

## 원위치 증합효소 연쇄반응에서 증폭산물의 세포내 보존을 위한 방법들

이재영\*

목포대학교 자연과학대학 생물학과

증합효소반응(PCR)은 그 뛰어난 효능에도 불구하고 목표핵산의 오염으로 인하여 종종 가양성반응을 일으키는데, 이를 해결할 수 있는 원위치증합효소반응(*in situ* PCR)이 개발되었다. 이 기술은 조직절편, 현탁배양세포 등에 다양하게 쓰이는데 그 목표핵산이 위치하는 곳에서 증폭을 하여 다양한 종류의 세포들이 모인 곳에서 원하는 목표핵산을 가진 세포만을 탐지할 수 있게 한다. 세포내에서 핵산표적물을 증폭시키기 위해서는 필요한 반응물질들이 세포내부로 들어갈 수 있도록 세포막의 투과성을 높여주어야 하는데, 이를 위한 처리는 반응물질들의 세포내로의 유입을 용이하게 할 뿐만 아니라 또한 증폭산물의 세포외부로의 유출을 가능케 한다. 따라서 세포막 유출을 감소시키기 위한 방법으로 증폭산물의 크기를 증가시킬 수 있는 두가지 방법을 사용하였다. HIV-1으로 감염시킨 Molt/LAV와 U1.1의 현탁배양세포들을 PCR tube 안에서 기존의 primer를 변형시킨 tailed primer와 dTTP 대신 biotinylated dUTP로 증폭시켰을 때, 각각 길이가 긴 증폭산물과 부피가 큰 증폭산물을 만들게 되었다.

**Key words** □ biotinylated dUTP, high molecular weight products, *In situ* PCR, tailed primers

HIV-1과 같은 잠복기가 긴 slow virus 등에 감염된 사람들에게는 빠른 진단이 필요한데, 특히 혈청 음성반응을 나타내는 사람 (14)이나 감염된 여성에게서 출산된 영아들(12)에게는 필수적이다. 1960년대 후반에 개발된 *in situ* hybridization (ISH) 기술은 특히 긴 잠복기와 아주 적은 양의 단백질을 만들어내는 slow virus의 연구에 긴요하게 사용되어져 왔다(10). 그러나 이 기술은 대상 mRNA의 경우 최소한 10-20 copies, DNA는 10 copies가 필요하다(15). 따라서 적은 양의 대상핵산을 탐지하려면 양적증폭이 필요하게 되었는데, 증합효소연쇄반응(PCR)이 그 문제를 해결해 주었다(19). 이 두 기술의 결합을 통해 PCR로는 대상핵산의 양을 늘이고, ISH로는 그 대상을 특이적으로 탐지할 수 있게 되었다. 새 기술의 명칭은 증폭된 산물을 가시화하는 방법에 따라 달리 불리울 수도 있는데, 표지되지않은 증폭산물을 방사능등으로 표지된 probe로 ISH한 후 가시화할 경우(6,15,17)에는 PCR *in situ* hybridization이라 하고, biotin, digoxigenin, fluore-scein등으로 표지된 nucleotide로 PCR을 하여 증폭산물에 이들이 삽입되어지고 이 산물을 immunochemistry, immunofluorescence나 autoradiography로 가시화할 경우(3,22,24)에는 *in situ* PCR (ISPCR)이라고 하기도 하는데, 통상 ISPCR로 통용되고 있다. 이 기술로 single copy 단위의 대상핵산을 발견할 수 있게 되었고(2,16,26), 조금씩 변형되어 현재는 여러 다양한 용도로 쓰일 수 있는 방법으로 발전되고 있다(1,20,21). 하지만 아직도 보편적으로 통일된 프로토콜이 없는 실정이라서, 각기 다른 조건(세포의 종류, 샘플의 형태 등)에 따라 서로 다른 ISPCR 방법들

을 사용하고 있다.

