

□ 원      저 □

## 흉막 삼출액에서 중합효소 연쇄반응(PCR)을 이용한 *M. tuberculosis*의 검출

동아대학교 의과대학 내과학교실

김 선 택 · 강 창 운

= Abstract =

### Identification of *Mycobacterium tuberculosis* in Pleural Effusion by Polymerase Chain Reaction(PCR)

Sun Taec Kim, M.D. and Chang Woon Gang, M.D.

Department of Internal Medicine, Dong-A University College of Medicine, Pusan, Korea

**Background:** Since polymerase chain reaction(PCR) was devised by Saiki in 1985, it has been used extensively in various fields of molecular biology. Clinically, PCR is especially useful in situation when microbiological or serological diagnosis is limited by scanty amount of causative agents. Thus, PCR can provide rapid and sensitive way of detecting *M. tuberculosis* in tuberculosis pleurisy which is diagnosed in only about 60 % of cases by conventional method.

**Method:** To evaluate the diagnostic usefulness of PCR in tuberculosis pleurisy, The results of PCR was compared with those of conventional method, including pleural biopsy. The pleural effusion fluid was collected from 7 proven patients, 7 clinically suspected patients and control group(7 patients with malignant effusion). We extracted DNA from pleural fluid by modified method of Eisennach method(1991). The amplification target for PCR was 123 base pair DNA, a part of IS6110.

**Result:**

- 1) Sensitivity of PCR: We detected upto 50fg DNA.
- 2) In patients with pleural effusion of proven tuberculosis, the positive rate of PCR was 85.7%(6/7). In patients with pleural effusion of clinically suspected tuberculosis, the positive rate was 71.5%(5/7). In control group, positive rate was 0%(0/7).

**Conclusion:** We concluded that PCR methd could be a very rapid, sensitive and specific one for diagnosis of M tuberculosis in pleural effusion. Further studies should be followed for the development of easier method.

---

**Key Words:** Polymerase chain reaction, Tuberculosis, Pleural fluid

본 논문은 1992년도 동아대학교병원 임상연구비의 보조로 이루어 졌음.

## 서 론

결핵성 흉막삼출은 아직까지 우리나라에서 가장 흔한 흉막삼출의 원인으로 생각되고 있다. 그러나 결핵을 포함한 마이코박테리움 감염증을 확진하려면 반드시 적절한 피검물로부터 원인균을 증명하여야 하는데, 흉막삼출액에서 항산성 간균을 직접 검경하기는 매우 드문 일이며, 기존의 진단 방법 중에 현재 가장 진단율이 높다고 알려져 있는 것이 흉막의 생검조건인데 이것 역시 진단율이 60%에 지나지 않는다<sup>1)</sup>.

임상적으로는 젊은 연령에서 급성 흉막염을 보이는 환자에서 임파구 주종의 흉막삼출이 있고 만성 피로감, 체중감소 그리고 야간 발한 등의 전신 증상을 동반될 경우 결핵성 흉막염으로 의심할 수 있겠으나, 환자가 고연령층 혹은 면역이 억제되거나, 신부전이나 간부전이 있는 경우에는 기존의 진단 방법으로 감별에 어려움을 겪게 되어, 보다 더 예민한 진단 방법의 필요성이 제기되어왔다<sup>2~4)</sup>. 1980년대 후반에는 기존의 방법 외에 임파구 주종의 흉막삼출액에서 결핵성흉막염의 경우 흉막내 adenosine deaminase의 활성도가 증가된다는 사실이 알려져 감별진단에 이용되어 왔다<sup>5~7)</sup>.

근래 분자생물학의 발전과 함께 내열성의 DNA 중합효소를 이용하여 연쇄적으로 DNA 합성 반응을 가능케 하는 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)이 개발되므로써<sup>8,9)</sup>, 가검물 내의 소량의 DNA를 단시간 내에 막대한 양으로 증폭할 수 있게 되었고, 그 방법이나 응용 면에서 많은 연구가 이루어 졌다<sup>10,11)</sup>.

