

나균의 분자생물학적 연구를 위한 효율적인 DNA 분리 방법의 비교 연구

■ 김윤지, 박진호, 김종필

■ 한국한센복지협회 한센병연구원

Comparison of Effective DNA Extraction method for Molecular biological study of *Mycobacterium leprae*

Yun-Ji Kim, Jin-Ho Park, Jong-Pill Kim

Institute for Leprosy Research, Korean Hansen Welfare Association

Background

Leprosy is an important health problem in many geographical areas yet. It is caused through a cough or contact with fluid from the nose of a person infected by *Mycobacterium leprae*. Study of DNA from *M. leprae* is important to understand essentiality for leprosy. However, there is no standard in many parts, so various studies are needed.

Objects

In this study, DNA extraction method were confirmed for the effective detection of *M. leprae*. And restriction enzyme fragment length polymorphism typing and high resolution melt (HRM) analysis were performed for comparison with sequencing analysis.

Methods

Compared with three DNA extraction methods (BB, SM and SP) with real-time polymerase chain reaction (PCR). Analysis single nucleotide polymorphism (SNP) genotype and tandem repeats by PCR amplification, and then compare with sequence.

Results

BB method was effective when measuring the concentration and threshold cycle (Ct) compared with SM and SP methods. When compared with restriction fragment length polymorphism typing method and sequence analysis, all methods were suitable for SNP1 and 3 type classification. Tandem repeats values of BB method were correspond to sequence analysis than SM and SP methods in HRM analysis.

Conclusion : The DNA extraction method by bead is useful approach for studying of *M. leprae*.

■ **Key words:** DNA extraction, Leprosy, *Mycobacterium leprae*, PCR

Corresponding author : Yun-Ji Kim

Yun-Ji Kim, 0000-0002-0003-8880

Email : yunjipod@naver.com

Received : October 30, 2019

Accepted : December 3, 2019

Copyright © 2019 Korean Leprosy Bulletin

서론

한센병은 나균(*Mycobacterium leprae*)에 의해 발생하는 만성 질환으로, 감염이 된 후 평균 5~7년의

잠복기를 가진다. 복합화학요법(multidrug therapy; MDT) 보급 이후 유병률은 지속적으로 감소하였지만, 여전히 많은 지역에서는 신환자가 발생하고 있으며, 아직도 여러 나라에서는 주요 보건문제의 하나로 간주되고 있는 만성 전염성 질병이기도 하다¹.

실험적으로도 한 생명의 진단은 많은 부분에서 임상증상에 의존하고 있으며, 피부 도말 검사에서 항산성균 염색(acid-fast bacilli, AFB)을 하여 현미경상 균의 존재여부를 확인하는 것을 기초로 하고 있는데, 다른 항산균의 영향을 배제할 수 없어 AFB에서 양성이 나타나더라도 나균으로 바로 확진을 할 수 없고, 신경 내 염증 소견을 발견하지 못하면 진단이 어렵기도 하다¹. 분자생물학적인 방법으로는 나균에 특이한 Phenolic glycolipid-I (PGL-I) 등과 같은 항원에 대한 항체검사를 통해

이루어지기도 하고, 나균에 특이한 염기서열에 기초한 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)검사로 나균의 DNA를 발견함으로써 그 진단이나 연구가 이루어진다²⁻⁴. 나균 검출에 있어서 면역학적, 생화학적 방법을 이용하려는 시도는 많이 행해지고 있으며, 기존 진단법의 특이성과 민감도 등을 극복하기 위한 다양한 연구도 지속되고 있다⁵.

그러나 오랜 시간 많은 연구가 행해졌음에도 최근 까지 세계보건기구(World Health Organization, WHO)는 뚜렷한 가이드라인을 제시하지 않았는데, 각 실험실의 진단 기술의 정확성과 재현성이 미흡하다는 점을 이유로 하고 있다⁶.

본 연구는 여러 방법으로 나균의 DNA를 분리한 후 다양한 중합효소 연쇄반응 기법을 이용하여

Table 1. Summary of objects

Clinical ID	Nationality of patient	Biopsy data	Generation of subculture (nude mouse)
H1	Korea	2011/05	6th
H2	Indonesia	2010/08	7th
H3	Korea	2012/12	5th
H4	Myanmar	2013/12	4th
H5	Indonesia	2010/02	8th
H6	Korea	2012/01	6th
H7	Sri Lanka	2008/11	10th
H8	Thailand	2008/06	10th
H9	Korea	2007/06	11th
H10	Korea	2007/07	11th
H11	Indonesia	2016/08	2nd
H12	Korea	2010/07	8th
H13	Sri Lanka	2012/08	6th
H14	Korea	2010/08	8th
H15	Korea	2007/07	11th

비교하고, 나균의 진단 및 연구에 활용하기 위한 효율적인 나균 DNA 분리법을 제시하고자 한다.

