

최근에 개발된 리팜피신 감수성 검사법

박 영 길

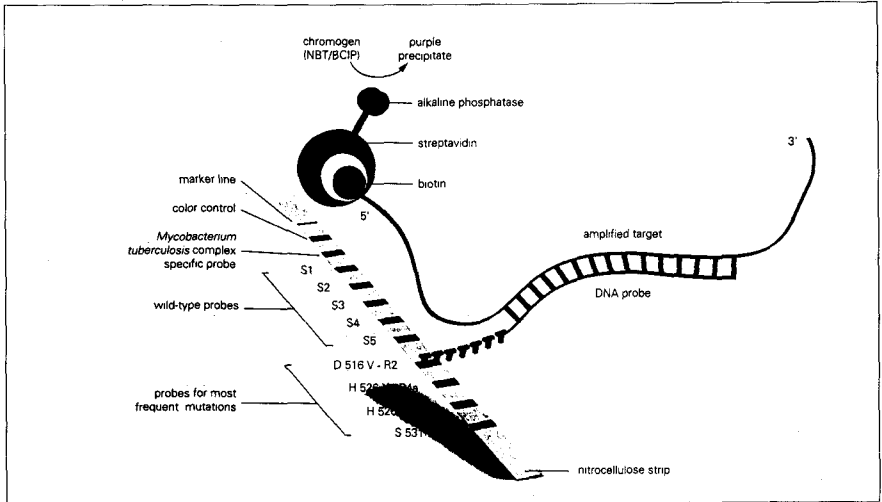
결핵연구원 분자생물과

지구상에서 자칭 만물의 영장이라는 인간은 꿈을 꾸는 독특한 습성이 있다.

꿈은 “잠잘때 꾸는 꿈”과 “현재에는 불확실하지만 미래에는 이루어지기를 바라는 희망”이란 두가지 의미가 있는데, 평소의 “희망사항”이 잠잘때 “꿈”에서는 이루어기도 하는 것을 보면, 이 두가지 의미를 가진 “꿈”이란 말은 잘도 지어냈다. 하여간 인간은 무엇이든 많이 가지고 싶어하고, 남보다 더 더욱 색다르게 살고 싶어하는 등 지금보다 편하게 살고 싶고, 일도 쉽게하고 싶어하며, 꿈을 먹고 산다. 어떤 인간은 혼자서만 많은 돈을 갖고 싶어하였고 이 욕망을 절제하지 못하고 불법적으로 긁어 모아서 지금 감옥 생활을 하고 있다. 남보다 색다른 인생을 살고자 하는 꿈으로 배꼽티가 유행하였고, 다양한 색깔로 머리를 염색하는 등 여러가지 볼거리를 만들어 주기도 하며, 이 꿈은 예술부문에 발전

을 이루는 동기가 되었다. 편하게 살고자 하는 꿈으로 난방을 장작불에서 연탄불로, 연탄불에서 석유나 가스불로 바꾸어 한 겨울도 춥지 않게 지내게 되었으며, 누워서 텔레비 방송 채널을 이리저리 바꾸게 하는 리모콘을 비롯하여 오만가지 전자제품을 만들어 우리의 일상생활을 얼마나 즐겁고 편하게 만들어 주고 있는가.

인간도 동물이라 먹지 않고 살 수 없으며, 먹고 살려면 일을 해야한다. 그러나 일을 하더라도 쉬운 방법으로 하면 더 많은 양의 일을 할 수 있을 것이다. 그래서 우리 인간은 “좀 더 쉬운 방법”에 대한 생각을 끊임없이 하게 된다. 이러한 생각으로 바퀴를 만들었고 이것은 또 구석구석에서 얼마나 많이 사용하고 있는가. 여느 동물에서 볼 수 없는 이러한 인간의 성질은 과학문명과 예술문화의 발전을 이룩하는 원동력임에 틀림없다.



▲ LiPA 검사원리

결핵균 검사 방법에 있어서도 예외는 아니다. 더 쉽고 빠르게 결과를 알 수 있는 방법은 없을까. 종이만 어떤 시험액에 담그면 결핵균이 있는지, 어떤 약제에 감수성인지를 판별할 수 있는 꿈같은 이야기가, 최근 분자생물학적인 기술의 발달로 현실로 다가오고 있다.

