

Detection of *Mycobacterium leprae* by Nested PCR Targeting *M. leprae*-Specific Repetitive Element (RLEP) Sequence

Hye-Young Wang¹, Yeun Kim¹, Hye-Eun Bang¹, Hyun-Chul Kim¹,
Sang-Nae Cho² and Hyeyoung Lee^{1†}

¹Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences,
Yonsei University, Kangwon 220-710, Korea.

²Department of Microbiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752, Korea

The aim of this work was to validate a rapid and an accurate method for detecting *Mycobacterium leprae* in clinical specimens using nested PCR targeting *M. leprae*-specific repetitive element (RLEP) sequence. The primers were derived from the RLEP sequence which yield a 272 bp outer product and a 230 bp inner product. The specificity and the sensitivity of the nested PCR were compared with those of single PCR for detecting *M. leprae* using DNAs isolated from reference strain and various species of *Mycobacterium*. The results showed that the sensitivity of the nested PCR was about 100 to 1,000 times higher than that of the single PCR and also showed that both the single and the nested PCR were highly specific to *M. leprae*. Subsequently, the usefulness of the single and nested PCR was evaluated with clinical samples isolated from leprosy patients. The number of positive detections by the single and the nested PCR with a total of 20 specimens from leprosy patients were 9 (45%) and 20 (100%), respectively. The results clearly showed that nested PCR has highest sensitivity in detecting *M. leprae* from clinical specimens. Therefore, nested primers targeting RLEP sequence developed in this study seems to be useful to detect the presence of *M. leprae*.

Key Words: *Mycobacterium leprae*, Repetitive element sequence (RLEP), Nested PCR

서 론

나병은 나균인 *Mycobacterium leprae*에 의해 발생하는 만성 염증성 질환으로, 지속적인 다제약물치료 (multi-drug therapy; MDT)로 질병의 발병을 줄이고 있지만, 아직도 세계적인 보건문제이다 (Chae et al., 2002). 나균은 인공배지로 균이 배양되지 않으며, 기존의 조직학적, 혈청학적 진단법이나 피부 도말검사, 피부 지각검사를 사용하는데 민감성과 특이성이 낮아 특징적인 피부병변을 보이지 않는 초기의 환자에서 나병을 진단하기는 매우 어렵다. 또한, 나균의 진단은 피부 도말검사서 항산성균 염색 (acid-fast bacilli, AFB)을 하여 현미경상에서 균이 존재하는지의 여부를 기초로 하고 있는데 항산성 염색에서 양성을 나타내는 균일지라도 나균으로 확진 할 수 없고 현미경상에서 균을 관찰할 수 있는 최소한의 균수가 피부조직의 10⁴/g 정도로 상당히 많은 양이 존

재해야 하며, MOTT (mycobacteria other than tuberculosis)에 속하는 다른 항산균이 섞여 있을 경우에는 모든 mycobacteria가 AFB 염색 양성으로 나타나 감별이 불가능하다 (Kang et al., 2003; Donoghue et al., 2001; Kurabachew et al., 1998). 그러므로 조직학적 검사에서 균이 발견되지 않고 염증성 반응이 비특이적이며 신경 내 염증 소견이 나타나지 않는다면 나병의 진단은 거의 불가능하여 많은 어려움을 겪고 있다.

따라서 나균을 검출하는데 면역학적, 생화학적 방법, 그리고 핵산 표식자 (probe)를 이용하려는 시도가 이루어지고 있으며 이러한 방법으로 기존의 진단법이 가지고 있는 낮은 특이성과 민감도를 극복하려 하고 있다 (Plikaytis et al., 1990).

최근에는 분자생물학적 진단법의 한가지인 중합효소 연쇄 반응 (polymerase chain reaction: PCR)이 환자의 여러 가지 종류의 검체를 사용하여 직접 나균의 핵산을 분리하고 이중에서 원하는 부위의 핵산만을 선택적으로 증폭시켜 매우 적은 수의 나균도 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 진단방법으로 이용되고 있으며 (Plikaytis et al., 1990; Santos et al., 1993; Kampirapap et al., 1998; Scollard et al., 1998; Chae et al., 2002; Kang et al., 2003; Torres et al., 2003; Patrocínio et al., 2005), PCR 단독 혹은 DNA probe를 이용하는 방법과의 병용으로 1~10개의 나균의 DNA까지 검출할 수 있다고 보고되