대상 및 방법

1. 대상 및 나균의 분리

한국한센복지협회 연구원을 내원한 한센병 환자에서 나균을 분리하여 이를 누드마우스 족저에 접종하였으며, 나균이 증식된 조직에서 트립신과 수산화나트륨(NaOH)를 이용하여 균을 분리하였다(Nakamura⁷ 수정된 방법). 대상 균주는 한국인과 외국인 환자로 구성하였으며 기초자료는 Table 1과 같다.

2. 나균 DNA 정제

동일한 나균 샘플로 세 가지 추출법(비드 박동에 의한 세포막 파괴, 실리카겔 막, 염석 및 침전)을 사용하여 DNA를 분리하였으며, 이 때 최종산물은 모두 100 μ l로 제조하였다.

- 1) 비드 박동에 의한 세포막 파괴(cracking of cell wall by bead beating, 이하 BB법)
분리한 나균에 10 mM Tris-cl과 0.5 mM EDTA를 넣어주고, 산으로 세척한 유리 비드로 5분간 균질한다. 100°C에서 10분, -20°C에서 2분간 정치한 후 상층액을 최종산물로 얻는다.
- 2) 실리카겔 막 이용(using silica gel membrane, 이하 SM법)
QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN, USA)를 이용하였으며, 제조사가 지정한 DNA Purification from Tissues법을 실시하였다.
- 3) 염석 및 침전 작용 이용(salting-out precipitation, 이하 SP법)
Puregene Yeast/Bact. Kit (QIAGEN)를 이용하였으며, 제조사가 지정한 DNA Purification from Gram-Positive Bacteria법을 실시하였다.

3. DNA 농도 및 순도 측정

마이크로 플레이트리더(Infinite F200, TECAN, Switzerland)를 이용하여 260 nm와 280 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 결과를 산출하였다. 260 nm 흡광도 값으로 DNA의 농도를 계산하였으며, 두 파장의 비를 통해 DNA의 순도를 확인하였다.

4. 분자생물학적 방법에 따른 비교

1) 나균 검출 확인을 위한 실시간 중합효소 연쇄반응

① DNA-결속 물질을 이용한 실시간 중합효소 연쇄반응

나균 DNA의 반복염기서열 중 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 제공되는 Blast search를 통하여 염기서열을 추출한 후 RLEP1 프라이머를 제작하였다(Table 2). QuantiNova SYBR® Green PCR kit (QIAGEN)를 사용하여 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time PCR)을 수행하였으며 그 조건은 Table 3과 같다.

② 형광 Probe를 이용한 중합효소 연쇄반응

Martinez⁴ 등이 제시한 프라이머 RLEP2 (Table 2) 및 중합효소 연쇄반응 조건(Table 3)을 이용하였으며, QuantiNova Probe PCR kit (QIAGEN)으로 실시간 중합효소 연쇄반응을 수행하였다.

2) 나균의 single nucleotide polymorphism (SNP) 유형분류를 위한 중합효소 연쇄반응

① SNP 유전자형 확인을 위한 중합효소 연쇄반응

Monot⁸ 등에 의한 방법에 따라 SNP1, 2, 3 프라이머를 이용하였고(Table 2), Multiplex PCR *plus* kit (QIAGEN)로 수행하였으며 그 조건은 Table 3과 같다.

② 중합효소 연쇄반응 후 제한효소 절편길이 다형성 기법 실시

Sakamuri⁹ 등이 제안한 방법으로 나균 SNP1, 2, 3의 중합효소 연쇄반응 산물에 제한효소를 처리하여 절편길이 다형성 기법을 실시하였다. 제한효소의 종류와 처리법은 Table 4와 같으며 전기영동하여 절편 길이를 분석하여 SNP에 따른 유전자형을 분류하였다(Fig. 1).

3) rpoT 유전자를 이용한 나균 패턴 분류

나균의 rpoT 유전자가 반복염기 패턴을 보이는 걸

이용하여 rpoT 프라이머¹⁰ (Table 2) 로 실시간 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. Type-it HRM PCR kit(QIAGEN)로 수행하였으며 Rotor-Gene Q software의 HRM 분석 프로그램으로 유전자형 별로 그룹화하여 반복패턴의 개수를 산출하였다.