ISPCR의 기본되는 핵심단계는 세포속의 대상핵산을 증폭시키는 것인데, 이를 위해서는 PCR의 주요 반응물질이 세포내로 들어 가야하고 이를 용이하게 하기 위해 세포의 투과성을 높이는 처리를 하게 된다. 그러나 이러한 처리는 증폭산물의 세포외부로의 유출을 가능하게 하고, 이들이 세포외부에서 또다른 주형으로 작용하여 원치않은 증폭산물을 만들게 된다. 이들은 주변의 대상핵산을 갖고 있지않은 세포들에 비특이적으로 결합하여 "Diffusion artefact"를 만들게 되는데, 특히 현탁배양세포에서는 false positive 결과를 나타내기도 한다(16). 이를 해소하기 위해서 여러 가지 방법들이 사용되어지고 있는데(15), 본 연구에서는 HIV-1에 감염된 두가지 현탁배양세포들(Molt/LAV와 U1.1)을 대상세포들로 사용하여, 5'쪽에 서로 상보적인 염기를 가진 tailed primer와 biotinylated dUTP를 PCR에 이용하였다. 이 세포들은 각각 수십개, 두 개의 HIV-1 copy수를 가지고 있는 것(7,11)으로 알려져 있는데, 사용되는 2가지 방법이 이들로 부터 얼마나 효율적으로 긴 고분자의 증폭산물이나 부피가 큰 증폭산물을 만드는 지를 비교하고, 증폭산물들에 대한 유출방지 효과를 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료 및 준비

HIV-1에 감염된 Molt/LAV (11)와 U1.1 (7), 그리고 감염안된 Molt의 현탁배양세포들이 사용되었다. 이들은 AIDS Research and Reference Reagent Program에 의해 구입되었고, 동결상태로 도착하여 즉시 해빙되었다. 이 현탁배양세포들은 원심분리(5분, 160×g)하여 수거되었고, 3.0×10<sup>6</sup> 세포/ml의 농도로 3일마다 50

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 061-450-2347, Fax: 061-454-0267  
E-mail: jaeyunglee@hotmail.com

ml의 새로운 배양액으로 조직배양 플라스크(type 75 cm<sup>2</sup>, Falcon 3023)속에서 계대배양되었다. 이 복합배양액 한 병에는 500 ml의 RPMI-1640 (Irvine Scientific, Santa Ana, CA), 50 ml의 heat inactivated fetal calf serum (Irvine Scientific), 0.5 ml의 2-mercaptoethanol (Sigma;  $5 \times 10^{-2}$  M), 5 ml의 HEPES buffer (Irvine Scientific; 1 M), 6 ml의 L-glutamine (Whittaker Bioproducts, Walkersville, MD), 7.5 ml의 penicillin-streptomycin 용액 (Whittaker Bioproducts; pen-strep이 각각 10,000 units/ml, 10,000 mcg/ml), 0.6 ml의 gentamicin sulfate 용액 (Irvine Scientific; 50 mg base/ml)이 혼합되어 있다. 실험재료로 쓰이기 위해 신선한 배양액에서 자라는 현탁배양세포들은 PBS로 2번 세척되었고 원심분리 (5분,  $160 \times g$ )하여 모아졌으며 에탄올-빙초산의 혼합액 (3:1)으로 5분동안 고정되었다. 이후 100% 에탄올로 세척되었고 70% 에탄올 속에 냉장상태(4°C)로 보관되었다.

### 사용된 Primer와 Probe

HIV-1의 gag 1551-1665 부위를 증폭할 수 있는 primer들로는 SK38과 SK39이 사용되었고, 이들 각각의 5'쪽에 서로 상보적으로 결합할 수 있는 18개의 tail sequence를 연결하였고, 특히 SK38에는 이 tail sequence의 3'쪽에 *RsaI* restriction enzyme site (GTAC)를 더 첨가하여 각각 TRSK38과 T'SK39이라 명명하였다.

Probe로는 이 부위의 존재를 확인할 수 있는 SK19이 사용되었고, <sup>32</sup>P로 방사능 표지되었다. 이들의 sequence와 결합위치는 다음과 같다.

