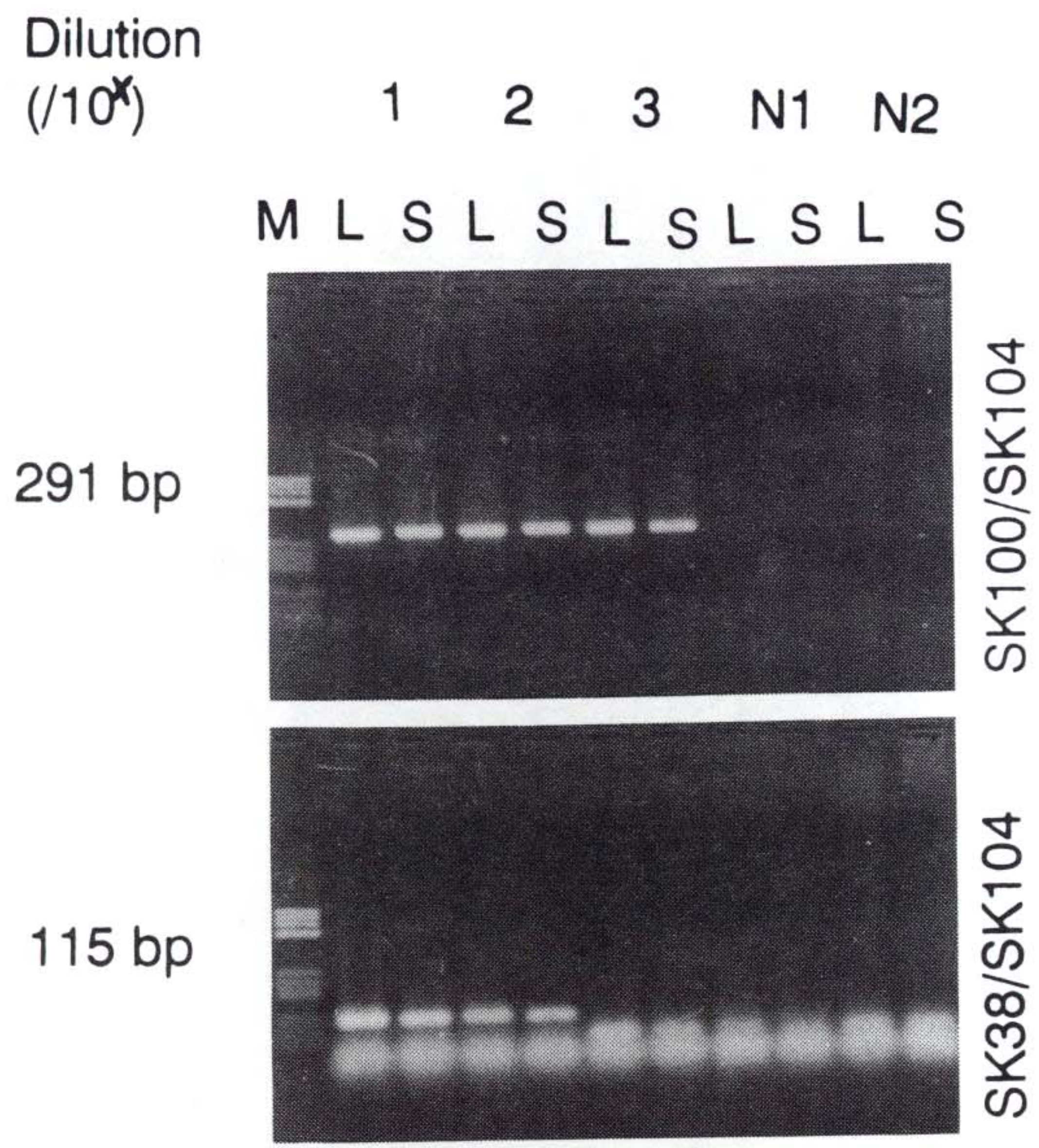


Fig. 1. Comparison between Short and Long Amplification Cycle



## 2. HLA-DQ beta primers 에 의한 human template DNA 존재 확인

말초혈액에서 분리된 DNA 에서 PCR 을 시행하여 HIV 의 존재를 조사하는 것은 provirus 상태로 사람의 유전자에 삽입된 바이러스 유전자를 증폭하는 것이므로 사람의 유전자에 공통적으로 존재하는 유전자 부위에 대한 primers 를 동일한 시료에서 동시에 증폭함으로써 말기 AIDS 환자에서 나타나는 말초혈액세포수의 격심한 감소로 인한 template DNA 의 양적 부족이나 혹은 부적절한 처리에 의한 반응억제물질 포함 등으로 나타날 수 있는 위음성 (false negative) 결과를 찾아내어 판독할 수 있다. 본 연구에서는 45 명의 HIV 항체 양성자 중 HIV 에 대한 PCR 결과 음성으로 나타난 2 명과 양성으로 나타난 17 명의 검체에 대하여 HLA-DQ beta primers 를 사용하여 PCR 을 시행한 결과 HIV 에 대한 PCR 음성인 2 명만이 음성으로 나타나 template DNA 의 양적 부족이나 혹은 부적절한 처리에 의한 위음성 (false negative) 임을 확인할 수 있었다 ( 그림 2, 표 3 ).

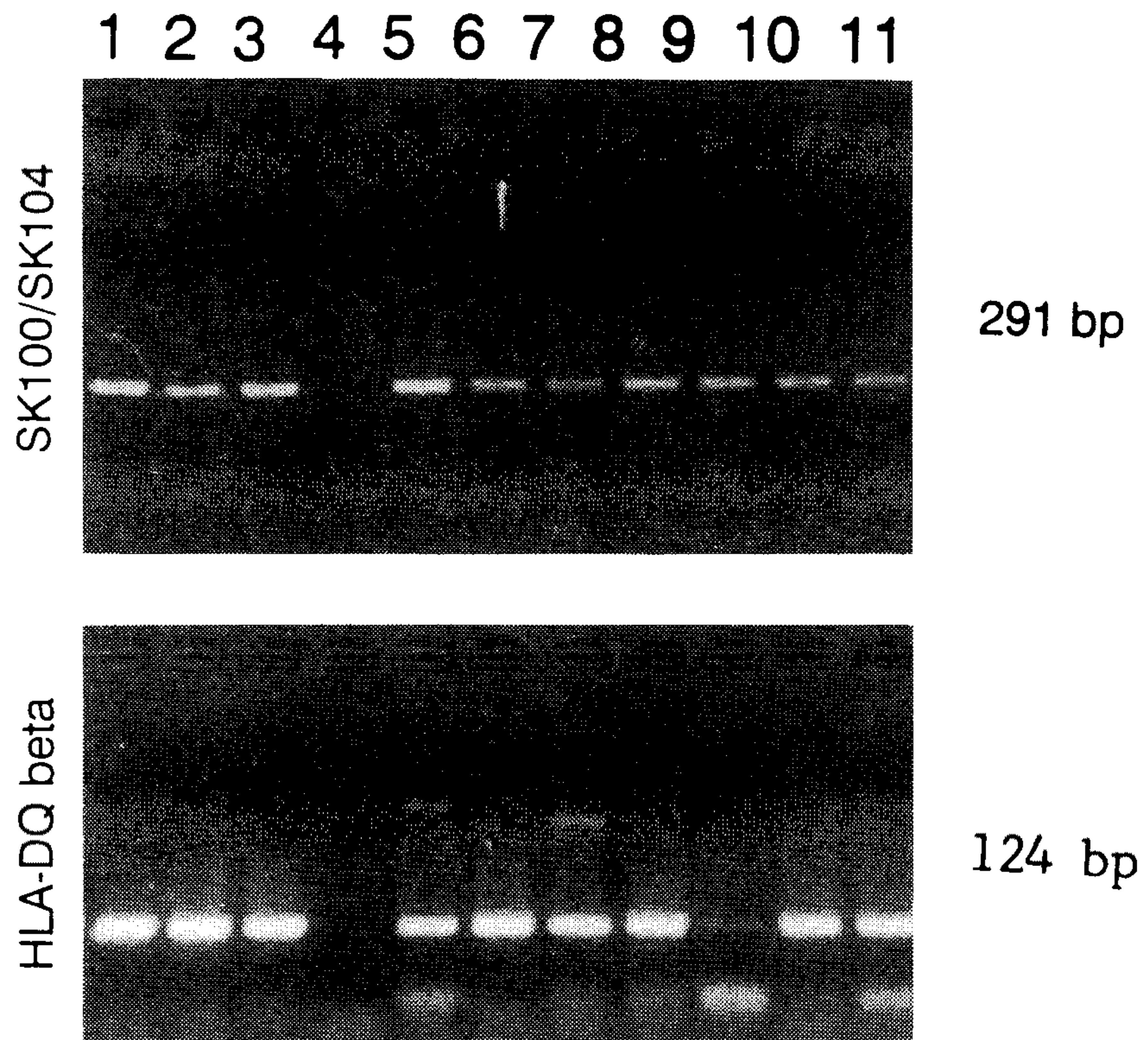


Fig. 2. Evaluation of the DNA Recovered for Amplification by HLA-DQ beta Primers

### 3. 이차증폭 및 hybridization에 의한 민감도의 증가

PCR 법이 바이러스의 유전자를 직접 감지하는 방법으로는 현재 개발된 방법 중 가장 예민한 검사법이지만 인체내에 HIV가 극미량으로 존재하는 경우나 말초혈액등에서 분리된 template DNA 량이 소량인 경우 증폭된 HIV 유전자가 증폭되어도 1ng 이하인 경우 일반적으로 사용하는 ethidium bromide 염색에는 나타나지 않게 된다. 그러므로 민감도와 동시에 특이도를 더욱 증가시키기 위하여 대부분 hybridization 법을 동반하여 사용하고 있으나 hybridization 법은 방법상 복잡한 조작을 반복하는 단점이 있다. 본 연구에서는 일차증폭된 DNA에 대해 이차증폭을 시행하여 민감도를 더욱 증가시키고자 양성대조인 pNL432 plasmid DNA를 대상으로 10배 단계 희석하여 일차 및 이차 증폭하여 ethidium bromide 염색과 SK 19, SK109, SK38/SK104 그리고 SK100/SK104 probe로 hybridization 하여 비교 관찰한 바 일차증폭은 2fg, 일차증폭 DNA의 hybridization과 이차증폭은 200ag까지 감지할 수 있었으며 이차증폭 DNA의 hybridization 시에는 2ag 이상 감지할 수 있었다(그림 3, 표 2).



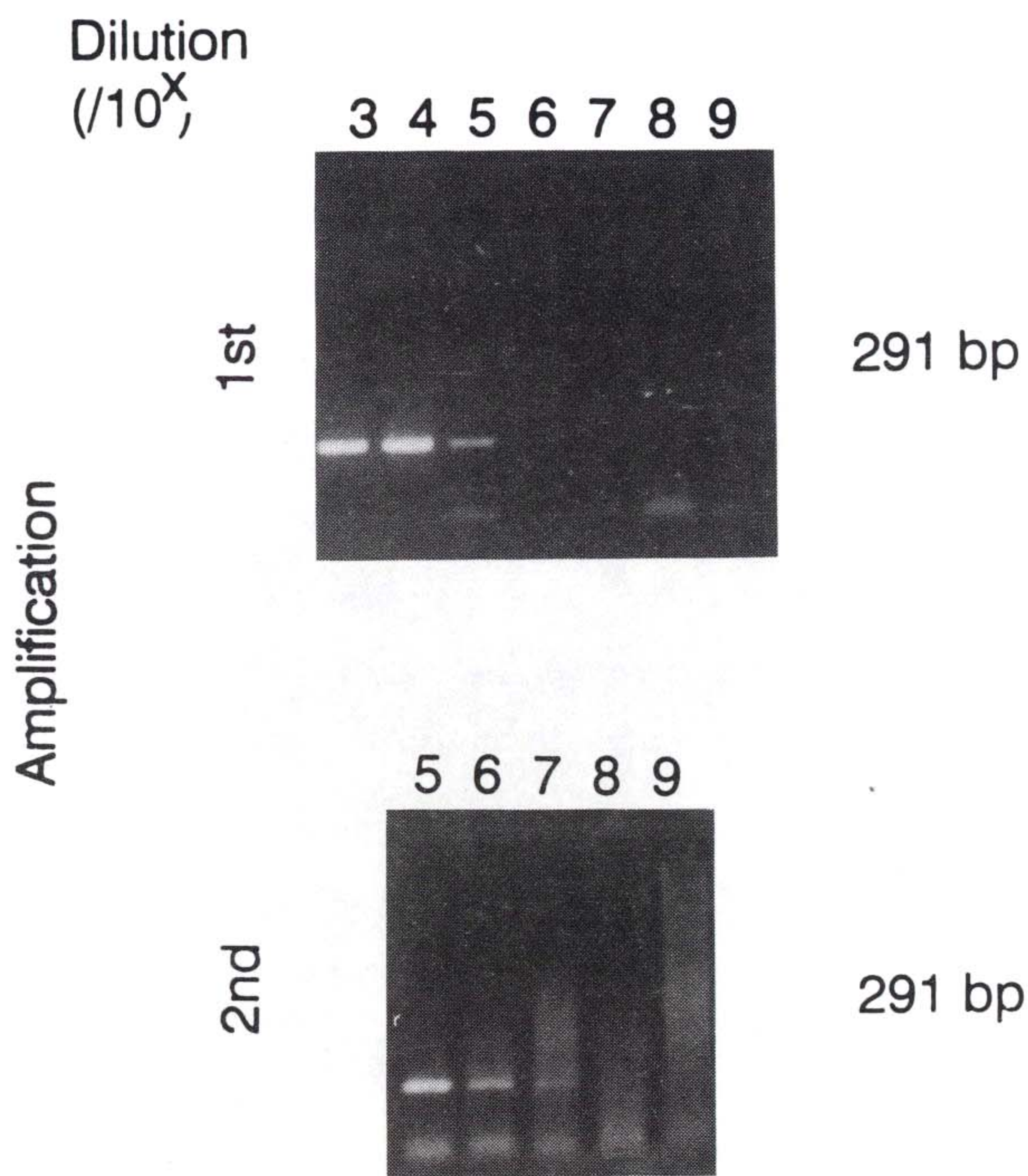


Fig. 3. Enhancement of Sensitivity by 2nd Amplification

Table 2. Enhancement of Sensitivity to Diluted Template DNA (pNL 432) by  
Second Amplification and Dot Blot Hybridization

Dilution of sample(/10 <sup>x</sup> )	3	4	5	6	7	8	9
Concentration(/20ul/tube)	2000	200	20	2fg	200	20	2ag
1st amplification	+++	+++	+	W+	—	—	—
Dot Blot ; SK19	+++	+++	+++	++	++	—	—
SK109	—	—	—	—	—	—	—
SK38/SK39	+++	+++	+++	+++	+	—	—
SK100/SK104	+++	+++	+++	+++	+	—	—
2nd amplification	ND	ND	+++	+++	+	—	—
Dot Blot ; SK19	ND	ND	+++	+++	+++	+++	++
SK109	ND	ND	—	—	—	—	—
SK38/SK39	ND	ND	+++	+++	+++	++	+
SK100/SK104	ND	ND	+++	+++	+++	++	+

#### 4. HIV 항체양성자의 말초혈액 DNA에 대한 PCR 결과

HIV 항체양성자 45명 중 19명의 말초혈액 DNA는 임파구를 분리하여 phenol/chloroform 추출과 ethanol 침전으로 분리하여 사용하였으며 26명은 헤파린이 처리된 전혈에서 적혈구를 용해시키고 proteinase K를 처리하여 PCR에 사용하였다.

SK100/SK104 primers와 SK38/SK104 primers를 이용한 1차 증폭 결과 임파구를 분리하여 추출한 DNA 검체 19명중 17명이 강양성, 1명이 약양성, 1명이 음성으로 나타났는데 음성인 1명은 HLA-DQ beta primers로 조사한 결과 음성으로 나타나므로 DNA 추출을 다시 하여야 할 것으로 사료된다 (그림 4, 표 3).



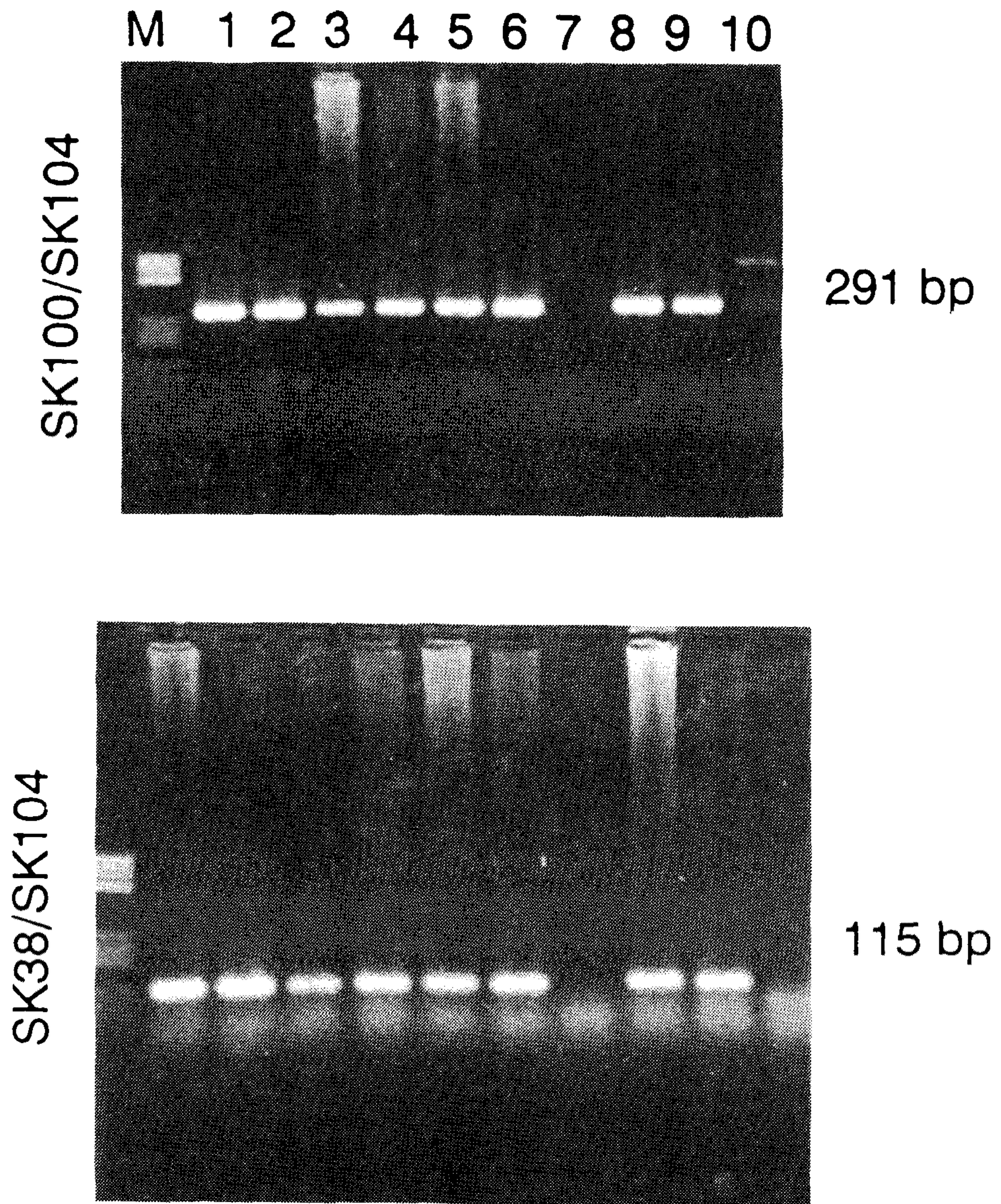


Fig. 4. The First Amplification of the DNA Recovered from HIV-seropositive Persons

Table 3. Results of PCR and Dot Hybridization to DNA Extracted from Lymphocytes of HIV – seropositive Persons

No	SK100/SK104		SK38/SK39		HLA DQ		SK100/SK104		SK38/SK104	
	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	SK 19	SK109	SK 19	SK109
01	+++		+++							
02	+++		+++							
03	+++		+++							
04	+++		+++		+	+++	+++	W+		
05	+++		+++		++	+++	+++	W+		
06	+++		+++		++	+++	+++			
07	-	-	-	-	-	-	-			
08	+++		+++		-	+++	+++			
09	+++		+++							
10	W+	++	W+	-						
11	+++		+++		+	+++	+++			
12	+++	+++	W+	-	+	+++	+++			
13	+++		+++		+	+++	+++			
14	+++		+++		-	+	+++			
15	+++		+++							
16	+++		+++							
17	+++		+++		+	+++	+++			
18	+++		+++							
19	+++		+++		+	+++	+++			



전혈에서 직접 추출한 26 명의 DNA 에 대한 1 차 증폭에서는 SK100 / S K 104 primers 를 사용한 경우 6 명, SK38/SK104 primers 의 경우 5 명에서만 양성으로 나타났다. 이들 26 명에 대해 동일한 primers 로 이차증폭을 25 명에서 양성반응을 보였으며 1 명이 음성으로 나타났는데 음성인 1 명은 HLA-DQ beta primers 로 조사한 결과 음성으로 나타나므로 DNA 추출을 다시 하여야 할 것으로 사료된다 ( 그림 5 , 표 4 ).

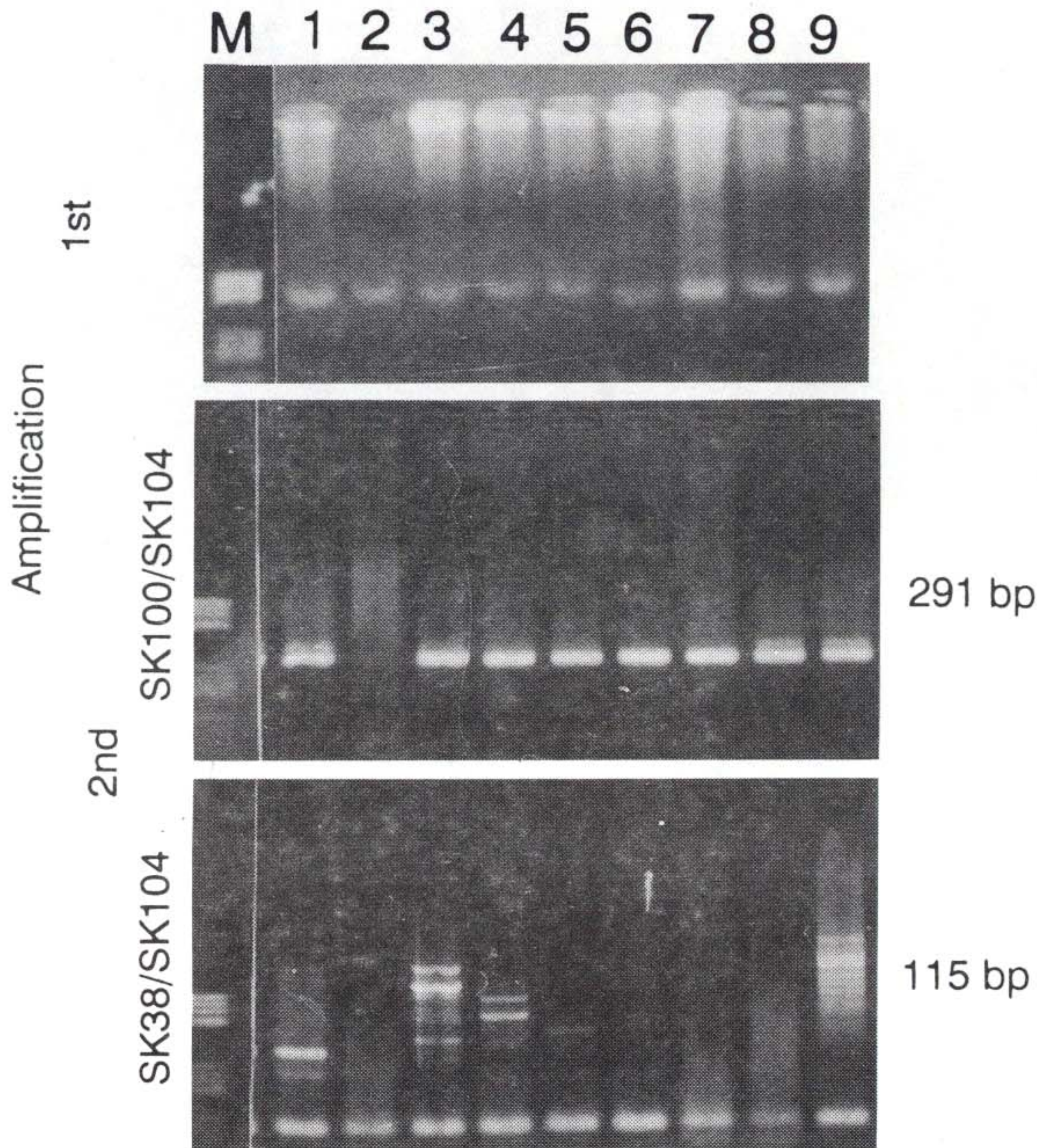


Fig. 5. The Second Amplification of the First Amplified DNA from HIV-seropositive Persons



Table 4. Results of PCR and Dot Hybridization to DNA Extracted from Whole Blood of HIV – seropositive Persons

No	SK100/SK104		SK38/SK39		HLA DQ		SK100/SK104		SK38/SK104	
	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	SK 19	SK109	SK 19	SK109
20	++	++	W+	++	++	+++	++	—	++	—
21	++	++	W+	W+			+++	—	+++	—
22	++		++							
23	W+	++	+	+			+++	—	++	W+
24	—	W+	+	++			++	—	++	—
25	—	++	—	—			+++	—	+++	—
26	—	+	—	++			+++	—	++	W+
27	—	+	—	++			+++	—	++	W+
28	—	++	—	++			+++	—	++	—
29	—	+	—	+++			+++	—	++	W+
30	—	+++	—	+++			+++	W+	++	W+
31	—	W+	—	++			+++	—	++	—
32	—	+++	—	+++			+++	—	++	—
33	—	+++	—	+++			+++	—	++	—
34	—	+++	—	+++			+++	—	++	—
35	—	+++	—	+++			+++	—	++	—
36	—	+++	—	++			+++	W+	++	W+
37	—	+++	—	++			+++	—	+++	—
38	—	+++	—	+++			+++	—	+++	—
39	W+	+++	—	+	+	+++	+++	—	+++	—



No	SK100/SK104		SK38/SK39		HLA DQ		SK100/SK104		SK38/SK104	
	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	SK 19	SK109	SK 19	SK109
40	-	-	-	+++	-	+	++	-	+++	-
41	W+	+++	-	+	W+	+++	+++	-	++	-
42	-	+++	-	-	++	+++	+++	-	+	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	+	-	-	W+	+++	+++	-	+	-
45	-	++	-	-	++	+++	+++	-	++	-

**5. Dot blot hybridization에 의한 HIV-1 및 HIV-2 동정**

HIV-1에 특이한 SK19 probe로 각 primer 쌍으로 증폭된 DNA 중 37명에 대해 dot blot hybridization한 결과 DNA 추출에 문 문제가 있는 2명을 제외한 35명 모두에서 양성반응을 보였는데 이 중 5명은 PCR에서 각 primer 쌍 중 하나가 음성으로 나온 것이었다.

HIV-2에 특이한 SK109 probe의 반응은 SK100/SK104 증폭 DNA 중에서 4명, SK38/SK104 증폭 DNA 중에서 7명에서 약양성을 보이고 나머지는 음성이었다 (그림 6, 표 3, 표 4).



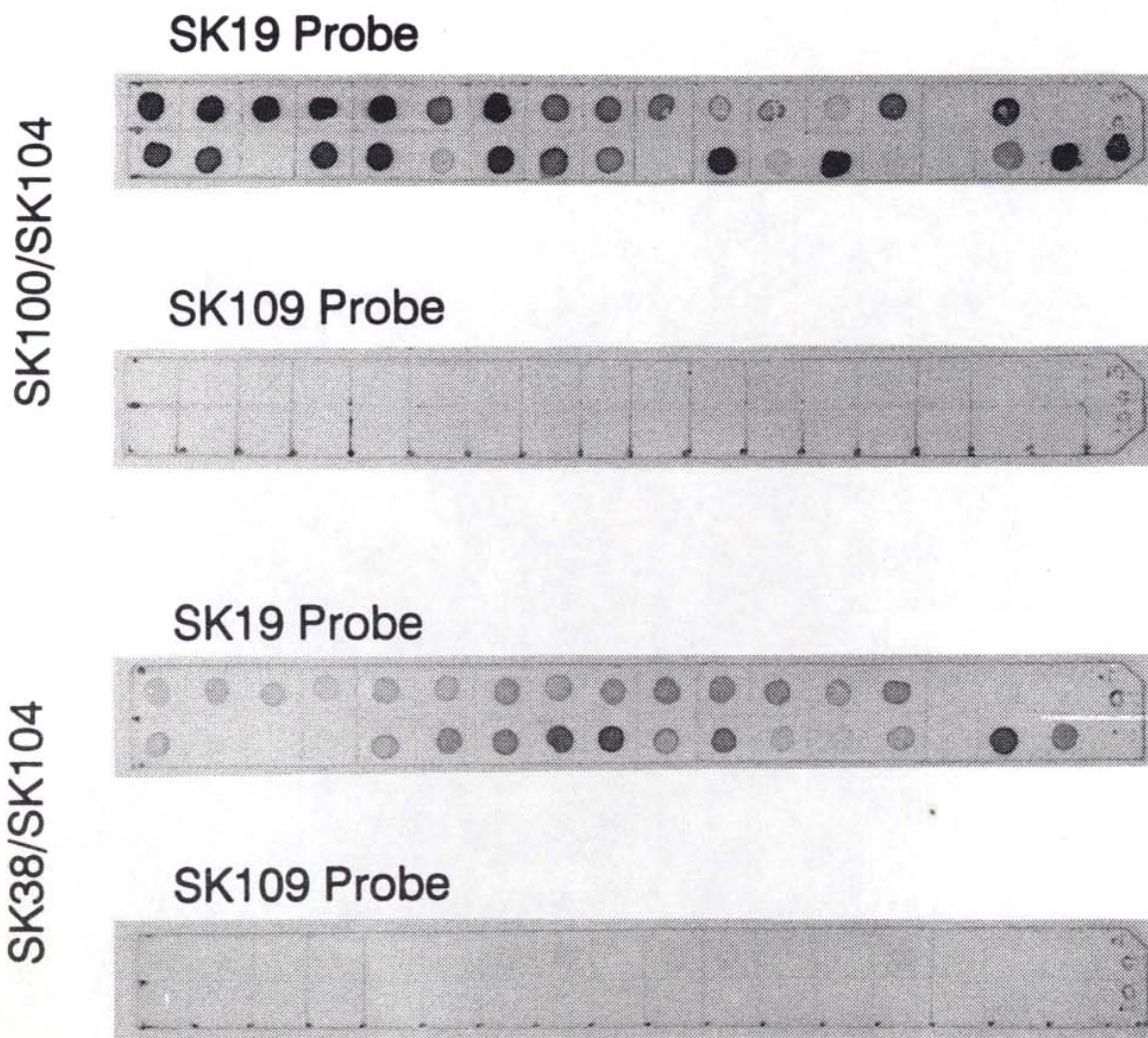


Fig. 6. Dot Blot on the Second Amplified DNA with SK19 and SK109 Probes



## 제 4 절 고 찰

바이러스학적으로 HIV 감염자를 진단하는 혈청학적 검사는 현재 감염보다는 과거 감염을 의미한다. 특히 항체양성자의 모체에서 태어난 신생아는 태반을 통해 전달된 모체의 항체를 생후 6-15 개월동안 가지고 있으므로 혈청학적 검사는 감염을 진단할 수 없다. HIV 감염 신생아의 조기 진단은 감염초기에 적절한 치료가 도움이 될 수 있기 때문에 중요하다. 그러므로 현재 감염을 진단하기 위해 바이러스의 배양 혹은 바이러스 항원 감지법이 필요하다. 그러나 바이러스 배양은 적어도 3~4 주가 소요되며 바이러스가 감염자에서 일정하게 분리될 수 없기 때문에 민감도가 떨어진다<sup>2)</sup> 단세포균항체등을 이용한 HIV 항원감지법등이 개발되어 있으나 대부분의 임상가검물내에 HIV 항원은 기존의 바이러스 특이항체와 결합된 항원항체 복합체로 존재하므로 항원감지가 어려우나 감염초기 즉 항체가 생성되기 이전 수개월 간에는 항원이 감지될 수 있으며 말기 후천성면역결핍증 환자들에서는 항원의 과다 생성으로 감지될 수 있는 항원들이 나타난다. 그러므로 항원감지법의 진단상의 의의는 제한적이다.

PCR 법은 이러한 바이러스배양과 항원감지법의 단점을 해결하고 HIV 의 감지와 유전자 특성규명에 이용되고 있는 방법이다. PCR 으로 감염자의 혈액내 HIV DNA 를 감지하는 일반적 과정은 Fico-11-hypaque 를 이용하여 말초혈액단핵구를 분리하고 DNA 를 추출한 후 primers 를 이용하여 HIV 유전자를 증폭하고 hybridization 법으로 증폭된 DNA 를 감지하는 것이다. 또한 바이러스 RNA 는 역

전사효소에 의해 DNA로 전환시킨후 PCR법으로 증폭하여 감지할 수 있다<sup>4,6,9)</sup> 이러한 과정을 통해 2~3일 이내에 진단이 가능한 PCR법은 임상적으로 신생아에서 HIV 감염을 진단하는데 응용되고 있는데 PCR법에 의한 양성율은 임신중 신생아의 HIV 감염 위험이 30-40%인 보고와 일치한다고 한다<sup>8)</sup>.

HIV-1와 HIV-2는 매우 유사한 염기서열을 가지고 있으며 혈청학적 교차반응을 나타내고 있으므로 혈청학적으로 확인하기에 어려운 점이 있다. 그러나 HIV-1과 HIV-2를 구분하기 위하여 각각의 독특한 염기서열에 특이한 primer와 probe를 이용하여 성공적으로 진단할 수 있게 되었다<sup>12,16)</sup> 본 연구에서는 HIV-1과 HIV-2의 gag 유전자를 모두 증폭시킬 수 있는 SK100와 SK104 primers와 HIV-1에 특이한 SK19 probe, HIV-2에 특이한 SK109 probe를 합성하여 한국인 HIV 항체양성자의 말초혈액에서 분리한 DNA에 대해 이중 PCR을 시행함으로써 민감도를 증가시키고 Digoxigenin 표지 probe를 이용하여 HIV-1과 HIV-2 감염 여부를 조사하였다.

PCR 반응의 적정 조건 확립하기 위하여 우선적으로 합성한 SK100, SK104 primer의 농도를 조사한 바에 의하면 각 50ng/20ul reaction mixture가 가장 비특이 반응이 적으면서 강한 양성반응을 나타내었으며 dNTP의 농도를 200uM로 사용시 MgCl<sub>2</sub>의 농도는 2mM이 적합하였다. 일반적으로 PCR을 tube당 100uL로 시행하고 있으나 tube당 반응량은 10uL까지 축소하여 실시하여도 반응 결과에 영향을 주지 않았으므로 시행상의 오차와 관찰에 필요한 양

을 고려해 20ul 로 정하였으며 반응시간은 각 1분, 2분, 3분 으로 하는 long cycle 과 각 20 초, 30 초로 하는 short cycle 을 비교한 바 유의한 차이를 보이지 않으므로 신속하게 결과를 판정하기 위하여 short cycle 을 선택하여 PCR 을 시행하여 소요되는 시약과 시간을 절약할 수 있게 되었다.

말초혈액에서 분리된 DNA 에서 PCR 을 시행하여 HIV 의 존재를 조사하는 것은 provirus 상태로 사람의 유전자에 삽입된 바이러스 유전자를 증폭하는 것이므로 사람의 유전자에 공통적으로 존재하는 유전자 부위에 대한 primers(HLA-DQ) 를 동일한 시료에서 동시에 증폭함으로써 말기 AIDS 환자에서 나타나는 말초혈액세포수의 격심한 감소로 인한 template DNA 의 양적 부족이나 혹은 부적절한 처리에 의한 반응억제물질 포함 등으로 나타날 수 있는 위음성 (false negative) 결과를 찾아내어 판독할 수 있다<sup>14)</sup>.

본 연구에서는 45 명의 HIV 항체 양성자중 HIV 에 대한 PCR 결과 음성으로 나타나는 2 명과 양성으로 나타난 17 명의 검체에 대하여 HLA-DQ beta primer 를 사용하여 PCR 을 시행한 결과 HIV 에 대한 PCR 음성인 2 명 만이 음성으로 나타나 template DNA 의 양적 부족이나 혹은 부적절한 처리에 의한 위음성 (false negative) 임을 확인할 수 있었다.

PCR 법이 바이러스의 유전자를 직접 감지하는 방법으로는 현재 개발된 방법중 가장 예민한 검사법이지만 AIDS , ARC 환자에서도 말초혈액단핵세포중 감염된 세포는 0.01 % 정도에 불과하므로 말초혈액등에서 분리된 template DNA 량이 소량이어서 HIV 유전자가 1 ng

이하로 증폭되는 경우 일반적으로 사용하는 ethidium bromide 염색에는 나타나지 않게 된다<sup>11,14)</sup>. 그러므로 민감도와 동시에 특이도를 더욱 증가 시키기 위하여 대부분 hybridization 법을 동반하여 사용하고 있으나 hybridization 법은 방법상 복잡한 조작을 반복하는 단점이 있다. 그러므로 일차증폭된 DNA에 대해 이차증폭을 시행하여 민감도를 더욱 증가시키고자 양성대조인 pNL432 plasmid DNA를 대상으로 10배 단계희석하여 일차 및 이차 증폭하여 ethidium bromide 염색과 SK19, SK109, SK38/SK104 그리고 SK100/SK104 probe로 hybridization하여 비교 관찰한 바 일차증폭은 2fg, 일차증폭 DNA의 hybridization과 이차증폭은 200ag까지 감지할 수 있었으며 이차증폭 DNA의 hybridization 시에는 2ag 이상 감지할 수 있었으므로 이차증폭을 통해 hybridization과 유사하게 민감도를 증가시킬 수 있었다.

SK100/SK104 primers와 SK38/SK104 primers를 이용한 1차 증폭 결과 임파구를 분리하여 추출한 DNA 검체 19명중 17명이 강양성, 1명이 약양성, 1명이 음성으로 나타났으나 전혈에서 직접 추출한 26명의 DNA에 대한 1차 증폭에서는 SK100/SK104 primers를 사용한 경우 6명, SK38/SK104 primer의 경우 5명에서만 양성으로 나타났으며 이들 26명에 대해 동일한 primers로 이차증폭을 한 결과 25명에서 양성반응을 보였다. 음성인 2명은 HLA-DQ beta primers로 조사한 결과 음성으로 나타나므로 DNA추출을 다시하여야 할 것으로 사료되며 PCR 결과가 DNA 분리방법에 영향을 많이 받는 것을 알 수 있었다.



HIV-1 에 특이한 SK19 probe 로 각 primer 쌍으로 증폭된 DNA 중 37 명에 대해 dot blot hybridization 한 결과 DNA 추출에 문제가 있는 2 명을 제외한 35 명 모두에서 양성반응을 보였으며 HIV-2 에 특이한 SK109 probe 의 반응은 SK100/SK104 증폭 DNA 중에서 4 명, SK38/SK104 증폭 DNA 중에서 7 명에서 약양성을 보이고 나머지는 음성이었다. 이러한 약양성반응은 hybridization 의 조건을 조절함으로써 특이성을 더욱 높인 후 재 판독하여야 하겠으나 현재로서는 검사대상자 모두 HIV-1 감염된 것으로 생각된다.

이상의 결과는 한국인 HIV 항체양성자중 일부 특히 혈청학적으로 HIV-2 감염이 예상되는 감염자의 시료가 포함되지 않은 상태에서 이루어진 것이므로 계속 조사가 진행되어야 하겠으며, 유전자의 변이가 예상되는 경우 염기서열 분석등을 통해 국내 감염 HIV 의 특성을 더욱 규명하여야 할 것으로 사료된다<sup>1,5,13,15</sup>).

## 제 5 절 결 론

국내 HIV 감염의 역학적 특성상 대부분 외국의 여러나라에서 감염되어 국내로 유입된 경우가 많으므로 HIV-1 과 HIV-2 등 여러 바이러스 변이형이 존재할 것으로 생각되므로 본 연구에서는 HIV-1 과 HIV-2 의 gag 유전자를 모두 증폭시킬 수 있는 SK100 와 SK104 primer 와 HIV-1 에 특이한 SK19, HIV-2 에 특이한 SK109 probes 를 합성하고 한국인 HIV 항체양성자의 말초혈액에서 분리한

DNA에 대해 이중 PCR을 시행하여 민감도를 증가시키고 Digoxigenin 표지 probe를 이용하여 HIV-1과 HIV-2 감염 여부를 조사하였다.

1. PCR 반응은 tube 당 20ul로 시행하였는데, SK100, SK104 primer의 농도는 각 50ng/20ul reaction mixture, MgCl<sub>2</sub>의 농도는 dNTP의 농도를 200uM로 사용시 2mM이 적합하였다. 반응 온도는 denaturation 94°C, anealing 55°C, extension 72°C로 하고 반응시간은 각 1분, 2분, 3분으로 하는 long cycle과 각 20초, 30초로 하는 short cycle를 비교한 바 유의한 차이를 보이지 않으므로 신속하게 결과를 판정하기 위하여 short cycle을 선택하여 PCR을 시행하였다.

2. 말기 AIDS 환자에서 나타나는 말초혈액세포수의 격심한 감소로 인한 template DNA의 양적 부족이나 혹은 시료의 부적절한 처리에 의한 위음성 (false negative) 결과를 찾아내어 판독하기 위해 HIV 항체 양성자중 HIV에 대한 PCR 결과 음성으로 나타나는 2명과 양성으로 나타난 17명의 검체에 대하여 HLA-DQ beta primers를 사용하여 PCR을 시행한 결과 HIV에 대한 PCR 음성인 2명만이 음성으로 나타나 template DNA의 양적 부족이나 혹은 부적절한 처리에 의한 위음성 (false negative)임을 확인할 수 있었다.

3. 이차증폭 및 hybridization에 의한 민감도의 증가를 비교하기 위해 양성대조인 pNL432 plasmid DNA를 10배 단계희석하여

일차 및 이차 증폭하고 ethidium bromide 염색과 SK19, SK109, SK38/SK104 그리고 SK100/SK104 probe 로 hybridization 하여 비교 관찰한 바 일차증폭은 2 fg, 일차증폭 DNA 의 hybridization 과 이차증폭은 200ag 까지 감지할 수 있었으며 이차증폭 DNA 의 hybridization 시에는 2ag 이상 감지할 수 있었다.

4. SK100/SK104 primers 와 SK38/SK104 primers 를 이용한 1차 증폭 결과 HIV 항체양성자의 임파구를 분리하여 추출한 DNA 검체 18명중 17명이 강양성, 1명이 약양성으로 나타났다. 전혈에서 직접 추출한 25명의 DNA 에 대한 1차 증폭에서는 SK100/SK104 primers 를 사용한 경우 6명, SK38/SK104 primers 의 경우 5명에서만 양성으로 나타났으나 동일한 primers 로 이차증폭을 한 결과 25명 모두 양성반응을 보였다.

5. HIV-1 에 특이한 SK19 probe 로 각 primer 쌍으로 증폭된 DNA 중 37명에 대해 dot blot hybridization 한 결과 DNA 추출에 문제가 있는 2명을 제외한 35명 모두에서 양성반응을 보였으나 HIV-2 에 특이한 SK109 probe 의 반응은 SK100/SK104 증폭 DNA 중에서 4명, SK38/SK104 증폭 DNA 중에서 7명에서 약양성을 보이고 나머지는 음성이었다.

이상의 결과는 한국인 HIV 항체양성자중 일부에 대해 이루어진 것이므로 계속 조사가 이루어져야 하겠으며, HIV-2 에 대한 약양성 반응은 hybridization 의 조건을 적절하게 조절하여 특이성을 더욱 높여 재조사 하여야 할것으로 사료된다.

## 제 6 절 참 고 문 헌

1. 김태규, 황응수, 서교일, 이홍래, 신영오, 박성희. 1989. 항원감지효소면역 측정법에 의한 한국인 HIV 감염자의 중화항체가 측정과 HIV분리주에 대한 중화항체의 특이성. 대한미생물학회지 24(5) · 511.
2. 용군호, 신영오, 윤재득, 이홍래, 강춘, 최정희, 김태규, 서교일. 1988. 후천성면역결핍증에 대한 바이러스학적 역학적 연구(II). 국립보건원보 25 : 331.
3. Busch, M. P., Rajagopalan, M. S., Gantz, D. M., Shuyuan FU, Stelmer, K. S., and Vyas, G. N. In Situ Hybridization and Immunocytochemistry for Improved Assessment of Human Immunodeficiency Virus Cultures. A. J. C. P December 1987.
4. Byrne, B. C., J. J. Li, J. Sninsky, and B. J. Poiesz. 1988. Detection of HIV-1 RNA sequences by an in vitro DNA amplification. , Nucleic Acids Res. 16 : 4165.
5. Hahn, B. H., G. M. Shaw, M. E. Taylor, R. R. Redfield, P. D. Markham, S. Z. Salhuddin, F. Wong-Staal, R. Gallo, E. S. Parks, and W. P. Panks 1986. Genetic variation in HTLV-III/LAV over time in patients with AIDS or at risk for AIDS. Science 232 : 1548.
6. Hart, C., G. Schochetman, T. Spira A. Lifson, J. Moore, J. Galphin, J. Sninsky, and C. Y. Ou. 1988. Direct detection of HIV RNA expression in seropositive subjects. Lancet II : 596.
7. Kwok, S., D. H. Mack, K. Mullins, B. Poiesz, G. Ehrlich, D. Blair, A.

- Friedman—Kien, and J. Sninsky, 1987. Identification of human immunodeficiency virus sequences by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. *J. Virol.* 61 : 1690.
8. Laure, F., V. Courgnaud, C. Rouzioux, S. Blanche, F. Veber, M. Burgard, C. Jacomet, C. Griscell, and C. Brechot. 1988. Detection of HIV DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction. *Lancet* II : 538.
  9. Murakawa, G. J., J. A. Zaia, P. A. Spallone, D. A. Stephens, B. E. Kaplan, R. B. Wallace, and J. J. Rossi. 1988. Direct detection of HIV—1 RNA from AIDS and ARC patient samples. *DNA* 7 : 287.
  10. Ou. C. Y., S. Kwok, S. W. Mitchell, D. H. Mack, J. Sninsky, J. W. Krebs, P. Ferorino, D. Warfield, and G. Schochetman. 1988. DNA amplification for direct detection of HIV—1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science* 239 : 295.
  11. Pezzella M., Mannella E., Mirolo M., Vonesch N., Macchi B., Rosci M. A., Miceli M., Moreace G., Rapicetta M., Angeloni P., and Sorice F. HIV Genome in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Seronegative Regular Sexual Partners of HIV—Infected Subjects. 1989. *J. of Medical Virology* 28 : 209—214.
  12. Rayfield, M., K. DeCook, W. Heyward, L. Goldstein, J. Krebs, S. Kwok, S. Lee, J. McCormick, J. M. Moreau, K. Odehour, G. Schochetman, J. Sninsky, and C. Y. Ou. 1988. Mixed HIV infection of an individual : Demonstration of both HIV—1 and HIV—2 proviral sequences by polymerases chain reaction. *J. Infect. Dis.* 158 : 1170.

13. Saag, M. S., B. H. Hahn, J. Gibbons, Y. Li, Extensive variation of human immunodeficiency virus type-1 in vivo. *Science* 334 : 440.
14. Schochetman, G., G. Y. Ou, and W. K. Jones. 1988. Polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* 158 : 1154.
15. Starcich, B. R., B. H. Hahn, G. M. Shaw, P. D. McNeely, S. Modrow, H. Wolf, E. S. Parks, W. P. Parks, S. F. Josephs, R. C. Gallo, and F. Wong-Staal. 1986. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* 45 : 632.
16. Weiss, S. H., J. Lombardo, J. Michaels, L. R. Sharer, M. Tayyarah, J. Leonard, A. Mangia, P. Kloser, S. Sathe, R. Kaplia, N. W. Williams, R. Altman, J. French, W. E. Perkins, Genentic Systems Corp., and AIDS Program, Center for Infectious Diseases, CDC. 1988. AIDS due to HIV-2 infection—New Jersey. *Morbidity Mortality Wkly. Rep.* 37 : 33.



## 2. HIV 탐색을 위한 Hybridization Probe의 제작 및 평가

### 제 1 절 서 설

지난 10년간 AIDS(acquired immunodeficiency syndrome)의 etiologic agent인 HIV-1(human immunodeficiency virus type 1)은 여러 그룹의 연구자들에 의해 분리되었고 배양되었으며, 전체 genome의 염기배열이 알려졌다<sup>1-7)</sup>.

그리고 HIV-1이 배양되는 cell type과 세포내에서 나타내는 자기복제의 양상(replication pattern), 그리고 생체내에서나 시험관내에서 병을 일으키는 진행과정등에 대해서도 많은 연구가 있어왔고 이를 바탕으로 적절한 치료방법들이 고안되어 임상 실험단계를 넘어 실제 사용되고 있으며, vaccine에 대한 시도도 활발히 진행 중에 있다.

HIV-1 virus는 human lenti virus의 prototype으로 같은 virus family 내에 있는 다른 virus 들 처럼 인간에게 만성적이며 degenerative한 질병을 유발시키는데 이러한 파괴적인 결과에 대한 원인은 숙주세포와 HIV 간의 복잡한 상관관계에 의해 일어나는 것으로 알려져 있다.

일단 HIV가 인체내에 감염되면 먼저 virus의 복제가 급격히

증가되며 brain 이나 spinal cord 주변의 fluid 나 또는 혈액내에 free virus 가 나타나게 되고 이러한 HIV 복제의 초기의 급격한 증가와 함께 열과 rashes 를 동반한 감기증상이나 신경계의 고통이 따르게 된다.

그러나 수 주일째로 순환하는 free virus 의 양은 급격히 떨어지게 되지만 virus 들은 이제까지 유일한 표적이라고 생각되었던 T<sub>4</sub> Lymphocyte 뿐 아니라 다른 종류의 면역계 세포들에 또는 신경계세포나 장내세포 심지어 bone-marrow cell 에도 잔존하여 남아 있게 된다.

그리고 나서 이러한 무증상기간이 시작된 지 2년에서 10년후에나 virus 의 복제가 재개되고 감염으로 인한 질병의 양상은 마지막 단계로 들어선다.

한편 virus 는 감염된 세포의 종류에 따라 cell 에 대한 손상 (damage) 정도가 서로 다른데 T Lymphocyte 의 경우는 virus 의 복제의 급격한 증가로 인해 cell 자체가 파괴될 수 있는 반면 같은 종류의 면역계 세포인 macrophage 등에서는 virus 가 천천히 증식되면서 cell 의 여러가지 기능들을 변화시키는 경우도 있다.

이러한 다양한 양상의 원인은 HIV virus 의 life cycle 과 virus 가 가지는 9749nt(nucleotides)의 genome 내에 들어있는 유전적 암호에서 찾을 수 있다.

HIV 의 life cycle 에 대한 가장 단순한 개관은 retrovirus 라는 말에 함축되어 있는데 retrovirus 라는 말은 virus 들이 정상적인 유전정보의 흐름 (DNA 에서 RNA 로 ) 에 역행하는 것처럼 보인

다는 이유로 붙여진 것이다.

즉, retrovirus의 유전암호들은 RNA 내에 암호화 되어 있어 이들이 발현되기 위해서는 RNA가 반드시 DNA 형태로 전환되어야만 한다는 것이다.

HIV의 life cycle(Fig. 1)은 HIV particle이 cell의 표면에 붙어 자신의 core를 cell내로 주입시키면서 시작되는데 이 core에는 똑같은 RNA가 1쌍 들어 있고 viral RNA를 DNA로 바꾸는 enzyme activity가 있어 (reverse transcriptase) RNA를 주형(template)으로 삼아 DNA를 합성하여 double stranded DNA를 만든 후에 associated integrase activity에 의해 nucleus로 이동된 double stranded DNA를 숙주세포의 chromosomal DNA에 삽입시키게 된다.

일단 숙주세포의 DNA에 끼어 들어간 viral DNA(provirus)는 숙주세포가 분열할 때마다 세포의 유전자들과 함께 복제되어 나가면서 영구적으로 감염된 상태를 만든다.

HIV-1의 life cycle의 나머지 부분은 (새로운 virus particle을 만드는 과정) 제한된 세포에서만 갑작스럽게 일어나서 (여러가지 요인에 의해) viral genome의 끝에 위치한 DNA sequence인 LTR에서 부터 숙주세포의 enzyme(RNA polymerase)에 의해 integrated viral DNA에서 부터 RNA를 만들어 낸다.

이런 RNA들 중에서 일부는 새로운 virus particle내로 들어가는 새로운 genome으로 사용되며 일부는 messenger RNA로 사용되어 여러가지 구조단백질(envelope와 gag 단백질)과 새로운 virus

particle 내로 들어가는 enzyme 을 합성시킨다.

이렇게 만들어진 유전자 산물들이 조립되어 숙주세포의 세포막에서 budding 되어 나오면 life cycle 을 일주하게 되며 새로운 감염을 일으키게 된다.

한편 위와같이 인체 면역계에 치명적인 손상을 입히는 HIV 에 감염된 환자들을 진단하여 발견해 내고자 하는 여러가지 다양한 진단방법들이 나오고 있는데 가장 일상적인 진단방법으로 serum 내 존재하는 viral epitopes 에 대한 antibodies 의 존재를 검출해 내는 것으로 대개 HIV 에 대한 antibody 를 먼저 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 로 검출해내면서 이와함께 여러가지 confirmatory test 를 실시하는 것이다<sup>8)</sup>.

이러한 confirmatory test 에는 Western blot, RIA(radioimmuno precipitation assay), indirect immunofluorescence assay 와 recombinant ELISA 등이 포함되며 한편 HIV-1 의 antigen 이나 reverse transcriptase 에 대한 test 는 대개 거의 진단에 사용되지 않는다. 그러나 보고된 바에 의하면<sup>9-11)</sup> HIV 에 감염된 사람이 antiviral antibodies 를 생성하지 못하는 기간이 약 수개월에서 심지어 1년이상 되는 경우도 있어 보다 조기에 진단할 필요성이 강조되고 있다.

