

□ 원 저 □

올리고뉴클레오티드 칩 (Oligonucleotide Chip) 을 이용한 항결핵제 감수성과 관련된 *Mycobacterium tuberculosis* *rpoB* 유전자의 점돌연변이 판별 방법

(주) 바이오메드랩 마이크로어레이센터¹, 선진연구센터², 서울대학교 의학연구원 의용생체공학연구소³,
울산대학교 의과대학 서울중앙병원 내과학교실⁴, 스위스 국립과학기술연구소 의공학연구소⁵

김현정^{1,3}, 김성근, 심태선⁴, 박용두⁵, 박미선²

= Abstract =

Detection of Point Mutations in the *rpoB* Gene Related to Drug Susceptibility in *Mycobacterium Tuberculosis* using an Oligonucleotide Chip

Hyun Jung Kim^{1,3}, Seong-keun Kim*, Tae Sun Shim⁴, Yong Doo Park⁵, Misun Park²

Microarray Center¹, Advanced Research Center², Biomedlab Co.,

Institute of Medical and Biological Engineering, Medical Research Center, Seoul National University³,

University of Ulsan, College of Medicine, Asan Medical Center⁴,

Institute for Biomedical Engineering, Swiss Federal Institute of Technology⁵

Background : The appearance of multiple-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains has been seriously compromising successful control of tuberculosis. Rifampin-resistance, caused by mutations in the *rpoB* gene, can be indicative of multiple-drug-resistance, and its detection is of great importance. The present study aimed to develop an oligonucleotide chip for accurate and convenient screening of drug-resistance.

Methods : In order to detect point mutations in the *rpoB* gene, an oligonucleotide chip was prepared by immobilizing specific probe DNA to a microscopic slide glass by a chemical reaction. The probe DNA that was selected from the 81 bp core region of the *rpoB* gene was designed to have mutation sites at the center. A total

Address for correspondence :

Misun Park, Ph.D.

Advanced Research Center, Biomedlab Co.

Clinical Research Institute 5-304, Seoul National University Hospital

Jongno-Gu, Yongon-Dong 28, Seoul 110-744, Korea

Phone : 82-2-760-1774 Fax : 82-2-764-9962 E-mail : misun@bio.bmelab.co.kr

*Present Address :

Product Planning & Development, Pharmaceutical Division, Life Science BU, LG Chem Ltd.

of 17 mutant probes related to rifampin-resistance including 8 rifabutin-sensitive mutant probes were used in this study. For accurate determination, wild type probes were prepared for each mutation position with an equal length, which enabled a direct comparison of the hybridization intensities between the mutant and wild type.

Results : Mycobacterial genomic DNA from clinical samples was tested with the oligonucleotide chip and the results were compared with those of the drug-susceptibility test in addition to sequencing and INNO-LiPA Rif. TB kit test in some cases. Out of 15 samples, the oligonucleotide chip results of 13 samples showed good agreement with the rifabutin-sensitivity results. The two samples with conflicting result also showed a discrepancy between the other tests, suggesting such possibilities as existence of mixed strains and difference in drug-sensitivity. Further verification of these samples in addition to more case studies are required before the final evaluation of the oligonucleotide chip can be made.

Conclusion : An oligonucleotide chip was developed for the detection of *rpoB* gene mutations related to drug-susceptibility. The results to date show the potential for using the oligonucleotide chip for accurate and convenient screening of drug-resistance to provide useful information in antituberculosis drug therapy. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2001, 50 : 29-41)

Key words : *Mycobacterium tuberculosis*, *rpoB* gene, Oligonucleotide chip, Rifampin, Rifabutin.

서 론

유전 질병과 관련하여, 1990년대 초반부터 연구된 유전자칩(oligonucleotide chip, DNA chip or gene chip)은 array-based sequencing by hybridization (SBH) 기술로서, 이 방법은 단시간에 대량으로 표적(target) DNA 서열을 효과적으로 정확하게 분석할 수 있다. 이는 미세단위 칩(microscale unit chip)으로 수 만개의 특정 올리고뉴클레오티드 프로브(specific oligonucleotide probe)을 일정 미세단위의 유리표면 위치에 화학적 또는 반도체 기술을 이용하여 고정시켜 표적 DNA와 혼성화반응(hybridization)을 함으로써 한번에 수많은 유전적 다형성(genetic polymorphism)에 대한 정보를 얻을 수 있도록 하였다. 이 방법은 기존의 Sanger의 염기서열 분석방법과 비교할 때, 단 한번의 실험결과로부터 얻는 유전적 정보도 대대할 뿐만 아니라 시간적 측면에서 매우 효율적이라 평가되고 있다. Zhen Guo는 1994년 human tyrosinase gene exon 4에 대한 5개의 점돌연

변이(point mutation)를 올리고뉴클레오티드 array로 연구하였으며, R. J. Lipshultz는 1995년 HIV-1의 항바이러스 약제(antiviral drug)에 대한 돌연변이와 유전적 다양성(genetic diversity)을 조사하기 위하여 올리고뉴클레오티드 프로브 array를 이용하여 reverse transcriptase와 protease를 조사하기도 하였다^{1,2}. 다른 한편으로는 암 또는 염증성 질병(inflammatory disease)과 관련하여 유전자 발현양상을 알기 위하여 올리고뉴클레오티드 대신 cDNA microarray를 사용하여 연구되기도 하였다^{3,4}.

