

중합효소 연쇄반응을 이용한 결핵균의 증명(Ⅱ)

신 완 식 / 가톨릭대학 의학부 내과학교실

결핵균은 세포벽에 지질이 풍부한 항산성균으로 같은 종(species)에서도 배양 조건이나 균주(strain)에 따라 형태와 생합성능력(biosynthetic capabilities)에 차이가 나므로 DNA수준에서 증명하는 것이 가장 좋은 방법으로 생각되고 있다. 그러나 결핵균에서 DNA를 추출하는 것은 세포벽의 불투과성(impermeability) 때문에 대단히 어렵다. 과거에는 주로 세포 파괴 방법을 사용하였기 때문에 DNA가 손상되기 쉬웠으나 1986년 patel등이 유기용제를 이용하여 세포벽의 지질성분을 제거한 후 단백질해효소와 lysozyme등으로 세포벽을 침투시킬수 있게 됨에 따라 결핵균의 DNA를 손상받지 않고도 추출할 수 있게 되었다. 또한 bead beating 방법도 사용될 수 있으며 추출 과정에서 염이 생성되는 경우에는 gene cleaning 방법을 이용할 수도 있다.

그러나 결핵균에서 DNA를 추출하는 과정은 아직 정립되어 있지 않아 앞으로 많은 연구가 필요할 것이다. PCR에 사용되는 시발인자와 탐식자의 대표적 종류

는 표1과 같다.

Patel등은 모든 결핵균주에서 양성을 보였고 Pao등은 전체적으로 예민도 100%, 특이도가 62.6%라고 발표하였다. Hermans등은 예민도가 Hance등의 연구보다는 나올것이나 DNA추출과정이 아직 미흡하다 하였고, 특이도는 M. tuberculosis complex 46 균주중 41 균주에서 양성이었으며 non-M. tuberculosis complex 45균주에서 나타나지 않았다. Eisenach등은 M. tuberculosis이외에 M. simiae에서도 양성으로 나타남을 보고하였다.

이와같이 예민도가 높은 데 대해서도 모두 인정하고 있으나 특이도에서는 아직 문제가 있음을 알 수 있으며 현재까지는 어떤 primer를 사용해야 가장 좋은 것인지에 대해서는 확실하지 않다.

최근에는 'nested primer'를 이용한 이중 PCR이 시도되고 있으므로 우선 광범위하게 결핵균이 존재하는가를 보고 M. tuberculosis complex의 여부를 확인할 수도 있을 것이다.

표 1. 사용된 올리고핵산염 시발인자와 탐식자의 서열

name	sequence	reference
TB-1	5'GAGATCGAGCTGGAGGATCC	Hance et al ^a
TB-2	5'AGCTGCAGCCCAAAGGTGTT	
TB-3	5'GCGGCATCGAAAAGGCCGTG	
TB-4	5'CGAAATCGCTGCGGTGGCCG	
TB-5	5'CTGCCACCGCGGCCATCTCC	
TB-6	5'CTGCCACCGCCGGTATCTCC	
Mtb A	5'GGGTCGGTGA CTCCGGGGGCT	Patel et al ^b
Mtb B	5'CGGTGGGAACGGGGGCGCT	
Mtb C	5'TACGGATTC CGTCCACCGTCAT	
Mtb D	5'CACCGGCGGAACACT	
A	5'GGTCCTGACGGTAATGGGGT	Hermans et al ^c
D	5'CGCCATCCACATCCCGCCC	
E	5'GGACATCTCTGTCCATCCA	
1P	5'CTCAAGGAGCGCAAGCACCG	
2P	5'TTGAAGGCGATCTGCTT	
1	5'CTAGGTCGGGACGTGAGGCCAGG	Pao et al ^d
2	5'CATTGCGAAGTGATTCCTCCGGAT	
3	5'AGCGTAAGTATCGGGGTTGCCGTC ACCGGTGACCCCGT	
1	5'CCTGCGAGCGTAGGCGTCCGG	Eisenach et al ^e
2	5'CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG	

a. Molec. microbiol. 3(7):843-849, 1989.

b. J. Clin. Microbiol. 28:513-518, 1990.

c. J. Clin. Microbiol. 28:1204-1213, 1990.

d. J. Clin. Microbiol. 28:1877-1880, 1990.

e. J. Infect. Dis. 161:977-981, 1990.