결핵균을 이용한 PCR은 Brisson 등<sup>3)</sup>이 1989년 TB-1, TB-2로 명명한 primer로 시행한 이래 계속 새로운 특이 primer가 개발되었고, 현재에는 결핵균의 한 개체에 여러 번 반복하여 존재하는 insertion element를 목표로 하는 PCR이 그 예민도가 가장 뛰어나다는 것이 보고되고 있다<sup>12~16)</sup>. PCR을 이용한 흉막 삼출액에서 결핵균의 실험은 Brisson<sup>3)</sup>, Thierry<sup>12)</sup>, Lassence<sup>14)</sup> Pao<sup>17)</sup>이 결과를 발표한 바 있으나 Pao의 37예 보고 이외에는 모두 약 10예 내외에 불과하다.

이에 저자들은 흉막 삼출이 있는 환자들에서 기존의

고전적인 진단 방법과 PCR법을 이용한 결핵균 검출을 시행하여 그 결과를 서로 비교하여 결핵성 흉막염의 진단에서의 PCR의 진단적 가치와 그 유용성을 찾아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대 상

1993년 1월 1일부터 1993년 7월 31일까지 동아대 학교병원 내과에 입원 환자 중에서 흉막삼출이 있었던 환자들로 조직병리학적(4예) 혹은 미생물학적(3예) 방법으로 결핵성 흉막염으로 확진된 7예를 1군(남:녀=6:1, 평균나이=32세)으로 하고, 조직병리학적 혹은 미생물학적 방법으로 결핵이 확진되지 않았으나 임상적으로 결핵성 흉막염으로 의심하여 항결핵제제를 사용하여 임상 호전이 있었던 7예를 2군(남:녀=3:4, 평균나이=29세)으로 하였고, 대조군(남:녀=6:1, 평균나이=68세)으로 폐결핵의 과거력이 없었던 폐암(2예) 혹은 전이성 암질환(5예)에 의한 흉막 삼출액 환자의 흉수를 이용하였다.

### 2. 방 법

#### 1) 기본 검사

##### (1) 환자군

결핵성 흉막염이 의심된 환자는 입원 즉시 흉막천자를 하여 늑막조직검사와 흉수에 대한 일반적인 세포병리검사 및 화학검사를 시행하였고 객담에서 3회, 흉수에서 1회의 항산균 도말검사 및 배양을 실시하였다.

##### (2) 대조군

환자군과 동일하게 검사를 시행하였으나, 늑막조직검사는 시행하지 않았다. 환자군이나 대조군 모두에서 흉막천자로 얻어진 흉수는 멸균 튜브에 10cc씩 담아서 즉시 -70℃ 냉장고에 보관하였다.

#### 2) PCR

##### (1) DNA 추출 방법

Eisenach 방법<sup>15)</sup>을 변형시켜 DNA를 추출하였다. 우선 흉수 3ml을 13,000×g에서 10분간 원심분리후 상층액을 제거하고, 20mg/ml의 lysozyme이 혼합되어 있는 TE buffer(10mM Tris-HCl(PH 8.0), 1mM EDTA)

300 $\mu$ 로 부유시킨후 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 배양했다.

