

## 약제내성 결핵균의 검출을 위한 Oligonucleotide Chip의 개발

부산대학교 의과대학 생화학교실<sup>1</sup>, 부산대학교 자연과학대학 미생물학과<sup>2</sup>,  
부산대학교 의과대학 진단검사의학과<sup>3</sup>

송은실<sup>1</sup>, 박희경<sup>1</sup>, 장현정<sup>2</sup>, 김효명<sup>1</sup>, 장철훈<sup>3</sup>, 김철민<sup>1</sup>

=Abstract=

### Development of Oligonucleotide Chip for Detection of Drug-Resistant *Mycobacterium Tuberculosis*

Eunsil Song<sup>1</sup>, Heekyung Park, Ph.D.<sup>1</sup>, Hyunjung Jang, M.S.<sup>2</sup>, Hyomyung Kim<sup>1</sup>,  
Chulhun L. Chang, M.D.<sup>3</sup>, Cheolmin Kim, M.D., Ph.D.<sup>1</sup>

Departments of Biochemistry<sup>1</sup> and Laboratory Medicine<sup>3</sup>, College of Medicine, Pusan National University ;  
Department of microbiology<sup>2</sup>, College of Natural Science, Pusan National University

**Background** : The resurgence of tuberculosis and the widespread emergence of multidrug-resistant *M. tuberculosis* have emphasized the importance of rapid and accurate diagnostic procedures. Recently, the oligonucleotide chip has proven to be a useful tool in the rapid diagnosis of infectious diseases. The purpose of this study was to rapidly and accurately detect specific mutations in the *rpoB*, *katG* and *rpsL* genes associated with rifampin, isoniazid and streptomycin resistance in *M. tuberculosis*, respectively, using a single oligonucleotide chip.

**Method** : For detection of drug-resistance, 7 wild-type and 13 mutant-type probes for rifampin, 2 wild-type and 3 mutant-type probes for isoniazid, and 2 wild-type and 2 mutant-type probes for streptomycin were designed and spotted onto glass slides. Fifty-five cultured samples of *M. tuberculosis* were amplified by PCR, and then underwent hybridization and scanning. Direct sequencing was done to verify the results from the oligonucleotide chip and to analyze the types of mutations.

**Result** : Thirty-five cases out of 40 rifampin-resistant strains (~88%) had mutations in the *rpoB* gene. One case had a new mutation(D516F, GAC R TTC) and another known mutation together. Twenty

---

<sup>†</sup>이 논문은 2002년도 과학기술부 정책연구과제 (부산-0102) 연구비에 의하여 연구되었음.

Address for correspondence :

**Cheolmin Kim, M.D., Ph.D.**

Department of Biochemistry, College of Medicine, Pusan National University

#10, Amidong 1 Ga, Seogu, Pusan, 602-739, Korea

Phone : 051-240-7725 Fax : 051-248-1118 E-mail : kimcm@pusan.ac.kr

cases out of 42 isoniazid-resistant strains (~50%) had mutations in the *katG* gene, while 7 cases out of 9 streptomycin-resistant strains (~78%) had mutations in the *rpsL* gene. From these results, the oligonucleotide chip was confirmed to be able to detect the most frequent mutations from the genes associated with rifampin, isoniazid and streptomycin resistance. The results proved that the drug-resistance detection probes were specific. When the results from the oligonucleotide chip and DNA sequencing were compared, the types of mutations were exactly matched.

**Conclusion :** The diagnostic oligonucleotide chip with mutation specific probes for drug resistance is a very reliable and useful tool for the rapid and accurate diagnosis of drug resistance against rifampin, isoniazid and streptomycin in *M. tuberculosis* infections. (*Tuberculosis and Respiratory Diseases* 2003, 55:41-58)

---

**Key words :** Multi-drug resistance, *Mycobacterium tuberculosis*, Oligonucleotide chip, Rifampin, Isoniazid, Streptomycin.

---

## 서 론

결핵은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)에 의한 감염성 질환으로 전 인류의 약 3분의 1이 결핵균에 감염되어 있다. 전 세계적으로 매년 약 800만 명의 새로운 환자가 발생하고 300만 명이 이로 인해 사망하는 것으로 세계보건기구(WHO)는 추정하고 있다<sup>1</sup>. 개발도상국에서는 항결핵제의 부족으로 인한 부적절한 치료로 약제 내성균을 가진 만성 배균자가 증가되었다고 한다<sup>2</sup>. 중국을 비롯한 35개국에서 5년간 실시한 약제내성 조사에서, 한가지 이상의 약제에 내성을 보이는 경우가 36%에 달하고 리팜핀(Rifampin, RMP)과 아이소니아지드(Isoniazid, INH)를 포함한 2가지 이상의 약제에 내성을 보이는 다제내성결핵균 (Multidrug-resistant *M. tuberculosis*; MDR-TB)에 의한 결핵도 약 13%를 차지하고 있다. 우리나라의 경우도 한가지 이상의 약제에 대한 획득 내성률은 38.6%였고, 다제내성률도 27.5%로 매우 높게 보고되고 있다<sup>2,3</sup>. 이러한 높은 약제 내성률은 결핵환자의 조기 발견과 약제 감수성 검사결과의 빠른 확보가 매우 중요함을 시사해주는 자료라 할 수 있겠다.

검사실에서 실시되는 일반적인 결핵균 검출방법은 우선 항산균염색(AFB staining)을 실시한 후 균배양을 하고 배양된 균에서 결핵균임을 확인하기 위한 생화학적 검사를 시행한다. 이 과정은 검체 채취로부터 결핵균 동정까지 4~6주가 소요되는데, 이는 결핵균의 세대기간이 12~18시간 정도로 긴 데 기인한다. 배양된 균의 약제 감수성 여부를 검사하는데 2~4주가 더 소요된다<sup>4</sup>. 결핵균의 약제내성 획득 이전에 관련된 연구가 활발히 진행되면서 리팜핀, 아이소니아지드와 스트렙토마이신 (Streptomycin, SM) 등의 내성 기전이 분자 수준에서 밝혀지고 있다. 리팜핀 내성의 94~98%가 *rpoB* 유전자에 의해 암호화되는 DNA 의존성 RNA 중합효소의  $\beta$  subunit에 포함된 69 bp의 제한된 지역내의 돌연변이에 의해 나타난다<sup>4,9</sup>. 아이소니아지드 내성은 50% 이상이 catalase-peroxidase를 암호화하는 *katG* 유전자의 변이에 의해 일어난다. 또한 아이소니아지드에 대한 내성은 mycolic acid의 생합성 경로에 작용하는 효소를 암호화하는 *inhA* 유전자, ( $\beta$ -ketoacyl-ACP-synthase를 암호화하는 *kasA* 유전자나 alkyl-hydroperoxidase를 암호화하는 *ahpC* 유전자의 조절 부위의

**Table 1.** *M. tuberculosis* used for the detection of drug resistance

No	Sample <sup>a</sup>	Resistance b, c			No	Sample <sup>a</sup>	Resistance b, c		
		RMP	INH	SM			RMP	INH	SM
1	MTBK-1	R	S	S	31	MTBK-1	R	S	S
2	MTBK-1	R	R	S	32	MTBK-1	R	R	R
3	MTBK-1	R	R	S	33	MTBK-1	R	R	S
4	MTBK-1	R	R	R	34	MTBK-1	R	R	S
5	MTBK-1	R	R	S	35	MTBK-1	R	R	R
6	MTBK-1	R	R	S	36	MTBK-1	R	R	S
7	MTBK-1	R	R	S	37	MTBK-1	R	S	S
8	MTBK-1	R	R	S	38	MTBK-1	S	R	S
9	MTBK-1	R	S	S	39	MTBK-1	R	R	R
10	MTBK-1	R	R	R	40	MTBK-1	S	R	S
11	MTBK-1	S	R	S	41	MTBK-1	S	S	S
12	MTBK-1	R	R	S	42	MTBK-1	S	S	S
13	MTBK-1	S	R	S	43	MTBK-1	R	R	S
14	MTBK-1	R	R	S	44	MTBK-1	S	S	S
15	MTBK-1	R	R	S	45	MTBK-1	R	R	S
16	MTBK-1	S	R	S	46	MTBK-1	S	R	S
17	MTBK-1	R	R	S	47	MTBK-1	R	R	S
18	MTBK-1	R	R	S	48	MTBK-1	R	R	S
19	MTBK-1	R	R	R	49	MTBK-1	S	S	S
20	MTBK-1	R	R	S	50	MTBK-1	S	S	S
21	MTBK-1	R	R	R	51	MTBK-1	R	S	S
22	MTBK-1	R	R	S	52	MTBK-1	R	R	S
23	MTBK-1	R	R	R	53	MTBK-1	S	S	S
24	MTBK-1	S	R	S	54	MTBK-1	R	R	S
25	MTBK-1	S	R	R	55	MTBK-1	R	S	S
26	MTBK-1	R	R	S					
27	MTBK-1	R	R	S					
28	MTBK-1	R	R	S					
29	MTBK-1	S	R	S					
30	MTBK-1	R	S	S					
							Total No. of sensitive strains		
							15	13	46
							Total No. of resistant strains		
							40	42	9

a: MTBK, *M. tuberculosis* isolates from The Korean National Tuberculosis Association ;