- SK38 : 5'-ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAAT-3'  
(gag 1551-1578)
- SK39 : 5'-TTTGGTCCTTGCTTATGTCCAGAATGC-3'  
(gag 1638-1665)
- TRSK38 : 5'-ccccaaacccccaaaccccGTAC-SK38-3' (소문자표시는 tail sequence)
- T'SK39 : 5'-gggggttgggggttgggg-SK39-3' (소문자표시는 TRSK38의 tail sequence와 상보적으로 결합할 수 있는 T'SK39의 tail sequence)
- SK19 : 5'-ATCCTGGGATTAATAAAAATAGTAAGAATG-TATAGCCCTAC-3' (gag 1595-1635)

### 현탁배양세포들의 PCR을 위한 준비 및 PCR

#### (1) Tailed Primer 사용시

70% 에탄올 (4°C)에 보관된 HIV-1에 감염된 Molt/LAV와 감염안된 Molt 세포들 ( $1.0 \times 10^6$ )을 PBS로 세척하고, 원심분리하여 세포들을 수거하고, 이들을 총 부피가 100  $\mu$ l가 되도록 다음과 같은 세 종류의 PCR 용액에 현탁시켰다.

Molt/LAV 세포들은 PCR 용액 I (10 mM Tris-Cl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ M tailed primers, 250  $\mu$ M dNTPs, 30 cycle당 5 units of Taq enzyme); PCR 용액 II (10 mM Tris-Cl, pH 8.3, 50 mM KCl, 4.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5  $\mu$ M tailed primers, 250  $\mu$ M dNTPs, 30 cycle당 10 units of Taq

enzyme); PCR 용액 III (Taq enzyme이 빠진 PCR 용액 II)에, Molt 세포들은 PCR 용액 II에 현탁시켜 사용하였다.

PCR 반응은 0.5 ml의 polypropylene microcentrifuge tube속에서 수행되었고, DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus)가 사용되었다.

PCR protocol은 94°C에서 처음 2분동안 분리시키고, 55°C에서 5 또는 10 unit의 Taq enzyme을 넣고 50  $\mu$ l의 mineral oil을 첨가시킨다. 72°C에서 2분 동안 연장시키고 그후에는 총 60 cycle의 program (94°C에서 1분, 55°C에서 2분, 72°C에서 2분)을 작동시킨다. 30 cycle이 되었을 때, 20  $\mu$ l의 현탁액을 빼낸다. 5 또는 10 unit의 Taq enzyme을 넣고 나머지 30 cycle을 진행시킨다. 60 cycle이 완료된 후 20  $\mu$ l의 현탁액을 빼낸다. 30 cycle과 60 cycle로 부터의 현탁액을 원심분리하여 세포들을 침전시키고, 이들을 PBS로 2번 세척한다. 세척된 현탁액을 3번 동결과 해빙을 거듭하여 세포를 파괴시키고 원심분리로 침전시켜 이로부터 핵산 상층액을 수거하여 2% agarose gel 전기영동을 한 후, Southern blot을 수행한다.

#### (2) Biotinylated dUTP를 dTTP 대신에 사용시

70% 에탄올 (4°C)에 보관된 U1.1을 위와 동일하게 처리하고 PCR 용액 I, II를 사용하여 PCR을 수행한다. 이때 primer로는 non-tailed primer인 SK38과 SK39을 사용한다. 40%의 dTTP를 biotin-16-dUTP (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN)로 대체하여 100  $\mu$ M의 biotin-16-dUTP를 사용한다. PCR 반응과 그후의 처리는 위와 동일하게 수행한다.