*논문 접수: 2007년 2월 2일

수정재접수: 2007년 3월 15일

†교신저자: 이혜영, (우)220-710 강원도 원주시 흥업면 매지리 234, 연세대학교 보건과학대학 임상병리과
Tel: 033-760-2740, Fax: 033-760-2934
e-mail: hyelee@yonsei.ac.kr

고 있다. 본 연구에서는 나균의 특이 유전부위인 repetitive sequence (RLEP)를 이용하여 이중 증합효소 연쇄반응 (nested-PCR)으로 증폭을 시도하였다. 이 방법은 증폭하려는 유전자 부분을 먼저 outside primers로 증폭시키고 여기서 얻어진 반응 산물의 염기서열 중 일부분을 목표로 하는 inside primers와 반응시켜 2번째 증폭을 시행하여 적은 수의 DNA로도 효과적으로 증폭시킬 수 있어서 특이성과 민감도 면에서 1쌍의 primer만을 사용했던 기존의 증합효소 연쇄반응보다 뛰어나다고 볼 수 있다 (Plikaytis et al., 1990). 따라서 2쌍의 primer를 가지고 nested-PCR을 이용하여 나균의 검출률을 관찰하여 PCR 검사법의 진단적 가치를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. DNA의 추출

표준균주로 사용된 *M. leprae* strain 4264는 Louisiana State University의 National Hansen's Disease Program에서 정제된 100 mg (평균 2.9×10^9 bacilli/mg 포함) *M. leprae*를 제공받아 QIAamp DNA Mini Kit (Tissue protocol; Qiagen GmbH, Hilden, Germany)에 의해 DNA를 분리하여 최종농도를 50 ng/ μ l로 하여 사용하였다. 임상에 이용된 피부생검조직은 필리핀의 Leonard Wood Memorial Center에서 나병이 의심되는 환자들로부터 채취한 피부생검조직을 제공받아 Qiagen manual (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)에 의해 DNA를 분리하여 최종 200 μ l로 하여 사용하였다.

2. 균주에서의 DNA의 추출

M. avium, *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. intracellulera*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. scrofulaceum*, *M. celatum*, *M. szulgai*, *M. africanum*, *M. marinum*, *M. mucogenicum*, *M. abscessus*, H37RV, *M. goodii*은 연세대학교 임상병리학과에서 제공된 균주를 이용하였으며, 배양한 균체에서 lysozyme을 5 mg/ml로 가하여 37°C에서 1시간, 1 mg/ml의 proteinase K 및 1% SDS를 가하여 55°C에서 24시간 반응시켰다. CTAB를 첨가하여 65°C에서 10분간 반응시키고 페놀 처리 및 에탄올 침전하여 DNA를 얻었다.

3. PCR

나균 DNA의 repetitive sequence (GenBank accession No. AL583917) 중에서 National Center for Biotechnology information (NCBI)에서 제공되는 Blast search를 통하여 유사염기서열을 추출한 후 MultAlin program을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 예상되는 증폭산물이 각각 272-bp, 230-bp의 크기가 되도록 R1 (5'-CGGGGTAGGGGCGTTTTAGT-3')과 R2 (5'-CTAGAAGGTTGCCGTATGTG-3') 그리고 R3 (5'-GCGTTTAA-

GTGTGCATGTCA-3')과 R4 (5'-GGATCATCGATGCACTGTTTC-3') 2쌍의 primer를 제작하였다 (Bioneer, 대전, 한국). PCR 반응액으로는 총 20 μ l 내에 Bioneer premix, 각각 10 pmol의 primer와 template DNA 1 μ l를 첨가하였다. 반응조건으로는 predenaturation을 94°C에서 5분간 1회 수행한 후에 R1, R1로 94°C에서 5분 denaturation, 51°C에서 30초 annealing, 72°C에서 30초 extension으로 35회 실시하였고, 여기서 나온 반응 산물 중 1 μ l를 취하여 R3, R4로 두 번째 증폭을 94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 30초로 35회 반복하고, 72°C에서 10분간 post-extension을 실시하였다. 유전자 증폭기는 GeneAmp 2700 (Applied Biosystems, USA)을 사용하였다. 증폭된 유전자 산물은 2% agarose gel 상에서 전기영동을 수행하여 분리하였고, ethidium bromide (EtBr, Sigma, USA)로 DNA의 염색을 실시하였다. PCR 증폭 여부와 증폭 산물의 크기는 Gel Doc EQ (Bio Rad, USA)을 이용하여 관찰하였고, DNA size marker로는 100 bp DNA ladder (Bioneer, 대전, 한국)로 사용하였다.

