

다중 중합효소 연쇄반응을 이용한 DNA 바이러스의 동시검출

성혜란 · 주진영 · 이종길 · 정연복 · 송석길*

충북대학교 약학대학

Epstein-Barr virus (EBV), cytomegalovirus (CMV), hepatitis B virus (HBV), parvovirus B19 (B19) 등 4종의 바이러스는 인체에 감염을 일으키는 병원체로서 DNA를 유전물질로 함유한다. 각 바이러스 유전자의 염기서열을 분석하여 EBV, CMV, HBV의 pol 유전자와 B19의 ns 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 primer를 설계·제작하고 단일 시험으로 4종의 바이러스를 동시에 검출할 수 있는 다중 중합효소 연쇄반응(Multiplex PCR)법을 확립하였다. Primer 염기서열, PCR 반응조성물의 농도, PCR 반응시간 및 온도조건을 최적화하여 민감도를 증대시켰으며, 단일 시험으로 5-10 분자수의 유전물질까지 검출이 가능하였다. 또한 4종의 바이러스 사이에 교차반응이 일어나지 않았으며 생체시료를 이용한 시험에서도 특이성과 민감도가 유지됨을 확인하였다. 그러므로 본 연구에서 확립한 다중 중합효소 연쇄반응은 세포배양액 또는 생체 시료에 감염된 4종 DNA 바이러스 진단에 효율적으로 이용할 수 있을 것이라고 판단된다.

Keywords □ multiplex PCR, epstein-Barr virus (EBV), cytomegalovirus (CMV), hepatitis B virus (HBV), parvovirus B19 (B19), diagnosis

Hepatitis B virus (HBV)는 간염 및 간암을 유발하며, cytomegalovirus (CMV)는 거대봉입체병(cytomegalic inclusion disease)의 원인 바이러스이다. Human parvovirus B19 (B19)가 감염되면 면역력이 저하된 환자에서 Aplastic crisis, 전염성 홍반 등의 증상이 나타나며, Epstein-Barr virus (EBV)는 Burkitt's lymphoma, nasopharyngeal carcinoma와 같은 악성 종양을 유발할 수 있다.

고전적으로 바이러스의 검출방법으로는 효소면역흡착법(ELISA)이나 형광항체염색법, 또는 바이러스 특이항체를 검출하는 혈청학적 진단법 등이 이용되어 왔다. 최근에는 바이러스의 핵산을 검출하는 hybridization법이나(1, 20) 중합효소 연쇄반응법이 이용되는 추세이지만(14, 19, 21, 28), 충분한 양의 시료를 요구하며 재현성과 효율성 측면에서 다소 단점이 있다.

다중 중합효소 연쇄반응법(Multiplex polymerase chain reaction)은 1980년대에 처음으로 보고된 후로 돌연변이분석, 다중 형질 분석, 정량분석, RNA 검출 등 핵산을 이용한 진단법에 널리 사용되어 왔다(5, 25, 26, 27). 다중 중합효소 연쇄반응은 변형된 PCR방법으로써 단일시험으로 두 개 또는 그 이상의 유전자를 동시에 증폭할 수 있는 효율적인 방법으로 인식되어왔다(3, 4, 8, 10). 그러나 하나 이상의 primer pair를 사용하는 다중 중합효소 연쇄반응에서는 primer dimer의 형성과 교차반응과 같은 원하지 않는 반응에 의한 비특이적인 위양성 증폭 산물이 형성되기 쉽다(2, 6, 15, 16, 24). 그러므로 다중 중합효소 연쇄반응에서 나

타날 수 있는 비특이적 반응을 억제 또는 제거하기 위해서는 반응 조건의 최적화가 필수적으로 요구된다(9, 10, 23).

다중 중합효소 연쇄반응을 위한 모든 primer pair는 각각의 표적에 대한 증폭 효율성이 유사하여야 한다. 즉, PCR 반응의 증폭 감도 및 특이성에 있어 primer의 선택이 가장 중요한 요소다. 또한 반응액의 성분, dNTP 그리고 중합효소 농도와 같은 요소들이 PCR 반응에 영향을 준다. 그러므로 이를 위해서 각각의 primer들은 최적의 GC 함량을 지니는 물론 거의 동일한 annealing 온도를 가지며 primer 자체 내에 또는 이들 primer 사이에는 염기서열의 유사성 및 상보적 결합이 적어야 한다(7, 9). 그리고 반응물에 dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol, bovine serum albumin (BSA) 또는 betaine과 같은 물질을 첨가하여 증폭과정에서 주형의 DNA에서 이차구조가 형성되어 DNA polymerization이 방해되는 것을 억제함으로써 다중 중합효소 연쇄반응의 효율을 증대시키기도 한다(11, 12, 18).