MTBM, *M. tuberculosis* isolates from National Masan Tuberculosis Hospital

b: RMP, rifampin ; INH, isoniazid ; SM, streptomycin

c: S, Susceptible in susceptibility test by the absolute concentration method

R, Resistant in susceptibility test by the absolute concentration method

돌연변이와도 관련이 있다<sup>8-13</sup>. 스트렙토마이신 내성은 16S rRNA를 암호화하는 *rrs* 유전자와 리보솜 단백질 S12를 암호화하는 *rpsL* 유전자에 의해 주로 나타난다<sup>14,15</sup>. 이러한 염기서열 변화에 의해 나타나는 내성균주를 검출하기 위해 DNA 기반의 프로브 분석법이 개발되었고, 최근에는 올리고뉴클

레오티드 칩(oligonucleotide chip, 이하 ‘올리고칩’) 기술이 새로운 방법으로 제시되고 있다<sup>16-20</sup>. 올리고칩은 유리 등 고정지지체의 수  $\text{cm}^2$  정도의 면적에 많은 수의 올리고뉴클레오티드를 부착시키고 미량의 표적 염기서열과 혼성화 반응을 시킴으로써 동시에 많은 수의 유전자를 검사할 수 있다. 이

는 초기에 다량의 샘플을 스크리닝하기 위한 매우 유용한 도구로써, 돌연변이 검색이나 질병의 진단 등에 많은 기여를 할 것으로 기대된다. 특히 알려져 있는 염기서열 정보를 이용하여 PCR에서는 검출할 수 없었던 점 돌연변이 등의 검출도 가능하다는 장점이 있다<sup>20</sup>.

이러한 장점을 진단적으로 이용하고자 본 연구에서는 결핵치료의 일차 약제인 리팜핀, 아이소니아지드와 스트렙토마이신 내성과 관련된 유전자 가운데 최소한의 적은수의 프로브로써 최대한 유용한 약제 내성 진단이 가능한 *rpoB*, *katG* 및 *rpsL* 유전자의 주요 돌연변이를 한번의 혼성화 반응으로 동시에 검출하는 올리고칩을 개발하여 그 유용성을 조사하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 사용 균주

대한결핵협회에서 분양받은 결핵균 40균주 및 국립마산결핵병원에서 객담의 마이코박테리움 도말, 세균 배양 및 약제 감수성 검사를 실시한 배양 결핵균 15균주를 본 실험에 사용하였다(표 1).

### 2. 약제감수성 검사

결핵의 약제감수성 검사는 절대농도법(Absolute concentration method)을 사용하였다<sup>4</sup>. Löwenstein-Jensen 배지에서 자란 2주 이내의 집락을 따서 0.4 mL의 증류수에 부유시킨 균액을 정해진 농도가 포함된 배지에 접종하여 배양하고, 4주 후에 관찰하였을 때 각 약제가 포함된 배지에서 20개 이상의 군집락이 관찰되면 내성으로 간주하였다.

### 3. DNA 추출

배양된 균주의 집락을 1백금이를 따서 1.5 mL 튜

브에 넣고 InstaGene matrix(Bio-Rad, USA)를 100  $\mu$ L 가하여 부유시킨 후 항온수조에서 56°C로 30분간 반응시켰다. 이후 10초 동안 진탕한 후 100°C에서 8분간 열처리하고 다시 10초간 진탕한 후, 3분간 12,000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 새 튜브로 옮기고 -20°C에 냉동 보관하였다.

### 4. PCR

본 연구의 프라이머와 프로브는 (주)바이오닉스(Korea)에 주문제작하여 사용하였다(표 2). 올리고칩의 PCR 프라이머는 5' 말단에 바이오틴을 표지하였고, 염기서열분석에는 바이오틴이 결합되지 않은 프라이머를 사용하였다. PCR 반응은 한 시험관내에서 3 종류의 약제내성 증폭이 동시에 일어나도록 하였다. 반응 조성은 100 mM KCl, 20 mM Tris HCl(pH 9.0), 1% Triton X-100, 10 mM deoxynucleoside triphosphates(dATP, dGTP, dTTP, and dCTP), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 쌍의 프라이머(각각 10 pmol), 1 U Taq polymerase(QIAGEN, USA)로 구성되었고, 주형 DNA 4  $\mu$ L와 함께 혼합액이 총 25  $\mu$ L가 되게 하였다. 혼합액을 94°C, 3분간 변성 후, 94°C, 1분, 60°C, 1분, 72°C, 1분씩 35회 반복하였고, 마지막으로 72°C, 10분간 연장하였다.

### 5. 올리고칩의 제작

#### 1) 올리고뉴클레오타이드 프로브의 부착

표 2의 각 유전자에서 프로브 염기서열의 중간위치에 점돌연변이 부위를 포함하도록 하였고, 5' 말단에 thymine 15 base(T<sub>15</sub>)를 스페이서로 부착하여 표적 DNA와 프로브의 혼성화 반응효율을 높였다. 또한 실란 처리된 슬라이드에 프로브가 고정되도록 5' 말단을 아민으로 변형시켜 본 실험에 사용하였다. 리팜핀 내성의 90% 이상을 차지하는 *rpoB* 유전자의 코돈 511-533 내에서 야생형 프로

**Table 2.** Primers and probes used in this study

Drugs (Target gene)	Primer and probe name <sup>a</sup>	Sequence <sup>b</sup>	T <sub>m</sub> (°C)	GC (%)
Rifampin ( <i>RpoB</i> )	Rpo 4F	5'- B-TCGCCGCGATCAAGGAGT-3'	53	61
	Rpo 3R	5'- B-TGCACGTCCGCGACCTCCA-3'	58	68
	RMP-W511L	5'-T <sub>15</sub> -CAGCCAGCTGAGCCAATTCA-3'	54	67
	RMP-M511L	5'-T <sub>15</sub> -AGCCAGCCGAGCCAA-3'	47	55
	RMP-W513Q	5'-T <sub>15</sub> -CTGAGCCAATTCATG-3'	39	47
	RMP-M513L	5'-T <sub>15</sub> -CTGAGCCTATTCATGG-3'	43	50
	RMP-W516D	5'-T <sub>15</sub> -TTCATGGACCAGAACA-3'	41	44
	RMP-M516V	5'-T <sub>15</sub> -TTCATGGTCCAGAACA-3'	41	44
	RMP-M516Y	5'-T <sub>15</sub> -ATTCATGTACCAGAACA-3'	40	35
	RMP-W522S	5'-T <sub>15</sub> -CTGTCCGGGGTTGAC-3'	43	64
	RMP-M522L	5'-T <sub>15</sub> -CTGTTGGGGTTGAC-3'	40	57
	RMP-W526H	5'-T <sub>15</sub> -GTTGACCCACAAGCGCCGA-3'	55	63
	RMP-M526Y	5'-T <sub>15</sub> -GGTTGACCTACAAGCGC-3'	49	59
	RMP-M526D	5'-T <sub>15</sub> -GGTTGACCGACAAGCGC-3'	52	65
	RMP-M526R	5'-T <sub>15</sub> -TTGACCCGCAAGCGC-3'	47	67
	RMP-M526L	5'-T <sub>15</sub> -TTGACCCTCAAGCGC-3'	45	60
	RMP-M526P	5'-T <sub>15</sub> -TTGACCCCAAGCGC-3'	47	67
	RMP-W531S	5'-T <sub>15</sub> -CGACTGTCCGCGCTG-3'	50	73
	RMP-M531L	5'-T <sub>15</sub> -CGACTGTTGGCGCTG-3'	47	67
	RMP-M531W	5'-T <sub>15</sub> -CCGACTGTGAGCGCT-3'	47	67
Isoniazid ( <i>KatG</i> )	Kat 1F	5'- B-AAGAGCTCGTATGGCACCCG-3'	56	60
	Kat 4R	5'- B-AGCGCCAGCAGGGCTCTTC-3'	58	68
	Kat 5F	5'- B-GGCGAAGCCGAGATTGCCAG-3'	58	65
	Kat 2R	5'- B-CTGCAGGCGGATGCGACCA-3'	58	68
	INH-W315S	5'-T <sub>15</sub> -ATCACCAGCGGCATC-3'	45	60
	INH-M315T	5'-T <sub>15</sub> -ATCACCACCGGCATC-3'	45	60
	INH-M315N	5'-T <sub>15</sub> -ATCACCAACCGGCATC-3'	42	53
	INH-W463R	5'-T <sub>15</sub> -CAGATCCGGGCGCATCG-3'	47	67
	INH-M463L	5'-T <sub>15</sub> -CAGATCCTGCGCATCG-3'	45	60
Streptomycin ( <i>RpsL</i> )	SM 1F	5'- B-GATGAGTAAGGTCAAGACCG-3'	52	50
	SM 1R	5'- B-GTTCTTGACACCCTGCGTAT-3'	52	50
	SM-W43K	5'-T <sub>15</sub> -TCGGCTTCTTCGGAGT-3'	46	56
	SM-M43L	5'-T <sub>15</sub> -TTCGGCTTCCTCGGAGTGG-3'	53	61
	SM-W88K	5'-T <sub>15</sub> -GCAGGTCCTTCACCCG-3'	51	69
	SM-M88L	5'-T <sub>15</sub> -GCAGGTCCTTCACCCG-3'	54	75