PCR방법은 비용이 비교적 많이 소요되는 단점이 있으나 1-2일 이내에 결핵균을 검출할 수 있다는 장점 때문에 계속 크게 각광 받을 전망이지만 간단한 방법으로 조그만 실험실에서도 쉽게 사용되기 위해서도 앞으로 많은 연구와 노력이 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

PCR를 시행하는 데는 heat denaturation, annealing, extension의 세가지 단순반응을 계속적으로 반복하여 DNA의 양을 증폭하게 되는데 표2에서 보여주는 바와 같이 온도와 온도변환시간 및 횟수에 보고자에 따른 차이가 많다. 따라서 각 실험실에서는 실험조건의 변화에 따라 적절히 조절하지 않으면 안된다.

PCR로 증폭후의 분석은 시료를 동위원소와 digoxigenin등으로 혹은 단순함 ethidium bromide염색으로 검정하게 된다. 각 보고자에 따른 차이는 표3과 같으며 DNA는 결핵균 0.2개에 해당하는 1fg 수

준까지 가능하나 결핵균의 갯수로는 동위원소나 digoxigenin을 이용한 탐식자로 검정한 경우에 수십개가 존재하여야 하고 단순히 ethidium bromide염색을 한 경우에는 1,000개 이상이 있어야 가능하다.

동위원소를 이용한 탐식자들은 취급에 따른 여러가지 문제점들로 실제로 대부분의 병원에 있는 실험실에서는 사용하기 어렵고 digoxigenin을 이용한 탐식자는 임상검체에 존재하는 단백질이나 탄수화물등이 교잡(hybridization) 반응에 영향을 미쳐 임상검체에서 직접 증명하는 것은 예민도가 훨씬 떨어지게 된다. 그러므로 ethidium bromide염색만으로 검정하려 한다면 예민도를 높이기 위해 이중 PCR이 필요할 것으로 생각된다.

이상에서 언급한 바와같이 결핵균을 증명하는 데는 임상검체를 다루는 기법, 결핵균의 용해 방법, DNA의 정제(purification)등의 여러가지 제한요소들과 함께 PCR을 시행하는 온도, 온도변환시간, primer농도, 효소 및 DNA의 양에 따라 차이가 날뿐 아니라 양성시료에 의해 이미



증폭된 DNA가 오염될 우려가 있으므로 매우 유의하여야 한다.

맺음말

뇌척수액이나 말초혈액등 결핵균이 소수만 존재하는 검체에서 PCR로 결핵균의 DNA를 증명하는 것은 예민도가 매우 높을 뿐 아니라 신속하고 비침습적인 좋은 방법이지만 PCR의 높은 예민도는 장점과 동시에 단점도 될 수 있으므로 임상에서는 유의하지 않으면 안된다.

결핵이 의심되어 치료받고 있는 환자

에서 얻은 검체가 배양검사는 음성이고 PCR에서는 양성으로 나왔다면 이는 실험실에서 배양되기 힘든 결핵균을 환자가 아직도 갖고 있다는 것을 말하며 치료 실패를 의미하는 것은 아니기 때문이다.

또한 PCR방법은 비용이 비교적 많이 소요되는 단점이 있으나 1-2일 이내에 결핵균을 검출할 수 있다는 장점 때문에 계속 크게 각광 받을 전망이지만 간단한 방법으로 조그만 실험실에서도 쉽게 사용되기 위해서도 앞으로 많은 연구와 노력이 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

표 2. PCR에 시행된 온도, 시간 및 횟수

temperature (time)			cycle	reference
heat denaturation	annealing	extension		
94°C (1.5min)	50°C (2min)	72°C (2min)	40	Hance et al
95°C (2min)	37 or 50°C (3min)	72°C (5min)	25-40	Patel et al
94°C (2min)	55°C (2min)	72°C (3min)	35	Hermans et al
94°C (20sec)	63°C (20sec)	72°C (1min)	32	Pao et al
94°C (25min)	68°C (2min)	72°C (2min)	25	Eisenach et al

표 3. PCR로 증폭후의 분석

method	detectable organism number or DNA amount	reference
ethidium bromide staining	1,000 mycobacteria	Hance et al
hybridization c 32p labelled probe	3-60 mycobacteria	
ethidium bromide staining	1 fg of DNA	Patel et al
hybridization c digoxigenin labelled probe	20 mycobacteria	Hermans et al
hybridization c 32p labelled probe	0.1 pg of DNA	Pao et al
ethidium bromide staining	1 fg of DNA	Eisenach et al

†