다양한 DNA 바이러스를 검출하기 위한 다중중합효소 검출법이 바이러스의 subtype과 분석할 시료별로 보고되어 왔다. 예를 들어 척수액에서 varicella-zoster 바이러스(VZV), herpes simplex 바이러스(HSV), CMV 및 EB 바이러스 등(22)과 점막조직에서 HSV와 VZV의 동시검출법(13)이 보고된바 있다. 생체세포에 감염을 일으키는 DNA 바이러스 4종 B19, CMV, EBV, HBV 등은 세포괴사나 종양을 일으킬 수 있는 바이러스로 인류건강에 위해 요인으로 작용해 왔다. 그러므로 본 연구에서는 B19, CMV, EBV, HBV와 같은 DNA 종양 바이러스를 혈액을 포함하는 생체시료에서 효율적으로 검출할 수 있는 다중 중합효소 연쇄반응법을 확립하고자 하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-43-261-2817, Fax: 82-43-268-2732
E-mail: songs@chungbuk.ac.kr

재료 및 방법

바이러스 DNA의 추출

중합효소연쇄반응을 수행하기 위하여 Puregene DNA purification kit (Gentra, USA)을 사용하여 EBV, CMV, HBV, B19 등의 genomic DNA를 추출하였다. 필요에 따라 spin column (Highpure Viral Nucleic Acid Extraction Column, Roche Diagnostics, Germany) 등으로 추출한 DNA를 핵산분해효소가 없는 멸균 D.W. (0.05% NP-40 포함)로 elute하고, spectrophotometry 정량 방법을 이용하여 양과 순도를 결정하였다. 사용하기 전까지는 -20°C에서 보관하였다가 PCR 반응에 시료로 사용하였다.

Primer의 설계 및 제작

먼저, 개별 바이러스에 대한 PCR 반응을 수행하기 위하여 하나의 시험관에서 수행되는 다중 중합효소 연쇄반응에서도 특이적으로 EBV, CMV, HBV 와 B19 virus의 증폭이 가능한 primer pair를 합성하였다(Table 1). B19-F, B19-R, EBV-F, EBV-R, CMV-F, CMV-R, HBV-F, HBV-R 등의 primer가 증폭되는 염기 서열 사이에 유사성을 최소화하고 자체내의 base-pairing이 이루어지지 않으며 비특이적 반응을 억제할 수 있도록 각 바이러스 genome 염기서열을 분석하여 높은 Tm값을 갖는 8개의 primer를 고안하였다. 각 primer는 B19의 ns 유전자에 결합하는 B19-F와 B19-R primer, EBV의 pol 유전자에 결합하는 EBV-F와 EBV-R primer, CMV의 pol 유전자에 결합하는 CMV-F와 CMV-R 그리고 HBV의 pol 유전자를 targeting 하는 HBV-F와 HBV-R이다 (Table 1).

바이러스 DNA의 증폭 및 반응산물의 확인

바이러스 DNA의 증폭을 위한 PCR반응은 1× PCR buffer, 각각 200 μM의 deoxynucleotide triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dUTP)와 바이러스 종에 따라 특이적인 20 pmole씩의 forward 및 reverse primer pair, 0.5 U의 Taq polymerase (Solgent, Korea)를 가한 후 25 μl가 되도록 멸균증류수를 가하여 수행하였다. 이 때 바이러스로부터 추출, 정제된 viral DNA 0.1 μg를 주형으로 사용하였고, GeneAmp PCR system 2700 (ABI PCR system, PE Applied Biosystems, USA) PCR 장비를 이용하였다.