1980년대 중반부터 전 세계적으로 마이코박테리움(*Mycobacterium*) 감염 환자가 현저하게 증가하고 있는데 이는 *Mycobacterium tuberculosis* 감염에 의한 결핵 환자뿐만 아니라 후천성 면역결핍증(AIDS)환자의 다른 마이코박테리움(*M. avium* complex:MAC)의 감염 빈도가 증가추세에 있기 때문이라고 보고되고 있다⁵. 수적인 증가뿐만 아니라 결핵치료에 있어 사용되는 일차 항결핵 약제인 isoniazid(INH), rifampin(RIF), streptomycin(STR),

ethambutol(EMB), pyrazinamide(PZA)에 대한 항결핵제 내성 균주도 증가하고 있어 이를 분자생물학적 기전 수준에서 연구하고자 하는 시도가 DNA 칩을 사용하여 이루어지고 있다^{6,7}. 특히 항결핵 약제인 RIF은 RNA polymerase β -subunit를 encoding하는 *rpoB* 유전자와 관련하여 내성을 보이는 것으로 지금까지 보고된 30여 개의 점돌연변이는 *rpoB* 유전자(3,534 bp)의 81 bp core region에 집중되어 있는 것으로 보고되었다⁸. 알려진 점돌연변이의 양상은 Table 1에서 제시된 바와 같이 513, 516, 526, 531 codon에서 주로 관찰되고 있다. 다른 항결핵 약제 rifabutin(RIF)은 rifamycin S의 spiro-piperidyl 유도체로서 AIDS 환자의 MAC감염 예방약제로 사용되고 있다⁹. 이 약제 또한 RNA polymerase β -subunit를 encoding하는 *rpoB* 유전자의 점돌연변이 양상에 따라 감수성이 변하는 것으로 보고되고 있어 *rpoB* 유전자의 특정 점돌연변이를 분자생물학적 기전 측면에서 고려해 보는 것은 약제 내성을 연구하는데 있어 의미가 있다. 여러 논문에서 제시된 바와 같이, RIF 약제에는 내성을 나타내지만 RIF 약제에는 감수성으로 나타나는 점돌연변이가 종종 보고되며 아울러 RIF과 RIF 두 약제에 대해 모두 내성을 보이는 점돌연변이 또한 보고되었다^{10,11}. 일련의 이러한 점돌연변이는 *rpoB* 유전자 돌연변이 위치와 변화된 아미노산(amino acid)으로 인해 이 약제에 대한 감수성이 변했기 때문이라고 보고되고 있다¹².

이러한 관점에서 본 연구는 올리고뉴클레오티드 칩으로 *Mycobacterium tuberculosis*의 *rpoB* 유전자에서 일어나는 점돌연변이를 조사하고자 하였다. 특정 프라이머(primer)를 사용하여 점돌연변이가 가장 많이 일어나는 81bp core region을 포함한 *rpoB* 유전자 영역을(157 bp) PCR로 증폭하고 이를 올리고뉴클레오티드 칩으로 혼성화 반응을 함으로써 점돌연변이를 판별하고자 하였다. 올리고뉴클레오티드 칩으로 *rpoB* 유전자에 대한 점돌연변이 연구는 결핵환자에 대한 RIF과 RIF 약제 내성 유무를 판단케 함으로써 효과적인 화학요법치료를 가능케 할 것으로

판단된다.

대상 및 방법

1. 시료, 시약 및 기구

15개의 마이코박테리아 genomic DNA는 아산재단 서울중앙병원 호흡기내과 심태선 선생님께서 제공받았으며, 염기서열분석 결과, RIF 감수성 실험 결과, 그리고 INNO-LiPA Rif.TB kit 실험 결과도 제공받았다. 알데하이드작용기(aldehyde functional group)가 유도된 silylated slide glass는 CEL Associates, Inc. (Massachusetts, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 각각의 프라이머(biotin-TR8, TR9)와 올리고뉴클레오티드 프로브는 Bionics (Korea)에서 합성 주문하여 사용하였으며, DNase I은 Boehringer Mannheim(Germany)의 DNase I, RNA-free($10\text{-}50 \times 10^3$ unit/ml)를 사용하였다. Streptavidin-R-phycoerythrin은 Molecular Probes(Oregon, USA)로부터 구입하였으며, 그 외 시약은 특급 시약을 사용하였다. 올리고뉴클레오티드 칩의 형광 이미지는 GMS 418 array scanner (TaKaRa, Japan)를 사용하여 532 nm의 emission 시그널을 PMT 80에서 주사(scanning)하여 얻었다.

2. 올리고뉴클레오티드 칩 제작

특정 5'-aminated DNA 프로브(표 2)를 $3 \times \text{SSC}$ 에 $200 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ 이 되도록 녹인 후 slide glass 위에 $0.1\text{-}0.2 \mu\text{l}$ 씩 spotting하여 가습된 배양기(humidified incubator)에서 37°C 에서 4시간 동안 반응하였다. Schiff base 반응이 완료된 slide glass를 가습된 배양기에서 꺼내 연속적으로 0.2% SDS 용액에서 1분, 2차 증류수에서 1분, 그리고 NaBH_4 용액(0.1 g NaBH_4 , 30 ml PBS , 10 ml EtOH)에서 5분 동안 처리하였다. 마지막으로 2차 증류수에서 1

분 동안 세척 후 건조하여, 사용할 때까지 상온의 암실에서 보관하였다.

3. PCR

PCR은 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1U Taq polymerase, 50 pmol biotin-TR8, TR9 프라이머를 첨가하여 최종 부피 50 μ l 에서 반응하였다. 동일한 PCR 반응물에 1 mM dATP dGTP, dCTP를 각각 2 μ l, dTTP를 1.5 μ l 사용하고 1 mM biotin-dUTP를 0.5 μ l 첨가하여 최종적으로 streptavidin-R-phycoerythrin를 사용하면 표적 DNA에 형광 표지(random fluorescence labeling)를 할 수 있도록 하였다. PCR 반응은 predenaturation:94 $^{\circ}$ C, 5분, denaturation:94 $^{\circ}$ C, 30초, 프라이머 annealing : 63 $^{\circ}$ C, 30초, polymerization : 72 $^{\circ}$ C, 45초, last extension ; 72 $^{\circ}$ C, 5분 조건 하에서 35 주기로 실행하였다. PCR 산물은 81 bp core region을 포함하는 157 bp로서 2% agarose gel 상에서 확인 하였다.