<sup>a</sup>: F, forward primer; R, reverse primer; W, wild type. M, mutant type.

Characters following W or M refer to amino acid types encoded by codon at mutation region.

<sup>b</sup>: B, biotin

브 7 종류와 돌연변이 프로브 13 종류를 고안하였고, 아이소니아지드 내성의 60% 이상을 차지하는 *katG* 유전자의 코돈 315와 코돈 463에서 야생형 프로브 2 종류와 돌연변이 프로브 3 종류를 고안하였으며, 스트렙토마이신 내성의 60% 이상을 차

지하는 *rpsL* 유전자의 코돈 43과 코돈 88에서 야생형과 돌연변이 프로브 각 2 종류를 고안하였다. 프로브는 3×SSC (0.45 M NaCl, 0.045 M Sodium citrate) spotting 용액에 50 pmol 로 희석하여 384-well plate에 분주하였고, 각 프로브를 유리 슬

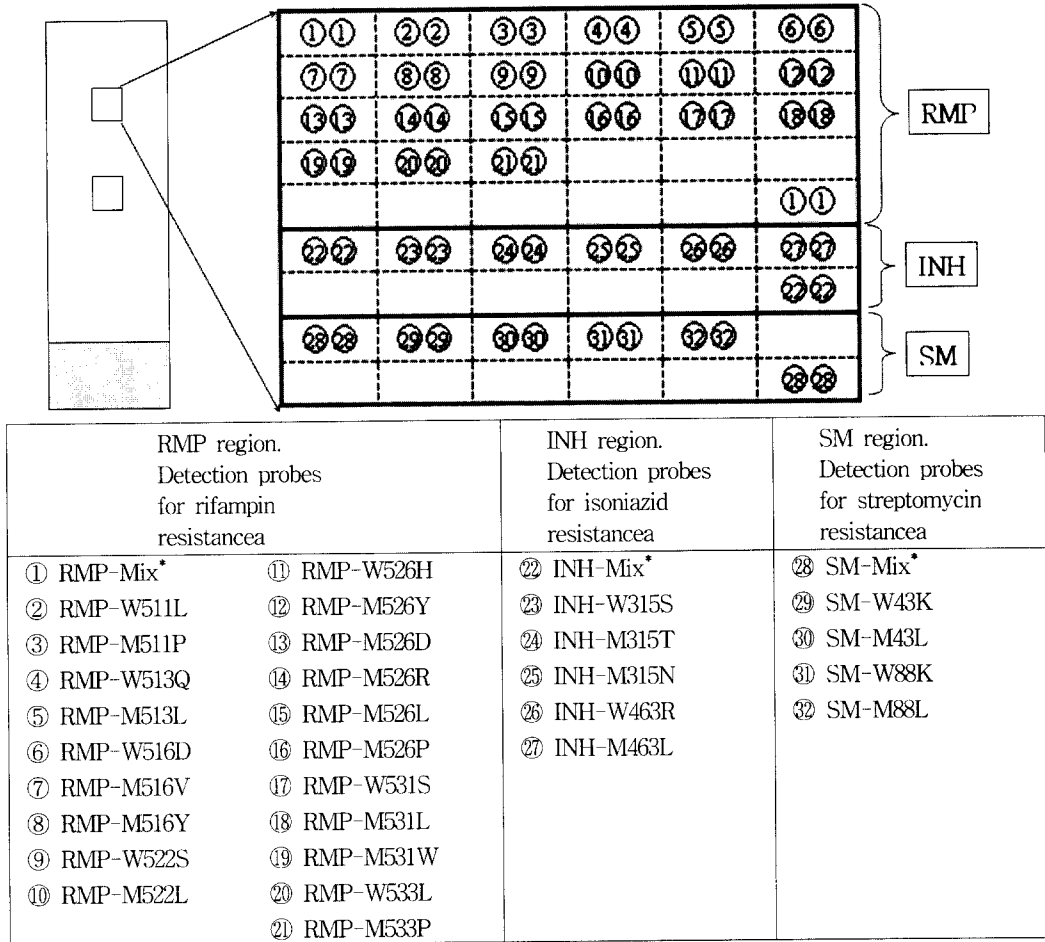


Fig. 1. Scheme of the probes layout in oligonucleotide chip.

<sup>a</sup>W, wild type. M, mutant type.

<sup>a</sup>: Characters following W or M refer to amino acid types encoded by codon at mutation region.

The oligonucleotide probes are patterned as duplex arrays.

The oligonucleotide sequences noted in table 3.

\* Mix: Probes region marker for each drug-resistance detection

라이드에 그림 1과 같이 배열하여 부착시킨 후, 실온에서 약 1시간 및 50℃ 에서 5시간 이상 정치하여 프로브를 고정시켰다.

## 2) 고정되지 않은 프로브의 세척

유리 슬라이드 표면에 고정되지 않은 프로브를 제거하기 위해 실온에서 0.2% SDS(sodium dodecyl

sulfate) 용액에 1회, 증류수로 1회 세척하였다. Sodium borohydride 용액(300 mL PBS, 100 mL ethanol, 1 g NaBH<sub>4</sub>)에서 5분간 처리하고 이를 100℃ 의 증류수에서 2분간 세척하였다. 0.2% SDS 와 증류수를 이용하여 각각 1분간 더 세척한 후 원심분리기를 이용하여 슬라이드를 건조시켜 올리고칩 제작을 완료하였다.

## 6. 올리고칩을 이용한 약제내성 돌연변이 검출

### 1) 혼성화 반응(hybridization)과 염료의 결합

바이오틴이 표지된 PCR 증폭산물을 95℃에서 5분간 열처리하여 단일가닥(single strand)으로 변성 (denaturation)시킨 후, 4℃에서 5분 이상 냉각시켰다. 혼성화 반응용액(20×SSPE 3  $\mu$ L, 22.2M Formamide 1.35  $\mu$ L, Bovine serum albumin 0.5  $\mu$ L, Salmon sperm DNA 0.1  $\mu$ L, Cy5-streptavidin(Amersham Pharmacia Biotech, USA) 0.06  $\mu$ L)은 한 튜브 당 8  $\mu$ L를 분주하고 각 튜브에 PCR 증폭산물 2  $\mu$ L를 더하여 혼합액 총 10  $\mu$ L를 제조하였다. 올리고칩의 표적부위에 혼합액 10  $\mu$ L를 분주하고 기포가 생기지 않도록 커버글라스를 덮은 뒤 40℃에서 30분간 반응시켰다.

### 2) 결합되지 않은 DNA의 세척

반응이 끝난 후, 혼성화 되지 않은 잔여의 DNA를 세척하기 위해 2×SSC(300 mM NaCl, 30 mM Na-citrate, pH 7.0) 용액을 이용하여 커버글라스를 제거한 후 5분간 세척하였다. 그리고 0.2×SSC 용액을 이용하여 다시 5분간 세척하고 마지막으로 원심분리기를 이용하여 슬라이드를 건조시켜 냉암소에 보관하였다.