CMV, EBV, HBV의 viral 유전자를 증폭하기 위하여 각각의 pol 유전자에 결합하는 CMV-F와 CMV-R, HBV-F와 HBV-R, EBV-F와 EBV-R primer pair를 사용하였고, B19은 B19의 ns 유전자에 결합하는 B19-F와 B19-R primer pair를 사용하여 각각의 viral gene에 대한 PCR 반응을 수행하였다(Table 1). PCR 반응의 반응시간 및 온도조건은 다음과 같다. 50°C에서 3분, 95 °C에서 2분간 pre-incubation하고 95°C 20초, 68°C 1분을 40회 반복한 후 72°C에서 3분 더 반응시켰다. 증폭된 viral DNA의 확인을 위하여 PCR 산물의 일부를 2% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide (EtBr)로 염색하여 UV transilluminator로 증폭여부를 확인하였다. 또한 필요할 경우 염기서열을 dideoxynucleotide법으로 결정(Solgent, Korea)하여 반응물의 진위를 최종 확인하였다.

유전자의 cloning

증폭된 바이러스 유전자의 확보의 확인을 위하여 PCR 반응에 의해 증폭시킨 4종의 viral 유전자 단편을 Topo TA Cloning kit (Invitrogen, USA)를 사용하여 제한효소 처리과정 없이 cloning 하였다. pCR2.1 vector와 PCR 반응의 증폭 산물을 일정한 비율 (end mole ratio = 1:3)로 넣은 후 실온에서 10분간 반응 시킨 후 5 μl의 반응물을 50 μl의 대장균과 혼합한 후, 42°C 에서 30 초간 배양하였다. 형질전환된 반응물에 항생제가 포함되지 않은 LB broth를 45 μl 넣은 후 37°C 에서 1시간 배양한다. 배양 후, 배양액 200 μl를 ampicillin (50 μg/ml), IPTG, X-Gal이 포함된 LB agar plate에 도말하여 37°C 에서 20시간 배양하였다. 1차로 white colony만을 선별하여 colony PCR을 이용해 유전자 삽입 여부를 확인한 후, DNA sequencing을 통하여 삽입된 표적 유전자의 염기서열을 확인하였다. 확보된 바이러스 유전자들은 PCR 조건의 최적화 과정과 다중 중합효소 연쇄반응에서 양성 대조군으로 이용하였다.

다중 중합효소 연쇄반응의 조건

다중 중합효소 연쇄반응을 최적화 하기 위하여 magnesium ion, primer, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dUTP) 농도 및 PCR buffer 조건, DNA polymerase의 종류, cycling condition을 결정 하였으며 재현성 확보를 위하여 template를 제외한 모든 성분은

Table 1. PCR primers designed in this study for detection of viruses by the multiplex PCR

Virus	Target gene	Name	Sequences (5' → 3')	Tm (°C)
B19	ns	B19-F	AGACACTTCTGACTGGGAACCACTAACT	82
		B19-R	CCCAATAACCACATGAATATGATAGCCTT	80
CMV	pol	CMV-F	CCGGGAAACCACGCCGGCGGTACA	84
		CMV-R	CAGCCGTGCGCCAGTCGCGCCTCT	84
EBV	pol	EBV-F	CTTGGAGCAGCTTGTTCGAAATAATGATC	80
		EBV-R	ACGGCCTGCAAGTTTGTGCAGACACG	82
HBV	pol	HBV-F	TATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGT	68
		HBV-R	GGAAAGCCCTACGAACCACTGA	68

2× premix 형태로 혼합하여 사용하였다. 목적하는 EBV, CMV, HBV 와 B19 바이러스 유전자의 증폭을 위하여 각각의 primer 당 20 pmoles/μl가 되도록 Table 1의 8종의 primer를 혼합하여 사용하였다. Premix는 25 μl 반응 기준으로 1× PCR buffer [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂], 각각 200 μM의 deoxynucleotide triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 각각 20 pmoles/μl씩 8종의 primer mixture, 0.5 U Taq polymerase (Solgent, Korea)와 template DNA를 가하여 다중 중합효소 연쇄반응을 수행하였다.