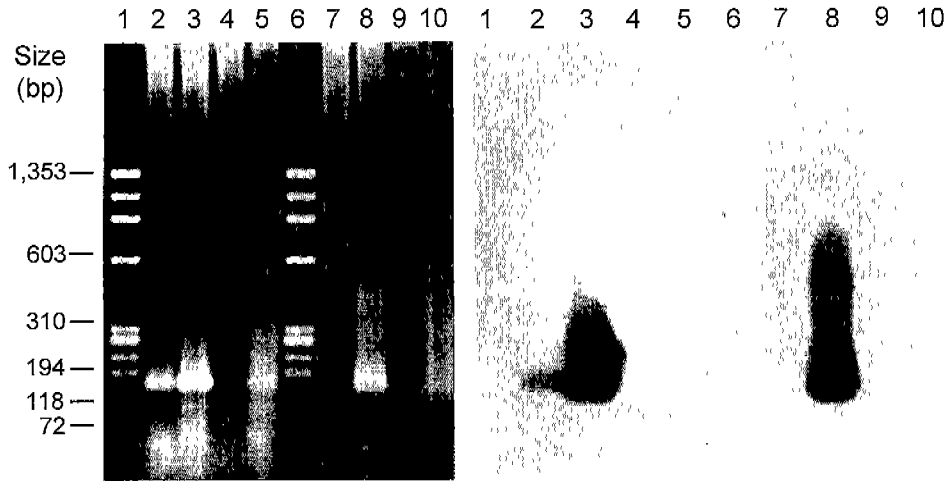
### Southern transfer, Hybridization 과 Autoradiography

전기영동 겔상의 증폭된 DNA는 이미 언급된 것처럼(18), nitrocellulose 종이에 옮겨지고 prehybridization과 hybridization을 58°C에서 각각 3 시간, 하룻밤동안 수행한다. Blot은 상온에서 3번 세척이 되는데 각각 한번씩, 2 $\times$ SSC, 0.1% SDS에서 10분간, 1 $\times$ SSC, 0.1% SDS에서 5분간, 0.1 $\times$ SSC에서 1분간 세척되고 상온에서 말린다. 마른 blot은 -70°C에서 Kodak Diagnostic Film X-OMAT<sup>TM</sup>AR (Kodak, Rochester, NY)로 하룻동안 노출이 되고, 그 후 빼낸 film은 Konica QX-60A automatic x-ray film processor (Konica, Tokyo, Japan)를 통해 현상이 된다.

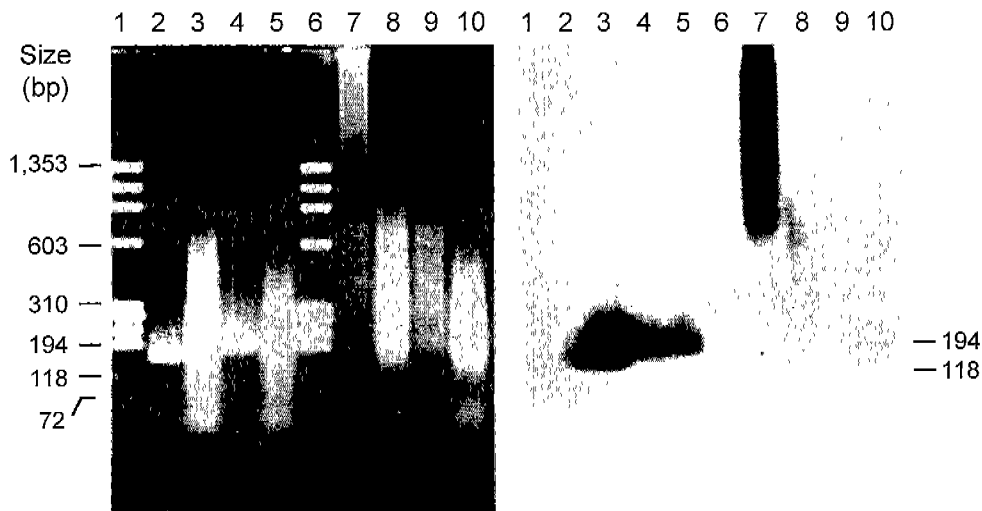
### 결과 및 고찰

Tailed primer와 두가지의 PCR 용액을 사용하여 세포의 현탁배양액에 ISPCR할 때 세포안에 잔류하는 증폭산물의 양상(Fig. 1)

한 세포당 수십개의 HIV-1 sequence를 가지고 있는 것으로 알려져 있는 Molt/LAV 세포(11)를 대상으로 tailed primer로 PCR을 수행하여 증폭산물의 양상을 조사했다. Tailed primer를 사용하여 세포들의 현탁배양액을 tube안에서 PCR 했을 때, 예상대로 30 cycle (lane 2와 3)에서는 155 bp의 primary products가 증폭되었고, 60 cycle에서는 PCR 용액 I의 경우(lane 7) 세포밖으로의 유출이 자유롭지 못할 high MW secondary products가 생산