이후 10N NaOH와 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)를 첨가해서 최종 농도가 각각 0.5N과 1%가 되게한 후 온탕기에서 10분간 가열했다. 이를 실온에서 식힌 후 1M HCl을 넣어 중화시키고 동량의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol(25:24:1)를 완전히 섞고 난 뒤, 4 $^{\circ}$ C 13,000 $\times$ g에서 10분간 원심 분리 후, 상층액(aqueous phase)을 새로운 Eppendorf 튜브에 옮겼다. 남아 있는 phenol phase에 1/2용적의 TE buffer를 넣어 잘 섞은 후 4 $^{\circ}$ C 13,000 $\times$ g에서 10분간 원심 분리하고 상층액을 Eppendorf 튜브에 넣었다. 1/10 용적의 3M sodium acetate와 동량의 isopropanol을 가한 후 -20 $^{\circ}$ C 냉장고에 2시간 이상 둔 뒤 4 $^{\circ}$ C 13000 $\times$ g에서 20분간 원심분리 후 상층액을 버리고 70% cold ethanol 1ml로 침전물을 분리시키고 나서 4 $^{\circ}$ C 13000 $\times$ g에서 20분간 분리하고 상층액을 피펫으로 제거한 후 실온에서 건조시켰다. 그후, 침전물을 BE buffer 50 $\mu$ 로 부유시킨 후 -20 $^{\circ}$ C에서 냉동 보관했다.

### (2) 추출된 DNA의 순도(Purity)와 양의 측정

*Mycobacterium tuberculosis*(이하 *M. tuberculosis* H37Rv 균주에서 추출된 DNA를 sterile tertiary distilled water(STDW) 20 $\mu$ 에 녹인 후 spectrophotometer를 이용하여 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>의 비가 1.8에 가까우면 순도가 충분한 것으로 하였고 OD<sub>260</sub>의 값으로 DNA의 양을 결정한 후 순차적으로 희석하였다.

### (3) PCR을 이용한 DNA의 증폭

#### ① primer

결핵균 1개체내 10~16번 반복하여 존재한다고 알려진 IS6110 DNA sequence를 target으로 하는 IS-1, IS-2 primer(by Eisenach)를 사용하였으며 이는 대한 생공사에 의뢰하여 합성하였다.

primer 1: 5'-CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG-3'

primer 2: 5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG-3'

#### ② 반응액의 조성

반응액은 총 50 $\mu$ 로 Table 1과 같이 만들어 사용하였다.

#### (4) 반응시간

DNA thermocycler(Perkin Elmer 제품)을 이용하여 Table 2와 같이 시행하였고, 이후 전기영동 전까지 -20

Table 1. Composition of Reaction Fluid

검체	10 ml
10배 reaction buffer (Perkin Elmer Cetus 제품) (100mM Tris-HCl, Ph 8.3; 500mM KCl; 15mM MgCl <sub>2</sub> ; 0.01% gelatin)	5 ml
primer 1	1 ml(50pmol)
primer 2	1 ml(50pmol)
dTNP	각각 1 ml(각각 200mM)
Taq DNA polymerase (대한 생공사 제품)	1 ml(1u)
3차 멸균 증류수	28 ml

Table 2. Reaction Time in DNA Thermocycler

	1st cycle	2nd-29th cycle	30th cycle
denaturation	94 $^{\circ}$ C 5min	94 $^{\circ}$ C 2min	94 $^{\circ}$ C 2min
annealing	68 $^{\circ}$ C 1min	68 $^{\circ}$ C 1min	68 $^{\circ}$ C 2min
extension	72 $^{\circ}$ C 1min	72 $^{\circ}$ C 1min	72 $^{\circ}$ C 10min

$^{\circ}$ C에서 냉동보관하였다.

### (5) 전기 영동

Ethidium bromide 0.5 $\mu$ l/ml이 함유되어 있는 2% agarose gel에서 전기 영동한 후 UV illuminator (VilBerlourmat, TF 20M)로 DNA band(123 base pair)를 관찰하였다

### (6) 감수성 검사.

본 실험에 앞서 IS-1, IS-2 primer를 이용한 감수성을 증명하기 위해 *M. tuberculosis* H37Rv(ATCC 27294)를 표준 균주로 사용하여 순차적으로 희석하여 사용하였다. 음성 대조군으로 증류수를 DNA 분리 과정에서부터 동일 과정을 시행하였다.