생체 조직에 대하여 본 다중 중합효소 연쇄반응의 특이성이 유지되는지 시험하기 위하여 0.5 g의 minced 생쥐의 간(liver) 조직 또는 건강한 사람의 혈액 5 ml에 cloning한 표적 viral DNA를 각각 100 pg씩 넣고 이 sample로부터 total DNA를 분리, 정제하였다. 이를 molecule 수가 50 copies가 되도록 하여 다중 중합효소 연쇄반응의 주형으로 이용하여 다중 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 또한 다중 중합효소 연쇄반응의 감도를 결정하기 위하여 최적화된 조건에서 각각의 클론된 viral DNA를 10-fold 계열 희석하고 이를 주형으로 사용하여 반응을 수행하였다. 이때 input의 양을 기준으로 환산하여 PCR 반응물에서의 template copy 수를 결정하였으며 다섯 번의 시험결과를 평균하여 감도를 결정하였다.

결 과

Viral DNA의 증폭

중합효소 연쇄반응을 이용하여 EBV, CMV, HBV와 B19 바이러스 genome을 각각 증폭하기 위하여 각각 CMV, EBV와 HBV의 pol 유전자에 결합하는 CMV-F와 CMV-R primer, HBV-F와 HBV-R primer 및 EBV-F와 EBV-R primer, parvovirus B19의 ns 유전자에 결합하는 B19-F와 B19-R primer를 제작하고 각각의 primer pair를 사용하여 반응을 수행하였다(Table 1). Predenaturation 과정은 95°C에서 2분, extension condition을 annealing step과 함께 68°C 1분의 조건으로 수행하였다. 이와 같은 조건으로 PCR반응을 진행한 결과 B19 (175 bp), CMV (350 bp), HBV (262 bp), EBV (470 bp) 모두 예상했던 크기의 증폭산물을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 또한 증폭된 DNA의 염기서열을 분석한 결과 목적하는 유전자와 정확히 일치함을 확인하였다. 따라서 본 시험의 조건하에서 각각의 primer쌍은 표적 유전자와 결합이 가능하고 표적 DNA 부분의 증폭을 위한 목적으로 사용 가능하다고 판단하였다.

다중 중합효소 연쇄반응 조건의 최적화

각각의 개별 조건으로 target virus에 대한 증폭반응이 성공적으로 이루어졌을지라도 개별 바이러스의 증폭 조건이 다르거나, 증폭산물의 크기가 유사하면 하나의 시험관에서 수행되는 다중 중합효소 연쇄반응으로 정확한 결과를 얻기에는 어려움이 있다. 그러므로 반응의 조건을 일부 변형함으로써 비특이적 반응을 최소화 시킨 최적화된 다중 중합효소 연쇄반응조건을 확립하고자

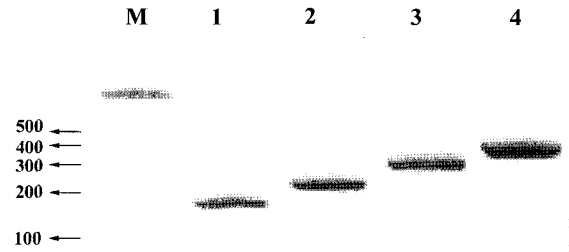


Fig. 1. Amplification of B19, CMV, EBV or HBV viral genomes. PCR was carried out using the primer pair targeting for each of four DNA viruses, as described in Table 1 and 50 copies of each cloned viral DNA were used as template. M, 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen, USA); lane1, B19; lane2, HBV; lane 3, CMV; lane 4, EBV.

하였다(3, 9). 먼저 각 primer를 유사한 Tm값(melting temperature)을 가지도록 함은 물론 primer sequence가 상호 결합하지 못하도록 함으로서 교차반응을 일으키지 않도록 하였다. 특히, extension (72°C)과 annealing (55°C) 과정을 별도로 수행하면 개별 바이러스의 검출에는 별다른 영향이 없었으나 다중반응 수행 시에는 교차반응에 의한 억제현상이 나타났으므로 두 과정을 동시에 수행 가능한 온도인 68°C를 선택하여 중합효소 연쇄반응을 수행하였다(자료 미제시). 이 같은 시험조건하에서 4종의 바이러스에 대한 반응산물이 동일한 비율로 생성됨을 확인하였다(Fig. 2). 따라서 본 시험조건하에서 4종의 primer pair를 이용하여 다중중합효소 연쇄반응을 수행하여 B19, CMV, EBV와 HBV의 동시검출이 가능함을 확인하였다.

