

Polymerase Chain Reaction (PCR)을 이용한 결핵의 진단에 관한 연구

서울대학교 의과대학 내과학교실

김 호 중 · 김 영 환 · 한 성 구
심 영 수 · 김 건 열 · 한 용 철

= Abstract =

Application of Polymerase Chain Reaction (PCR) to the Diagnosis of Tuberculosis

Ho-Joong Kim, M.D., Young Whan Kim, M.D., Sung Koo Han, M.D.
Young-Soo Shim, M.D., Keun-Youl Kim, M.D. and Yong Chol Han, M.D.

Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Since its development by Saiki et al, polymerase chain reaction (PCR) has been very useful in various fields of molecular biology. PCR can be used for the detection of a very small amount of microbial agent, and is especially useful in those patients who are difficult to diagnose microbiologically or serologically. Mycobacterium tuberculosis is a very slowly growing organism and AFB staining frequently shows false negative results, and therefore PCR would be a very rapid, easy, and sensitive diagnostic method for the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis.

Method: To compare PCR with conventional methods in diagnosing Mycobacterium tuberculosis in sputum, we used sputa of patients who visited or were admitted to Seoul National University Hospital. The amplification targets were 383 base pair DNA, a part of 2520 base pair DNA encoding 65 kD Mycobacterium tuberculosis specific protein (the primers are TB-1, -2), and 123 base pair DNA, a part of IS6110 fragment, which multiple copies are known to exist per one genome (the primers are Sal I-1, -2). We also requested AFB staining and culture to the lab of Seoul National University Hospital with the same sample and compared the results.

Results:

1) Using TB-1, -2 primers, PCR was positive in 73.1% (19/26) of culture positive sputa, in 12.5% (1/8) of culture negative, but clinically diagnosed tuberculous sputa, and was negative in all sputa of patients who were clinically diagnosed as non-tuberculous etiology.

2) Using Sal I-1, -2 primers, PCR was positive in 94.1% (32/34) of culture positive sputa, in 23.1% (6/26) of culture negative, but clinically diagnosed tuberculous sputa, and was negative in 87.5% (14/16) of sputa from patients who were clinically diagnosed as non-tuberculous etiology.

Conclusion: PCR could be a very rapid, sensitive and specific method for the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis in sputa, and further studies should be followed for the development of easier method.

Key Words: PCR, Mycobacterium tuberculosis, Sputum

서 론

1985년 Saiki등에 의해, 특정한 DNA를 연속적으로 복제할 수 있는 방법인 polymerase chain reaction (PCR)이 개발된 이래¹⁾, PCR은 분자 생물학의 여러 분야에서 매우 유용한 방법이 되어 왔다. PCR은 검체내에 극미량으로 존재하고 있는 병원체의 진단에도 이용될 수 있으며, 이는 특히 기존의 미생물학적, 면역 혈청학적 방법으로 진단이 어려운 병원체의 진단에 큰 도움을 줄 것으로 기대되었다. 결핵균의 진단 방법은 항산성 균주의 도말 염색 및 배양이 있는데, 도말 염색 방법은 감수성이 낮아서 문제가 되고 있으며, 배양은 감수성은 높으나 기간이 오래 걸려서 임상적으로 도움을 주지 못하는 경우가 많다.

PCR을 이용하여 결핵균을 진단하는 방법은 Brisson 등²⁾이 1989년 *Mycobacterium species*의 특이 단백질인 65kD Mycobacterial Antigen³⁾을 encoding 하는 2520 base pair 유전자의 일부인 383 base pair DNA를 TB-1, TB-2로 명명한 primer로 시행한 이래, Shankar⁴⁾, Pao⁵⁾, Hermans⁷⁾, De Wit⁸⁾등이 보고한 바 있으며 Eisenach⁹⁻¹⁰⁾, Hermans¹¹⁾, Patel¹²⁾등은 소위 IS family gene의 PCR까지도 발표한 바 있다.

이러한 여러 연구자의 발표들은 임상 검사물을 사용하여 임상에 응용한 것이라기 보다는, 배양된 결핵균을 사용하여 특이성을 갖는 primer의 발견에 주안점을 둔 것으로서 임상 검사물에서의 적용은 대개 10례 내외이었다. 또한 국내에서도 PCR을 이용한 결핵균의 진단에 대해 여러 연구소에서 실험이 진행중이며 윤¹⁴⁾등은 매우 높은 감수성을 보고한 바 있다.

이에 본 연구자들은 PCR을 이용하여 환자의 객담에서 결핵균을 조기 진단하는 방법을 개발하고자 연구를 하였으며¹³⁾ 이상의 결과를 실험 과정과 함께 보고하는 바이다.