**Fig. 1.** Effect of tailed primers for the *in situ* PCR of cell suspension. (Left) Ethanol: glacial acetic acid (3:1)-fixed cells [Molt/LAV (lanes 2-4 and 7-9) or Molt (lanes 5 and 10); about  $1 \times 10^6$  cells/reaction] were amplified in 100  $\mu$ l reactions by using PCR buffer solution I (10 mM Tris-Cl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ M tailed primers, 250  $\mu$ M dNTPs, 10 units of Taq enzyme; lanes 2 and 7), solution II (10 mM Tris-Cl, pH 8.3, 50 mM KCl, 4.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5  $\mu$ M tailed primers, 250  $\mu$ M dNTPs, 20 units of Taq enzyme; lanes 3, 5, 8 and 10), and solution III (solution II without Taq enzyme; lanes 4 and 9). The reactions were started with 5 units (solution I) or 10 units (solution II) of Taq enzyme for 30 cycles. At 30 cycles (lanes 2-5), 20  $\mu$ l aliquots of amplified cell suspensions were withdrawn, washed, and lysed for the analysis of amplified products inside the cells in a 2% agarose gel electrophoresis. Additional 5 or 10 units of Taq enzyme were then added to the tubes for further 30 cycles (lanes 7-10), another 20  $\mu$ l aliquots were analyzed. (Right) The presence of amplified products was verified by Southern blot of the gel using the internal probe SK19.



**Fig. 2.** Effect of biotinylated nucleotide for the *in situ* PCR of cell suspension compared to that of tailed primers. (Left) PCR solution I (10 mM Tris-Cl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ M tailed primers, 250  $\mu$ M dNTPs, 10 units of Taq enzyme in 100  $\mu$ l reaction; lanes 2, 4, 7 and 9) or solution II (10 mM Tris-Cl, pH 8.3, 50 mM KCl, 4.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5  $\mu$ M tailed primers, 250  $\mu$ M dNTPs, 20 units of Taq enzyme in 100  $\mu$ l reaction; lanes 3, 5, 8 and 10) was used to amplify the low proviral sequences (about 2 copies/cell) of HIV-1 inside the ethanol: glacial acetic acid (3:1)-fixed U1.1 cells. In reactions using biotinylated dUTPs (lanes 4, 5, 9 and 10), 40% of dTTP was replaced by biotin-16-dUTP. At 30 cycles (lanes 2-5) and 60 cycles (lanes 7-10), a 20  $\mu$ l from each tube was withdrawn, washed, lysed, and analyzed for the amplification products inside the cells in a 2% agarose gel electrophoresis. (Right) The presence of amplified products was verified by Southern blot of the gel using the internal probe SK19.

되었다. 이 이차적 고분자 증폭산물은 대략 30 cycle 이후에 primer가 고갈되어감에 따라 primer가 원래의 target sequencce에 불기보다는 서로 불거나, 상대적으로 많이 생성된 primary products의 상보적인 tail에 불거나, cycle이 진행됨에 따라 이미 생성된 primary products의 양 끝에 위치한 tailed primer에서 primary

products간의 서로 상보적인 tail에 의한 결합과 그들을 주형으로 사용한 증폭에 의해 생성되는 이차증폭산물인데, 이는 60 cycle에서 155 bp의 primary products가 거의 다 소멸되었고(lane 7), *RsaI* enzyme 처리에 의해 이 이차증폭산물이 그 안에 삽입되어 있는 TRSK38에서 분해되어 primary products로 잘라짐을 통해 확인되