다중 중합효소 연쇄반응의 특이성 및 감도

확립한 다중 중합효소 연쇄반응으로 목적하는 바이러스 검출 효율성을 평가하기 위하여 최적화된 cycling 조건에 따라 하나의 시험관에 각각 50 copies의 viral DNA를 주형으로 하고 합성한 8종의 primer pool을 이용하여 다중 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 반응물의 일부를 2% agarose gel에서 전기영동 하여 분석한 결과 각 개별 바이러스에 대한 PCR반응을 수행한 결과와 마찬가지로 다중 중합효소 연쇄반응 조건에서도 각각의 바이러스 유전자가 모두 효율적으로 증폭됨을 확인하였다(Fig. 2 and 3).

또한 생체 조직을 시료로 이용하였을 때 본 다중 중합효소 연쇄반응의 특이성이 유지되는지 시험하고자 재료 및 방법에서와 같이 준비한 혈액 시료에 viral genome을 spiking하고 이를 주형으로 하여 동일한 조건으로 다중 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 이 때 음성대조군으로서 viral genome을 spiking 하지 않은 시험관을 함께 반응시켰다. 그 결과 사람의 혈액과 같은 생체시료를 대상으로 하여도 정제된 viral DNA를 대상으로 다중 중합효소 연쇄반응을 수행한 결과와 마찬가지로 매우 특이적으로 viral genome을 증폭할 수 있었다(Fig. 2). 또한 확립한 다중 중합효소 연쇄반응의 감도를 결정하기 위하여 각각의 클론된 viral

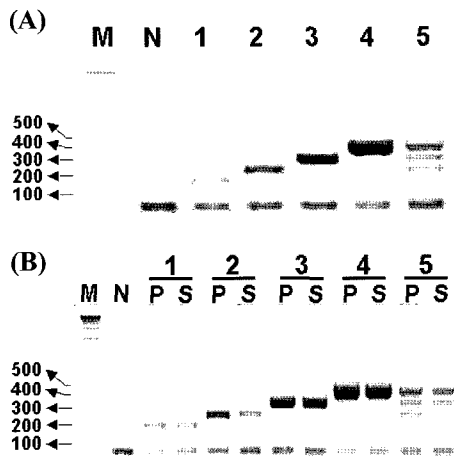


Fig. 2. Specific amplification of viral genomes by multiplex PCR. The multiplex PCR was carried out using the primer pool (B19-F and R for B19, HBV-F and R for HBV, CMV-F and R for CMV, EBV-F and R for EBV). (A) 1 µg of total DNA from human blood cell was spiked with 0.1 µg of cloned viral DNA. After purification, 50 copies of viral DNA were used as PCR template. (B) 50 copies of cloned viral DNA purified from mouse liver tissue after spiking (S) or non-spiked (P) were used as PCR template. M, 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen, USA); N, No viral DNA; lane 1, B19; lane 2, HBV; lane 3, CMV; lane 4, EBV; lane 5, B19+HBV+CMV+EBV.

DNA를 10-fold 계열 희석하고 이를 주형으로 사용하여 반응을 수행한 결과 음성 대조군에서는 어떠한 반응물도 생성되지 않았고 B19, CMV, EBV, HBV 각 개별 바이러스 유전자는 모두 5-10 copies 까지 유의성 있게 증폭되었다(Fig. 3). 더욱이 사람의 혈액 또는 생쥐 간의 마쇄 조직에 spiking한 시료를 사용하였을 때도 유사한 수준의 검출감도를 유지하였다(자료 미제시). 그러므로 본 연구에서 설정한 다중 중합효소 연쇄반응은 생체시료에 대해서도 그 반응의 특이성이 뛰어난 바이러스 진단 방법으로 이용할 수 있을 것이라고 판단된다.

고 찰

생체 조직에서 바이러스의 검출은 개별 바이러스에 대한 배양 분리법 및 유전자 증폭법이 이용되어 왔지만 다중중합효소 검출법의 이용은 여러 종의 동시검출을 가능케 함으로서 효율적 검출을 가능케 하였다. 또한 환자의 생검 시료를 대상으로 바이러스를 검출할 경우 시료는 소량의 혈액은 물론 조직세포를 포함하므로, 혈액감염 바이러스와 조직세포 감염 바이러스의 동시검출이 바람직하다. 특히, 조직이식환자의 경우 CMV는 활성화되어 혈액 내에서 발견되기도 한다. 따라서 본 연구에서 수행한 4종의 바이러스 동시 검출법은 검출감도와 시험의 효율성을 근거로 할 때, 생검 시료의 바이러스 검출법으로 유용하다고 판단된다.