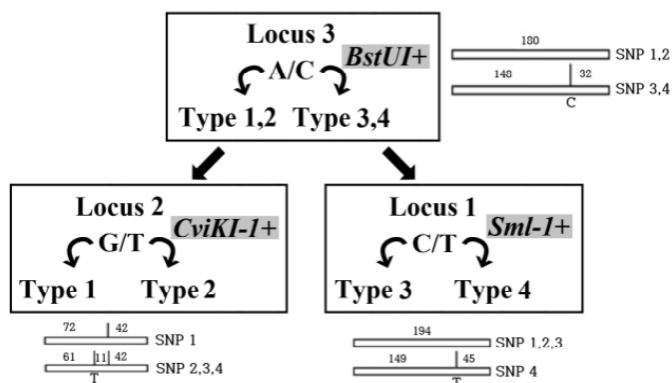


Fig. 1. SNP subtyping of *M. leprae* based on PCR-RFLP⁹

Table 2. PCR primer sequences

	Primer name	Sequence (5'-3')	Length (bp)
RLEP1	LP-F	ACC ATT TCT GCC GCT GGT AT	159
	LP-R	ATC TGC GCT AGA AGG TTG CC	
RLEP2 ⁴	Taq-F	GCA GCA GTA TCG TGT TAG TGA A	81
	Taq-R	CGC TAG AAG GTT GCC GTA T	
	Taq-Probe	CGC CGA CGG CCG GAT CAT CGA	
SNP1 ⁸	SNP14676-F	AAT GGA ATG CTG GTC AGA GC	194
	SNP14676-R	CAA TGC ATG CTA GCC TTA ATG A	
SNP2 ⁸	SNP1642875-F	TGC TAG TTT AAC CGA GTA CTG CTA	189
	SNP1642875-R	GTA GTA GTC TTC CAA GTT GTG GTG	
SNP3 ⁸	SNP2935685-F	ATC TGG TCC GGG TAG GAA TC	180
	SNP2935685-R	ACC GGT GAG CGC ACT AAG	
rpoT	rpoT-F2	CTG AAC ACC CTC GAC TCC G	140
	rpoT-R2	TGA CTA CGT CGT CGT CTT CG	

4) 유전자 염기서열 분석

SNP1, 2, 3와 rpoT 프라이머를 이용하여 얻은 중합효소 연쇄반응 산물을 외부업체인 BIONICS (Korea)사에 의뢰하여 시퀀싱을 분석하였다.

① SNP 유전자형 확인

시퀀싱 분석 후 SNP의 각 좌위에 있는 염기를

확인하였으며, Monot⁸ 등에 의한 방법에 따라 SNP 유전자형을 분류하였다(Table 5). 이후 제한효소 절편길이 다형성 기법의 분석결과와 일치하는지 확인하였다.

Table 3. PCR reaction condition

Target	Temp. (°C)	Time	Cycle
REL P1	95	5 min	-
	95	5 s	28
	60	10 s	
REL P2 ⁴	95	10 min	-
	95	15 s	40
	60	1 min	
SNP1, 2, 3 ⁸	95	5 min	-
	95	30 s	40
	57	90 s	
	72	90 s	
	68	10 min	-
rpoT	95	5 min	-
	95	10 s	40
	55	30 s	
	72	10 s	

Table 4. Conditions of restriction enzyme for SNP⁹

SNP	Restriction enzyme	Temp.(°C)	Incubation time
SNP1	Sml-1	55	1 hr
SNP2	CviKI-1	60	
SNP3	BstUI	37	

Table 5. SNP type for *M. leprae*

SNP	Locus1 (SNP14676)	Locus2 (SNP1642875)	Locus3 (SNP2935685)
Type 1	C	G	A
Type 2	C	T	A
Type 3	C	T	C
Type 4	T	T	C

② 반복패턴 염기서열 개수 확인

실시간 중합효소 연쇄반응 중 HRM분석 프로그램을 이용하여 그룹화한 결과와 rpoT 프라이머와의 중합효소 연쇄반응 산물의 시퀀스에서 반복염기서열 개수를 비교하여 분석결과가 일치하는지 확인하였다. 반복염기서열은 6 bp의 “CATCGA”로 이루어져있으며, 3반복 또는 4반복을 나타내었다.

5) 통계처리

NCSS 2019 Data Analysis (USA)를 사용하여 통계 처리를 하였다. 정규분포 상태를 보기 위해 skewness 검정을 하였고, 변수에 대한 검정은 일원배치 분산분석 중 Tukey-Kramer's법을 실시하였다. 시퀀싱과의 상관관계는 교차검정 중 Likelihood Ratio Fisher's Exact와 Single Binary Diagnostic Test를 이용하였다.

결 과

1. 방법에 따른 DNA 추출 효율 비교

나균에서의 효율적인 DNA 분리법을 제시하기 위해 세 가지 방법(BB법, SM법 및 SP법)으로 DNA 분리작업을 수행한 후 DNA농도 및 순도 측정을 실시하였다.