## 7. 올리고칩 결과 분석

비공초점 레이저 스캐너인 GenePix 4000A(Axon Instruments, USA)를 이용하여 Cy5의 레이저 파장인 635 nm에서 스캐닝하고 화상분석을 하였다. 그 후 각 spot의 화소세기(pixel intensity)를 저장하여 동일한 프로브가 부착된 두 spot의 화소세기를 평균값으로 산출하였다. 그 산출된 값으로 야생형 프로브와 해당되는 돌연변이 프로브를 상대적으로 비교하여 돌연변이 유무를 검출하였다. 각 약제에 대한 야생형과 돌연변이 균주에서 동일한 코

돈이지만 올리고칩의 프로브에는 선정되지 않은 돌연변이 경우는 예를 들어 L511? 등으로 표시하였다.

올리고칩 검출결과의 분석은 세가지 그룹으로 나누어, A 그룹은 약제 감수성 검사, 올리고칩과 염기서열분석 결과가 모두 일치하는 결과로, B 그룹은 올리고칩과 염기서열분석 결과는 일치하지만 약제 감수성 검사결과가 다른 경우로 정리하였다. 나머지 C 그룹은 약제 감수성 검사와 염기서열분석 결과는 일치하지만 올리고칩의 결과가 다른 경우, 또는 세가지 방법 모두 결과가 다른 경우로 정리하였다.

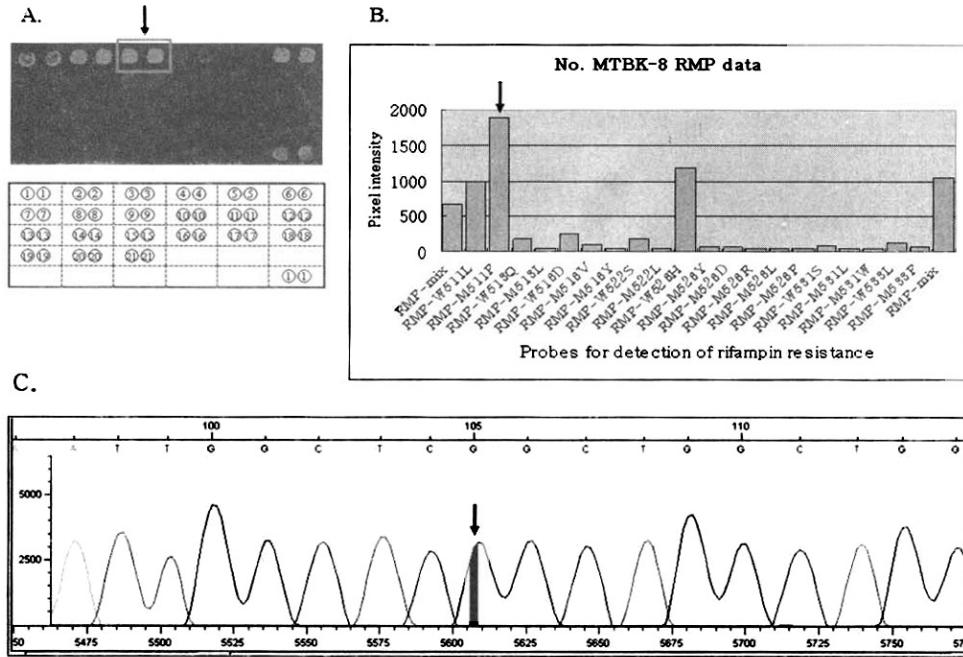
## 8. 염기서열분석

염기서열분석은 BaseStation 51 자동염기서열분석기(MJ Research, USA)를 이용하였다. 주형 DNA는 ABI prism BigDye terminator sequencing kit(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 반응시킨 후, 이를 염기서열분석기에 전기영동하고 분석 프로그램 Catographer™ (MJ Research, USA)로 결과를 분석하였다.

## 결 과

### 1. 올리고칩을 이용한 리팜핀 내성 결핵균 검출

리팜핀 내성검출은 그림 2의 균주 MTBK-8의 예에서 보면, 혼성화 반응결과를 화상분석하고(그림 2A), 이에 대한 프로브의 형광세기를 그림 2B와 같이 히스토그램으로 전환하여 비교해보면 코돈 511에서는 야생형 프로브 RMP-W511L(화소세기 1000)보다 돌연변이 프로브 RMP-M511P(화소세기 1900)가 훨씬 더 높았고 (1.9배), 나머지 코돈에서는 RMP-W513Q, RMP-W516D, RMP-W522S, RMP-W526H, RMP-W531S와 RMP-W533L 등의



**Fig. 2.** Detection of rifampin resistance of strain No. MTBK-8 by the oligonucleotide chip.

A: Hybridization image of rifampin resistance in strain No. MTBK-8 by oligonucleotide chip.

Numbers indicate the oligonucleotide probes in noted in RMP region of Fig. 1.

B: Pixel intensity of rifampin resistance after hybridization in strain No. MTBK-8.

C: Detection of *rpoB* mutation in strain No. MTBK-8 by sequence analysis. Arrows indicate the nucleotide substitution. This example sequence is obtained using reverse primer, so G indicated by arrow interpreted C.

야생형 프로브의 형광세기가 더 높았다. 이 결과로 보아 균주 MTBK-8이 L511P 돌연변이를 가진 리팜핀 내성 결핵균으로 진단할 수 있었다(그림 2B). 이러한 올리고칩 결과를 확인하기 위한 염기서열 분석 실험에서도 코돈 511에서 CTG→CCG(leucine→proline)의 점돌연변이가 관찰되었다(그림 2C). 결핵균 55균주의 리팜핀 내성검출 결과를 표 3에 정리하였다. 약제 감수성 검사, 올리고칩과 염기서열분석 결과가 모두 일치하는 A 그룹에 속하는 내성균주 31주의 경우 8가지의 돌연변이 유형으로 구성되어 있었고, 그 중 S531L 유형이 18개(58%)로써 가장 많았다. 올리고칩과 염기서열분석 결과

는 일치하지만 약제 감수성 검사 결과와는 일치하지 않은 B 그룹에 속하는 내성균주 5주의 경우에는 올리고칩과 염기서열분석 결과 모두 야생형으로 확인되었고, 감수성 균주 4주는 L511P, S531L과 S531W의 돌연변이를 가진 것으로 확인되었다. 약제 감수성 검사와 염기서열분석 결과는 일치하였으며, 올리고칩에는 포함되어 있지 않은 돌연변이로 예측되는 C 그룹에 속하는 내성균주 4주의 경우, 이 중 3주는 코돈 513의 야생형 프로브 RMP-W513Q와 돌연변이 프로브 RMP-M513L 중 어느 프로브와도 혼성화되지 않은 것으로 확인되었다. 이를 염기서열분석한 결과 glutamine→proline

**Table 3.** Comparison of results determined by oligonucleotide chip and DNA sequencing methods to determine rifampin susceptibility of *M. tuberculosis* in cultured samples.

G <sup>a</sup>	No.	R <sup>b</sup>	Result from c		G <sup>a</sup>	No.	R <sup>b</sup>	Result from c	
			Oligo chip	DNA sequencing				Oligo chip	DNA sequencing
A	8	R	L511P	L511P	B	37	R	S531L	S531L
	17	R	D516V	D516V		43	R	S531L	S531L
	21	R	D516Y	D516Y		52	R	S531L	S531L
	32	R	H526P	H526P		11	S	WT	WT
	5	R	L533P	L533P		13	S	WT	WT
	18	R	H526Y	H526Y		16	S	WT	WT
	22	R	H526Y	H526Y		29	S	WT	WT
	30	R	H526Y	H526Y		38	S	WT	WT
	47	R	H526Y	H526Y		40	S	WT	WT
	54	R	H526Y	H526Y		42	S	WT	WT
	55	R	H526Y	H526Y		44	S	WT	WT
	33	R	H526D	H526D		49	S	WT	WT
	34	R	H526D	H526D		50	S	WT	WT
	3	R	S531L	S531L		53	S	WT	WT
	4	R	S531L	S531L		2	R	WT	WT
	6	R	S531L	S531L		26	R	WT	WT
	7	R	S531L	S531L		39	R	WT	WT
	9	R	S531L	S531L		45	R	WT	WT
	10	R	S531L	S531L		48	R	WT	WT
	12	R	S531L	S531L		24	S	L511P	L511P
	14	R	S531L	S531L		25	S	S531L	S531L
	15	R	S531L	S531L		41	S	S531L	S531L
	19	R	S531L	S531L		46	S	S531W	S531W
	20	R	S531L	S531L	C	1	R	Q513?	Q513P
	23	R	S531L	S531L		31	R	Q513?	Q513P
	27	R	S531L	S531L		51	R	Q513?	Q513P
	28	R	S531L	S531L		36	R	D516?	D516F
	35	R	S531L	S531L					