바이러스 진단법으로는 전자현미경을 이용한 방법, 바이러스

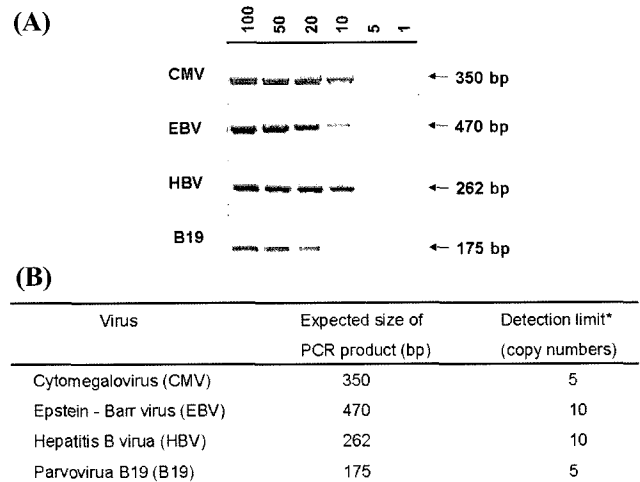


Fig. 3. Determination of sensitivity under the condition of the multiplex PCR. Each clone of viral DNA were serially diluted and subjected to the multiplex PCR analysis with the each primer pairs, as described in Table 1. (A) The numbers above each lane describe the copy numbers of the viral DNA used as a template. (B) Expected size of products and detection limits were determined by the multiplex PCR. Detection limits are the means from five independent experiments.

항원을 검출하는 형광항체염색법, 효소 면역 흡착법(ELISA) 및 방사선 면역분석법, 바이러스 특이 항체를 검출하는 혈청학적 진단법, 바이러스 핵산을 검출하는 hybrid 형성법 등을 이용되어 왔으나 이들은 감도와 정확도가 떨어지며 경우에 따라 방사성 물질을 사용해야 하고 많은 시간과 노력이 요구된다는 단점이 있다(1, 20). 더욱이 감염초기에는 감염원의 개체수가 적고 이에 의한 항체의 생성이 불완전하므로 바이러스 진단 방법으로 효과적이지 못하다. 최근에는 분자생물학적 실험기법의 발전으로 인해 간단하면서도 높은 감도와 특이성을 가지는 중합효소연쇄반응(PCR)이 바이러스 진단법으로 자리를 잡고 있다(14, 21, 28). 하지만 정확한 시험을 위해서는 충분한 양의 시료가 요구되며 또한 생체재료의 진단이나 임상시험에 이용하기 위해서는 PCR법의 단점을 해결하기 위해서는 단일반응으로 여러 바이러스를 동시에 증폭할 수 있는 다중 중합효소 연쇄반응기법이 효율적이다(8, 17).

다중 중합효소 연쇄반응은 시험관에서 단일 시험과정으로 여러 target 유전자를 증폭하는 기법으로써 각 target에 대하여 높은 특이성을 지녀야 하며, PCR 반응의 특이성과 정확성이 수반되어야 함은 물론 여러 target에 대한 반응물 사이에 교차반응이 없도록 하는 것이 중요하다. 또한 검출 바이러스의 용이한 확인을 위하여 각 반응물의 크기가 전기영동 후 잘 분리되도록 하여야 한다. 이와 같은 사항을 고려하여 Table 1에서와 같은 primer pair를 설정하고 몇 번의 시행착오를 거쳐 네 종의 바이러스 모두 검출 가능한 thermo cycling 조건을 확립하였다(9, 10, 23). 특히, 본 연구에서는 annealing과 extension을 68°C에서 수행하는 2단계 반응으로 유전자 증폭 반응을 수행함으로써 primer의 결합

특이성을 증가시키고 교차반응을 최소화하였다.