한편 virus 의 감염에 대해 가장 믿을 만한 진단방법은 cell culture 에 의해 virus 를 분리하는 것과 virus 의 genome 을 검출해내는 방법들이 있다.

virus 를 분리하는 방법은 감염되지 않은 사람에게서 얻은 phy-

tohemagglutinin-stimulated lymphocyte 또는 virus 가 감염할 수 있는 indicator cell line 과 함께 감염된 사람의 peripheral blood mononuclear cell 을 함께 오랜 기간동안 coculture 하는 방법으로<sup>12)</sup> 3 ~ 4 주 정도의 시간을 필요로 하며 sensitivity 가 부족한 것으로 알려져 있다<sup>13-15)</sup>.

그리고 viral genome 을 찾아내는 방법으로 lymphocyte 내의 genome DNA 에 삽입되어 있는 proviral DNA sequence 를 적절한 probe 를 사용하여 Southern blot 에 의한 hybridization 으로 찾아낼 수 있으나 이러한 방법은 별로 성공적이지 못했는데<sup>16)</sup> 이유는 proviral DNA sequence 의 양이 검출한계를 훨씬 밑돌기 때문이다.

Harper 등에<sup>17)</sup> 의하면 in situ hybridization 에 의해 검사해보면 감염된 사람에서 viral RNA 를 expressing 하는 peripheral blood lymphocyte 의 숫자는 0.01 % 이하에 지나지 않으므로 HIV-1 에 감염된 lymphocyte 의 숫자가 적으므로 해서 HIV DNA sequence 가 검출되기에는 매우 양이 적기 때문에 검출이 어렵다고 보고하고 있다.

이러한 이유로 인해 매우 적은 양의 시료 DNA 로 부터 DNA 의 특정부위를 증폭시켜 쉽게 탐지할 수 있도록 하는 PCR(polymerase chain reaction) 방법이 도입되었다<sup>18)</sup>.

PCR 기술은 자연계에서 일어나는 DNA 의 복제과정을 모방하여 각각의 cycle 을 지날때마다 DNA 의 양이 두배로 증가된다는 간단한 원리를 가지고 실험관내에서 DNA 의 양을 증가시키는 방법으



로 개발되었다<sup>19)</sup>.

즉, 목적하는 DNA sequence를 알고 있어 임의의 길이만큼 떨어져 있는 region에 두개의 primer ( 하나는 DNA의 plus strand에 complementary하고 나머지는 minus strand complementary한 )를 사용해서 target DNA를 denaturation 시킨후 primer와 annealing시키고 DNA polymerase를 첨가하여 primer에서 부터 새로운 strand를 합성시켜 두개의 double strand DNA fragment를 만들도록 함으로써 이를 반복할 경우에 DNA 양을 증가시킬 수 있게 된다 (Fig. 2).

개발 초기에는 열에 강한 DNA polymerase가 발견되지 않아 cycle을 지날때마다 새로운 enzyme을 넣어 주어야 했으므로 시간이 오래 걸리면서 증폭배수 (amplification fold)를 효과적으로 높일 수 없었으나 thermostable DNA Polymerase가 발견되면서 손쉬운 방법으로 발전되었다. 즉, 반응온도만을 조절해 줌으로써 denaturation, primer annealing, extension의 3가지 step을 계속 반복시켜서 목적하는 DNA의 양을 손쉽게 그리고 우수한 효율로 증폭시킬 수 있게 되었다.

이러한 기술을 이용하여 HIV에 감염되었다고 생각하는 사람의 혈액에서 peripheral blood mononuclear cell을 분리한 후 total DNA를 수백만배에서 수천만배로 증폭시킨 후 일상적인 hybridization 방법으로 탐색하여 seropositive인 사람의 confirmatory test뿐 아니라 seronegative인 사람중에서 HIV에 감염된 사람의 탐색에도 이용되고 있다.

이러한 PCR-based 방법은 culture method와 비교할때 짧은 시간내에 peripheral blood mononuclear cell로 부터 HIV의 genome fragment를 찾아낼 수 있도록 해주며 또한 antibody 생성이 시작되지 않은 감염자의 감염여부를 결정할 수 있는 매우 민감한 방법이 될수 있다고 생각하고 있다<sup>20, 21)</sup>.

위와 같은 기술개발의 흐름에 맞추어 본 연구과제에서는 지난해 까지 PCR 기술의 확립을 위한 반응조건의 확립 및 검출기술을 확립하였고 금년에는 여러가지 primer set(TAT, VPU region과 GAG, ENV, LTR region)를 합성하여 PCR 산물을 얻는데 성공하였고, 국립보건원 및 녹십자 임상병리과 의원에서 가져온 whole blood 또는 lymphocyte를 가지고 sample 처리방법을 확립하였고 PCR 반응을 수행하여 seropositive인 sample과 seronegative인 sample을 구분해낼 수 있는 기술확립에 주력하였으며 이와 더불어 일상적인 hybridization 방법에서 한발 더 나아가 liquid hybridization을 이용한 보다 빠른 검출방법의 확립을 시도하여 나름대로의 전체 기술계통을 형성하였기에 보고합니다.

## 제 2 절 실험재료 및 방법

### 1. Whole blood 에서 lymphocyte DNA의 준비

Peripheral blood mononuclear cell (PBMC- lymphocyte, macrophage 등 포함) 를 혈액에서 분리하기 위해 Ficoll-Plaque method 를 이용하였다.

Anticoagulant 인 EDTA 로 처리된 혈액 1 ml 을 Ficoll-Plaque solution (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM EDTA, 0.14 mM Ficoll 400, 0.15 M Sodium diatrizoate) 1 ml 위 에 혼합되지 않도록 하면서 조심스럽게 엮은 후, 2500 rpm (Dynac II, table top centrifuge) 에서 15 분간 원심분리 한다. 원심관 밑에 가라앉아 있는 RBC 층 이 따라 올라오지 않도록 하면서 Ficoll solution 과 상층의 경계면에 층을 이루고 있는 lymphocyte 층을 따내서 새로운 시험관으로 옮긴다. 분리해낸 lymphocyte 층에 3 ml 의 balanced salt solution (0.09 % glucose, 0.045 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.9 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.45 mM KCl, 130 mM Tris-HCl (pH 7.6), 14 mM NaCl) 을 첨가하여 혼합시켜 세척한 후에 2200 rpm 에서 5 분간 원심분리하여 lymphocyte cell 을 침전시키고 상층액을 버린 다음, 적당한 lysis buffer 100ul 에 녹인다 (SDS-based lysis buffer; 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.01 % Triton X-100, 0.001 % SDS, 또는 NP-40-based lysis buffer; 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/ml gelatin, 0.45 % NP-40, 0.45 % tween 20).

Lysis buffer 에 녹인 cell 용액을 Eppendorf tube 로 옮긴 후, Proteinase K 를 200 ~ 300 ug 더한 후, 55 ℃ ( 또는 60 ℃ ) 에서 1 시간 반응시킨 다음 boiling water bath 에서 15 분간 끓인 뒤에 -20 ℃ 에서 보관하였다.

## 2. High molecular weight DNA 의 준비

위에서 lysis 시킨 혈액시료를 그대로 PCR 에 사용하였으나 경우에 따라 DNA 만을 분리하여 사용하기도 하였다.

먼저 분리된 lymphocyte 나 eukaryotic cell 을 SDS-based lysis buffer 에 녹여 Proteinase k 를 처리한 후, 동량의 phenol:chloroform:isoamylalcohol(25:24:1) 로 2 번 추출한 후 1/10 부피의 3 M Sodium acetate 를 더하고 alcohol precipitation 을 하여 DNA 만을 분리하였고 template-dissolving buffer(10 mM Tris - HCl (pH 8.0), 0.1mM EDTA) 에 녹여서 사용하였다.

한편, DNA 시료준비 과정의 오염 여부를 검사하기 위하여 상업적으로 판매하고 있는 mini-column 을 구입하여 (A.S.A.P genomic DNA isolation kit :Boehringer-Mannheim) DNA 를 추출하였는데 Ficoll-solution 을 이용하여 분리한 WBC fraction 에 solution I (lysis buffer) 을 처리하고 RNase와 Proteinase K 를 처리한 후 A.S.A.P genomic DNA isolation column 을 통과시켜 elution buffer 로 DNA 를 뽑아낸 후, ethanol precipitation 하여 분리하였다.

### 3. Polymerase chain reaction

가. Reaction buffer 등의 제조

2차 년도에 보고하였던 대로 보다 간단한 반응 buffer 를 표준으로 하여 조건을 확립하였다.

10 X amplifying buffer 의 조성은 100mM Tris-HCl(pH 8.3), 500 mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 % gelatin 이며 MgCl<sub>2</sub> 의 농도는 전술 하였던 보고서에서처럼 매우 중요한 요소이므로 각각의 primer set 에 따라 최적농도를 결정하는 실험을 수행하였으며 이를 바탕으로 하여 MgCl<sub>2</sub> 최적농도를 결정, 사용 하였다.

각각의 reagent 들은 stock solution 으로 제조하였고 되도록 개봉하지 않은 시약을 사용하려 했으며 살균한 후 10x buffer 로 혼합한 다음, 0.22  $\mu$ m disposable filter 로 filtration 한 후, aliquots 로 나누어서 -20 C 에 보관하였다.

한편 dNTPs 는 1N NaOH 용액으로 pH 7.0 이 되도록 맞춘 후 각각을 특정파장에서 (dATP-259nm, dGTP-253nm, dCTP-272nm, dTTP-267 nm ) 흡광도를 측정하여 흡광도로 부터 molar 농도를 계산하고 각각의 nucleotide 들을 혼합하여 10mM dNTPs 혼합용액으로 제조하여 사용하였다.

나. Oligonucleotide primer 의 합성 및 정제

PCR 기술에서 primer 의 순수도와 분리정도는 매우 중요한 인자로서 nonspecific 반응의 방지와 증폭배수의 증진을 위해서 합



성시 남아 있게 되는 크기가 작은 oligonucleotide의 제거를 확실하게 하려 노력했고 이런 정제과정에서 되도록이면 고농도를 얻기 위해 여러가지 방법들을 시도하였으며 polyacrylamide gel electrophoresis를 통한 분리와 정제를 주로 이용하였다.

암모니아 용액에 담겨져 있는 primer를 분리해내기 전에 52 °C에서 1~2시간 정도 암모니아를 날려버리고 30분에서 1시간 정도 vacuum 상태에서 완전히 날려버린 후에 적절히 희석하여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 OD<sub>260</sub> / ml을 정하였다. 5 OD<sub>260</sub>에 해당하는 primer 용액에 같은 부피의 2 X sample loading buffer (95 % (v/v) Formamide, 25mM EDTA, 0.05 X TBE)를 첨가, 혼합한 후에 boiling water bath에서 2~3분 끓여서 2차 구조를 없앤 다음 미리 준비해 놓은 20 % Polyacrylamide-urea gel에 loading하여 200~250 V에서 4~5시간 분리시켰다. 전기영동이 끝나면 gel을 silica gel plate 위에 얹고 UV를 쬐어 원하는 크기의 oligonucleotide band를 잘라내어 잘게 썬 후에 적당한 elution buffer에서 overnight 동안 37 °C에서 elution하였다 (TEAA-based Elution Buffer; 200mM TEAA in water; Tris-based Elution Buffer; 100mM Tris - HCl (pH 8.3)).

용출된 primer solution을 0.45 μm filter로 filtration 한 후에 1/200 배로 희석하여 260nm에서 흡광도를 측정한 후, 1 OD<sub>260</sub> 일때 primer 농도가 33 μg / ml이라 계산하여 각 반응물에 10 pmole이 되도록 맞추어서 더하였다.

#### 다. PCR 반응의 수행

PCR 반응을 위해 각각의 reagent 들을 다음과 같은 순서로 더하였다.

10 × amplifying buffer	10 $\mu$ l (또는 5 $\mu$ l)
dNTPs solution	3 $\mu$ l (또는 1.5 $\mu$ l)
primer solution 10pmoles	1 ~ 2 $\mu$ l
Water	76 ~ 75 $\mu$ l (32 ~ 33 $\mu$ l)
sample DNA solution	10 $\mu$ l (또는 1 $\mu$ l)

위의 성분들을 혼합한 후 100  $\mu$ l paraffin oil을 용액위에 얹은 후에 94 °C 에서 10 분간 방치하면서 2.5unit 의 Taq DNA polymerase 를 더하여 적당한 온도 구성으로 30 (또는 40 ) cycle을 수행 하였다.

Denaturation 온도는 94 °C 에서 1 분 15 초이고 extension 온도는 72 °C 에서 1 분 30 초로 하였으며 annealing 온도는 primer 조합에 따라 TAT, VPU primer set 의 경우는 55 °C 또는 58 °C 에서 1 분 또는 2 분간 수행하였으며 MP1.2 와 MP3.4 primer set 의 경우는 58 °C 에서 1 분 또는 2 분간 수행하였으며 SK 29,30 과 SK 38,39 primer set 의 경우는 60 °C 에서 1 분 15 초로 수행하였다.

모든 경우에 마지막 extension 에서는 72 °C 에서 7 분간 수행 하였다.

각 primer 의 경우는 MgCl<sub>2</sub> 의 최적화와 annealing 온도의 최적

화를 위해서 비교실험을 수행하였는데  $MgCl_2$ 의 경우는 1.5mM  $MgCl_2$ 를 기준으로 하여 2,3,4 mM까지 변화시켜 수행하였고 annealing 온도의 경우는 5 °C 간격으로 68 °C까지 실험하였다.

반응물질을 혼합하는 과정에서 오염의 가능성이 대두되면서 각각의 성분들을 따로 더하는 방법에서 탈피하여 premix를 만든 후에 DNA sample 과 enzyme 만을 더하여 반응시키는 system을 확립하였다.

즉, 10 X buffer 와 dNTPs solution, water 및 primer를 각각 농도에 맞추어 미리 혼합한 후에 aliquots로 나누어서 보관하였다가 반응시에 꺼내어 나머지 성분들을 넣으므로 반응부피에 도달하도록 각각의 tube를 만들어서 -20 °C에 보관하였다.

한편 PCR 반응의 오염방지를 위해 많은 방법들이 제기되었는데 이런 가능성은 대부분 반응물을 혼합하는 과정에서 enzyme을 처리하거나 UV를 쬐어서 혹시 반응 mixture에 있을지도 모르는 오염된 DNA를 제거하는 방법들이다<sup>25-29)</sup>

이런 방법들중에서 UV를 조사하여 DNA 오염을 최소화하는 방법을 사용하기로 하고 예비실험을 통하여 polypropylene Eppendorf tube 내에 있는 반응 mixture를 UV transilluminator에서 30분간 조사하여 decontamination하는 방법을 확립하였다.

이를 위해 10 X buffer 와 dNTPs 용액, water를 정해진 농도로 미리 tube에 나누어 넣고 UV를 조사한 후, 동일한 방법으로 UV를 조사한 primer solution을 더하고 혼합하여 decontamination된 반응 mix를 만든 후에 오염을 최대한 방지할 수 있도록

실험중에 조심하면서 DNA 시료와 mineral oil, enzyme 을 첨가하여 반응을 수행하였다.

#### 라. PCR product 의 확인

##### (1) Southern blot hybridization

PCR 반응이 종료된 반응물에 chloroform 200 $\mu$ l 를 더하고 3 분간 원심분리하여 paraffin oil 을 제거하고 상층을 새로운 tube 에 옮긴 후 -20 C 에 보관하였다.

PCR product 100 $\mu$ l 중에서 20 $\mu$ l 를 취하여 10 X agarose gel loading dye (0.4% xylene cyanol, 0.4% bromophenol blue, 50% glycerol) 을 더하고 5' 말단이 표시된 size marker 와 함께 1.5 ~ 2% agarose gel 에 loading 하여 전기영동하였다.

Bromophenol blue 가 gel 길이의 3/4 위치에 도달되면 전기영동을 끝내고 UV 조명하에서 사진을 찍은 후에 600ml의 변성액 (1.5M NaCl, 0.5N NaOH) 에서 30 분간 변성시켰다.<sup>30)</sup> 변성이 끝나면 600 ml의 neutralizing solution (1M Tris-HCl (pH 7.4), 1.5 M NaCl) 에서 30 분간 중화시킨 후, nitrocellulose membrane (0.22 $\mu$ m, Bio-rad) 에 transfer 시켰다.

vacu-blot apparatus 를 이용하여 1 시간동안 vacuum transfer 시킨 후<sup>31,32)</sup> membrane 을 6 X SSC 로 세척하고 vacuum dry oven 에서 80 C, 1 시간동안 baking 해서 PCR product 를 membrane 에 고정화시킨 다음, 적당한 hybridization solution (Table 1) 에서 1 시간동안 prehybridization 한 후에 적당한 DNA probe 를 넣어

overnight 동안 (oligonucleotide probe 의 경우는 3 ~ 4 시간 동안 ) hybridization 을 수행하였다.

hybridization 이 끝난 membrane은 핵산탐색자에 따라 알맞은 세척과정을 거친 후 (Table 2). autoradiography 하였다.

Random-primer labeled DNA probe 의 제조는 <sup>33</sup>P 각각의 해당 DNA fragment 를 multiple-primed DNA labeling system ( Amersham, 또는 Boehringer Mannheim ) 을 이용하여 탐색자를 만들었다.

Random priming buffer, random primer, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP 와 2 unit 의 klenow enzyme 을 첨가하여 실온에서 2 시간동안 반응한 후, Sephadex G-50 으로 제작된 spun-column 을 통과시켜 unincorporated [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP 를 제거하고 탐색자로 사용하였다.

Nonradioactive labeled DNA probe 의 제조는 nonradioactive DNA labeling and detection kit(Boehringer Mannheim) 을 이용하여 탐색자를 만들었다.

각각의 region 에 해당하는 DNA fragment 에 hexanucleotide 와 dNTP labeling mixture, Klenow enzyme 을 더하여 37 °C에서 1 시간 반응하고 4 M LiCl로 ethanol precipitation 하여 분리 정제 하여 사용하였다.

Nonradioactive labeled DNA probe 의 경우는 hybridization 이 끝난 후, random primer labeled DNA probe 와 washing 과정은 동일하나 autoradiography 하는 대신 conjugate-antibody 로 하여금 DNA 에 labeled 된 hapten 에 부착하게 하여 NBT(nitroblue-tetrazolium chloride) 와 X-phosphate 를 기질로 해서



conjugate-antibody 에 있는 alkaline phosphatase로 하여금 발색  
케하여 band 를 검출하였다.

Oligonucleotide probe 의 제조는 <sup>34, 35)</sup> 각각의 분리, 정제된  
oligonucleotide 10 pmole 에 10 X T4 polynucleotide kinase buffer  
(500mM Tris-HCl. (pH7.5), 100mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM dithiothreitol, 1mM  
spermidine, 1mM EDTA) 와 [<sup>32</sup>P] ATP, 그리고 T4 polynucleot-  
ide kinase 8 Unit 를 더하여 37 °C 에서 45 분간 반응하고 68 °C  
에서 10 분간 실활화시킨 후에 spun-column 으로 분리하여 탐색자  
로 이용하였다.

## (2) Liquid hybridization

일상적인 Southern hybridization 은 모든 기술이나 장비  
가 완비되어 있어도 결과를 보기 위해서는 PCR 반응이 종료된 이  
후로 최소한 3 ~ 4 일의 시간이 요구되므로 이를 극복하기 위해  
보다 빠른 검출방법을 모색하였다.

Liquid hybridization 을 이용한 방법은 <sup>35, 36)</sup> solution 내에서  
target DNA 와 oligonucleotide probe 가 hybridization 되도록 하고  
이를 곧바로 polyacrylamide gel 에 loading 하여 probe 와 probe-  
DNA 의 hybrid 를 분획, 구별하여 target DNA 의 존재유무를 밝혀  
내는 방법이다.

이를 위해 PCR product 20  $\mu$ l 를 Eppendorf tube 에 옮긴 후, boiling water  
bath에서 5분간 denaturation 시킨 후에 곧바로 ice water bath에 넣어서 quen-  
ching시킨 후 probe를  $1 \times 10^6$  cpm (약 10  $\mu$ l)를 섞은 후에 55 °C에서 30분간 hybr-

idization 시켰다.

hybridization 이 종료되면 gel loading buffer 를 더한 후, 준비된 polyacrylamide gel 에 loading 하여 120 V 에서 3 ~ 4 시간 동안 전기영동한 후, gel 을 직접 autoradiography 하였다.

이때 plasmid DNA 를 template 로 하여 반응한 PCR product 를 positive control 로 삼아 같이 loading 하여 HIV-specific band 의 존재유무를 가지고 positive 와 negative signal 을 구분하였다.

### 제 3 절 실험 결과

#### 1. TAT VPU primer set 에 대한 PCR 검사

2 차년도 결과에 대한 계속실험으로 국립보건원으로 부터 받은 seropositive 환자의 sample 을 가지고  $MgCl_2$  농도의 변화를 보는 실험을 하여, 4 mM  $MgCl_2$  에서 product 의 양이 최대임을 확인하여 (data not shown) annealing 온도 55 °C와 4 mM  $MgCl_2$  조건에서 positive sample 의 경우 모두 positive 를 확인하였다.

한편 진단기술의 specificity 를 확증하기 위하여 즉 false positive 의 유무를 밝혀내서 negative 와 positive sample 를 확실히 구분할 수 있는 기술의 확립을 위하여 녹십자 임상 병리과의원에 검사요청되어 들어오는 혈액 sample 을 무작위로 선택하여 HIV 에 대한 거의 모든 sample 에서 negative 일 것으로 간주하고 이들 sample 을 가지고 PCR 하여 negative control 로 삼아 실험하였다.

TAT primer set 에 대해서는 2 차례에 걸쳐 19 개 sample 을 검사하였고 (Fig. 7.8) VPU primer set 에 대해서는 1 차례에 10 개 sample 를 검사하였다(Fig.5) 이 경우 모두 random primer labeled DNA probe 를 사용하였으나 모든 sample 에서 positive signal 이 나타났다.

이러한 결과에 대해서는 다음의 두가지 가능성을 생각할 수 있었다.

첫째로는 위의 실험에서 사용한 TAT, VPU region 을 잡아내는 primer 들이 sample 내에 들어 있는 lymphocyte genomic DNA 의 어느 부분에 annealing 하여 HIV-specific sequence 를 잡는 것이 아니라 원래 human chromosome 상에 있는 HIV-like sequence 를 잡는 것일 가능성이 있다.

혹은 같은 맥락으로 위의 실험에서 사용된 조건에서 primer 가 chromosome DNA 상의 어떤 sequence 에 nonspecific 하게 binding 함으로써 나온 결과일 가능성이 있다.

둘째로는 실험에서 사용된 HIV sequence 가 cloning 되어 있는 plasmid 를 계속해서 positive control(반응의 신빙성 정도를 나타내 주는) 로써 사용하여 왔는데 이런 plasmid 들이 위의 실험과정 중에 오염이 됨으로써 나타난 결과일 수 있다.

즉 lymphocyte DNA 준비과정, 반응시약 제조과정, 반응 mixture를 만드는 과정, 직접 반응을 시키는 과정중에 여러가지 가능한 통로를 통하여(실험기구, 또는 aerosol 등) 오염이 되었을 가능성이 있다.

이러한 가능성을 배제하기 위하여 두번째의 오염문제에 대해서는 다른 논문들이나 실험서에서 권장하는 주의사항을 숙지하여 가능한 지키기로 하면서 첫번째 가능성에 대해서 sample 로 lymphocyte 외에 다른 종류의 DNA 를 가지고 실험하였고 다른 set 의 primer 를 가지고 계속 실험하였다.

이러한 맥락하에 DNA sample 을 여러가지 준비하여 실험하여 보았는데, lymphocyte 의 total genomic DNA 와 본 연구소에서 배양한 human leukemia cell 의 DNA 와 monkey lymphoma cell 의 DNA, E.coli JM.101 의 chromosomal DNA, 그리고 yeast cell 의 chromosomal DNA (data not shown) 등을 함께 TAT, VPU primer set 를 가지고 PCR 하여 본 결과 (Fig.10), lymphocyte 와 human cell line cell 뿐 아니라 monkey cell 들의 DNA 에서도 strong positive signal 로 나타났고 E.coli 와 Yeast chromosomal DNA 에서도 희미하지만 DNA band (PCR product) 를 확인하였다.

이로써 앞에서 설명한 가능성 중에서 lymphocyte 내에 HIV-like sequence 에 잘못 annealing 되어 false positive 가 나온 것이라는 가능성이 배제될 수 있다고 생각되었다.

즉 human DNA 와 E.coli DNA 양쪽에 모두 annealing 되어 약 200bp 크기의 product 를 만들 수 있는 primer set 의 sequence 는 존재하지 않을 것으로 생각되기 때문이다.

이런 이유로 우선 VPU, TAT region 이외의 primer set 를 합성하여 보기로 하고 PCR 을 이용하여 HIV 를 진단하는 내용의 발표된 논문들을 참조하여 가장 빈번하게 primer 로 사용되었던 region

을 선택하여 2 종류의 primer set, MP1.2 와 MP3.4 를 합성, 실험하였다.

## 2. MP1.2 와 MP3.4 primer set 에 대한 PCR 검사

MP1.2 primer set 는 GAG region 에 annealing 되는 primer set 로 300b.p 의 product 를 만들게 되며 MP3.4 primer set 는 ENV region 에 annealing 되어 200b.p 의 product 를 만들게 된다.

일단 정제, 분리된 MP1.2 와 MP3.4 primer set 를 가지고 9 개의 negative sample 들을 검사하였는데 annealing 온도는 melting temperature ( $T_m$ ) 에서  $5^{\circ}\text{C}$  가 낮은 조건에서 다른 반응조건은 동일하게 하여 PCR 을 수행하였다 (Fig.11,12).

대부분의 sample 에서 positive signal 을 보였으므로 우선 반응 조건의 최적화를 위해  $\text{MgCl}_2$  의 농도를 변화시키면서 positive plasmid DNA 와 negative, positive sample 에서 PCR 반응을 하였다 (Fig.13,14).

$\text{MgCl}_2$  2mM에서 sensitivity가 가장 민감했으나 negative control에서도 signal이 나왔으며  $\text{MgCl}_2$  3mM에서 sensitivity는 좋지 않았으나 negative sample에서 signal이 없으므로 MP3.4 primer set에서는 3mM을 사용하기로 했으나 보충실험의 결과 sensitivity나 specificity가 모두 기대이하로 나왔으므로 해서 MP3.4의 경우는 일단 보류하기로 하였다.



MP1.2의 경우는 (Fig. 15,16) 2mM에서 sensitivity도 좋았고 negative sample에서도 signal이 없어 MP1.2의 경우는 2mM을 사용키로 하였다.

이러한 조건으로 positive sample 9개와 negative sample 9개를 실험하였으나 (Fig. 17,18) negative sample에서 모두 positive가 나타났으므로 positive sample에서 나온 positive signal도 믿을 수 없게 되었다.

결론적으로 앞에서 이야기 하였던 첫번째 가능성 즉, 우리의 primer set들이 sample DNA에 다른 HIV-like sequence를 잡고 있다는 가능성은 비록 negative 결과로만 추측해 본 것이지만 일단 배제하기로 하였다. 이로써 남은 두번째 가능성 즉, 오염이 되었다는 가정을 가름해 보기 위하여 일단은 sample DNA를 준비하는 과정에 대한 검사를 하였다.

지금까지는 sample을 lysis시킨 후에 phenol/chloroform extraction과 함께 ethanol 침전을 수행하여 DNA만 분리하거나 lysis시킨 후, boiling하여 그대로 sample로 사용하였다.

이들에 대해서 각각의 시약들을 모두 새것으로 교체하고 다른 시약들과 격리시켜서 똑같은 방법으로 sample을 처리하였고 더불어서 상업적으로 판매하고 있는 genomic DNA isolation kit를 구입하여 kit내의 시료들만을 가지고 lymphocyte에서 부터 DNA를 추출하여 DNA 시료로 사용 실험하였다 (Fig.19).

3가지 방법에 대해 각각 negative sample 3가지, 그리고 positive sample 3가지씩을 준비하여 MP1.2 primer set를 가지고

PCR 하였다.

결과는 column 으로 정제한 DNA 시료의 경우, DNA 의 양이 적기는 하나 준비하는 과정에 상관없이 대개 positive signal 를 나타내어 일단 DNA 시료 준비과정에서 오염이 되었다고 생각되지는 않는다.

이러한 결과들을 토대로하여 MP1.2나 MP3.4의 경우 본 실험실에서 임의로 선택한 primer sequence 이므로 일단 논문에 보고된 primer set 들을 가지고 primer set 가 human genomic DNA 에 있을지도 모르는 HIV-like sequence 를 검출하지 않는다는 전제하에 각각의 실험과정들에서 오염가능성을 최소화하여 확실한 negative control 을 확립하기 위해 SK series 의 primer set 를 합성하였다.

### 3. SK 29,30 primer set 와 SK 38,39 primer set 에 대한 PCR 검사

일단 분리, 정제된 SK29,30 set 를 가지고 annealing 온도 63°C 에서 positive sample 3 가지와 negative sample 5 가지를 검사하였으나 (Fig.20) 앞서의 결과들에서 보는 것과 대부분의 경우 비슷한 양상을 보였고 반응정도도 많이 떨어져 있음을 알았다.

한편 SK 38, 39 primer set 는 annealing 온도 55°C 에서 positive sample 6 가지와 negative sample 8 종류를 검사하였는데 negative sample 중에서 거의 band 를 찾아볼 수 없는 sample 이 발견되었으므로 일단 이들 primer set 를 가지고 반응조건을 최적화

하기 위한 실험을 하였다.

그리고 PCR product 의 동정을 신속히 하기 위하여 일상적인 southern hybridization 방법에서 탈피하여 소요시간을 절반으로 줄일 수 있고 DNA transfer 등에서 오는 손실을 방지하여 sensitivity 도 높일 수 있는 liquid hybridization 방법을 도입하여 예비실험 (Fig .23) 을 거쳐 사용하였다.

SK 29, 30 set 의 반응조건 최적화를 위해  $MgCl_2$  농도를 1.5, 2, 3, 4 mM로 조정한 다음, 각각을 annealing 온도  $58^{\circ}C$ ,  $63^{\circ}C$ ,  $68^{\circ}C$  에서 PCR 검사하였고 sample 은 각각 negative 와 positive 1 가지씩 1 쌍으로 만든 조건에서 PCR product 를 검사하였다. (Fig . 24, 25, 26)

annealing 온도  $58^{\circ}C$  와 3 mM  $MgCl_2$  농도일 때 positive sample 에서 product 가 가장 많이 생성되었고 negative sample 에서 band 가 관찰되지 않았으므로 이런 조건이 가장 최적한 조건이라 생각 했고 논문에서는  $62^{\circ}C$  2 mM  $MgCl_2$  로 실험하였던 것과 비교하여  $MgCl_2$  농도는 3 mM annealing 온도는  $62^{\circ}C$  로 하여 positive sample 6 가지와 negative sample 9 가지를 검사한 결과 (Fig.27) negative sample 에서 band 가 확인되지 않는 sample 이 있었으나 이는 positive sample 과 비교해 볼 때 column 으로 분리된 lymphocyte DNA 시료의 경우에서 band . 확인이 안되는 것으로 미루어 봐서 반응된 정도가 떨어지므로 해서 band 의 확인이 안된 것으로 추측했고 우선은 위의 조건을 가지고 새로운 lymphocyte 를 가지고 실험하기로 했다.

한편, SK38, 39 set도 annealing 온도를 60 °C로 올려서 2mM MgCl<sub>2</sub> 농도에서 positive와 negative sample들을 검사하였는데 (Fig.28,29) negative sample 중에서 비교적 여러개의 sample에서 band가 나타나지 않았으므로 이런 조건하에서 SK29, 30 set와 더불어 계속적으로 negative sample을 입수하여 각 sample들을 준비하는 과정에서 오염의 가능성이 있는 step들, 또는 기구등을 없애거나 보완하여 가면서 negative control을 확립하고자 하였다.

sample들의 serial number 1의 10가지 negative sample을 검사한 결과 (Fig.30,31) SK 38, 39 primer set에서 10개중 3개에서 negative signal을 얻었으나 positive control인 plasmid DNA에서도 약한 signal을 보였으므로 반응양이 적기 때문일지도 모른다고 생각하여 primer elution buffer를 Tris-based buffer로 바꾸어서 계속 실험하였다.

Sample serial number 4의 10개 negative sample을 검사한 결과 (Fig.32,33) SK29, 30 set와 SK38, 39 set 모두에서 negative signal을 보였으므로 아마도 반응 mixture를 만드는 동안에 plasmid DNA 등의 오염이 되었을 가능성이 가장 높으므로 반응 mixture를 먼저 premix로 만들어서 반응시키는 system을 도입하였다.

#### **4. Premix system과 UV Decontamination을 이용한 PCR방법의 확립**

PCR 반응은 매우 민감한 기술이므로 매우 적은 양의 DNA 만이라도 오염된 경우 나타나는 결과는 크게 달라질 수 있으므로

이런 가능성을 줄이기 위해 반응 buffer, nucleotide, primer, water 들을 DNA 오염이 최소인 환경아래서 미리 eppendorf tube 에 mixture 로 넣은 후 보관하였다가 반응시에 DNA sample 과 mineral oil, enzyme 만을 더하고 반응하여 오염 가능성을 극소화하고자 하였으며, 일단 mixture 로 만든 후에 UV로 mixture 를 조사하여 solution 내에 오염되었을 DNA 가 template 로 사용되는 것을 방지하고자 하였다.

이를 위해 premix system 과 UV decontamination 을 하여 plasmid DNA 로 부터 PCR 산물의 양이 어떻게 변하는지를 보고자 했다. (Fig.34).

SK 29, 30 primer set 의 경우  $10^{-7}$ ng plasmid 존재하에 UV 로 20 분이상 조사한 경우, PCR product band 를 확인할 수 없었으며 SK 38, 39 primer set 의 경우 30 분을 조사하였을 경우 조사하지 않았거나 5 분, 10 분 조사한 것 보다 product 의 양이 줄어들음을 확인하여 UV 에 의한 오염방지가 효과가 있다고 생각하고 있으며 이런 절차를 걸친 경우 PCR 반응정도에 영향을 미치는지 알아보기 위해 plasmid DNA 를 희석하여 PCR 반응정도를 알아본 결과  $10^{-7}$  ng 까지도 band 확인이 가능하여  $10^{-8}$ ng 까지도 희미한 band 를 확인하였다. (Fig. 35, 36).

이런 절차로 sample serial number 6 의 negative sample 10 개 를 검사한 결과 (Fig.37,38) SK29,30 primer set 의 경우 10 개 모두 negative signal 을 보였고 SK38,39 primer set 에서는 1 개가 positive signal 을 나타냈으나 보충실험 결과 negative 로 확인



되었다.

sample serial number 8 의 negative sample 20 개를 검사한 결과 (Fig. 39, 40, 41, 42) 1 차, 2 차 결과를 종합하여 SK29, 30 set와 SK38, 39 set 모두에서 negative signal 을 볼 수 있었다.

한편 국립보건원에서 받은 positive sample 20 가지를 새로 준비하여 각각을 위의 방법으로 검사한 결과 SK29, 30 set 에서는 3 개를 제외한 나머지에서 모두 positive signal 을 나타내었고 SK 38, 39 set 에서는 4 개를 제외한 나머지에서 모두 positive signal 을 나타내었는데 이들을 종합해보면 sample number 10, 15, 18 에서 양쪽 primer 에 모두 negative 로 나타났다 (Fig. 43, 44, 45, 46, 47).

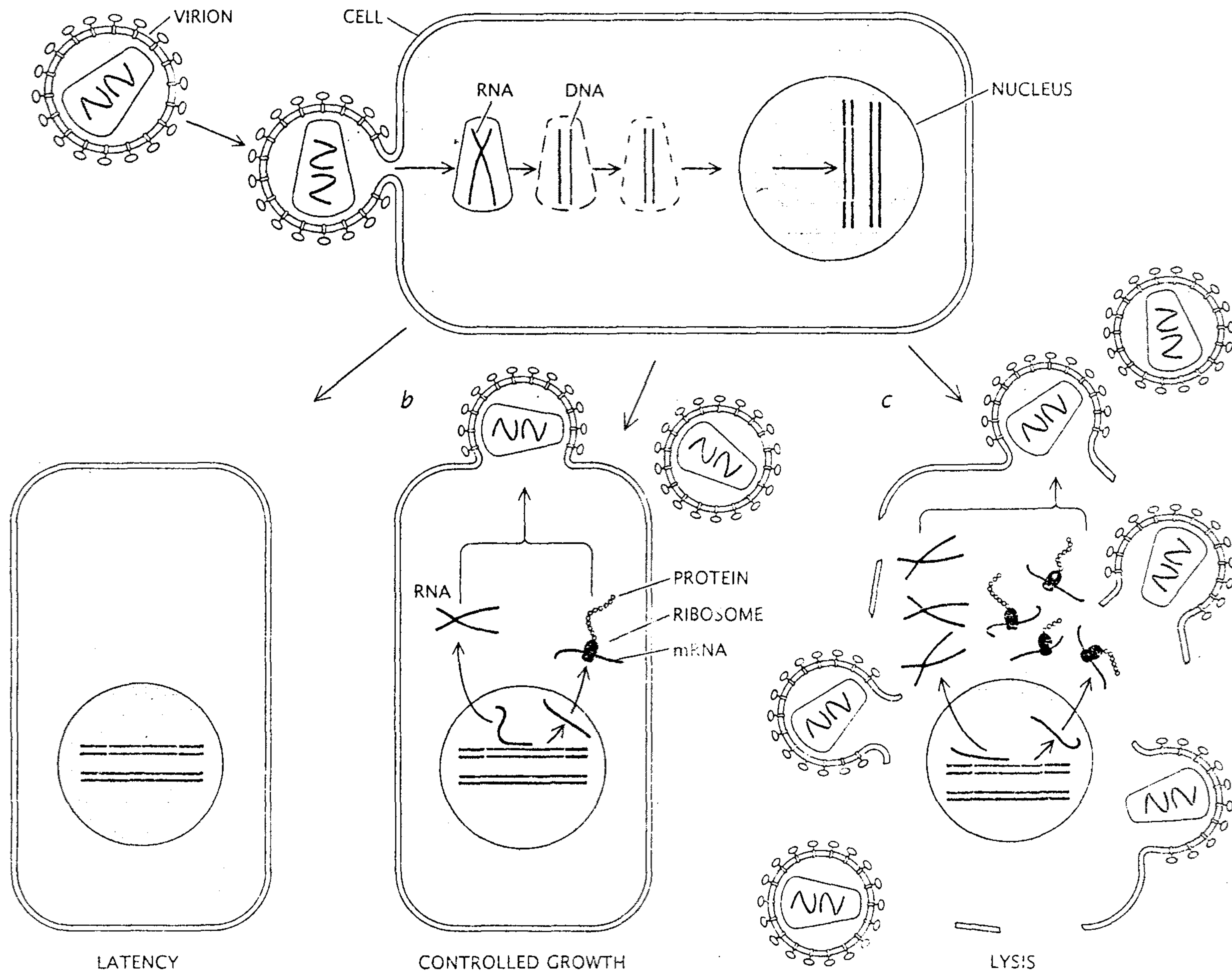


Fig 1 Life cycle of HIV-1.

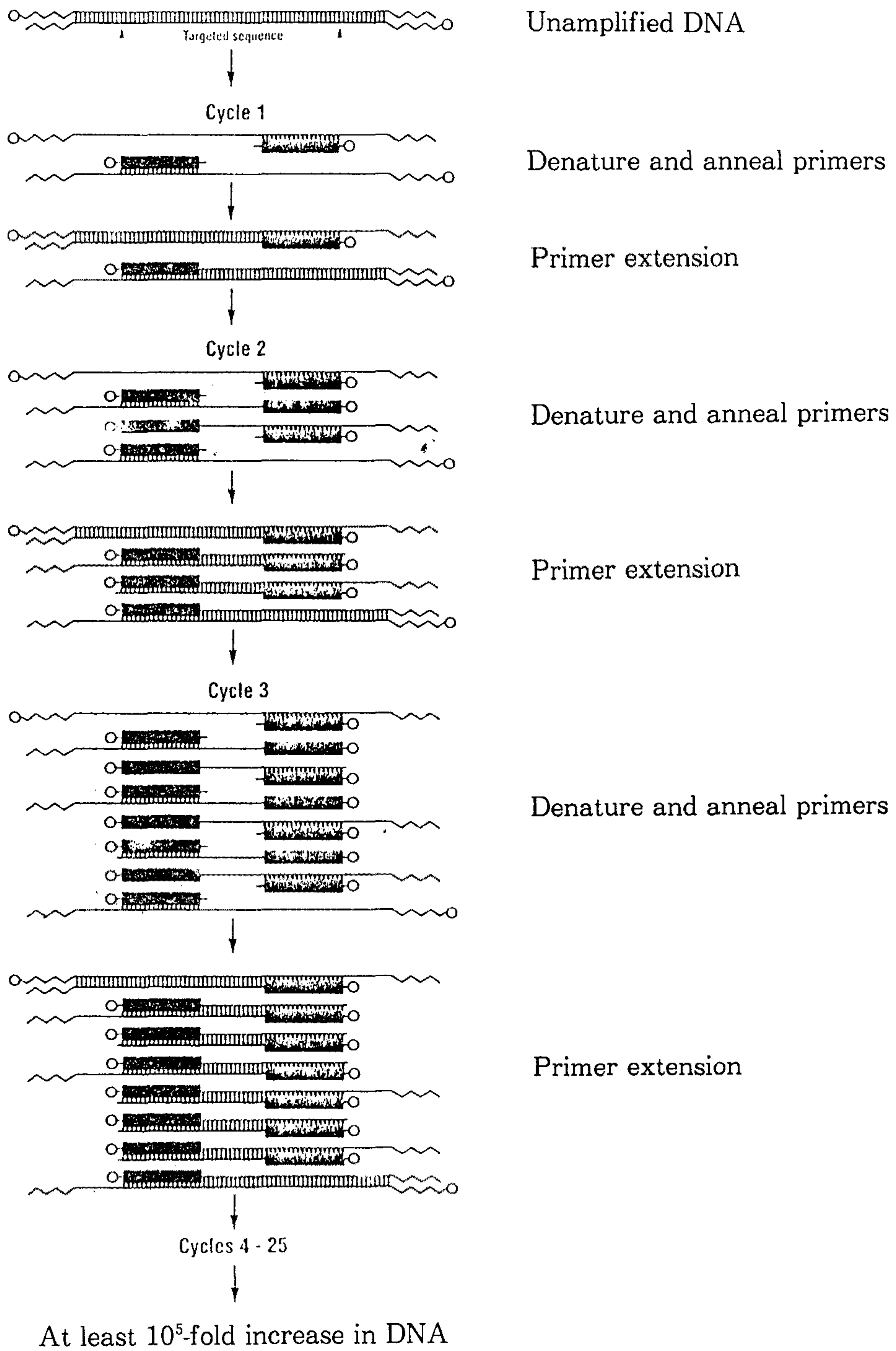


Fig. 2. Principle of DNA amplification in the PCR.

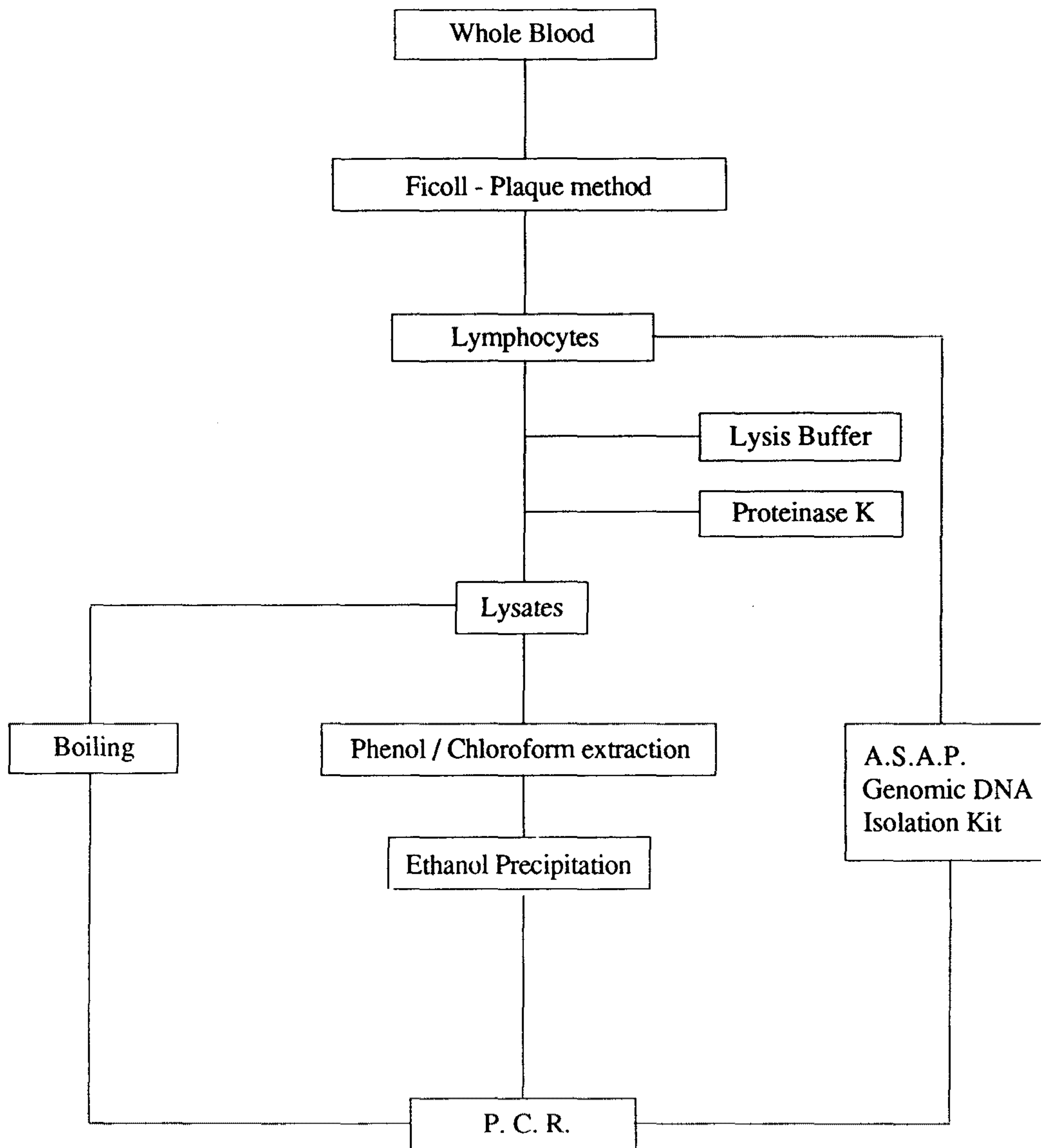


Fig. 3. Schematic representation of lymphocyte DNA preparation for PCR reaction.