대상 및 방법

1. 대 상

1) 결핵균주

본 연구의 감수성과 특이성을 증명하기 위하여 배양된 표준 균주를 사용하였다. 즉 특이성을 증명하기 위하여

Mycobacterium tuberculosis 균주로서 H37Rv (ATCC 27294)와 H37Ra (ATCC 25177)를, non-tuberculous *Mycobacterium* 중으로는 *Mycobacterium intracellulare* (ATCC 13950)와 *Mycobacterium bovis* (ATCC 19210), *Mycobacterium scrofulaceum* (ATCC 19981)를 사용하였고 감수성을 증명하기 위하여서는 H37Rv 균주에서 분리한 DNA를 순차적으로 회석하여 사용하였다.

2) 임상 검체

임상적, 방사선학적으로 진단된 환자의 객담을 사용하였으며 동일 검체를 항산균 도말 검경 및 배양을 서울 대학교병원 결핵 검사실에 의뢰하여 시행하였다. 객담은 도말검경 양성군, 도말검경 음성-배양 양성군 및 도말 검경 음성-배양 음성군으로 분류하여 각군의 PCR을 시행하였다. 또한 음성 대조군 검체로서 결핵력이 없는 환자의 객담을 사용하여 PCR을 시행하였다.

2. 방 법

1) 객담의 처리

통상적으로 항산균의 도말 검경 및 배양을 위하여 처리하는 방법을 사용하였다. 즉 객담통에 채취한 객담에 4% Sodium hydroxide 용액 10 ml를 넣고, 5분후 15 ml 시험관에 붓고 Vortex mixer에 다 녹을 때까지 진탕하였고 3000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 pellet을 재용해하여 사용하였다.

2) DNA의 추출

Hurley등¹⁸⁾의 방법을 수정하여 DNA를 추출하였다. 즉 2 ml screw-tube에 위의 방법으로 처리한 검체 200 μ l를 1 ml 주사기로 무균적으로 넣은 후, 0.1 mm Zirconium Bead 200 μ l, TEN solution 100 μ l, PCI solution 100 μ l를 넣고, mini-Bead beater에서 3분간 처리하여 세포를 파괴함과 동시에 단백질을 변성시켰다. 이때 오염에 의한 위양성의 가능성을 배제하기 위하여 멸균 3차 증류수를 검체와 같이 실험하여 음성 대조군으로 삼았다. 검체를 3000 rpm으로 5분간 원심분리한 후, 투명한 상층액 200 μ l를 새 micro-tube에 옮기고 CI solution 200 μ l를 넣고 30초간 서서히 흔든 다음, 다시 3000 rpm으로 5분간 원심분리하였고 상층액을 새 micro-tube에 옮겼다. 이에 3M Sodium Acetate 10 μ l를 넣은 후, 100% 냉동 Ethanol 220 μ l를 넣고, -70°C 냉동고에 15분 이상 둔후 10000 rpm으로 10분간 원심분

리한 다음, 상층액을 vaccum suction을 이용하여 제거한 후, 냉동건조기에서 완전히 건조시켰다. 통상의 이러한 방법이, 특히 결핵균이 다수 포함된 검체에서, 결핵균 세포막에 다량으로 함유된 다당질에 의하여 DNA간의 hybridization이 방해받는다라는 것을 실험중 발견하였으므로(Fig. 1)¹³⁾, 이를 막기 위하여 Darby등¹⁷⁾의 방법을 변형하여 검체를 재처리하였다. 즉, 위의 검체에 0.4 M Sodium Chloride 500 μ l, 5% CTAB solution 200 μ l를 넣고 가볍게 흔들어 섞고, 3000 rpm으로 15초간 원심분리한 후 실온에 15분간 둔 다음, 5% CTAB solution 100 μ l를 더 넣고 가볍게 섞은 후, 10000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 vaccum suction을 이용하여 제거한 후, 1M Sodium Chloride 500 μ l를 넣고 10000 rpm으로 10분간 원심분리하고, 상층액 200 μ l를 새 micro-tube에 옮긴 후, 이를 위에 기술한 CI solution, Ethanol precipitation 방법으로 다시 처리하여 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 멸균 3차 증류수 100 μ l에 용해시켰고 -20°C에 보관하였다.

3) PCR을 이용한 DNA의 복제

검체 및 반응액은 검사당 각각 50 μ l로 하였으며, PCR의 음성 대조군으로는 또 하나의 멸균 3차 증류수 검체와 같이 실험하였다. 반응액은 검체당, 멸균 3차 증류수 13.5 μ l, 10배 reaction buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl:pH 8.3, 24 mM MgCl₂, 1 mg/ml gela-

