

DNA-probe를 이용한 미생물 검출 진단 방법의 개발

김영대

생명공학연구소 세포화학분석 R.U.

진단용 미생물 검사 방법의 변혁

전통적인 의료 진단용 미생물 검사 방법은 샘플에 포함된 미생물을 적절한 영양성분이 섞인 agarose gel이나 배양 용액 속에 장기간 균을 배양시켜서 그 상태를 검사하는 직접 배양 방법과 미생물의 여러 가지 생화학적 특성을 분석하여 그 종류를 분별, 확인하는 방법이 있다. Culture 방법은 비교적 정확하고 재현성이 높아서 지난 수십 년 동안 미생물 검사에 표준이 되었고 현재도 새로 개발되는 검사방법들을 평가하는 기준이 된다. 그러나 미생물 배양 방법은 의료 진단 방법으로는 다음과 같은 단점을 갖고 있다. 첫째로 미생물의 배양기간이 수일 내지 수주일 걸리므로 그 결과에 의존하는 환자의 진단과 이에 따르는 적절한 치료를 지연시킨다. 둘째로 민감도가 비교적 낮아서 양성 환자를 음성으로 오류 판단하는 경우가 적지 않다. 셋째로 검사 결과를 검사원(檢査員)의 주관적인 판단에 의존하므로 결과가 불투명한 경우 오판(誤判) 할 수 있다. 넷째로 샘플 수가 많을 경우 검사의 신속, 정확성을 위한 검사방법의 자동화가 불가능하다.

새로운 미생물 검사 방법의 개발

Immunoassay 방법은 미생물 항원이나 항원에 특이한 항체를 환자의 샘플에서 검사하는 것이며 검사 소요시간이 짧고(8시간 이내) 검사결과를 객관적으로 판단하게 한다. Immunoassay는 샘플을 즉시 처리하여 검사하거나 또는 적절한 기간 미생물을 배양한 후에 검사 할 수 있으며, 검사 결과의 정밀도는 culture 방법과 유사하거나 그보다 높은 민감도를 나타낸다. 그러므로 immunoassay는 현재 culture 방법의 여러 가지 단점들을 보완 해주는데 큰 역할을 하고 있다. 또 다른 미생물 검사 방법은 chromatography 기술을 이용한 gas chromatography, liquid chromatography, high-performance-liquid-chromatography 등으로 샘플 속에 미생물에 특이한 구성 물질의 유/무를 탐색하는 것이다. chromatography 기술은 대부분 자동화됐으며 신속하고 저렴하게 검사 결과를 얻을 수 있으나 기기 설비와 운영에 상당한 투자를 필요로 한다.

DNA-probe 미생물 검사 방법

DNA-probe 기술은 샘플 속에 함유된 미생물 특유의 유전 인

자 핵산을 직접 DNA-probe를 이용하여 측정하는 방법과, 이 유전 인자 핵산을 배양 또는 증폭시켜서 수가 증가된 핵산을 측정하는 방법이 있다. 후자의 경우 검사 결과는 전자보다 현저하게 민감도가 높은 것이 특징이지만, 미생물 배양 기간 또는 핵산 증폭 과정을 거쳐야 함을 고려해야 한다. 현재, DNA-probe 미생물 검사 방법은, culture 또는 immunoassay같은 검사 방법의 정확성이 부족하거나, 다른 검사 과정이 복잡하던가, 정확한 검사 방법이 없을 경우에 의료기관 또는 기업에서 적절히 개발되어 널리 사용되고 있다. 전염성 성병인 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*)나 나이세리아 고노리아(*Neisseria gonorrhoeae*)의 검출을 위한 enzyme immunoassay는 오래 전부터 존재하지만, 근래에 이들을 탐지하기 위해 개발된 DNA-probe 증폭 검사는 민감도와 특이성이 뛰어나서, 불편하고 사람들이 꺼리는 smear 샘플 대신에, 소변 샘플을 사용하여 대량 스크린도 가능하게 한다 (5). 종래의 폐결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*) 진단은 4주 내지 8주일이 걸리는 균 배양 방법에 의존해 왔으나 새로 개발된 *M. tuberculosis*를 위한 DNA-probe 증폭 검사는 8시간 내에 검사 결과를 알아서 진단을 내리고 즉시 약물치료를 시작하게 한다. 현재 미국 식품 의약품 관리국에서 승인되어 상품화된 DNA-probe를 이용한 미생물 직접 검사 방법과 미생물 배양 후 검사 방법을 Table 1에 열거해 놓았다. Table 1에 열거한 검사 방법들은 DNA-probe를 직접 (또는 일정기간 배양 후) 샘플에 가하여, DNA-probe와 hybridize한 target 핵산에서 발산되는 enzyme, fluorescence 또는 chemiluminescence signal을 측정한다. 그 중에 복수 DNA-probe를 이용하여 signal을 증가시키는 branched-DNA 방법이 감도가 높고 검사 방법이 간단한 것으로 평가된다 (2). 분자 생물학에서 개발된 증폭 기술을 이용해서 샘플 속에 있는 target 핵산을 단 시간에 증폭시키는 방법은 DNA-probe에 의한 미생물 검사 방법을 다른 차원으로 올려놓았다. 이 방법은 환자 샘플 속에 함유된 10개 이하의 target 핵산도 증폭 반응 후 감지할 수 있게 한다.