4. 유전자 클로닝 및 염기서열 분석

증폭된 유전자는 Multiple elution kit (Biosolution, 대전, 한국)를 사용하여 PCR 산물을 추출하였다. 추출된 DNA를 Topo 21 (Invitrogen, USA) vector에 결합시켜, 형성된 재조합 plasmid를 Top 10 *E. coli* competent cells 내에 삽입하여 형질 전환시켰다. 재조합 클론은 선택표지인 ampicillin (100 μ g/ml)을 이용하여 선별하였으며, 재조합 plasmid DNA는 plasmid mini prep kit (Biosolution, 서울, 한국)를 사용하여 추출하였다. 유전자 염기서열은 제노텍 (Genotech, 대전, 한국)에 의뢰하였다. 또한 분석된 유전자 염기서열은 Blast network service를 이용하여 분석하였다.

결 과

1. *M. leprae*의 RLEP sequence의 비교

나균의 표준 DNA strain 4264와 임상 샘플 DNA를 이용하여 cloning을 시행한 후 GenBank [http://www.ncbi.nlm.nih.gov] 상에 있는 여러 다른 균주의 RLEP 염기서열을 비교한 결과 표준균주와 임상샘플 모두가 GenBank 상에 나와 있는 나균 관련 RLEP 염기서열과 일치함을 알 수 있었다 (Fig. 1). 이를 근거로 나균검출용 PCR primer 두 쌍을 nested PCR을 위해 고안하였다.

2. Single PCR과 nested PCR의 *M. leprae* 검출 특이도

나균을 진단하기 위하여 제작된 RLEP primer 쌍이 *M. leprae*에만 특이적으로 반응하는지를 알아보기 위해 15개의 Mycobacterium spp. 대조용 DNA를 가지고 single PCR과