tin) 10 μ l, 각 1.25 mM dNTP 혼합액 16 μ l(각 총 200 μ M), 2쌍의 primer 5 μ l씩(각 총 50 pM), 5 U/ μ l Taq Polymerase 0.5 μ l(총 2.5 U)이었다. Primer로는 Brisson등²⁾의 TB-1(5'-GAGATCGAGCTGGAGGATCC-3')과 TB-2(5'-AGCTGCAGCCCAAAGGTGTT-3') 및 Eisenach등¹⁰⁾의 Sal I-1(5'-CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG-3')과 Sal I-2(5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG-3')를 DNA 합성기로 합성하여 사용하였다. Taq Polymerase를 제외한 반응액과 검체를 0.5 ml micro-tube에 넣고 mineral oil를 50 μ l씩 넣은 후, 15초간 3000 rpm으로 원심분리하고, Thermal cycler에서 TB-1, -2의 경우는 pre-heating은 95°C에서 5분간, initial melting은 95°C에서 5분간, denaturation은 94°C에서 1분간, annealing은 60°C에서 1분간, extension은 71°C에서 1분 30초간, last extension은 71°C에서 10분간 하여, 총 40회를 시행하였고, Sal I-1, -2의 경우는 pre-heating은 95°C에서 10분간, initial melting은 95°C에서 5분간, denaturation은 94°C에서 1분간, annealing은 68°C에서 1분간, extension은 71°C에서 1분간, last extension은 71°C에서 10분간 하여, 총 35회를 시행하였다. PCR이 끝나면 30°C로 식을 때까지 기다린 후 -20°C에 보관하였다.

4) 전기 영동

383 base pair DNA의 경우 Agarose Gel을 TAE buffer에 2%가 되게 넣고 가열하여 녹인 후, 60°C에서 10 mg/ml의 ethidium bromide 3% volume으로 염색하였고, 123 base pair DNA의 경우는, Agarose Gel 2%와 NuSieve Gel 2%를 혼합하여 TAE buffer에 총 4%가 되게 넣고 가열하여 녹인 후, 60°C에서 10 mg/ml의 ethidium bromide 3% volume으로 염색하였다. 이에 PCR한 검체 10 μ l와 gel load buffer 2 μ l씩을 섞어 well에 넣었고 크기를 아는 size marker와 함께 100 V의 직류로 약 1시간 동안 전기 영동한 다음, 260 nm의 자외선 발광경하에서 123 및 383 base pair 크기의 band를 확인하고 사진을 찍었다.

5) Nylon Membrane에의 전이 및 Southern Blot 분석

표준 균주를 사용한 실험에서는 특이성을 검증하기 위하여, Nylon membrane에 전이하여 Southern Blot 분석을 하였다. Nylon membrane에의 전이는, 전기영동한 gel을 0.2 N HCl 50 ml에 담고 15분간 가볍게 흔들

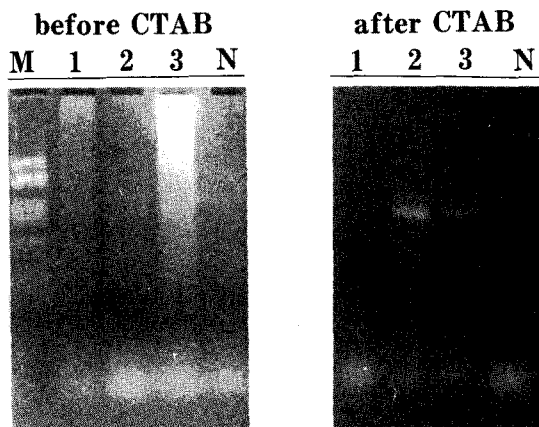


Fig. 1. Ethidium bromide stained PCR results of sputa before and after CTAB treatment using Sal I-1, -2 primers. After CTAB treatment, non-specific binding disappeared and specific 123 bp band is visualized. M; size marker, 1-3; samples, N; negative control

어 고정시킨 후, 증류수로 세척하고 0.4 M Sodium Hydroxide 용액에서 4시간 동안 전이시켰다. 전이된 Nylon membrane은 실온에서 완전히 말린 후 실온에 보관하였다.

Southern Blot 분석은 *Mycobacterium tuberculosis* 균주에 특이성을 갖는 probe인 TB-4 (5'-CGAAA-TCGCTGCGGTGGCCG-3') 및 Sal I-3 (5'-GTCGACA-CATAGGTGAGGTC-3')를 T4 kinase 를 이용하여 [γ^{32} P] ATP로 5' -end labeling하여 10 ml의 SDS/prehybridization 용액(6배 SSC용액, 5배 Denhardt 용액)으로 37°C에서 1시간 동안 prehybridization한 후, hybridization 용액 III(6배 SSC용액, 1배 Denhardt 용액, 100 μ g/ml salmon sperm DNA, 0.05% sodium pyrophosphate)으로 42°C에서 20시간 동안 시행하였다. 이를 6배 SSC/0.05% Sodium Pyrophosphate로 10분간 실온에서 4회, 6배 SSC/0.05% Sodium Pyrophosphate로 30분간 55°C에서 세척한 후, 강화 방사선 고정틀에서 방사선 감광지에 -70°C에서 24시간 동안 노출시키고, 감광지를 현상하였다.