DNA 농도를 측정했을 때(Fig. 2A), BB법은 평균 3196.1 ± 232.6 ng/ml, SM법은 평균 1876.5 ± 22.7 ng/ml, SP법은 평균 1867.9 ± 22.3 ng/ml이었으며, 정규분포를 만족하지 않았지만($\alpha=0.21$), SM법과 SP법은 모두 BB법에 유의한 통계적 변화를 보였으며($**p<0.01$), 두 실험법은 서로 통계적 유의성이 없었다($p=0.99$).

DNA의 순도를 측정했을 때(Fig. 2B), BB법은 평균 1.02 ± 0.04 , SM법은 평균 0.98 ± 0.00 , SP법은 평균 0.97 ± 0.01 이었으며, 전체적으로 순도가 높은 편은 아니었다. 순도 역시 정규분포를 만족하지 않았고($\alpha=0.83$), 각 방법 간 통계적인 유의성은 없었다.

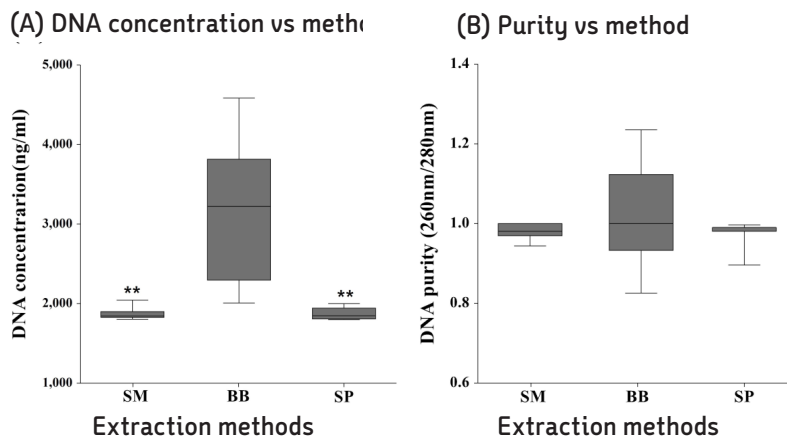


Fig. 2. Results of DNA concentration and purity of three extraction methods for *M. leprae*.

(A) The DNA concentration was high in BB method compared to SM and SP methods. (B) The DNA purity of BB method was high compared with SM and SP methods but was not significant. (One-way ANOVA followed by tukey-kramer's test, $**p < 0.01$ vs. BB method)

2. 나균 확인을 위한 실시간 중합효소 연쇄반응 결과 비교

실시간 중합효소 연쇄반응에서는 최초 주형(template) 양을 반영하는 Ct값의 비교로 나균 DNA산물의 양을 가정하였다. 형광물질로 SYBR Green을 이용 시(Fig. 3A) BB법을 기준으로, SM법은 $166.1 \pm 4.0\%$, SP법은 $180.4 \pm 5.3\%$ 가 나타났다. 정규분포를 만족하진 않았지만($\alpha=0.85$), SM법과

3. 제한효소 절편길이 다형성 기법을 이용한 SNP 유전자형 분류의 효율(Table 6)

SNP 프라이머를 이용한 중합효소 연쇄반응 산물에 제한효소(Sml-1, CviKI-1, BstUI)를 처리 후 절편 길이를 분석하여 SNP 유형을 분류하였으며, 외부업체에 의뢰하여 분석한 시퀀싱과 비교하여 결과를 확인하였다.

모든 샘플군의 92.9%가 시퀀싱과 동일하였으며,

SP법 모두 BB법에 유의한 통계적 변화를 보였으며($**p<0.01$), 두 실험법의 유의성은 없었다($p=0.22$). 형광물질로 probe 이용 시(Fig. 3B), BB법을 기준으로, SM법은 $149.5 \pm 2.1\%$, SP법은 $162.5 \pm 3.1\%$ 로 나타났으며 정규분포를 만족하였고, 세 방법은 통계적으로 유의한 변화를 보였다($p<0.01$). SM법과 SP법은 모두 BB법에 유의한 통계적 변화를 보였지만($**p<0.01$), 두 실험법 간 유의성은 없었다($p=0.12$).

