

중합효소 연쇄반응을 이용한 결핵균의 증명(I)

신 완 식 / 가톨릭대학 의학부 내과학교실

결핵은 아직도 우리나라에서 해마다 약 16만명의 새로운 환자가 발생하며 특히 사회적으로 활동력이 있는 연령층인 20-64세 사이의 유병률은 2.7%에 이르고 있다.

결핵의 진단방법은 항산상균(acid fast bacilli; AFB)이 검출되면 큰 도움을 주지만 *Nocardia*나 일부의 *Corynebacterium*에서도 양성반응을 보이는 수가 있어 추정진단에 불과하고 예민도가 낮아 10^4 /ml 이상의 균이 존재하여야 한다. 배양 검사법은 양성으로 나타나면 특이도는 100%에 이르나 동정을 해야하는 번거로움이 있고 3-6주 이상의 배양시간이 소요될 뿐 아니라 균수가 적을 때는 여러번 반복하지 않으면 안된다. 배양 시간을 단축시키기 위해 BACTEC System을 이용하여 ^{14}C labeled palmitic acid를 측정하는 검사도 10-12일간이 소요된다. 혈청학적 검사 중 많이 사용되는 효소결합면역흡착검사(ELISA)도 예민도가 낮아 사용하기 어려울 뿐 아니라 우리나라와 같이 결핵 환자가 많

은 지역인 경우에는 양성이라 하더라도 결핵이라고 확진하기는 어렵다. 그외에 복막염, 뇌막염, 늑막염 등에서는 세포면역반응 중 림프구나 대식세포에서 나오는 adenosine deaminase의 활성도를 측정하여 결핵으로 진단 붙이기도 하나 앞으로 좀 더 추구해 보아야할 필요가 있다.

최근 의학분야에서 분자 생물학의 발전은 감염질환의 진단에도 새로운 방법론으로 등장되어 있으며 특히 DNA 탐식자(probe)를 보편적으로 사용할 수 있게 됨에 따라 좀 더 신속한 진단이 가능하게 되었다. DNA 탐식자를 이용하여 검출하는 방법중에서는 교잡(hybridization) 방법이 흔히 사용되고 있으며, 동위원소가 label된 탐식자로 검정할 경우 매우 예민도가 높아 target DNA의 양이 1pg수준에서도 검출할 수 있으나 동위원소를 이용한 탐식자들은 오랫동안 보관하기 어렵고 폐기물 처리에 번거로움이 있으며, 자가 방사 사진술로 확인하기까지의 많은 장비와 시간소요 등의

문제점들이 뒤따른다. 최근 동위원소를 사용하지 않고 biotinylated probe나 chemiluminescence를 이용한 탐식자 등으로 검출하고 있으나 동위원소가 label된 탐식자에 아직 미치지 못하고 있고, 임상검체에 존재하는 단백질이나 탄수화물들이 hybridization 반응에 영향을 미치기 때문에 임상검체에서 직접 증명하는 것은 예민도가 훨씬 떨어진다. 또한 target DNA가 미량일 경우에는 이상의 방법으로 검출할 수 없기 때문에 이를 극복하기 위하여 세균을 사용하지 않고 단시간 내에 시험관 내에서 손쉽게 원하는 유전자의 제한된 부위를 증폭시킬 수 있는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; 이하 PCR)이 1985년 Saiki 등에 의해 처음 소개된 이래 그 방법이나 응용범위가 매우 빠른 속도로 발전되고 있다.

따라서 PCR을 이용한 결핵균의 증명 및 동정에 대한 이해를 돕기 위해 PCR의 일반적인 방법을 먼저 소개하고자 한다.

PCR을 시행하기 위해서는 여러가지 방법이 있으나 기본적인 방법은 target DNA의 양쪽끝을 인접하는 염기 배열에 상응하는 두 종류의 5'와 3' single-stranded oligonucleotides(primers)와 각종 deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP), 그리고 *Thermus aquaticus*에서 분리된 Taq DNA polymerase가

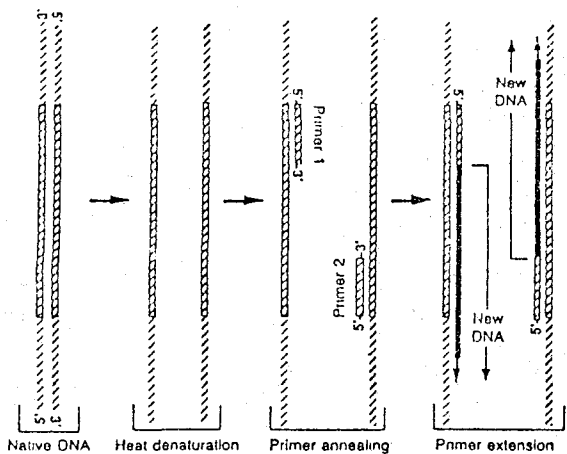


그림 1. 중합효소 연쇄반응 1 단계

필요하며 이들을 이용하여 3가지 단순반응을 계속적으로 반복하여 DNA양을 증폭하게 된다(그림 1).