결 과

1. PCR의 특이성

특이성을 증명하기 위하여 시행한 *Mycobacterium*

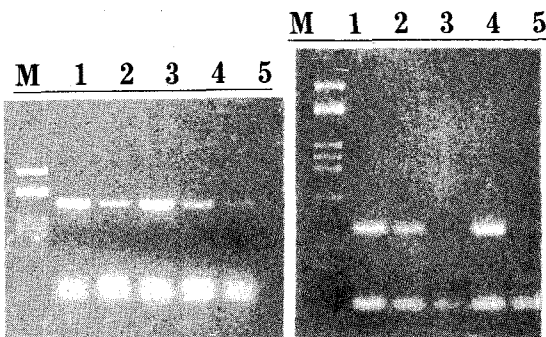


Fig. 2. Ethidium bromide stained PCR results of cultured *Mycobacterium* species using TB-1, -2(A) and Sal I-1, -2 (B) primers. M; size marker, 1; *M. tuberculosis* (H37Rv, ATCC 27294) 1ng, 2; *M. tuberculosis* (H37Ra, ATCC 25177) 1ng, 3; *M. intracellulare* (ATCC 13950) 1ng, 4; *M. bovis* (ATCC 19210) 1ng, 5; *M. scrofulaceum* (ATCC 19981) 1ng

tuberculosis (H37Rv, H37Ra)와 *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium scrofulaceum*의 PCR은 primer에 따라 그 결과가 다르게 나왔다. 즉 TB-1, -2를 이용한 PCR에서는 발광경하에서 모두 383 base pair 위치에 band를 보여 양성을 나타낸 반면, Sal I-1, -2를 이용한 PCR에서는 발광경하에서 *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv, H37Ra)와 *Mycobacterium bovis*만이 123 base pair 위치에 band를 보여 양성을 나타내었다(Fig. 2). 그러나 Southern Blot 분석에는 두 primer 모두에서 *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv, H37Ra)와 *Mycobacterium bovis*만이 양성을 나타내었으며 *Mycobacterium intracellulare*와 *Mycobacterium scrofulaceum*은 음성을 나타내었다(Fig. 3).

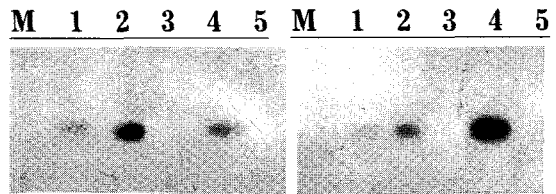


Fig. 3. Southern blot and autoradiographed PCR results of cultured *Mycobacterium* species using TB-1, -2 (A) and Sal I-1, -2 (B) primers. M; size marker, 1; *M. tuberculosis* (H37Rv, ATCC 27294) 1ng, 2; *M. tuberculosis* (H37Ra, ATCC 25177) 1ng, 3; *M. intracellulare* (ATCC 13950) 1ng, 4; *M. bovis* (ATCC 19210) 1ng, 5; *M. scrofulaceum* (ATCC 19981) 1ng

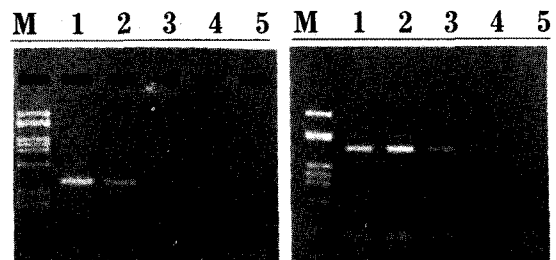


Fig. 4. Ethidium bromide stained PCR results of serial dilution of *Mycobacterium tuberculosis* using TB-1, -2(A) and Sal I-1, -2 (B) primers. M; size marker, 1; 1 pg, 2; 100 fg, 3; 10 fg, 4; 1 fg of *M. tuberculosis* (H37Rv) DNA, 5; negative control

2. PCR의 감수성

감수성을 알아보기 위하여 *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv)의 DNA를 순차적으로 희석하여 PCR을 시행하였는데, 두 primer 모두에서 발광경하에서도 *Mycobacterium* 균 1개체에 해당되는 1 fg DNA까지 양성을 나타내었다(Fig. 4).

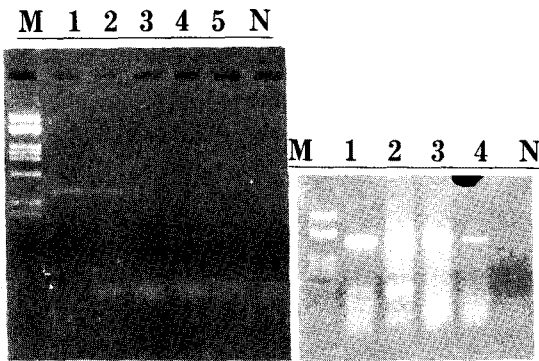


Fig. 5. Ethidium bromide stained PCR results of sputa using TB-1, -2 (A) and Sal I-1, -2 (B) primers. M; size marker, 1-6; samples, N; negative control

3. 결핵 환자의 객담에서의 PCR(Fig. 5)

1) TB-1, -2 Primer를 이용한 PCR(Table 1)

도말 검경 양성균의 객담 22예중 18예인 81.8%에서 양성을 나타내었으며, 도말 검경 음성-배양 양성균에서는 4예중 1예(25.0%), 그리고 도말 검경 음성-배양 음성균에서는 8예중 1예(12.5%)가 양성을 나타내었다. 또한 음성대조균 검체 16예에서는 모두 음성을 나타내었다.