모든 실험과정에서 오염방지를 위한 제반수칙을 준수하였고 특히 PCR 이후의 복제된 DNA가 있는 튜브는 50m 정도 거리가 떨어진 다른 방으로 옮겨 전기영동을 실시하고, 결과를 판독하였다. 또한 오염에 의한 위양성의 오류를 줄이기 위해 동일한 검체를 2회이상 실시하여 모두 양성으로 나온 경우를 PCR 양성으로 판독하였다.

## 결 과

### 1. PCR의 감수성

감수성을 알아보기 위하여 *M. tuberculosis*(H37Rv)의 DNA를 순차적으로 희석하여 PCR을 시행한 바 자외선 발광경하에서 50fg DNA에서 양성임을 확인하였다(Fig. 1).

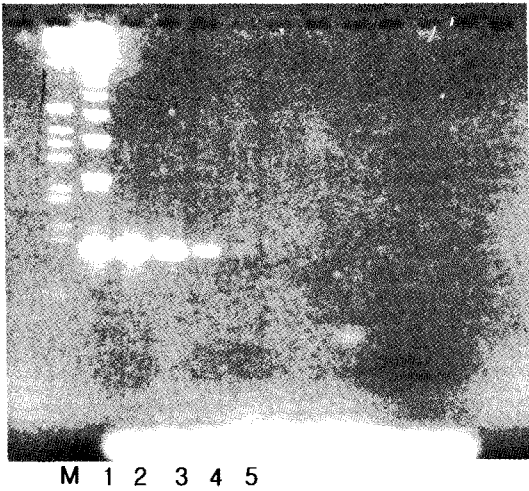


Fig. 1. Sensitivity of PCR using serial dilution of DNA from *M. tuberculosis* after ethidium bromide staining and UV transilluminator. The primer was IS-1 and IS-2.

M: Sizer Marker(1kb),  
 line 1: *M. tuberculosis* H37Rv(ATCC27294, 123bp)  
 line 2: 50pg, line 3: 5pg, line 4: 500fg, line 5: 50fg

Table 3. PCR Result of Proven Tuberculosis and Non-tuberculous Pleural Effusions

Group	PCR positive cases
Group 1 (Proven tuberculosis by pathology)	6/7(85.7%)
Group 2 (Improved after medication)	5/7(71.5%)
Control group	0/7( 0.0%)

### 2. 결핵 환자군에서 PCR의 결과(Table 3)

조직병리학적 및 미생물학적 방법으로 확진된 결핵성 흉막염 환자중 85.7%(6/7)에서 PCR 양성을 나타내었다(Fig. 2). 임상적으로 결핵성 흉막염이 의심된 환자중 71.5%(5/7)에서 PCR 양성을 나타내었다(Fig. 3).

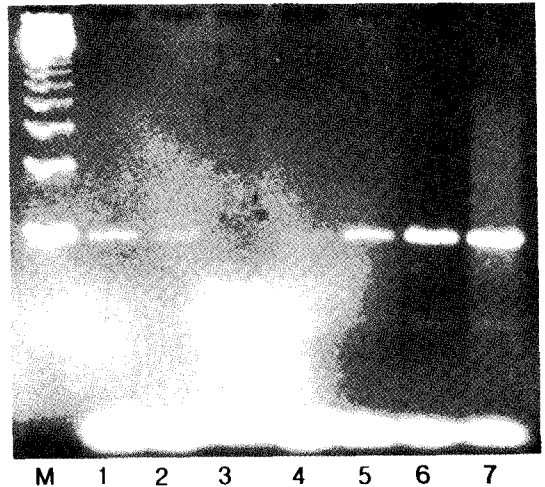


Fig. 2. Result of PCR in proven group.

M: marker of *M. tuberculosis*  
 line 1-7: Sample number of patient.  
 Positive at sample number 1, 2, 3, 5, 6, 7.