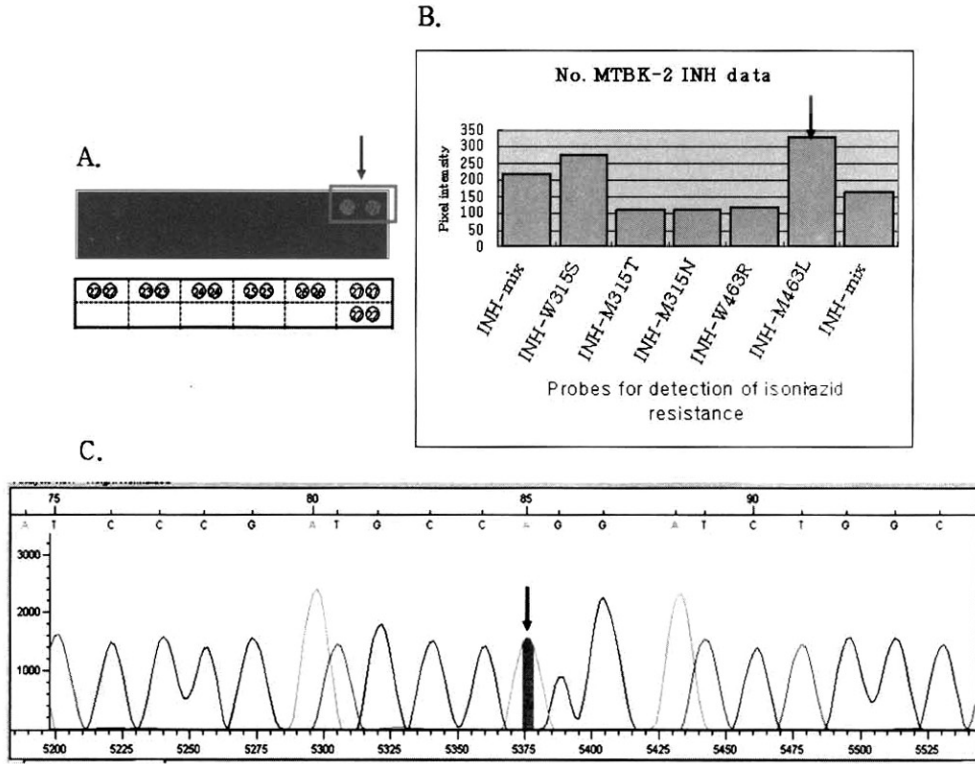
<sup>a</sup>: Group; A, Matching of results of three methods; B, Only mismatching of result of susceptibility test; C, Mismatching of results of three methods <sup>b</sup>: S, Susceptible in susceptibility test by the absolute concentration method; R, Resistant in susceptibility test by the absolute concentration method <sup>c</sup>: The numbers of correspond to *E. coli* RNA polymerase codon alignment; WT, wild type

으로 치환된 돌연변이(Q513P)로 확인되어 올리고칩에는 선정되지 않은 프로브의 결과인 Q513?로 나타났다. 다른 한 유형(균주 MTBK-36)은 코돈 516의 야생형 프로브 RMP-W516D와 돌연변이 RMP-M516V와 RMP-M516Y 중 어느 프로브와도 혼성화되지 않은 것으로 확인되었다. 이를 염기서열 분석한 결과 aspartic acid→phenylalanine 으로 치

환된 돌연변이(D516F)로 확인되어 올리고칩에는 선정되지 않은 프로브의 결과인 D516?로 나타났다.

## 2. 올리고칩을 이용한 아이소니아지드 내성 결핵균 검출

아이소니아지드 내성 결핵균의 검출은 그림 3의



**Fig. 3.** Detection of isoniazid resistance of strain No. MTBK-2 by the oligonucleotide chip.

A: Hybridization image of isoniazid resistance in strain No. MTBK-2 by oligonucleotide chip.

Numbers indicates the oligonucleotide probes in noted in INH region of Fig. 1.

B: Pixel intensity of isoniazid resistance after hybridization in strain No. MTBK-2.

C: Detection of *katG* mutation in strain No. MTBK-2 by sequence analysis Arrows indicate the nucleotide substitution. This example sequence is obtained using reverse primer, so A indicated by arrow interpreted T.

균주 MTBK-2의 예에서 보면, 혼성화 반응결과를 화상분석하고(그림 3A), 이에 대한 프로브의 형광세기를 비교해보면 코돈 463에서 야생형 프로브 INH-W463R(화소세기 119)보다 돌연변이 프로브 INH-M463L(화소세기 329)가 더 높았고(2.8배), 코돈 315는 INH-W315S 야생형 프로브의 형광세기가 더 높았다(2.6배). 이 결과로 보아 균주 MTBK-2가 R463L의 돌연변이를 가진 아이소니아지드 내성 결핵균으로 진단할 수 있었다(그림 3B). 이러한 올리고칩 결과를 확인하기 위한 염기서열

분석 실험에서도 코돈 463에서 CGG→CTG (arginine→leucine)의 점돌연변이가 관찰되었다(그림 3C). 결핵균 55균주의 아이소니아지드 내성검출 결과를 표 4에 정리하였다. 세가지 결과가 모두 일치하는 A 그룹에 속하는 내성균주 20주의 경우 S315T와 R463L 유형이 19개(95%)로써 가장 많았고, 다른 하나는 S315N과 R463L 유형으로 확인되었다. 약제 감수성 검사 결과는 다르고 올리고칩과 염기서열분석 결과는 일치한 B 그룹에 속하는 내성균주 22주의 경우 19주(86%)는 올리고칩과 염기

**Table 4.** Comparison of results determined by oligonucleotide chip and DNA sequencing methods to determine isoniazid susceptibility of *M. tuberculosis* in cultured samples

G <sup>a</sup>	No.	R <sup>b</sup>	Result from		G <sup>a</sup>	No.	R <sup>b</sup>	Result from	
			Oligo chip	DNA sequencing				Oligo chip	DNA sequencing
A	1	S	WT315, R463L	WT315, R463L	B	2	R	WT315, R463L	WT315, R463L
	9	S	WT315, R463L	WT315, R463L		3	R	WT315, R463L	WT315, R463L
	37	S	WT315, R463L	WT315, R463L		4	R	WT315, R463L	WT315, R463L
	42	S	WT315, R463L	WT315, R463L		5	R	WT315, R463L	WT315, R463L
	49	S	WT315, R463L	WT315, R463L		13	R	WT315, R463L	WT315, R463L
	50	S	WT315, R463L	WT315, R463L		14	R	WT315, R463L	WT315, R463L
	51	S	WT315, R463L	WT315, R463L		17	R	WT315, R463L	WT315, R463L
	53	S	WT315, R463L	WT315, R463L		19	R	WT315, R463L	WT315, R463L
	6	R	S315T, R463L	S315T, R463L		23	R	WT315, R463L	WT315, R463L
	7	R	S315T, R463L	S315T, R463L		26	R	WT315, R463L	WT315, R463L
	8	R	S315T, R463L	S315T, R463L		27	R	WT315, R463L	WT315, R463L
	10	R	S315T, R463L	S315T, R463L		28	R	WT315, R463L	WT315, R463L
	11	R	S315T, R463L	S315T, R463L		29	R	WT315, R463L	WT315, R463L
	15	R	S315T, R463L	S315T, R463L		38	R	WT315, R463L	WT315, R463L
	18	R	S315T, R463L	S315T, R463L		39	R	WT315, R463L	WT315, R463L
	20	R	S315T, R463L	S315T, R463L		45	R	WT315, R463L	WT315, R463L
	21	R	S315T, R463L	S315T, R463L		46	R	WT315, R463L	WT315, R463L
	22	R	S315T, R463L	S315T, R463L		48	R	WT315, R463L	WT315, R463L
	24	R	S315T, R463L	S315T, R463L		52	R	WT315, R463L	WT315, R463L
	32	R	S315T, R463L	S315T, R463L		12	R	WT	WT
	33	R	S315T, R463L	S315T, R463L		16	R	WT	WT
	34	R	S315T, R463L	S315T, R463L		25	R	WT	WT
	35	R	S315T, R463L	S315T, R463L		30	S	S315T, R463L	S315T, R463L
	36	R	S315T, R463L	S315T, R463L		31	S	S315T, R463L	S315T, R463L
	40	R	S315T, R463L	S315T, R463L		41	S	S315T, R463L	S315T, R463L
	47	R	S315T, R463L	S315T, R463L		44	S	S315T, R463L	S315T, R463L
	54	R	S315T, R463L	S315T, R463L		55	S	S315T, R463L	S315T, R463L
	43	R	S315T, R463L	S315T, R463L					

<sup>a</sup>: Group: A, Matching of results of three methods; B, Only mismatching of result of susceptibility test <sup>b</sup>: S, Susceptible in susceptibility test by the absolute concentration method; R, Resistant in susceptibility test by the absolute concentration method <sup>c</sup>: The numbers of correspond to *E. coli* RNA polymerase codon alignment; WT, wild type; -, not determined

서열분석 결과 모두 R463L의 자연 획득 돌연변이를 가진 것으로 확인되었고, 3주는 야생형(14%)으로 확인되었다. 감수성 균주 5주는 S315T와 R463L의 돌연변이를 가진 것으로 확인되었다.