2) Sal I-1, -2 Primer를 이용한 PCR(Table 2)

도말 검경 양성균의 객담 29예중 28예인 96.6%에서 양성을 나타내었으며, 도말 검경 음성-배양 양성균에서는 5예중 4예(80.0%), 그리고 도말 검경 음성-배양 음성균에서는 26예중 6예(23.1%)가 양성을 나타내었다. 또한 음성 대조균 검체 16예에서 2예(12.5%)에서 양성을 나타내었다.

고 안

본 연구는 PCR을 이용하여 임상 검체내에서 결핵균을 빠르고 예민하게 진단하는 방법을 개발하여 일반화시킬 수 있는 방법을 모색하고자 하였다. 복잡하고 시간이 많이 걸리는 Southern Blot 분석을 하지 않고도 항산성

Table 1. Result of PCR in Sputa Using TB-1 & -2 Primes After Ethidium Bromide Staining

Sample Group	Result of PCR (%)
Clinically Diagnosed as TB	
Smear (+), Culture (+)	18/22 (81.8%)
Smear (-), Culture (+)	1/ 4 (25.0%)
Smear (-), Culture (-)	1/ 8 (12.5%)
Clinically Excluded	0/16 (0.0%)
	20/34 (58.8%)
	19/26 (73.1%)

Table 2. Result of PCR in Sputa Using Sal I-1 & -2 Primes After Ethidium Bromide Staining

Sample Group	Result of PCR (%)
Clinically Diagnosed as TB	
Smear (+), Culture (+)	28/29 (96.6%)
Smear (-), Culture (+)	4/ 5 (80.0%)
Smear (-), Culture (-)	6/26 (23.1%)
Clinically Excluded	2/16 (12.5%)
	38/60 (63.3%)
	32/34 (94.1%)

균의 배양보다 우수한 감수성을 갖는 PCR의 조건을 찾고자 하였으며, 임상 검체중 비록 폐결핵 환자의 객담만을 대상으로 하였으나 DNA의 추출방법, PCR의 조건, 전기영동법등을 가급적 단순화시켜 1일 이내에 실험을 완료함으로써 임상에서 실제로 이용할 있는 방법을 제시하였다. 그러나 어느 검사법에도 감수성 100%, 특이성 100%가 존재할 수 없듯이, PCR도 검체에 적용하였을 때에는 이론과 달리 감수성과 특이성이 감소하여, 배양과 비교하여 볼 때 감수성 95%, 특이성 90% 수준에 만족하여야 하였고, 배양 음성이지만 임상적, 방사선학적으로 진단한 결핵 환자 객담의 약 20%에서 양성을 나타내었다. 즉, 저자들이 개발한 방법으로 PCR을 시행한 결과, 배양과 비교하여 어느 경우에는 PCR이 더 예민하고, 어느 경우에는 배양이 더 예민한 상호 보완적인 결과를 나타내었다고 할 수 있다. PCR이 더 예민하게 나타난 경우는, 투약 시작 1~2개월 후의 폐결핵 환자로서 이는 미생물학적으로 번식력은 없지만 이미 생성된 결핵균의 DNA가 객담내에 존재한다는 의미로 해석되며, 이는 확진없이 투약이 시작되었으나 진단이 다시 의심스러운 경우, 임상적으로 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다. 또한 후천성 면역결핍증이나 백혈병, 신부전 등과 같이 면역기전이 저하되어 있는 경우, 빠른 진단이 환자의 예후와 직결되는 상황에서는 PCR을 임상적으로 이용할 수 있을 것으로 기대되며, 비결핵성 결핵균(non-tuberculous Mycobacterium)과의 감별을 빨리 원하는 경우도 도움을 주리라 사료된다.

그러나 여기에서 임상 의사로서 한가지 짚고 넘어가야 할 점이 있다. 즉, 이러한 검사 방법을 어떻게 이용하여야 하는 점인데, 물론 PCR이 배양에 비해 매우 빠른 방법이지만 모든 폐결핵 환자에 있어 보편적으로 이용하기에는 너무 비싸고 취급이 까다로워 부적절하다고 생각된다. 보통의 폐결핵 환자에 있어 진단이 어려운 경우는 많지 않으며, 항결핵제의 투여가 한달 정도 늦어져서 크게 문제되지 않기 때문이다. 따라서 위에서 언급한 특별한 경우를 제외하고는, PCR은 객담의 결핵의 진단에 있어 보조적인 역할에 그친다는 점을 또한 언급하고자 한다.