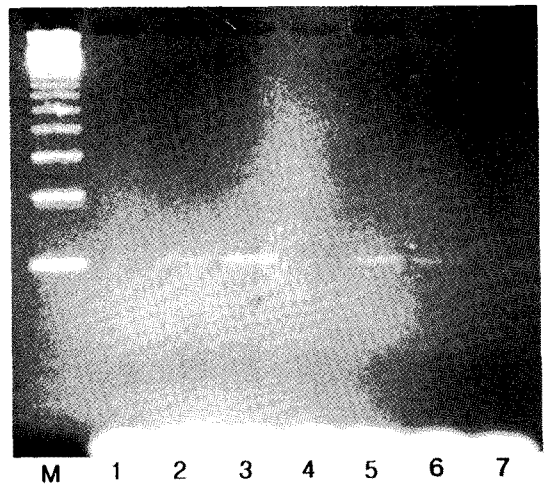


Fig. 3. Result of PCR in clinically suspected group.

M: marker of *M. tuberculosis*  
 line 1-7: Sample number of patient.  
 Positive at sample number 2, 3, 5, 6, 7.

대조군 7에는 모두 PCR 음성이었다.

## 고 찰

1985년 Saiki 등에 의해 특정한 DNA를 연속적으로 복제할 수 있는 방법인 PCR이 개발된 이래<sup>8)</sup>, PCR은 분자 생물학의 여러 분야에서 매우 유용한 방법이 되어 왔다. PCR은 검체내에 극미량으로 존재하고 있는 병원체의 진단에도 이용할 수 있으며, 이는 특히 기존의 미생물학적 면역혈청학적 방법으로 진단이 어려운 여러 병원체의 진단에 큰 도움을 줄 것으로 기대되었다.

PCR을 이용하여 결핵균을 진단하는 방법은 Brisson 등<sup>3)</sup>이 1989년 *Mycobacterium species*의 특이 단백질인 65 kD Mycobacterial antigen을 encoding하는 2520 base pair(이하 bp) 유전자의 일부인 383 bp DNA를 TB-1, TB-2로 명명한 primer를 개발한 이래 Pao<sup>17)</sup>, Shankar<sup>18)</sup>, Hermans<sup>19,20)</sup>, De wit<sup>21)</sup>, Patel 등<sup>22)</sup>이 새로운 특이 primer를 개발하여 여러 사람의 관심을 받게 되었으나, 실제 임상검체에서 PCR을 시행하였을 때, 예민도가 낮아져 Southern Blot를 하여 동위원소를 이용한 검출을 하여야 배양보다 우수한 성적을 보고하게 되었다<sup>12,21)</sup>. 이는 PCR자체의 예민도가 낮은 것이 아니라 검체에서 DNA를 분리하는 과정에서의 문제가 있을 것이라 추측하였으나<sup>23~25)</sup>, 이러한 문제는 결핵균 1 개체 내에 10~16번 반복하여 존재한다고 알려진 IS6110이라는 부위를 목표로 한 PCR primer를 Eisenach 등이 발표한 이후<sup>15,16)</sup>, 새로운 발전을 가져오게 되었다. 즉, IS-1과 IS-2라고 불리는 이 primer를 이용하여 임상 검체에서 PCR을 하였을 때, 결핵균 한 개체 내에 여러 번 반복하여 존재하는 부위를 목표로 하기 때문에 이론적으로 그 배수만큼 예민도가 높아져 진기영동 자외선 발광경하에서 육안으로 관찰할 때도 결핵균 10~100개체도 검출이 가능하다는 것이 발표되었다<sup>15)</sup>. 그리고 목표 DNA인 IS61410 fragment의 길이가 123bp밖에 되지 않기 때문에 검체에서 DNA를 분리하는 과정에서 DNA가 손상되더라도 다른 primer보다 우수한 결과를 얻을 수 있다고 생각되고 있다.