DNA-probe 미생물 검사 방법 개발의 핵심은 특정 미생물에 특이한 유전인자 핵산의 서열을 찾아서 이 서열을 정확하게 인지하는 DNA-probe나 DNA-primer를 설계하는 것이다. 컴퓨터를 이용해서 설계된 여러 개의 DNA-probe/primer는 제조과정

을 거쳐서 배양된 미생물(cultured bacteria/mycobacteria) 패널을 기반으로 특이성이 비교 검토된다. 이 중에서 민감도와 특이성이 가장 높은 DNA-probe/primer가 검사 방법의 개발을 위해 선정된다. DNA-probe/primer의 특성이 검사 결과의 정확성을 결정하는 가장 중요한 요소로 인정된다.

Table 1. Commercially available DNA probes (*)(**)

Direct detection	Culture identification
Bacteria	Bacteria
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Campylobacter species</i>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Enterococcus species</i>
Group A <i>Streptococcus</i>	Group B <i>Streptococcus</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Protozoa	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Fungi	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Candida species</i>	Group A <i>Streptococcus</i>
Virus	<i>Mycobacterium avium</i>
<i>Human papillomavirus</i>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
	<i>Mycobacterium avium complex</i>
	<i>Mycobacterium gordonae</i>
	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>
	<i>Mycobacterium kansasii</i>
	Fungi
	<i>Blastomyces dermatitidis</i>
	<i>Coccidioides immitis</i>
	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	<i>Histoplasma capsulatum</i>
	Viruses
	<i>Human papillomavirus</i>

(*) Probes have been cleared by the U.S. Food and Drug Administration.

(**) Reference 1.

일반적으로, 핵산 증폭 기술을 이용하는 DNA-probe 미생물 검사 방법은 3단계로 그 과정을 나눌 수 있으며 이들은: 1) 환자 샘플 준비, 2) target 핵산의 증폭 반응, 그리고 3) 증폭된 핵산의 측정과 결과 분석이다. 다음에 이 과정을 좀 더 구체적으로 검토해 보기로 한다.

1) DNA-probe 증폭 미생물 검사를 위한 환자 샘플 준비

환자 샘플의 대부분은 혈액, 혈청, 가래, 소변, cerebrospinal fluid(CSF)이며, 샘플 준비 단계는 환자 샘플의 병 전염성을 제거하고 동시에 target 핵산을 미생물체에서 추출하여 다음 단계인 증폭 반응에 적합하도록 준비하는 과정이다. 환자 샘플에 섞

여 있는 물질 중에는 증폭 과정에 필수적인 효소(DNA polymerase, ligase, restriction enzyme)의 반응을 방해하거나, target 핵산과 DNA-probe의 hybridization을 저해하는 물질이 포함될 수 있으므로 이 단계에서 이 물질들이 제거되어야 한다. 이 목적을 달성하는 효과적인 방법은 유기/무기 화학 약품 또는 detergent를 샘플에 첨가하고 원심 분리 또는 고온 처리방법을 여기에 적절히 적용하는 것이다. 예를 들면, 환자의 가래(sputum) 샘플을 95 °C 이상의 온도에 20분 이상 처리하면 mycobacteria를 포함한 미생물의 전염성을 완전히 제거할 수 있으며 동시에 표면 membrane을 파괴시켜서 유전 인자 핵산을 비롯한 미생물 내의 함유 물질을 밖으로 추출시킨다. 여기에 원심 분리나 buffer 대처 등 방법을 적절히 적용하면 위에 언급한 증폭 방해 요소들을 극복할 수 있다 (6).