통계적으로도 일치하였다($\dagger \alpha<0.05$). 제한효소 절편길이 다형성 기법은 SNP1 유형의 민감도(sensitivity, TPR) 100.0%, 특이도(specificity, TNR) 85.7%를 보였고, SNP3 유형의 민감도와 특이도는 모두 100.0%를 보였다. DNA 추출 방법별로 분석 시, 세 방법에서 제한효소 절편길이 다중법의 결과는 모두 통계적으로 시퀀싱과 일치하였다($\dagger \alpha<0.05$). BB법과 SP법은 SNP1, 3유형의 민감도와 특이도 모두 100.0%를 보였으며,

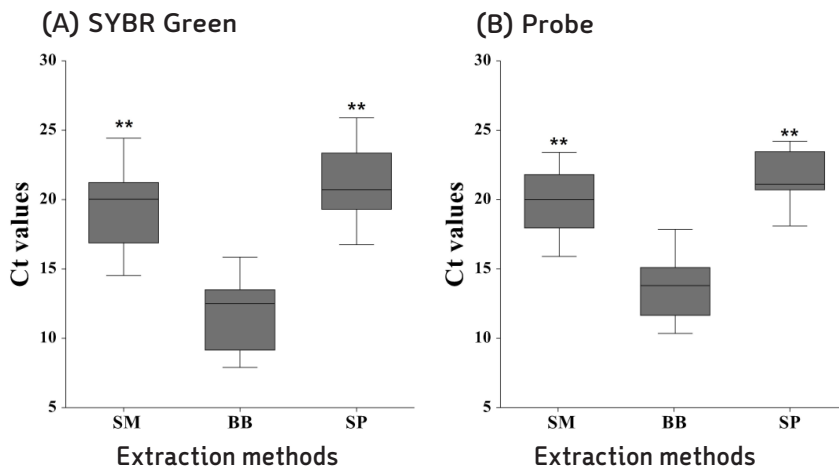


Fig. 3. Comparison of DNA extraction methods for *M. leprae* via Ct values of PCR. Low Ct value indicates high DNA amplification. PCR fluorescent dye was used as two types: (A) SYBR Green, (B) Probe. The total Ct values were significantly increased in SM and SP methods compared to the BB method. (One-way ANOVA followed by tukey-kramer's test, $**p<0.01$ vs. BB method)

SM법의 SNP3 유형 역시 민감도와 특이도 모두 100.0%였으나, SNP1 유형은 민감도 75.0%, 특이도 100.0%를 보였다.

결과를 종합하였을 때, 제한효소 절편길이 다형성

기법은 시퀀싱과 비교 시 민감도와 특이도가 높은 것으로 보아 BB법, SM법 및 SP법에서 모두 SNP1 및 SNP3 유형 분류에 높은 효율을 보인다고 판단된다.

Table 6. Comparison with restriction fragment length polymorphism typing method and sequence analysis for SNP types. (A) Results of restriction fragment length polymorphism typing method by sequence analysis, (B) Results for rates of TPR and TNR. All methods were significantly correspond compared to the sequence analysis (Two way followed by Likelihood Ratio Fisher's Exact, † $\alpha < 0.05$ vs sequence analysis). TPR and TNR values of SNP1 and 3 type were 1.00 in BB, SM and SP methods except TPR value of SNP1 type was 0.75 in SM method (Single Binary Diagnostic Test. ‡ TPR value > 0.80, and § TNR value > 0.80 vs. sequence analysis).

(A) Restriction fragment length polymorphism typing method by sequence analysis

Methods	Total †		By bead beating †		Silica gel membrane †		Salting-out precipitation †	
Seq. Rest.	1 type	3 type	1 type	3 type	1 type	3 type	1 type	3 type
1 type	21(50%)	-	7(50.0%)	-	6(42.9%)	-	8(57.1%)	-
3 type	-	18(42.9%)	-	6(42.9%)	-	6(42.9%)	-	6(42.9%)
N/A	3(7.1%)	-	1(7.1%)	-	2(14.3%)	-	-	-

(B) Results for rates of sensitivity and specificity

Methods	Total		By bead beating		Silica gel membrane		Salting-out precipitation	
Seq.	1 type † §	Non-1 type	1 type † §	Non-1 type	1 type §	Non-1 type	1 type † §	Non-1 type
1 type	21(50.0%)	-	8(57.1%)	-	6(42.9%)	2(14.3%)	8(57.1%)	-
non-1 type	3(7.1%)	18(42.9%)	-	6(42.9%)	-	6(42.9%)	-	6(42.9%)
Seq.	3 type † §	Non-3 type	3 type † §	Non-3 type	3 type † §	Non-3 type	3 type † §	Non-3 type
3 type	18(42.9%)	-	6(42.9%)	-	6(42.9%)	-	6(42.9%)	-
non-3 type	-	24(57.1%)	-	8(57.1%)	-	8(57.1%)	-	8(57.1%)

Table 7. Comparison of HRM and sequence analysis for tandem repeats. (A) Results of HRM analysis by sequence analysis, (B) Results for rate of TPR and TNR. All methods were significantly independent compared to the sequence analysis (Two way followed by Likelihood Ratio Fisher's Exact). TPR and TNR values of SNP1 type and 3 type were below in general (Single Binary Diagnostic Test. † TPR value>0.80, and §TNR value>0.80 vs. sequence analysis).