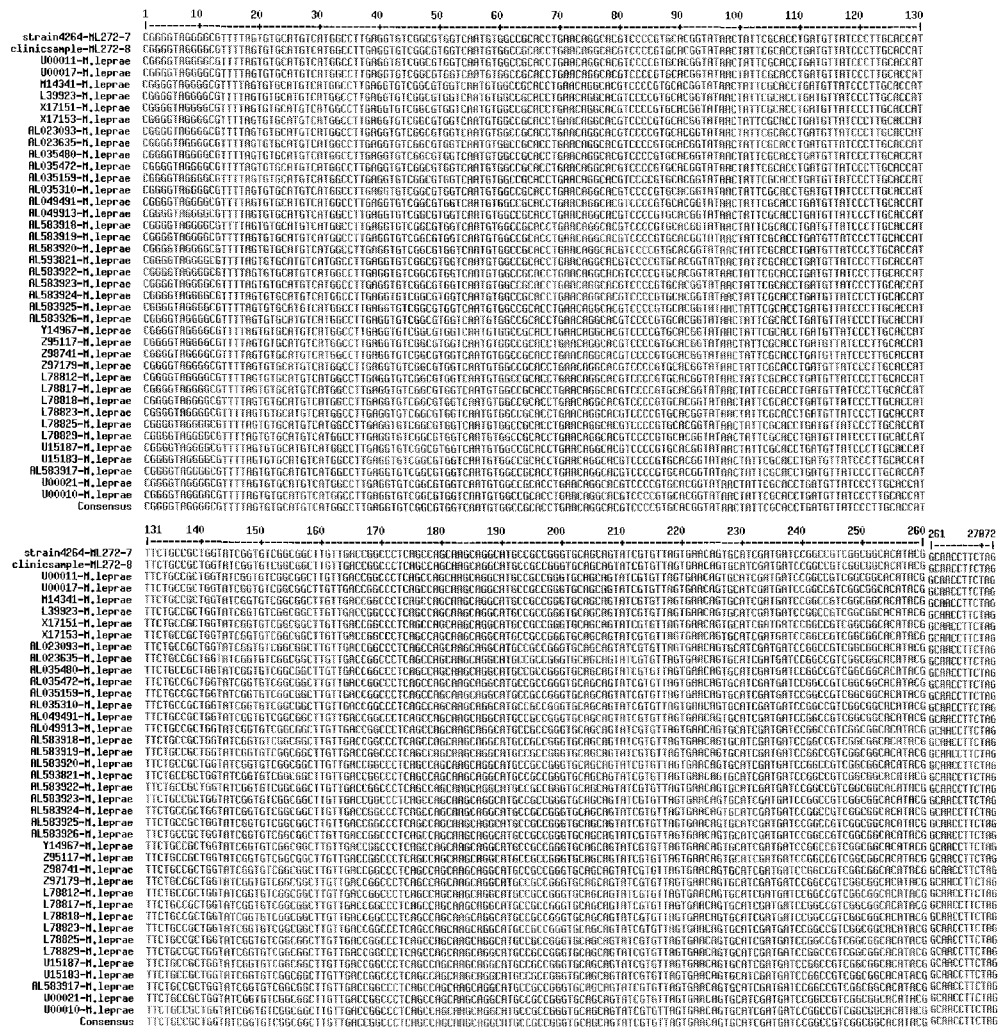


Fig. 1. Comparison of RLEP sequence of *M. leprae* reference strain 4264 (ML 272-7) and Clinical sample (ML 272-8) with the existing 38 sequence registered in GenBank database using multialign program. U00010; *M. leprae* cosmid B1170, U00021; *M. leprae* cosmid L247, AL583917; *M. leprae* strain TN complete genome, U15183; *M. leprae* cosmid B1740, U15187; *M. leprae* cosmid L296, L78829; *M. leprae* cosmid B998, L78825; *M. leprae* cosmid B1723, L78823; *M. leprae* cosmid B13, L78818; *M. leprae* cosmid B32, L78817; *M. leprae* cosmid B27, L78812; *M. leprae* cosmid B1229, Z97179; *M. leprae* cosmid L383, Z98741; *M. leprae* cosmid B22, Z95117; *M. leprae* cosmid B1351, Y14967; *M. leprae* cosmid B628, AL583926; *M. leprae* strain TN complete genome, AL583925; *M. leprae* strain TN complete genome, AL583924; *M. leprae* strain TN complete genome, AL583923; *M. leprae* strain TN complete genome, AL583922; *M. leprae* strain TN complete genome, AL593821; *M. leprae* strain TN complete genome, AL583920; *M. leprae* strain TN complete genome, AL583919; *M. leprae* strain TN complete genome, AL583918; *M. leprae* strain TN complete genome, AL049913; *M. leprae* cosmid B1610, AL049491; *M. leprae* cosmid B1222, AL035310; *M. leprae* cosmid B2533, AL035159; *M. leprae* cosmid B1450, AL035472; *M. leprae* cosmid B596, AL035480; *M. leprae* cosmid B12, AL02363; *M. leprae* cosmid B1243, AL023093; *M. leprae* cosmid B2548, X17153; *M. leprae* repetitive element, RLEP3, X17151; *M. leprae* repetitive element, RLEP2, L39923; *M. leprae* cosmid L222 DNA sequence, M14341; *M. leprae* 65 kD antigen, U00017; *M. leprae* cosmid B2126, U00011; *M. leprae* cosmid B1177.

nested PCR을 각각 수행하였다. 그 결과 두 PCR 결과 모두에서 나균에서만 특이적으로 RLEP 유전자 단편이 증폭되었으며, 대조군으로 사용한 DNA에서는 모두 증폭되지 않았다 (Fig. 2).

3. Single PCR과 nested PCR의 *M. leprae* 검출 민감도 나균 검출을 위한 single PCR법과 nested PCR법과의 민감도

도를 비교 분석하기 위해 *M. leprae* strain 4264 DNA를 연속적으로 10배씩 희석한 후 PCR의 template DNA로 각각 사용하였다. 그 결과 single PCR에서는 10 pg 이상에서 증폭되었으나, nested PCR에서는 10 fg에서 RLEP 유전자가 증폭되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 따라서 nested PCR을 이용한 진단법이 single PCR을 이용한 진단법보다 약 100~1,000배 정도 민감성이 높은 것을 알 수 있었다.