최적화된 조건에 따라 단일 시험관에서 PCR 반응을 수행한 결과 각각에 대한 개별 반응을 수행하였을 때와 마찬가지로 B19, CMV, EBV, HBV 모두 특이적으로 증폭되었다(Fig. 1 and 2). 또한 생체조직에 대해서도 다중 중합효소 연쇄반응의 특이성이 유지되는지 알아보기 위하여 생쥐의 간(liver) 조직과 인간 혈액 시료에 각각 50 copies의 viral genome을 spiking하고 total DNA를 정제하여 이를 주형으로 같은 조건에서 다중 중합효소 연쇄반응을 수행한 결과 정제한 바이러스 DNA를 이용하였을 때와 마찬가지로 유의성 있게 증폭되었다(Fig. 2). 그러므로 본 연구에서 확립한 네 종의 바이러스에 대한 다중 중합효소 연쇄반응은 생체 시료를 이용한 바이러스의 검출 진단법으로 응용 가능한 방법이라 할 수 있다. 또한 본 시험방법의 감도는 약 5-10 분자수의 viral genome까지 증폭이 가능한 매우 민감한 시험방법임을 확인하였다(Fig. 3). 그러므로 단일 시험으로 특이적이고도 높은 감도로 검출이 가능한 본 연구의 결과는 HBV, EBV, CMV, B19 바이러스에 대한 진단법으로써 가치가 있으며 생검시료와 같은 임상검체에 적용이 가능할 것이라고 사료된다.

감사의 말

이 논문은 2005학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음(This work was supported by the research grant of the Chungbuk National University in 2005).

참고문헌

- Anderson, M.J., S.E. Jones, and A.C. Minson. 1985. Diagnosis of human parvovirus infection by dot-dot hybridization using cloned viral DNA. *J. Med. Virol.* 15, 163-172.
- Brownie, J., S. Shawcross, J. Theaker, D. Whitcombe, and R. Ferrie. 1997. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Res.* 25, 3235-3241.
- Burgart, L., R. Robinson, M. Heller, W. Wike, O. Iakoubova, and J. Chenville. 1992. Multiplex polymerase chain reaction. *Mod. Pathol.* 5, 320-323.
- Chamberlain, J.S., R.A. Gibbs, J.E. Ranier, P.N. Nguyen, and C.T. Caskey. 1990. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy, p. 38-46. In Gelfand, D.H., M.A. Innis, J.J. Shinsky, and T. J. White (ed), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, Calif, USA
- Chamberlain, J.S., R.A. Gibbs, J.E. Ranier, P.N. Nguyen, and C.T. Caskey. 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16, 11141-11156.
- DeFillippes, F.M. 1991. Decontaminating the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 10, 26-29.
- Dieffenbach, C.W., M.J. Lowe, and G.S. Dveksler. 1993. General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl.* 3, S30-37.
- Edwards, M.C. and R.A. Gibbs. 1994. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods Appl.* 3, S65-75.
- Elnifro, E.M., A.M. Ashshi, R.J. Cooper, and P.E. Klapper. 2000. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 559-570.
- Henegariu, O., N.A. Heerema, S.R. Dlouhy, G.H. Vance, and P.H. Vogt. 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques* 23, 504-511.
- Hengen, P.N. 1997. Optimizing multiplex and LA-PCR with betaine. *Trends Biol. Sci.* 22, 225-226.
- Jackson, R., D.J. Morris, R.J. Cooper, A.S. Bailey, P.E. Klapper, and G.M. Cleator. 1996. Multiplex polymerase chain reaction for adenovirus and herpes simplex virus in eye swabs. *J. Virol. Methods* 56, 41-48.
- Jain, S., D. Wyatt, C. McCaughey, H.J. O'Neill, and P.V. Coyle. 2001. Nested multiplex polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous herpes simplex and herpes zoster infections and a comparison with electronmicroscopy. *J. Med. Virol.* 63, 52-56.
- Jin, L., A. Richards, and D.W.G. Brown. 1996. Development of a dual target-PCR for detection and characterization of measles virus in clinical specimens. *Mol. Cell. Probes* 10, 191-200.
- Kitchin, P.A., A. Szotyori, C. Fromholz, and N. Almond. 1990. Avoidance of false positive. *Nature* 344, 201.
- Kwock, S. and R. Higuchi. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339, 237-238.
- Markoulatos, P., A. Georgopoulou, N. Sifakas, E. Plakokefalos, G. Tzanakaki, and J. Kourea-Kremastinou. 2001. Laboratory diagnosis of common Herpesvirus infections of the central nervous system by a multiplex PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 39, 4426-4432.
- McElhinney, L.M., R.J. Cooper, and D.J. Morris. 1995. Multiplex polymerase chain reaction for human herpesvirus-6, human cytomegalovirus, and human β -globin DNA. *J. Virol. Methods* 53, 223-233.
- McOmish, F., P.L. Yap, A. Jordan, H. Hart, B.J. Cohen, and P. Simmonds. 1993. Detection of parvovirus B19 in donated blood: a model system for screening by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31, 323-328.
- Mori, J., A.M. Field, J.P. Clewley, and B.J. Cohen. 1989. Dot blot hybridization assay of B19 virus DNA in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 27, 459-464.
- Myerson, D., P.A. Lingenfelter, C.A. Gleaves, J.D. Meyers, and R.A. Bowden. 1993. Diagnosis of cytomegalovirus pneumonia by polymerase chain reaction with archived frozen lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid. *Am. J. Clin. Pathol.* 100, 407-413.
- Quereda, C., I. Corral, F. Laguna, M.E. Valencia, A. Tenorio, J.E., Echeverria, E. Navas, P. Martin-Davila, A. Moreno, V. Moreno, J.M. Gonzalez-Lahoz, J.R. Arribas, and A. Guerrero. 2000. Diagnostic utility of a multiplex herpesvirus PCR assay performed with cerebrospinal fluid from human immunodeficiency virus-infected patients with neurological disorders. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3061-3067.
- Roux, K.H. 1995. Optimization and troubleshooting in PCR. *PCR Methods Appl.* 4, S185-194.
- Sarkar, G. and S.S. Sommer. 1991. Parameters affecting susceptibility of PCR contamination to UV inactivation. *BioTechniques* 10, 590-594.
- Sherlock, J., V. Cirigliano, M. Petrou, B. Tutescheck, and M. Adinolfi. 1998. Assessment of diagnostic quantitative fluorescent multiplex polymerase chain reaction assays performed on single cells. *Ann. Hum. Genet.* 62, 9-23.
- Shuber, A.P., J. Skoletsky, R. Stern, and B.L. Handelin. 1993. Efficient 12-mutation testing in the CFTR gene: a general model for