(A) Results of HRM analysis by sequence analysis

Methods	Total		By bead beating		Silica gel membrane		Salting-out precipitation	
Seq. HRM	3 repeats	4 repeats	3 repeats	4 repeats	3 repeats	4 repeats	3 repeats	4 repeats
3 repeats	15(35.7%)	4(9.5%)	5(35.1%)	1(7.1%)	5(35.7%)	2(14.3%)	5(35.7%)	1(7.1%)
4 repeats	9(21.4%)	8(9.0%)	4(28.6%)	4(28.6%)	3(21.4%)	2(14.3%)	2(14.3%)	2(14.3%)
N/A	3(7.1%)	3(7.1%)	-	-	1(7.1%)	1(7.1%)	2(14.3%)	2(14.3%)

(B) Results for rates of sensitivity and specificity

methods	Total		By bead beating		Silica gel membrane		Salting-out precipitation	
Seq. HRM	3 repeats	Non-3 repeats	3 repeats §	Non-3 repeats	3 repeats	Non-3 repeats	3 repeats †	Non-3 repeats
3 repeats	15(35.7%)	12(28.6%)	5(35.7%)	4(28.6%)	5(35.7%)	4(28.6%)	2(14.3%)	3(21.4%)
non-3 repeats	4(9.5%)	11(26.2%)	1(7.1%)	4(28.6%)	2(14.3%)	3(21.4%)	3(21.4%)	6(42.9%)
Seq. HRM	4 repeats	Non-4 repeats	4 repeats †	Non-4 repeats	4 repeats	Non-4 repeats	4 repeats	Non-4 repeats
4 repeats	8(19.0%)	7(16.7%)	4(28.6%)	1(7.1%)	5(35.7%)	1(7.1%)	2(14.3%)	2(14.3%)
Non-4 repeats	9(21.4%)	18(42.9%)	4(28.6%)	5(35.7%)	4(28.6%)	4(28.6%)	3(21.4%)	7(50.0%)

4. HRM 분석연구와 시퀀싱을 통한 rpoT 유전자의 반복패턴 산출(Table 7)

HRM 분석을 통해 그룹화하여 유전자형 분류하였으며, 실시간 중합효소 연쇄반응 산물을 외부업체에

의뢰하여 분석한 시퀀싱에서 “CATCGA”의 반복염기 (3반복 혹은 4반복)개수를 확인하여 HRM 분석과 시퀀싱의 결과를 비교하였다.

HRM 분석 결과의 44.7%가 시퀀싱과 동일하였지만,

통계적 불일치를 보였고($\alpha=0.19$), 3반복은 민감도 55.6%, 특이도 73.3%, 4반복은 민감도 53.3%, 특이도 66.7%를 나타냈다.

DNA 추출 방법별로 분석하였을 때, BB법은 63.7%가 시퀀싱과 동일하였으나 통계적인 불일치를 보였으며($\alpha=0.19$), 3반복은 민감도 55.6%, 특이도 80.0%, 4반복은 민감도 80.0%, 특이도 55.6%를 나타냈다. SM법은 50.0%가 시퀀싱과 동일하였으며, 통계적인 불일치를 보였고($\alpha=0.83$), 3반복은 민감도 55.6%, 특이도 60.0%, 4반복은 민감도 40.0%, 특이도 66.7%를 나타냈다. SP법도 50.0%가 시퀀싱과 동일하였으며, 통계적인 불일치를 보였고($\alpha=0.42$), 3반복은 민감도 83.3%, 특이도 50.0%, 4반복은 민감도 50.0%, 특이도 70.0%를 나타냈다.

HRM 분석에 있어 BB법은 SM법, SP법에 비해 시퀀싱과 유사성이 높았으며, SP법은 SM법 보다 통계적인 일치 확률이 크다고 짐작된다.

고 찰

나균은 병원성 미생물 중 역사상 최초로 보고 된 것들 중 하나에 속하지만, 아직까지 인공배지 증식 기술이 개발되지 않았고, Shepard¹¹ 등에 의해 생체 내 실험법으로 쥐 족저 내 접종법이 표준화 된 것을 제외하면 특별한 가이드라인이 제시되지 않아 연구에 어려움이 있다. 나균은 특이 염기서열을 기반으로 하는 연구가 활발히 진행되고 있어 DNA를 추출하여 사용하는 경우가 많은데, DNA 분리에서 특별한 기준 없이 다양한 방법들이 사용되고 있기에, 여러 방법들의 실제적인 효율을 확인하고자 본 연구를 진행하게 되었다.