4. 임상 시료에서 RLEP sequence의 검출 효율성

나병 환자의 피부조직에서 추출된 DNA로부터 RLEP의 특이 유전자 검출을 실시하였다. 그 결과 총 20개의 시료 중 single PCR을 이용한 방법으로는 9개 (45%)의 검체에서 양성 결과가 나온 반면 nested PCR을 이용한 방법으로는 20개 (100%) 모두에서 RLEP sequence의 증폭이 관찰되었다. 따라서 nested PCR을 이용한 방법이 single PCR을 이용한 진단 방법보다 높은 효율성을 나타내었다 (Fig. 4).

고 찰

지금까지 나병의 진단은 임상 소견과 항산성균 염색에 주로 의존하여 왔으며, 나균을 시험관 내에서 배양할 수 없기

때문에 감염병의 진단에 필수적인 실험실내에서 균 증식과 동정을 거치지 못하는 것이 나병 진단의 가장 큰 취약점이었다.

나병 진단에 있어서 혈청학적 방법 (Buhner-sekula et al., 2003)과 분자 표식방법 (Clark-surtiss and Docherty, 1989)을 이용하여 환자에서 나균의 검출과 분리를 시도 했으나, 어떤 잠재적인 체내의 면역 방어 상태에 따라 검출, 동정할 수 있기 때문에 나균의 검출이 어렵고, 조직학적 발견도 비특이적이다 (Martinez et al., 2006). 이 방법은 특이도와 민감도 부분에서 낮기 때문에 (Kang et al., 2003), 최근에는 적은 균체 수가 존재할 경우 나균을 검출하기 위하여 다양한 계놈 염기서열, 즉, 나균에 특이하다고 알려진 65 kDa 항원 유전자 (Plikaytis et al., 1990), 18 kDa 항원 유전자 (williams et al., 1992), 36 kDa 항원 유전자 (Parkash et al., 2004), repetitive sequences (Woods and Cole, 1989; Yoon et al., 1993) 등을 중합 효소 연쇄반응을 통하여 DNA를 증폭시키는 방법이 널리 사용되고 있다 (Almeida et al., 2004; Donoghue et al., 2001).

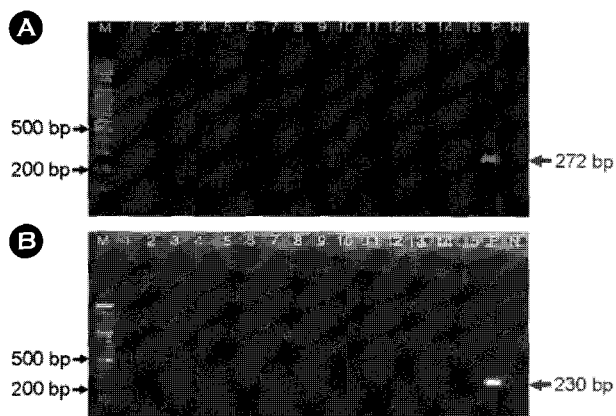


Fig. 2. The specificity of the single PCR (A) and the nested PCR (B). M, 100 bp DNA ladder (Bioneer, Daejeon, Korea), lane 1, H37RV, lane 2, *M. avium*, lane 3, *M. chelonae*, lane 4, *M. intracellulare*, lane 5, *M. kansasii*, lane 6, *M. scrofulaceum*, lane 7, *M. terrae*, lane 8, *M. triviale*, lane 9, *M. africanum*, lane 10, *M. celatum*, lane 11, *M. marinum*, lane 12, *M. szulgai*, lane 13, *M. mucogenicum*, lane 14, *M. abscessus*, lane 15, *M. gortuitum*, lane 16, *M. leprae*, P, positive control; N, negative control.