Table 1. 각 Probe에 대한 Hybridization solution의 조성

Probe 의 종류	Hybridization solution 의 조성
Random - primer labeled DNA Probe	6 X SSPE 5 X Denhardt's Solution 50 % (V/V) Formamide 0.5 % Sodium Dodecyl Sulfate 100 ug/ml Single Stranded Salmon Sperm DNA
Nonradioactive labeled DNA Probe	5 X SSPE 5 % Blocking Reagent 50 % (V/V) Formamide 0.1 % (W/V) Sarcosine 0.02 % (W/V) Sodium Dodecyl Sulfate
oligonucleotide Probe	5 X SSPE 0.1 % Sodium Dodecyl Sulfate 100 ug/ml Single Stranded Salmon Sperm DNA

20 X SSPE : 3 M NaCl, 0.23 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.02 M EDTA.

50 X Denhardt's Solution : 1 % Ficoll 400, 1 % Polyvinylpyrrolidone, 1 % BSA (Fraction V)



Table 2. 각 Probe에 대한 Washing condition 및 Washing solution의 조성

Probe 의 종류	Washing Procedure
Random - primer labeled DNA Probe 와 Nonradioactive labeled DNA Probe	<ul style="list-style-type: none"> <li>* First Washing</li> <li style="padding-left: 20px;">300 ml Solution I ( 2 X SSC, 0.1 % SDS ) at Room Temperature , 20 분간, 3번 반복</li> <li>* Second Washing</li> <li style="padding-left: 20px;">500 ml Solution II ( 1 X SSC, 0.1 % SDS ) at 60 'C, 30 분간, 2 번 반복</li> </ul>
Oligonucleotide Probe	<ul style="list-style-type: none"> <li>* First Washing</li> <li style="padding-left: 20px;">300 ml Solution A ( 5 X SSC, 0.1 % SDS ) at Room Temperature, 15 분간, 4 번 반복</li> <li>* Second Washing</li> <li style="padding-left: 20px;">300 ml Solution B ( 5 X SSC, 0.1 % SDS ) at Tm - 5 'C , 5 분간, 2 번 반복.</li> </ul>

20 X SSC : 3 M NaCl, 0.3 M Sodium Citrate.

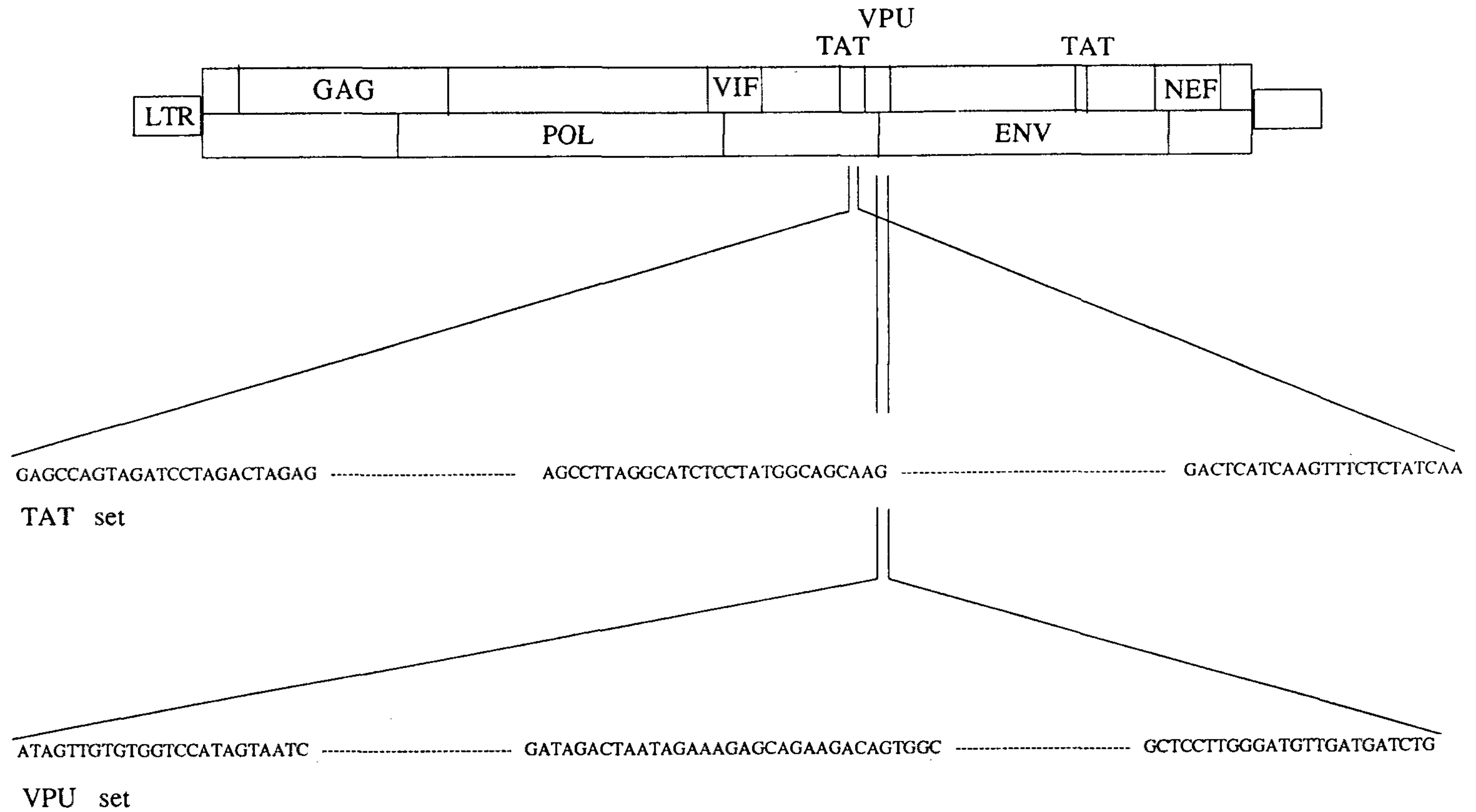


Fig 4 Strategy for the PCR with TAT primer set(from 5415 to 5621) and VPU primer set(from 5699 to 5887)

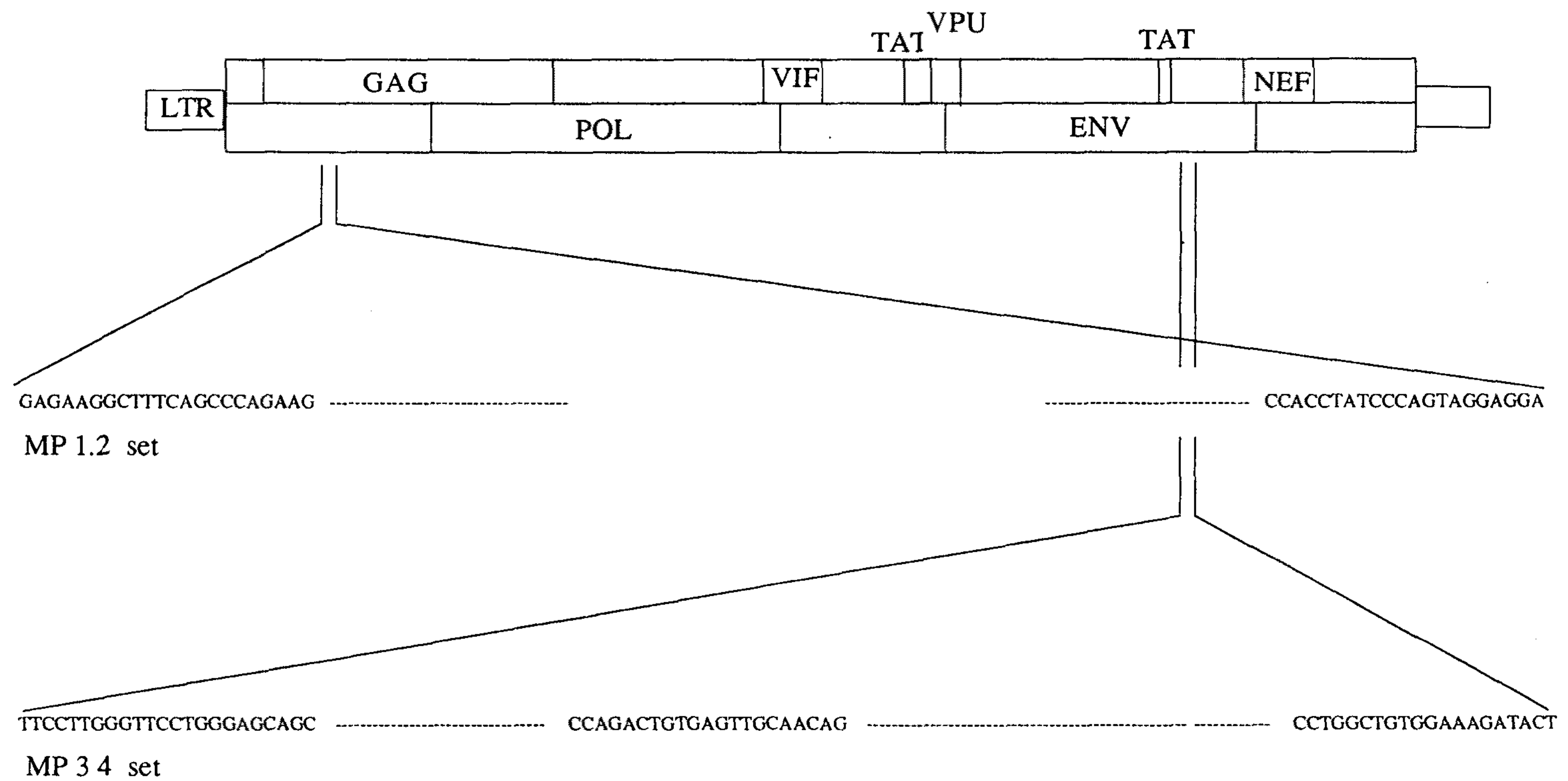


Fig 5 Strategy for the PCR with MP1.2 primer set(from 814 to 1113) and MP3 4 primer set(from 7359 to 7564)

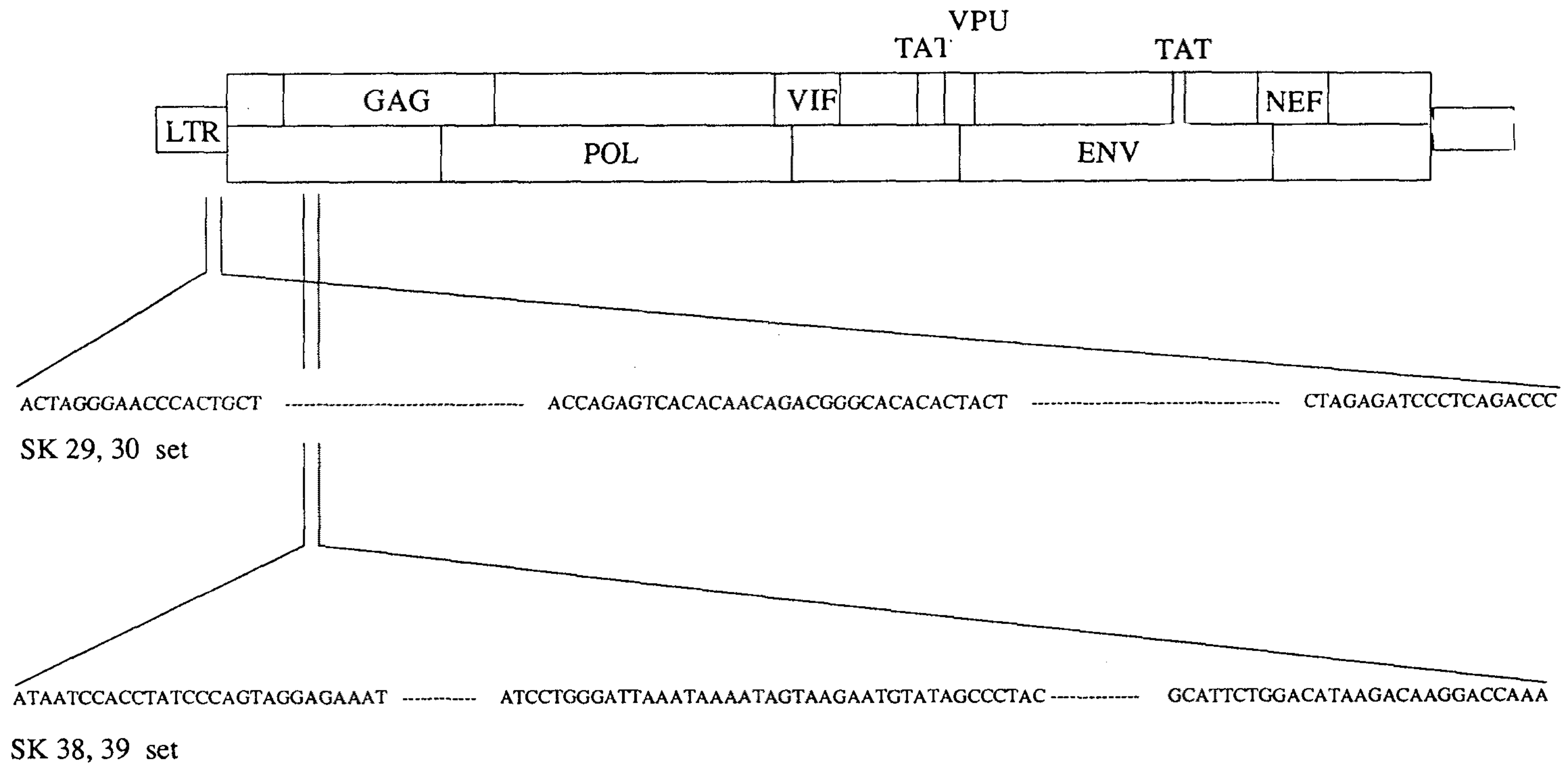


Fig 6 Strategy for the PCR with SK29, 30 primer set(from 48 to 152) and SK38, 39 primer set(from 1088 to 1202)



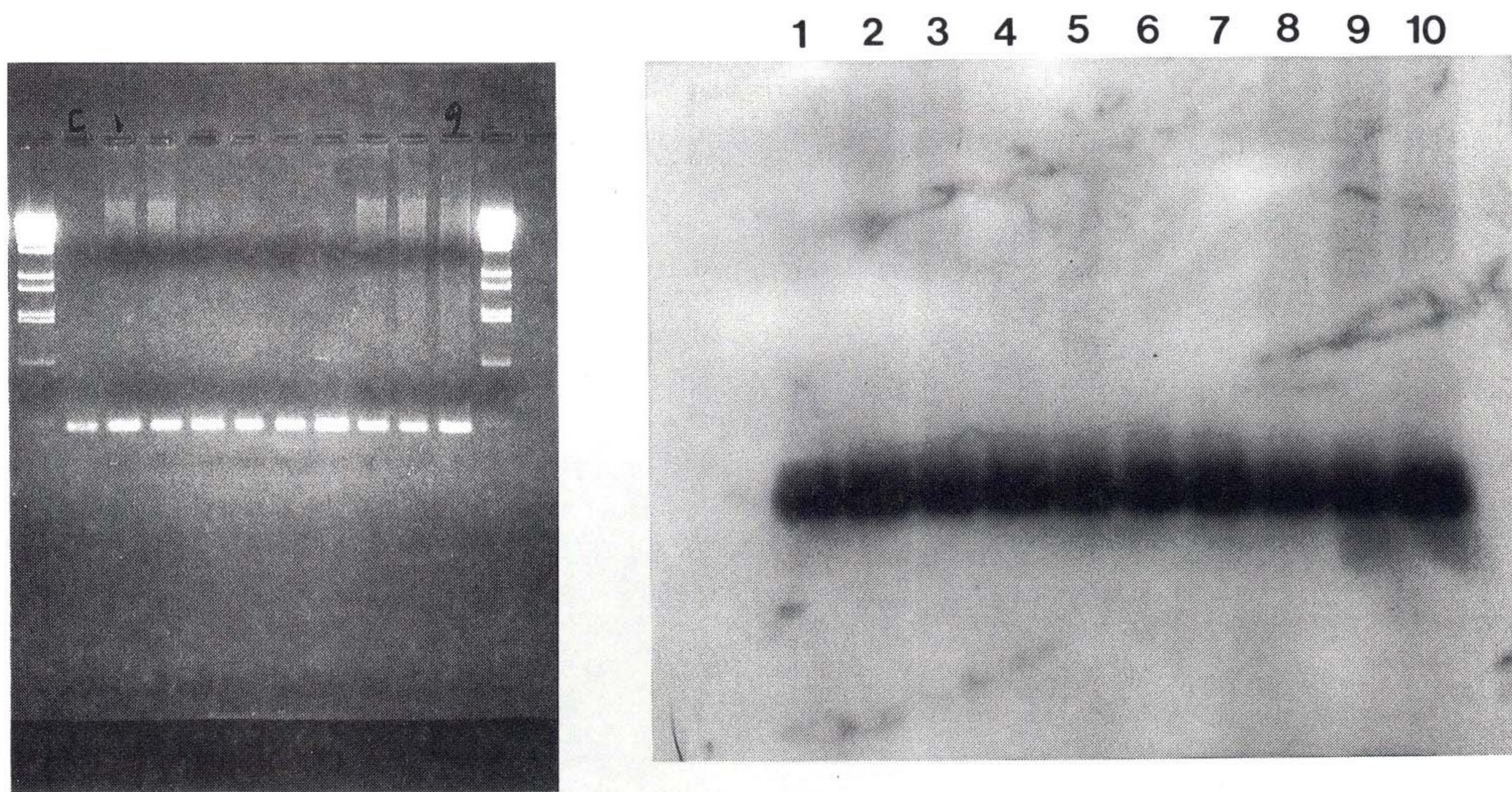


Fig. 7. PCR product(TAT primer set) detection by random primer labeled DNA probe in negative samples.

lane 1 : Positive control plasmid DNA

lane 2-10 : Lymphocyte DNA from negative samples



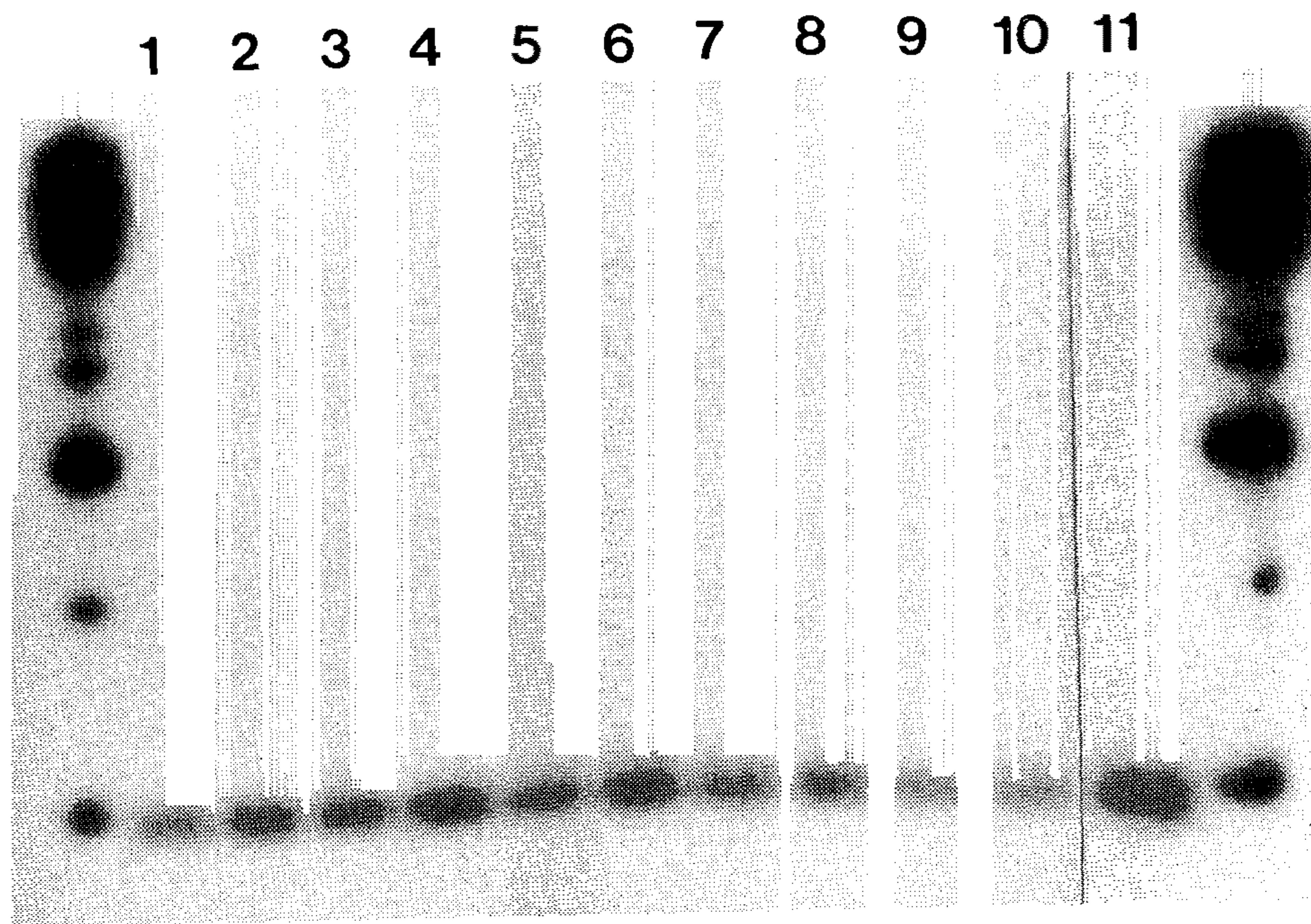


Fig. 8 PCR product(TAT primer set) detection by random primer labeled DNA probe in negative samples  
lane 1-10 Lymphocyte DNA from negative samples  
lane 11 Positive control plasmid DNA

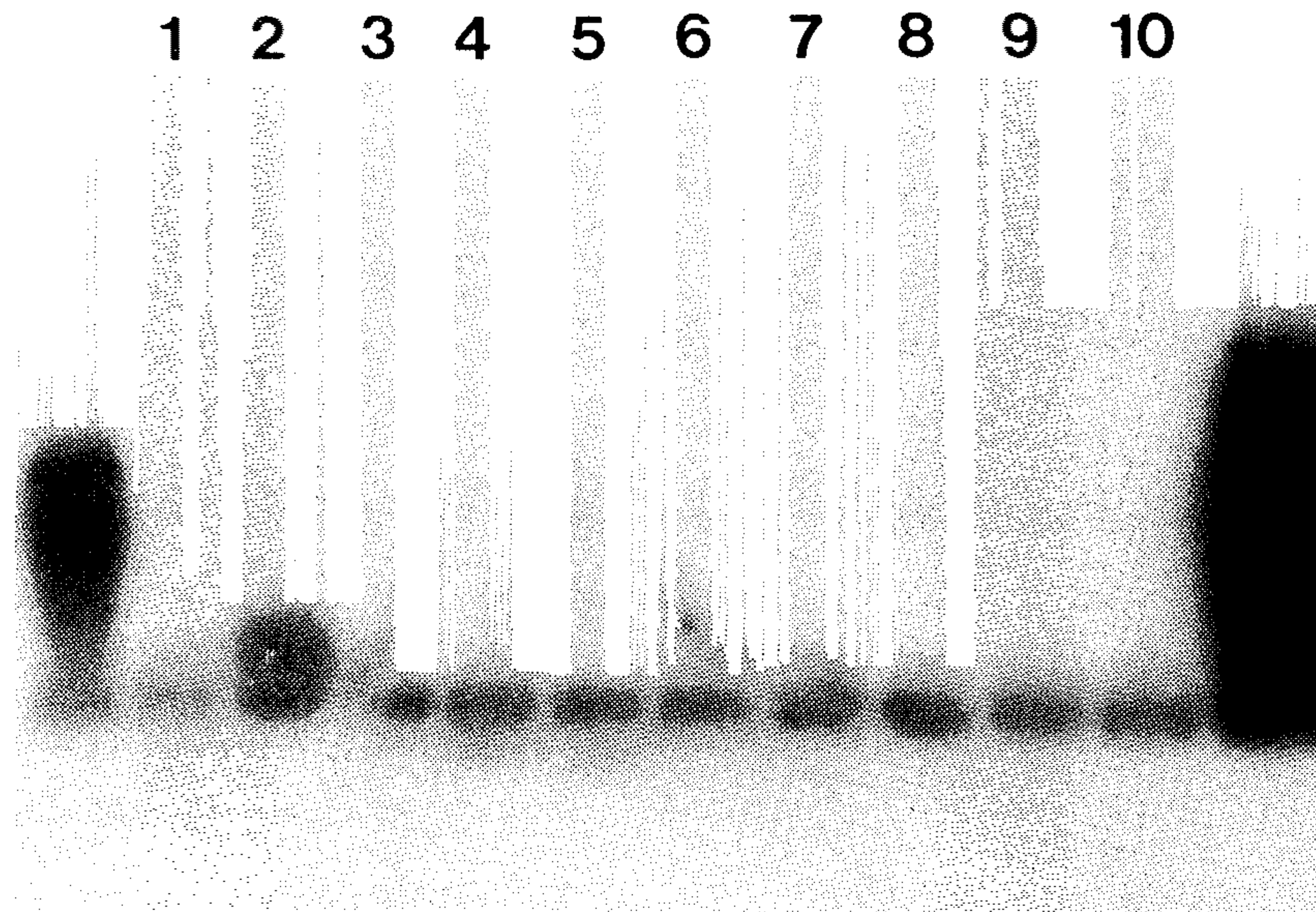


Fig 9 PCR product(VPU primer set) detection by random primer labeled DNA probe in negative samples  
lane 1-10 Lymphocyte DNA from negative samples



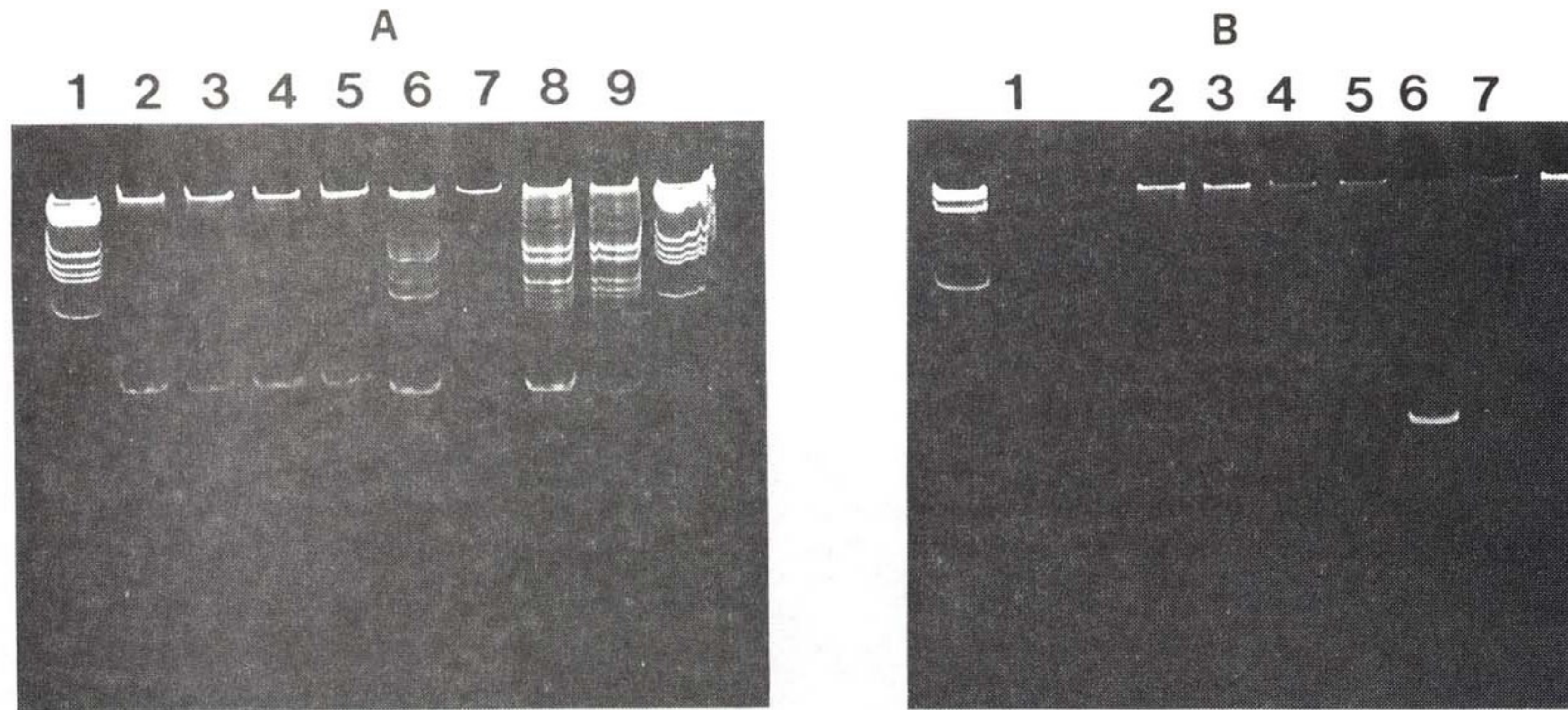


Fig. 10. Electrophoretic pattern of PCR product in 10% polyacrylamide gel.

- (A) lane 2, 3 : Human leukemia cell의 DNA(TAT primer set)  
lane 4, 5 : Monkey lymphoma cell의 DNA(TAT primer set)  
lane 6, 7 : Human leukemia cell의 DNA(VPU primer set)  
lane 8, 9 : Human leukemia cell의 DNA(VPU primer set)

(B) Using TAT primer set:

- lane 2 : Lymphocyte DNA from positive sample  
lane 3 : Lymphocyte DNA from negative sample  
lane 4 : Human leukemia cell DNA  
lane 5 : Lymphocyte DNA from negative sample  
lane 6 : E. coli genomic DNA  
lane 7 : Positive control plasmid DNA



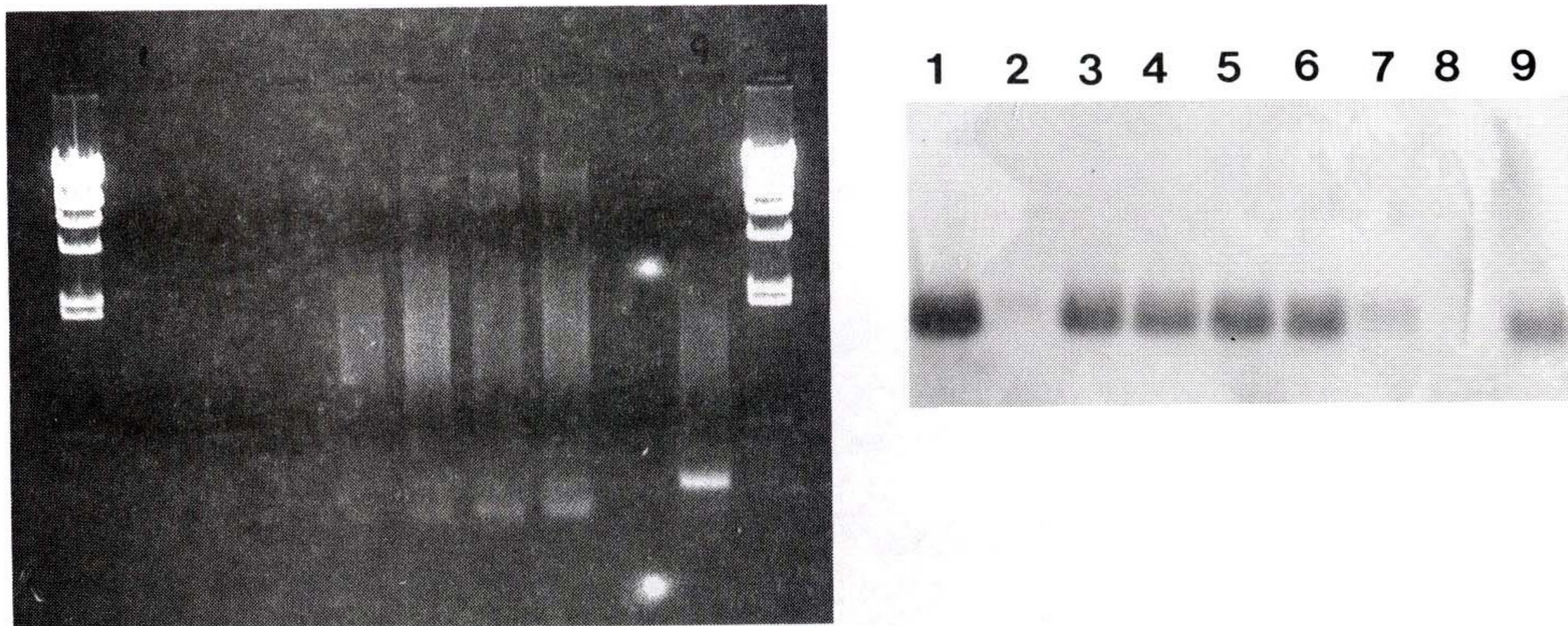


Fig. 11. PCR product(MP1.2 primer set) detection by nonradioactive labeled DNA probe in negative samples.  
lane 1-8 : Lymphocyte DNA from negative samples  
lane 9 : Positive control plasmid DNA



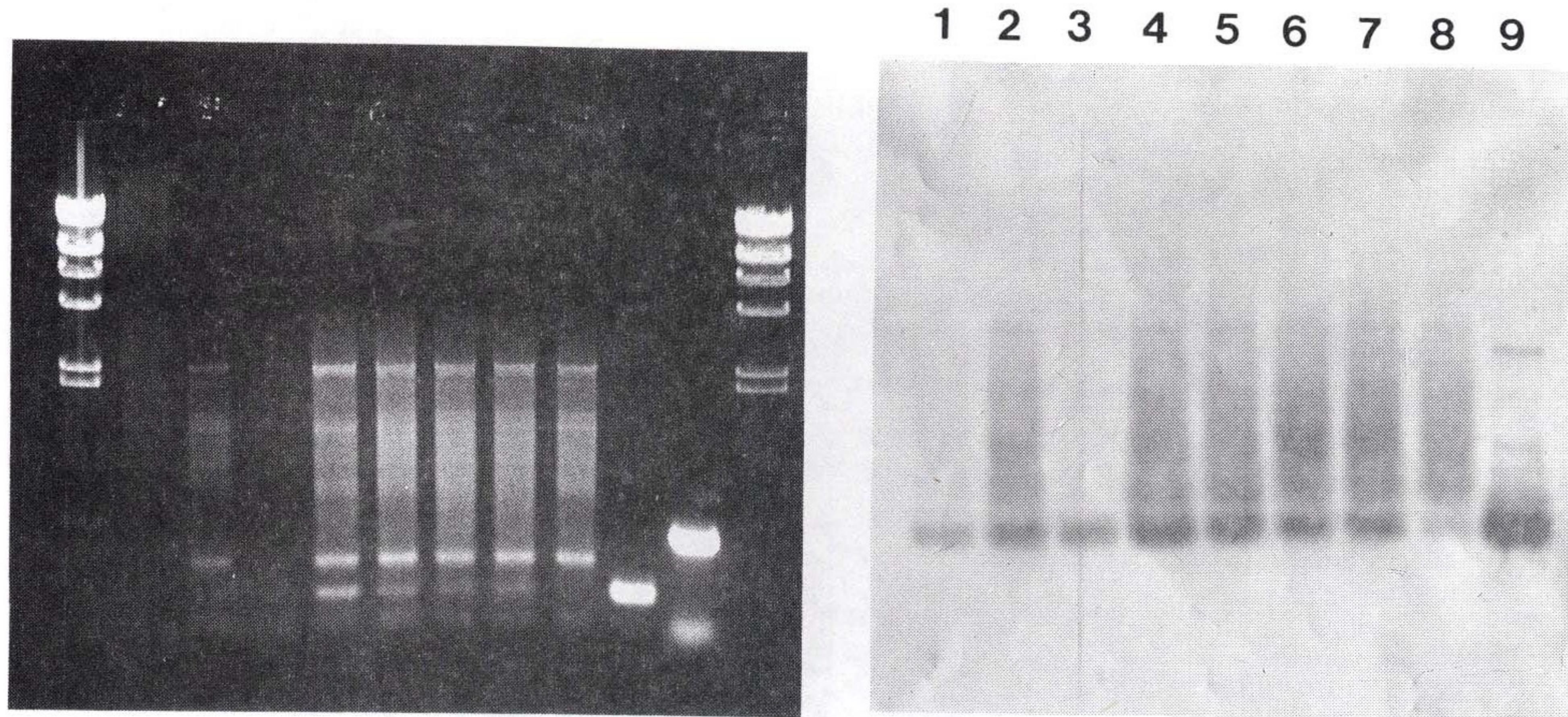


Fig. 12. PCR product(MP3.4 primer set) detection by nonradioactive labeled DNA probe in negative samples.  
lane 1-8 : Lymphocyte DNA from negative samples  
lane 9 : Positive control plasmid DNA.



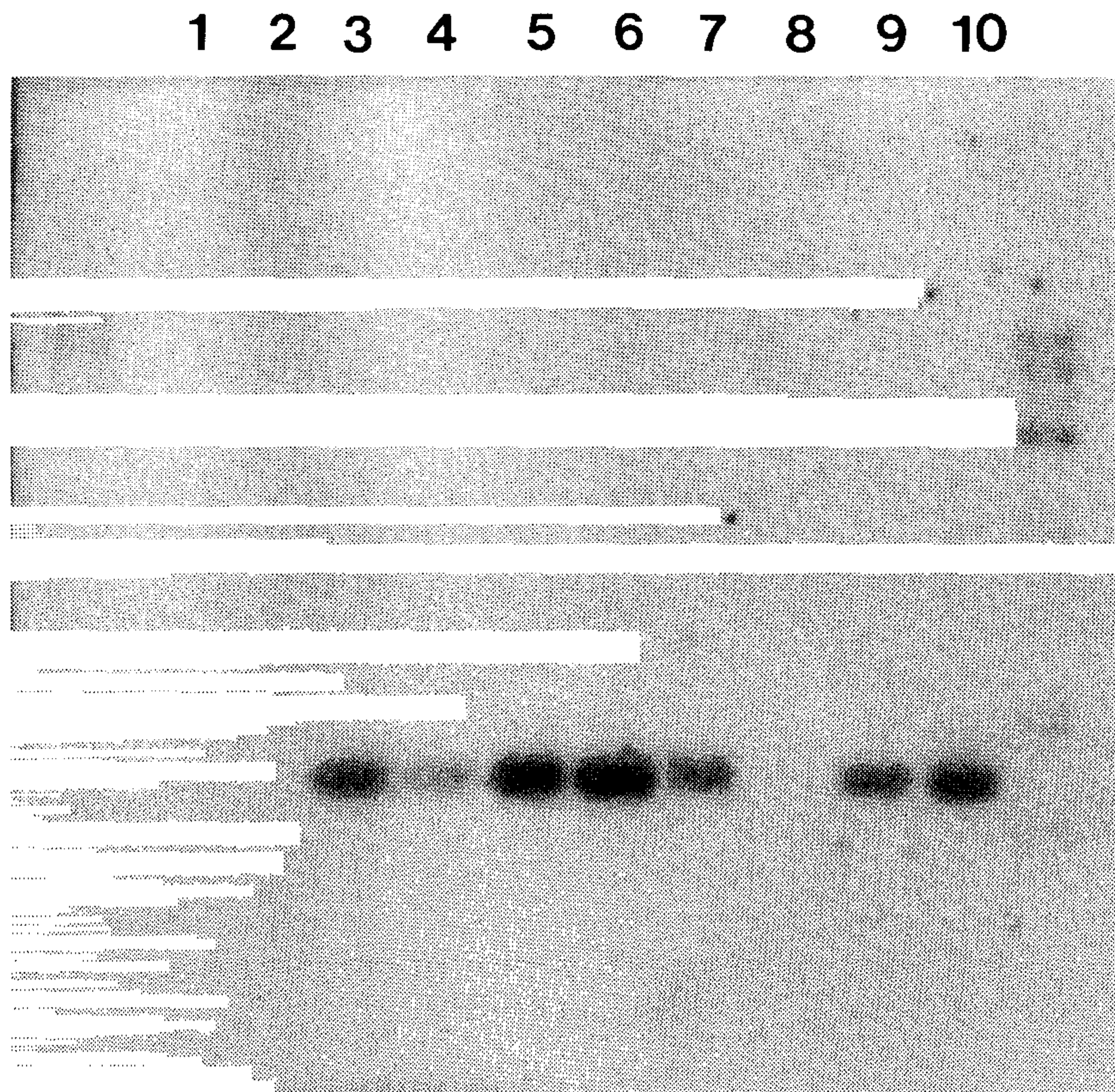


Fig. 13. Autoradiogram of PCR product(MP3.4 primer set) with variation of  $MgCl_2$  concentration .

lane 1-5 : 1.5mM  $MgCl_2$

lane 6-10 : 2mM  $MgCl_2$

lane 1, 6 : Positive control plasmid DNA  $10^{-4}$  ng

lane 2, 7 : Positive control plasmid DNA  $10^{-6}$  ng

lane 3, 8 : Positive control plasmid DNA  $10^{-8}$  ng

lane 4, 9 : Human leukemia cell DNA for negative control

lane 5, 10 : Lymphocyte DNA from negative sample

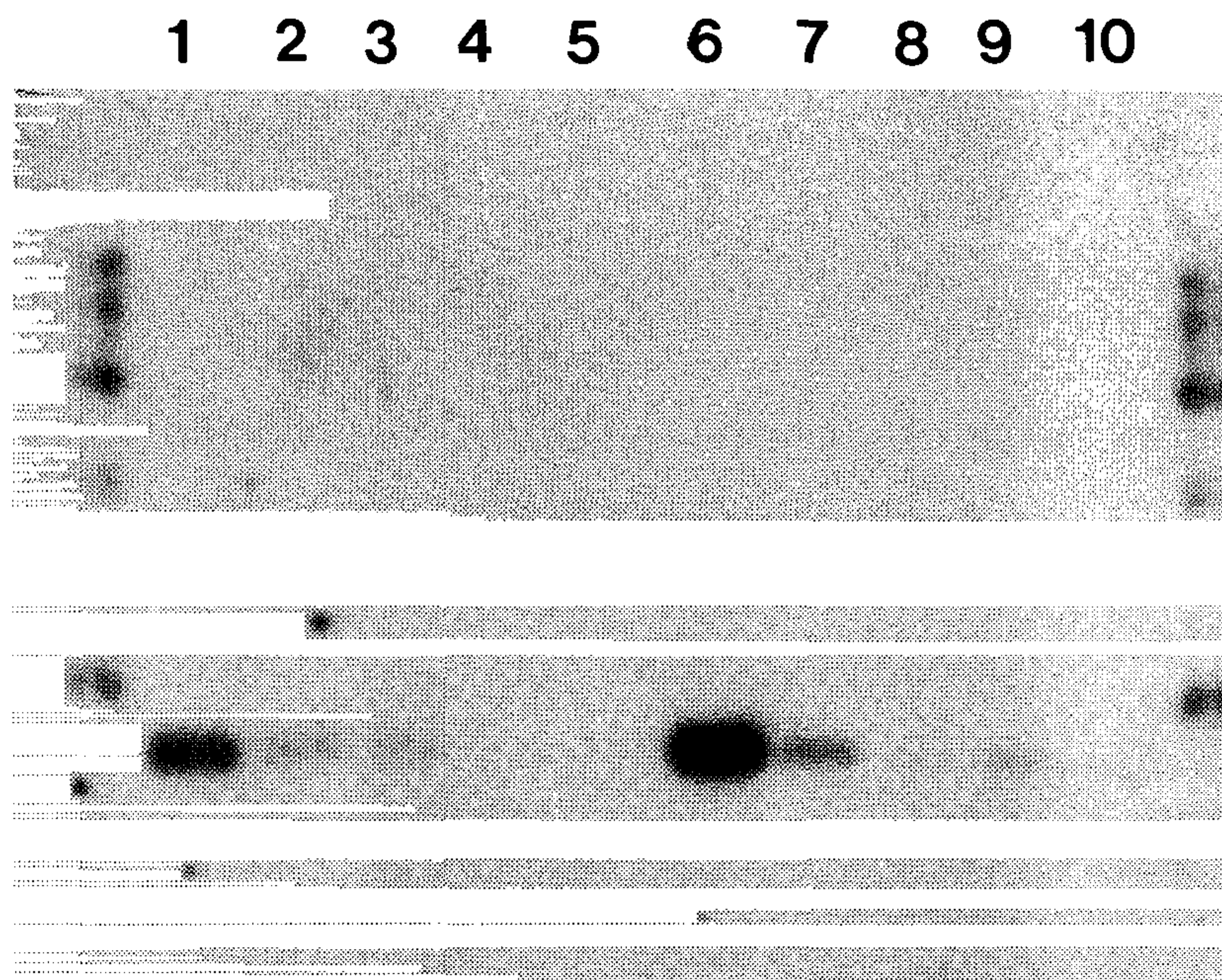


Fig. 14. Autoradiogram of PCR product(MP3.4 primer set) with variation of  $MgCl_2$  concentration.

lane 1-5 : 3mM  $MgCl_2$

lane 6-10 : 4mM  $MgCl_2$

lane 1, 6 : Positive control plasmid DNA  $10^{-4}$  ng

lane 2, 7 : Positive control plasmid DNA  $10^{-6}$  ng

lane 3, 8 : Positive control plasmid DNA  $10^{-8}$  ng

lane 4, 9 : Human leukemia cell DNA for negative control

lane 5, 10 : Lymphocyte DNA from negative sample



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

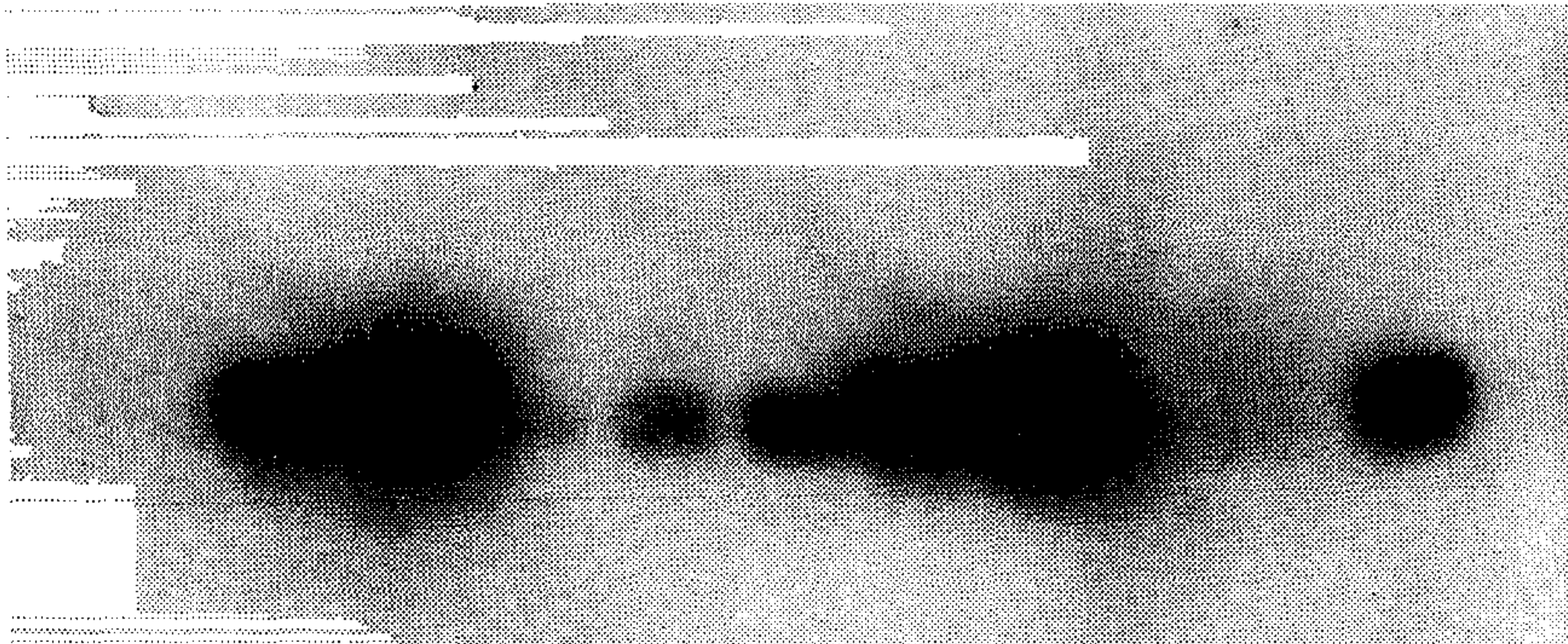


Fig. 15. Autoradiogram of PCR product(MP1.2 primer set) with variation of MgCl<sub>2</sub> concentration .

lane 1-5 : 1.5mM MgCl<sub>2</sub>                      lane 6-10 : 2mM MgCl<sub>2</sub>

lane 1, 6 : Positive control plasmid DNA 10<sup>-4</sup> ng

lane 2, 7 : Positive control plasmid DNA 10<sup>-6</sup> ng

lane 3, 8 : Positive control plasmid DNA 10<sup>-8</sup> ng

lane 4, 9 : Human leukemia cell DNA for negative control

lane 5, 10 : Lymphocyte DNA from negative sample

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

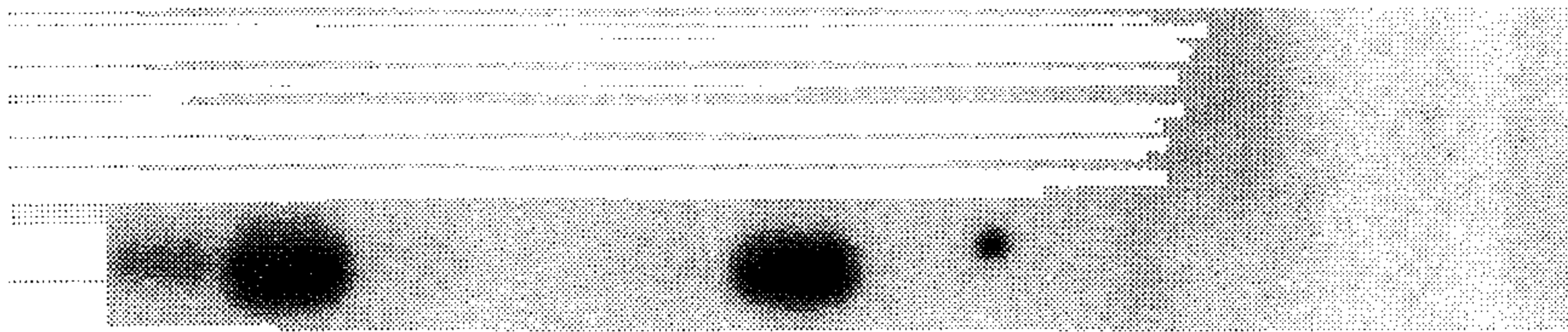


Fig. 16. Autoradiogram of PCR product(MP1.2 primer set) with variation of  $MgCl_2$  concentration .

lane 1-5 : 3mM  $MgCl_2$

lane 6-10 : 4mM  $MgCl_2$

lane 1, 6 : Positive control plasmid DNA  $10^{-4}$  ng

lane 2, 7 : Positive control plasmid DNA  $10^{-6}$  ng

lane 3, 8 : Positive control plasmid DNA  $10^{-8}$  ng

lane 4, 9 : Human leukemia cell DNA for negative control

lane 5, 10 : Lymphocyte DNA from negative sample



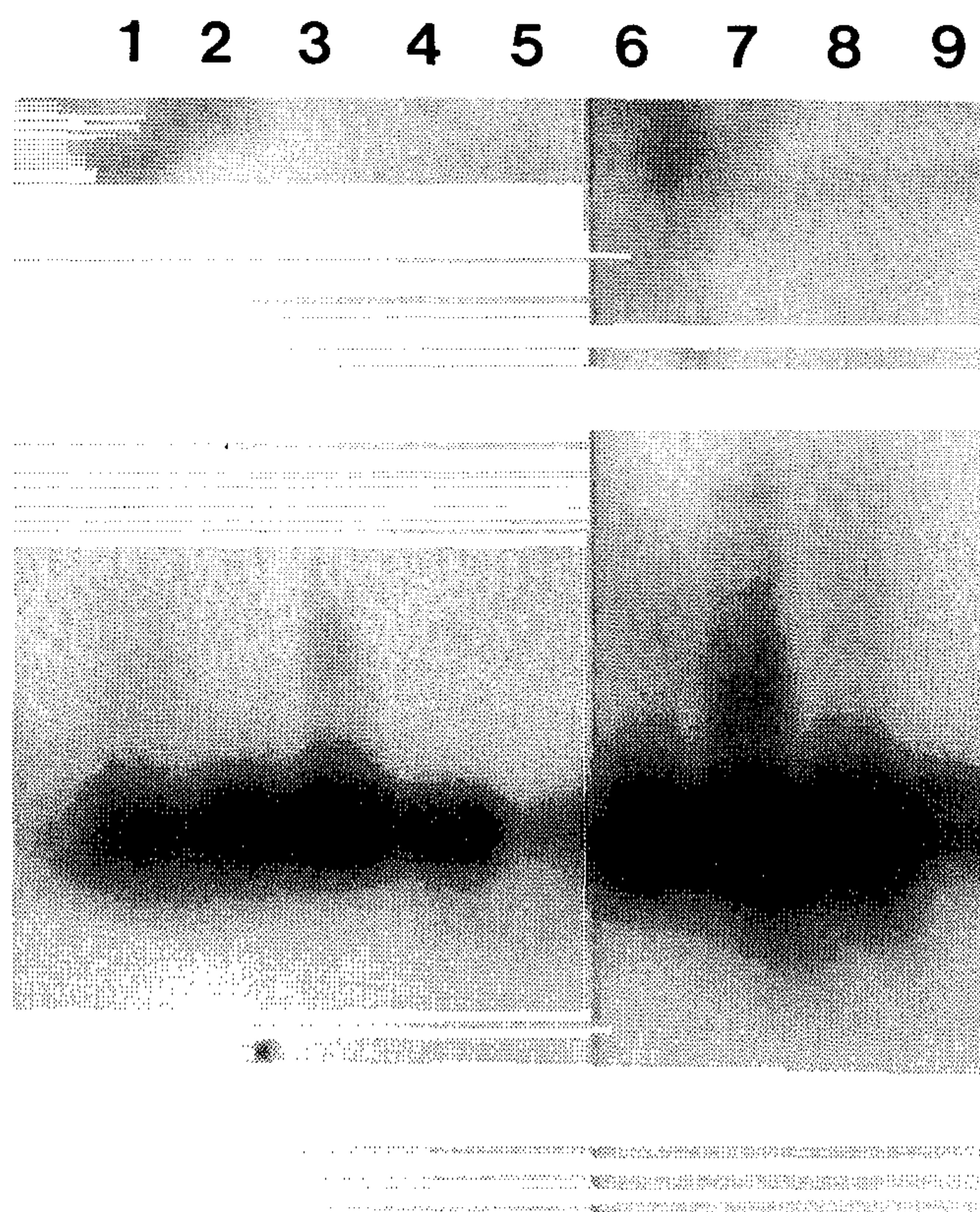


Fig. 17. Autoradiogram of PCR product from the positive samples using MP1.2 set.

Lane 1-9 : Lymphocyte DNA from positive samples

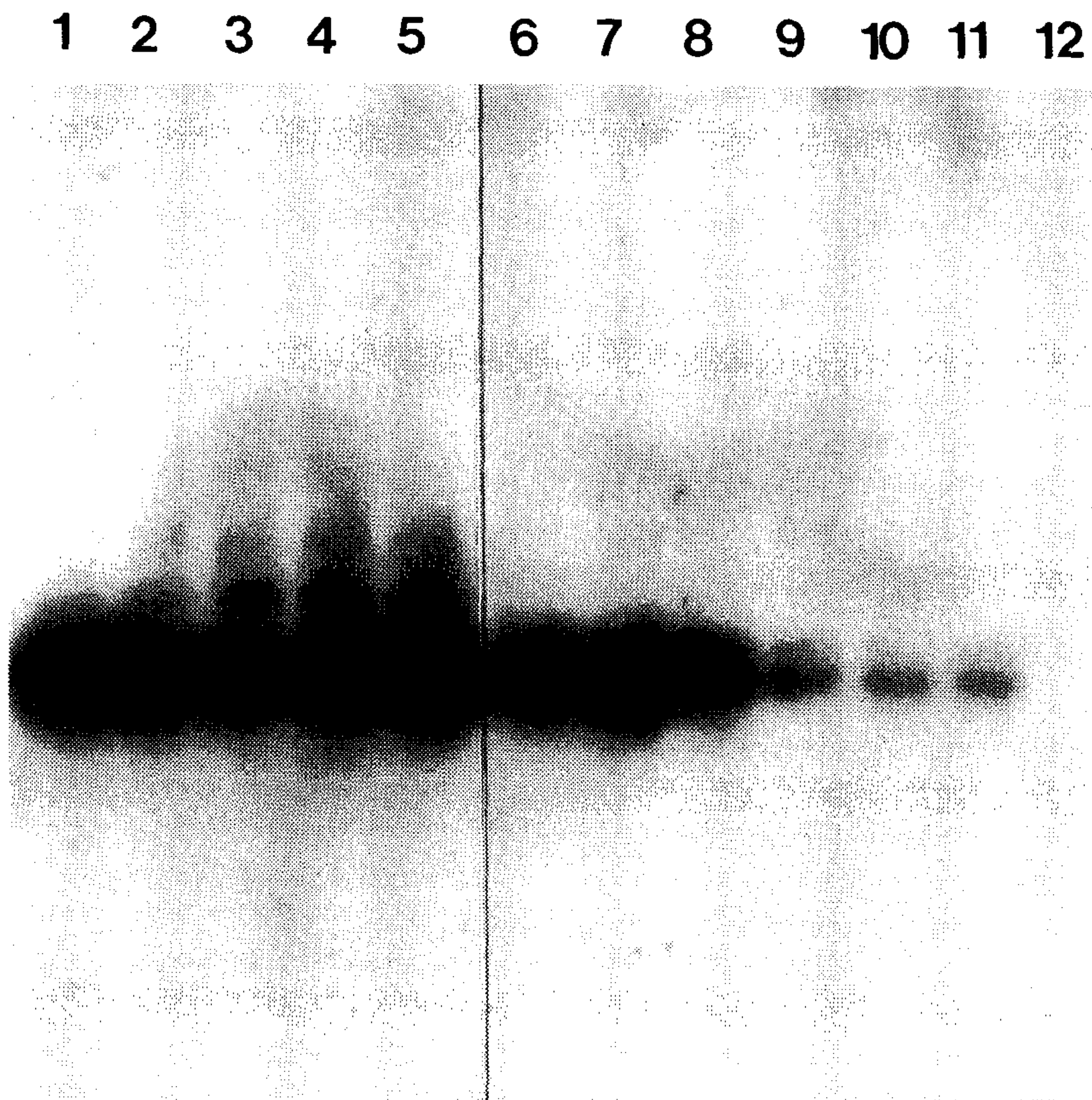


Fig. 18. Autoradiogram of PCR product from the negative samples using MP1.2 set.

Lane 1-9 : Lymphocyte DNA from negative samples

lane 10, 11 : Positive control plasmid DNA

lane 12 : No DNA

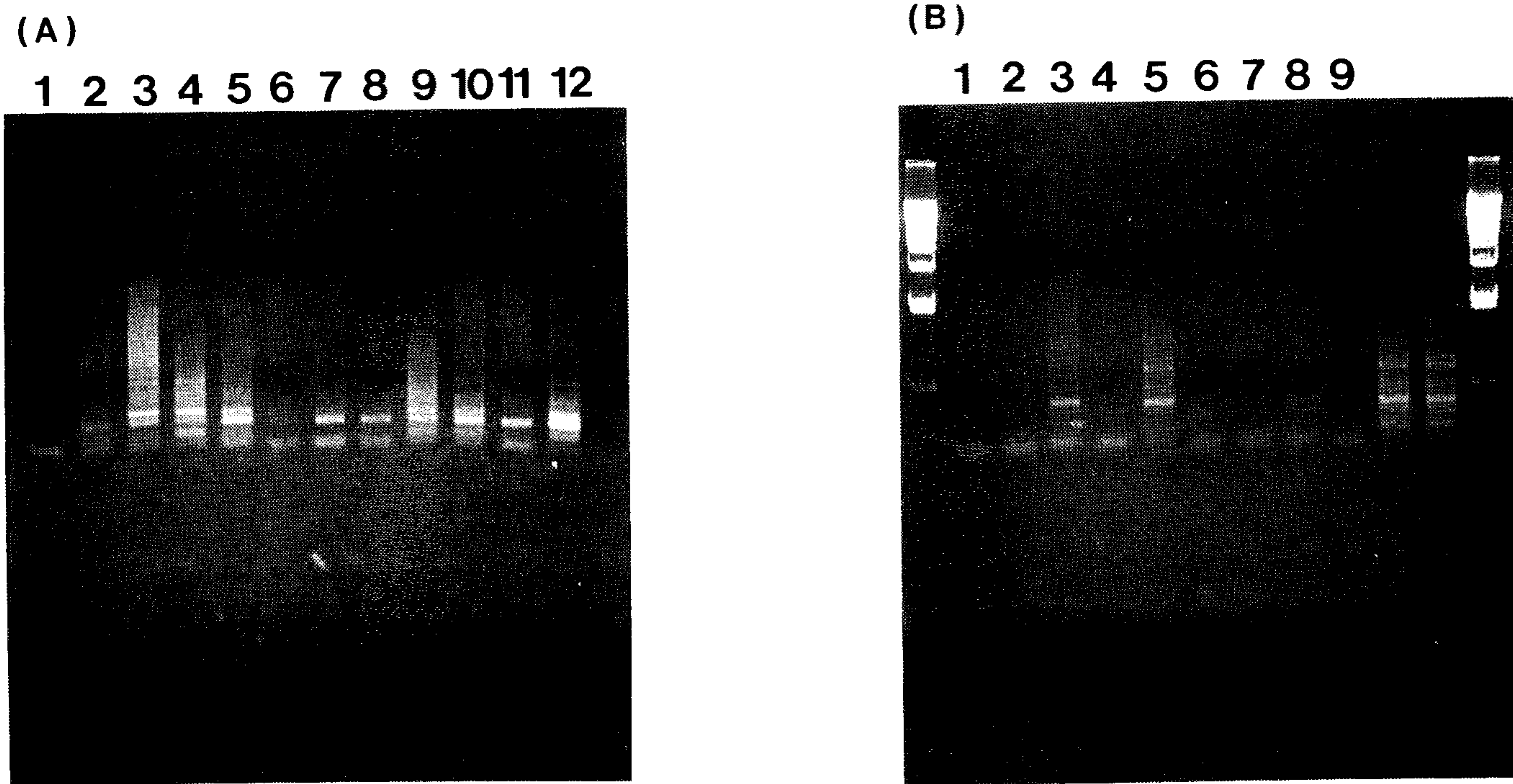


Fig 19 Electrophoretic pattern of PCR product(MP1 2 primer set) from negative and positive samples with variation of sample-prep methods.