PCR 방법의 차이에 따른 다른 검체에서의 결핵균 발견을 연구한 논문들<sup>4,13,14,18)</sup>에서는 IS-1, IS-2 primer

는 다른 primer보다 우수하다는 것이 입증되고 있어, 이제 결핵균을 이용한 primer의 선정이 IS-1, IS-2로 단일화되는 추세라고 할 수 있어, 본 연구에서도 이 primer를 이용하여 실험하게 되었다.

흉수액내의 대부분의 DNA의 출처는 부유하는 여러 세포들로 추정되는데 결핵의 병인론을 살펴 볼 때, 일단 결핵균이 체내에 들어오면 대식세포에 탐식되고, 이를 T-인파구에 표현하여 여러가지 Lymphokine를 분비하며 이로 인해 대식세포가 더욱 활성화되는 세포매개성 면역반응을 일으킨다. 이때 대식세포가 결핵균을 완전히 파괴 못할 경우 대식세포에 있던 결핵균이 확산되어 나와 혈액내의 단핵구의 병변내로 이동을 촉진시켜 대식세포의 활성화를 더욱 조장 시킨다<sup>26)</sup>. 이를 보아 결핵균은 주로 대식구내에 탐식된 상태로 존재한다고 생각되며, Martens 등<sup>2)</sup>의 보고에 따르면 흉수의 양보다는 보관의 신속성이 중요하다고 강조한 바, 본 연구에서도 검체에서 DNA를 분리하기 전에 결핵균이 대식세포 등에 의해 용해되는 것을 막기 위해 천자 즉시 10CC씩 멸균튜브에 담아 저온 냉동(-70°C)에 보관하였다.

결핵균을 이용한 PCR을 시행함에 있어 또 다른 문제가 되는것 중의 하나가 DNA 분리 방법의 문제인데 이는 전술한 바와 같이 PCR의 예민도를 낮추는 이유 중의 하나이고, 분리 과정에서 Taq polymerase의 활성도를 약화시키는 물질을 완전히 제거 못하기 때문이라고 생각되어지고 있다<sup>23,25)</sup>. 이러한 물질로는 hemoglobin, sodium dodecyl sulfate(SDS), phenol등으로 알려져 있으며<sup>26)</sup>, 분리된 DNA에 다량의 단백질이나 탄수화물이 남아 있는 경우는 DNA의 hybridization을 방해한다고 알려져 있다. 현재 이러한 방해 요소를 최소화하기 위해 알려진 DNA 분리법에는 bead beater법<sup>28)</sup>, SDS-microwave over(Bollet's) method<sup>29)</sup>, Triton x-100-protenase K method<sup>30)</sup>, Lysis Buffer method<sup>30)</sup>, SDS-protenase K method<sup>31)</sup>, NaOH lysis method<sup>32)</sup> 등이 있으나 본 연구에서는 Eisenach(1991)의 방법을 변형시켜 사용하였다.

오염방지는 PCR을 시행시 초석이 되는 것이고 이를 위하여 여러방법이 제시되고 있으나 아직도 불완전하다. 오염의 경로는 크게 접촉오염 및 복제자오염으로

나누어 볼 수 있는데 접촉자오염의 경우 검체취급을 주의하면 어느 정도 예방이 가능하다, 복제자오염의 경우 일단 오염이 되면 회복이 매우 어렵고 시간이 지날수록 오염도가 증가하므로 심각한 문제를 초래하게 된다. 본 연구 과정 중에서도 같은 실험실내에서 멸균한 증류수에서도 PCR 위양성을 경험한 바 있다. 따라서 저자들은 김 등<sup>1)</sup>이 제안한 바에 따라 PCR 후 튜브뚜껑을 열고 전기영동하는 곳을, 검체에서 DNA를 추출하고 PCR을 실시하는 실험실과 완전히 분리하여 재시행하여 결과를 얻었다.