었다(13). PCR 용액 II의 경우(lane 8) 여전히 많은 양의 primary products가 생산되었다. 이는 PCR 용액 II의 고농도의  $Mg^{++}$  이온, 고농도의 tailed primer와 많은 양의 Taq enzyme으로 인해 30 cycle 이후에 primary products의 상보적인 tail sequence간의 결합이 일어날 기회가 줄어들어 생겨난 현상인 것 같다. Taq enzyme이 제거된 경우(lane 4와 9)와 HIV-1의 감염이 없는 Molt 세포의 경우(lane 5와 10)에는 증폭산물이 없었다. 한편, PCR 수행후 세포들을 세척하기 전에 20  $\mu$ l의 증폭된 현탁액을 추출하고 세포들을 침전시켜 얻은 세포외액으로부터의 증폭산물을 따로 검사한 결과, 세포내에서 발견되는 증폭산물의 양상과 유사하였다. 이는 PCR 초기에 primary products가 세포밖으로 유출되어 세포외액에서 계속 증폭이 된 결과라 예상되고, 또한 세포내부에서의 primer의 고갈현상을 유도시켜 이차증폭산물을 생성케 하는 원인이 되기도 하겠다. 이 결과를 토대로 해볼 때 tailed primer를 사용하여 PCR 용액 I을 사용하면 60 cycle에서 원하는 긴 길이의 이차증폭산물들을 얻을 수 있고, 용액 II를 사용하면 30 cycle에서 짧기는 하지만 많은 양의 primary products를 얻을 수 있을 것 같다. 이처럼 증폭된 산물의 양을 높이기 위해 증폭 cycle을 증가시키거나(4-6,9,25), PCR 용액의 주요 반응물들인  $Mg^{++}$  이온, Taq enzyme, primer등의 농도를 높여주기도 한다(3,17,23). 따라서 PCR 용액 II를 사용하면서 여기에 세포밖으로 유출되는 증폭산물을 물리적으로 막을 수 있는 물질을 첨가한다면 초기의 유출현상도 감소시키고 더 많은 양의 증폭산물을 얻는 결과를 얻을 수 있을 것이라 예상된다.

#### Biotinylated dUTP와 tailed primer를 사용했을 때 세포내에 잔류하는 증폭산물의 양상비교(Fig. 2)

증폭산물의 세포내 잔류를 강화시키기 위한 방법으로 tailed primer와 biotinylated nucleotide인 biotin-16-dUTP를 사용하여 두 가지의 PCR 용액으로 PCR을 수행하였다. 한 세포당 2개의 HIV-1 proviral sequence를 가진 것으로 알려진 U1.1 세포현탁배양액(7)을 사용하여 이 방법의 특이성과 민감성을 Molt/LAV의 경우 (Fig. 1)와 비교하였다. 예상대로 tailed primer를 쓸 때 (lanes 2, 3, 7, 8)는 30 cycle (lane 2와 3)과 60 cycle (lane 7과 8)에서 PCR 용액의 차이(용액 I; lane 2와 7/용액 II; lane 3과 8)로 인한 다른 증폭양상을 보여주었다. 이는 U1.1이 아주 적은 HIV copy를 갖고 있어서 30 cycle에서는 적은 양의 증폭산물을 만들지만 cycle이 지나면서 primer들의 고갈로 인한 많은 양의 이차증폭산물을 만드는 것으로 보인다(lane 2와 7). Biotinylated dUTP의 경우(lanes 4, 5, 9, 10), PCR 용액 II에서는 tailed primer와 동일한 양상을 보여주면서 band size는 194 bp로 부피가 증가한 증폭산물을 생산하였다. 특히 60 cycle (lane 9와 10)에서는 미미한 양의 증폭산물이 발견되었는데, 이는 biotinylated dUTP를 쓰는 경우에 cycle이 지나면서 전반적으로 PCR 효율이 떨어진 것 같고, PCR 초기에 증폭산물이 많이 세포밖으로 유출이 되거나, monocyte 계열인 U1.1의 세포적 구조가 T cell 계열인 Molt/LAV와 다르기 때문일 수도 있다. PCR 초기에 유출된 primary products로 인한 세포외액에서의 증폭산물의 양상은 세

포내부의 것과 Molt/LAV에서의 경우보다는 양이 적는데, 이 현상도 위에서 언급한 가능성들과 U1.1의 적은 HIV copy 수 때문인 것 같다. 따라서 biotinylated dUTP를 쓰는 경우에도 세포밖으로의 유출을 막을 수 있는 성분을 첨가한다면 더 많은 증폭산물을 얻을 것이고, tailed primer를 쓰면서 biotinylated dUTP 사용을 병행한다면 더 좋은 결과를 얻을 수 있으리라 예상된다.