PCR은 알고 있는 DNA의 단순 복제라는 간단한 원리를 이용하여 검체내에 극미량으로 존재하고 있는 병원체를 짧은 시간에 매우 감수성이 높게 진단을 내릴 수 있는 방법이다. 즉 2⁴⁰배에 해당하는 1조배의 DNA 복제를

5시간에 일으키는 감수성과, 1/4²⁰분의 확률, 즉 1조분의 1의 특이성을 보이는 이론적 배경은 지금까지 알려진 어떤 방법과도 비교할 수 없는 매우 좋은 진단 방법이 될 수 있을 것으로 생각되어져 왔다. 실제로 결핵균에 특이적인 여러가지 primer를 개발한 여러 연구자들의 실험에서도 배양한 결핵균이 1~10개체만 있으면 PCR로 확인할 수 있다고 하였다^{4,6-9)}.

그럼에도 불구하고 이를 임상에 응용하는 데에는 몇가지 문제점이 지적되어 왔다. 첫째로 배양된 균주로 실험한 결과와 임상 검체로 실험한 결과간의 감수성의 차이가 약 1000배 정도 존재한다는 점이다. 즉 임상 검체에서 분리한 DNA 내에 PCR을 방해하는 물질이 존재함으로써 DNA의 복제가 비효율적으로 일어난다는 것인데 이러한 물질중에서 알려져 있는 대표적인 것이 hemoglobin과 SDS (sodium dodecyl sulfate)였다. 그러나 본 연구자들의 실험에서 이러한 가능성을 배제시킨 후에도 항산성 도말 양성 객담의 PCR이 수차례 음성으로 나왔으며 이는 도말 양성의 정도와 무관하여서 DNA 추출 과정의 문제점으로 생각되었으며, 결핵균 세포막에 다량으로 함유된 다당질에 의하여 DNA간의 hybridization이 방해받는다는 것을 문헌고찰 결과 발견하게 되었다. 그후 CTAB를 이용한 다당류의 분리 과정을 시행하였으며 그 결과, 감수성의 상당한 진전을 보게 되어 (Fig. 1), 결핵 환자의 객담에 적용하였던 것이다. 그러나 TB-1, -2 primer를 이용한 도말 및 배양 양성 객담의 PCR에서 약 10%에 달하는 위음성이 나타났으며 이의 극복을 위하여 PCR의 감수성을 높이기 위한 여러 시도를 하였으나 오히려 위양성의 출현이 심각하여지는 결과를 초래하게 되었다. 따라서 이의 극복을 위하여 최근에 각광받는 Sal I-1, -2 primer를 사용하게 되었다. Sal I-1, -2 primer는, IS6110이라는 결핵균 한 genomic DNA에 여러번 반복하여 존재하는 유전자의 일부분을 목표로 하는 primer로서¹⁰⁾, 이를 target으로 하여 PCR을 한다면 감수성을 더욱 개선할 수 있을 것으로 생각되었으며 실제로 도말 및 배양 양성 객담의 위음성율이 5% 이하로서 감수성의 개선은 이루어졌으나 음성 대조군의 위양성율이 12.5%로서 이는 오염의 방지가 매우 어려운 문제임을 시사하고 있다.

오염(contamination)이라는 문제점은 PCR의 근본을 유지시키는 매우 중요한 초석으로서 이의 방지를 위해 여러가지 방안이 제시되고 있으나 아직도 불완전한

실정이다. 즉, 비교적 적은 분자량의 DNA를 다량으로 복제한 후 전기영동하는 과정을 반복하게 되는데 PCR 자체가 매우 예민하여 극미량이 오염되더라도 위양성으로 나오는 것이다. PCR에서는 오염은 손끝이나 pipet tip, 재생하여 사용하는 tube 등에 의한 "fomites contamination(접촉 오염)"과 복제된 DNA가 비말핵으로 pipet내에 계속 존재하거나 공기중에 떠다님으로써 발생하는 "replicon contamination(복제자 오염)"으로 나올 수 있는데, 접촉 오염은 polyethylene glove를 자주 갈아 끼고, tube와 pipet tip을 재생하여 사용하지 않으며, 시약이나 검체의 취급을 매우 주의있게 함으로써 숙련된 연구자들은 어느 정도 예방이 가능하다. 그러나 복제자 오염은 일단 오염되면 회복이 매우 어렵고, 실험양과 기간에 비례하여 오염도가 증가한다는데 그 심각성이 있다. 실제로 본 연구자들은 복제자 오염으로 인하여 같은 연구소내의 멸균 소독기에서 멸균한 증류수에서도 PCR 위양성을 경험하였고 이의 제거가 불가능하여 primer를 다른 종류로 바꾸어 다시 실험하여야 하였던 경험을 가지고 있다. 복제자 오염을 예방하는 방법으로 DNase를 사용하는 방법이 제시되기도 하지만 너무 가격이 비싸서 우리의 현실로는 어렵다고 생각된다. 따라서 본 연구자들의 제안은, PCR 후에 tube 뚜껑을 열고 전기영동하는 곳을, 검체에서 DNA를 추출하고 PCR을 시행하는 실험실과 완전히 분리해서, 가급적이면 다른 건물의 실험실에서 다른 연구자가 시행하도록 사전에 계획하는 것이다. 분자생물학 분야에서의 PCR의 이용은, 주로 유전자의 다량 복제를 시행하여 이를 가지고 다른 연구에 사용하는 것으로 오염의 문제가 그리 중요하지 않지만, 본 연구와 같이 PCR 결과 자체로 진단의 가부를 가리는 실험은 오염의 방지가 그 성패를 가름한다고 해도 과언이 아닐 것이다.