2) DNA-primer/probe를 이용한 유전 인자 핵산의 증폭 반응

핵산 증폭 방법은 DNA-primer/probe, DNA polymerase를 포함한 핵산 효소, 그리고 핵산이 반응 온도의 적절한 변화/조정(cycle)으로 target 핵산 수를 기하 급수적으로 증폭시키는 polymerase chain reaction(PCR)과 ligase chain reaction (LCR)이 있다. 또 다른 종류의 증폭 방법은 시초에 반응을 고온으로 시작하지만 다음 cycle부터는 고정된 온도에서 증폭반응을 되풀이하는(isothermal amplification) 것으로 strand displacement amplification(SDA), self-sustaining sequence replication(3SR), QB replicase 등 다양한 기술이 개발, 응용되고 있다. 이 단계는 고온에서 활력을 보존하는 효소(DNA polymerase, ligase)를 포함한 DNA nucleotide에 작용하는 효소(restriction enzyme)를 필요로 하며, 또한 반응온도와 시간을 주기적으로 변화/조정하는 기기(thermocycler)를 필요로 한다. 이 목적으로 흔히 사용되는 고온 활성 DNA polymerase를 Table 2에 포함해 놓았는데, 이 효소들은 DNA와 반응을 위해서 MgCl₂나 MgSO₄를 필요로 하는 것이 특징이다. 만약 DNA 대신 RNA가 증폭 반응의 대상인 경우에는, 한 tube 속에서, 우선 reverse transcriptase(RT)를 이용하여 RNA를 DNA로 전환시킨 후, 같은 tube 내에서 DNA polymerase를 이용하여 target 핵산을 증폭시키는 것이 효과적이다. 참고로, PCR, LCR와 SDA 증폭 방법의 특성을 비교하여 Table 3에 요약해 놓았다.

3) 증폭된 target 핵산의 측정과 결과 분석

이 단계는 증폭된 target 핵산을 정성/정량 분석하여 환자 샘플 속에 미생물 특유의 유전인자 핵산이 있는가를 결정하는 것이다. 정성 분석 방법의 하나는 증폭된 핵산을 agarose gel로 전기 분해하고 membrane에 이동된 nucleotide 핵산의 크기와 양을 radioactivity 또는 fluorescence를 probe로 추정하는 것이다. 정량 분석 방법은 대부분 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 또는 biotin-streptavidin 시스템을 기반으로 개발되고 있으며 enzyme, fluorescence, chemiluminescence를 probe

Table 2. Common thermostable DNA polymerases (**)

Enzyme	Source of enzyme	Stability at 95 °C	Optimal temperature (°C)	Vendor
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>	$t(1/2) = 40 \text{ min}^*$	50-75	Perkin-Elmer
AmpliTaq	Recombinant Taq	$t(1/2) = 40 \text{ min}^*$	50-75	Perkin-Elmer
AmpliTaq Stoffel	Mutant of AmpliTaq	$t(1/2) = 80 \text{ min}^*$	75-80	Perkin-Elmer
rTth	<i>Thermus thermophilus</i>	$t(1/2) = 20 \text{ min}^*$	55-75	Perkin-Elmer
Vent	<i>Thermococcus litoralis</i>	>95% activity for 1hr	80	New England BioLabs.
Deep Vent	<i>Pyrococcus sp. strain</i> GB-D	>95% activity for 1hr	72-80	New England BioLabs.
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>	>95% activity for 1hr	75	Stratagene

(*) $t(1/2)$: Half-life at 95°C.

(**) Reference 1.

Table 3. Comparison of the Characteristics of PCR, LCR and SDA Technique

Amplification technique	PCR	LCR	SDA
No. of primer	2	4	2
Enzyme	DNA polymerase	DNA polymerase + Ligase	DNA polymerase + restriction enzyme
Temperature control	Denaturation + annealing + extension(cycle)	Denaturation + annealing, extension(cycle)	Denaturation + isothermal amplification (cycle)
Assay sensitivity	Similar to LCR & SDA	Similar to PCR & SDA	Similar to PCR & LCR
Assay specificity		Higher than PCR or SDA	
Reference	3, 4	5, 6	7, 8

로 삼고 있다. 이 분석 시스템은 발산되는 광 signal을 측정하고 그 결과를 컴퓨터로 처리하여 샘플에 함유된 유전 인자 핵산을 정량적으로 나타낸다. 기업에서 개발된 컴퓨터 시스템은 software가 정량 분석 검사 결과의 임상적인 중요성을 제시하기도 한다.