- (A) lane 1-3 Lymphocyte DNA from positive samples lysis and ethanol precipitation method
- lane 7-9 Lymphocyte DNA from negative samples lysis and ethanol precipitation method
- lane 4-6 Lymphocyte DNA from positive samples Lysis only
- lane 10-12 Lymphocyte DNA from negative samples Lysis only
- (B) lane 1-3 Lymphocyte DNA from positive samples column elution method
- lane 4-8 Lymphocyte DNA from negative samples column elution method
- lane 9 No DNA



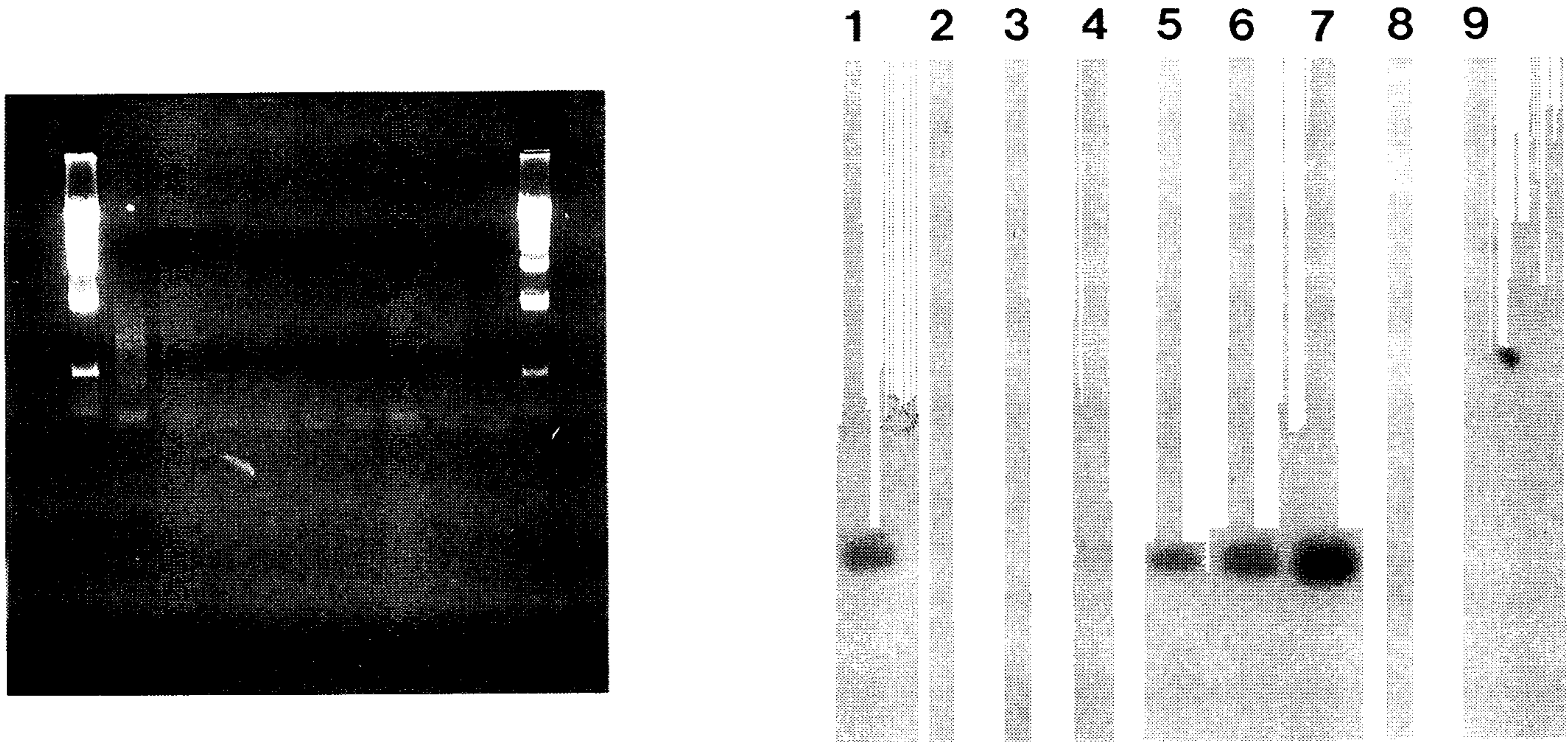


Fig 20 PCR product(SK29, 30 primer set) detection by oligonucleotide probe in positive and negative samples.  
lane 1-3 : Lymphocyte DNA from positive samples    lane 4-8    Lymphocyte DNA from negative samples  
lane 9    No DNA



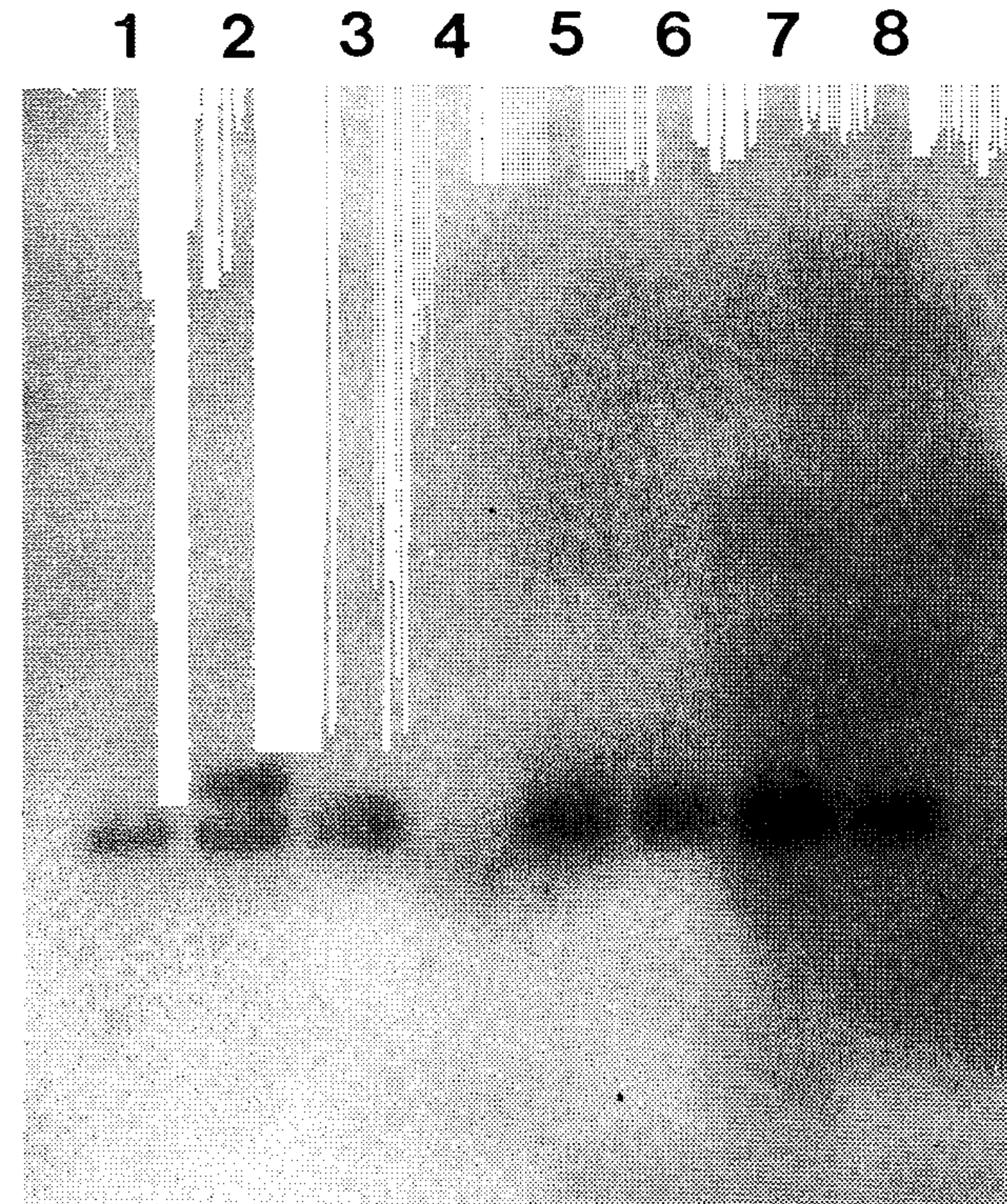
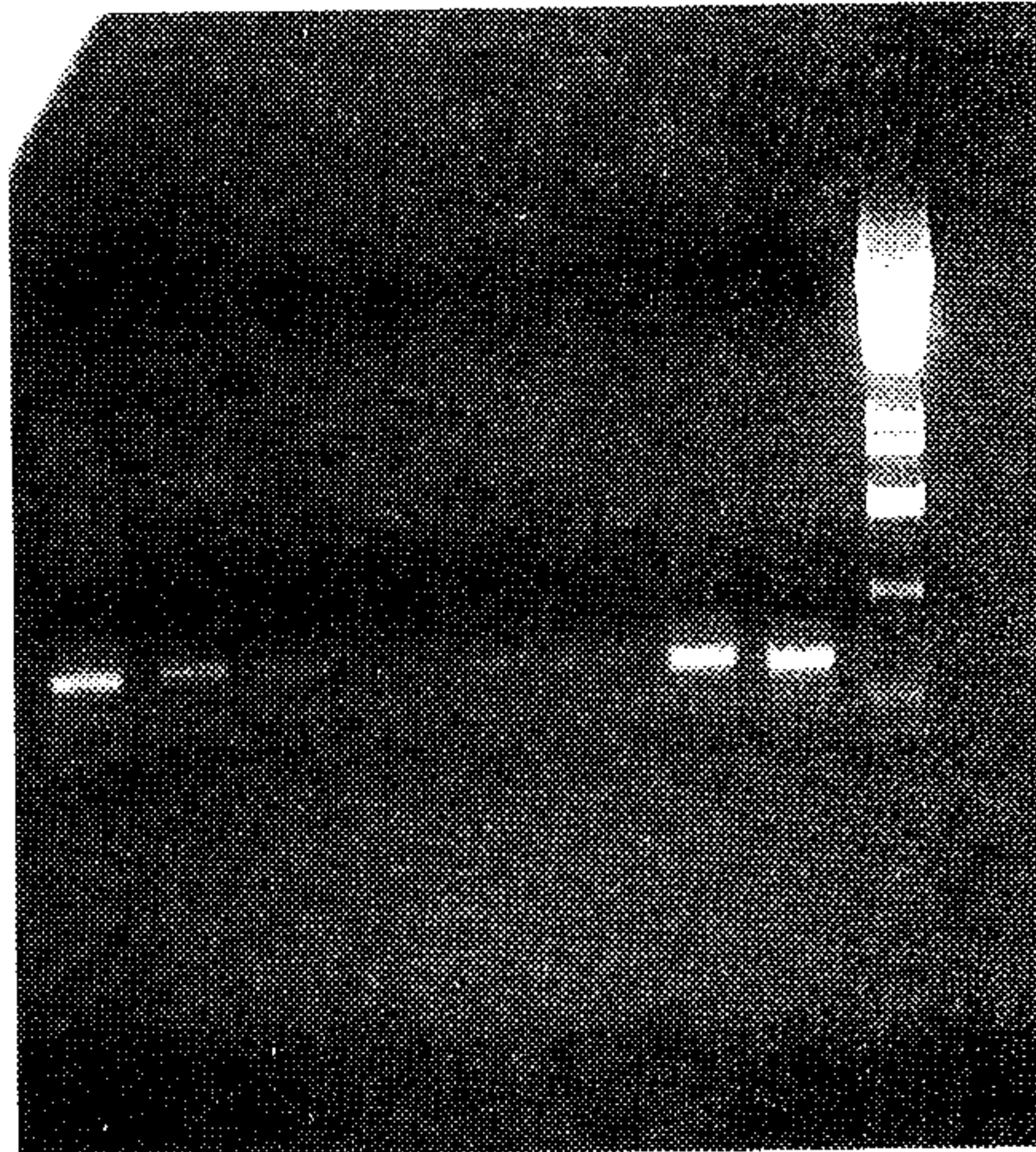


Fig 21 PCR product(SK38, 39 primer set) detection by oligonucleotide probe in positive and negative samples  
lane 1-6 Lymphocyte DNA from positive samples lane 7-8 : Lymphocyte DNA from negative samples



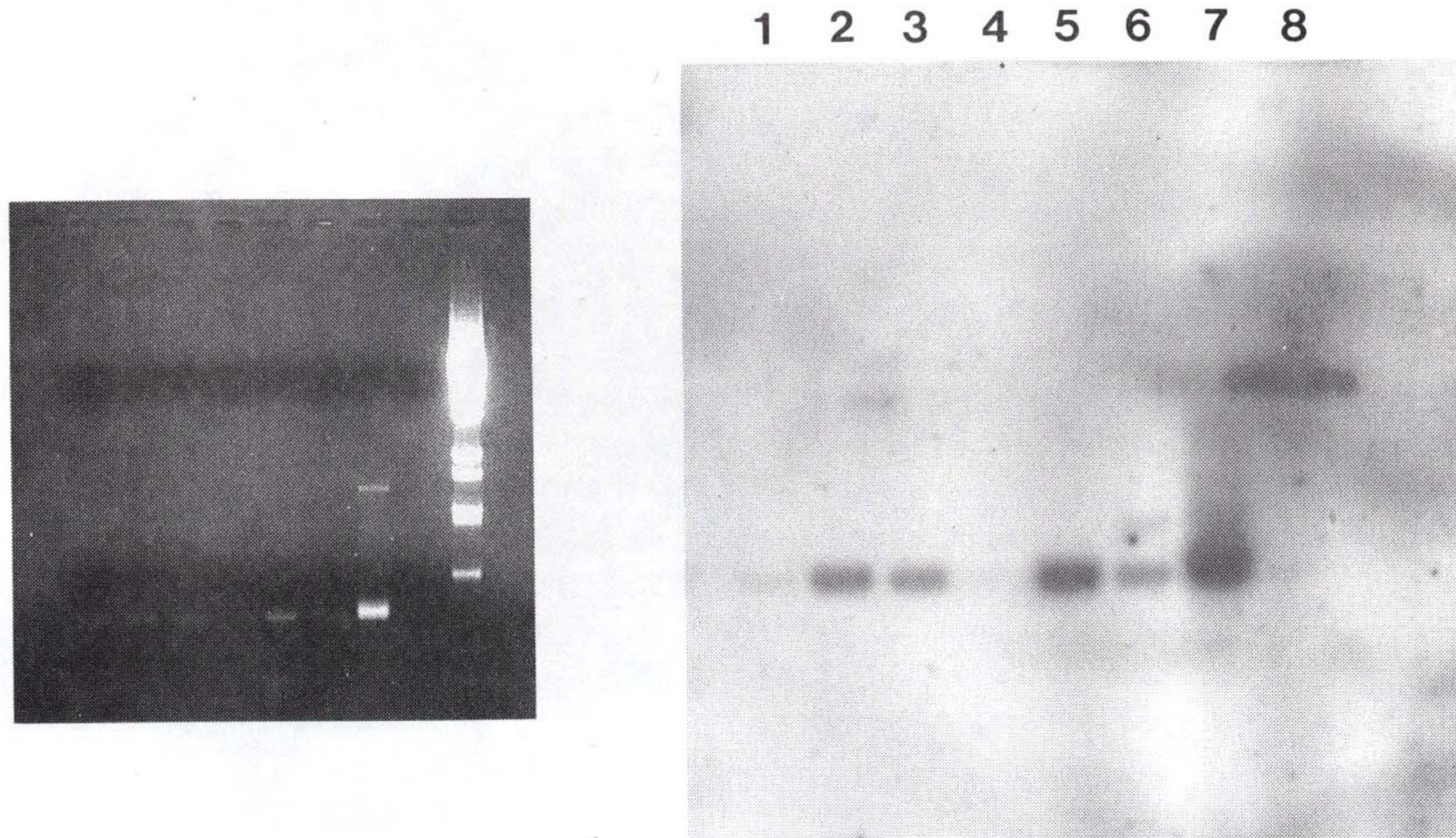


Fig. 22. PCR product(SK38, 39 primer set) detection by oligonucleotide probe in negative samples.  
lane 1-6 : Lymphocyte DNA from negative samples      lane 7 : Positive control plasmid DNA  
lane 8 : No DNA



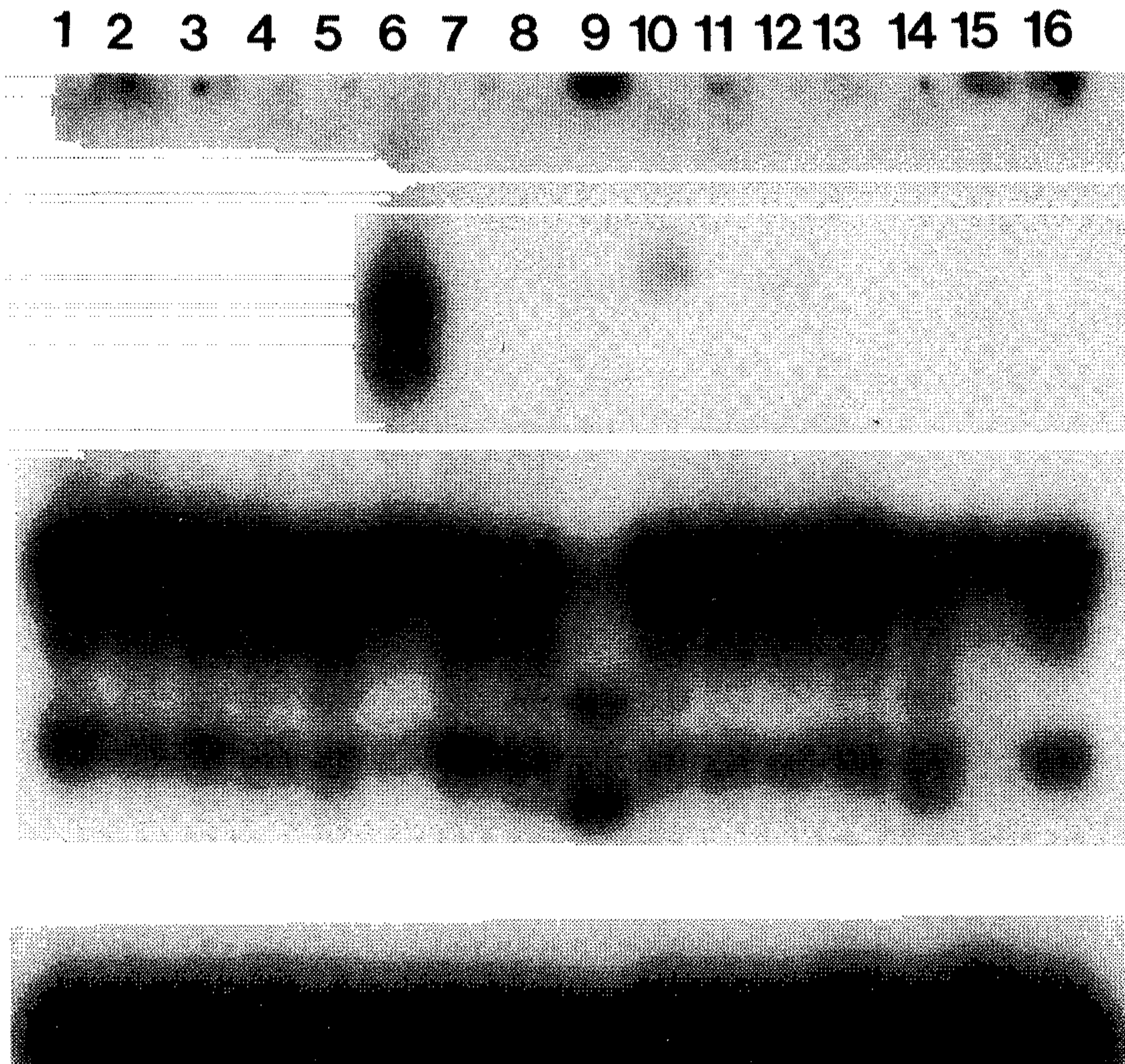


Fig. 23. PCR product(SK38, 39 primer set) detection by liquid hybridization (oligonucleotide probe) in positive and negative samples.  
 lane 1-6 : Lymphocyte DNA from positive samples  
 lane 7-14 : Lymphocyte DNA from negative samples  
 lane 15, 16 : Positive control plasmid DNA

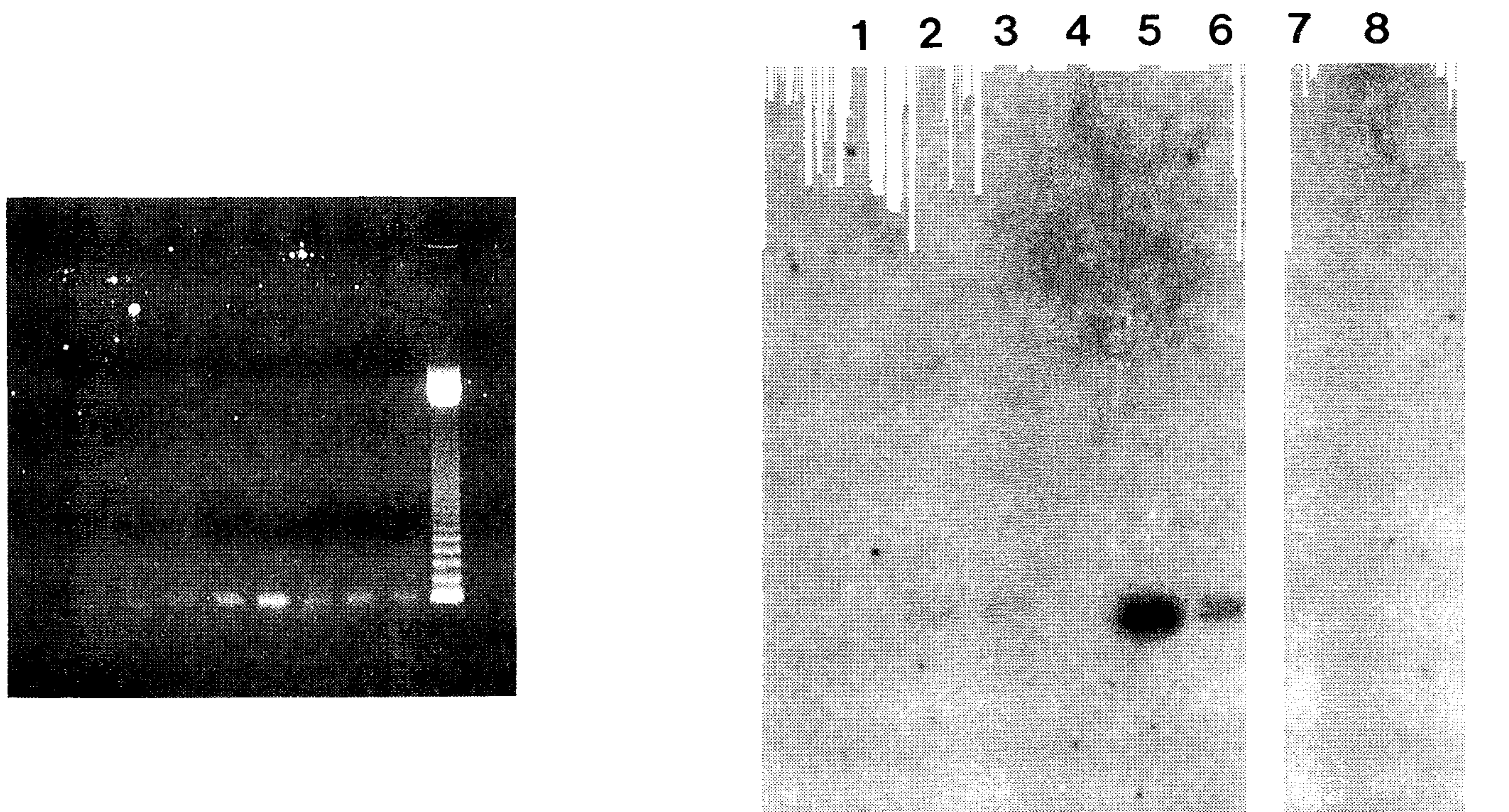


Fig 24 PCR product(SK29, 30 primer set) detection by oligonucleotide probe with variation of  $MgCl_2$  concentration(annealing temperature- $58^{\circ}C$ )

lane 1, 3, 5, 7 Lymphocyte DNA from positive sample  
lane 2, 4, 6, 8 Lymphocyte DNA from negative samples  
lane 1, 2 1.5mM  $MgCl_2$       lane 3, 4 2mM  $MgCl_2$   
lane 5, 6 3mM  $MgCl_2$       lane 7, 8 4mM  $MgCl_2$



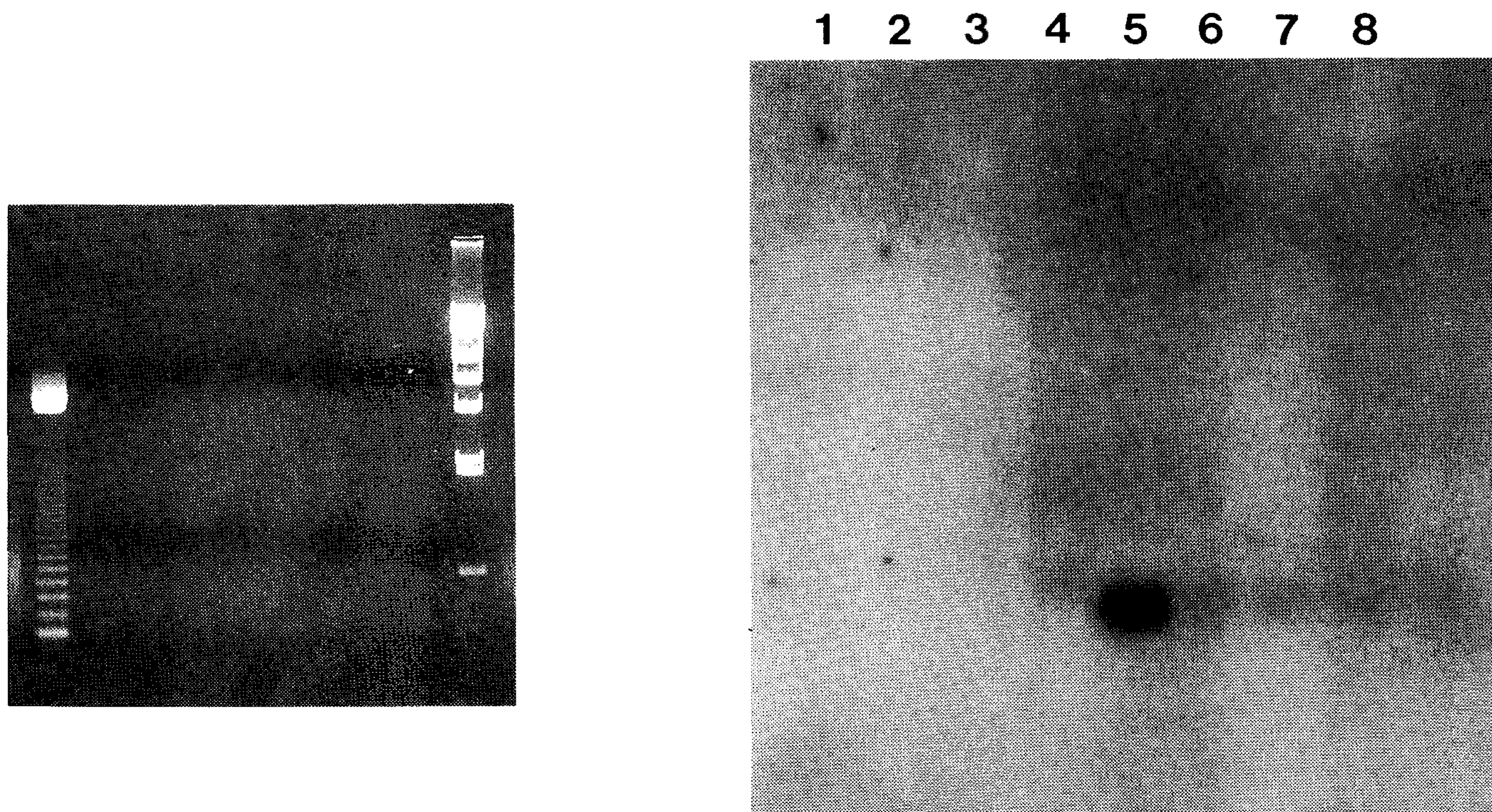


Fig 25 PCR product(SK29, 30 primer set) detection by oligonucleotide probe with variation of  $MgCl_2$  concentration(annealing temperature- $63^{\circ}C$ )

lane 1, 3, 5, 7 Lymphocyte DNA from positive sample  
lane 2, 4, 6, 8 Lymphocyte DNA from negative samples  
lane 1, 2 1.5mM  $MgCl_2$       lane 3, 4 2mM  $MgCl_2$   
lane 5, 6 3mM  $MgCl_2$       lane 7, 8 4mM  $MgCl_2$



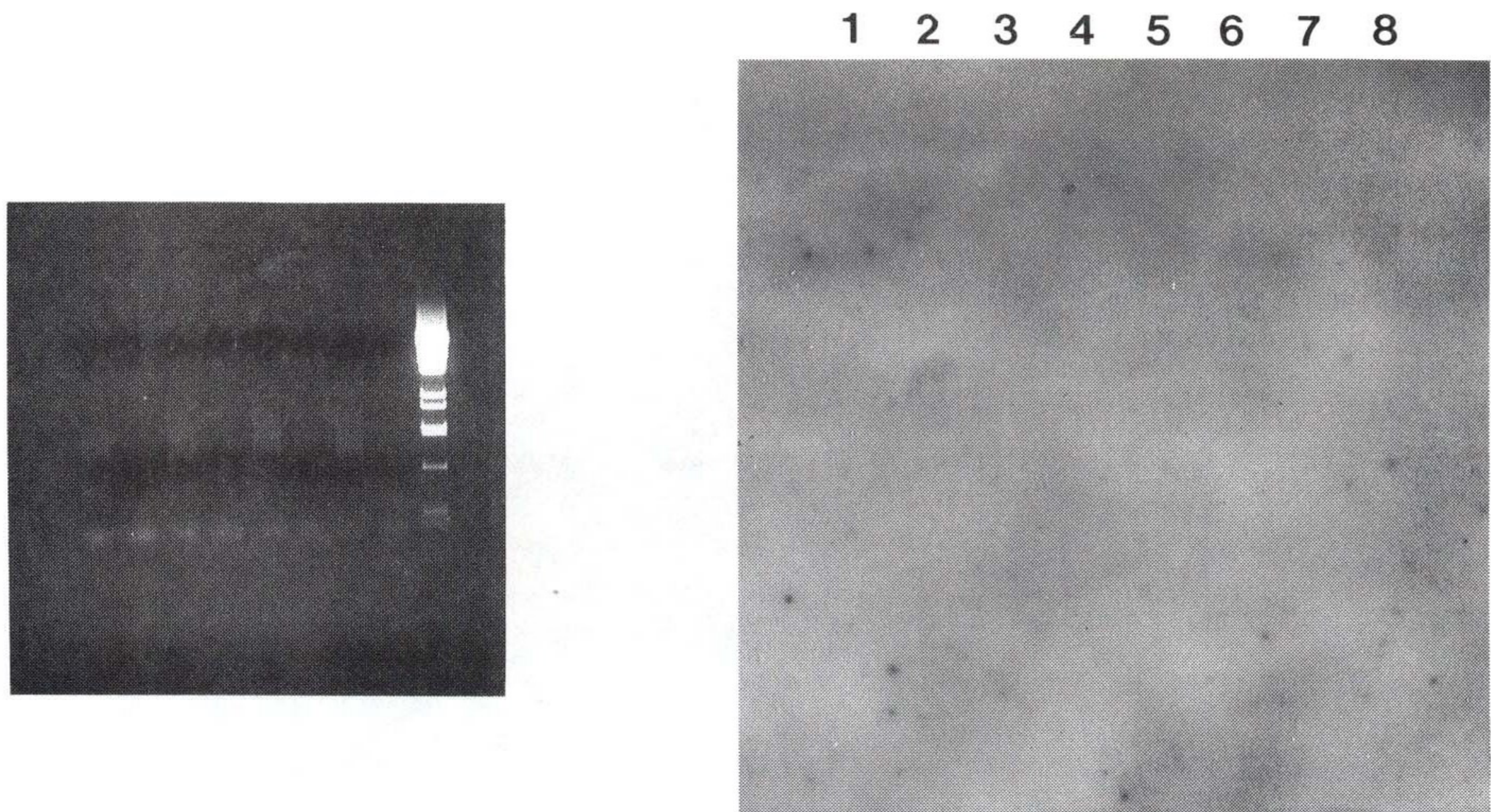


Fig. 26. PCR product(SK29, 30 primer set) detection by oligonucleotide probe with variation of MgCl<sub>2</sub> concentration(annealing temperature-68°C).

lane 1, 3, 5, 7 : Lymphocyte DNA from positive sample  
lane 2, 4, 6, 8 : Lymphocyte DNA from negative samples  
lane 1, 2 : 1.5mM MgCl<sub>2</sub>      lane 3, 4 : 2mM MgCl<sub>2</sub>  
lane 5, 6 : 3mM MgCl<sub>2</sub>      lane 7, 8 : 4mM MgCl<sub>2</sub>



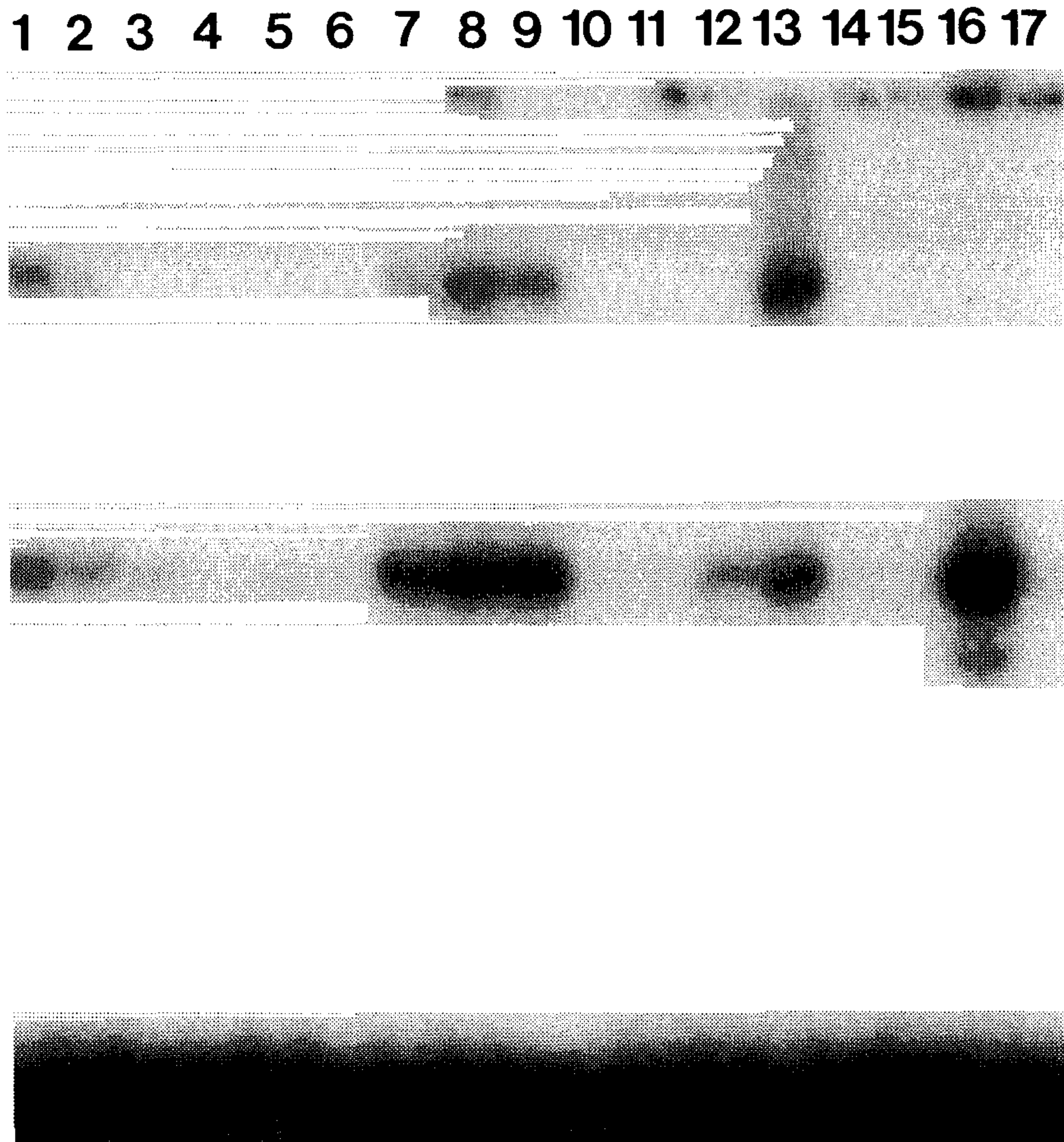


Fig. 27. PCR product(SK29, 30 primer set) detection by liquid hybridization in positive and negative samples(at 3mM MgCl<sub>2</sub> and annealing temperature 62°C).

lane 1-6 : Lymphocyte DNA from positive samples  
 lane 7-15 : Lymphocyte DNA from negative samples  
 lane 16 : Positive control plasmid DNA  
 lane 17 : No DNA

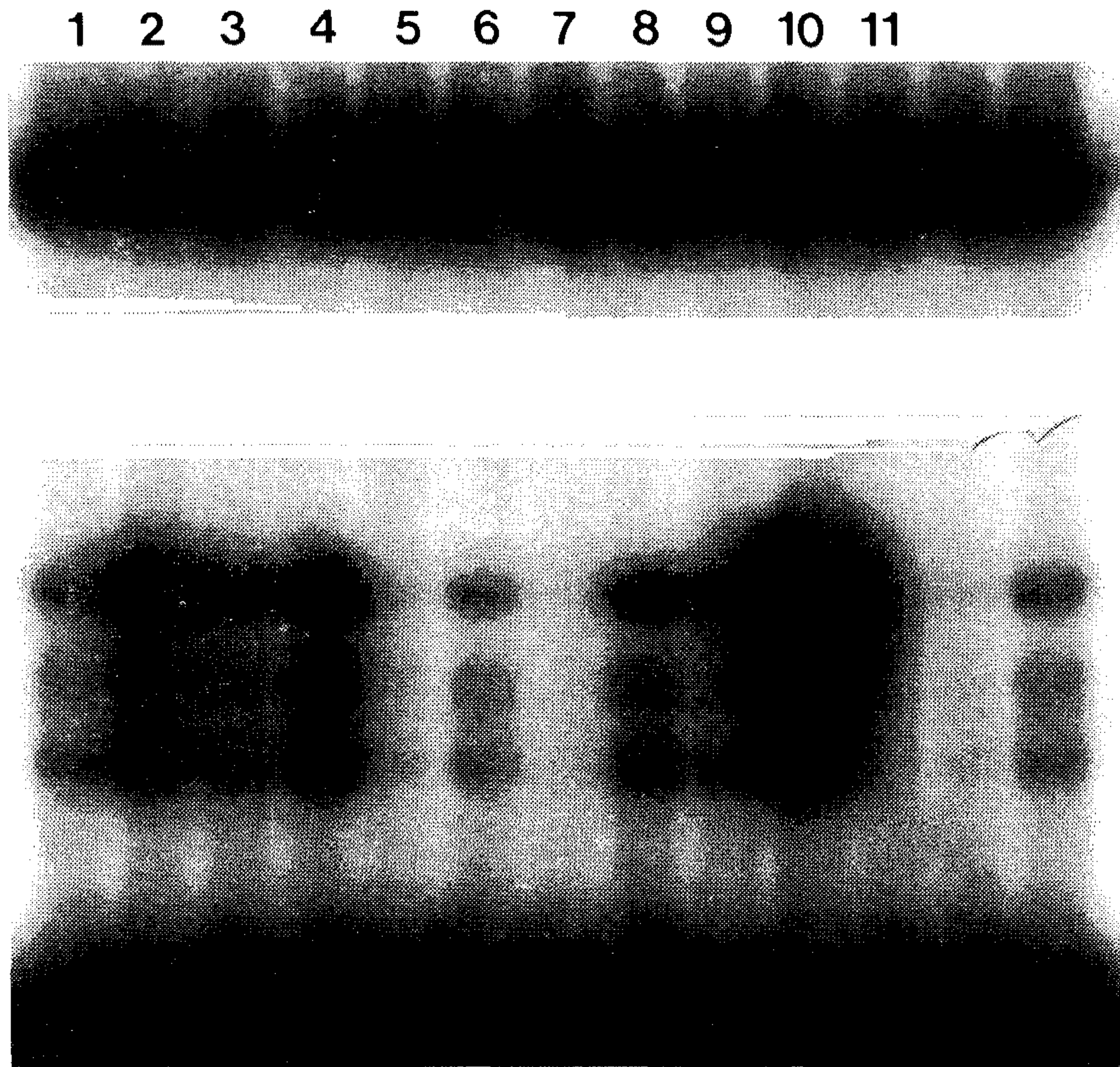


Fig. 28. PCR product(SK38, 39 primer set) detection by liquid hybridization in positive samples.

lane 1-9 : Lymphocyte DNA from positive samples

lane 10 : Positive control plasmid DNA

lane 11 : No DNA



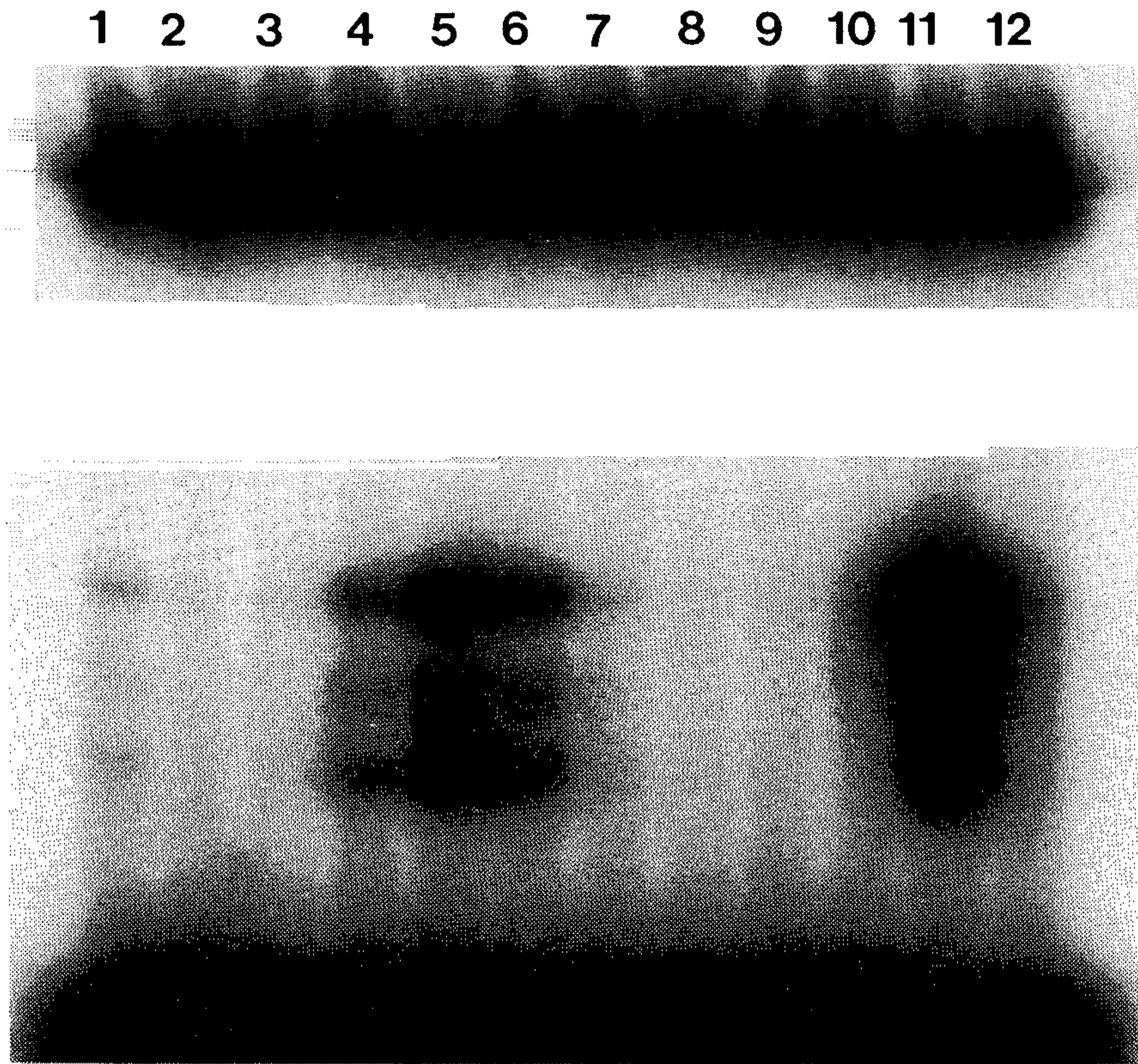


Fig. 29. PCR product(SK38, 39 primer set) detection by liquid hybridization in negative samples.

lane 1-10 : Lymphocyte DNA from negative samples

lane 11 : Positive control plasmid DNA

lane 12 : No DNA

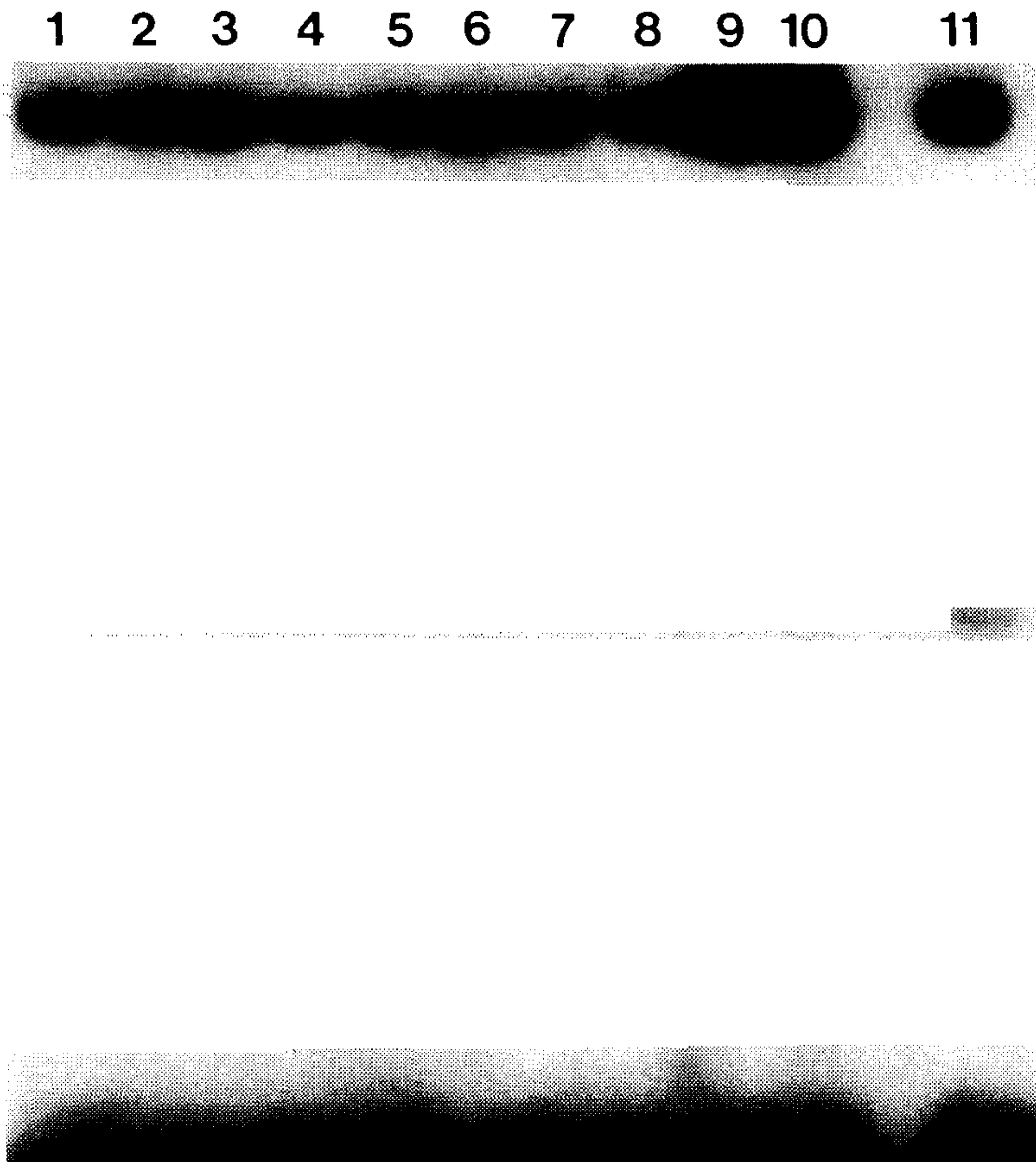


Fig. 30. PCR product(SK29, 30 primer set) detection by liquid hybridization in negative samples #1.  
lane 1-10 : Lymphocyte DNA from negative samples  
lane 11 : Positive control plasmid DNA

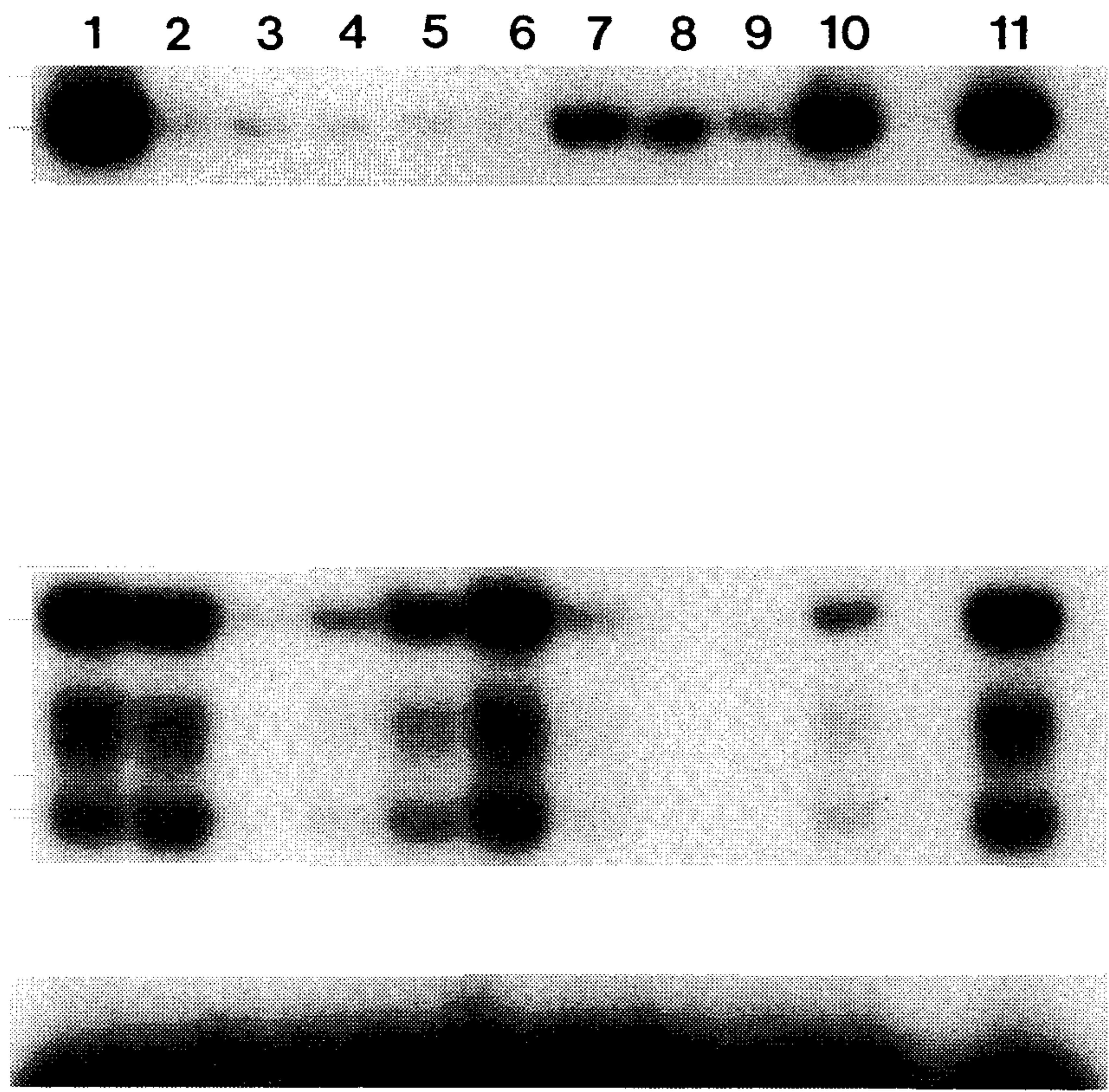


Fig. 31. PCR product(SK38, 39 primer set) detection by liquid hybridization in negative samples #1.  
lane 1-10 : Lymphocyte DNA from negative samples  
lane 11 : Positive control plasmid DNA