세번째 문제점은 죽은 결핵균도 양성으로 나온다는 점으로 이는 PCR의 장점이 될 수 있다. 즉 PCR 양성인 결핵균의 어떤 특정 부위의 DNA가 존재한다는 것이 결핵의 감염과는 다른 개념으로서 임상적인 판단이 필요하며 몇 주간 항결핵제를 투여받은 환자의 검체에서도 양성을 나타낼 수 있음이 확인되고 있다⁴⁻⁶⁾.

네번째 문제점은 Taq Polymerase가 너무 고가로서 일반화하기에는 아직 이르다는 점인데 이는 유전자 재조합 방법으로 제조하는 기술이 개발중에 있으므로 머지않은 장래에 해결되리라 믿으며 현재로는 PCR의 양을

절반인 50 μ l로 하는 방법이 고작이다.

이러한 PCR의 제반적 문제 외에도 본 실험에 사용한 TB-1, -2 primer의 문제점도 지적되어야 한다. 먼저 Mycobacterium tuberculosis complex와 non-tuberculous Mycobacterium의 감별이 되지 않는다는 것은 TB-1, -2 primer의 최대 약점으로서 이들의 감별이 필요한 경우에는 DNA sequence의 차이가 있는 부위로의 재선정을 통해 primer를 변경하여야 한다. 본 실험의 Southern Blot probe로 사용한 TB-4와 TB-1을 primer로 사용할 경우, 279 base pair의 target DNA를 설정할 수 있으므로 대안이 될 수 있을 것이다.

한편 IS6110 fragment를 target으로 한 Sal I-1, -2 primer는 TB-1, -2 primer에 비해 몇가지 장점을 가지고 있다. 첫째, Mycobacterium complex인 Mycobacterium tuberculosis와 Mycobacterium bovis에 특이성을 가짐으로써 Southern 분석 없이도 타종의 결핵균과 감별이 된다는 점이다. 둘째는 IS6110 fragment가 한 결핵균 내에 10내지 16번 반복하여 존재함으로써 이론상 감수성이 그만큼 높아진다는 점이며, 셋째는 Sal I-1, -2 primer의 핵산 염기의 구성이 GC성분이 높다는 점이다. 즉 hybridization이 보다 쉽게 일어남으로서, 여러가지 방해 물질의 영향을 그만큼 적게 받고 보다 높은 온도에서도 annealing이 일어날 수가 있다. 그러나 단점으로는 목표 DNA의 길이가 123 base pair로 매우 짧기 때문에 전기 영동에 사용하는 gel을 보다 비싸고 취급이 까다로운 polyacrylamide gel이나 NsSieve gel로 하여야 한다는 점과 앞에서 언급한 복제자 오염이 상대적으로 일어나기 쉽다는 점이다.

요 약

연구배경 : 1985년 Saiki 등에 의해, 특정한 DNA를 연속적으로 복제할 수 있는 방법인 polymerase chain reaction (PCR)이 개발된 이래, PCR은 검체내에 극미량으로 존재하고 있는 병원체의 진단에 큰 도움을 줄 것으로 기대되었다. 결핵균의 진단방법중, 도말염색 방법은 감수성이 낮아서 문제가 되고 있으며, 배양은 감수성은 높으나 기간이 오래 걸려서 임상적으로 도움을 주지 못하는 경우가 많다. 이에 저자들은 Mycobacterium tuberculosis의 특이 단백질인 65 kD mycobacterial antigen을 encoding하는 2520 base pair DNA중, 383

base pair DNA를 이용한 PCR과 IS6110 fragment의 일부인 123 base pair DNA를 이용한 PCR을 시행하여, 이의 감수성과 특이도를 알아보고 폐결핵 환자의 객담을 검체로한 결핵의 조기진단 방법을 개발하고자 하였다.

방법 : *M. tuberculosis* (H37Rv, H37Ra), *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* 균주와 환자의 객담에서 DNA를 추출하여, 383 base pair DNA 양끝의 20 base pair DNA primer (TB-1, -2)와 IS6110 fragment 일부의 DNA 양끝의 20 base pair DNA primer (Sal I-1, -2)로 PCR을 시행하였으며, 전기영동후 자외선 발광으로 확인하였다.