기존의 진단 방법으로 결핵성 흉막염으로 확진된 7명의 환자중 PCR 결과는 6명이 양성을 보였고 임상적으로 결핵성 늑막염이 의심된 7명의 환자중 5명이 양성을 보였으며 각각 85.7%, 71.4%의 양성율을 보였고, 결핵이 배제된 대조군의 흉막 삼출 환자 7예 모두에서 음성이었다. 이는 외국의 여러 보고와 비교해<sup>4,12,14)</sup>, 볼 때 본 연구에서 양성율이 감소되어진 것으로 나타났는데 이는 증례수가 많지 않아서 발생한 것으로 사료된다. 하지만 PCR의 이론적 예민성과 특이성에는 불구하고 아직까지 5~10%의 위양성율과 위음성율이 있다고 생각되어 지고 있다.

향후 보다 많은 환자를 대상으로 전향적 연구가 이루어진다면 결핵성 흉막염의 진단에 있어서 IS6110을 이용한 PCR법은 고신속적인 진단방법에 비하여 신속하고 정확한 진단을 가능하게 해주는 유용한 방법이 될 것으로 생각된다.

## 요 약

**연구 배경:** 결핵성 흉막삼출은 아직까지도 우리나라에서 가장 흔한 흉막삼출 원인으로 생각되고 있으나 기존의 검사로는 60% 정도의 확진만이 가능하다. 이에 보다 예민한 진단법의 개발이 요구되던 중 PCR의 발전으로 결핵성흉염의 진단에 도움을 줄 것으로 기대되었다. 이에 저자들은 PCR을 이용한 결핵성 흉막염 진단의 유용성을 알아보고자 하였다.

**방법:** 환자군으로 결핵성 흉막염으로 확진된 경우와 임상적으로 결핵성 흉막염으로 의심이된 각각 7명의 군으로 선정하였고 대조군으로 결핵의 과거력이 없었

던 7명의 악성종양 환자의 흉수를 각각 사용하여 PCR을 시행하였으며, PCR의 target은 IS6110 gene의 일부인 123bp DNA로 하였고 DNA추출은 Eisennach 방법(1991)을 변형하여 사용하였다.

## 결과:

1) PCR의 감수성검사에서 자외선 발광경하에서 50fg DNA에서 양성 임을 확인하였다.

2) 조직병리학적 및 미생물학적 방법으로 확진된 결핵성 흉막염 환자중 85.7%(6/7)에서 PCR양성을 나타내었고, 임상적으로 결핵성 흉막염이 의심된 환자중 71.5%(5/7)에서 PCR 양성을 나타내었다

3) 대조군 7예는 모두 PCR 음성이었다.

**결론:** 이상의 결과로서 결핵성 흉막액의 진단에 있어서 IS6110을 이용한 PCR법은 고신속적인 진단방법에 비하여 결핵군의 신속하고 정확한 진단을 가능하게 해주는 유용한 방법임을 알 수 있었으나 비용을 절감할 수 있고 오염을 줄일 수 있는 방법에 대한 연구가 더 필요하리라 생각된다.

## 참 고 문 헌

- 1) 김호중, 김영환, 한성구, 심영수, 김건열, 한용철: Polymerase chain reaction (PCR)을 이용한 결핵의 진단에 관한 연구. 결핵 및 호흡기 질환 39:517, 1992
- 2) Maartens G, Bateman ED: Tuberculous pleural effusions: increased culture yield with bedside inoculation of pleural fluid and poor diagnostic value of adenosine deaminase. Thorax 46:96, 1991
- 3) 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
- 4) Brisson-Noel A, Azanar C, Chureau C, Nguyen S, Pierre C, Bartoli M, Bonete R, Pialowx G, Gicquel B, Garrigue G: Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. Lancet 338:364, 1991