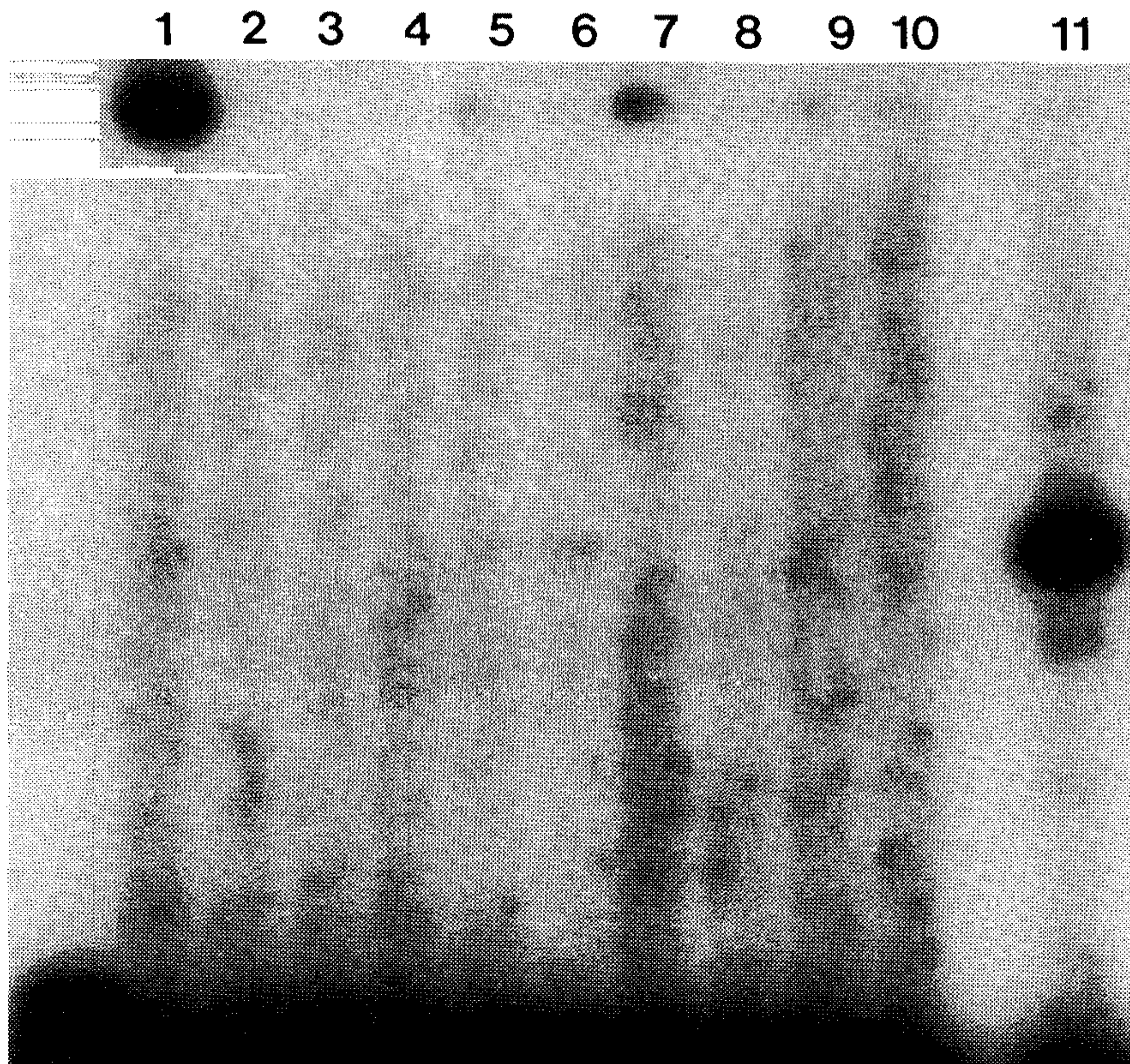


Fig. 32. PCR product(SK29, 30 primer set) detection by liquid hybridization in negative samples #4.

lane 1-10 : Lymphocyte DNA from negative samples

lane 11 : Positive control plasmid DNA



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

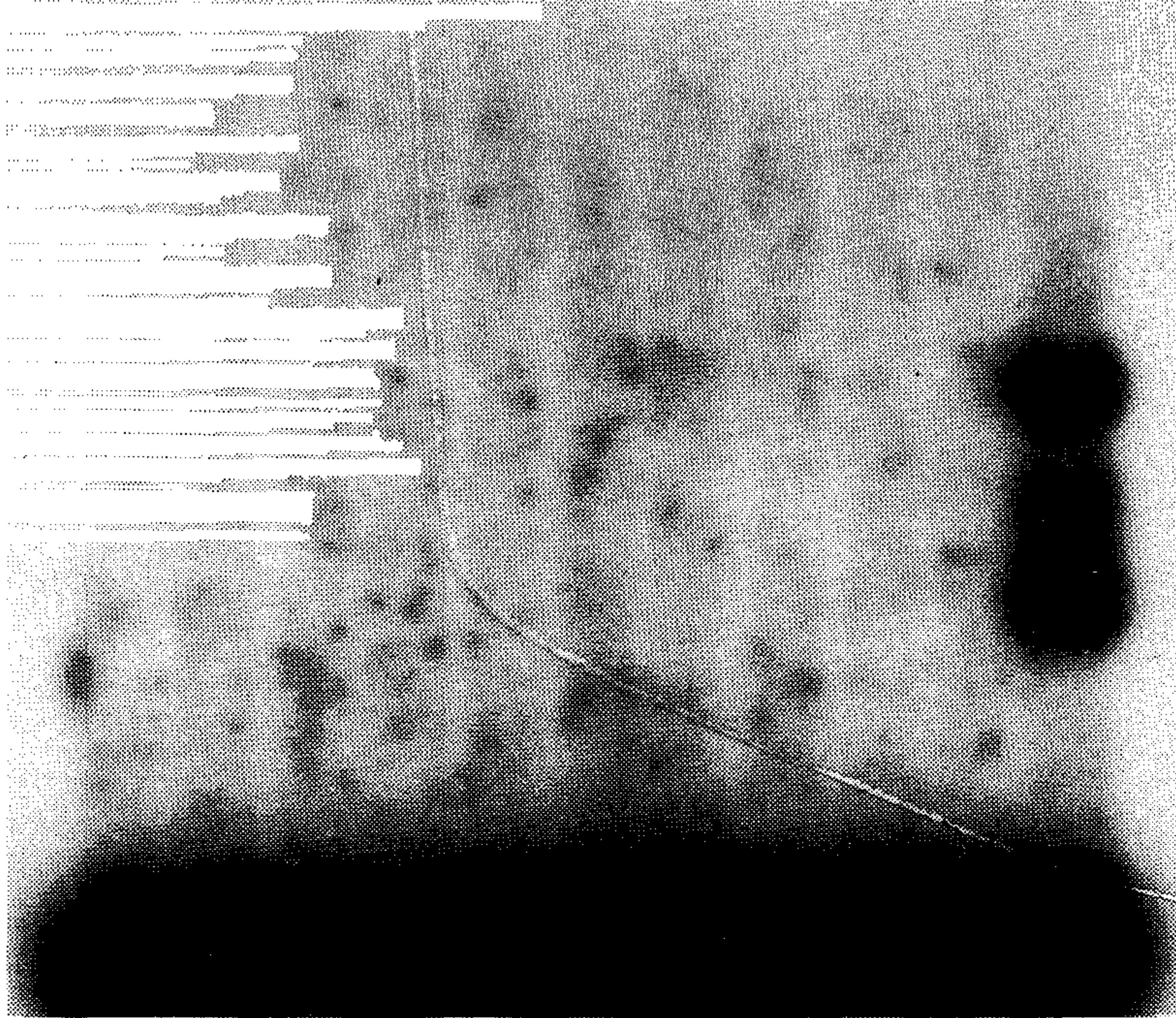


Fig. 33. PCR product(SK38, 39 primer set) detection by liquid hybridization in negative samples #4.

lane 1-10 : Lymphocyte DNA from negative samples

lane 11 : Positive control plasmid DNA

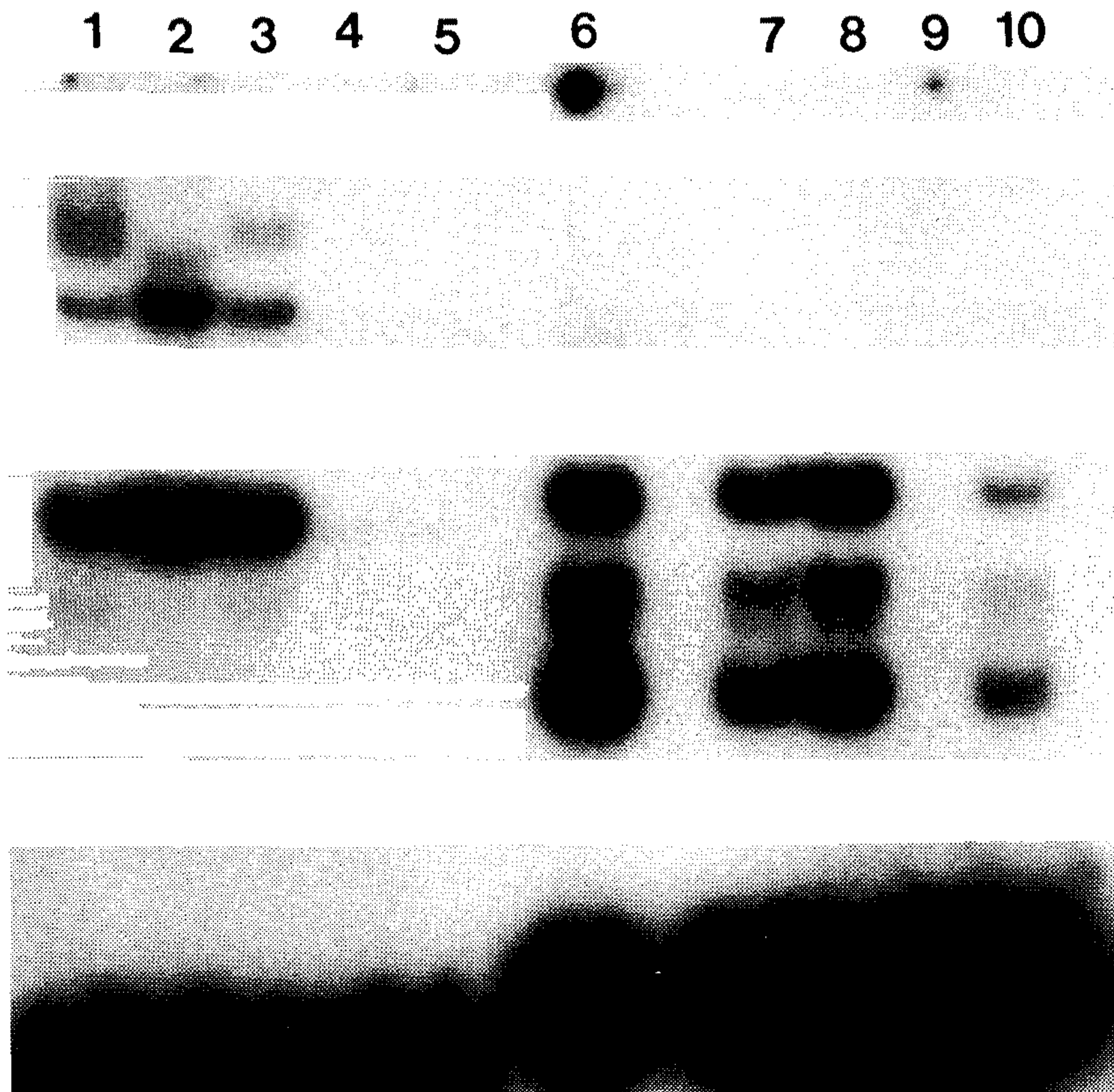


Fig. 34. PCR product detection by liquid hybridization in positive control plasmid DNA.

lane 1-5 : using SK29, 30 primer set

lane 6-10: using SK38, 39 primer set

UV-irradiation time :

lane 1, 6 : 0 min.

lane 2, 7 : 5 min.

lane 3, 8 : 10 min.

lane 4, 9 : 20 min.

lane 5, 10 : 30 min.



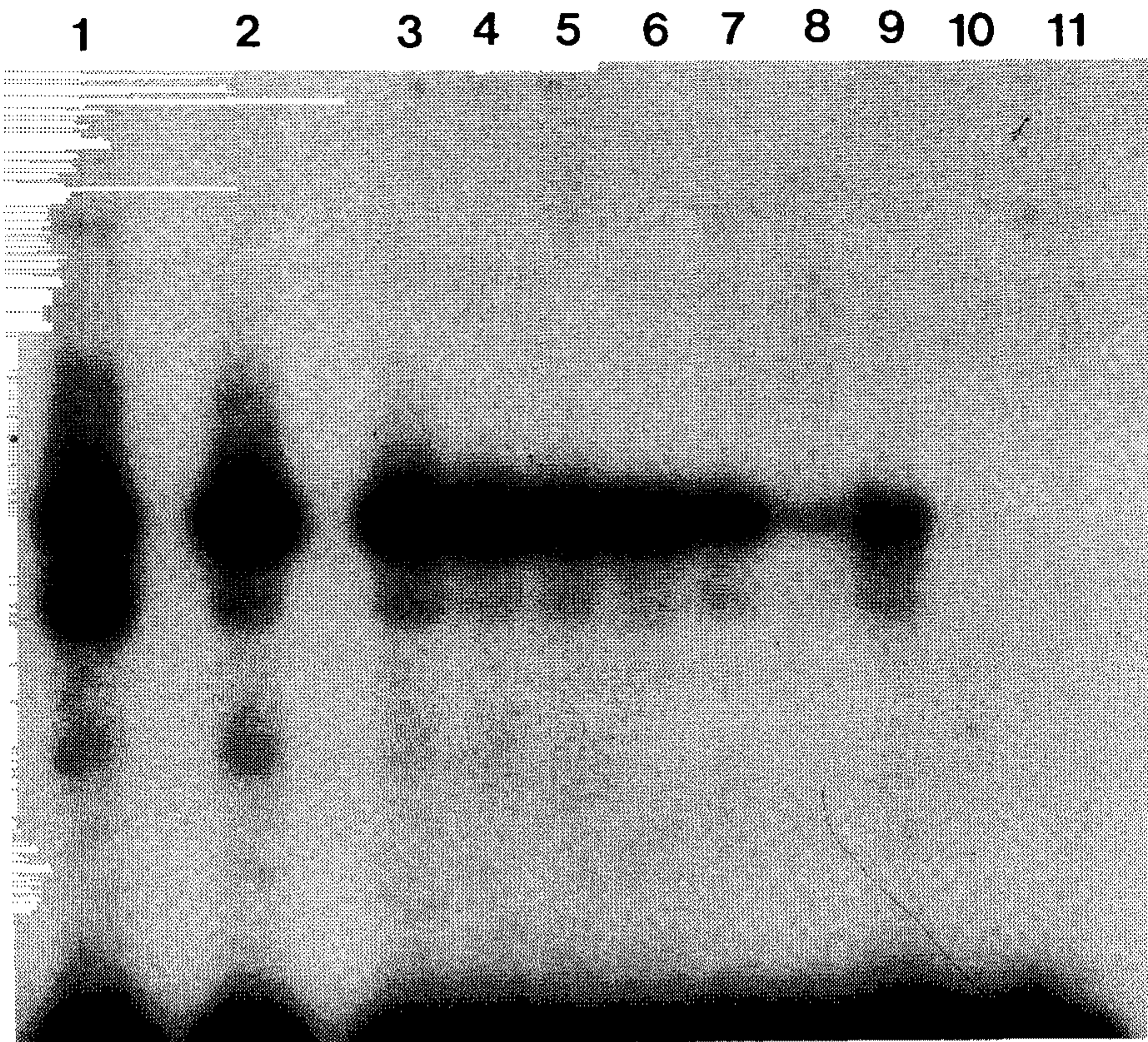


Fig. 35. PCR product(SK29, 30 primer set) detection by liquid hybridization in positive control plasmid DNA with variation of DNA concentration.

lane 1 : 5 ng

lane 2 :  $5 \times 10^{-2}$  ng

lane 3 :  $5 \times 10^{-3}$  ng

lane 4 :  $5 \times 10^{-4}$  ng

lane 5 :  $5 \times 10^{-5}$  ng

lane 6 :  $5 \times 10^{-6}$  ng

lane 7 :  $5 \times 10^{-7}$  ng

lane 8 :  $5 \times 10^{-8}$  ng

lane 9, 10 : Lymphocyte DNA from positive samples

lane 11 : No DNA



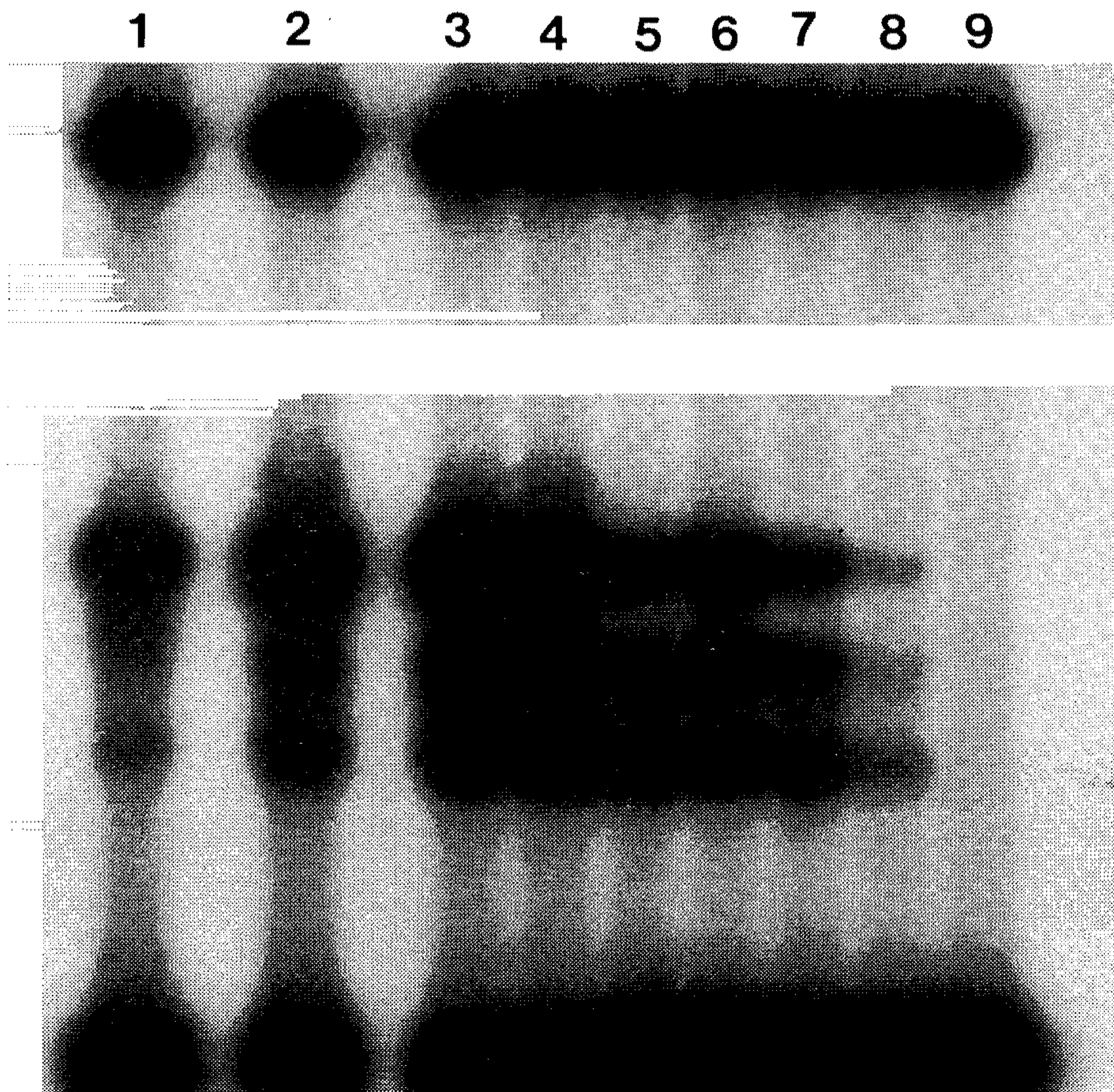


Fig. 36. PCR product(SK38, 39 primer set) detection by liquid hybridization in positive control plasmid DNA with variation of DNA concentration.

lane 1 : 5 ng	lane 2 : $5 \times 10^{-2}$ ng
lane 3 : $5 \times 10^{-3}$ ng	lane 4 : $5 \times 10^{-4}$ ng
lane 5 : $5 \times 10^{-5}$ ng	lane 6 : $5 \times 10^{-6}$ ng
lane 7 : $5 \times 10^{-7}$ ng	lane 8 : $5 \times 10^{-8}$ ng
lane 9 : No DNA	



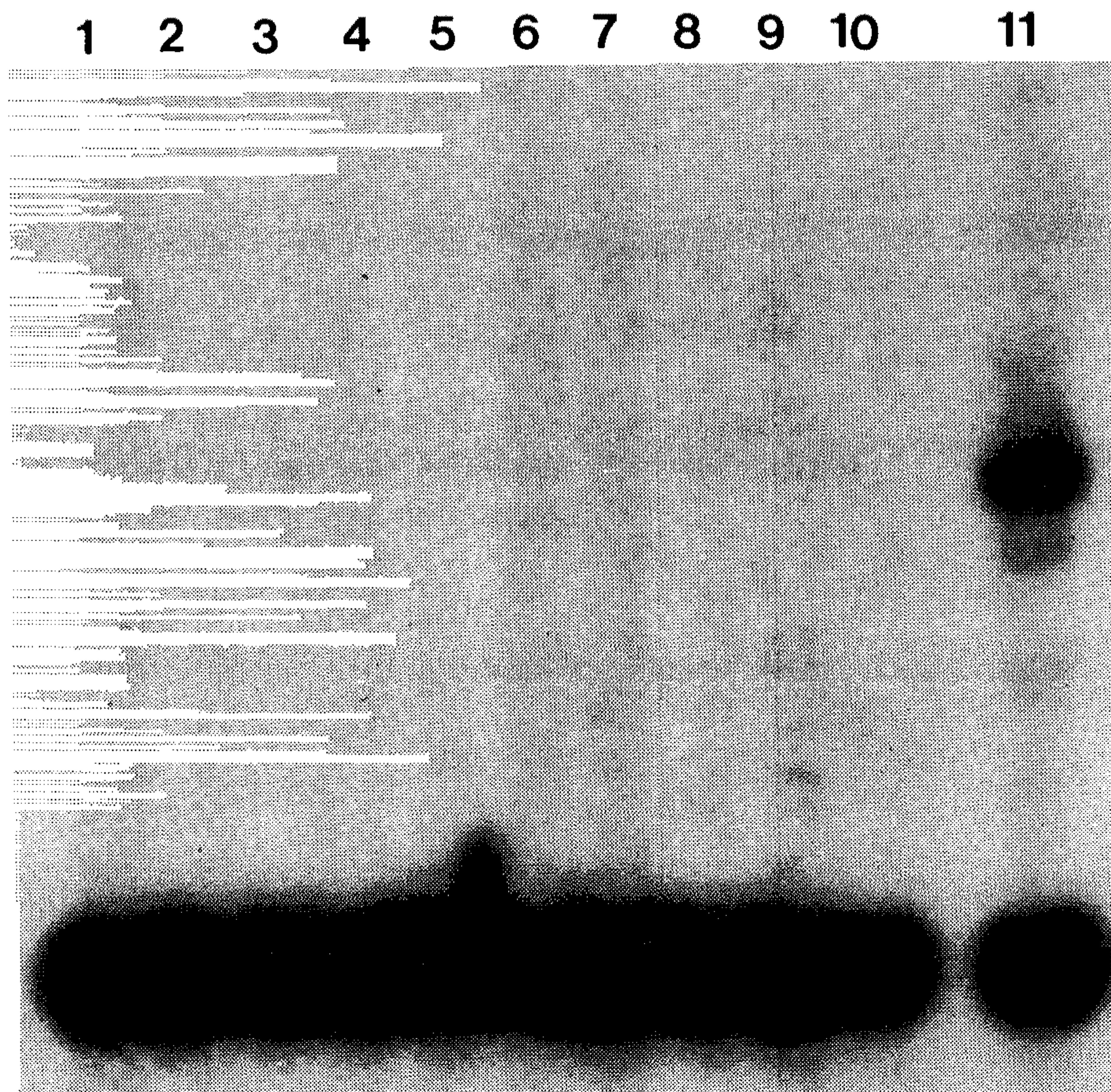


Fig. 37. PCR product(SK29, 30 primer set) detection by liquid hybridization in negative samples #6.

lane 1-10 : Lymphocyte DNA from negative samples

lane 11 : Positive control plasmid DNA



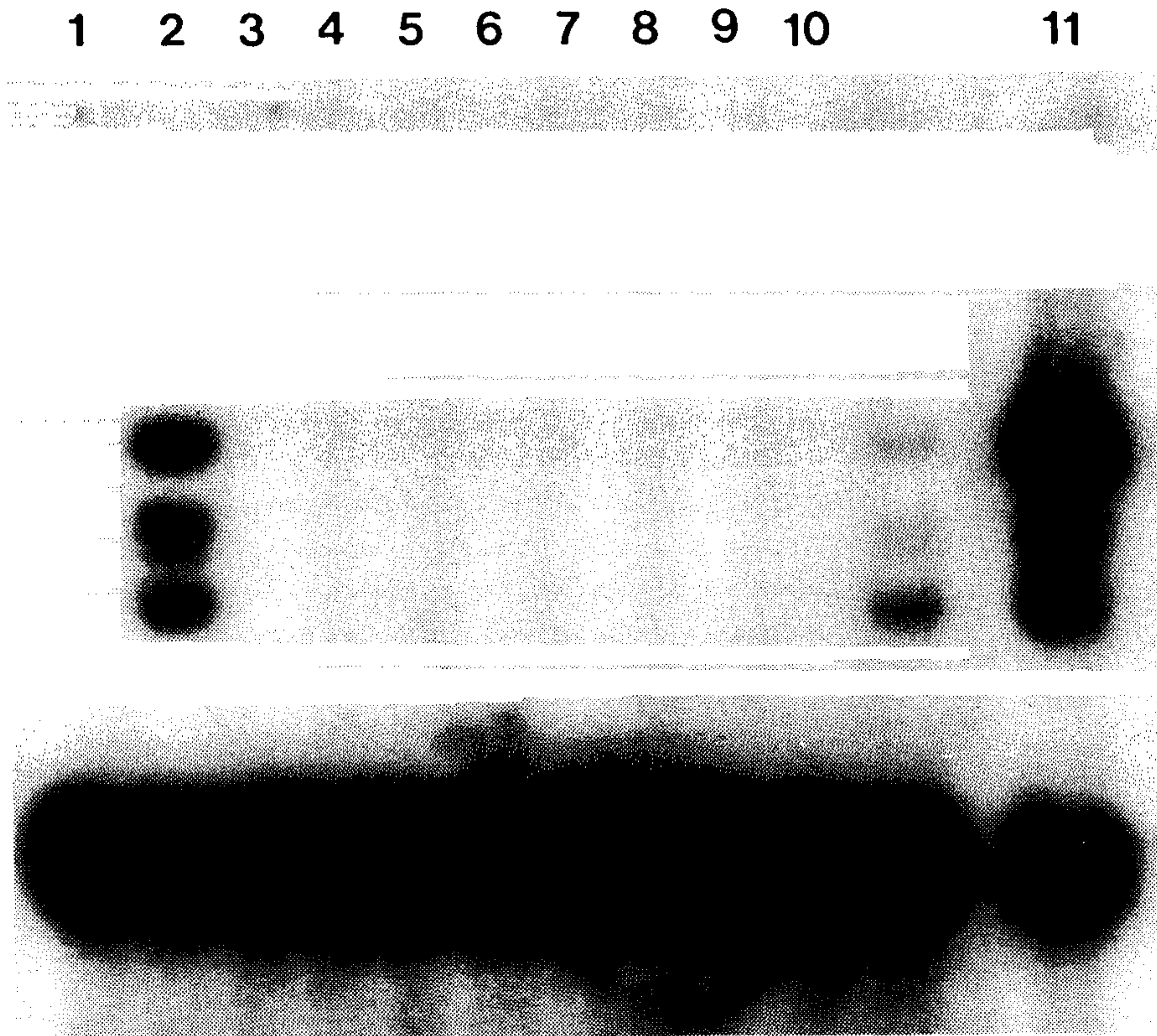


Fig. 38. PCR product(SK38, 39 primer set) detection by liquid hybridization in negative samples #6.

lane 1-10 : Lymphocyte DNA from negative samples

lane 11 : Positive control plasmid DNA

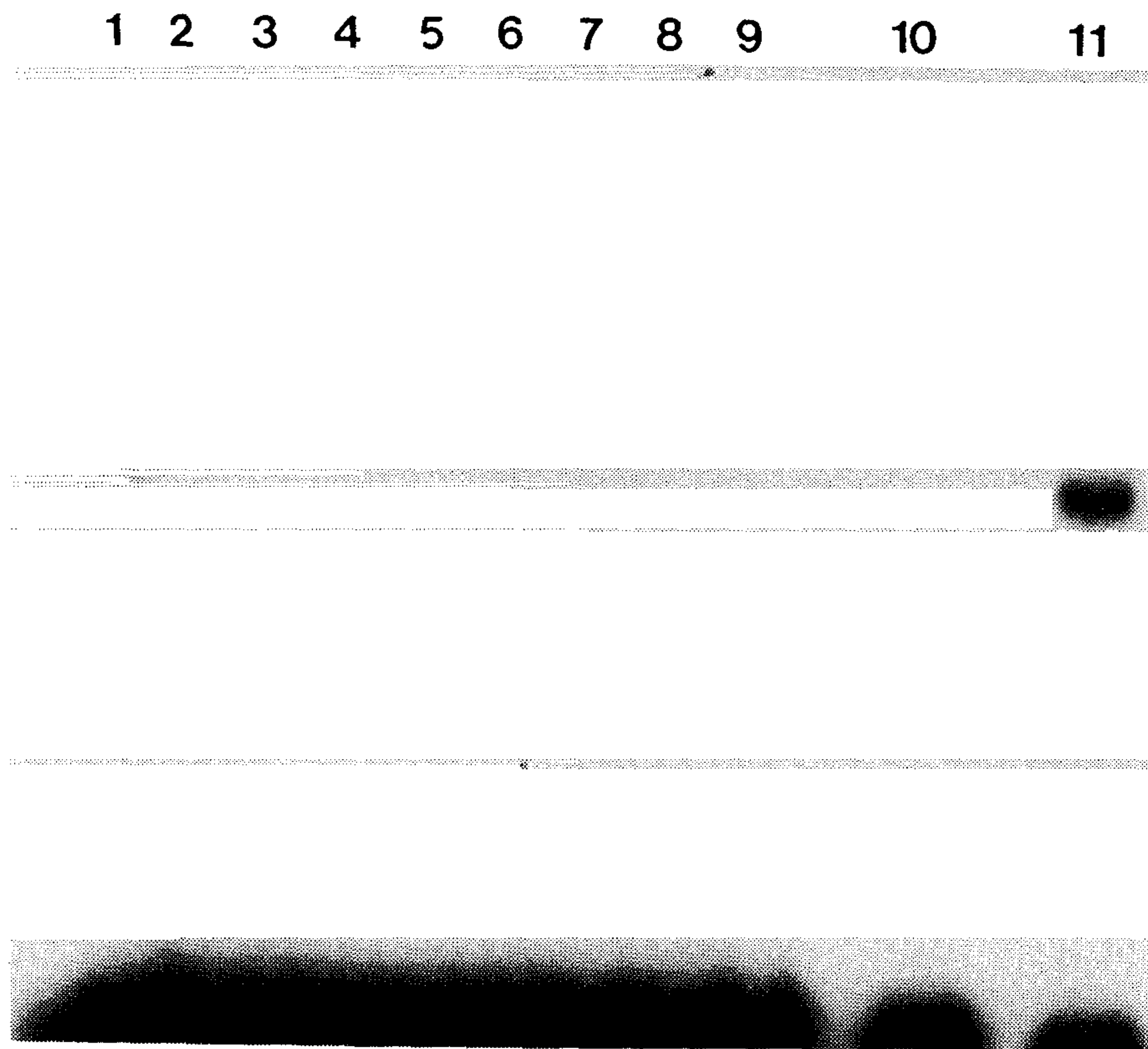


Fig. 39. PCR product(SK29, 30 primer set) detection by liquid hybridization in negative samples #8.

lane 1-10 : Lymphocyte DNA from negative samples No. 1-No. 10

lane 11 : Positive control plasmid DNA

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

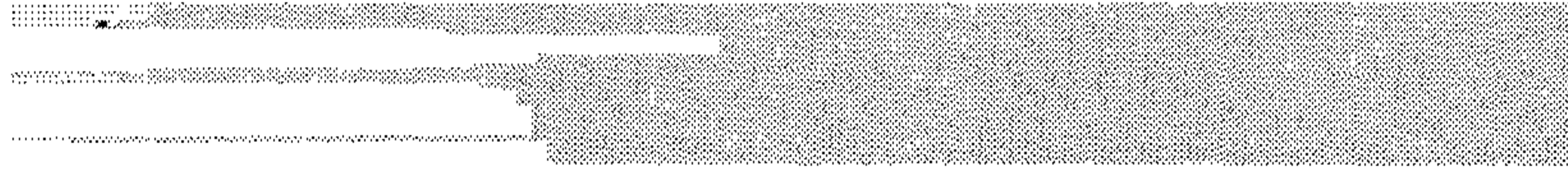


Fig. 40. PCR product(SK29, 30 primer set) detection by liquid hybridization in negative samples #8.

lane 1-10 : Lymphocyte DNA from negative samples No. 11 – No. 20



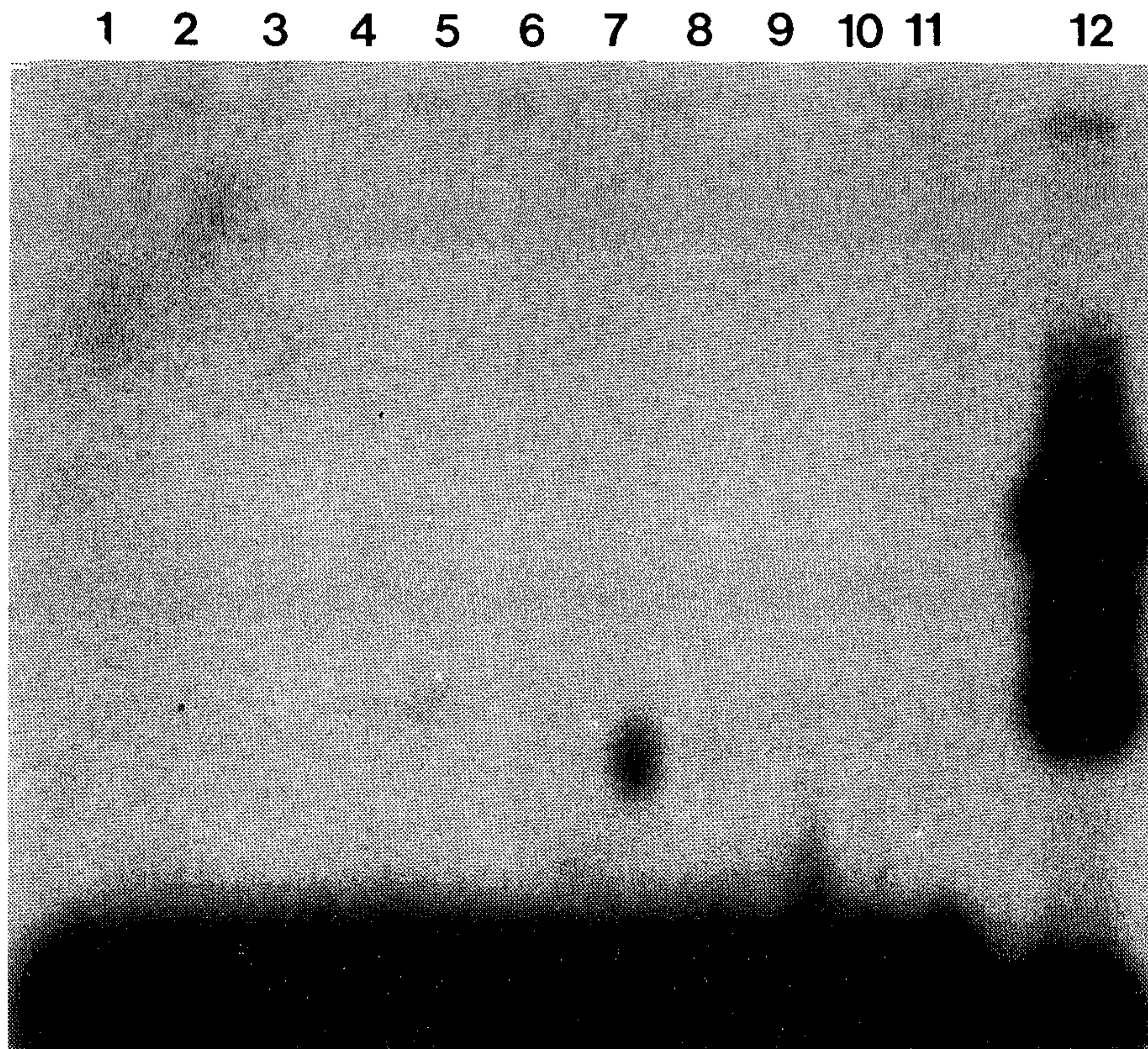


Fig. 41. PCR product(SK38, 39 primer set) detection by liquid hybridization in negative samples #8.

lane 1-10 : Lymphocyte DNA from negative samples No. 1-No. 10

lane 11 : No DNA

lane 12 : Positive control plasmid DNA



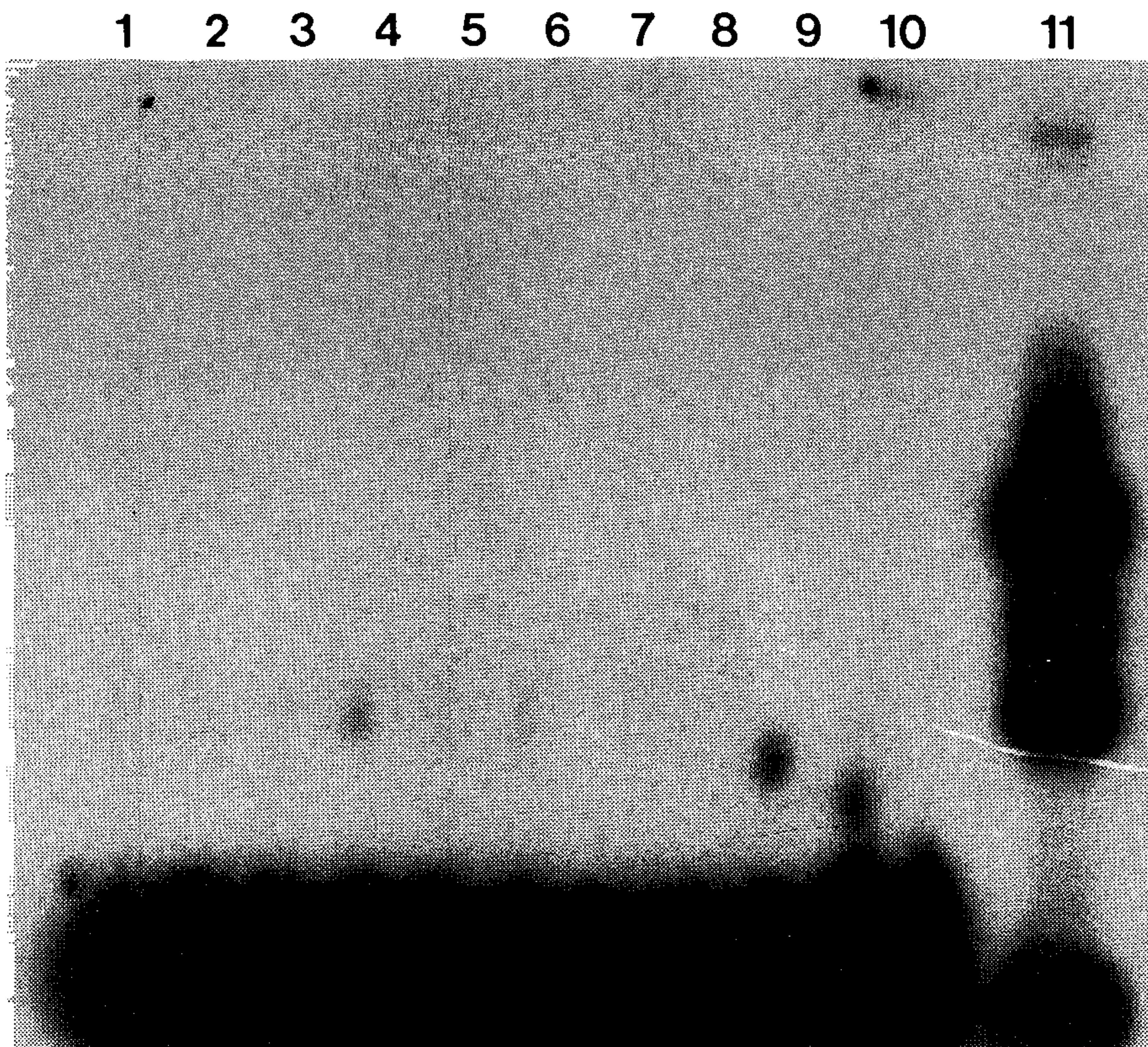


Fig. 42. PCR product(SK38, 39 primer set) detection by liquid hybridization in negative samples #8.

lane 1-10 : Lymphocyte DNA from negative samples No. 11-No. 20

lane 11 : Positive control plasmid DNA

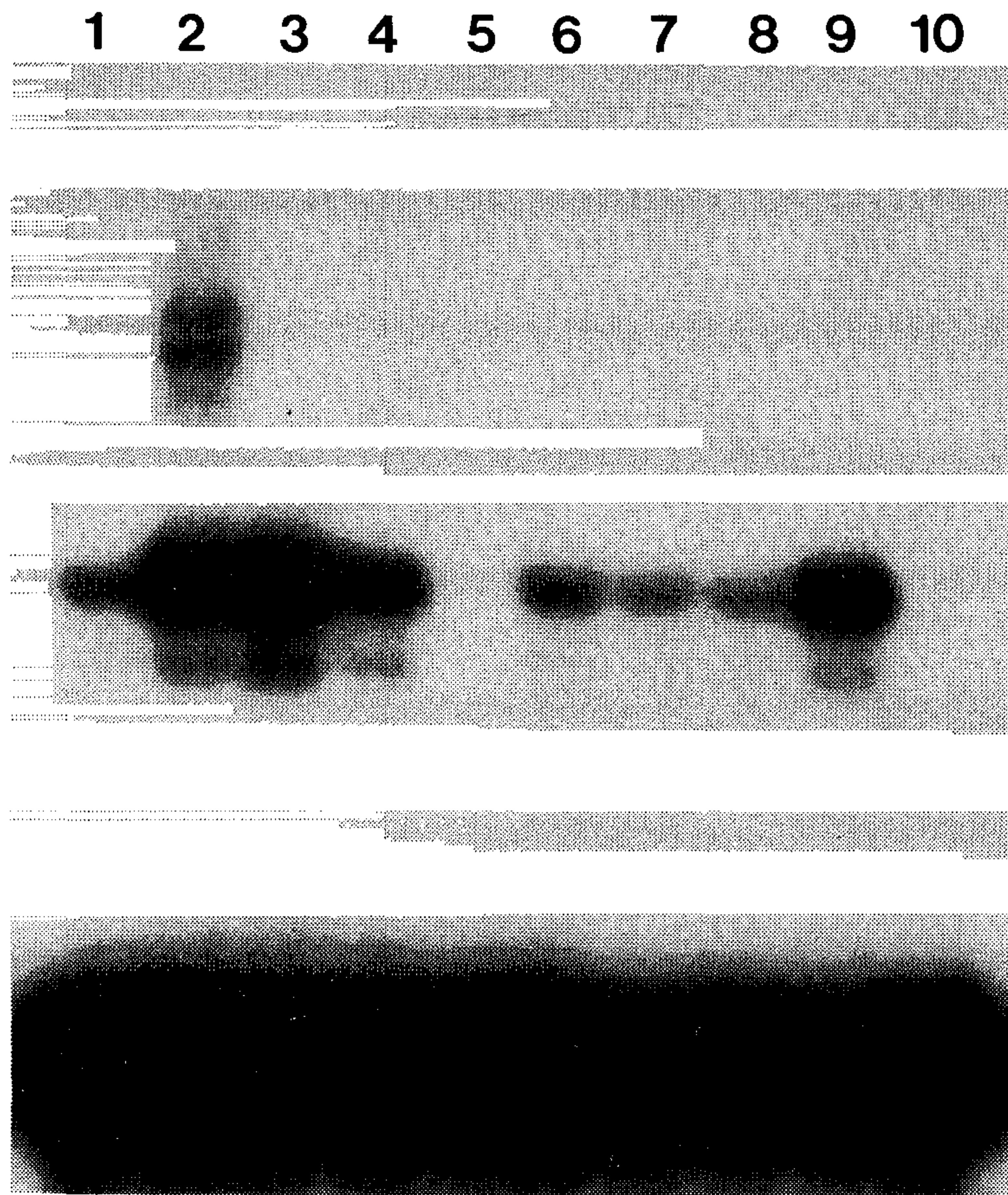


Fig. 43. PCR product(SK29, 30 primer set) detection by liquid hybridization in positive samples.

lane 1-10 : Lymphocyte DNA from positive samples No. 1-No. 10



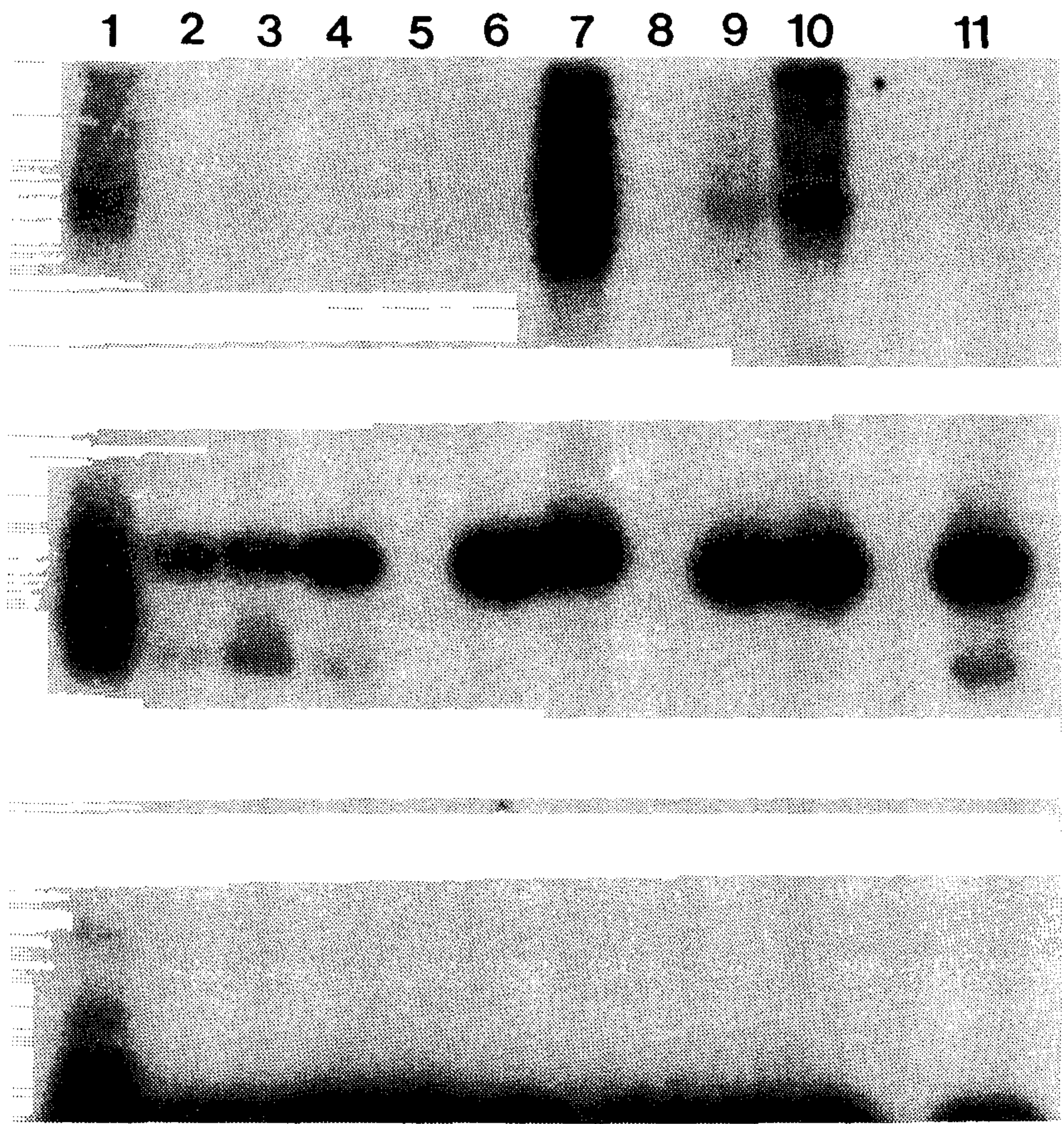


Fig. 44. PCR product(SK29, 30 primer set) detection by liquid hybridization in positive samples.

lane 1-10 : Lymphocyte DNA from positive samples No. 1-No. 10

lane 11 : Positive control plasmid DNA

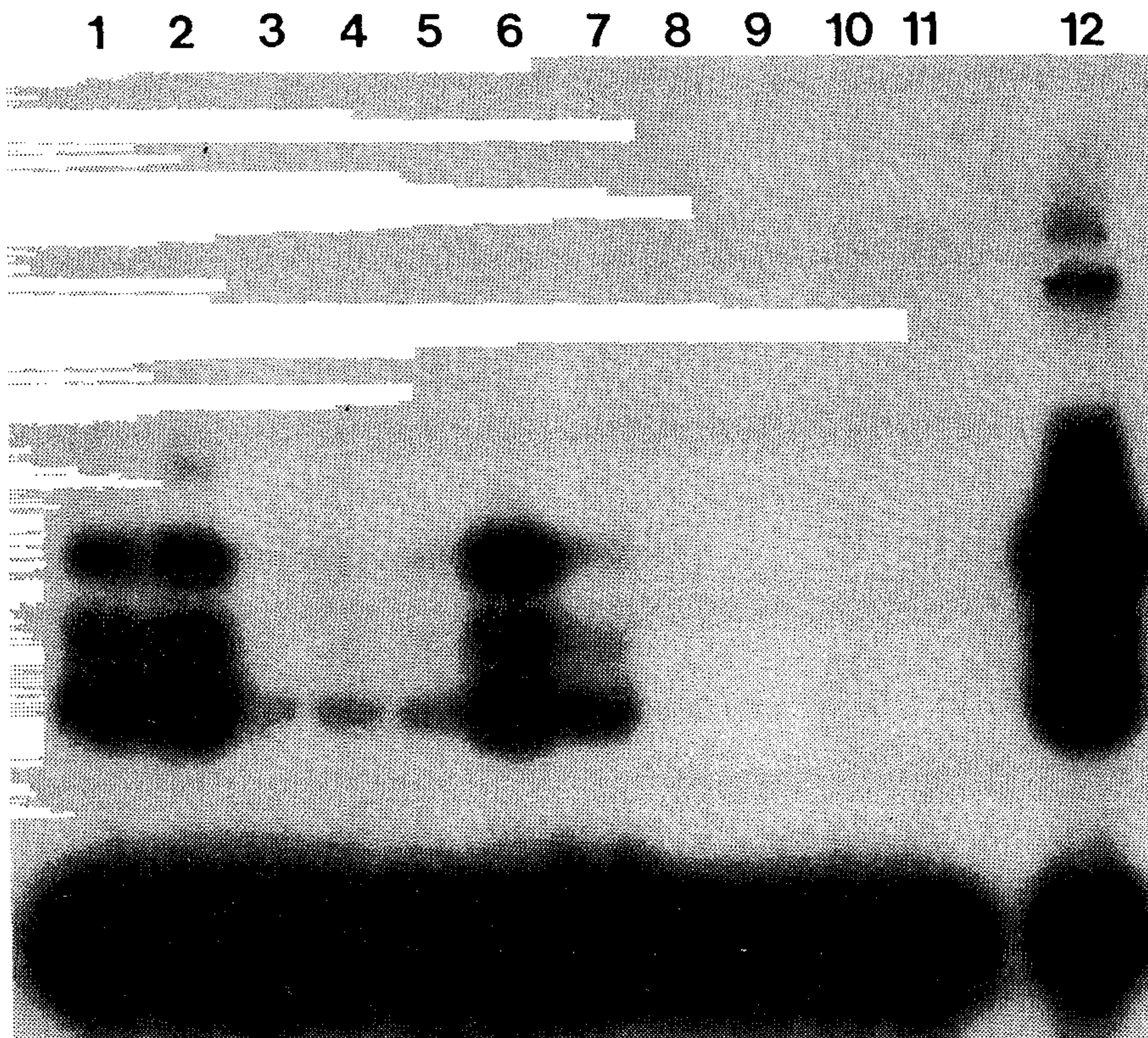


Fig. 45. PCR product(SK38, 39 primer set) detection by liquid hybridization in positive samples.