위의 두가지 방법을 비교해 볼 때 tailed primer가 더 효율적인 것 같은데, biotinylated nucleotide를 사용하여 적은 PCR cycle을 수행하면서도 만족한 증폭산물을 세포내에서 탐지하려면 탐지의 민감성을 높이는 방안도 고려할 수 있다. 이때는 FITC-avidin을 biotin에 붙이고 난후 다시 biotinylated anti-avidin antibody로 탐지를 증폭시키면 된다. 그러나 이 방법은 역시 세포외부로 유출된 산물의 탐지도 증폭시키게 되므로 주의해야 한다(8). 따라서 이후의 연구방향은 agarose처럼 증폭산물의 유출을 물리적으로 막을 수 있는 물질을 실험과정에 첨가시켜 적은 cycle의 PCR을 수행하고서도 많은 증폭산물을 세포내에 잔류시키는 방법을 개발하고 이의 결과를 ISH로 확인하는 것이다.

#### 참고문헌

- Andras, S.C., J.B. Power, E.C. Cocking, and M.R. Davey. 2001. Strategies for signal amplification in nucleic acid detection. *Mol. Biotechnol.* 19, 29-44.
- Bagasra, O., T. Seshamma, and R.J. Pomerantz. 1993. Polymerase chain reaction *in situ*: intracellular amplification and detection of HIV-1 proviral DNA and specific genes. *J. Immunol. Meth.* 158, 131-145.
- Chen, R.H. and S.V. Fuggle. 1993. *In situ* cDNA polymerase chain reaction: A novel technique for detecting mRNA expression. *Am. J. Pathol.* 143, 1527-1534.
- Chiu, L.P., S.H. Cohen, D.W. Morris, and G.W. Jordan. 1992. Intracellular amplification of proviral DNA in tissue sections using the polymerase chain reaction. *J. Histochem. Cytochem.* 40, 333-341.
- Embleton, M.J., G. Gorochoy, P.T. Jones, and G. Winter. 1992. In-cell PCR from mRNA: amplifying and linking the rearranged immunoglobulin heavy and light chain V-genes within single cells. *Nucleic Acids Research* 20, 3831-3837.
- Embretson, J., M. Zupancic, J. Beneke, M. Till, S. Wolinsky, J.L. Ribas, A. Burke, and A.T. Haase. 1993. Analysis of human immunodeficiency virus-infected tissues by amplification and *in situ* hybridization reveals latent and permissive infections at single-cell resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 357-361.
- Folks, T.M., J. Justement, A. Kinter, C.A. Dinarello, and A.S. Fauci. 1987. Cytokine-induced expression of HIV-1 in a chronically-infected promonocyte cell line. *Science* 238, 800-802.
- Gosden, G. and D. Hanratty. 1993. PCR *In Situ*: A rapid alternative to *in situ* hybridization for mapping short, low copy number sequences without isotopes. *Bio Techniques* 15, 78-80.
- Haase, A.T., E.F. Retzel, and K.A. Staskus. 1990. Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 127-135.
- Harper, M.E., L.M. Marselle, R.C. Gallo, and F. Wong-Staal. 1986. Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected indi-