4. DNase I 처리, 혼성화 반응 및 주사(scanning)

PCR로 증폭된 표적 DNA(157 bp) 20 μ l 를 취하여 DNase buffer 20 μ l, DNase I (0~10 U/ μ l) 1 μ l 를 처리하였으며 반응이 끝난 후 DNase I을 불활성화(inactivation)시키기 위해 99 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 열처리하였다. 이중 나선(double strand) DNA를 단일 나선(single strand) DNA로 변성(denaturation)하기 위하여 4 μ l 의 3 N NaOH로 25 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 처리하고 2 μ l 의 Tris-HCl (pH 7.2), 4 μ l 의 3 N HCl로 0 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 처리하였다. 최종적으로 위의 반응 혼합물에 50 μ l 의 12 \times SSPE와 0.5 μ l 의 10% SDS를 첨가하여, 올리고뉴클레오티드 칩상에서 40 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 혼성화 반응을 하였다. 반응이 끝난 후 2 \times SSPE, 0.03% SDS으로 25 $^{\circ}$ C에서 3분, 1 \times SSPE로 25 $^{\circ}$ C에서 5

분, 0.2 \times SSPE로 25 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 세척하여 올리고뉴클레오티드 칩과 반응하지 않은 표적 DNA를 제거하였다. 올리고뉴클레오티드 칩을 25 $^{\circ}$ C에서 건조한 후 49 μ l 의 3 \times SSPE에 1 μ l 의 streptavidin-R-phycoerythrin를 섞어 25 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 처리하였다. 최종적으로 올리고뉴클레오티드 칩을 1 \times SSPE에서 1분 동안 세척, 건조 후 scanner로 올리고뉴클레오티드 칩을 주사(scanning)하였다.

결 과

1. 임상 분리체(clinical isolate) *rpoB* 유전자 (157bp) 증폭

15개의 임상 분리체(clinical isolate) *rpoB* 유전자(157 bp)를 biotin-TR8, TR9 프라이머로 증폭할 수 있었고 이것을 2%의 agarose gel 상에서 단일 DNA band로 확인 수 있었다(Fig. 1).

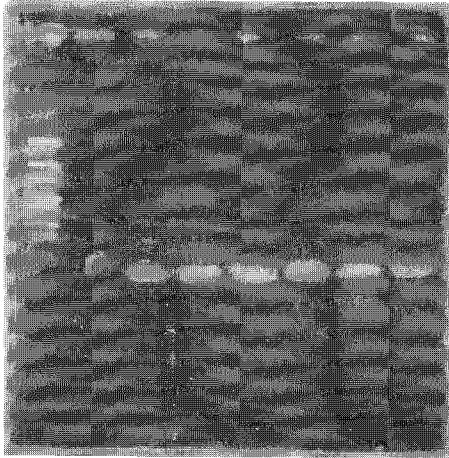
2. 혼성화 반응에 미치는 DNase I 반응조건 최적화

15개의 증폭된 *rpoB* 유전자(157 bp)를 DNase I으로 처리한 후 올리고뉴클레오티드 칩상에서 혼성화 반응을 하였다. 이때 사용되는 DNase I의 처리 조건을 최적화하기 DNase I의 농도(0~10 U), 반응시간(5~10분) 및 온도(0~25 $^{\circ}$ C)를 변화시켰으며 그 결과 0.1 U DNase와 0 $^{\circ}$ C, 5분의 반응조건이 가장 적절하다고 판단되었다(Fig. 2). 그림 2에서 볼 수 있듯이 0.1 U DNase I을 0 $^{\circ}$ C, 5분에서 처리한 PCR 반응물의 혼성화 반응 결과에서 mutant 511/531임을 가장 분명하게 읽을 수 있었다.

3. 올리고뉴클레오티드 칩을 이용한 *rpoB* 유전자 돌연변이 검출

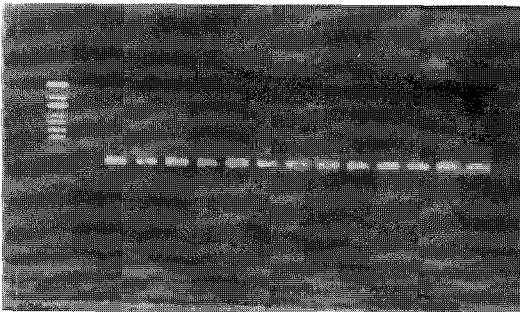
Fig. 3과 Fig. 4의 결과는 각각 3개, 17개의 돌연변이 프로브(mt)를 이에 상응하는 야생형 프로브(wt)

M N 2 3 9 12 24 27



(A)

M N 22 24 30 36 48 82 87 90 91 94 98 99 118



(B)

Fig. 1. The 157 bp PCR product containing 81 bp core region of *rpoB* gene amplified with biotin-TR8, TR9 primers. M : marker, N : negative control, Number : clinical isolate No.

아래에 배치하여 제작한 칩의 결과로서, 종합하면 각각의 임상 분리체의 RIF 내성 돌연변이 종류는 #2 (mt531), #3(mt526c), #9(mt516a), #12 (mt531), #22(mt516c), #24(mt526b/mt526e), #27(mt526c), #30(mt531), #36(mt516b), #48(mt526f), #82(mt531/516c), #87(mt531/516c), #90(mt516c/526d), #91(mt531), #94 (mt511/531)로 해석되었고 그 중 RIF에 대해 감수

성을 보이는 임상 분리체는 #9(mt516a), #22 (mt516c), #24(mt526b/526e), #36(mt516b), #48(mt526f), #82(mt531/516c), #87(mt531/516c), #90(mt516c/526d) 모두 8개로 해석되었다. 표 3은 이 결과를 염기 서열 분석 결과 및 RIF 감수성 실험결과와 비교한 것이다. 총 15개 중 13개는 RIF 감수성 실험결과와 일치하였고, #9와 #24에서는 차이가 발견되었다.