lane 1-10 : Lymphocyte DNA from positive samples No. 1-No. 10

lane 11 : No DNA

lane 12 : Positive control plasmid DNA



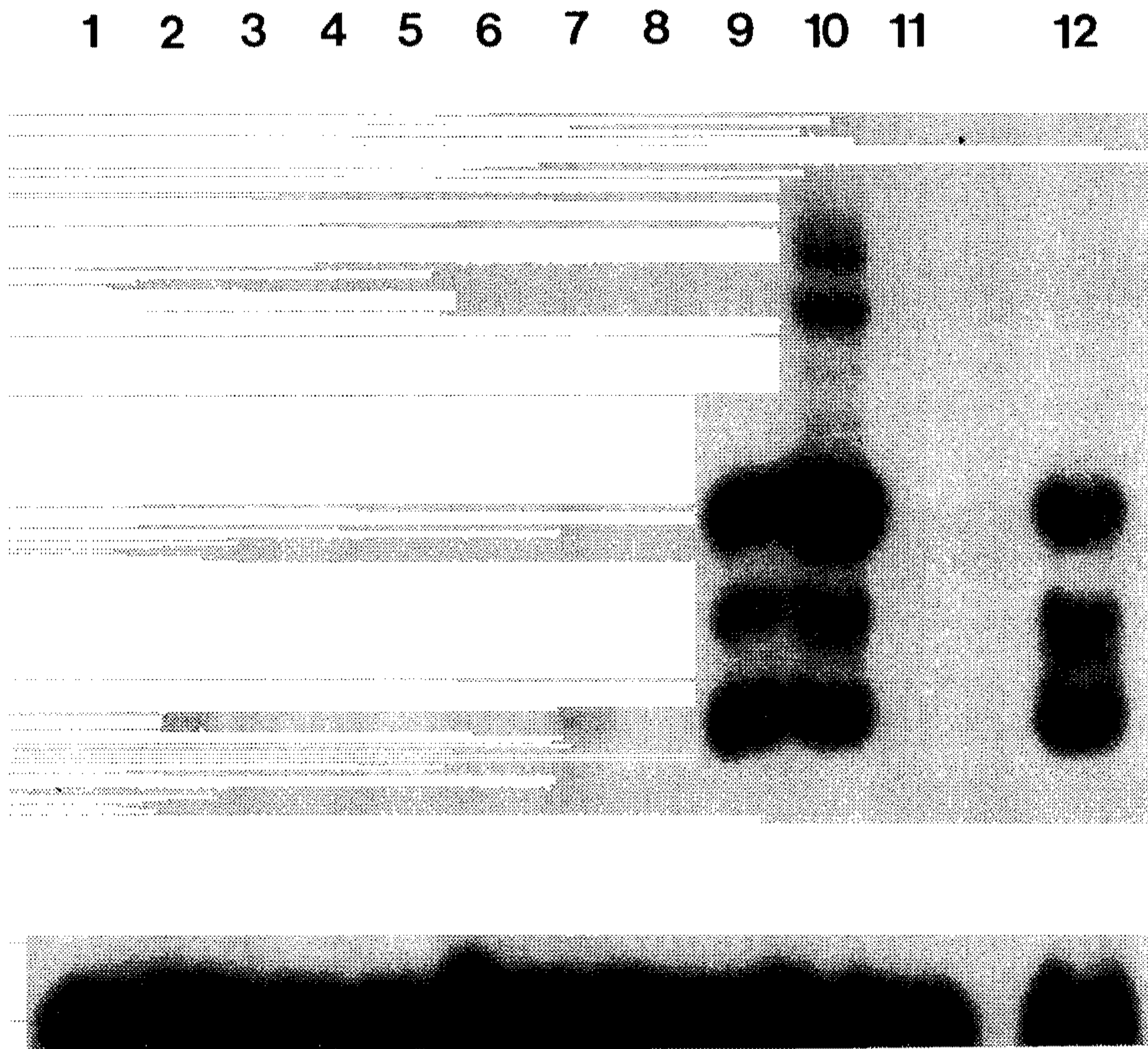


Fig. 46. PCR product(SK38, 39 primer set) detection by liquid hybridization in positive samples.  
 lane 1-10 : Lymphocyte DNA from positive samples No. 11 – No. 20  
 lane 11 : No DNA  
 lane 12 : Positive control plasmid DNA



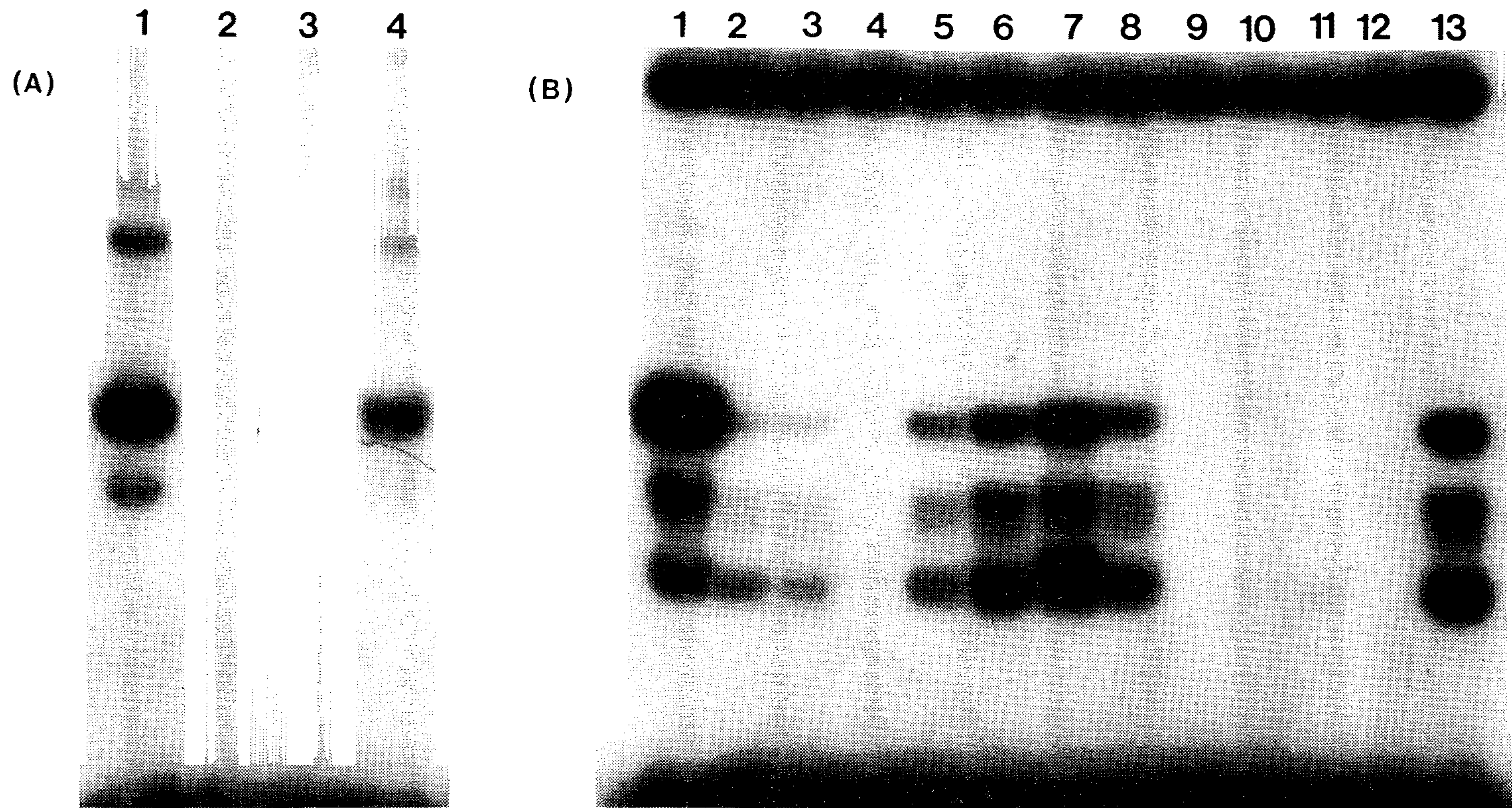


Fig 47 Positive sample들 중에서 첫번째 PCR에서 negative signal을 보인 sample들에 대한 반복 실험 결과

(A) Using SK29, 30 primer set

lane 1 Lymphocyte DNA from positive sample No 5

lane 2 Lymphocyte DNA from positive sample No 10

lane 3 Lymphocyte DNA from positive samples No 18

lane 4 Positive control plasmid DNA

(B) Using SK38, 39 primer set

lane 1-12 Lymphocyte DNA from positive samples No 7-No 18

lane 13 Positive control plasmid DNA

## 제 4 절 고 찰

매우 적은 양의 시료 DNA로부터 다량의 DNA fragment를 증폭해줌으로써 sensitivity의 한계를 극복하는 PCR 기술은 여러가지 방향으로 사용되고 있으나 같은 이유로 해서 철저히 확립된 실험기술과 실험수행에 있어 세심한 주의를 기울일 필요가 있다.

본 연구과제의 2차년도와 3차년도에 걸쳐 PCR 반응의 조건은 확립되었다고 생각되나 negative sample을 이용한 false positive signal의 배제에는 상당한 어려움이 있어 왔다.

TAT region이나 VPU region, 또는 MP1.2 set의 GAG region이나 MP3.4 set의 ENV region에 걸쳐 false positive signal을 없애기 위한 노력으로 여러 region을 대상으로 하여 primer sequence의 영향을 검사하였으나 specificity 증진에는 기대에 미치지 못하였다.

한편 plasmid DNA 또는 positive sample DNA의 오염으로 인한 false positive 결과의 해석 및 수정을 위해 여러가지 실험기술과 실험시약들을 사용하여 본 결과로는 주의를 기울여 시약을 준비하거나 cross contamination 될 가능성이 높은 실험과정, 실험 방법들은 되도록 피함으로써 false positive signal의 대부분을 배제할 수 있음을 알았다.

그러나 아직도 negative sample에 대해서는 PCR 검사결과중 몇몇 sample에서 false positive를 보이고 있어 실험절차상의 재정립이 필요한 상태이며 이를 위해 반복실험을 실시하여 positive

로 인식하는 sample에 대해서는 sample 입수처인 임상병리과 의원에 의뢰하여 serological data와 맞추어 보거나, follow-up이 가능한지의 여부를 알아보고 sample의 positivity를 입증하는 과정을 통하여 확립된 기술의 유용성 여부를 종합, 판단하고자 한다.

이를 위해 녹십자 임상병리의원과 긴밀한 협력관계를 가지고 계속 실험하고자 한다.

그리고 PCR 기술에서 negative와 positive의 구별과 더불어 얼마나 적은 양의 시료로부터 얼마만한 양의 product를 얻는지는 검사방법의 sensitivity 측면에서 매우 중요한데 앞서의 결과에서 보듯이 최종적으로 확립된 실험조건, 실험방법에서  $10^6 \sim 10^7$  배 정도의 증폭배수를 얻을 수 있으므로 만족할 만한 수준으로 생각된다. 또한 최종 확립된 기술에서 primer set는 외국에서 발표된 논문에서 발췌한 sequence를 사용하였으므로 독자적인 기술개발의 명목하에 다른 region의 primer들을 가지고 최종 확립된 기술에 응용하여 나름대로의 진단방법 절차를 확립하고자 한다.

이를 위해 앞서 사용한 primer set들을 다시 분리, 정제하여 PCR 검사에 대한 특이성을 점검하여 보고, 필요하다면 새로운 sequence를 도입하여 검사의 특이성을 높일 수 있도록 하고 나아가서 독자적인 진단방법의 확립을 꾀하고자 한다.

한편 오염방지조치도 보다 간편하면서 효과적인 방법을 시도하여 보다 안정되고 보다 손쉬운 방법으로 개발하여 HIV 외에 인체에 해가 되는 또다른 중요한 virus나 병원균의 탐색으로 확대하여 나가하고자 한다.



## 제 5 절 결 론

1. 시료내에 매우 적은 양으로 존재하는 HIV DNA의 존재규명을 위해서 실험관내에서 DNA를 증폭해낼 수 있는 PCR 방법을 이용한 신속하고 간단한 탐색방법을 확립하였다.
2. 국립보건원으로 부터 얻은 seropositive 시료 20 종에서 GAG 와 LTR region 을 검사한 결과, 전체적으로 3 종의 시료에서 negative 를 보여 seropositive 시료의 85 %를 확증하였다.
3. 임상병리과의원에서 얻은 seronegative 시료 50 종에서 거의 100 %의 seronegativity 를 확증하였다.
4. False positivity 의 방지를 위해 pre-mix system 의 도입과 UV 조사에 의한 오염 방지방법을 실시하여 유용성을 확인하였다.

## 제 6 절 참 고 문 헌

1. Barre—Sinoussi., et. al.,(1983) Isolation of T lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome(AIDS). Science 220, 868—870.
2. Gallo, R. C., et. al.,(1984) Human T—lymphotropic retrovirus, HTLV—III, isolated from AIDS patients and donors at risk for AIDS. Science 224, 500—503.
3. Levy, J. A., et. al.,(1984) Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco Patients with AIDS. Science 225, 840—842.
4. Muesing, M. A.,(1985) Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. Nature 313,450—458.
5. Ratner, L., et. al.,(1985) Complete Nucleotide sequence of the AIDS Virus, HTLV—III. Nature 313, 277—284.
6. Sanchez—Pescador, R., et. al.,(1985) Nucleotide sequence and expression of an AIDS—associated retrovirus (ARV—2). Science 227, 484—492
7. Wain—Hobson, S., et. al.,(1985) Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. Cell 40, 9—17.
8. Couroure, A. M., et. al.,(1987) Comparison of commercial kits for the detection of anti—LAV antibodies in blood donors. Ann. Inst. Pasteur/Virol. 138, 61—66.
9. Marlink, R. G., et. al.,(1987) Low sensitivity of ELISA testing in early HIV infection. N. Engl. J. Med. 315, 1549.

10. Ranki, A., et. al.,(1987) Long latency precedes overt seroconversion in sexually transmitted Human Immunodeficiency Virus infection. *Lancet* ii, 589–593.
11. Salahuddin, S. Z., et. al.,(1984) HVLV–III in symptom free seronegative persons. *Lancet* ii, 1418–1420.
12. Feorino, P. M., et. al.,(1988) *Science* 225, 473–478.
13. Gomperts, E. D., et. al.,(1987) *Blood* 65, 1549.
14. Ward, J. W., et. al.,(1986) *J.Am. Med. Assoc.* 256,357.
15. Feorino, P. M., et. al.,(1985) *N. Engl. J. Med.* 312, 1293.
16. Shaw, G. M., et. al.,(1984) Molecular characterization of Human T–Cell Leukemia(lymphotropic) Virus type III in the acquired immunodeficiency syndrome. *Science* 226, 1165–1171.
17. Harper, M. E., et. al.,(1986) Detection of lymphocytes expressing Human T–lymphotropic Virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by in situ hybridization.
18. Kwok, S., et. al.,(1987) *J. Virol.* 61, 1690.
19. Mullis, K. B., et. al.,(1987) *Methods in Enzymology* 155, 335.
20. Imagawa, D. T., et. al.,(1989) Human immunodeficiency virus type I infection in homosexual men who remain seronegative for prologed periods. *N. Engl. J Med.* 320, 1458–1462.
21. Jackson, J. B., et. al.,(1990) Human immunodeficiency virus type I detected in all seropositive symptomatic and asymptomatic individuals. *J. of Clin. Micro.* 28, 16–19.
22. Boyum, A.,(1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from



- human blood. *Scand. J. Clin. Lab. invest.* 21, suppl 97,77–89.
23. Boyum, A.,(1968) Isolation of leucocytes from human blood—further observation (part II). *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21, suppl 97, 31–50.
  24. Boyum, A.,(1976) Isolation of lymphocytes granulocytes and macrophages. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 5, suppl 5, 9–15.
  25. Kitchin, P. A., et. al.,(1990) Avoidance of false positive. *Nature* 344, 201.
  26. Kwok, S., et. al.,(1989) Procedure to minimize PCR—product carryover.
  27. Chin, Y. O., et. al.,(1988) DNA amplification for direct detection of HIV—1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science* 239, 295–297.
  28. Sarkar, G. A., et. al.,(1990) Shedding light on PCR contamination. *Nature* 343, 27.
  29. Schochetman, G., et. al.,(1988) Perspective : Polymerase Chain Reaction. *J. Infect. Dis.* 158, 1154–1157.
  30. Medveczky, P., et. al.,(1987) Rapid vacuum driven transfer of DNA and RNA from gels to solid support. *Biotechnology* 5, 242.
  31. Olszewska, E., et. al.,(1988) Vacuum blotting enhances nucleic acid transfer. *Trend. in Genetic* 4, 92.
  32. Feinberg, A. P., et. al.,(1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6.
  33. Abbott, M. A., et. al.,(1988) Enzymatic gene amplification, Qualitative and Quantitative methods for detection proviral DNA amplified in vitro. *J of Infect. Dis.* 158, 1158.
  34. Wages, J. M., et. al.,(1991) Clinical performance of a polymerase chain reaction testing algorithm for diagnosis of HIV—1 infection in peripheral

- blood mononuclear cells. *J. Med. Virol.* 33, 58–63.
35. Varmus, H. E., et. al.,(1977) *Cell* 11, 307–319.
  36. Fritsch, E. F., et. al.,(1977) *J. Virol.* 24, 461–469.
  37. Malim, M, H., et. al., *Nature* 338, 254–257.
  38. Ho. D. D., et. al.,(1986) Infection of monocyte/Macrophage by Human T lymphotropic Virus type III. *J. Clin. Invest.* 77,1712–1715.
  39. Gartner, S., et. al.,(1986) The role of monocuclear phagocytes in HTLV—III /LAV infection. *Science* 233, 215–219.
  40. Koenig, S., et. al.,(1986) Detectioin of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 233, 1089–1093.
  41. Lang, J. M. A., et. al.,(1986) Persistent HIV antigenemia and decline of HIV core antibodies associated with transition to AIDS. *Br. Med. J.* 293, 1459–1462.
  42. Michel, L.,et. al.,(1988) Identification of HIV–infected seronegative individuals by a detect diagnostic test based on hybridization to amplified viral DNA. *Lancet.* 418–421.
  43. Laure, F., et. al.,(1988) Detection of HIV–1 DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction. *Lancet*, 538–540.
  44. Maniatis, T., et. al.,(1989) *Molecular Cloning* 2nd. ed. Cold spring harbor laboratory press.
  45. Southern. E.,(1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503.

## 제 IV 장 단백질을 이용한 HIV 진단방법의 개선

### Establishment of diagnostic methods for HIV using protein

許淑珍  
趙泳杰  
南廷球

李柱實  
李鴻來  
李榮鍾



여 백

# 1. HIV 감염자로 부터의 바이러스 분리 및 성상

## 제 1 절 서 설

1981년에 AIDS가 미국에서 처음으로 발견된 이후 감염자 및 환자의 수가 급격히 증가되었고 우리나라에서도 1985년 외국인 환자와 내국인 감염자가 확인됨으로써 AIDS 문제가 대두되기 시작하였다. 1983년 블란서의 Sinoussi 등에 의하여 Human Immunodeficiency Virus(HIV)라는 retrovirus가 AIDS의 원인 병원체로 규명된 이래<sup>1)</sup> HIV 감염은 혈청 및 plasma내에 항체의 존재 여부를 확인할 수 있게 되었으나, 세포배양 방법을 이용하여 Reverse transcriptase 및 Ag-capture ELISA 시험으로 검색한 감염자 림프구로 부터의 바이러스 분리율은 30-89% 정도로 다양하다<sup>2-7)</sup>. 감염자 질병 진전을 예측할 수 있는 방법은 CD4/CD8 ratio 비교등 여러가지가 있으나 바이러스의 분리 정도를 통하여 발병 여부를 가늠할 수도 있다.

본 연구실에서는 항체검색용 진단제 개발 및 동물면역용으로 H9/HTLV-III 세포의 대량 배양을 비롯하여 세포 감수성 시험 등 국내 HIV 감염자로 확인된 사람들에 대해 바이러스 분리시험을 하여 현재 외국에서 활발히 진행되고 있는 HIV vaccines, 치료제 개발 및 국내에서 개발이 예상되는 항AIDS 천연물질과의 상

호관계 등 제반문제에 대처하였다.

## 제 2 절 실험재료 및 방법

### 1. 사용 세포 및 배양

면역형광 항체시험의 항원 제조 및 HIV 감염자로 부터 바이러스 분리를 위하여 H9/HTLV-Ⅲ, H9, HIV 항체음성인 사람의 fresh lymphocytes, HTLV-I 바이러스를 함유하고 있으며 HIV감염에 의해 다핵거대세포를 형성하는 MT-2 및 MT-4 세포주를 사용하였다. H9/HTLV-Ⅲ 및 H9 세포주는 미국 ATCC에서 분양받았고, MT-2 세포주는 일본 NIH special pathogen laboratory로 부터 분양받았다. 상기 세포들은 10% Fetal bovine serum(FBS)을 첨가한 RPMI-1640 배양액 (GIBCO)으로 배양 및 계대하였다.

### 2. HIV 항체양성자 lymphocytes로 부터 바이러스 분리<sup>2,4,6,8,9,10)</sup>

HIV 감염자 혈액으로 부터의 림프세포 분리 방법은 전년도 ('89) 국립보건원보에 기술한 바와 같으며, HIV 분리를 제고를 위하여 두가지 방법으로 cocultivation 하였다.

A Phytohemagglutinin-p(PHA-p, sigma)로 activation 시킨



양성자 lymphocytes 와 동일하게 처리한 정상인의 lymphocytes 와의 cocultivation

혈액에서 분리한 HIV 양성자 및 정상인의 lymphocytes 를 count 하여 각각 ml 당  $4\mu\text{g}$  의 PHA-p가 함유된 RF-10 medium[RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated FBS, penicillin (100U/ml)-streptomycin( $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 25mM/ml HEPES, 2mg/ml sodium bicarbonate, 2mM/ml L-Glutamine]으로 ml 당  $2 \times 10^6$  개씩 5%  $\text{CO}_2$  가 함유된  $37^\circ\text{C}$ , humidified chamber에서 3일간 처리하였다.

3일 후 세척배지 (RF-10 media without FBS)으로 2회 세척 후 양성자 lymphocytes 와 정상인의 lymphocytes 를 RF-10+IL-2 media[RF-10 media supplemented with 10% Interleukin-2(IL-2, CPI),  $2\mu\text{g}/\text{ml}$  polybrene(sigma) and 3IU/ml sheep anti-human  $\alpha$ -Interferon(IFN)]로 2:1 비율로 혼합하여 24 well plate 에 well 당 1ml ( $2 \times 10^6$  cells) 씩 분주한 후 3-4일에 한번씩 상층액 및 세포를 취하여 Immunofluorescence assay (IFA), Reverse transcriptase(RT) 및 Antigen-capture ELISA 시험을 실시하였다. 7일에 1회씩 activation 시킨 정상인의 lymphocytes 를 well 당  $2 \times 10^6$  개씩 첨가하였으며, cocultivation 7일 후 MT-2 세포를 첨가하여 다핵거대세포 형성 유무를 관찰하였다.

B. Activation 하지 않은 양성자 lymphocytes 와 PHA-p 로 activation 시킨 정상인 lymphocytes 와의 cocultivation

분리된 HIV 양성자 lymphocytes 를 count 하여 preservation media(RPMI-1640 supplemented with 10 % FBS and 10 % Dimethylsulfoxide)으로 vial (ml) 당  $2 \times 10^6$  개씩  $-70^{\circ}\text{C}$  이하의 온도에 보관하였다. 7-10 일 후에 세포를 꺼내어  $37^{\circ}\text{C}$  물에 빠르게 녹인 다음 1ml 의 cold RF-10 과 혼합한 후  $4^{\circ}\text{C}$  상태로 5 분 정도 방치하였다.  $4^{\circ}\text{C}$  에서 다시 2ml 의 cold RF-10 을 넣은 다음 5 분 후 다시 4ml 의 RF-10 을 첨가하여 1,200rpm 에서 5 분간 원심하였다. 상층을 제거하고 10ml 의 cold RF-10 을 넣고 실온에서 1 시간 방치 후 다시 동일하게 원심하였다. 3 일간 activation 시킨 정상인의 lymphocytes 를 1 회 세척한 다음 RF-10 + IL-2 media 로 양성자와 정상인 lymphocytes 의 혼합비율을 1 : 1 로 하여 ml 당  $2 \times 10^6$  개씩 plate 에 넣어 A 에서 기술된 바와 동일하게 시험하였다.

### 3 . CPE (Cytopathogenic effect) 양성이며 HIV-1 항원검사에서 음성인 사람의 plasma 에 대한 HTLV - I 항체시험

HTLV-1 바이러스를 갖고 있는 MT-4 세포주를 원심하여 phosphate buffered saline (PBS, pH7.2) 로 2 회 세척한 다음 spot slide 에 떨어뜨려 건조시켰다. Cold acetone 에 10 분간 처리하여 고정시킨 다음 5 -10 배 희석된 plasma 를 well 당  $20\mu\text{l}$  씩 떨어뜨려 humidified chamber 에서 1 시간 작용시킨 후 PBS 로 3 회 세척하였다. Fluorescein isothiocyanate (FITC) 표식 anti-human IgG conjugate 를  $20\mu\text{l}$  씩

적하시켜 37 °C, incubator에서 1시간 작용시킨 다음 PBS로 3회 세척 후 mounting medium을 올려 놓고 형광현미경으로 관찰하였다.

#### 4. HIV에 대한 세포 감수성 시험

여러 사람의 혈액에서 분리한 후 pooling하여 -70 °C 이하에서 보관한 frozen PBL을 recovery시켜 37 °C에서 신속하게 녹인 후 washing medium을 첨가하고 1,000 rpm에서 10분간 2회 원심하여 DMSO를 제거하였다. 침전세포에 activation medium을 넣고 suspension시킨 다음 3일간 배양시킨 후 배양중인 MT-2 및 MT-4 세포와 더불어 2회에 걸쳐 1,000 rpm에서 10분간 원심하였다. 상층 제거 후 washing medium으로 resuspension하고 8개의 tubes에 동량씩 분주하고 1,000 rpm에서 10분간 원심하고 상층을 제거하였다. 보관중인 HIV를 10배 단위로  $10^3$ 부터  $10^8$ 까지 희석한 후 각 tube에 0.2ml씩 접종하고 37 °C에서 1시간 방치한 후 RF-10 medium을 넣고 24 well plate에 각각 분주한 다음 CPE 및 세포 상태를 계속 관찰하였으며, 7일 후 배양상층액 및 세포를 취하여 RT 및 Ag-capture ELISA 시험을 실시하였다.

#### 5. HIV 항체 양성자 lymphocytes 배양세포내 p24 항원 탐지를 위한 Immunofluorescence antibody assay<sup>11,12)</sup>

정상인의 lymphocytes와 cocultivation된 후 9일 지난 HIV 양성자 lymphocytes를 PBS (pH 7.2)로 2회 세척한 다음 spot



slide 에 떨어뜨려 건조시켰다. Cold acetone 에 10 분간 처리하여 고정시킨 후 anti-p24 (mouse monoclonal antibody, Dupont) 를 PBS 로 10 배 단계 희석하여 well 당 20  $\mu$ l 씩 떨어뜨리고 humidified chamber 에서 1 시간 작용시킨 후 PBS 로 3 회 세척하였다. Fluorescein isothiocyanate (FITC) 표식 anti-mouse IgG conjugate 를 20  $\mu$ l 씩 적하시켜 37°C, humidified chamber 에서 1 시간 작용시킨 후 PBS 로 3 회 세척한 다음 mounting medium 을 올려놓고 형광현미경으로 관찰하였다.

## 6. HIV 접종된 H9 세포배양액내 FBS 농도에 따른 RT activity 비교

대량 배양시 FBS 농도에 따른 HIV 생성능을 측정하기 위해 H9 세포를 count 하여 ml 당  $2 \times 10^4$  cells 로 맞춘 다음 여러 개의 tube 에 넣고 1,000 rpm 에서 10 분간 원심하였다. 상층 제거 후 HIV 를 접종한 다음 37°C 에서 1 시간 동안 정치시켰다. 2%, 5%, 10%, 20% FBS 함유 RPMI-1640 배지를 각 tube 에 넣은 다음 suspension 시키고 24 well plate 에 분주하였으며 3 일 에 1 회씩 상층을 수거하여 RT activity 를 실시하였다.

## 7. 항원탐지시험<sup>13,14)</sup>

HIV 항체양성자 lymphocytes 배양세포에 대한 Ag-capture ELISA 시험은 전년도 ('89) 국립보건원보에 기술된 바와 같다.

## 제 3 절 실험 결과

### 1. HIV 감염자로 부터 바이러스 분리

100 명의 HIV 감염자 림프세포로 부터 바이러스 항원검색을 시도한 결과 Table 1 에서 보는 바와 같이 16 명 (16%) 에서 Ag-capture ELISA 에 의해 HIV 항원이 탐지되었는 바, 그 중 3 명은 AIDS 로 사망하였고 나머지 13 명은 무증상 감염자였다. 또한 2 명 (AIDS 환자 1 명 포함) 의 plasma 에서도 항원이 검출되었다. Table 1 에서와 같이 16 명의 HIV 항원 양성 림프세포 중 5 명은 CPE 양성이었고 7 명은 RT 양성이었으며 IFA 양성은 5 명이였다. 또한 Ag-capture ELISA 에서 음성으로 나온 반면 CPE 나 RT 에서 양성으로 나온 경우도 있었으나 Ag-capture ELISA 가 가장 민감한 것으로 볼 때 이들은 모두 음성으로 처리하였다. Table 2 에 나타난 바와 같이 7 명의 AIDS 환자 (모두 사망) 4 명으로 부터 HIV 항원이 탐지되었고 (57%), 무증상 감염자 93 명 중 14 명에서만 HIV 항원이 검색되었다 (15%).

### 2. PHA-p 로 activation 된 HIV 감염자 PBL 과 처리되지 않은 PBL 로 부터 바이러스 분리

PHA-p 가 처리된 100 명의 HIV 감염자 lymphocytes 및 처리하지 않은 12 명의 lymphocyte 를 배양하여 HIV 분리율을 비교한 결과, Table 3 에 보는 바와 같이 Ag-capture ELISA 에서 activa-

tion 시킨 PBL 중 16 명으로 부터 HIV 항원이 검출되었으며 (16%)  
처리하지 않은 PBL 12건 중 1명에서 HIV가 탐색되었다 (8.4%).

### 3. HIV항원 음성인 사람의 plasma에 대한 HTLV-I 항체 시험

Cocultivation에서 전형적인 CPE(Fig.1)를 보이나 RT 및  
Ag-capture ELISA 시험에서 음성으로 나타나는 사람의 plasma를  
단계 희석하여 MT-4 세포를 이용한 IFA로 HTLV-I 항체 시험을 해  
본 결과 음성으로 확인되었다.

### 4. HIV에 대한 세포 감수성 시험

Pooling 되어  $-70^{\circ}\text{C}$  이하에 보관 후 recovery한 primary  
lymphocytes와 established cell lines인 MT-2, MT-4 세포주에  
HIV를 접종하여 세포 감수성 시험을 실시한 결과 Table 4에 나타난  
바와 같이 freezing된 HIV 항체 음성인 사람들의 lymphocytes  
는 HIV에 대해 Ag-capture ELISA에서  $10^4$  희석까지만 양성이 나  
오고, RT에서는  $10^3$  배 희석에서조차 음성으로 시험되었다. MT-2  
세포는  $10^7$  배 희석까지 민감도가 낮은 CPE에서도 양성을 나타내  
었다.

### 5. HIV 감염자 lymphocytes로 부터 p24 항원 검색

2인의 HIV 항체 음성인 사람의 fresh한 PBL과 cocultivation



된 12 명의 HIV 감염자 lymphocytes 를 배양 9 일 후 IFA 로 p24 항원 검색을 한 결과 Table 3 에 나타난 바와 같이 p24 항원이 전혀 검출되지 않았다.

#### 6. FBS 농도에 따른 HIV 생성능 비교

HIV 가 접종된 H9 세포에 각 농도 (2%, 5%, 10%, 20%) 의 FBS 를 넣고 배양한 결과 Fig.2 에서와 같이 7 일을 전후해서 RT 생성능이 증가하였고, 10 일 후에는 5% FBS 가 함유된 배양액에서 최고의 HIV 생성능을 보여 주었다.

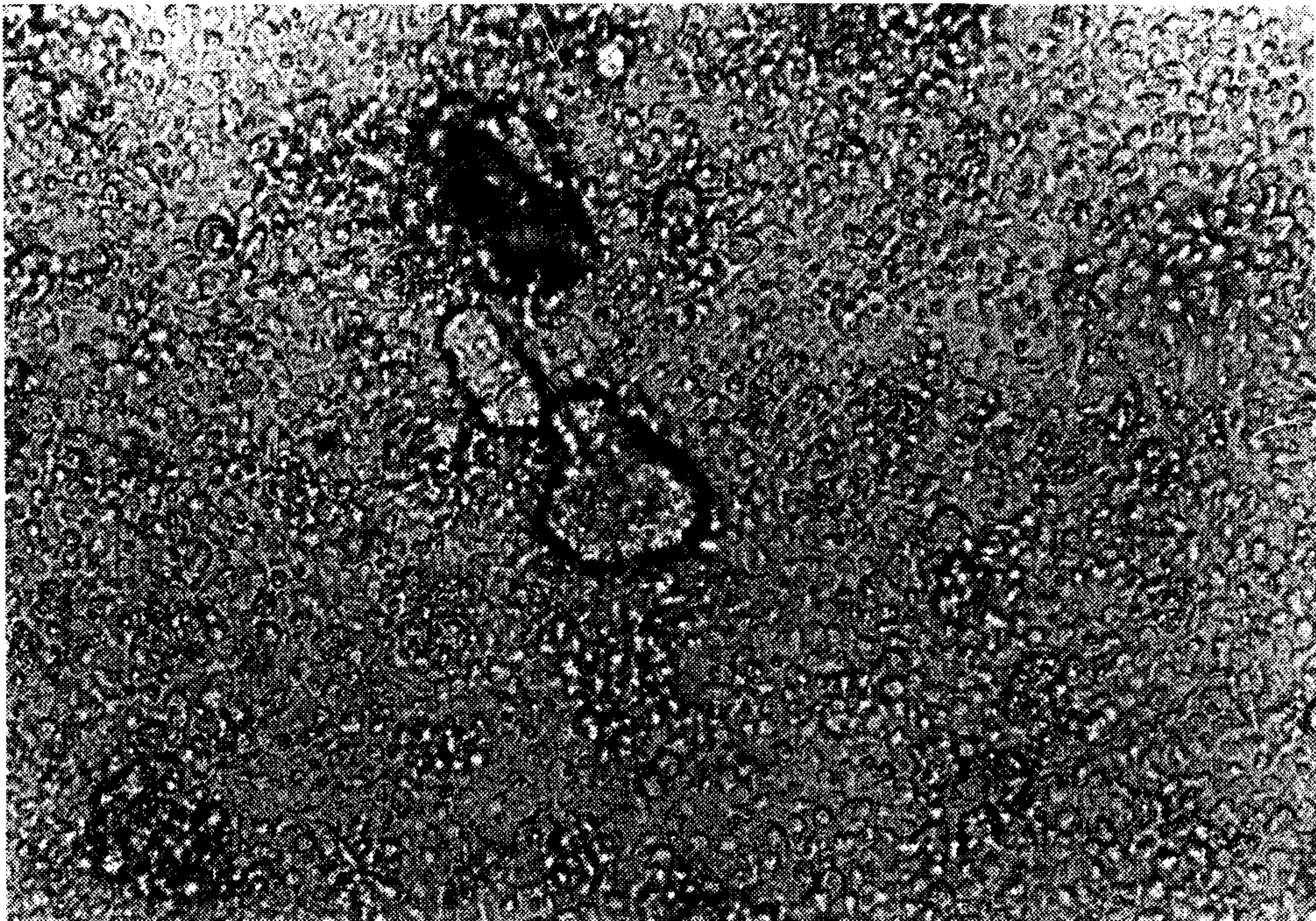


Fig. 1. Formation of multinucleated giant cells from lymphocytes of HIV seropositive person cocultivated with normal person's lymphocytes,

Table 1. Comparison of HIV antigen detection according to antigen-capture ELISA, CPE, IFA and RT

Methods of Detection	All	Only by				By ELISA & RT	Total
		ELISA	CPE	IFA	RT		
Positive	5	11	2	—	5	2	25
Negative	75	—	—	—	—	—	75
Total	80	11	2	—	5	2	100

Table 2. Comparison of HIV isolation rate from lymphocytes culture of 100 seropositive persons according to symptoms

Symptoms	Virus		Positive	Negative	Positive rate(%)	Total
	Isolation	Methods				
AIDS		ELISA	4	3		
		CPE	3	4	57	7
		IFA	3	2		
		RT	3	4		
Asymptomatic		ELISA	14	79		
		CPE	4	89	15	93
		IFA	2	10		
		RT	9	5		
Total			18	82	100	

Table 3. Result of HIV antigen detection from PBL of HIV seropositive individuals activated with PHA – p or not

Virus Isolation	Methods	Positive	Negative	Total
Activated with PHA – p	ELISA	18(2)	82	100
	CPE	7	93	
	IFA	5	12	
	RT	12	63	
Not activated with PHA – p	ELISA	1	11	12
	CPE	NO	NO	
	IFA (p24)	0	12	
	RT	ND	ND	
Total		19	93	112

(2) : means HIV ag detection from plasma

NO : Not observed

ND : Not done



Table 4 Result of sensitivity test of HIV on frozen PBL, MT-2 & MT-4 cells

Virus dilution kind of cells	10 <sup>3</sup>			10 <sup>4</sup>			10 <sup>5</sup>			10 <sup>6</sup>			10 <sup>7</sup>			10 <sup>8</sup>		
	Detection	CPE	RT	Ag-c-E	CPE	RT	Ag-c-E	CPE	RT	Ag-c-E	CPE	RT	Ag-c-E	CPE	RT	Ag-c-E	CPE	RT
Frozen PBL	NO	-	+	NO	-	+	NO	-	-	NO	-	-	NO	-	-	NO	-	-
MT-2	+	+	ND	+	+	ND	+	-	ND	+	-	ND	+	-	ND	-	-	ND
MT-4	+	-	ND	+	-	ND	-	-	ND	-	-	ND	-	-	ND	-	-	ND

NO : Not observed      ND : Not done      CPE : Cytopathogenic effect      RT : Reverse transcriptase

Ag-c-E    Antigen-capture enzyme linked immunosorbent assay

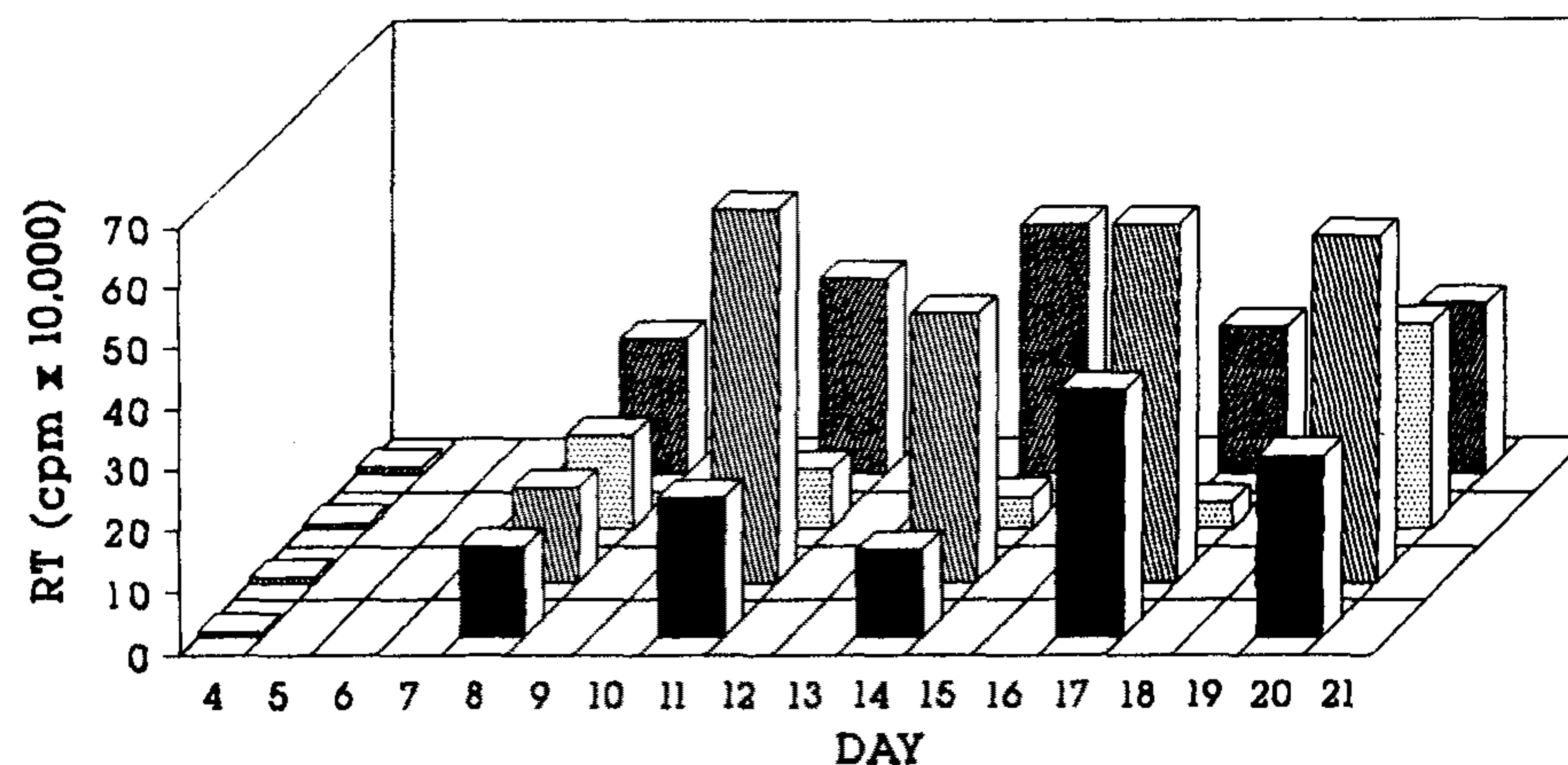


Fig 2 Comparisons of virus production according to different FBS concentration in H9 cells infected with HIV-1.

## 제 4 절 고 찰

1984년 미국에서 HTLV-III라고 명명된 retrovirus가 AIDS 또는 ARC인 환자의 peripheral blood lymphocytes에서 분리되었고<sup>15,16)</sup>, 비슷한 시기에 프랑스에서는 LAV1이라는 유사한 바이러스가 lymphadenopathy syndrome 환자에서 분리되었다<sup>1)</sup>. 그리고 HIV 바이러스 분리는 무증상 감염자 보다는 임상증상을 보이는 감염자에게서 높은 바이러스 분리율을 나타내고 있다. Cocultivation에서 전형적인 CPE를 보이지만 HIV 항원검사에서 음성으로 나온 것은 HTLV-I 바이러스의 배양방법이 HIV와 동일한 것으로 미루어 볼 때 HTLV-I 감염으로 추측하였으나 IFA에서 음성인 것은 HIV나 HTLV-I 이외의 다른 바이러스에 의한 감염일 것이라고 사료되며, RT양성이며 Ag-capture ELISA에서 음성으로 나온 것은 특이도에 있어서 Ag-capture ELISA가 RT보다 높은 것으로 간주된다.

여러 사람의 lymphocytes를 pooling하여  $-70^{\circ}\text{C}$  이하에 보관 후 recovery하여 HIV 감염자 lymphocytes와 cocultivation한 것은 RT 및 Ag-capture ELISA 시험에서 매우 낮은 민감도를 보였는 바, 이는 CD4-receptor가 손상되었기 때문이라 생각되며, 비록 MT-2 세포는 높은 HIV 희석배수에서 양성으로 나왔지만 established cell lines이라는 점과 CPE 음성이면서 Ag-capture ELISA에 양성인 경우가 많은 점으로 볼 때 primary 세포인 HIV 항체 음성인 사람의 fresh한 lymphocytes를 사용하는 것이

가장 적합하리라 생각된다.

바이러스 대량 배양을 위하여 HIV에 감수성인 H9 세포주에 바이러스를 접종했을 경우 FBS의 농도에 따른 reverse transcriptase 생성능을 보면 배양 초기에는 20% FBS에서 높은 생성능을 보였으나 시간이 경과할 수록 5% FBS에서 최고의 RT activity를 보인 바 5% FBS를 사용하여 HIV를 배양하는 것이 적당한 것으로 보여진다.

## 제 5 절 결 론

HIV 감염자 혈액 림프세포로부터 바이러스 분리 및 진단제 개발용 항원제조 시험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 100명의 HIV 감염자 림프세포로부터 바이러스 항원 검색을 한 결과 16명(16%)에서 HIV 항원이 검색되었으며 그 중 3명은 AIDS로 사망하였고 나머지 13명은 무증상 감염자였다.

2. AIDS 환자 1명을 포함해서 2명의 plasma에서 HIV 항원이 검출되었다.

3. 7명의 AIDS 환자(모두 사망)중 4명에서 HIV 항원이 탐지되었고(57%), 무증상감염자 93명중 14명에서만 HIV 항원이 검색되었다(15%).



4. CPE 나 RT 시험 보다는 Ag-capture ELISA 가 민감도나 특이도에서 더욱 우수하였다.

5. PHA-p 가 처리된 100 명의 HIV 감염자 림프세포 중 16 명에서 ( 16 % ), 처리되지 않은 감염자 세포는 12 명중 1 명에서 ( 8.4 % ) HIV 항원이 검색되었다.

6. 여러 사람의 primary lymphocytes 를 pooling 하여  $-70^{\circ}\text{C}$  이하에 보관후 사용시 꺼내어 cocultivation 한 것보다는 established cell 인 MT-2 세포주가 HIV에 대해 더욱 민감하였다.

7. 항원 제조용 바이러스 대량 배양시 HIV를 감수성 세포인 H9에 접종한 후 5%의 FBS를 사용하여 배양한 것이 가장 적합하였다.

## 제 6 절 참 고 문 헌

1. Barre—Sinoussi F., et al., *Science*. 229 : 368, 1983.
2. Jackson J. B., et al., *J. Clinic. Microbiol.* 26(7) . 1416, 1988.
3. Bolton V., et al., *J. Clinic. Microbiol.* 25 : 1411, 1987.
4. Gallo D., et al., *J. Clinic. Microbiol.* 25 : 1291, 1987.
5. Levy J. A., et al., *J. Infect. Dis.* 152 : 734, 1985.
6. Salahuddin S. Z., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82 : 5530, 1985
7. Ward J. W., et al., *J. Am. Med. Assoc.* 256 : 357, 1986.
8. Zagury D., et al., *Science*. 231 : 850, 1986.
9. Gallo R. C., et al., *Science*. 224 : 500, 1984.
10. Montefiori D. C., et al., *Virology*. 160 : 372, 1987.
11. Carlson J. R., et al., *J. Clinic. Microbiol.* 25(3) · 494, 1987.
12. Gallo D., et al., *J. Clinic. Microbiol.* 26(8) · 1487, 1988.
13. ELAVIA AgI, *Diagnostic Pasteur*, pp. 1—12.
14. Higgins J. R., et al., *J. Clinic. Microbiol.* 24(3) · 424, 1986.
15. Shinji Harada, et al., *Science*. 229 : 563, 1985.
16. Popovic M., et al., *Science*. 224 : 497, 1984.

## 2. HIV 감염자 혈청에서 CD4 antigen과 soluble CD8차

### 제 1 절 서 설

AIDS는 human immunodeficiency virus-1(HIV-1)의 감염에 의하여 이 virus는 CD4 antigen을 표현하는 림프구를 선택적으로 감염시키는 lymphocytopathic retrovirus이다<sup>1)</sup>. HIV에 초기 감염시는 CD4/CD8 ratio의 큰 변화없이 약간의 혈소판 감소와 심한 림프구를 나타내며 뒤이어 CD8 cells 현저한 증가로 CD4/CD8 비가 역전되고 비정상적인 림프구를 동반한 림프구증가(lymphocytosis)가 일어나고 그 후 점차 림프구가 감소한다.<sup>2-4)</sup> CD4는 주로 helper T lymphocytes와 monocyte/macrophage lineage의 세포표면에 표현된다. 대식세포의 CD4 기능은 잘 알려져 있지 않지만, HIV의 envelope glycoprotein gp120이 주로 T cells 표면에 있는 HIV receptor인 CD4 항원에 결합함으로써 시작된다.<sup>5)</sup> 정상적으로 T cells에 있는 CD4는 T cell activation을 촉진하는 항원제시세포(antigen presenting cell)상의 class II Major Histocompatibility Complex(MHC)와 작용한다. HIV의 cell 혹은 tissue tropism은 CD4 receptor의 expression에 의존하며 CD4와 gp120의 상호작용으로 CD4 cell 이상기능이 나타나고 궁극적으로 CD4 세포의 파괴를 초래한다<sup>5)</sup>.



T 림프구 subsets 표면에 표현되는 CD4 와 CD8 glycoprotein 은 immunoglobulin gene superfamily 에 속하며 CD4 는 mouse 와 사람에서 55 Kilodelton(Kd) monomer 이고 이와 달리 CD8 는 두 종간에 전혀 다르고 사람의 말초혈액 T cells 표면에서 34 Kd disulfide-linked homodimer 와 homomultimer 를 구성하고 있다<sup>6)</sup>.

본 실험에서 저자들은 국내 HIV 감염자들에서 CD4 antigen 과 soluble CD8(SCD8) level 이 AIDS 환자로 진행되는 과정에서 예후 판정의 marker 로 이용될 수 있는지와 이들의 혈중농도가 CD4 cells 과의 사이에 어떤 상관관계가 있는지를 알아보고자 하였다.

## 제 2 절 실험재료 및 방법

### 1. 대 상

건강한 성인 21 명을 대조군으로, 무증상 HIV 감염자 53 명으로부터 얻은 혈청 63 건( 9 명에 대해서 약 11.8 개월 간격으로 반복 측정되었음 ) 을 대상으로 하였다.

### 2 . CD 4 and CD 8 Lymphocyte Count

Falcon tube 에 FITC 가 결합된 anti-Leu 3a(CD8) monoclonal antibody 와 phycoerythrin(PE) 이 결합된 anti-Leu-2a(CD8) monoclonal antibody 가 혼합된 Simultest Reagent(Beckton-Dickin-

son 사) 를 20uL 넣고 100 uL 의 anticoagulated whole blood 를 blank 및 sample 에 넣고 15 분간 실온에서 10 분간 incubation 후 300 g 로 5 분간 원심한 상청액은 버리고 50uL 를 남긴 후 1% paraformaldehyde 0.5ml 를 넣고 3 초간 vortexing 하여 빛을 차단한 채로 4°C 에 고정하여 두었다가 flow cytometry 를 이용하여 CD4 및 CD8 fraction 을 측정하여 구하였다.

### 3. CD 4 Antigen Assay

T Cell Sciences 사 (Cambridge, Mass.) 의 Cell Free CD4 Test Kit 를 이용하여 측정하였다. Kit 에 포함된 anti-CD4 monoclonal antibody 를 polystyrene microtiter plate wells 에 coating 하고 약 40 시간 incubation 후 coating solution 을 버리고 blocking solution 을 넣고 37°C 에 2 시간 incubation 후, 2-3 회 세척 후 sample diluent 를 50uL 씩 각 wells 에 분주한 후 여기에 standards 와 1:2 로 희석된 혈청을 첨가하였다. 37°C 에 2 시간 incubation 후 세척하고 horse-radish peroxidase(HRP)-conjugated anti-CD4 antibody 를 blank 를 제외한 모든 wells 에 넣은 후 37°C 에 2 시간 incubation 후 100uL 의 OPD 기질액을 첨가하여 실온에서 30 분 방치하여 발색시킨 후 stop solution (2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 을 첨가 후 490 nm 에서 ELISA reader 로 흡광도를 측정하였다.

6 개의 standards 로 부터 얻은 측정치를 X 축 농도, Y 축 흡광도로 하여 standard curve 를 그린 후 각각의 농도를 산출하여 얻

었다.

#### 4 . Soluble CD 8 assay

역시 T Cell Sciences 사의 Cell Free CD8 Test Kit 로 CD4 antigen assay 와 유사한 방법으로 실시하였다.

### 제 3 절 결 과

#### 1 . CD4 세포수 , CD 4 antigen , CD8세포수와 SCD8치간의 상관관계

정상인 21 명의 혈청에서 측정된 CD4 antigen 치는  $4.6 \pm 3.8$  U/ml, HIV 감염자 63 건 ( 53 명 ) 에서의 측정치는  $35.5 \pm 58.0$  U/ml 로 유의하게 감염자에서 높았다 ( $p < 0.001$ ) (Table 1, 그림 1 ). 정상인 21 명에서의 SCD8 치는  $231 \pm 95$  U/ml, 감염자 63 건 ( 53 명 ) 에서는  $505 \pm 311$  U/ml로 감염자에서 유의하게 높았다 ( $p < 0.001$ ). 감염자에서 CD4 세포수와 CD8 세포수간에 ( $r = 0.28, p < 0.05$ ), CD8 세포수와 SCD8 치간에 ( $r = 0.44, p < 0.01$ )는 각각 유의한 상관관계를 나타내었으나 CD4 세포수와 CD4 antigen 치간에는 유의한 상관관계를 보이지 않았다 ( $r = 0.21, p = 0.10$ ). 정상인에서는 CD4 세포수와 CD8 세포수에서만 유의한 상관관계를 보였다 ( $r = 0.92, p < 0.0001$ ).

정상인 13 명과 감염자 63 건 ( 53 명 ) 에서 본 실험시에 채혈한 말초혈액에서의 CD4 세포수는  $1140 \pm 605$  (/mm<sup>3</sup>) 로 ( $p < 0.01$ ), CD4 (%)는  $33.8 \pm 13.8$ (%)에서  $20.1 \pm 9.7$ (%)로 감소하였고 ( $p < 0.01$ ),



CD8 세포수는  $853 \pm 397 (/mm^3)$ 에서  $1458 \pm 770 (/mm^3)$ 로 CD8 (%)는  $27.3 \pm 7.4 (%)$ 에서  $44.6 \pm 13.6 (%)$ 로 증가하였고 ( $p < 0.001$ ), 그리고 CD4/CD8 비는  $1.45 \pm 0.56$ 에서  $0.54 \pm 0.47$ 로 감소하였다 ( $p < 0.001$ ).