### 3. 올리고칩을 이용한 스트렙토마이신 내성 결핵

### 균 검출

스트렙토마이신 내성 결핵균의 검출은 그림 4의 균주 MTBK-4의 예에서 보면, 혼성화 반응결과를 화상분석하고(그림 4A), 이에 대한 프로브의 형광 세기를 비교해보면 코돈 43에서는 야생형 프로브

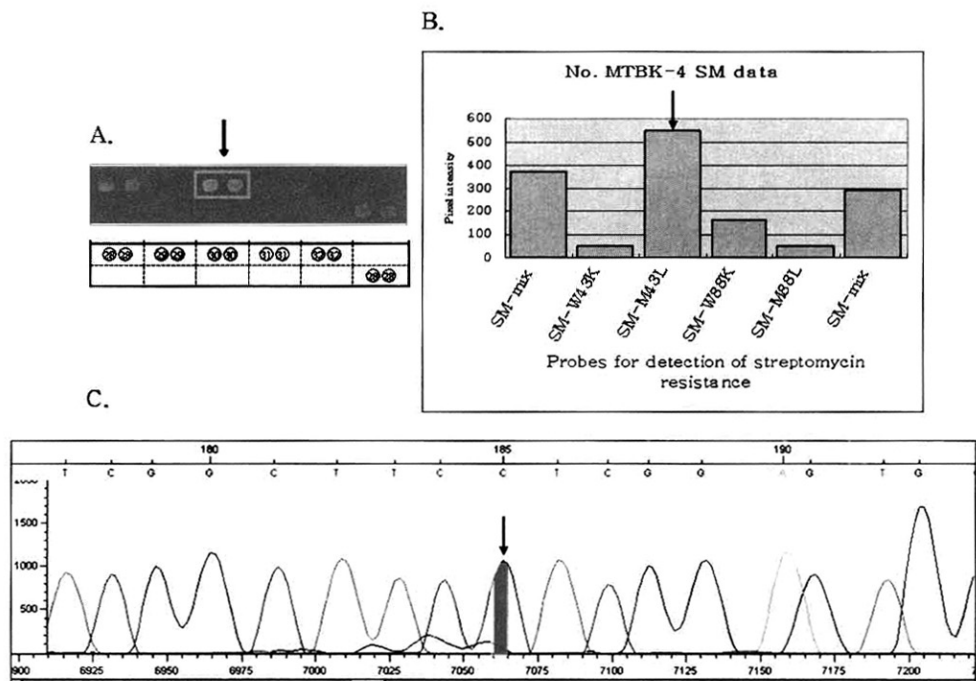


Fig. 4. Detection of streptomycin resistance of strain No. MTBK-4 by the oligonucleotide chip.

A: Hybridization image of streptomycin resistance in strain No. MTBK-4 by oligonucleotide chip. Numbers indicates the oligonucleotide probes in noted in SM region of Fig. 1.

B: Pixel intensity of streptomycin resistance after hybridization in strain No. MTBK-4.

C: Detection of *rpsL* mutation in strain No. MTBK-4 by sequence analysis. Arrows indicate the nucleotide substitution. This example sequence is obtained using reverse primer, so C indicated by arrow interpreted G.

SM-W43K(화소세기 50)보다 돌연변이 프로브 SM-M43R(화소세기 550)가 훨씬 더 높았고(11배), 코돈 88에서는 SM-W88R 야생형 프로브의 형광 세기가 더 높았다(3.2배). 이 결과로 보아 균주 MTBK-4가 K43R 돌연변이를 가진 스트렙토마이신 내성 결핵균으로 진단할 수 있었다(그림 4B). 이러한 올리고칩 결과를 확인하기 위한 염기서열 분석 실험에서도 코돈 43에서 AAG→AGG (lysine → arginine)의 점돌연변이가 관찰되었다(그림 4C). 결핵균 55균주의 스트렙토마이신 내성검출 결과를 표 5에 정리하였다. 세가지 결과가 모두 일치하는 A 그룹에 속하는 내성균주 7주의 경우 K43R 유형

이 6개 (86%)로써 가장 많았고, K88R 유형이 1개 (14%)로 확인되었다. 감수성 균주 42주는 모두 야생형으로 확인되었다. 약제 감수성 검사 결과는 다르고 올리고칩과 염기서열분석 결과는 일치한 B 그룹에 속하는 내성균주 2주의 경우 올리고칩과 염기서열분석 결과 모두 야생형으로 확인되었다. 약제 감수성 검사, 올리고칩과 염기서열분석 결과가 모두 다르게 나타난 C 그룹에 속하는 감수성 균주 4주의 경우 2주는 올리고칩에서 K43R의 돌연변이를 가진 것으로 확인되었고, 나머지 2주는 야생형과 돌연변이 프로브 중 어느 것에도 전혀 반응을 나타내지 않은 경우로 확인되었다.

**Table 5.** Comparison of results determined by oligonucleotide chip and DNA sequencing methods to determine streptomycin susceptibility of *M. tuberculosis* in cultured samples.

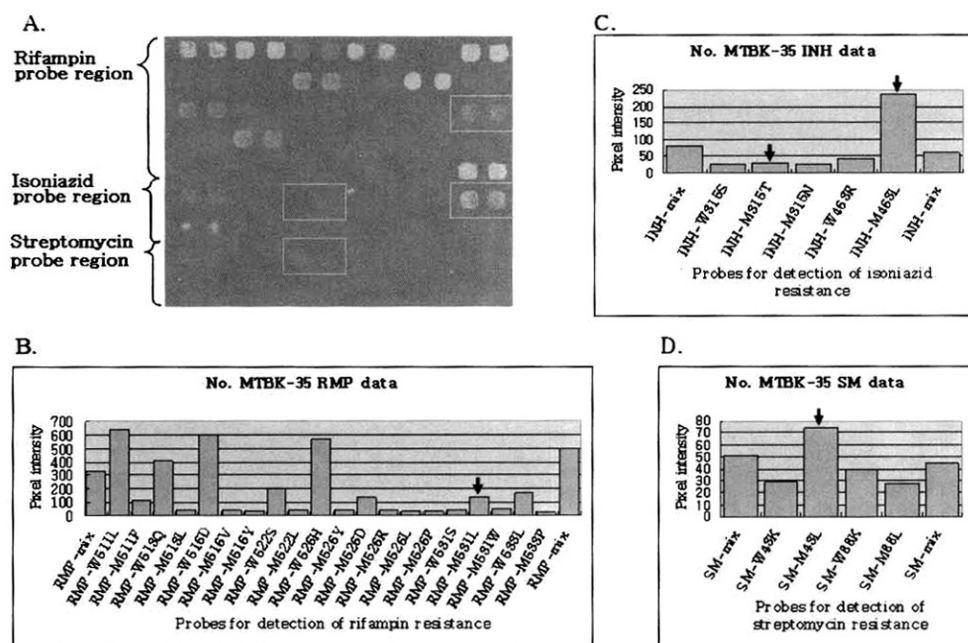
G <sup>a</sup>	No.	R <sup>b</sup>	Result from		G <sup>a</sup>	No.	R <sup>b</sup>	Result from	
			Oligo chip	DNA sequencing				Oligo chip	DNA sequencing
A	4		K43R	K43R		28		WT	WT
	19		K43R	K43R		29		WT	WT
	21		K43R	K43R		30		WT	WT
	23		K43R	K43R		31		WT	WT
	35		K43R	K43R		33		WT	WT
	39		K43R	K43R		34		WT	WT
	10		K88R	K88R		36		WT	WT
	1		WT	WT		37		WT	WT
	2		WT	WT		38		WT	WT
	3		WT	WT		40		WT	WT
	5		WT	WT		41		WT	WT
	6		WT	WT		42		WT	WT
	7		WT	WT		43		WT	WT
	8		WT	WT		44		WT	WT
	9		WT	WT		45		WT	WT
	11		WT	WT		48		WT	WT
	12		WT	WT		49		WT	WT
	13		WT	WT		50		WT	WT
	14		WT	WT		51		WT	WT
	15		WT	WT		53		WT	WT
	16		WT	WT		54		WT	WT
	17		WT	WT	B	25		WT	WT
	18		WT	WT		32		WT	WT
	20		WT	WT	C	52		K43R	WT
	22		WT	WT		55		K43R	WT
	24		WT	WT		46		ND	WT
	26		WT	WT		47		ND	WT
	27		WT	WT					