- complex mutation analysis. *Hum. Mol. Genet.* 2, 153-158.
27. Suzuki, M.T. and S.J. Giovannoni. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 625-630.
28. Vangrysperre, W. and K. DeClercq. 1996. Rapid and sensitive polymerase chain reaction based detection and typing of foot-and-mouth disease virus in clinical samples and cell culture isolates, combined with a simultaneous differentiation with other genomically and/or symptomatically related viruses. *Arch. Virol.* 141, 331-344.

(Received January 24, 2007/Accepted February 27, 2007)

ABSTRACT : Simultaneous Detection of Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, Hepatitis B Virus, and Parvovirus by a Multiplex PCR

Hyeran Sung, Jin Young Joo, Chong-Kil Lee, Yeon Bok Chung, and Sukgil Song* (College of Pharmacy, Chungbuk National University, 12 Gaeshindong, Cheongju, 361-763, Korea)

We describe a multiplex PCR method that can detect and differentiate simultaneously four different kinds of DNA viruses, Epstein-Barr virus (EBV), cytomegalovirus (CMV), hepatitis B virus (HBV) and parvovirus B19 (B19). Primers for the multiplex PCR reaction were designed to amplify specific regions of the EBV (pol), CMV (pol), HBV (pol) and B19 (ns) viral genomes and used to simultaneously detect individual viruses. In order to achieve optimal sensitivity and specificity for multiplex PCR, the thermo-cycling parameters, primer sequences, and concentration of each reaction components were optimized systematically. The sensitivity of the detection method ranged between 5 and 10 copies of viral genome with a mixture of multiple primer pairs. Furthermore, this highly sensitive test showed no cross-reactivity among the four viruses. Thus, the results obtained in this study provide evidence that the assay system is a good tool for supporting the diagnosis of viral infection and contamination.