물리적으로 유리 비드의 박동을 이용하는 방법(BB법)과 실리카겔 막을 이용하는 방법(SM법), 그리고 염색

및 침전 작용을 이용하는 방법(SP법)으로 나누어 DNA를 추출한 후 실험을 진행하였으며, 흡광도를 측정하여 비교해 본 결과(Fig. 2), BB법의 DNA농도가 SM법과 SP법에 비해 통계적으로 유의하게 높은 것을 확인 할 수 있었고, DNA의 순도도 BB법이 가장 좋았으나 통계적인 변화는 보이지 않았다.

또한 나균 유전자를 이용한 실시간 중합효소 연쇄반응을 진행하고 Ct값을 비교한 결과 역시 BB법은 다른 두 방법에 비해 통계적으로 유의하게 낮은 Ct값을 나타냈고, 이는 곧 DNA의 증폭량이 비교적 높은 것으로 해석되기에 DNA의 추출 효율이 높다고 해석 할 수 있다(Fig. 3). 이때 사용한 형광물질은 DNA-결속 형광인 SYBR Green과 형광 probe를 기반으로 한 probe 두 가지를 사용했으며, BB법은 SM법, SP법에 비해 두 형광물질에서 모두 통계적으로 유의한 변화를 보였다. 추출 작업 시에도, BB법은 약 30분 정도 소요되는 반면, SM법과 SP법은 정치시간이 길고 작업 단계가 많아 상대적으로 오랜 시간이 소요된다. 결과적으로 BB법은 SM법과 SP법에 비교하여 DNA 추출에 있어서는 효율적인 방법이라고 판단된다. 다만, DNA의 순도가 전체적으로 높지 않은 점에 대해서는 조직에서의 나균 분리법과 DNA 추출법의 수정 등과 같은 추후 연구가 필요할 것이라 사료된다.

중합효소 연쇄반응은 나균 검출에 일반적인 방법으로, 나균 특이 유전자 부위(18 kDa12, 36 kDa13, 65 kDa5 등)에 대한 확인을 통해 이루어진다. 특히 세 가지 SNP 좌위의 발견을 바탕으로 네 개의 주요 SNP 유형이 있다고 보고되었는데⁸, 직접 염기서열을 확인하지 않고 중합효소 연쇄반응 후 제한효소를 처리하여 확인하는 절편길이 다형성 기법을 이용할 수 있다⁹. 이에 따라 Sml-1, DviKI-1, BstU1 등의 제한효소를 처리 후 전기영동 한 결과로 SNP 유형을 분류하였을 때(Table 6), 염기서열로 확인한 결과와 통계적인 차이가 없었음을 확인하였다($\dagger \alpha < 0.05$).

SNP3 유형의 민감도, 특이도는 모두 100.0%였으며, SNP1 유형도 SM법에서 민감도 75.0%가 나온 것을 제외하고는, 모두 100.0%의 결과를 보였다. 본 연구의 결과, 시퀀싱과 비교 시 민감도와 특이도가 높은 것으로 보아, BB법, SM법, SP법 등의 추출 방법들은 모두 제한효소 절편길이 다형성 기법을 이용한 SNP1 유형과 SNP3 유형 분류에 있어서 높은 효율을 가진다고 판단된다. 이전 연구에 따르면 SNP1 유형과 SNP3 유형이 미얀마 및 태국 등에서 가장 흔하게 발견되며, 한국, 일본, 인도네시아에서는 SNP3 유형이 더 흔하게 발견된다고 한다^{9,14-15}. 따라서 제한효소 절편길이 다형성 기법은 한국에서 발견한 나균에 있어서는 SNP 유형분류에 적합한 방법이라 사료된다. rpoT 유전자는 코딩기반(coding region) 안에 존재하는 6 bp의 반복염기 횡수의 차이를 응용한 것으로, GACATC의 염기서열을 3개 및 4개가 직렬하는 형으로 구분하여 나균의 형별법으로 사용되고 있다¹⁶. HRM 기법은 실시간 중합효소 연쇄반응 산물이 DNA 서열에 따라 고유의 녹는 온도(Tm)를 갖는 것을 이용한 SNP 분석기법으로, 본 연구에서 HRM 기법을 이용한 실시간 중합효소 연쇄반응을 수행하여 나균의 반복 염기 확인의 효율성을 확인하였다(Table 7). BB법은 63.7%가 시퀀싱과 일치한 반면 SM법과 SP법은 각각 50.0%가 동일했으며, 3반복 및 4반복의 민감도와 특이도도 BB법이 다른 두 방법에 비해 높은 수준을 보였다. 이로써 HRM 분석에서 BB법은 SM법과 SP법에 비해 효율이 높다고 판단된다. 그러나 결과 값이 시퀀싱과 통계적으로 유의하지 않고, 민감도와 특이도가 전체적으로 높지 않은 것에 대한 이유는 향후 추가 연구가 필요할 것이라 사료된다. 우리나라는 한센병의 발병률이 낮아졌지만, 경제적 구조의 변화로 외국인의 유입이 늘어나는 추세이며 그에 따라 신환자가 꾸준히 발병되고 있는 실정이다. 따라서 우리나라 역시 한센병의 분자생물학적인 연구가 계속적으로 필요하다고 생각하며, 본 연구와