- 5) 성낙억, 신계철, 이홍재, 이경원: 각종 늑막저류에서 adenosine deaminase 활성도에 관한 연구. 대한내과학회잡지 **33**:240, 1986
- 6) 장상호, 장 준, 손희영, 김성규, 김기호: 흉막액 adenosine deaminase 활성도의 진단적 가치에 관한 연구. 대한내과학회잡지 **31**:214, 1986
- 7) Giusti G: Adenosine deaminase, In Bergmeyer HU(Ed.) Method of enzymatic analysis, Vol 2, p 1092 New York. Academic Press, 1974
- 8) Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Amheim N: Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia Science **230**:1350-1354, 1985
- 9) Saiki-RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA. Science **239**:487-491, 1988
- 10) 신완식: 결핵진단의 면역학적 및 분자생물학적 방법, 결핵 및 호흡기질환 **39**:1-6, 1992
- 11) Reiss J: The polymerase chain reaction and its potential role in clinical diagnostics and research, review article. J Int Med **230**:391-395, 1991
- 12) 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
- 13) Walker DA, Taylor IK, Mitchell DM, Shaw RJ: Comparison of polymerase chain reaction amplification of two mycobacterial DNA sequences, IS6110 and the 64kDa antigen gene in the diagnosis of tuberculosis. Thorax **47**:690, 1992
- 14) Lassence A, Lecossier D, Pierre C, Cadranet J, Stern M, Hance AJ: Detection of mycobacterial DNA in pleural fluid from patients with tuberculous pleurisy by means of the polymerase chain reaction comparison of two protocols. Thorax **47**:265, 1992
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) Shankar P, Manjunath N, Lakshmi R, Aditi B, Seth P, Shrinivas: Identification of Mycobacterium tuberculosis by polymerase chain reaction. Lancet **17**(335):423, 1990
- 19) 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
- 20) 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**:2437, 1990
- 21) 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
- 22) Patel RJ, Freis JW, Piessens WF, Wirth DF: Sequence analysis and amplification by polymerase chain reaction of a cloned DNA fragment for identification of Microbacterium tuberculosis. J Clin Microbiol **28**:513, 1990

- 23) Bocart D, Lecossier D, Lassence AD, Valeyre D, Ballesti J, Hance AJ: A search for mycobacterial DNA in granulomatous tissues from patients with sarcoidosis using the polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis* **145**:1142, 1992
- 24) 모은경, 김영환, 한성구, 심영수, 김건열, 한용철, 유철규: Adenosine deaminase의 진단적 가치에 관한 전향적 연구. *결핵 및 호흡기 질환* **39**:596, 1992
- 25) Fidler H, Rook GAW, Johnson NM, McFadden JJ: Search for mycobacterial DNA in granulomatous tissues from patients with sarcoidosis using the polymerase chain reaction. *Am Respir Dis* **147**:777, 1993
- 26) Kurasawa-T, Shimokata-K: Cooperation between accessory cells and T lymphocyte in patients with tuberculous pleurisy. *Chest Oct* **100**(4): 1046, 1991
- 27) Sjobring U, Mecklenburg M, Anderson AB, Miorner H: Polymerase Chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **28**:2200, 1990
- 28) 김호중, 유철규, 김영환, 한성구, 심영수, 김건열, 한용철: Polymerase chain reaction을 이용한 결핵균의 확인 방법에 관한 연구. 제73차 대한 결핵 및 호흡기학회 초록집 p54, 1991
- 29) Bollet C, Gevaudan M, de Lamballerie X, Zandotti C, de Micco P: A simple method for the isolation of chromosomal DNA from Gram Positive or acid-fast bacteria. *Nucleic Acid Research* **19**:1955, 1991
- 30) 김주옥, 한표성, 홍석철, 이종건, 조해정, 김선영: 종합효소연쇄반응을 이용한 결핵의 진단에 있어서 각종 DNA 추출방법의 비교. *결핵 및 호흡기질환* **40**:47, 1993
- 31) Unit 2.4: Preparation of genomic DNA from bacteria. p2.4.1 in *Current protocols in molecular biology*, 1990
- 32) Bio-Medical Workshop: 한국과학기술원 생명과학과 1992