첫 과정은 heat denaturation과정으로 검체에 존재하는 ds DNA를 고온(90-95℃)으로 올리면 수소결합이 깨져 ss DNA로 된다. PCR의 큰 장점은 target DNA가 순수하지 않아도 되고 많은 양이 필요하지도 않다는 점이며, 1개의 target DNA 분자만 있어도 증폭이 가능하므로 대단히 예민도가 높다. 둘째 과정은 primer annealing과정으로 고온에서 40-60℃로 온도를 낮추면 2 종류의 primers들이 target DNA의 반대편에 있는 상보적 염기배열(complementary sequences)에 annealing이 이루어지게 된다. 이러한 primers들은 서로 annealing 되어서는 안되며 새로운 DNA를 합성할 수 있도록 충분히 거리를 유지하여야 한다. 셋째 과정은 70-75℃에서 Taq polymerase로 dNTP를 이용

하여 각 annealed primer가 extension 되어 새로운 DNA를 합성하는 과정이다.

PCR의 중요한 점은 전에 만들어졌던 모든 DNA가 새로운 DNA 합성의 templates로 작용하게 되므로 연쇄반응(chain reaction)이 일어나는 것이다. 이러한 과정은 자동 thermocycling heating block이 도입되어 보통 30회의 온도변환이 이루어지는데 횟수가 진행됨에 따라 primers와 dNTP는 고갈되고 새로운 DNA strand 수는 늘어나게 된다(그림 2). PCR이 성공하기 위해서는 원하는 short products(동일한 ds DNA)의 수가 기하학적으로 증가(geometric expansion)해야 하며, 이러한 short products들은 3회의 온도변화 이후에 나타나게 된다. 반면에 single stranded long products의 수는 산술학적 증가(arithmetic expansion)만 이루어지기 때문에 이러한 선택적합성의 결과로 PCR의 온도변화 횟수가 모두 끝날때면 거

의 대부분 short products만 남게 된다.

PCR로 증폭후의 분석 또한 중요한데 시료를 동위원소가 label된 탐식자로 검정할 경우 단순한 ethidium bromide 염색보다 예민도와 특이도가 높은 장점이 있으나 상기한 동위원소 취급에 따른 여러가지 문제점등을 해결하고 유사한 예민도와 특이도를 얻기 위해 최근에는 nested primer를 이용한 이중 PCR이 시도되기도 한다. 따라서 target DNA의 염기배열을 모를 경우에는 gene cloning이 선택적 방법이 될 수 있겠지만 primer만 만들수 있다면 PCR 방법으로 순수하지 못한 미량의 DNA로 부터 많은 양을 쉽게 빠른 속도로 증폭시킬 수 있기 때문에 앞으로 크게 각광 받을 전망이다.

그러나 PCR도 만능은 아니며 PCR의 단점은 첫째, 찾기자 하는 유전자 부

의 각 sequence를 정확히 알고 있어야 하며, 둘째, PCR의 예민도가 너무 높다는 것이 오히려 임상진단에 혼동을 줄 가능성도 있고, 이미 증폭된 DNA나 양성시료에 의해 오염(contamination)되어 위양성(false positive)이 나올 수 있으므로 매우 유의하여야 한다. 셋째, 각 primer가 annealing되고 extension되는데 온도, 온도 변환시간, primer 농도, Mg^{++} 농도, 효소 및 DNA의 양에 따라 차이가 나게 된다는 점이다. 卍

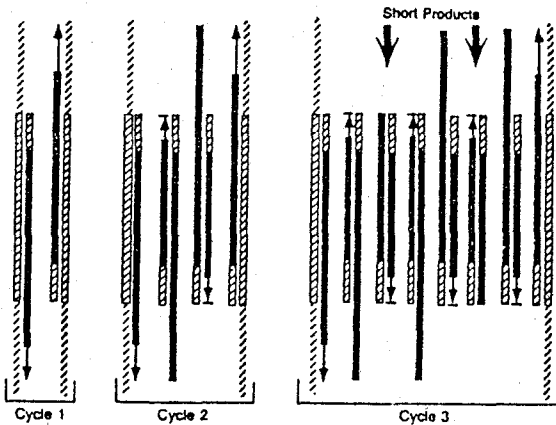


그림 2. 중합효소 연쇄반응 1주기에서의 생산물