- viduals by *in situ* hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83, 772-776.
11. Kikukawa, R., Y. Koyanagi, S. Harada, N. Kobayashi, M. Hatanaka, and N. Yamamoto. 1986. Differential susceptibility to the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus in cloned cells of human leukemic T-cell line Molt-4. *J. Virol.* 57, 1159-1162.
  12. Laure, F., V. Courgnaud, C. Rouzioux, S. Blanche, F. Veber, M. Burgard, C. Jacomet, C. Griscelli, and C. Brechot. 1988. Detection of HIV DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction. *Lancet* 2, 538-541.
  13. Lee, J.Y., J-K. Auh, and G.W. Jordan. Evaluation of several parameters of *in situ* polymerase chain reaction (ISPCR) to reduce the leakage of amplifcants from the cells. *J. Microbiol.* (Submitted).
  14. Loche, M. and B. Mach. 1988. Identification of HIV-infected seronegative individuals by a direct diagnostic test based on hybridisation to amplified viral DNA, *Lancet* 2, 418-421.
  15. Komminoth, P. and A.A. Long. 1993. *In situ* polymerase chain reaction. An overview of methods, applications and limitations of a new molecular technique. *Virchows Archiv. B. Cell. Pathol.* 64, 67-73.
  16. Komminoth, P., A.A. Long, R. Ray, and H.J. Wolfe. 1992. *In situ* polymerase chain reaction detection of viral DNA, single-copy genes, and gene rearrangements in cell suspensions and cytopspins. *Diagn. Mol. Pathol.* 1, 85-87.
  17. Long, A.A., P. Komminoth, and H.J. Wolfe. 1993. Comparison of indirect and direct *in situ* polymerase chain reaction in cell preparations and tissue sections. *Histochemistry* 99, 151-162.
  18. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. Southern transfer, p 382-389. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor laboratory.
  19. Mullis, K.B. and F. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol.* 155, 335-350.
  20. Nuovo, G.J. 2001. Co-labeling using *in situ* PCR. A review. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 1329-1340.
  21. Nuovo, G.J. 2000. *In situ* strand displacement amplification: An improved technique for the detection of low copy nucleic acids. *Diagn. Mol. Pathol.* 9, 195-202.
  22. Nuovo, G.J., J. Becker, P. MacConnell, M. Margiotta, S. Comite, and H. Hochman. 1992. Histological distribution of PCR-amplified HPV6 and 11 DNA in penile lesions. *Am. J. Surg. Pathol.* 16, 269-275.
  23. Nuovo, G.J., F. Gallery, P. MacConnell, J. Becker, and W. Bloch. 1991. An improved technique for the *in situ* detection of DNA after polymerase chain reaction amplification. *Am. J. Pathol.* 139, 1239-1244.
  24. Spann, W., K. Pachmann, H. Zabnienska, A. Pielmeier, and B. Emmerich. 1991. *In situ* amplification of single copy gene segments in individual cells by the polymerase chain reaction. *Infection* 19, 242-244.
  25. Staskus, K.A., L. Couch, P. Bitterman, E.F. Retzel, M. Zupancic, J. List, and A.T. Haase. 1991. *In situ* amplification of visna virus DNA in tissue sections reveals a reservoir of latently infected cells. *Microbial Pathogenesis* 11, 67-76.
  26. Zehbe, I., G.W. Hacker, E. Rylabder, J. Sallstrom, and E. Wilander. 1992. Detection of single HPV copies in SiHa cells by *in situ* polymerase chain reaction (*in situ* PCR) combined with immunoperoxidase and immunogold-silver staining (IGSS) techniques. *Anti-cancer Res.* 12, 2165-2168.

(Received November 17, 2001/Accepted December 3, 2001)

#### ABSTRACTS: Methods of *in situ* PCR to Retain the Amplification Products Inside the Cells

Jae Yung Lee (Department of Biology, Mokpo National University, Chonnam 534-729, Korea)

Highly effective polymerase chain reaction (PCR) often brings about false positivity caused by contamination of the sample with target nucleic acids. To solve this problem, *in situ* PCR (ISPCR) has been developed and applied onto various tissue sections and suspension cultures. With combination of PCR and *in situ* hybridization, this method amplifies the nucleic acid targets *in situ* and detect the amplified products inside the cells over the background of various cell types. In order to amplify the nucleic acid targets inside the cells, permeabilisation of a sample is required for the entry of amplification reactants into a cell. Treatments of a sample for the purpose allow not only the entry of reactants into the cell but also the exit of amplification products out of the cell. As a means to reduce the leakage of the amplification products, two methods were applied to suspension cultures of HIV-infected Molt/LAV and U1.1 cells, in which modified, tailed primers produced long linear amplifcants whereas biotinylated dUTP instead of dTTP did bulky products.