## 2. CD4 세포수 및 CD4/CD8 Ratio

2회 이상 반복 측정된 27명에서의 HIV 감염 사실 확인 후 평균 3.6개월 뒤 첫 검사시의 CD4 세포수는 평균  $749 \pm 399 (/mm^3)$ 였고, 첫 검사 후 평균 17.6 (HIV 감염 확인 후 21.2)개월 뒤에는  $592 \pm 365 (/mm^3)$ 로 감소하였으나 통계학적으로 유의하지 않았으나 ( $p < 0.05$ ), 말초혈액에서의 CD4 (%)는  $30.7 \pm 9.5 (%)$ 에서 17.6개월 후  $18.2 \pm 9.7 (%)$ 로 통계학적으로 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.001$ ). CD4/CD8 ratio는 첫 검사시  $0.78 \pm 0.39$ 이었고 17.6개월 후에는  $0.49 \pm 0.39$ 로 통계학적으로 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.01$ ).

## 3. CD4 antigen 과 Soluble CD8 의 반복측정

HIV 감염자 9명에서 평균 11.8개월 간격으로 CD4 antigen, SCD8을 2번 측정하였다. CD4 세포수는 첫 검사시는  $874 \pm 507 (/mm^3)$ , 11.8개월 후에는  $530 \pm 239 (/mm^3)$  ( $p < 0.05$ )로 감소하였고, CD4 (%)는  $26.6 \pm 9.1 (%)$ 에서  $17.1 \pm 4.1 (%)$ 로 유의하게 감소하였다 ( $P < 0.05$ ). CD8 세포수는  $1529 \pm 563 (/mm^3)$ 에서  $1832 \pm 891 (/mm^3)$ 로 증가하였으나 통

계학적으로 유의하지는 않았다 ( $P < 0.05$ ). CD4/CD8 비는  $0.56 \pm 0.3$ 에서  $0.34 \pm 0.1$ 로 유의하게 감소하였으나 ( $P < 0.05$ ), CD4 antigen 은  $34.1 \pm 62.4$ (U/mL)에서  $14.9 \pm 14.5$ (U/mL)로 감소 ( $P > 0.05$ ), SCD 8 는  $545 \pm 469$ (U/mL)에서  $555 \pm 300$ (U/mL)로 증가하였다 ( $P > 0.05$ ) (Table 2, 그림 2).

Table 1. The levels of CD4 antigen and soluble CD8, and lymphocyte subsets in normal control and HIV infected sera.

Test	Group	Control Sera		HIV Infected Sera		P-value
		No.	Mean ± S.D	No.	Mean ± S.D	
CD4 antigen (U/mL)		21	4.6 ± 3.8	63	35.5 ± 58.0	<0.001
Soluble CD8 (U/mL)		21	231 ± 96	63	505 ± 311	<0.001
CD4 cells(/mm <sup>3</sup> )		13	1140 ± 605	61	660 ± 385	<0.05
CD8 cells(/mm <sup>3</sup> )		13	853 ± 397	61	1479 ± 770	<0.01
CD4/CD8 ratio		13	1.34 ± 0.31	63	0.54 ± 0.47	<0.001
CD4(%)		13	35.9 ± 10.7	63	20.1 ± 9.7	<0.001
CD8(%)		13	27.4 ± 7.1	63	44.6 ± 13.6	<0.001

Table 2. The changes of CD4 cells count and CD4 antigen and CD8 cells count and soluble CD8 in 9 asymptomatic HIV seropositive persons with mean 11.8 months interval.

Test	Period	First Test	Second Test	P-value
		Mean ± S.D	Mean ± S.D	
CD4 antigen (U/mL)		34.1 ± 62.4	14.9 ± 14.5	>0.05
Soluble CD8 (U/mL)		545 ± 469	555 ± 300	>0.05
CD4 cells(/mm <sup>3</sup> )		874 ± 507	530 ± 239	>0.05
CD8 cells(/mm <sup>3</sup> )		1529 ± 563	1832 ± 891	>0.05
CD4/CD8 ratio		0.56 ± 0.29	0.34 ± 0.11	<0.05 *
CD4(%)		26.6 ± 9.1	17.1 ± 4.13	<0.05 *
CD8(%)		50.4 ± 8.4	53.1 ± 5.3	>0.05



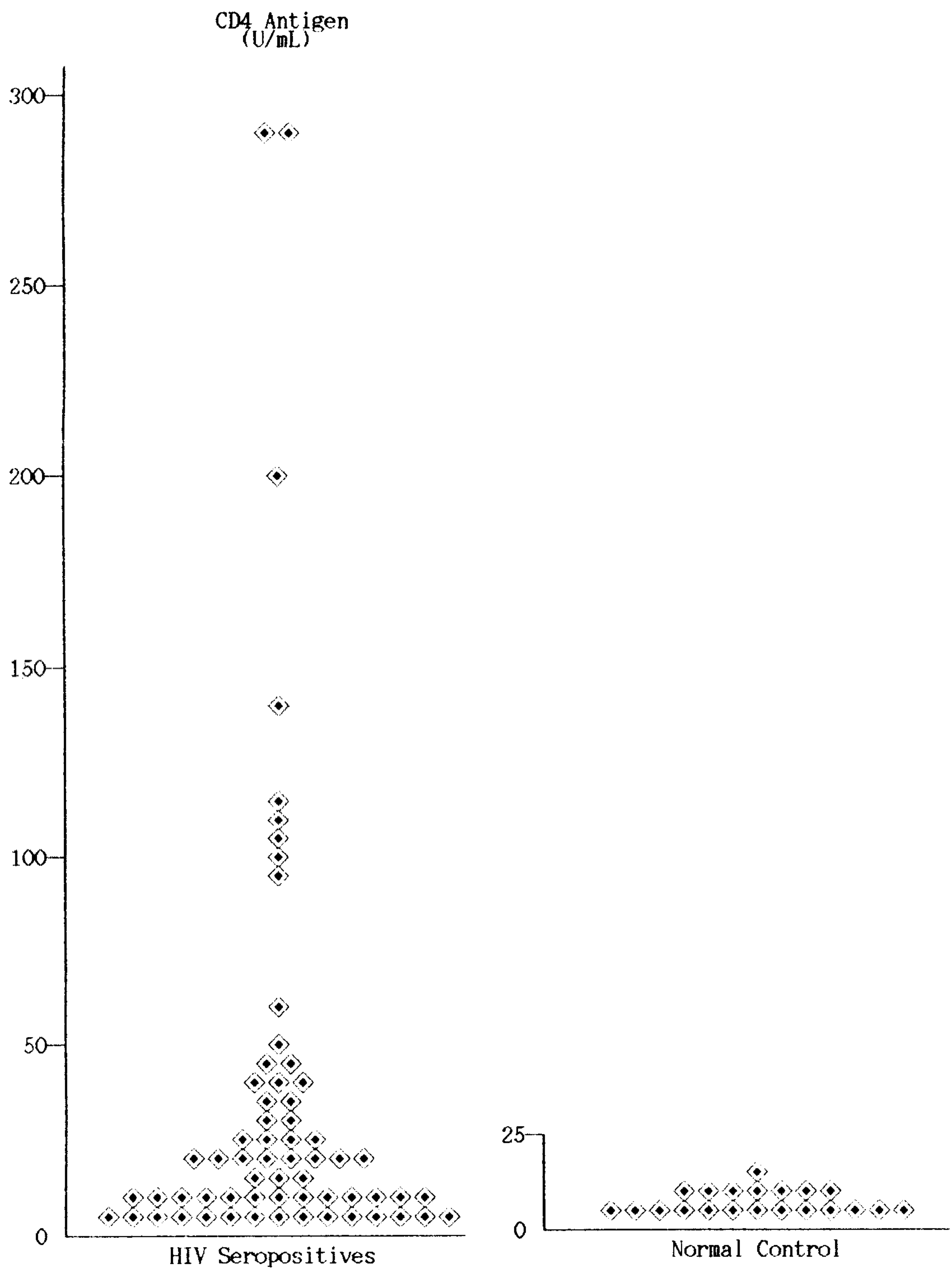


Fig. 1. Levels of CD4 antigen (U/mL) in 21 normal control and 63 sera from 53 HIV infected persons.

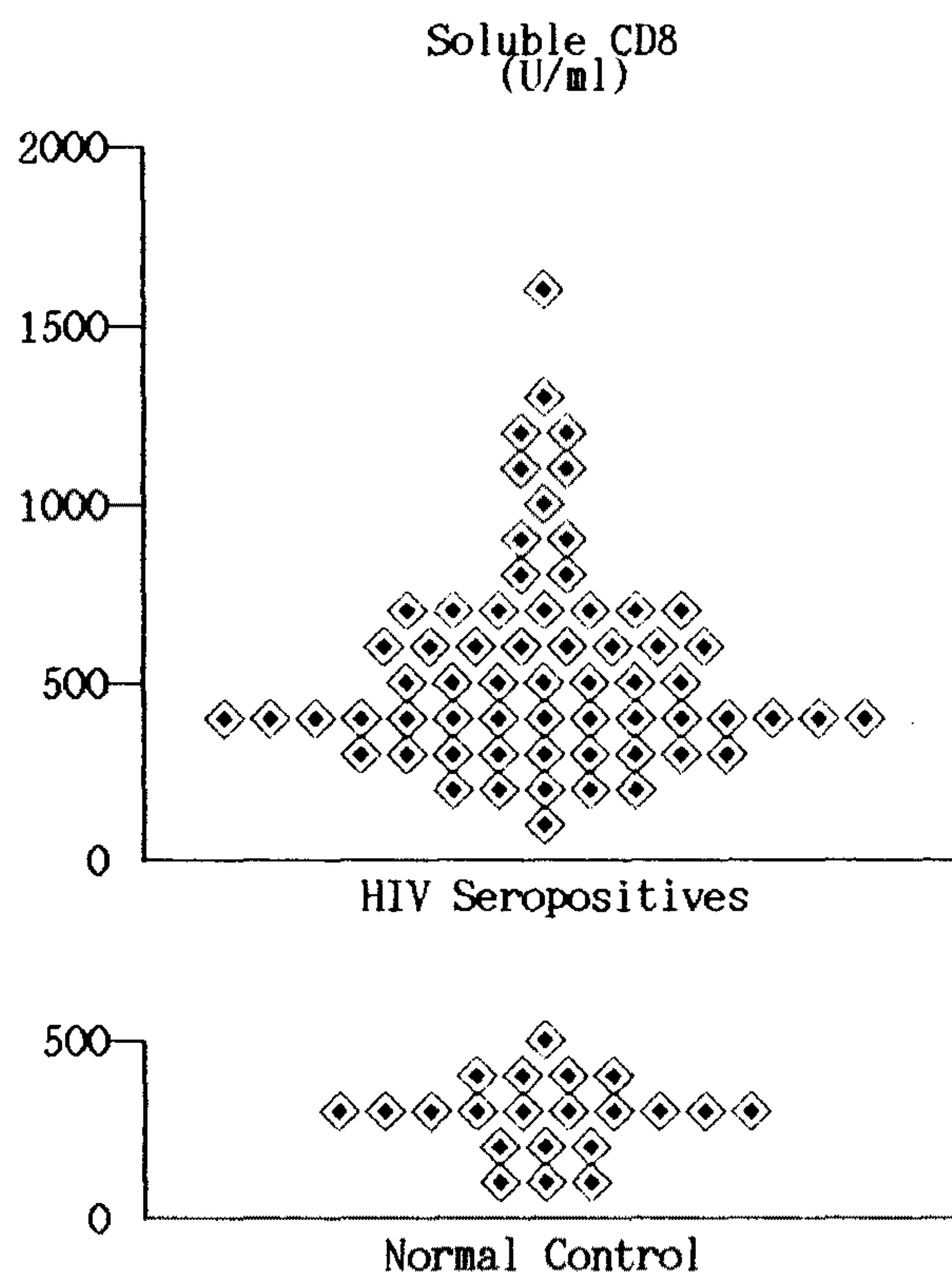


Fig. 2. Levels of Soluble CD8 (U/mL) in 21 normal control and 63 sera from 53 HIV infected persons.

## 제 4 절 고 찰

HIV 에 감염되면 림프구감소, CD4 림프구감소, CD8 림프구 증가, 결과로서 CD4/CD8 비의 감소, cutaneous anergy, 그리고 T와 B 림프구의 기능감소로 세포매개성 면역결핍을 초래한다. 더우기 혈청내 beta2-microglobulin, neopterin, soluble interleukin-2 receptor, Ig A, acid-labile human leukocyte interferon, soluble CD8 와 CD4 antigen 이 증가하는 것으로 알려져 있으며 이중에 CD4 cells 이 AIDS 로 진단되는 것을 알 수 있는 가장 우수한 예후 인자로 그 다음으로 beta2-microglobulin 가 알려져 있다 7-11).

CD4 cells 은 대부분의 면역기능의 유발에 직간접적으로 관여하는 중요한 세포로 대식세포 (macrophages) 의 활성화, cytotoxic T cells, suppressor cells, B cell 과 natural killer(NK) cells 기능의 induction, nonlymphoid cells 기능을 유도하는 인자 분비, hematopoietic colony stimulating factors 분비, lymphoid cells에 대한 성장 및 분화인자를 분비한다 12).

HIV 에 감염되면 이 CD4 cells 의 감소가 감염 후 매년 60-100/uL 씩 계속된다 13). 이러한 감소는 in vivo 에서 HIV 에 의한 직접적인 세포병변효과 (cytopathic effect) 에 의한 경우 12,14), uninfected CD4 cells 이 gp120 을 표현하는 감염된 CD4 cells 과 융합하여 소실되는 경우, 그리고 soluble gp120 을 CD4 cells 로 uptake 한 후 gp120-specific cytotoxic T cells 에 의한 cytotoxicity 에 의한 것으로 생각할 수 있다. 5,15,16)



본 실험에서 정상인에서 CD4 cells 은  $1140 \pm 605 (/mm^3)$ , CD4 antigen  $4.6 \pm 3.8(U/ml)$ , CD8 cells  $853 \pm 397 (/mm^3)$ , SCD8  $231 \pm 95(U/ml)$ 였으며 Reddy 등의  $860 \pm 40$ ,  $11.3 \pm 0.7$ ,  $463 \pm 29$  그리고  $307 \pm 18$ 에 비해 CD4 cells 은 본 연구에서 더 높았고, CD4 antigen 은 더 낮았으며, CD8 cells 도 본 연구에서 더 높았고 SCD8 은 더 낮았다<sup>11)</sup>.

HIV 감염자중 무증상 상태의 정맥주사 사용력이 있는 집단 (31 명)에서는 CD4 antigen 이  $67.5 \pm 37.9$ , AIDS-Related Complex(ARC) group (11 명)에서는  $21.1 \pm 2.4$ , P. carinii 폐렴균 (PCP; 60 명)에서는  $34.5 \pm 3.2$ 였으며 본 연구에서는  $35.5 \pm 58$ 로 Reddy 등의 정상인 그룹과, ARC의 성적 보다는 훨씬 높았으나 정맥주사 그룹보다는 낮았다.

본 연구에서 SCD8 은  $505 \pm 311$ 로 Reddy 등의 무증상정맥주사 그룹의  $1512 \pm 85$ , ARC의  $722 \pm 83$ , PCP에서의  $1092 \pm 68$ 보다 낮았으나 정상인 그룹 (50 명)의  $307 \pm 18$ 보다는 훨씬 높았다. Reddy 등에 의하면 CD4 cell 과 CD4 antigen 사이에는 역상관관계가 있는 것으로 보고하였으나 ( $r = -0.1$ ,  $p > 0.05$ ) 본 연구에서는 유의하지 못하였다 ( $r = -0.21$ ,  $p = 0.09$ ). CD4 antigen 과 SCD8 치 사이에는 유의한 역상관관계가 있었으나 본 연구에서는 역상관관계는 보였으나 유의하지 못하였고 ( $r = -0.05$ ,  $p > 0.05$ ), CD8 cells 과 SCD8 사이에 유의한 상관관계를 나타내어 ( $r = 0.43$ ,  $p < 0.001$ ) 감염자들에게서 CD8 cells 이 증가함에 따라 파괴되는 SCD8 이 증가함을 알 수 있으며, CD4 antigen 과 SCD8 사이에서 유의한 상관관계를 ( $r = 0.42$ ,  $p < 0.001$ )을 보였다.

Reddy 등의 연구에 비하면 HIV에 감염되지 않은 무증상 정맥주사 상용자들과 동성연애자들에서 정상인에 비해 유의하게 증가되어 있는데 이는 이들이 cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and hepatitis B와 같은 여러종류 virus의 감염으로 인한 것으로 생각하고 있으며 이들 virus에 만성적으로 재감염되면 CD8 cells와 soluble CD8도 증가할 수 있다고 한다<sup>17-18)</sup> 이 환자들 HIV에 대해 혈청학적으로 음성이지만 PCR에 의해 증명된 바에 의하면 이들이 viral DNA의 보균자(carrier)였다는 것이 최근 보고되었기 때문에 이들의 일부는 HIV에 감염되어 있을 수 있다고 한다<sup>20)</sup>.

본 연구에서 정상인에게는 CD4 cells과 CD4 antigen 사이에 순상관관계를 나타내었으나 감염자들에서는 역상관관계를 나타내어 감염자들에서 CD4 cells이 낮을수록 CD4 cells death, 혹은 alternatively spliced mRNA로부터 SCD8이 만들어지는 것과 유사하게 CD4 cell의 합성증가로 인해 혈중에 유리된 CD4 antigen이 증가하는 것으로 생각된다.

본 연구성적에 의하면 CD4 antigen과 SCD8는 HIV 감염자에서 지금까지 알려진 다른 어떤 혈청학적인 인자 못지 않게 유의한 serologic marker로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 제 5 절 결 론

CD4 antigen 과 soluble CD8 level이 AIDS 환자로 진행되는 과정에서 에 후판정의 marker 로 이용될 수 있는지 그리고 이들 농도와 CD4 cell 및 CD8 cell 수와 어떤 상관관계가 있는지를 알아보 고자 정상인 21 명과 HIV 감염자 53 명을 대상으로 전혈을 채취하여 CD4, CD8 세포수를 측정하였고, 혈청에 대해 Cell Free CD4(CD8) Test Kit(T Cell Sciences 사) 를 사용하여 다음과 같은 결론을 얻 었다.

CD4 antigen level 은 정상인 21 명에서  $4.6 \pm 3.8 U/ml$ , 무증상 HIV 감염자 혈청 63 건 ( 53 명 )에서는  $35.5 \pm 58 U/ml$ 로 HIV감염자 에서 유의하게 높았으며 ( $p < 0.0001$ ), 그림 1에서 이상하게 높은 수치를 보인  $150 U/ml$  이상의 3명을 제외하여도 평균치가  $24.8 \pm 4.0$ 로 통계학적으로 유의하게 감염자에서 높았다 ( $p < 0.0001$ ).

혈청내 soluble CD8(SCD8) level 은 정상인 21 명에서  $231 \pm 95 U/ml$ , 감염자 혈청 63 건에서  $505 \pm 311 U/ml$ 로 감염자에서 유의하 게 높았다 ( $p < 0.001$ ).

정상인에서는 CD4 세포수와 CD8 세포수 사이에만 유의한 상관관 계 ( $r = 0.92, p < 0.0001$ ) 를 보였으나, HIV 감염자에서는 CD8 세포수 와 SCD8 간에 ( $r = 0.59, p < 0.01$ ), 그리고 CD4 antigen 과 SCD8 level 간에는 ( $r = 0.42, p < 0.001$ ) 유의한 상관관계를 보였다.

말초혈액에서 CD4 세포수, 비율 (%) 그리고 CD4/CD8 비는 정 상인에서 각각  $1140 \pm 650 (/mm^3)$ ,  $35.9 \pm 10.7 (%)$ , 및  $1.34 \pm 0.31$



이었고, HIV 감염자들에서  $660 \pm 385$  ( /mm<sup>3</sup> ),  $20.1 \pm 9.7$  (%) 및  $0.54 \pm 0.47$  로 감염자에서 모두 유의하게 낮았다 ( p < 0.01).

평균 11.8 개월 간격으로 반복 측정된 9 명에서 CD4 antigen level 과 SCD8 은 모두 유의한 차이를 보이지 않았으나, CD4 세포 비율 (%)와 CD4/CD8 비는 적은 수를 대상으로 한 이 경우에서도 유의한 차이를 나타내었다 ( 표 2 ).

이상의 성적으로 보아 CD4 antigen 과 soluble CD8 은 HIV 감염자들에서 유의하게 높아 혈청학적 marker 로 이용될 수 있을 것으로 생각되나 아직 일정기간 간격으로 측정한 prospective study 문헌이 없으므로 앞으로 약 6 개월 간격으로 추적검사를 실시한다면 marker로서의 유용성에 대해 보다 좋은 성적을 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

## 제 6 절 참 고 문 헌

1. Klatzmann D, Barre-Sinoussi F, Dauguet C, Villmer E, Griscenli C, Brun Vezinet F, Rouzioux C, Gluckman JC, Chermann J-C, Montagnier L : Selective tropism of lymphadenopathy associated virus(LAV) for helper-inducer T lymphocytes. Science. 225 : 59-63, 1984.
2. Buchanan JG, Goldwater PN, Somerfield SD, Tobias-MI : Mononucleosis-like syndrome associated with acute AIDS retrovirus infection. NZ Med J 99 : 405-7, 1986.
3. Biggs B, Newton-John HF : Acute HTLV-III infection. A case followed from onset to seroconversion. Med J Aust 144 : 545-7, 1986.
4. Cooper DA, Tindall B, Wilson EJ, Imire AA, Penny R : Characterization of T lymphocyte responses during primary infection with human immunodeficiency virus. J. Infect. Dis. 157 : 889-896, 1988.
5. White JM, Littman DR : Viral receptors of the immunoglobulin superfamily. Cell 56 : 725-728, 1989.
6. Litmatman DR : The structure of the CD4 and CD 8 genes. Ann. Rev. Immunol. 5 : 561-84, 1987.
7. DeStefano E, Friedman RM, Friedman-Kien AE, Goedert JJ, Henriksen D, Preble OT, Sonnabent JA, Vilcek KJ : Acid-labile human leukocyte interferon in homosexual men with Kaposi's sarcoma and lymphadenopathy. J. Infect. Dis. 146 : 451-455, 1982.
8. Grieco MH, Reddy MM, Kothari, Lange M, Buimovici-Klein E, Wiliam D :

- Elevated beta<sub>2</sub>-microglobulin and lysozyme levels in patients with acquired immune deficiency syndrome. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 32 : 174–184, 1984.
9. Reddy MM, Grieco MH : Elevated soluble interleukin–2 receptor levels in serum human immunodeficiency virus infected populations. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 4 : 115–120, 1988.
  10. Reddy MM, Lange M, Grieco MH : Elevated soluble CD8 levels in sera of human immunodeficiency virus–infected populations. *J. Clin. Microbiol.* 27 : 257–260, 1989.
  11. Reddy MM, Vodian M, Grieco MH : Elevated Levels of CD4 antigen in sera of human immunodeficiency virus–infected populations. *J. Clin. Microbiol.* 28 : 1744–1746, 1990.
  12. Fauci AS : The human immunodeficiency virus : infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science.* 239 : 617–622, 1988.
  13. Moss AR : Prediction who will progress to AIDS. At least four laboratory predictors available. *Br. Med. J.* 297 : 1067–1068, 1988.
  14. Dalgleish AG, Beverly PCL, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA : The CD4(T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, 312 : 763–767, 1984.
  15. Siliciano RF, Lawton T, Knall C, Karr RW, Bermann P, Gregory T, Reinherz : Analysis of host–virus interactions in AIDS with anti–gp 120 T cell clones : effect of HIV sequence variation and a mechanism for CD<sup>+</sup> cell depletion. *Cell* 54 : 561–575, 1988.
  16. Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Campbell K, Haseltine WA : Role of the

HTLV – III / LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity.  
Nature(London) 322 : 470–474. 1986.

17. De Waele, Thielmans C, Camp BKG : Characterization of immunoregulatory T cells in EBV–induced infectious mononucleosis by monoclonal antibodies. N. Engl. J. Med. 304 : 460–462, 1981.
18. Drew WL, Mills J, Levy J, Dylewski J, Casavant C, Ammann AJ, Brodie H, Merigan T : Cytomegalovirus infection and abnormal T–lymphocyte subset ratios in homosexual men. Ann. Intern. Med. 103 : 61–63, 1985.
19. Fahey JL, Prince H, Weaver M, Groopman J, Visscher B, Schwartz K, Detels R : Quantative changes in T helper or T suppressor/cytotoxic lymphocyte subsets that distinguish acquired immunodeficiency syndrome from other immune subset disorders. Am. J. Med. 76 : 95–100, 1984.
20. Imagawa D, Lee MH, Wolinsky SM, Sano K, Morales F, Kwok S, Sninsky JJ, Nishanian PG, Giorgi J, Fahey JL, Dudley J, Visscher BR, datels R : Human immunodeficiency virus type 1 infection in homosexual men who remain seronegative for prolonged periods. N. Engl. J. Med. 320 : 1458–1462, 1989.



여 백

### 3. HIV 탐지를 위한 Western Blot, Radioimmunoprecipitation Assay의 개발

#### 제 1 절 서 론

후천성면역결핍증 (AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome)은 1981<sup>1)</sup>년 동성연애자들에게 기회감염과 Kaposi sarcoma 등의 증상을 동반한 증후군으로 처음 보고되었으며 초기 연구단계에서 사람 종양원성 바이러스 (human retrovirus)에 감염된 세포의 표면항원에 대한 항체가 AIDS 환자에서 증명되었다.

1983년 AIDS 환자에서 특이한 바이러스들이 발견되고 이들 바이러스들은 모두 동일한 바이러스로 밝혀지면서 AIDS의 원인체로 인정되어, 1987년 Human Immunodeficiency Virus (HIV)로 통일 명명되었다.<sup>2)</sup> 현재 HIV는 HIV-1과 HIV-2로 분류되며 HIV는 retrovirus이므로 감염시 복제된 바이러스 유전자가 혈청내에서 쉽게 측정할만한 정도의 항원을 생성하지 않는다. 그리고 AIDS 혹은 ARC (AIDS-related complex) 환자 거의 대부분이 HIV에 대한 항체를 가지고 있음이 알려져 있다.

현재 국립보건원 AIDS과에서는 이 항체의 유무를 판정하기 위하여 효소면역법 (ELISA), 면역형광항체법 (Immunofluorescence assay), 방사면역침강법 (Radioimmunoprecipitation assay), 웨스턴 블롯 (Western blot) 등의 방법들을 쓰고 있다. 특히 최후판정으로 쓰여지고 있는

Du Pont 사의 웨스턴 블롯의 band 의 선명함은 가히 괄목할만하다. 그러나 도덕적인 문제를 야기시킬 수 있는 위양성의 문제와 전파의 위험성이 있는 위음성의 문제가 있으므로 HIV 자체 특히 envelope protein 의 유전적인 변이 때문에 더욱 논란되고 있는 이러한 시점에 최후판정에 도달하기 까지는 몇번이나 재현성 있는 실험을 거치지 않으면 안된다. 또한 최근 정치, 경제, 문화적인 국제교류가 활발한 대한민국에서는 HIV 에 감염된 항체양성 보유자가 날로 증가하는 추세에 있으며 그에따른 진단시약 비용도 엄청난 금액에 달한다.

전국 실험실에서 1차 screening 에 의해 양성으로 판명되어 국립보건원에 의뢰된 HIV 항체확인 건수만해도 연간 7,200건으로 거기에 따른 ELISA 진단시약 비용이 2,175,000 원, 웨스턴 블롯 진단시약 비용이 8,700,000 원에 달하고 있다.

그러므로 한국내 유행 virus 주의 성상 파악과 감염자의 질병진전 상태의 파악을 위한 한국형의 virus 분리와 아울러 경비절감을 위한 국내 AIDS 진단제 개발이 필수적이다. 본 연구에서는 이를 위하여 웨스턴 블롯, 방사면역침강법의 개발을 시도하였으므로 이에 보고하고자 한다.

## 제 2 절 시험재료 및 방법

### 1. HIV 의 항원정제

H9/HTLV-Ⅲ 세포주는 HTLV-Ⅲ를 계속 생성하는 세포로서 1987년 ATCC(American Type Culture Collection)로 부터 분양받아 본 실험실에서 RPMI-1640(GIBCO) 배지를 사용하여 계속 계대배양한 것이다. HTLV-Ⅲ 세포주를 10% FBS가 함유된 RPMI-1640 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 후 56°C에서 30분간 불활성화시켰다. -70°C에서 동결, 37°C에서의 용해과정의 3회 반복 후 4°C에서 10,000Xg로 20분간 원심분리하여 얻은 상층액을 다시 50,000Xg에서 4시간 원심분리하였다. 이 바이러스 침전물을 20% sucrose에 50,000Xg에서 4시간, 최소량의 0.2M KPO<sub>4</sub>(pH 7.4) buffer에 녹인 후, 원심분리하였다. 이 침전물을 소량의 PBS에 녹인 후 viurs particle로서 -20°C에 보관하였다.

## 2. 혈청 준비

효소면역측정법 (Enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA) 으로 HIV에 대한 항체가 양성이고, 웨스턴 블롯상에서 HIV p24에 대한 항체반응만 있는 혈청과 HIV의 모든 항원에 대해 항체반응이 있는 각 1인씩의 헤파린으로 처리된 혈장을 56°C 수조에서 1시간 비동화시킨 후 사용하였다.

## 3. IgG 정제

위에서 준비된 혈장을 수정된 Gravey et al<sup>3)</sup>의 방법에 따라 염석하였다. 즉 혈장을 2배 부피량의 phosphate buffered saline



(pH 7.4)으로 희석시키고 ammonium sulfate를 4 °C 에서 서서히 첨가하여 최종농도가 50 % 되게 하였다. 4 °C에서 30 분간 교반한 후 4 °C의 Hitachi RPR 20-2 rotor 55,000 rpm에서 20 분간 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 이 침전물을 최소량의 PBS(pH 7.4)에 녹인 후 100 배 이상의 PBS 로 3 번 갈아주면서 투석하였다. 이 샘플을 염 농도구배 이온교환크로마토그래피 (DEAE-Sephacel chromatography, 13 ml vol.)를 하였다. 즉 0.015M NaCl 50 mM Tris(pH 7.4)로 평형이 잘 맞추어진 column에 샘플을 넣은후 0.015M부터 0.3 M NaCl 까지 농도구배를 주면서 용출시켜 3.3ml 씩 분획을 회수하였다. 첫 peak를 나타내는 분획들만 모은 후에 ammonium sulfate 최종농도가 50 % 되도록 하여 그 침전물을 최소량의 PBS 로 녹인 후 PBS 로 투석하였다. 이 용액을 280nm 에서의 흡광도를 측정하여 단백질 양을 정한 후 -20 °C 에 보관하였다. 나머지 샘플의 일부분 (IgG)은 Protein A와 Protein G에 binding buffer(0.15M NaCl / 0.05M Tris-HCl, pH 7.2/1 % DOC/0.1 % SDS/1 % Triton X-100/5 mM EDTA)로 binding 시킨 후 washing buffer(0.4 % Triton X-100 /0.1 M NaCl / 0.02 % SDS/5 mM EDTA/50 mM Tris-HCl, pH 7.4)로 washing, 0.1 M glycine (pH 2.8)으로 용출하여 즉시 중화시켰다.

#### 4. SDS 전기영동

Lammli<sup>4)</sup>의 SDS-PAGE 를 이용하였다. 웨스턴 블롯을 위해서는 10 %의 running gel 과 3.8 % stacking gel 을, 정제된 항체의

purity 를 보기 위해서는 12.5%의 running gel 과 5%의 stacking gel 을 사용하였다. 0.01% SDS/192mM Glycin/Tris-HCl을 전기영동 buffer로 하여 10°C, 30mA에서 2 - 3시간 전기영동하였다.

## 5. 웨스턴 블롯

Towbin<sup>5)</sup>의 방법을 이용하였다. 간략히 서술하자면 SDS-PAGE의 gel을 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 이 때의 블롯 buffer로서는 192mM Glycine/20% Methanol/25mM Tris-HCl를 사용하였으며 4°C에서 40V로 overnight transfer하였다. Blotting 후 nitrocellulose membrane을 0.5% NP-40/PBS로 1시간 incubation, 5% skim milk 용액으로 1시간의 blocking 후 같은 blocking buffer로 100배 희석된 항체혈청과 overnight 반응시켰다. 0.05% Tween 20/PBS로 3회의 세척과 1000배 희석된 Biotin conjugated goat anti-human IgG와의 2시간 반응 후 avidin conjugated horseradish peroxidase(HRP)로 반응시켰다. 그 후 4-chloro-1-naphthol로 발색하였으며 증류수로 그 반응을 정지시켰다. 모든 반응은 실온에서 shaking incubation 하였다.

## 6. 항원검색 효소면역 측정법

부착항체의 적정농도를 결정하기 위해 정제된 IgG 항체를 25ng,

50ng, 100ng/100ul 되게 10mM carbonate buffer(pH.9.6)로 희석하여 Costar 의 96 microtiterwell patae 에 coating 시킨 후 실온에서 2 시간, 4°C에서 overnight incubation 하였다. Washing 은 0.05% Tween 20 /PBS 로 Blocking 은 0.5% BSA/PBS 로 1000 배 희석된 HRP conjugated affinity purified goat anti-human IgG 로 37°C 에서 1 시간 incubation 시킨 후 0.03%의 과산화수소 / 0.04% (W/V)의 0-phenylenediamine / phosphate citrate buffer(pH 5.0)에서 발색시켰다.

## 7. 항체 검색 효소면역 측정법

부착 항원의 적정농도를 결정하기 위해 정제된 항원 단백질을 8ng, 16ng, 24ng, 32ng/100ul of 10mM carbonate buffer (pH 9.6)로 96well microtiter plate에 coating 시킨 후 항체로서는, 1000 배 희석한 Protein A purified anti-human HIV 항체를 사용하였다. 나머지는 항원 검색효소면역 측정법과 동일한 방법으로 수행하였다.

## 8. 방사면역침강법 (Radioimmuoprecipitation assay)

25ml 의 10% FBS 를 함유한 RPMI-1640 배지에서 배양된 log phase 의 H9, H9/HTLV-III 세포를 cysteine free의 RPMI-1640 에 1회 washing 한 후 각 5ml씩의 10 uCi/ml [<sup>35</sup>S] cysteine (specific activity 1050 uCi/mmol : NEN) 을 함유한 cysteine free의 RPMI-

1640 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 modified 된 Essex et al<sup>6)</sup>에 의하여 expose 시켰다.

Cell lysate는 RIPA buffer(0.15 M NaCl / 1% sodium deoxy-chlorate/0.1% SDS/1% Triton X-100/0.05 M Tris-HCl, pH 7.2)에 현탁하여 freezing and thawing을 3회 반복한 후 4°C 100,000xg에서 1시간 원심분리한 상층액으로 하여 얻어졌다. 200ul의 cell lysate에 40ul의 25% SDS와 3.2ul의 2-mercaptoethanol을 넣어 4분간 boiling하였다. 여기에 260ul의 D.D.W와 2ml의 buffer(2.5% Triton x-100/190mM NaCl/5mM EDTA/1.25% DOC/50mM Tris-HCl, pH7.4)를 넣어 10<sup>7</sup>cpm이 되도록 분주한 후 각각 HIV에 대한 20ul씩의 nonimmune serum 및 immune serum과 실온에서 overnight 반응시켰다. 이 각각의 반응액에 팽윤된 Protein G-Sepharose (PBS 1:1) 20ul씩을 분주하여 실온에서 4시간 rotary shaking한 후 eluting buffer(1.06% SDS/0.4% 2-ME/0.022 M Tris)로 elution하여 SDS-PAGE에 걸었다.

이 Gel을 fixation solution(10% TCA/30% MEOH/10% Acetic acid)에서 1시간 고정시킨 후 EN<sup>3</sup>HANCE(Du Pont)에 1시간 처리한 후 -40°C에서 AGFA film에 expose 시켰다.

### 제 3 절 실험 결과

#### 1. HIV에 대한 항혈청 준비



HIV 에 대한 항혈청은 HIV 에 감염된 양성자의 혈청을 사용하였다. 50 % ammonium sulfate 로 염석한 HIV 항혈청을 DEAE-Sephacel(Pharmacia), Protein A-Sepharose CL-4B(Pharmacia), Protein G-Sepharose 4FF(Sigma) 의 chromatography 에 걸쳐 그 yield 를 비교하였다 (Table 1).

TABLE 1  
Purification of antibody from HIV infected human plasma

Fraction	Conc. (mg/ml)	Total protein (mg)	Yield (%)
Ammonium sulfate (0-50 %)	23.0	6.9	100.0
DEAE-Sephacel	9.7	5.7	82.5
Protein A-Sepharose	3.0	0.9	13.0
Protein G-Sepharose	5.0	1.5	21.7

DEAE-Sephacel (2×3cm, 13ml) 에 6.9mg 의 HIV 항혈청을 0.05M NaCl/50mM Tris-HCl (pH7.4) 에서 binding 시켜 0.015M NaCl 에서 0.3 M NaCl 까지 농도구배 용출하였다 (Fig.1). 유속은 1 시간에 9ml 이며 3.3ml 의 fraction number 7 번에서 17 번까지 모았다. 이 sample 을 50 % ammonium sulfate 로 염석시키고 PBS 로 투석시킨 후의 최종농도는 9.7mg/ml 로서 그 yield 는 82.5 % 였다. Protein G-Sepharose 가 Protein A-Sepharose CL-4B 보다 1.67 배 정도 그 yield 가 높았으며 이 각 fraction 에서 정제된 purity 를 검사하기 위하여 각기 2ul, 5ul 씩을 SDS 전기영동하였다 (Fig.2). 이

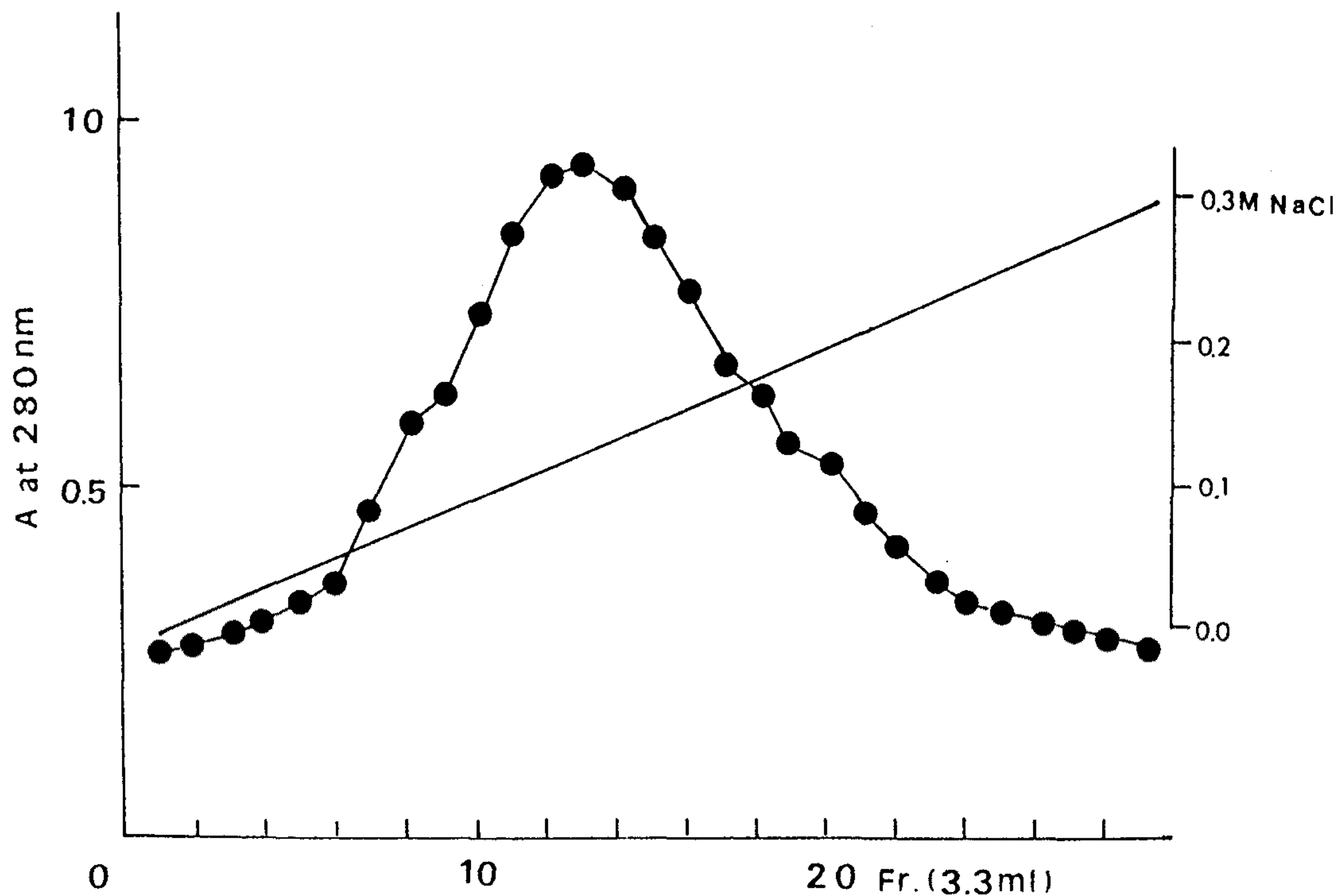


Fig. 1. DEAE-Sephacel column chromatography of anti-human HIV antibody. The ammonium sulfate fraction was loaded on a DEAE-Sephacel column (2×3cm) which had been equilibrated with 0.015 M NaCl/50 mM Tris-HCl(pH7.4). The column was washed with 50 ml of 0.015 M NaCl/50 mM Tris-HCl(pH 7.4) and then the antibody was eluted with 100ml of a linear gradient of 0.015-0.3 M NaCl/50mM Tris-HCl (pH 7.4) at a flow rate of 9 ml/h. Fractions of 3.3 ml were collected, absorbance at 280 nm.

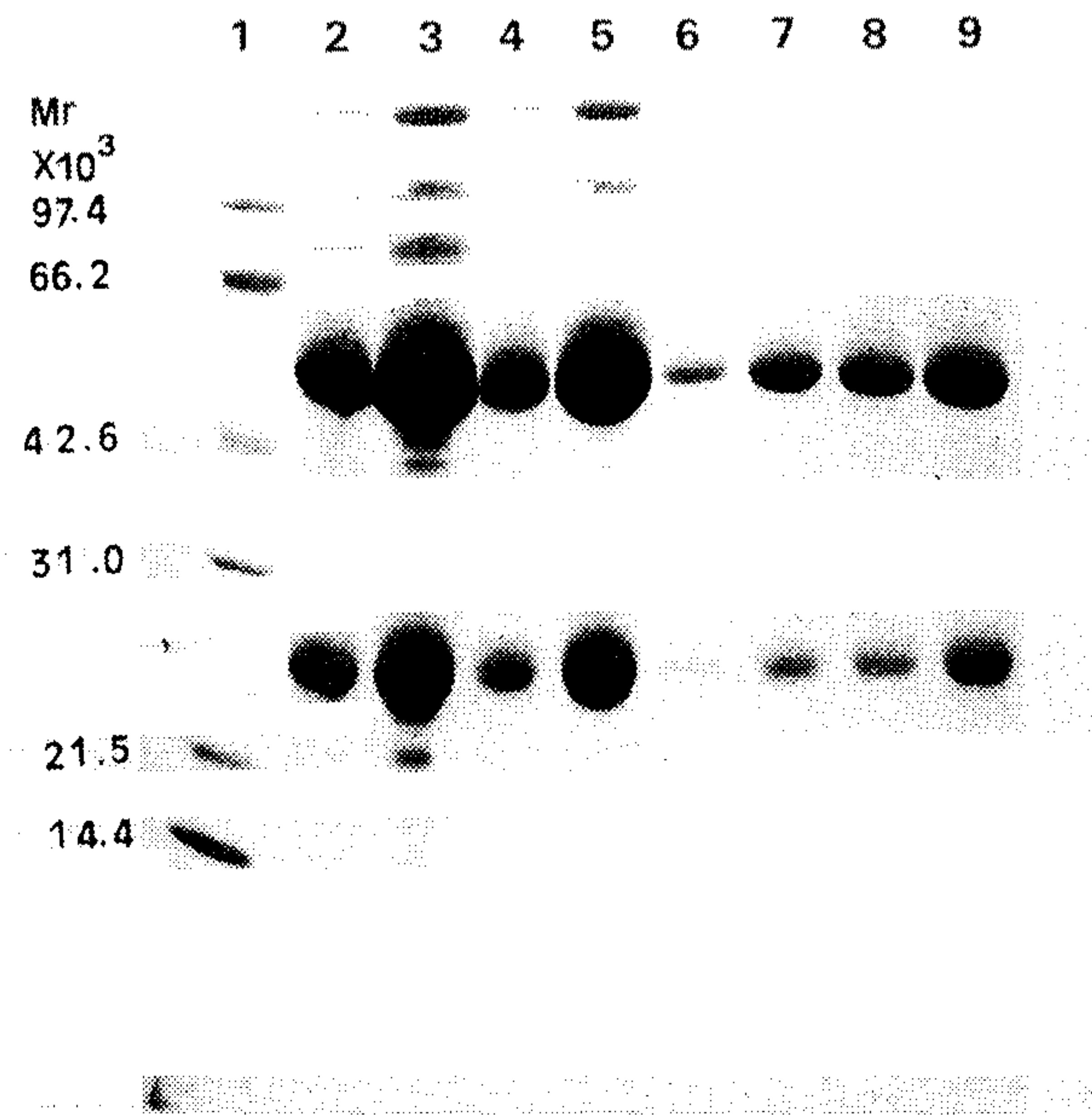


Fig. 2. SDS—polyacrylamide gel electrophoresis of anti—human HIV antibody. The purified anti—human HIV antibody was electrophoresed on slab gel containing 12.5% polyacrylamide. Protein was located by staining with Coonassie blue. Lane 1, standard molecular weight proteins; lanes 2 and 3, 2 ul and 5 ul and 5 ul of ammonium sulfate purified antibody(23 mg/ml);lanes 4 and 5, 2 ul and 5 ul of DEAE—Sephacel purified antibody (9 mg/ml); lanes 6 and 7, 2 ul and 5 ul of Protein A—Sepharose CL—4B purified antibody (3 mg/ml); lanes 8 and 9, 2 ul and 5 ul of Protein G—Sepharose 4FF purified antibody(5 mg/ml).



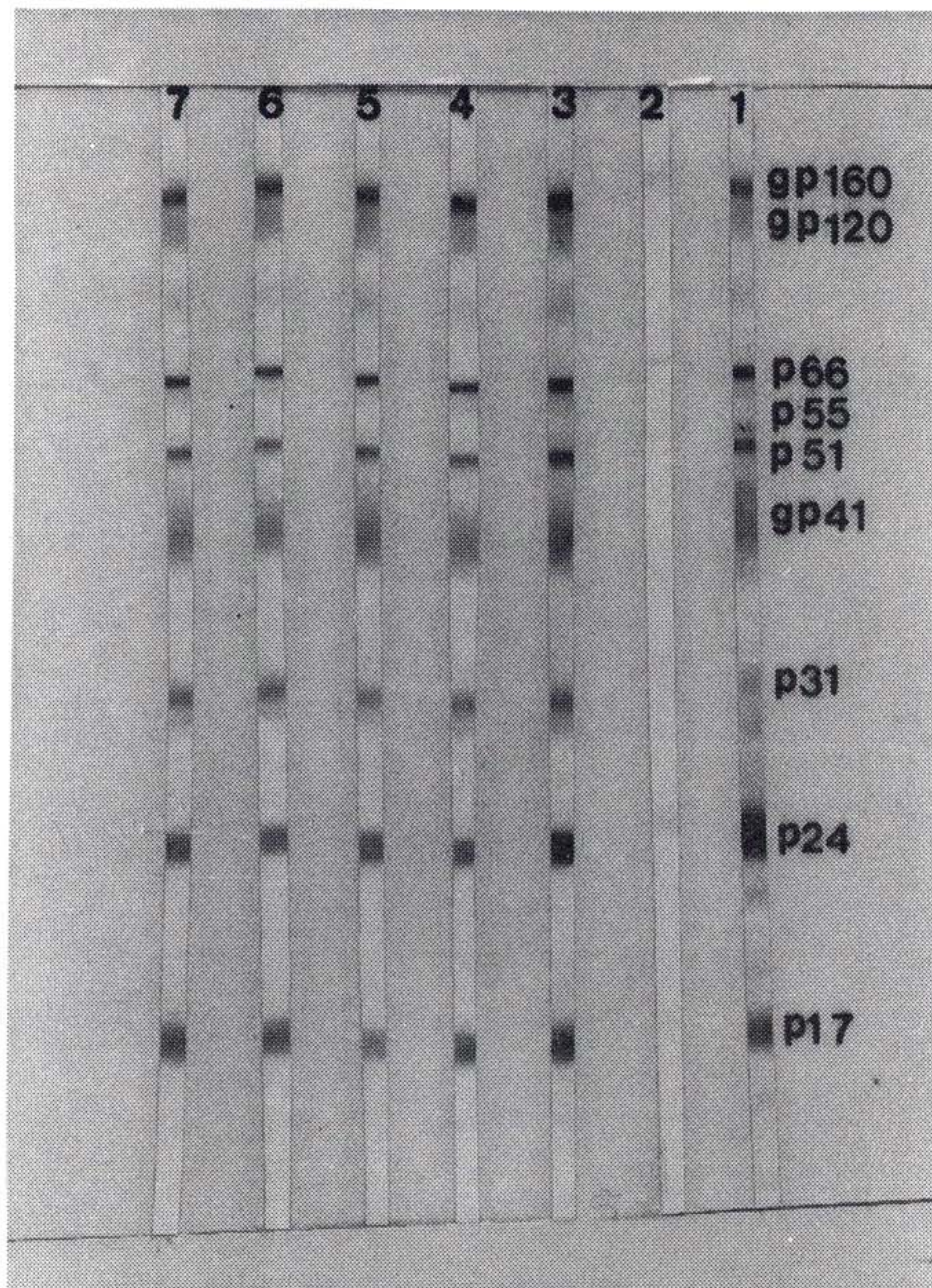


Fig. 3. Western blot reactivity of purified anti-human HIV antibody tested with HIV antigen from Du Pont.

Lane 1, HIV—strong positive control serum ; lane 2, HIV—weak positive control serum ; lane 3, ammonium sulfate purified anti-human HIV antibody; lane 4, two fold diluted antibody of lane 3; lane 5, DEAE—purified anti-human HIV antibody; lane 6, Protein A—purified anti-human HIV antibody; lane 7, Protein G—purified anti-human HIV antibody.



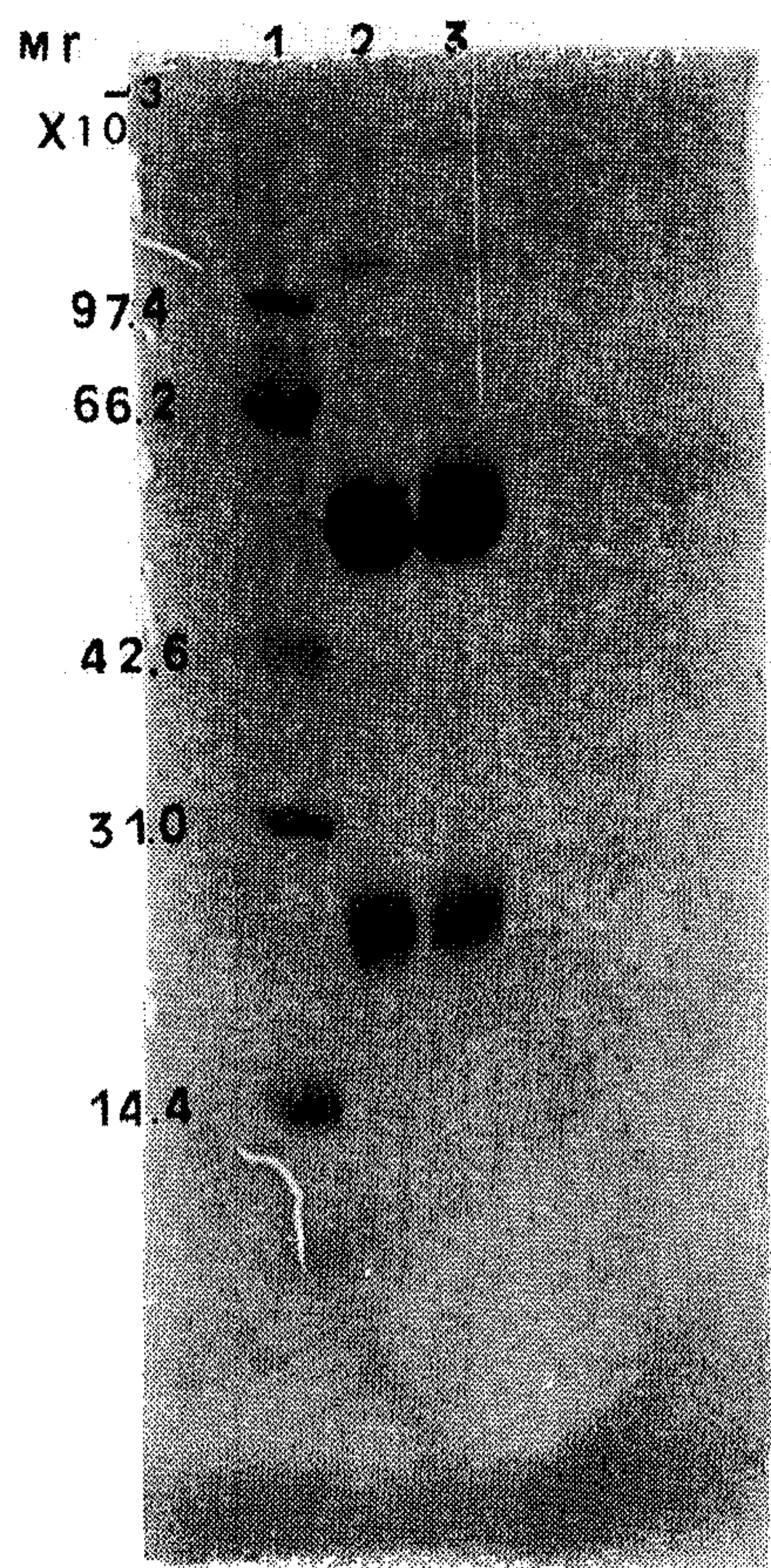


Fig. 4. SDS – polyacrylamide gel electrophoresis of anti – human p24 antibody.  
Lane 1, standard molecular weight proteins; lane 2, 25 ug of Protein G – purified anti – human HIV antibody as control; lane 3, 25 ug of Protein G – purified anti – human p24 antibody.