검사의 마지막 단계에서 중요한 사항은 증폭된 target 핵산을 검사 종료 후, 철저히 처리하여 다음 샘플 검사에 오염되지 않도록 해야 하는 것이다. 효소나 유기/무기 화학 물질을 증폭된 target 핵산과 반응시켜 target nucleotide를 완전히 분해시키는 것이 효과적인 방법으로 인정된다.

DNA-probe 증폭 검사 수행 절차

진단용 DNA-probe 증폭 검사는 수요에 따라서 샘플 불량이 상당 수 이면 의료기관 자체 내에서 개발하여 사용할 수 있으며 이에 필요한 절차를 간단히 검토해 보기로 한다. 진단용 DNA-probe 증폭 검사의 정확성은 검사실(検査室) 내부 설비가 어떻게 위치해 있는가에 중요한 영향을 받는다. 그 이유는 각

검사 때마다 DNA 증폭 반응 결과로 엄청난 수의 target 핵산이 생산되며, 이들이 다음 검사 과정에 오염을 일으킬 수 있고 일단 오염이 발생하면 이를 제거하기가 어렵기 때문이다. 일반적으로, 이상적인 검사실의 실내 배치는, (1)시약 준비 지역, (2)샘플 준비 지역, 그리고 (3)증폭 반응/분석 지역의 3지역을 그 순서대로 위치 상 분리시키는 것이다.

- DNA-probe 증폭 검사를 위한 첫 단계에서 검사원(検査員)은 시약 준비 지역에서 마이크로 튜브(microtube)에, 샘플을 제외한, 증폭 반응에 필요한 효소와 핵산 등 모든 성분을 섞어 넣어서 증폭 반응 튜브(reaction tube)를 만든다. 기업(企業)에서 구입하는 진단 용 DNA-probe 증폭 키트 중에는 모든 증폭 반응 성분(샘플을 제외한)이 이미 증폭 반응 튜브에 들어있다.
- 검사원은, 별도로, 샘플 준비 지역에서 환자 샘플을 이전에 확립된 방법에 의하여 처리하여 증폭 반응 단계에 대비한다.
- 검사원은 샘플 준비 지역에서 증폭 반응 튜브의 뚜껑을

열고 미리 처리된 샘플을 반응 물질과 혼합하여 증폭 반응 준비를 완료한다.

- 다음에, 검사원은 증폭 반응 튜브를 증폭 반응/분석 지역으로 이동, 온도 변화 기기 (thermocycler)를 이용하여 증폭 반응 과정을 수행한다.
- 이어서, 증폭 반응/분석 지역에서 자동 시스템이 증폭된 target 핵산을 정량 측정하고 결과를 분석하여 환자 샘플 속에 미생물이 있는가를 결정한다.
- 샘플 검사가 완료된 후, 증폭된 target 핵산은 증폭 반응 튜브 속에서 완전히 분해, 처리 되고 이중으로 봉해서 검사실 밖에 퇴출해야 한다.

이와 같이 전 검사과정이 한 증폭 반응 튜브 속에서 진행되므로, 검사원은 가능한 증폭 반응 튜브의 뚜껑을 샘플 투입 시를 제외하고는 열지 말고 증폭 반응으로 생산된 핵산이 다른 지역에 오염되지 않도록 주의해야 한다. 이와 관련하여, 검사실 내부는 공기 유통이 샘플이나 target 핵산 때문에 오염되지 않도록 설계하고 공기 유통을 항상 조절해야 한다. DNA-probe 증폭 검사에 필요한 기기나 용품은 DNA-probe 증폭 검사에만 사용되도록 별도로 지정할 것이며, 또한, 검사실 내에서는 검사원이 언제나 일회용 플라스틱 장갑과 실험실 코트를 착용하고 검사를 수행해야 한다.