고 찰

올리고뉴클레오티드 칩 프로브는 표 2에 제시된 바와 같이 *rpoB* 유전자의 점돌연변이를 조사하기 위한 7개의 야생형(wild type ; wt) 프로브와 17개의 RIF 내성(mt) 프로브, 8개의 RIF 감성(mt) 프로브를 포함하도록 고안되었다. 17개의 RIF 내성 프로브는 511 codon (Leu>Pro), 513 codon (Gln>Pro), 516 codon (a : Asp>Val, b : Asp>Tyr, c : Asp>Glu), 518 codon (Asn>His), 521 codon (Leu>Met), 522 codon (Ser>Leu), 526 codon (a : His>Tyr, b : His>Asp, c : His>Arg, d : His>Asn, e : His>Ala, f : His>Cys, g : His>Gln, h : His>Gly), 531 codon (Ser>Leu)으로 점돌연변이된 것을 판별할 수 있도록 하였다. 17개의 RIF 내성 프로브 중 8개의 RIF 감성 프로브는 516 codon (a : Asp>Val, b : Asp>Tyr c : Asp>Glu), 526 codon (d : His>Asn, e : His>Ala, f : His>Cys, g : His>Gln, h : His>Gly)으로 점돌연변이된 것을 판별할 수 있도록 하였다. 단, 여러 논문에 의하면 mt 516a와 mt 516b는 RIF 내성 점돌연변이면서 동시에 RIF 감수성이 다양하게 보고되고 있기 때문에 일단, RIF 감성 프로브에 포함하여 전체 칩 형태를 결정하였다. 야생형 프로브는 *rpoB* 유전자 507-533 codon에 해당하는 부위에서 고안된 7종의 17mer DNA 절편으로서 빈발 점돌연변이 사이트를 중간위치(8-12 position)에 포함하여 각각의 프로브가 서로 겹치는 부위를 최대한으로 하여, RIF 내성

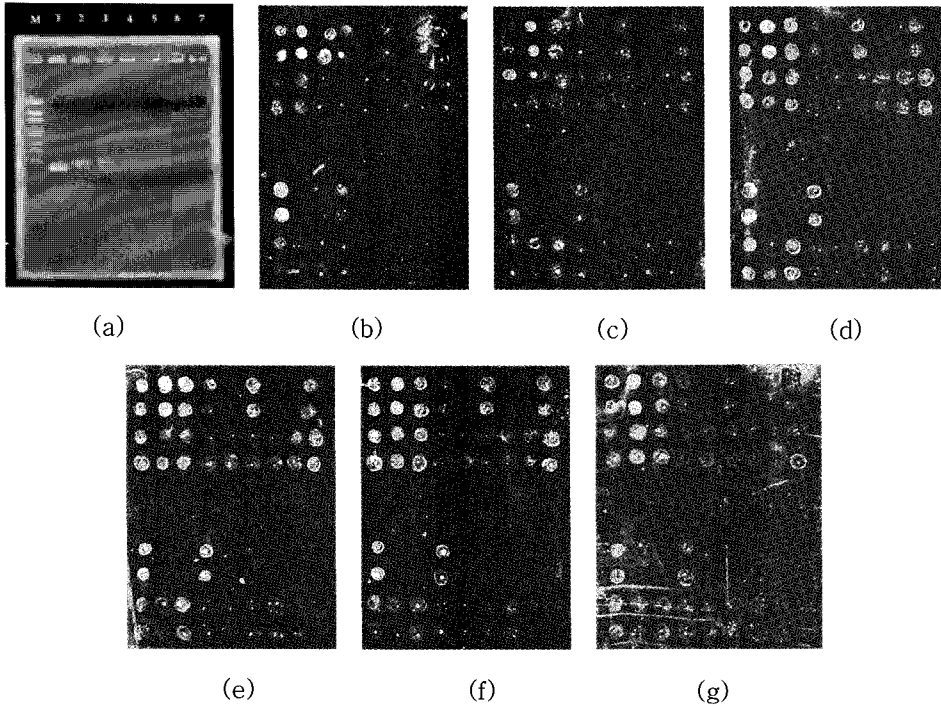


Fig. 2. The hybridization of target DNA(mt511/531) treated with various concentrations of DNase I on the oligonucleotide chip.

(a) image of 2% agarose gel electrophoresis: M, marker; lane 1, PCR product; (b) 0U DNase I (a : lane 2); (c) 0.01U DNase I (a: lane 3); (d) 0.1U DNase I (a: lane 4); (e) 1U DNase I (a : lane 5); (f) 5U DNase I (a: lane 6); (g) 10U DNase I (a: lane 7)

프로브와 혼성화 시그널의 비교에 의해 빈발 돌연변이를 정확하게 검출함과 동시에 507-533 codon에서 발견되는 모든 점돌연변이를 예측할 수 있도록 고안되었다. 또한 모든 프로브는 T_{10} 을 스페이서(spacer)로 5'에 첨가하여 표적 DNA와 혼성화 반응시 그 효율을 높이고자 하였다. 표적 DNA는 T_{10} -mt 526c 프로브, mt 526c 프로브와 혼성화 반응시, T_{10} 스페이서가 유도된 T_{10} -mt 526c 프로브에만 확실하게 혼성화 반응되는 것을 확인 할 수 있었다(data not shown). 이것은 표적 DNA와 17 bp 프로브의 혼성화 반응시, T_{10} 이 입체적 장애(steric hindrance)를 감소시켜 그 효율을 증가시킨 것으로 해석된다.