더불어 다양한 연구가 더 진행되어, 보편적이면서 효율성이 높은 검출 방법과 질병 진단이 필요할 것이라 사료된다.

결 론

본 연구의 결과, BB법은 SM법, SP법에 비해 DNA의 농도와 순도가 높았으며, 중합효소 연쇄반응에서 DNA 증폭 수준도 컸다. 또한, BB법은 절편길이 다형성 기법을 이용한 SNP1, 3유형의 분류와, HRM 분석을 통한 반복염기 패턴산출의 효율이 높았다. 따라서 나균의 진단 및 연구에 활용하기 위한 방법으로 BB법이 적합하다고 사료된다.

ORCID

Yun-Ji Kim, 0000-0002-0003-8880

Jin-Ho Park, 0000-0002-2613-7246

Jong-Pill Kim, 0000-0003-0421-6389

참고문헌

1. Cardona Castro N, BeltránAlzate JC, Romero-Montoya IM, Meléndez E, Torres F, Sakamuri RM et al. Identification and comparison of *Mycobacterium leprae* genotypes in two geographical regions of Colombia. *Lepr Rev.* 2009;80(3):316-320
2. Suzuki K, Akama T, Kawashima A, Yoshihara A, Yotsu RR, Ishii N. Current status of leprosy: epidemiology, basic science and clinical perspectives. *J Dermatol.* 2012;39(2):121-129
3. Suzuki K, Takigawa W, Tanigawa K, Nakamura K, Ishido Y, Kawashima A et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA from Archaeological Skeletal Remains in

- Japan Using Whole Genome Amplification and Polymerase Chain Reaction. PLoS One. 2010;26(5):e12422
4. Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of Real-time PCR. J Clin Micro biol. 2009;47(7):2124-2130
5. Plikaytis BB, Gelber RH, Shinnick TM. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. J Clin Microbiol. 1990;28:1913-1917
6. World Health Organization(WHO) 2018. Guidelines for the Diagnosis, Treatment and Prevention of Lepros. ISBN: 978 92 9022 638 3
7. Nakamura M. Elimination of contaminants in a homogenate of nude-mouse footpad experimentally infected with *Mycobacterium leprae*. Nihon Rai Gakkai Zasshi. 1994;63(2):47-50
8. Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée JY, Lacroix C et al. On the Origin of Leprosy. Science. 2005;308:1040-1042
9. Sakamuri RM, Kimura M, Li W, Kim HC, Lee H, Kiran MD et al. Population-based molecular epidemiology of leprosy in Cebu. Philippines. J Clin Microbiol. 2009;47(9):2844-2854
10. Masanori M, Maeda S, Kai M, Nakata N, Chae GT, Gillis TP et al. *Mycobacterium leprae* typing by genomic diversity and global distribution of genotypes. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 2000;68(2):121-128
11. Shepard C. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacillus into footpads of mice. J Exp Med. 1960;112:445-454
12. 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(1):193-200
13. Hart skeerl RA, De Wit MYL, Klatser PR. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. J Gen Microbiol. 1989;135(9):2357-2364
14. Masuoka M, Lopez R, Budiawan T, Kyaw K, Chae GT. Genotypic analysis of *Mycobacterium leprae* isolates from Japan and other Asian countries reveals a global transmission pattern of leprosy. FEMS Micro biol let. 2006;261(1):150-154
15. Weng X, Wang Z, Liu J, Kimura M, Black WC 4th, Brennan PJ et al. Identification and distribution of *Mycobacterium leprae* genotypes in a region of high leprosy prevalence in China. J Chin Micro biol. 2007;45(6):1728-1734
16. Matsuoka M, Zhang L. Molecular epidemiology of the leprosy. Nihon Hansen byo Gakkai Zasshi. 2004;42(4):1666-1672