진단용 DNA-probe 검사의 미래 취향

DNA-probe 검사방법은 의료진단을 위한 미생물 검사에 혁신을 일으켰다. 더구나 분자 생물학을 이용한 DNA nucleotide 증폭 기술은 미생물 검사를 위한 민감도의 한계와 특이성에 새로운 정의를 내리게 했으며 검사 소요시간의 획기적인 단축과 검사방법의 자동화에 효시를 날렸다. 현재 사용되는 DNA-probe 증폭 검사방법이 개선해야 할 점은 (1) 샘플 준비과정이 비교적 복잡하고, (2) 증폭 기술에 독립된 기기(thermocycler)가 필요하며, (3) 검사 소요시간의 단축이 요구되고, (4) 기업에서 제작 판매하는 DNA-probe 증폭 검사 키트가 비교적 비싸다는 것이다. 근래 의료 진단 기술 개발의 추세는 기기를 포함한 키트 부피를 줄이고, 검사의 소요 시간을 최대한 단축시키며, 검사 과정을 단순화하여 검사 비용을 줄이는 것이다. DNA-probe 증폭 검사 방법이 이 조건들을 만족시킬 수 있으면 가까운 장래에, 모든 미생물 검사 방법의 표준으로 인정되는, culture 방법을 대체할 것으로 추측된다. 특히, 현장에서 의료 진단을 가능케 하는 point-of-care 속성 검사 방법이 환자 치료에 갖다주는 혜택을 고려하여, 과학자들은 point-of-care 검사에 필요한 조건을 충족시키는 DNA-probe 증폭 검사 키트 개발에 박차를 가하고 있다. 집적화되고 완전히 자동화된, 소형 DNA 증폭 분석 시스템이 이미 선을 보였으며(11,12), DNA 칩(chip) 기술을 기반으로 한 효율적이고 저렴한 진단용 DNA-probe 증폭 검사 키트가 개발될 때가 멀지 않을 것으로 필자는 기대한다.

참고문헌

1. Murray, P. R., *et al.*, 1995. Manual of Clin. Microbiol. 6th ed. AMO Press, Washington, DC.
2. Nolte, F. S., 1998. Branched DNA signal amplification for direct quantification of nucleic acid sequences in clinical specimens, *Adv. Clin. Chem.* 33: 201-235.
3. Miyashita N., *et al.*, 1994. Evaluation of the sensitivity and specificity of polymerase chain reaction test kit AMPLICOR *Chlamydia trachomatis*, *Microbiol. Immunol.* 38(1): 81-85.
4. Jaschek, G., *et al.*, 1993. Direct detection of *Chlamydia trachomatis* in urine specimens from symptomatic and asymptomatic men by using a rapid polymerase chain reaction assay. *J. Clin. Microbiol.* 31(5): 1209-1212.
5. Carroll K. C., *et al.*, 1998. Evaluation of the Abbott LCx ligase chain reaction assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Nisseria gonorrhoea* in urine and genital swab. *J. Clin. Microbiol.* 36(6): 1630-1633.
6. Tortoli E., *et al.*, 1997. Evaluation of a commercial ligase chain reaction kit (Abbott LCx) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. *J. Clin. Microbiol.* 35(9): 2424-2426.
7. Pfyffer G. E., *et al.*, 1999. Performance characteristics of the BDProbeTec system for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* 37(1): 137-140.
8. Bergmann, J. S., *et al.*, 1998. Clinical evaluation of the BDProbeTec strand displacement amplification assay for rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 36(9): 2766-2768.
9. Gingeras, T. R., 1990. Unique features of the self-sustained sequence replication (3SR) reaction in the in vitro amplification of nucleic acids. *Ann. Biol. Clin.(Paris)*. 48(7): 498-501.
10. Mueller, J. D., *et al.*, 1997. Self-sustained sequence replication (3SR): an alternative to PCR. *Histochem. Cell Biol.* 108(4-5): 431-437.
11. Burns M. A., *et al.*, 1998. An integrated nanoliter DNA analysis device, *Science* 282: 484-487.
12. Miyachi, H., 1998. Molecular diagnostics by automated systems, *Rinsho Byori* 46(5): 413-419.



김 영 대

1968년 미네소타 대학교 화학과 박사

1974년 Abbott Laboratories 연구원
(의료 진단시약 연구 및 개발)

1998년-현재 생명공학연구소 Brain pool
자문 역

미국 암학회 회원

미국 화학회 회원

미국 면역학회 회원