올리고뉴클레오티드 칩 결과는 야생형(wt)과 돌연

변이형 타입(mt)의 형광세기를 상대적으로 비교함으로써 해석할 수 있었다. 즉, 돌연변이 프로브는 야생형 프로브와 비교시, 동일한 염기서열이나 서열 중간 위치에 단 한 개의 상이한 염기 서열을 가짐으로써 표적 DNA와 혼성화되는 정도가 다르며 이로 인한 두 점의 형광 시그널의 차이로 돌연변이 유무를 보다 정확히 해석할 수 있었다. 또한 상대적인 형광세기를 수치화하여 비교함으로써 더 명확하게 확인할 수 있다. 그림 3의 (e)를 예로 들면 mt531 프로브와 이에 상응하는 wt 프로브인 F7의 시그널 세기를 비교해 볼 때 wt 시그널이, 그리고 mt516a 프로브와 상응하는 wt 프로브인 F3의 시그널이 더 강하므로 531, 516 지역에는 돌연변이가 없으므로 해석한다. 동일하게

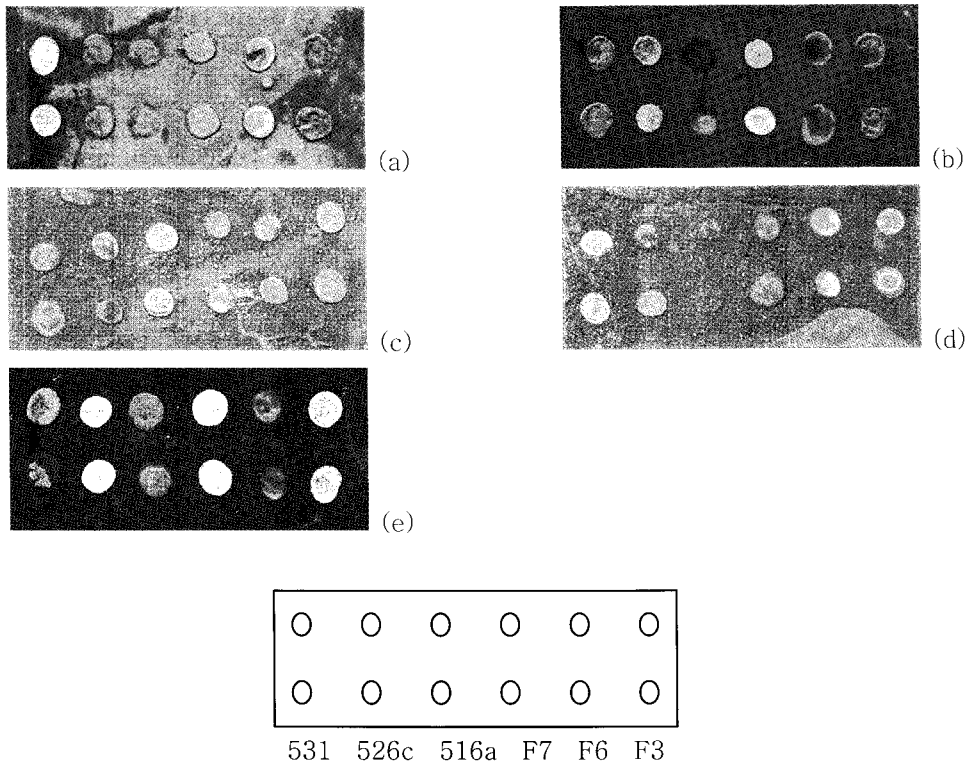


Fig. 3. Fluorescence images of the oligonucleotide chip hybridized with biotin-labeled PCR products: F3, F6, F7, wild type probes; 516a, 526c, 531, mutant probes; mutant-wt probe comparison pairs; 516a-F3, 526c-F6, 531-F7. (a) #2(mt531), (b) #12(mt526), (c) #9(mt516a), (d) #12(mt531), (e) #27(mt526c).

mt526c와 그 wt F6의 시그널을 비교해 보면 mt526c의 시그널이 더 강하므로 526c 돌연변이임을 알 수 있다. 같은 방법으로 (a)와 (b)는 각각 531, 526c 돌연변이로 읽을 수 있으나 wt F3와 mt516a 시그널이 모두 약한 것으로 볼 때 516 codon 부근에 516a가 아닌 다른 돌연변이가 있을 것으로 예측된다.

위에서 제시한 올리고뉴클레오타이드 칩으로 15개의 임상 분리체를 혼성화 반응 및 그 형광 이미지를 비교하여 해석한 결과, #9는 올리고뉴클레오타이드 칩으로는 mt 516a로 RIB 감성 분리체로 판명되었으나 RIB 감수성 실험시 내성으로 나타나 차이를 보였다.

그러나 염기 서열 분석 결과 역시 516a 돌연변이로 판정되었고 516a 돌연변이의 RIB 감수성에 대해서는 서로 다른 보고가 발표되어 있으므로 칩 결과가 틀린 것으로 단정하기는 어렵다. L. B. Heifets에 의하면 511(Leu>Pro), 516a(Asp>Val), 516b(Asp>Tyr), 522(Ser>Leu)의 돌연변이를 갖는 균종은 RIB MIC가 0.5 μ g/ml로 낮은 내성 균종으로 분류되어야 한다고 보고되었다¹³. 즉, 516 codon에 의한 RIB 감수성은 그 양상에 따라 매우 다양하기 때문에 항상 돌연변이 존재 여부에 관한 실험 결과와 약제 감수성 결과(MIC)가 함께 고려되어야 한다고 생각된