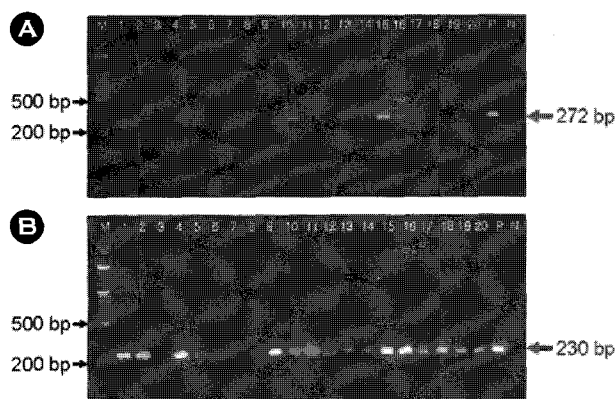


Fig. 4. Detection of *M. leprae* using single PCR (A) and the nested PCR (B) from clinical specimens isolated from leprosy patients (Lanes 1-20). P, positive control; N, negative control; M, 100 bp DNA ladder (Bioneer, Daejeon, Korea).

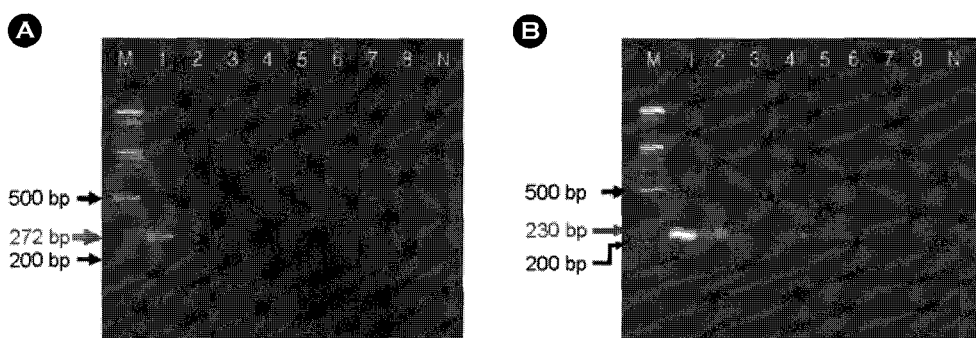


Fig. 3. The sensitivity of the single PCR (A) and the nested PCR (B) using reference strain of *M. leprae* (strain 4264). M, 100 bp DNA ladder (Bioneer, Daejeon, Korea), lane 1, 10 ng, lane 2, 1 ng, lane 3, 100 pg, lane 4, 10 pg, lane 5, 1 pg, lane 6, 100 fg, lane 7, 10 fg, lane 1 fg, N, negative control.

이 중에서 나균 유전자의 repetitive sequence는 다른 항산균이나 세균에는 존재하지 않는 특이 염기서열로 알려져 있으며, repetitive sequence가 하나의 나균 유전자에 약 28 copy가 존재하기 때문에 (Woods and cole, 1990) 한 개의 세포에 1 copy가 존재하는 18 kDa 항원 유전자보다 훨씬 높은 민감도를 보이며 (Donoghue et al., 2001; Kang et al., 2003), PCR을 시행하여 전기영동 또는 dot blot hybridization으로 1개의 나균까지도 검출하여 다른 표적 유전자를 이용할 때에 비하여 높은 민감도를 유지하는 것으로 보고되었다.

나균만을 특이적으로 진단하기 위하여 제작된 RLEP primer 쌍은 single PCR과 nested PCR 모두에서 *M. leprae*에만 특이적으로 반응을 하였고, 대조균으로 사용한 *M. tuberculosis*를 포함한 15종의 *Mycobacterium*과는 반응을 하지 않았다. 이러한 결과로 보아 RLEP primer 쌍을 이용한 PCR법은 나균에 대한 진단의 특이성이 높다는 점을 확인할 수 있었다.

또한, *M. leprae*의 표준 균주에 의한 민감성의 비교 분석에서 nested PCR을 이용한 진단법이 single PCR을 이용한 진단법 보다 약 100~1,000배 정도의 민감성이 높다는 점도 알 수 있었다 (Fig. 3). Nested PCR은 원하는 부분이 잘 증폭되기 위해서는 4개의 primers가 부착해야 하고, outer primers를 이용한 첫 번째 증폭효소 연쇄반응을 실시하고 여기서 나온 산물로 두 번째 증폭을 할 때에는 다시 새로운 시약을 첨가하기 때문에 반응이 원활하게 일어날 수 있으며, 한 쌍의 primers가 비교적 적은 횟수의 반응을 하여 전기영동 후 사진에서 관찰되는 의미 없는 band들을 없앨 수 있어서 민감도와 특이성이 높일 수 있는 장점을 가지고 있다 (Plikaytis, 1990).