LiPA(line probe assay)라는 방법이 1995년 8월에 선을 보여 이를 소개하고자 한다.

현재 일차항결핵제로 사용하고 있는 리팜피신에 대하여 내성을 보이는 결핵균은 95% 이상이 *rpoB*라는 유전자내에서 돌연변이를 갖고 있으며 감수성균은 돌연변이가 없다. 다시 말하면 *rpoB* 유전자의 돌연변이를 갖는 결핵균은 리팜피신에 내성을 나타내는 균이라는 의미이며, 따라서 유전자내 돌연변이를 찾아내는 방법이 있다면 그것이 곧 임상분리 결핵

■ 종이만 어떤 시험액에 담그면 결핵균이 있는지, 어떤 약제에 감수성인지를 판별할 수 있는 꿈같은 이야기가, 최근 분자생물학적인 기술의 발달로 현실로 다가오고 있다. ■

균이 리팜피신에 내성이 있는지 여부를 판별해 주는 감수성 검사법이 된다.

그런데 다행스럽게도 *rpoB* 유전자내에서 발생되는 돌연변이는 일정부위에서만 집중적으로 존재하고 있다. 그리고 그 부위만 선택해서 PCR(polymerase chain reaction) 방법으로 똑같은 염기서열을 가진 DNA 복제물을 많이 만들 수 있다.

이 PCR산물(amplified target)에 대하여 돌연변이가 있는지 여부를 분석하므로써 그 결핵균의 *rpoB* 유전자내에 돌연변이 여부를 역으로 추정할 수 있다.

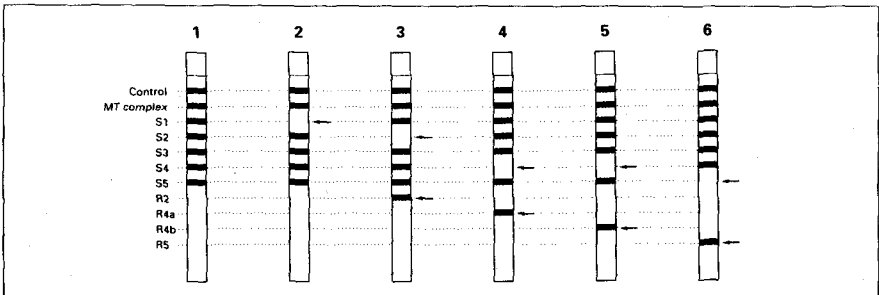
그러면 어떻게 PCR산물을 분석할 수 있을까. LiPA검사를 위한 PCR을 실시할 때는 시발체(primer)에 biotin을 매달아 놓았다. 시발체는 PCR 산물에 같이 포함되어 있으므로 PCR산물에는 biotin이 매달려 있게 된다. 임상결핵균의 *rpoB* 유전자로 부터 만들어진 PCR산물에는 기다란 막대종이(nitrocellulose strip)위에 붙어있는 probe(보통 20개의 염기로 이루어진 짧은 사슬, oligomer)와 결합하게 된다. 이 probe에는 여러 종류가 있다.

뉘시에서 미끼를 사용할 때, 붕어를 잡기 위해서는 떡밥을, 메기에는 지렁이를, 잉어에는 갯목을, 가물치를 잡기 위해서는 피라미를 주로 사용한다. 즉 잡고자 하는 물고기에 따라 미끼를 달리 사용한다.

LiPA검사에서 probe란 뉘시에서 미끼와 같아서 probe 종류에 따라 그곳에 붙

은 PCR산물의 종류가 달라진다. probe는 "정상적인 probe"(S1-S5)와 "돌연변이 probe"(R2-R5)로 크게 두 종류로 나누어져 있다. *rpoB* 유전자에서 돌연변이가 잘 발생되는 부위를 5개의 작은 부위로 나누어 정상적인 염기서열을 가진 probe를 5개 만들었으며, 돌연변이가 빈번한 부위는 돌연변이 염기서열을 갖는 probe를 4개 만들어 막대종이위에 붙였다. 임상분리균의 *rpoB* 유전자가 정상적인 염기서열을 가지고 있다면 PCR산물의 염기서열이 정상적인 것이 생기고, 이것은 또한 정상적인 probe와 결합한다. *rpoB* 유전자가 돌연변이 염기서열을 갖고 있으면 돌연변이 염기서열을 갖는 PCR산물이 생기며, 이것은 정상적인 probe와는 결합하지 못하고 돌연변이 probe와 결합하게 된다.