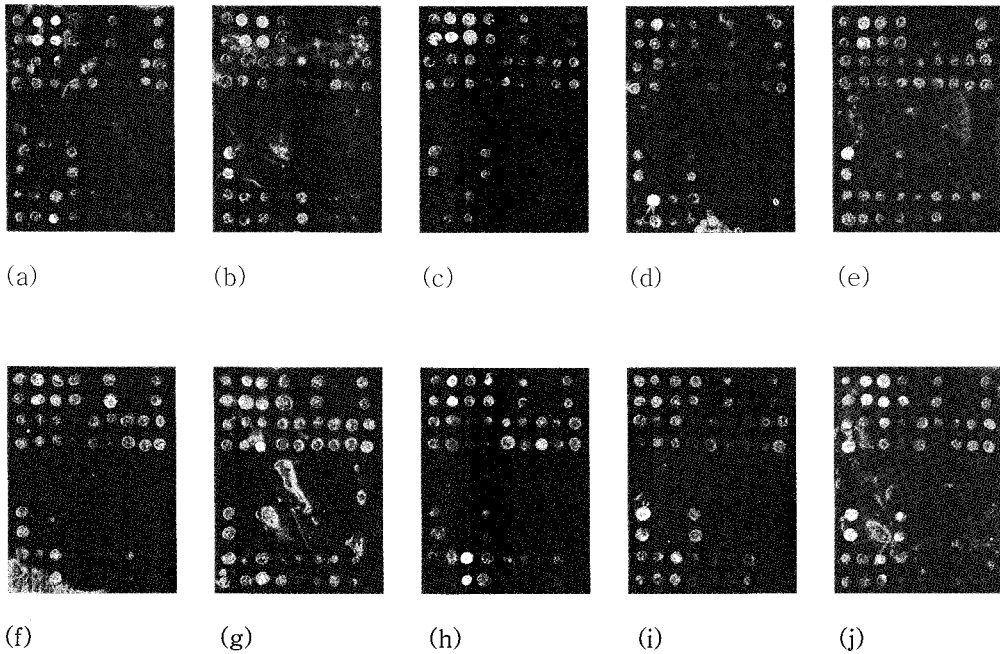


Fig. 4. Fluorescence images of the oligonucleotide chip hybridized with biotin-labeled PCR products. (a) #22(mt516c), (b) #24(mt526/mt526e), (c) #30(mt531), (d) #36(mt516b), (e) #48(mt526f), (f) #82(mt531/mt516c) (g) #87(mt531/mt516c) (h) #90(mt516c/mt526d) (i) #91(mt531) (j) #94(mt511/mt531).

다. 그러나 526 codon에서 유발되는 돌연변이는 His >Gln, Gly, Asn, Ala, Cys은 RIB 감수성, His >Tyr, Pro, Arg, Asp는 RIB 내성으로 판별되기 때문에 mutation detection 만으로 그 susceptibility를 유추할 수 있을 것으로 판단된다. #24의 경우, INNO-LiPA Rif. TB kit의 결과는 526b로, 염기 서열분석 결과는 526e로 나타났으며 칩 실험으로는 두 가지 돌연변이가 동시에 발견되었다. RIB 감수성 실험결과도 4.0까지 내성이며 그 이상에서는 감수성으로 나타난 것으로 볼 때 결핵균주가 섞여 있는 것으로 판단되었다. 따라서 약제내성 실험 결과와 차이는 있으나 모두 칩 결과가 더 신빙성이 있다고 판단된다. 염기서열분석 결과와 비교시 #22를 제외한 모든 임상 분리체가 칩 결과와 잘 일치함을 알 수 있었다. 그러나 #22의 경우 RIB 감수성인 임상 분리체이나 염기서열분석 결과는 RIB 감수성과 관련된 돌연변이를

전혀 포함하고 있지 않으므로 칩 결과처럼 516c 돌연변이일 가능성이 큰 것으로 사료된다. 위의 시료들을 반복실험을 통하여 검증하였을 때도 같은 결과를 얻었다(data not shown). 결론적으로 RIB 감수성 결과와 비교하였을 때 올리고뉴클레오티드 칩의 결과가 염기서열분석 결과등 다른 돌연변이 판별 방법에 비해 가장 정확한 정보를 제공하였으며 재현성도 매우 높음을 알 수 있었다.

위에서 제시한 바와 같이 결핵을 유발하는 *Mycobacterium tuberculosis*의 *rpoB* 유전자에서 보여지는 돌연변이를 올리고뉴클레오티드 칩으로 판별하고자 하였으며 *rpoB* 유전자 돌연변이와 관련하여 RIF과 RIB의 감수성을 조사하기 위하여 15 개의 임상 분리체를 올리고뉴클레오티드 칩으로 조사하였다. 그 결과 13개 임상 분리체의 올리고뉴클레오티드 칩 결과가 RIB 감수성 실험결과와 일치하였으며, 차이를

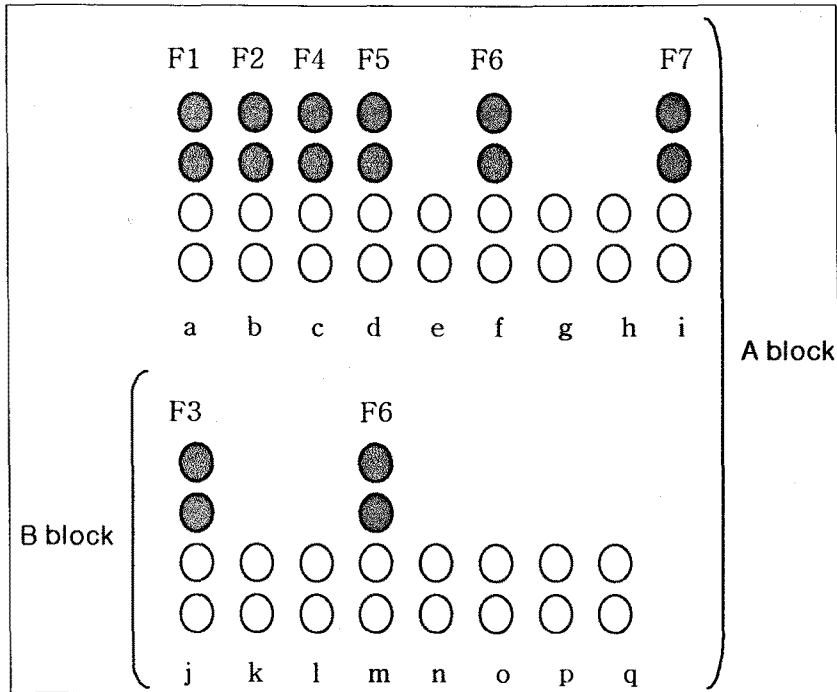


Fig. 5. The format of oligonucleotide chip used in Fig. 4

A block : RIF-resistant probes

B block : RIB-resistant probes

Wild type probes are placed right above the corresponding mutant probe groups for accurate comparison; F1-F6, wild type probes; a-q, mutant probes.