결과 :

1) Ethidium bromide 염색후 발광경하에서, *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv, H37Ra)와 *Mycobacterium bovis*는 TB-1, -2 primer와 Sal I-1, -2 primer를 이용한 PCR에서 모두 양성을 보였고 *Mycobacter intracellulare*와 *Mycobacterium scrofulaceum*은 TB-1, -2 primer를 이용한 PCR에서만 양성을 보였다.

2) Southern Blot 분석에는 두쌍의 primer 모두에서 *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv, H37Ra)와 *Mycobacterium bovis*만이 양성을 나타내었으며 *Mycobacterium intracellulare*와 *Mycobacterium scrofulaceum*은 음성을 나타내었다.

3) *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv)를 순차적으로 희석하여 시행한 PCR에서 두쌍의 primer 모두에서 *Mycobacterium* 균 1개체에 해당되는 1 fg DNA까지 양성을 나타내었다.

4) 임상적으로 진단받은 결핵환자의 시행한, Sal I-1, -2 primer를 이용한 PCR에서 도말 검경 양성균의 객담 29예중 28예인 96.6%에서 양성을 나타내었으며, 도말 검경 음성-배양 양성균에서는 5예중 4예(80.0%), 그리고 도말 검경 음성-배양 음성균에서는 26예중 6예(23.1%)가 양성을 나타내었고 음성 대조균 검체 16예에서 2예(12.5%)에서 양성을 나타내었다.

결론 : 이상의 결과로, PCR은 객담에서의 결핵균의 진단에 있어, 배양과 견줄 수 있는 특이도와 예민도를 보이고 있어, 특정한 경우 진단에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대되며, 추후 방법의 개선을 위한 연구가 계속 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구에 조언과 협조를 아끼지 않으신 서울대학교 의과대학 임상병리과학교실 김 의중 선생님, 결핵 연구원 김 상재 선생님, 그리고 연세대학교 의과대학 미생물학교실 조 상래 선생님께 감사의 뜻을 전합니다.

REFERENCES

- 1) Saiki RK, Genfand DH, Stoffel SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487, 1988
- 2) Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, Levy-Frebault V, Nassif X, Hance AJ: Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet* 4:1069, 1989
- 3) Shinnick TM: The 65-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 169(3): 1080, 1987
- 4) Hance AJ, Grandchamp B, Levy-Frebault V, Lecossier D, Rauzier J, Bocart D, Gicquel B: Detection and identification of *Mycobacteria* by amplification of *Mycobacterial* DNA. *Mol Microbiol* 3:843, 1989
- 5) Shankar P, Manjunath N, Lakshmi R, Aditi B, Seth P, Shrinivas: Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction. *Lancet* 17(335):423, 1990
- 6) Pao CC, Benedict Yen TS, You JB, Maa JS, Fiss EH, Chang CH: Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 28:1877, 1990
- 7) Hermans PW, Schuitema AR, Soolingen DV, Verstynen CP, Bik EM, Thole JR, Kolk AH, Embden JD: Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 28:1204, 1990
- 8) DeWit D, Steyn L, Shoemaker S, Sogin M: Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 28:2437, 1990
- 9) Eisenach KD, Siffford MD, Cave D, Bates JH, Crawford JT: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis* 144:1160, 1991

- 10) Eisenach KD, Cave D, Bates JH, Crawford JT: Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* **161**:977, 1990
- 11) Hermans PW, Soolingen DV, Dale JW, Schuitema AR, McAdam RA, Catty D, Embden JD: Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* **28**:2051, 1990
- 12) Patel RJ, Freis JW, Piessens WF, Wirth DF: Sequence analysis and amplification by polymerase chain reaction of a cloned DNA fragment for identification of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **28**:513, 1990
- 13) 김호중, 유철규, 김영환, 한성구, 심영수, 김건열, 한용철: Polymerase chain reaction (PCR)을 이용한 결핵균의 확인 방법에 관한 연구. 제73차 대한결핵 및 호흡기학회 추계학술대회 초록집 54, 1991
- 14) 윤경한, 조상래, 이미경, 정동현, 김주덕, 천선희, 장준, 김성규, 이원형, 조철호: 결핵의 진단을 위한 중합효소연쇄반응의 평가. 제73차 대한결핵 및 호흡기학회 추계학술대회 초록집 56, 1991
- 15) Thierry D, Brisson-Noel A, Levy-Frebault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B: Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* **28**:2668, 1990
- 16) Sjobring U, Mecklenburg M, Anderson AB, Miorner H: Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **28**:2200, 1990
- 17) Darby GK, Jones AS, Kennedy JF, Walker RT: Isolation and analysis of the nucleic acid and polysaccharides from *Clostridium welchii*. *J Bacteriol* **103**:159, 1970
- 18) Hurley SS, Splitter GA, Welch RA: Rapid lysis technique for *Mycobacterial* species. *J Clin Microbiol* **25**:2227, 1987