따라서 피부 생검조직에서 항산성 염색으로 균을 검출하지 못한 경우나, 검출하고자 하는 병원체의 수가 소량일 경우, 많은 수의 검체를 동시에 처리해야 하는 경우에 나균의 repetitive sequence를 이용한 nested PCR방법은 신속하고 나균에 특이적이며 높은 민감도를 가지고 있어서 나균 진단에 있어서 유용하리라 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2003년도에 선정된 한국학술진흥재단의 지방대학육성지원사업 연구비 (KRF-2003-E00099) 지원에 의해 이뤄졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

Buhrer-Sekula S, Smits HL, Gussenhoven GC, van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, Klatser PR, Oskam L. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy.

J Clin Microbiol. 2003. 41: 1991-1995.
 Chae GT, Kim MJ, Kang TJ, Lee SB, Shin HK, Kim JP, Ko YH, Kim SH, Kim NH. DNA-PCR and RT-PCR for the 18-kDa gene of *Mycobacterium leprae* to assess the efficacy of multi-drug therapy for leprosy. J Med Microbiol. 2002. 51: 417-422.
 Clark-Curtiss JE, Docherty MA. A species-specific repetitive sequence in *Mycobacterium leprae* DNA. J Infect Dis. 1989. 159: 7-15.
 Donoghue HD, Holton J, Spigelman M. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. J Med Microbiol. 2001. 50: 177-182.
 Kampirapap K, Singtham N, Klatser PR, Wiriyawipart S. DNA amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1998. 66: 16-21.
 Kang TJ, Kim SJ, Lee SB, Chae GT, Kim JP. Coparison of Two different PCR amplification products (the 18-kDa protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in the diagnosis of *Mycobacterium leprae*. Clin Exp Dermatol. 2003. 28: 420-424.
 Katoch VM, Girdhar BK. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA for 36kDa protein in urine from leprosy patients: a preliminary report. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2004 46: 275-277.
 Kurabachew M, Wondimu A, Ryon JJ. Reverse transcription-PCR detection of *Mycobacterium leprae* in clinical specimens. J Clin Microbiol. 1998. 36: 1352-1356.
 Martinez AN, Britto CF, Nery JA, Sampaio EP, Jardim MR, Sarno EN, Moraes MO. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. J Clin Microbiol. 2006. 44: 3154-3159.
 Parkash O, Singh HB, Rai S, Pandey A, Katoch VM, Girdhar BK. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA for 36kDa protein in urine from leprosy patients: a preliminary report. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2004. 46: 275-277.
 Patrocinio LG, Goulart IM, Goulart LR, Patrocinio JA, Ferreira FR, Fleury RN. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005. 44: 311-316
 Plikaytis BB, Gelber RH, Shimmick TM. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. J. Clin Microbiol. 1990. 28: 1913-1917.
 Santos AR, De Miranda AB, Sarno EN, Suffys PN, Degraive WM. Use of PCR-mediated amplification of *Mycobacterium leprae*

- DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. *J Med Microbiol.* 1993. 39: 298-304.
- Scollard DM, Gillis TP, Williams DL. Polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Mycobacterium leprae* in patients in the United States. *Am J Clin Pathol.* 1998. 109: 642-6.
- Torres P, Camarena JJ, Gomez JR, Nogueira JM, Gimeno V, Navarro JC, Olmos A. Comparison of PCR mediated amplification of DNA and the classical methods for detection of *Mycobacterium leprae* in different types of clinical samples in leprosy patients and contacts. *Lepr Rev.* 2003. 74: 18-30.
- Williams DL, Gillis TP, Booth RJ, Looker D, Watson JD. The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J Infect Dis.* 1990 162: 193-200.
- Woods SA, Cole ST. A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. *FEMS Microbiol Lett.* 1989 53: 305-309.
- Yoon KH, Cho SN, Lee MK, Abalos RM, Cellona RV, Fajardo TT Jr, Guido LS, Dela Cruz EC, Walsh GP, Kim JD. Evaluation of polymerase chain reaction amplification of *Mycobacterium leprae*-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients. *J Clin Microbiol.* 1993 31: 895-899.
-