a : mt 511 b : mt 513 c : mt 518 d : mt 521 e : mt 522 f : mt 526a
 g : mt 526b h : mt 526c i : mt 531 j : mt 516a k : mt 516b l : mt 516c
 m : mt 526d n : mt 526e o : mt 526f p : mt 526g q : mt 526h

보였던 두 가지 임상 분리체는 돌연변이 자체의 내성 차이 또는 서로 다른 균주의 존재가능성을 배제할 수 없었으므로 올리고뉴클레오티드 칩결과의 평가가 불가능하였다. 염기서열분석이나 INNO-LiPA Rif. TB kit 등의 방법을 이용한 돌연변이 판별 결과와 RIB 감수성 실험결과를 종합하여 판단하였을 때, 올리고뉴클레오티드 칩 실험결과가 가장 신빙성이 있다고 사료되었다. 결론적으로 본 연구 결과로부터 염기서열분석이나 INNO-LiPA Rif. TB kit 등 기존의 돌연변이 판별 방법으로 명확히 탐지되지 않았던 RIF 내성 및 RIB 감수성을 올리고뉴클레오티드 칩을 이용하여 정확, 간편하게 진단할 수 있음이 증명되었으며, 이를 토대로 한 계속적인 연구개발로 올리고뉴클레오티드

칩을 이용하여 임상적으로 결핵 환자에게 적절한 약물 치료를 할 수 있도록 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 전망된다.

요 약

연구배경 :

결핵환자에 있어 *rpoB* 유전자 염기서열 돌연변이로 인해 생겨나는 rifampin(RIF)내성은 화학요법치료에서 나타나는 다제내성의 표지자로서 많은 연구가 되어 있으며 rifabutin(RIB)은 이러한 RIF의 내성을 보이는 일부 점돌연변이에 대하여 감성 또는 내성을 보이는 것으로 보고되고 있다. 그러므로 본 연구에서

Table 1. Mutations occurring in codons 507 through 533 of the *M. tuberculosis rpoB* gene

| <i>Codon</i> | <i>Variant nucleotide (Amino acid change)</i> |
|--------------|---|
| 510 | CAG(Gln)>CAT(His) |
| 511 | CTG(Leu)>CCg(Pro), CGG(Arg) |
| 512 | AGC(Ser)>ACC(Thr), CGC(Arg) |
| 513 | CAA(Gln)>CTA(Leu), AAA(Lys), CCA(Pro) |
| 515 | ATG(Met)>ATA(Ile) |
| 516 | GAC(Asp)>GTC(Val), TAC(Tyr), GAG(Glu), GGC(Gly) |
| 521 | CTG(Leu)>ATG(Met) |
| 522 | TCG(Ser)>TTG(Leu) |
| 526 | CAC(His)>TAC(Tyr), GAC(Asp), CGC(Arg), CTC(Leu), CCC(Pro), CAA(Glu), AAC(Asn), CAG(Gln) |
| 531 | TCG(Ser)>TTG(Leu), TGG(Trp), TGT(Cys), CAG(Gln) |

Table 2. Sequences of oligonucleotide primers and probes

| <i>probe or primer</i> | <i>Sequence</i> |
|---|--|
| <u>Wild type probes</u> | |
| F1 | 5' Amine-T ₁₀ -cagccagctgagccaat 3' |
| F2 | 5' Amine-T ₁₀ -gctgagccaattcatgg 3' |
| F3 | 5' Amine-T ₁₀ -attcatggaccagaaca 3' |
| F4 | 5' Amine-T ₁₀ -tggaccagaacaaccgg 3' |
| F5 | 5' Amine-T ₁₀ -caaccgctgtcgggg 3' |
| F6 | 5' Amine-T ₁₀ -ggttgaccacaagcgc 3' |
| F7 | 5' Amine-T ₁₀ -ccgactgtcggcgctgg 3' |
| <u>Rifampin-resistant probes</u> | |
| mt511 | 5' Amine-T ₁₀ -cagccagccgagccaat 3' |
| mt513 | 5' Amine-T ₁₀ -gctgagcccattcatgg 3' |
| mt516a | 5' Amine-T ₁₀ -attcatggtccagaaca 3' |
| mt516b | 5' Amine-T ₁₀ -attcatgtaccagaaca 3' |
| mt518 | 5' Amine-T ₁₀ -tggaccagcaaccgg 3' |
| mt521 | 5' Amine-T ₁₀ -caaccgctgtcgggg 3' |
| mt522 | 5' Amine-T ₁₀ -caaccgctgtgggg 3' |
| mt526a | 5' Amine-T ₁₀ -ggttgacctacaagcgc 3' |
| mt526b | 5' Amine-T ₁₀ -ggttgaccgacaagcgc 3' |
| mt526c | 5' Amine-T ₁₀ -ggttgaccgcaagcgc 3' |
| mt531 | 5' Amine-T ₁₀ -ccgactgttggcgctgg 3' |
| mt516c | 5' Amine-T ₁₀ -attcatggagcagaaca 3' |
| mt526d | 5' Amine-T ₁₀ -ggttgaccacaagcgc 3' |
| mt526e | 5' Amine-T ₁₀ -ggttgaccgccaagcgc 3' |
| mt526f | 5' Amine-T ₁₀ -ggttgacctgcaagcgc 3' |
| mt526g | 5' Amine-T ₁₀ -ggttgaccagcaagcgc 3' |
| mt526h | 5' Amine-T ₁₀ -ggttgaccggcaagcgc 3' |
| cf) Rifabutin-sensitive probes : "Bold character" | |
| <u>Primers</u> | |
| Bio-TR 8 | 5' biotin-tgcacgtcgggacctcc 3' |
| TR 9 | 5' tcgccgatcaaggagt 3' |