PCR산물은 수산화 나트륨의 간단한 조작과 온도를 조절하면 probe와 쉽게 결합한다. 막대종이위에 있는 probe와 결합되어 있는 PCR산물의 한쪽 끝에는 biotin이 매달려 있다. 이것은 streptavidin과는 찰떡궁합으로 만나기만



▲ LiPA 결과 해석 : ①번은 리팜피신 감수성균이고 나머지는 모두 내성균이다.

하면 잘 결합한다.

그런데 streptavidin에는 또 딸린 자식이 하나 있는데 그것이 바로 alkalinephosphatase라는 효소인 것이다. 이 효소는 발색제(NBT/BCIP)를 분해시켜서 PCR산물이 위치한 곳에 색깔을 띠게 하는 특기가 있다. 그러므로 PCR산물이 결합되어 있지 않은 probe의 위치에서는 아무 색깔이 나타나지 않게 된다. 따라서 5개의 정상적인 probe중에서 한곳이라도 색깔이 나타나지 않은 부위가 있다면 PCR산물의 염기서열 중에서 그 probe의 위치에서 돌연변이가 발생되어 있었다는 것이며, 이는 곧 PCR을 실시한 대상 결핵균의 *rpoB* 유전자내에 돌연변이가 발생되었다는 것을 의미하여 그 임상분리균은 리팜피신에 내성을 나타내는 균으로 볼 수 있다. 즉 5개의 정상적인 probe에서 색깔이 모두 나타나면 리팜피신 감수성균, 그 중 한 곳에서도 색깔이 나타나지 않은 것이 있으면 리팜피신 내성균인 것이다.

현재의 약제 감수성법으로는 4주 이상의 시일이 필요하지만 이 검사는 2일이면 그 결과를 알 수 있다. 그러나 LiPA 검사를 실용화 하기에는 아직 불완전하다. 낚시 미끼를 지렁이를 사용했는데 봉어가 물리는 경우가 있듯이, LiPA 검사에서도 약간의 온도 차이에 따라 정상적인 염기서열을 가진 probe에 약간의 돌연변이 PCR산물이 결합되어 흐릿하게 위양성 색깔이 나타나는 경우가 있다. 또한 비교실험 결과, 기존의 방법으로 판정된 리팜피신 내성균의 약 98% 정

도만이 LiPA검사를 검출할 수 있었으며, 내성균과 감수성균이 혼합되어 있을 경우 구별이 불확실하고, LiPA검사로 리팜피신에만 사용할 수 있기 때문에 다른 약제에 대한 결과를 알 수 없다. 그러나 리팜피신에 내성인 결핵균은 아이나에도 내성을 나타내는 경우가 많기 때문에 항결핵약제 다제 내성균을 판별하기 위한 검사로서는 의미를 갖고 있다.

rpoB 유전자의 돌연변이를 검출하기 위하여 SSCP(single strand conformation polymorphism) 방법을 사용할 수 있다. SSCP 방법의 원리는 PCR산물인 DNA 두가닥을 가열처리하여 한가닥으로 분리시킨다. 그러면 각 가닥은 자체적으로 일정한 구조를 만든다. 그런데 돌연변이 염기서열을 가지고 있는 PCR산물의 DNA가닥은 그 구조가 정상적인 염기서열을 가진 가닥의 구조와 달라진다. 분리된 DNA 가닥을 전기영동으로 분석하면 돌연변이 염기서열을 가진 구조와 정상적인 염기서열을 가진 구조간에 이동 거리가 달라져서 구별을 할 수 있게 된다. 그러나 이 방법은 돌연변이의 위치와 염기에 따라서 정상적인 염기를 가진 구조와 구별하기 어려운 경우가 많다. 리팜피신 이외의 다른 약제와 관련된 유전자내의 돌연변이를 SSCP방법으로 구별하려는 연구가 진행되어 왔지만 아직은 기존의 방법을 대체할 만큼 효율적인 방법은 개발되지 않았다.

그러나 머지않은 장래에 좀 더 편리하고, 정확한 감수성 검사 방법이 출현할 것이라고 꿈꾸어 본다. †