<sup>a</sup>: Group; A, Matching of results of three methods; B, Only mismatching of result of susceptibility test; C, Mismatching of results of three methods <sup>b</sup>: S, Susceptible in susceptibility test by the absolute concentration method; R, Resistant in susceptibility test by the absolute concentration method <sup>c</sup>: The numbers of correspond to *E. coli* RNA polymerase codon alignment; WT, wild type; -, not determined; ND, not detected

#### 4. 올리고칩에 의한 다제내성결핵균의 동시 검출

세가지 약제내성과 관련된 돌연변이를 올리고칩을 이용하여 한번의 혼성화 반응에서 동시에 검출할 수 있었다. 그림 5의 군주 MTBK-35의 예에서 보면, 혼성화 반응결과를 화상분석하고, 이에 대한

프로브 각각의 형광세기를 히스토그램으로 전환하여 비교해보았다(그림 5A). 리팜핀 내성의 검출결과 야생형 프로브 RMP-W531S(화소세기 25)보다 돌연변이 프로브 RMP-M531L(화소세기 150)이 더 높았고(6배), 나머지 코돈은 RMP-W511L, RMP-W513Q, RMP-W516D, RMP-W522S, RMP-



**Fig. 5.** Detection of drug resistance in strain No. MTBK-35 by the single oligonucleotide chip.  
 A: Hybridization image of drug resistance in strain No. MTBK-35 by oligonucleotide chip.  
 B: Pixel intensity of rifampin resistance after hybridization in strain No. MTBK-35  
 C: Pixel intensity of isoniazid resistance after hybridization in strain No. MTBK-35  
 D: Pixel intensity of streptomycin resistance after hybridization in strain No. MTBK-35

W526H와 RMP-W533L 등의 야생형 프로브의 형광세기가 더 높았다. 이 결과로 보아 균주 MTBK-35가 S531L 돌연변이를 가진 리팜핀 내성 결핵균으로 진단할 수 있었다(그림 5B). 아이소니아지드 내성검출 결과는 야생형 프로브 INH-W315S(화소세기 30)와 INH-W463R(화소세기 46)보다 돌연변이 프로브 INH-M315T(화소세기 40)와 INH-M463L(화소세기 230)이 형광세기가 더 높았다(1.3배, 5배). 이 결과로 보아 균주 MTBK-35가 S315T와 R463L 돌연변이를 가진 아이소니아지드 내성 결핵균으로 진단할 수 있었다(그림 5C). 스트렙토마이신 내성검출 결과는 야생형 프로브 SM-W43K(화소세기 30)보다 돌연변이 프로브 SM-M43R(화소세기 73)이 더 높았고(2.4배), 코돈

88은 SM-W88K 야생형 프로브의 형광세기가 더 높았다(1.6배). 이 결과로 보아 균주 MTBK-35가 K43R 돌연변이를 가진 스트렙토마이신 내성 결핵균으로 진단할 수 있었다(그림 5D).

즉 균주 MTBK-35는 리팜핀, 아이소니아지드, 및 스트렙토마이신에 대한 내성을 동시에 가지는 다제내성 결핵균으로 진단할 수 있었다.

## 고 찰

항결핵 약제 내성균의 출현이 결핵 치료의 큰 장애로 대두되면서 다제내성결핵균의 증가에 따른 약제 감수성 검사의 중요성이 더욱 강조되고 있다<sup>2,3</sup>. 이에 따라 약제 감수성을 조기에 정확히 진단

하는 것이 약제의 부적절한 처방으로 인하여 발생되는 다제내성결핵균의 출현을 막는데 매우 중요하다. 최근 이를 위해 분자생물학적 방법이 적용되고 있는데, 그 중 염기서열 분석방법은 한번에 수행할 수 있는 검체의 수가 제한되어 있고 고가의 장비와 숙련된 기술을 요구하는 단점 때문에 진단분야에서의 적용이 용이하지 않다<sup>5</sup>. 다른 방법으로 유전자 증폭 방법인 PCR과 다형성분석용 전기영동법을 접목한 PCR-SSCP(Single Strand Conformation Polymorphism) 방법을 이용하여 유전자의 구조 변화를 분석함으로써 돌연변이를 스크리닝할 수 있다. 그러나 이 방법은 감수성균과 내성균이 공존할 경우 내성균 비율이 낮을 때 이를 감수성으로 평가할 수 있다는 단점이 있다<sup>5,21</sup>. 혼성화 반응에 기초한 Line hybridization assay(INNO-LiPA Rif. TB kit : Innogenetics, Belgium) 방법은 프로브가 필터에 흡수되어있는 방법이기 때문에 프로브나 표적 DNA가 다량 필요하고, strip상에 위치하는 프로브의 수가 리팜핀 한 약제에 대한 코돈 516, 522, 526, 531과 533에서 고안된 야생형 5종류와 돌연변이형 4종류로 제한되어 있는 단점이 있다<sup>17</sup>. 이에 본 연구에서는 항결핵 약제인 리팜핀, 아이소니아지드와 스트렙토마이신 내성과 관련된 유전자의 주요 돌연변이를 동시에 한번의 혼성화 반응으로 빠르고 정확하게 검출할 수 있도록 올리고칩을 고안하여 결핵균 55균주로부터 목적 유전자를 증폭시킨 후 혼성화 반응시키고 그 형광세기를 비교하여 약제 내성 결핵균을 검출하였다.

표 3의 리팜핀 내성검출 결과 S531L 돌연변이 유형이 45%(18/40)로 가장 높은 빈도를 보였다. Q513P 돌연변이는 7.5%(3/40)로 나타나 최근에 발표한 자료(2/28, 7.1%)와 같이 높은 편이었다<sup>18</sup>. 그러나 다른 자료에서는 0.3%(1/307)나 0.5%(3/533)로 나타나 출현빈도의 차이를 보였다<sup>8,9</sup>. D516F의 aspartic acid가 phenylalanine 으로 치환된 이전의

자료에서는 찾아볼 수 없는 새로운 돌연변이를 발견함으로써 계속해서 새로운 점돌연변이에 의한 내성이 발생하고 있음을 알 수 있었다. 이미 보고된 바와 같이 리팜핀 내성은 *rpoB* 유전자의 코돈 511-533에 돌연변이가 모여 hot spot을 이루고 있었고, 특히 코돈 531과 코돈 526 돌연변이가 전체의 65%로 큰 비중을 차지함을 확인할 수 있었다<sup>5-9</sup>. 본 연구의 올리고칩으로 감수성으로 진단된 내성균주 5주의 경우 염기서열분석 결과와 올리고칩 결과가 동일하게 나온 것으로 보아 올리고칩의 위음성의 결과가 아니라 돌연변이 부위가 본 연구에서 선정한 hot spot을 벗어난 다른 지역일 것으로 사료된다. 감수성 균주에서 내성으로 진단된 4주의 경우 약제 감수성 검사 시 사용한 Löwenstein-Jensen 배지의 사용이 감수성 검사에 적당하지 않다고 보고된 자료도 있듯이 염기서열분석 결과가 올리고칩과 동일하게 나온 것으로 보아 올리고칩의 위양성의 결과가 아니라 약제 감수성 검사를 다시 시행하여 정확한 감수성 여부를 파악해야 할 것으로 사료된다<sup>4</sup>.