Table 3. Oligonucleotide chip results of clinical isolates and comparison with other test.

| Sample # | Chip result | Sequencing data | RIB susceptibility |
|----------|-------------|---|--------------------|
| 2 | 531 | - | 내성 |
| 3 | 526 | - | 내성 |
| 9* | 516a | 516a <i>gac</i> > <i>gtc</i> | 내성 |
| 12 | 531 | - | 내성 |
| 22 | 516c | 517 504 <i>gag</i> > <i>gat</i> 550 <i>gtg</i> > <i>atg</i> | 감수성 |
| 24* | 526b/526e | 509 <i>agc</i> > <i>aga</i> 526e <i>cac</i> > <i>gcc</i> | 4.0까지 내성, 감수성 |
| 27 | 526c | - | 내성 |
| 30 | 531 | - | 32까지 내성 |
| 36 | 516b | 516b <i>gac</i> > <i>tac</i> 517 | 감수성 |
| 48 | 526f | 517 526f <i>cac</i> > <i>tgc</i> | 감수성 |
| 82 | 531/516c | 531 <i>tcg</i> > <i>ttg</i> | 내성 |
| 87 | 531/516c | - | 내성 |
| 90 | 516c/526d | 516c <i>gac</i> > <i>gag</i> 517 526d <i>cac</i> > <i>aac</i> | 감수성 |
| 91 | 531 | - | 내성 |
| 94 | 511/531 | - | 내성 |

*Samples with chip result different from RIB susceptibility test.

는 mycobacteria *rpoB* 유전자의 특정 DNA 서열 (17 bp)을 고정한 올리고뉴클레오티드 칩을 개발하여 *rpoB* 유전자의 점돌연변이로 인한 RIF과 RIB의 감수성을 조사하고자 하였다.

방 법 :

사용된 올리고뉴클레오티드 칩은 RIF 내성 프로브 및 RIB 감성 프로브를 포함하도록 고안되었으며, 각각의 돌연변이에 상응하는 야생형 프로브를 동일한 염기서열에서 선정하여 형광 시그널 세기의 직접비교에 의해 보다 정확한 탐지를 가능하게 하였다.

결 과 :

15개의 임상 분리체를 검사한 결과 RIF 내성으로 밝혀진 돌연변이중 13개의 임상 분리체에서 RIB 감수성 돌연변이 종류를 판별할 수 있었다.

결 론 :

올리고뉴클레오티드 칩으로 *rpoB* 유전자에 대한 점돌연변이 연구는 결핵환자에 대한 RIF과 RIB 억제내성 유무를 판단케 함으로써 효과적인 화학요법치료를 가능케 할 것이며 기존 방법과 비교시 효율 및 재현성이 매우 높다고 판단되었다.

감사의 글

본 연구에 도움을 주신 제주대학교 의과대학 김범준 교수님께 감사 드립니다.

참 고 문 헌

1. Guo Z, Guilfoyle RA, Thiel AJ, Wang R, Smith LM. Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucleic Acids Res* 1994;22(24):5456-65.
2. Lipshutz RJ, Morris D, Chee M, Hubbell E, Kozal MJ, Shah N, et al. Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. *Biotechniques* 1995;19(3):442-7.
3. DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 1996;14(4):457-60.
4. Hellar RA, Schena M, Chai A, Shalon D, Bedilion T, Gilmore J, et al. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(6):2150-5.
5. Benson CA. Disease due to the *Mycobacterium avium* complex in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 1994;18:S218-22.
6. Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SP. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(11):5022-6.
7. Hunt JM, Roberts GD, Stockman L, Felmlee TA, Persing DH. Detection of a genetic locus encoding resistance to rifampin in mycobacterial cultures and in clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994;18(4):219-27.
8. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993;341:647-50.
9. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in Mycobacteria : Molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* 1995;8(4):496-14.
10. Della Bruna C, Schioppacassi G, Ungheri D, Jabes D, Morvillo E, Sanfilippo A. LM 427, a new spiropiperidylrifamycin : *in vitro* and *in vivo* studies. *J Antibiot* 1983;36:1502-6.
11. Dessen A, Quemard A, Blanchard JS, Jacobs WR Jr, Sacchettini JC. Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1995;267:1638-41.
12. Gillespie SH, Baskerville AJ, Davidson RN, Felmingham D, Bryceson AD. The serum rifabutin concentrations in a patient successfully treated for multi-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Antimicrob Chemother* 1990;25(3):490-1.
13. Heifets LB. Antituberculosis drugs : antimicrobial activity *in vitro*. In : Heifets LB, editor. Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections. 1st ed. Boca Raton, Florida: CRC Press ; 1991. p.14-57.
14. Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, Kim SJ, Bai GH, Kim SJ, et al. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene(*rpoB*). *J Clin Microbiol* 1999; 37(6):1714-20.
15. Miller LP, Crawford JT, Shinnick TM. The *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimi-*

– Detection of point mutations in the *rpoB* gene related to drug susceptibility –

- croB Agents Chemother 1994;38(4):805-11.
16. Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, De Rijk P, Portaels F. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB Assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. Antimicrob Agents Chemother 1997;41(10):2093-8.