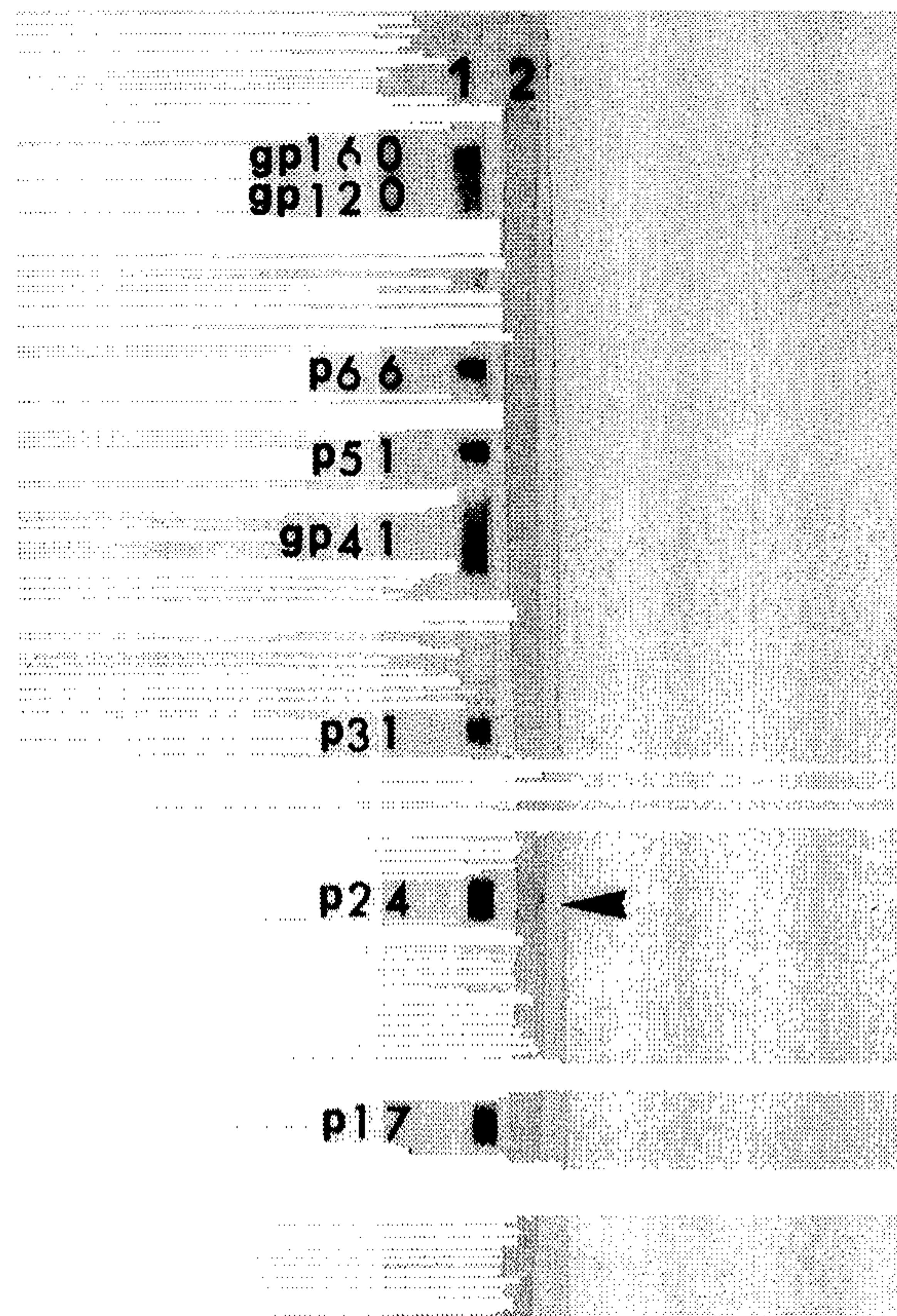


Fig. 5. The efficiency of horseradish peroxidase conjugation to anti-human HIV or p24 antibody tested HIV antigen from Du Pont.

Protein G-purified anti-human HIV and p24 antibodies were conjugated with horseradish peroxidase. Then to test the efficiency of conjugation, these purified antibodies were reacted with HIV antigen on nitrocellulose membrane sheet from Du Pont.

The complex was detected by incubation with 4-chloro-1-naphtol.

Lane 1, Protein G-purified anti-human HIV antibody; lane 2, Protein G-purified anti-human p24 antibody.

결과 54-Kda 정도의 항체의 large chain 과 23-Kda 정도의 small chain 의 두 종류의 band 가 보였으며 Protein-G-Sepharose 나 Protein A-Sepharose CL-4B 의 purity 의 차이는 없었다. 단지 전자가 후자보다 2 배 정도 yield 가 높은 것으로 보인다.

다음 이 각 fraction 에서 정제된 항체의 activity 를 보기 위해서 웨스턴 블롯을 하였다 (Fig. 3) 웨스턴 블롯은 Du Pont 사의 Kit 를 사용하였으며 그 지침서에 준하여 수행하였다. 그 결과 strong positive control (lane 1) 보다 본 연구실에서 정제한 항체가 더욱 nonsepecific binding 이 적었다 (lanes 3-7).

HIV p24 에 대한 항체를 정제하기 위하여 웨스턴 블롯상에서 p24 항원에 대한 인식만을 하는 감염자의 혈액을 사용하여 같은 방법으로 정제하였다.

Protein G-Sepharose 4FF 에서 12.28mg/ml 의 항체를 정제할 수 있었다. 이것은 20.0 % 에 yield 에 해당하는 것이다 (Data not shown) Fig.4 는 그 정제된 purity 를 검사하기 위한 것으로 SDS 전기영동한 결과이다.

Protein G-Sepharose 로 정제된 HIV 항체를 (lane 2) control 로 하였으며 lane 3 은 Protein G-Sepharose 로 정제된 p24 의 항체이다.

Fig.5 는 Protein G-Sepharose 로 정제된 HIV p24 에 대한 항체에 HRP 를 conjugation 시켜 Du Pont 사의 웨스턴 블롯 Kit 의 membrane sheet 에 반응시킨 후 4-chloro-1-naphthol 로 발색시킨 결과이다. HRP-conjugation 은 4ml 의 0.1M phosphate buffer (pH6.8)



각 항체 4mg 씩을, 0.1 M carbonate buffer(pH 9.2), 2ml 에 HRP  
를 20mg 녹인 용액과 2ml 의 물에 3.42mg 의 NaIO<sub>4</sub> 를 녹여서  
실온에서 2 시간 incubation 시킨 혼합용액 2ml 와 1g 의 Sepha-  
dex G-25 를 혼합시켜 냉암소에서 3 시간 incubation 하였다.

이 혼합반응액을 NaBH<sub>4</sub> 로 그 반응을 정지시킨 후 ammonium  
sulfate 로 염석하여 그 침전물을 TEN buffer 로 투석하였다.

각 band 에 대한 강도의 차이는 그다지 없는 것으로 보이나  
(lane 1) p.24 에 항체에 대한 HRP-conjugation 은 약한 band 를  
나타냈다 (lane 2).

## 2. 항체, 항원검색 효소면역법

여러 종류의 HIV 항체를 이용하여 녹십자 HIVIRO 의 항원  
coated plate 를 검사하였다 (Table 2). 검사방법은 지침서에 준하였  
다. Total cell lysate 에 대한 반응은 강하였으나 gp41, gp120,  
reverse transcripase 의 항체와의 반응은 거의 없었다.

TABLE 2  
Binding of antibodies to HIV antigen coated wells from HIVIRO

Reacted antibody	Absorbance at 492 nm
negative human serum	0.24
negative control serum	0.25
positive control serum	2.40
MoAb gp41	0.14
MoAb gp120	0.20
MoAb revers transcriptase	0.13
Protein G purified IgG	2.39

항원, 항체 검색 효소 면역법을 위한 plate 를 만들기 위해 정제된 항체 또는 항원을 Costar 의 microtiter plate 에 coating 하였다. 항체검색법을 위해서는, nonimmune serum 과 positive serum 의 차이가 거의 없었다 (Date not shown). 항원 검색법을 수행하기 위해서 Protein G-Sepharose 로 정제된 항체를 0, 50, 100ng/100 ul 로 plate 에 coating 하여 washing, blocking 을 거쳐서 HRP-conjugated mouse anti-human IgG 로 37°C 에서 1 시간 반응시킨 후 O-phenylenediamine 으로 발색시켰다. 100ng 까지 lineality 를 보여주고 있다 (Fig.6). Lineality 가 있는 범위내의 8, 16, 24, 32ng 의 위의 실험에서 사용한 항체를 coating 시킨 후 negative 와 positive serum 으로 overnight 반응하였다. 여기에 rabbit anti-human HIV와 HRP conjugated goat anti-rabbit IgG 와의 반응 후 O-phenylenediamin 으로 발색한 것이 Table 3 이다.

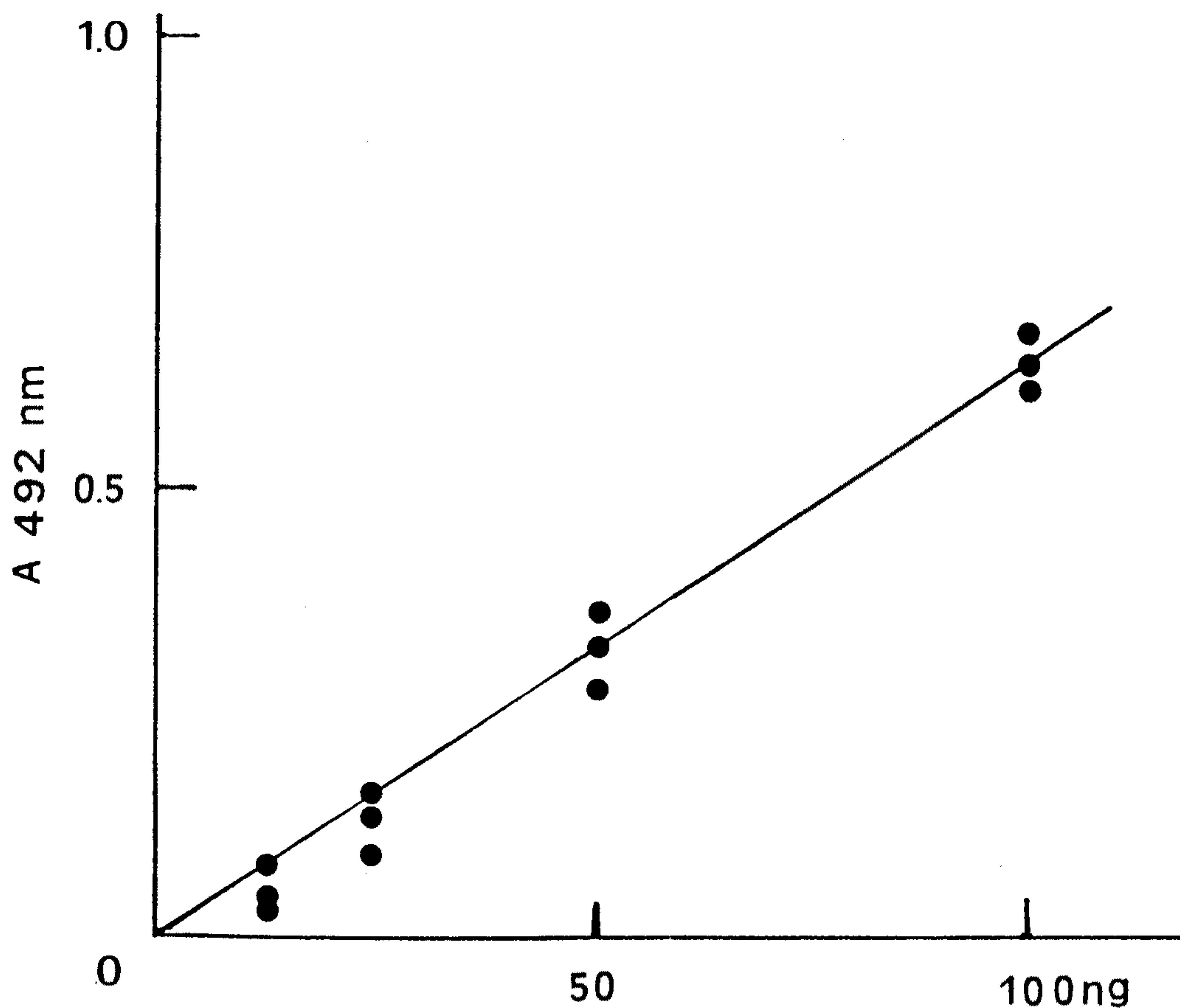


Fig. 6. Binding efficiency of purified anti-human HIV antibody on microtiter wells.

Microtiter wells were coated with the amounts of Protein G-purified anti-human HIV antibody indicated and then incubated with 100ul of horesradish peroxidase conjugated mouse anti-human IgG for 1h at 37 °C. The amounts of coated antibody were determined by ELISA as described under "Materials and Methods."



TABLE 3  
Antigen detection with Protein G purified antibody  
coated on microplate wells.

Coated antibody	OD 492 nm	
	nonimmune	immune
8 ng	0.46	> 2.5
16 ng	0.46	> 2.5
24 ng	0.78	1.3
32 ng	0.69	> 2.5

### 3. HIV 항원 준비

Log phase 에 있는 H9/HTLV-III 배양액 200ml로부터 최종 1 ml의 cell lysate를 정제하였다. 이 정제된 cell lysate의 purity를 검사하기 위하여 SDS 전기영동을 수행하였다 (Fig.7).

Lane 5는 20% sucrose 정제된 final cell lysate이다. 전체 protein band들의 proportion을 볼 때 lane 3,4 보다는 정제되어 있으나 순수한 virus particle만은 아닌 것을 알 수 있다. 이 20% sucrose로 정제된 cell lysate의 항원성을 알기 위하여 Du pont사의 antigen detection ELISA system을 사용하였다. 정제된 HIV 항원 단백질량은 2.355 ug(ug/ml)이었다 (Fig.8).

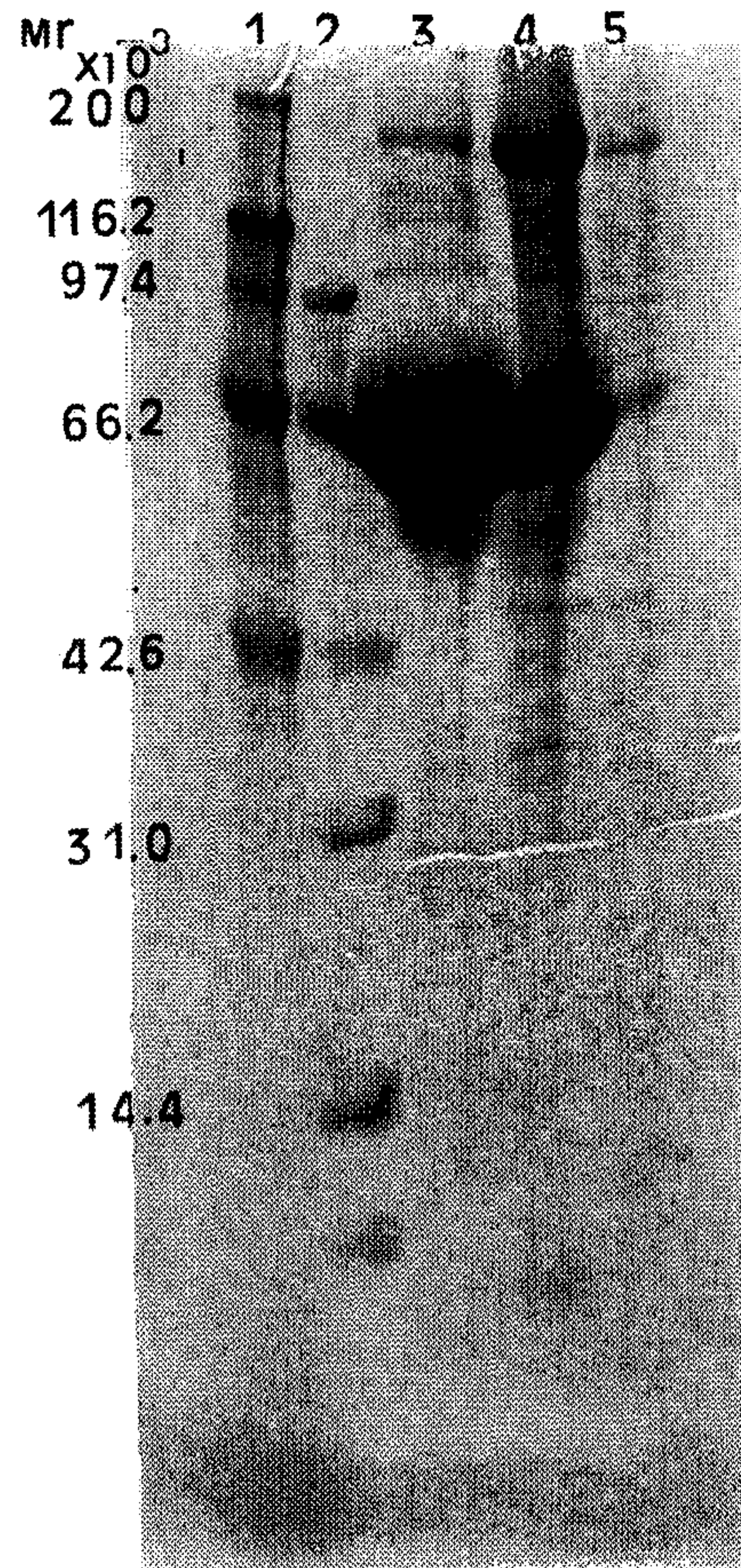


Fig. 7. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of HIV antigen purified from H9/HTLV - III cell lysate.

H9/HTLV - III cells were grown at 37°C on RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum. The infected cells in log phase were frozen and thawed, then ultracentrifuged and pelleted on 20% sucrose/0.2M potassium phosphate buffer (pH 7.4). HIV antigen protein of each purification step was electrophoresed on 10% polyacrylamide slab gel. Lane 1, standard high molecular weight proteins; lane 2, standard low molecular weight proteins; lane 3, frozen and thawed culture medium; lane 4, ultracentrifuged virus pellet; lane 5, virus pellet throughed on 20% sucrose.

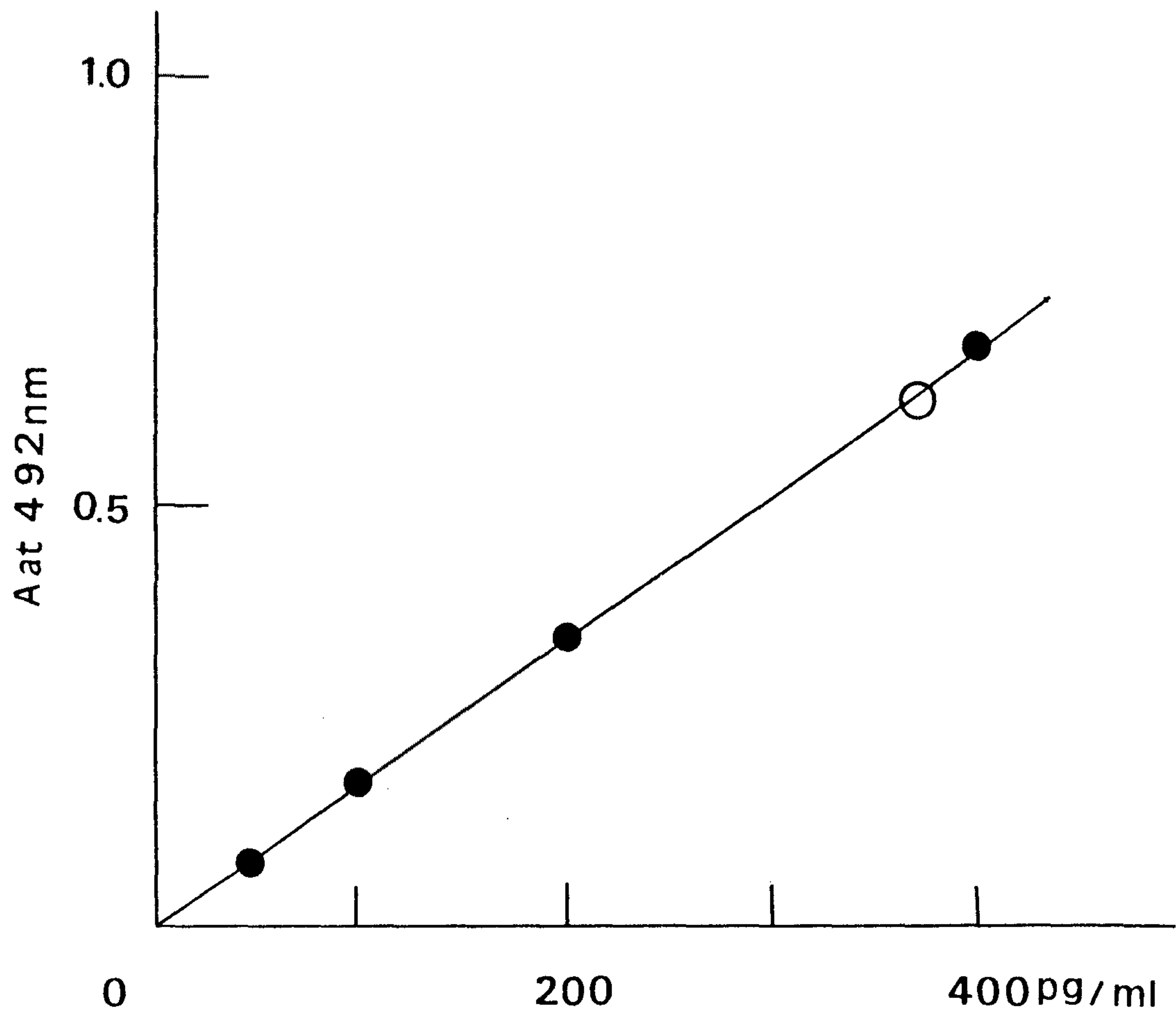


Fig. 8. Antigenicity of 20% sucrose pelleted H9/HTLV-III cell lysate tested with HIV antibody from Du Pont.

Diluted positive control was added onto the HIV antibody coated wells.

●, Spots of standard control on line as lineality

○, 6,400 fold diluted H9/HTLV-III cell lysate

#### 4. 웨스턴 블롯

SDS 전기영동에서 HIV 단백질 band의 정확한 위치를 알기 위하여 control로서 peptide p24, 5ug을 사용하였다. p24 band의 위치는 분자량 marker protein 으로서는 거의 31-Kda 위치를 차지하고 있다 (Fig.9, lane 4).

Protein G-Sepharose purified p24 항체의 actitivity를 알기 위하여 cell lysate 50 ng을 SDS 전기영동한 후 nitrocellulose membrane에 transfer하였다 (Fig.10, lanes 7 and 8). Lane 9는 p24 peptide 10 ng을 transfer한 것이다. 이 때의 control로서는 Du Pont사의 웨스턴 블롯 kit의 membrane을 사용하였으며 (Fig.10, lanes 4, 5 and 6), lane 5의 band들은 전기영동상의 bands와는 일치하지 않는다. Lane 6의 Kit의 antigen에 비해 lanes 8 과 9의 정제된 H9/HTLV-III의 antigen의 band가 훨씬 broad한 band였다. Fig.11은 20% sucrose purified virus pellet를 TEN buffer에 현탁시킨 후 50ng을 1% SDS로 boiling하여 각 solt에 loading한 후 웨스턴 블롯한 결과이다.

Protein G-Sepharose purified human antibody와의 반응에서는 gp160, gp120, p66, p51, gp41과 broad한 p24 band가 보이나 (lane 3) HIV 양성혈청과의 반응에서는 lane 3과 거의 동일하나 p24의 거의 약한 band들이 나타났다. Fig.12는 cell lysate를 1% NP-40에 처리한 상층액을 0.01% SDS로 boiling하여 50ng씩을 loading한 후 웨스턴 블롯한 결과이다. HIV negative,



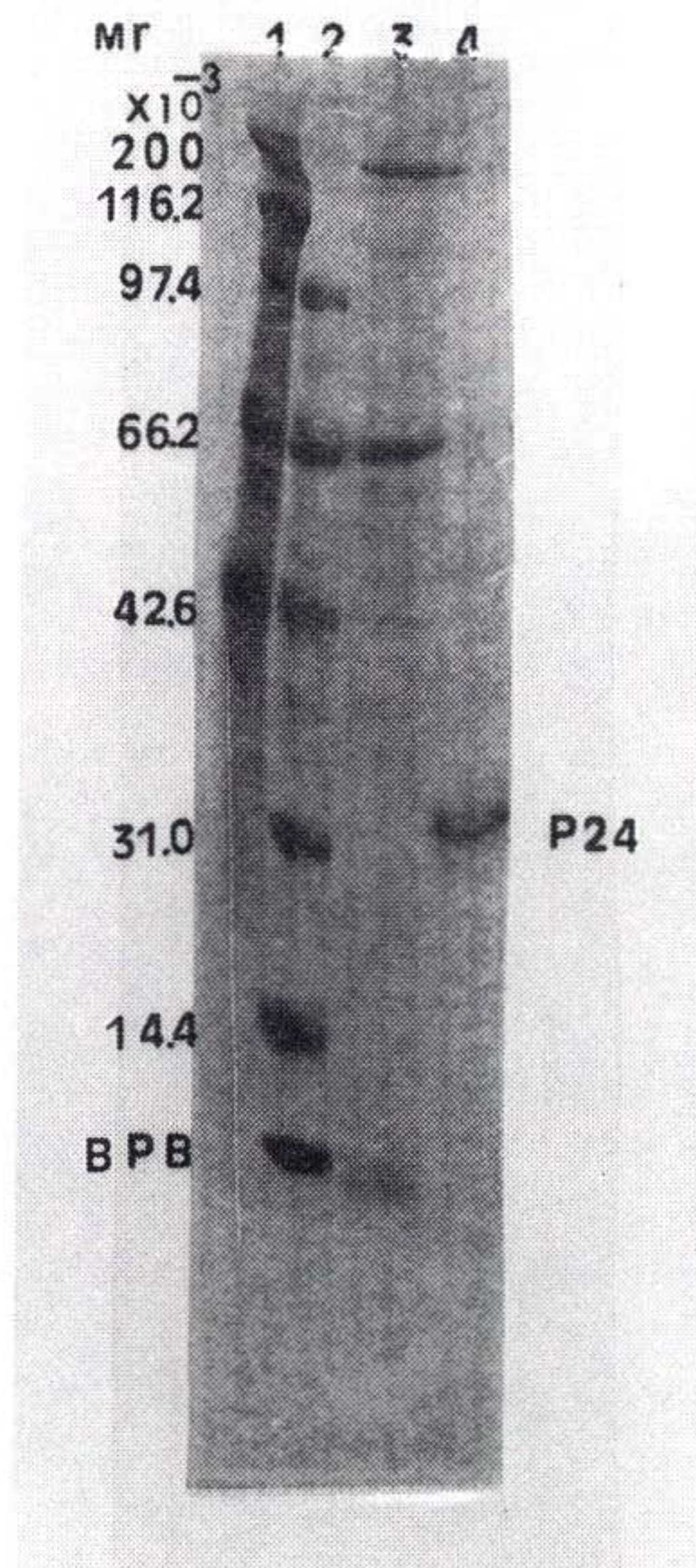


Fig. 9. Position of peptide p24 protein on 10% SDS—polyacrylamide gel electrophoresis. Lane 1, standard high molecular weight proteins; lane 2, standard low molecular weight proteins; lane 3, peptide p24 protein.



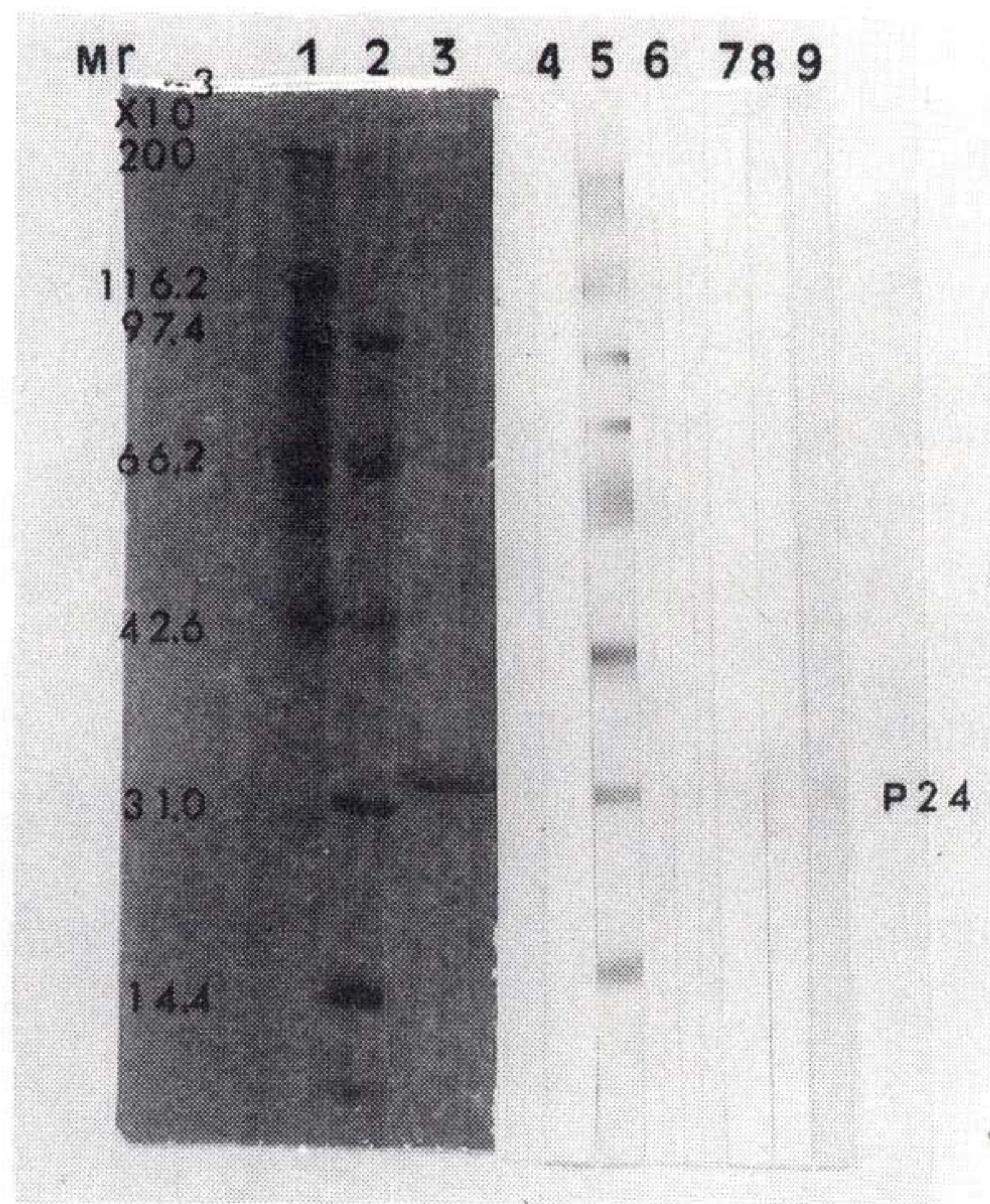


Fig. 10. Reactivity of Protein G purified anti-human HIV p24 antibody by Western blotting.

Lanes 7 and 8 were transferred with 50 ng of H9/HTLV-III cell lysate and reacted with nonimmune serum and Protein G purified anti-human HIV p24 antibody, respectively; lane 9 was transferred with 10 ng of peptide p24 antigen and reacted with purified p24 antibody.

Lanes 4, 5, and 6 were antigen from Du Pont as control and reacted with negative control serum, positive control serum and Protein G purified HIV p24 antibody, respectively.



positive antiserum 은 모두 100 배 희석시킨 것들을 사용하였다. Fig.11 에서 보여졌던 gp160, gp120 의 band 가 보이지 않았으며 대신 p55 의 band 가 나타났다 (lanes 4-10). 또한 항원이 transfer 된 membrane 과 반응시킨 후의 HIV negative human serum 과의 반응에서는 비특이적인 band 가 나타나지 않으나 (lane 3), Du Pont 사의 웨스턴 블롯 Kit 의 negative control serum (lane 1) 과 HIV negative human serum 과의 반응에서는 (lane 2) gp41 에 대한 약한 비특이적인 band 가 보였다. 또한 Du Pont 사의 positive control serum (lane 4) 과 Protein G purified HIV antibody (lane 5), ammonium sulfate purified HIV antibody (lane 6) 는 band 의 강도에 있어서는 거의 비슷하였으나 HIV 양성인 사람들의 항혈청에서는 더욱 약한 band 들이 보였다 (lanes 8,9 and 10).

##### 5. 방사면역 침강법 (Radioimmunoprecipitation assay)

HTLV-III 에 감염된 log phase 의 H9 cell 을 [<sup>35</sup>S] cysteine 으로 labelling 하여 얻은 H9 whole lysates 의 RIPA/SDS-PAGE (radioimmunoprecipitation assay and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 에 의하여 HIV 항원이 동정되었다.

200ul 의 H9 과 H9/HTLV-III cell lysates 의 [<sup>35</sup>S] cysteine 의 total count 는 각각  $5.2 \times 10^7$  cpm 과  $6 \times 10^7$  cpm 이었으며 Du Pont 사의 antigen detection ELISA system 의 결과 total HIV 의 492nm 에서의 OD 가 각각 1.24 와 2358 으로 이 때의 H9/HTLV-III 의 항원 단백질량은 396ng 에 해당하는 것이었다 (Table 4).

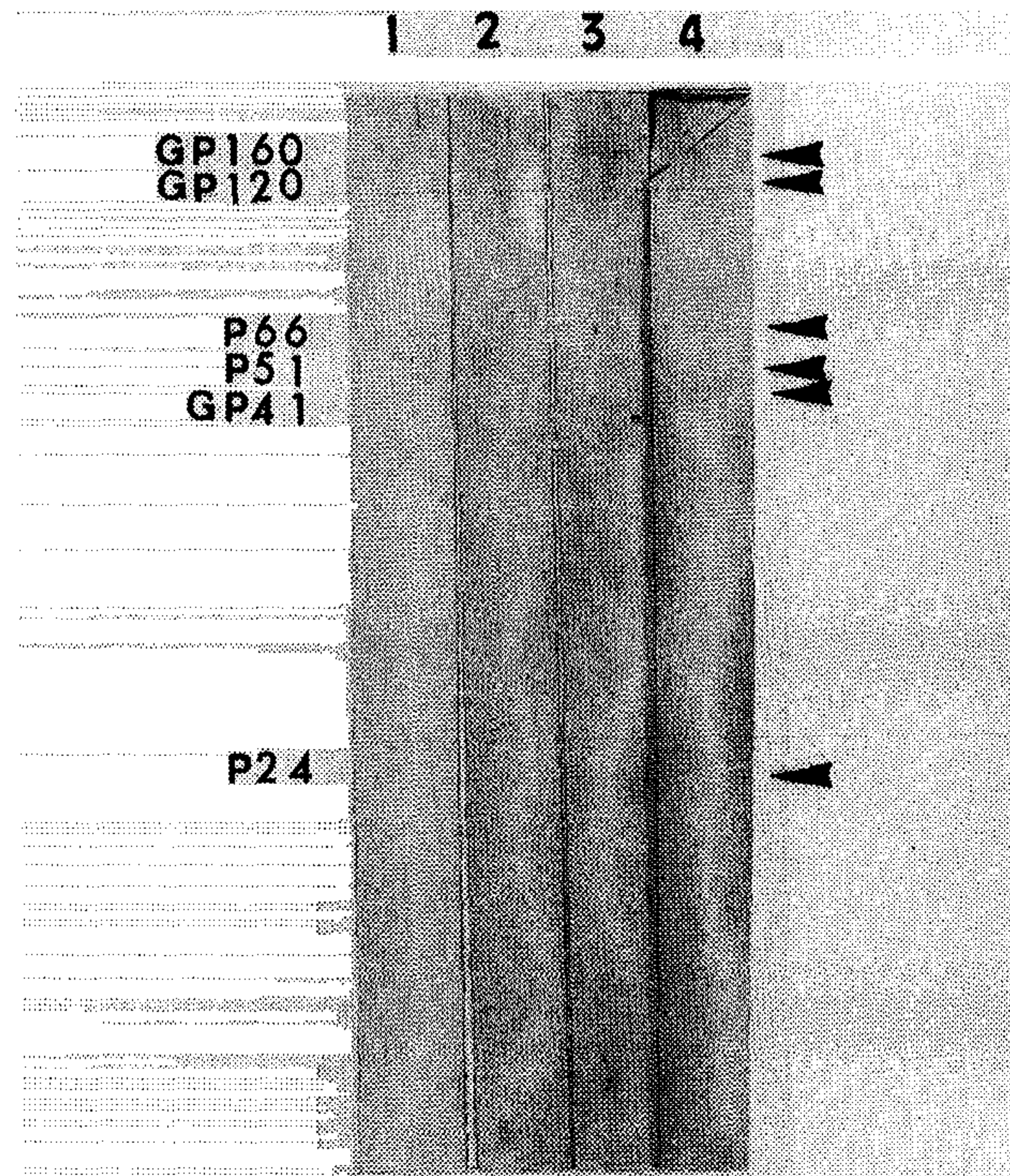


Fig. 11. Antigenicity of 20% sucrose pelleted H9/HTLV—III cell lysate by Western blotting.

50 ng of H9/HTLV—III protein was treated with 1% SDS then electrophoresed and transferred to nitrocellulose membrane.

Lane 1, reacted with negative control serum; lane 2, reacted with nonimmune serum; lane 3, Protein G purified anti—human HIV antibody; lane 4, immune serum.



TABLE 4

H9, H9/HTLV—III in log—phase growth were pulsed with [<sup>35</sup>S] cysteine.

Cell line	Log—phase culture	Pulsed label	Total count	HIV antigen
H9	25ml	150uci	$5.2 \times 10^7$ cpm	—
H9/HTLV—III	50ml	300uci	$6.0 \times 10^7$ cpm	396 ng

—, not detected.

각 cell lysate를  $10^7$ cpm씩 분주하여 nonimmune과 immune serum과 반응시킨 후 그 상층액의 antigen detection assay를 행하였다(Table 5).

TABLE 5

Remainder antigen activity in supernatant after radioimmunoreaction which is detected by antigen detection ELISA assay from Du Pont.

NO.	Cell lysate	Reacted serum	Absorbance at 492 nm
1	H9	nonimmune serum	0.21
2	H9	immune serum	0.20
3	HTLV—III	nonimmune serum	390.00
4	HTLV—III	negative control serum	368.00
5	HTLV—III	posotive control serum	0.20
6	HTLV—III	Protein G purified IgG	0.19
7	HLTV—III	anti serum 1	0.21
8	HLTV—III	sntı serum 2	0.18

Number 4,5 는 웨스턴 블롯 Kit 의 negative, positive control serum 을 각기 20u1 씩 사용하였으며 number 3 은 정상인의 혈청을 number 7,8 은 HIV 에 감염된 감염자의 혈청을 각 20u1 씩을 사용하였다.

H9/HTLV-III 의 antigen 의 total OD 2538 을 6 부분으로 나눈 부분의 OD 가 393 인 것을 생각할 때 immunoprecipitation 은 정상적으로 행하여 졌다는 것을 알 수 있다. 이 radioimmunoprecipitation 의 RIPA/SDS-PAGE 의 결과가 Fig.13 이다.

gp160, gp120 의 band 는 어떤 lane 에서도 나타나지 않는 것은 1 % NP-40 을 사용한 웨스턴 블롯의 결과와도 동일하였다 (Fig.12).

다만 p66, p55, p51, gp41, p24 의 극히 약한 band(lanes 6, 7, 8 and 9 )를 보이고 있다.

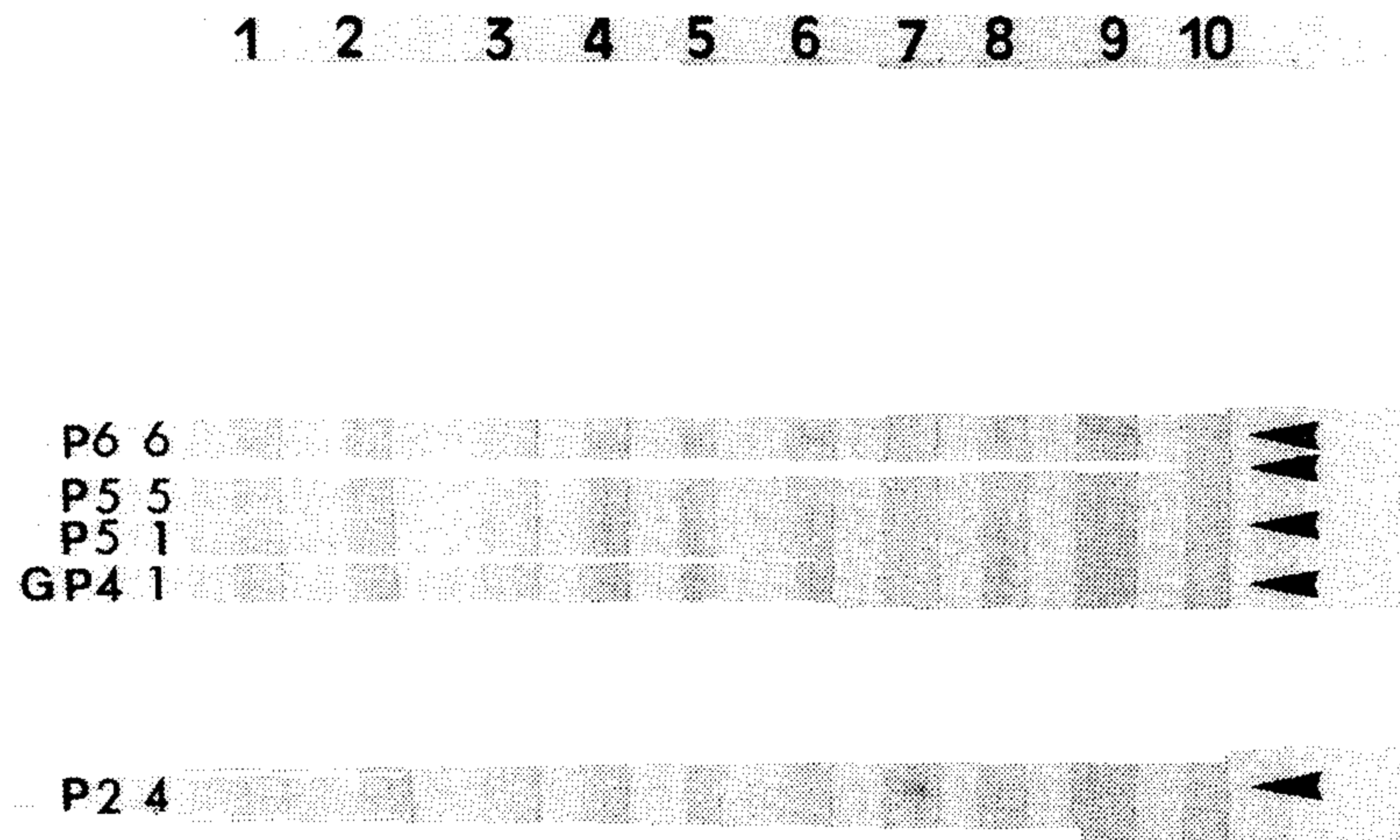


Fig. 12. Antigenicity of 20% sucrose pelleted H9/HTLV—III cell lysate by western blotting. 50 ng of H9/HTLV—III protein was treated with 1% NP—40 and 1% SDS then electrophoresed and transferred to nitrocellulose membrane. Lanes 1 and 2, reacted with negative control serum and HIV negative human serum, respectively; lane 3, reacted with HIV negative human serum incubated with nitrocellulose membrane; lane 4, reacted with positive control serum; lane 5, reacted with Protein G purified anti—human HIV antibody; lane 6, reacted with ammonium sulfate purified anti—human HIV antibody; lane 7, reacted with Protein G purified anti—human HIV p24 antibody; lanes 8, 9 and 10, reacted with immune sera.



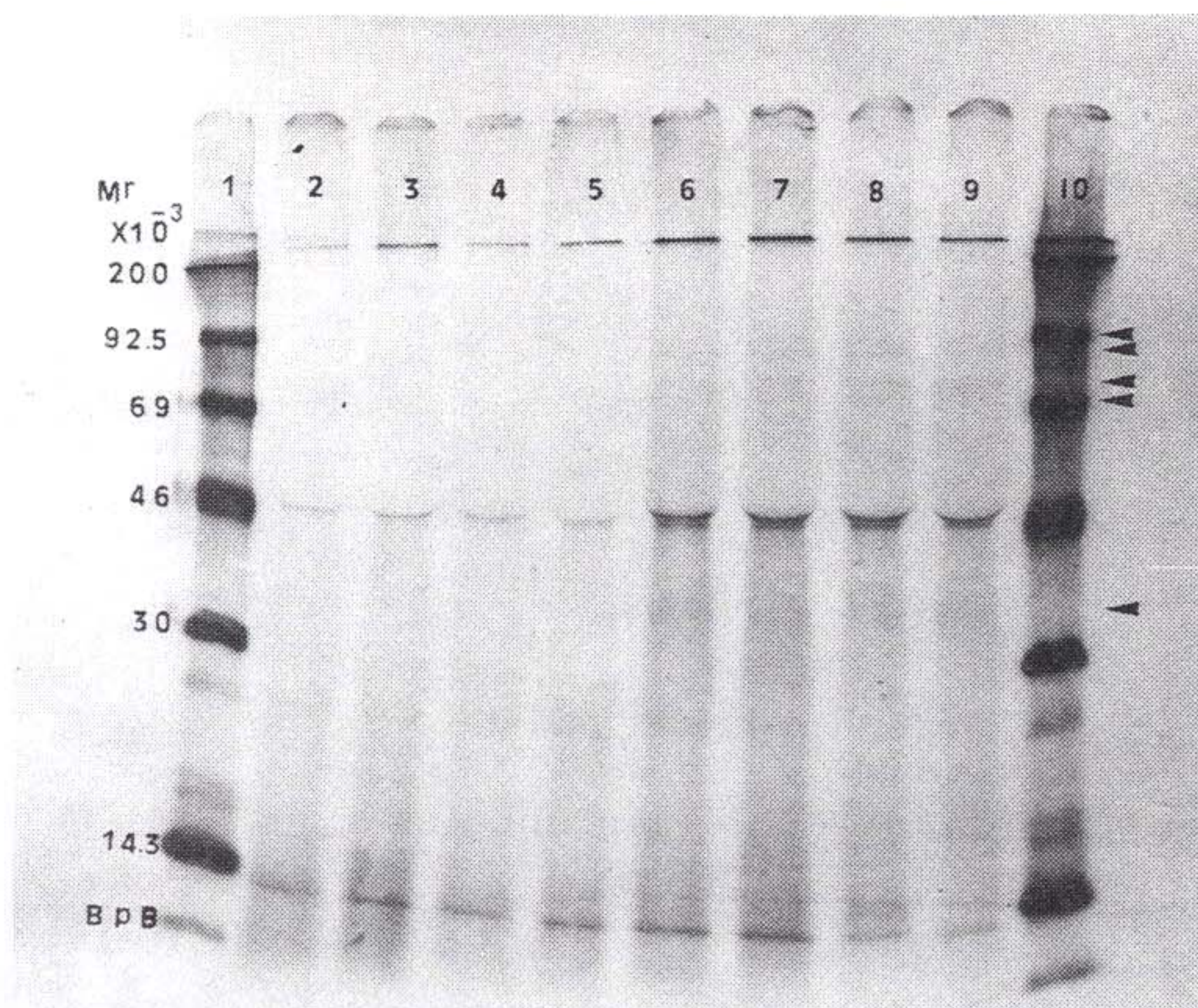


Fig. 13. Radioimmunoprecipitation of HIV antigen. H9/HTLV-III and H9 cells were harvested at their peak of log phase growth and were exposed to [<sup>35</sup>S] cyteine [100 uci/ml] for 11 hours. A soluble cell lysate was prepared by disruption of cells with RIPA buffer and ultracentrifugation for 1 hour at 100,000 x g. The lysates H9(lanes 1 and 2);H9/HTLV-III (lanes 3-9) were reacted with 20 ul of following test sera bound to Protein G-Sepharose 4FF(sigma); lanes 1 and 2, nonimmune serum and immune serum, respectively; lanes 3-8, nonimmune serum, negative control serum, immune serum, Protein G purified anti-human HIV antibody, anti serum 1 and anti serum 2, respectively. Radioimmunoprecipitates were eluted in a sample buffer containg 2% SDS, 0.08 M Tris-HCL(pH 6.8), 10% glycerol, and 0.2% bromophenol blue by boiling for 4 mimutes. Samples were analyzed in a 10% polyacrylamide resolving gel with a 3.8% stacking gel.



## 제 4 절 고 찰

본 연구에서는 국내 AIDS 진단제 개발을 위하여 웨스턴 블롯, 방사면역침강법의 개발을 시도하였다.

항원은 H9/HTLV-III 로 부터, 항체는 HIV 에 감염된 감염자의 혈장으로부터 정제하였다. 0-50 % ammonium sulfate fraction 과 DEAE-Sephacel fraction 에서 보다 Protein A 나 Protein G affinity column chromatography 에서의 정제가 훨씬 순수하다는 것이 Fig. 2 의 SDS 전기영동 gel 에 나타나 있다. 그러나 p24 에 특이한 항체의 Protein G affinity column chromatography 에서의 항체가의 떨어짐은 glycine buffer(pH 2.7) 에서의 용출시 너무 낮은 pH 농도에서 기인한 것이라고 사료되며 (Fig.10) p24 만을 강하게 인식하는 감염자의 혈액이 필요하다. 또한 DEAE-ionexchange chromatography 를 통해 높은 농도의 fraction 만 취하는 방법도 좋으리라 생각된다. 항체 detection ELSIA 를 위한 녹십자의 HIVRO 를 보면 coating 된 항원에서는 envelope protein 이 거의 없는 것을 알 수 있다 (Table 3). 이는 본 연구에 있어서의 H9/HTLV-III 로 부터의 항원 정제시 1 % NP-40 을 사용했을 경우 gp160 과 gp120 이 없어지는 것과는 일맥 상통한 것이라 보여진다 (Fig.11). 또한 방사면역침강법의 [<sup>35</sup>S] H9/HTLV-III 와의 면역반응에서, nonimmune 과의 반응에는 항원이 완전히 상층액에 남아있고 immune 과의 반응에는 상층액에 거의 남아 있지 않는 것을 볼 때 면역침강법이 잘 이루어져 있다는 것을 의미하고 있으나 (Table 4) 그 전기영동 결

과를 보면은 거의 약한 band 만을 보일 뿐이다 (Fig.13). 이러한 결과들을 모두 in house reagent로서의 가능성을 보여주고 있으나 이를 위해서는 lectin affinity column 을 이용한 enrich step 과 또한 더 많은 항원의 정제가 필요하다. Nonspecific binding의 제거를 위한 [<sup>35</sup>S] unlabeled H9/HTLV-III 가 또한 필요하며 antigen 으로 antigen affinity column 을 만들어 그 antigen 과 pair 의 antibody 를 만든 후의 antigen affinity column 에 반드시 antibody 가 정제되어야 한다. 웨스턴 블롯을 위해서는 HIV virus 의 CPE 가 있는 cell line 에 adaptation 시켜 그 상층액을 사용할 것과 HIV protein 의 각 fragment 를 인식하는 각각의 monoclonal antibody 의 affinity column 으로 antigen 을 개별 정제한 후 웨스턴 블롯을 해 본 결과 희미한 band 에 대해서는 recombinant protein 을 정제하여 보충 할 필요가 있다.

## 제 5 절 결 론

국내 AIDS 진단제 개발을 위하여 웨스턴 블롯, 방사면역침강법의 개발을 시도한 결과 다음과 같은 결론을 내렸다.

1. 항체의 yield는 Protein A-Sepharose 에 비해 Protein G-Sepharose 가 2배 정도 높았다.



2. H9/HTLV-III 배양액으로부터 정제된 항원을 1% SDS/1% NP-40 으로 처리한 웨스턴 블롯에는 p24, gp41, p51, p55, p66 의 band 가 1% SDS 의 웨스턴 블롯에는 p24, gp41, p51, p66, gp120, gp160 의 band 가 나타났다.

3. [<sup>35</sup>S] Cystein H9/HTLV-III 의  $6 \times 10^7$  cpm 에 속하는 HIV antigen 은 396 ng 이었다.

4. [<sup>35</sup>S] Cystein H9/HTLV-III 의 방사면역침강법의 autoradiography 에서는 p24, gp41, p51, p55, p66 의 band 가 나타났다.

## 제 6 절 참 고 문 헌

1. Frideman—Kein AE, Laubenstein L, Marmor M. Kaposi'sarcoma and pneumocystis pneumonia among homosexual men—New York and California. MMWR 30:250, 1981.
2. Barre—Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, Axler—Blin C, Vezinet—Brun F, Rouzioux C, Rosenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T—lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrom(AIDS). Science 220:868—871, 1983.
3. Garvey JS, Cremer NE, Sussdorf DH. Chapter 24. Ammonium sulfate precipitation. p. 218—219. In methods in immunology 3rd (Ed.) W. A. Benjamin, Inc, Massatusets. 1980.
4. Laemmli, U, K. nature 227:680—685, 1970.
5. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some application. Proc. natl. Acad, Sci. USA. 76:4350—4354, 1979.
6. Essex M, Mclane M. F, Lee T. H, Falk L, Howe C. W. S. Mullins J. I. Antibodies to cell membrane antigen associated with human T—cell leukemia virus in patients with AIDS. Science 220:859—862, 1983.