표 4의 아이소니아지드 내성검출 결과에서는 코돈 315의 S315T와 S315N 돌연변이 유형이 47.6%(20/42)로 높은 빈도를 보였다. 이는 최근 보고된 자료와 같이 코돈 315는 아이소니아지드 내성의 50% 이상을 차지하는 주요 돌연변이임을 확인할 수 있었다<sup>11</sup>. 그러나 코돈 463의 R463L 돌연변이의 경우는 이미 보고된 자료에서와 같이 자연 획득 돌연변이로써 아이소니아지드 내성 검출의 중요한 표지자가 아님을 확인할 수 있었고, 차후에는 중요도가 높은 다른 유전자 부위를 추가로 선정하여 아이소니아지드 내성 검출률을 더 높여야 할 것으로 사료된다<sup>13</sup>.

표 5의 스트렙토마이신 내성검출 결과에서는 코돈 43과 코돈 88의 K43R과 K88R 돌연변이 유형이 77.8%(7/9)로 높은 내성빈도를 보였고, 앞선 연구와 마찬가지로 매우 높은 비중을 차지하는 돌

연변이임을 확인할 수 있었다<sup>14,15</sup>. 전혀 반응이 일어나지 않은 감수성 균주 2주의 경우는 혼성화 반응 시 미지의 저해 작용에 의하여 반응이 일어나지 않은 것으로 예상된다.

본 연구에서 고안한 올리고칩으로 리팜핀 내성의 88%(35/40), 아이소니아지드 내성의 50%(20/42), 그리고 스트렙토마이신 내성의 78%(7/9)를 검출함으로써 현재까지 보고되어 있는 세가지 약제 내성과 관련된 주요 돌연변이는 대부분 검출할 수 있음을 확인할 수 있었다. 본 연구의 올리고칩으로 세가지 약제내성 결핵균을 검출하기까지는 5시간 밖에 소요되지 않았고, 번거로운 조작 없이 혼성화 반응만을 수행함으로써 이전의 어떠한 방법보다도 제일 신속하고 정확한 방법이라고 할 수 있겠다. 또한 염기서열분석 결과와 비교하였을 때 모두 정확히 일치하는 결과를 얻었다.

따라서 본 연구에서 개발한 올리고칩은 약제내성 결핵균의 조기 진단과 약제의 효율적인 선택을 위한 매우 유용하고 믿을 수 있는 진단도구가 될 것으로 예상되고, 추후에는 임상검체에서도 정확성과 신속성을 검증해야 할 것으로 사료된다. 또한 본 연구진이 개발중인 올리고칩 분석 프로그램인 SCAN-Pro<sup>TM</sup>를 적용하게 되면 배양 균주와 함께 임상 균주에서도 더욱 쉽게 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

귀중한 결핵균주를 제공해주시고 연구를 위해 자문해 주신 국립마산결핵병원 박승규 과장님께 감사드립니다.

## 요 약

### 연구배경 :

약제내성 결핵균의 조기 진단을 위해서, 최근 돌연

변이 검출 및 질병의 진단 등에 새로운 기술로 대두되고 있는 올리고뉴클레오타이드 칩 기술을 이용하여 결핵균의 리팜핀, 아이소니아지드와 스트렙토마이신 내성과 관련된 *rpoB*, *katG*와 *rpsL* 유전자의 주요 돌연변이를 신속하고 정확하게 검출하고자 하였다.

### 방 법 :

리팜핀 내성 검출의 야생형 7개와 돌연변이형 13개, 아이소니아지드 내성 검출의 야생형 2개와 돌연변이형 3개, 그리고 스트렙토마이신 내성 검출을 위한 야생형과 돌연변이형 프로브 각 2종류를 고안한 후, 유리 슬라이드에 고정시켜 올리고뉴클레오타이드 칩을 제작하였고, 약제내성을 가지고 있는 배양균주 55균주를 선택하여 PCR 증폭반응과 혼성화 반응을 실시한 후 비공조점 레이저 스캐너를 이용하여 돌연변이를 검출하였다. 이를 염기서열분석 방법으로 확인하여 돌연변이 다형성을 분석하였다.

### 결 과 :

리팜핀 내성은 코돈 531과 코돈 526에서 65%의 돌연변이를 검출하였고, 현재까지 보고되어 있지 않은 D516F의 새로운 돌연변이도 검출하였다. 아이소니아지드 내성은 S315T와 R463L 돌연변이가 45.2%로 검출되었고, 스트렙토마이신 내성은 K43R과 K88R 돌연변이가 78%로 검출되었다. 리팜핀 내성의 88%(35/40), 아이소니아지드 내성의 50%(20/42), 그리고 스트렙토마이신 내성의 78%(7/9)를 검출함으로써 현재까지 보고되어 있는 세가지 약제내성과 관련된 *rpoB*, *katG*와 *rpsL* 유전자의 주요 돌연변이는 대부분 검출할 수 있음을 확인할 수 있었고, 염기서열분석 결과와 비교하였을 때 모두 일치하는 결과를 얻음으로써 올리고뉴클레오타이드 칩의 유용성을 확인할 수 있었다.

### 결 론 :

따라서 본 연구에서 개발한 올리고뉴클레오타이드 칩은 약제내성 결핵균의 조기 진단에 유용한 도구가 될 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. WHO/UNHCR. Tuberculosis Control in Refugee Situations: An Interagency Field Manual. Tuberculosis 1997;15-7
2. Pablos-Mendex A, Raviglione MC, Laszlo A, Binkin N, Rieder HL and Bustreo F, et al. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance. N Engl J Med 1998;338: 1641-9
3. Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, Boulaïbal F, Kim SJ and Reniero A, et al. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. N Engl J Med 2001;344:1294-303
4. Chang CH, Son HC, Kim CM. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and their susceptibility tests. J Korean Soc Chem 1998;16:187-203
5. Kim CM. Molecular biological study for early detection of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. 국립마산결핵병원논문집 1995;20:73-94
6. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S and Colston MJ, et al. Detection of rifampin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet 1993;341:647-50
7. Valim AR, Rossetti ML, Ribeiro MO, Zaha A, et al. Mutations in the *rpoB* gene multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. J Clin Microbiol 2000;38:3119-22
8. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. Tuber Lung Dis 1998;79:3-29
9. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: Molecular genetic insights. Clin Microbiol Rev 1995;8:496-514
10. Lee AS, Lim IH, Tang LL, Telenti A and Wong SY. Contribution of *kasA* analysis to detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. Antimicrob Agents Chem 1999;43:2087-9
11. Mokrousov I, Narvskaya O, Otten T, Limeschenko E, Steklova L and Vyshnevskiy B. High prevalence of *katG* Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Northwestern Russia, 1996 to 2001. Antimicrob Agents Chem 2002;46:1417-24
12. Kelley CL, Rouse DA and Morris SL. Analysis of *ahpC* gene mutations in isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chem 1997;41:2057-8
13. Doorn HR, Kuijper EJ, Ende A, Welten AG, Soolingen D and Haas PE, et al. The susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and the Arg→Leu mutation at codon 463 of *katG* are not associated. J Clin Microbiol 2001;39:1591-4
14. Honore N, Cole ST. Streptomycin resistance in Mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother 1994;38:238-42
15. Dobner P, Bretzel G, Rüscher-Gerdes S, Feldmann K, Rifai M and Löscher, et al. Geographic variation of the predictive values of genomic mutations associated with streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Cell probes 1997;11:123-126
16. Troesch A, Nguyen H, Miyada CG, Desvarenne S, Gingeras TR and Kaplan PM, et al. Mycobacterium species identification

- and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. J Clin Microbiol 1999;37:49-55
17. Lee MK, Kim YS, Lee HJ, Cheon DS, Yun SM and Park SS, et al. Analysis of *rpoB* gene in rifampin-resistant *M. tuberculosis* by direct sequencing and line probe assay. 결핵 및 호흡기 질환 1997;44:251-63
18. Park SK, Lee MK, Chung BS, Kim CM, Chang CH and Park HK, et al. Detection of *rpoB* gene mutation in rifampin-resistant *M. tuberculosis* by oligonucleotide chip. 결핵 및 호흡기 질환 2000;49:546-57
19. Kim HJ, Kim SK, Shim TS, Park YD, Park MS. Detection of point mutations in the *rpoB* gene related to drug susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* using an oligonucleotide chip. 결핵 및 호흡기 질환 2001;50:29-41
20. Hacia JG, Collins FS. Mutational analysis using oligonucleotide microarrays. J Med Genet 1999;36:730-6
21. Telenti A, Honore N, Bernasconi C, March J, Ortega A and Heym B, et al. Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a build study at reference laboratory level. J Clin Microbiol 1997;35:719-23
-