

□ 원 저 □

결핵균 PCR에서 이온교환수지를 이용한 신속한 DNA 분리

국립 마산결핵병원 임상연구소, 병리과, * 부산대학교병원 의학연구소
부산대학교 의과대학 임상병리과학교실, 생화학과학교실**

김철민 · 박승규 · 손말현 · 송선대 · 김 영* · 전은숙 · 손한철 · 정병선**

= Abstract =

Rapid Extraction of DNA using Ion Exchange Resin for Early Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by the Polymerase Chain Reaction

Cheol Min Kim, M.D., Seung Kyu Park, M.D., Mal Hyun Shon, M.D., Young Kim, M.S.,* Sun Dae Song, M.D., Eun Sook Jun, B.S., Han Chul Son, M.D. and Byung Sun Jung, Ph.D.**

Institute of Clinical Research, and Pathology, National Masan Tuberculosis Hospital, Masan, Korea*
Medical Institute, Pusan National University Hospital, Pusan, Korea
*Department of Clinical Pathology, Department of Biochemistry,***
Medical College, Pusan National University, Pusan, Korea

Background: The extraction methods of DNA from clinical samples are the major obstacle to use the PCR(Polymerase Chain Reaction) in routine laboratory for early detection of *M. tuberculosis*. We tried to improve the extraction method of DNA from sputum for establishment of the PCR in routine laboratory by reducing the possibility of cross contamination and performing it easily and safely.

Methods: We used the InstaGene™ DNA extraction kit(BioRad Co.) using Chelex 100 ion exchange resin for preparation of DNA. We compared InstaGene method in 100 cases of sputum from proteinase K method which is known as the most commonly used method for DNA purification(Experiment 1). And we compared InstaGene method in 98 cases of sputum from Microwave method developed by a company in Korea(Experiment 2). In experiment 1, 245bps of IS6110 were amplified and then 188bps were amplified by nested PCR. In experiment 2, 536bps in primary PCR and 276bps in nested PCR were amplified and analysed by agarose gel electrophoresis and EtBr staining.

Results: When we chose AFB smear, culture, or AFB smear and culture as a standard test, PCR had low specificity and positive predictive value in both experiments. The InstaGene method has higher value in sensitivity and negative predictive value significantly than proteinase K method. The InstaGene method and the Microwave methods were similar in sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value..

Conclusion: Even though both methods had lower possibility of cross contamination, shorter time requirement, simplicity, and economic advantages than Proteinase K method, the InstaGene method was a little simpler than the Microwave method. Therefore, in terms of usefulness in clinical application, the Instagene method seems to be the most useful method in DNA extraction for detection of *M. tuberculosis* using PCR. The reliability of this method will be clarified by further studies with enough clinical samples.

Key Words: Tuberculosis, PCR, InstaGene, Proteinase K, Microwave

서 론

결핵은 의학사에 있어서 단일 질병으로는 가장 많은 연구가 행해진 감염성 질환이며, Isoniazid와 rifampin 등을 사용하는 항결핵화학요법의 발달로 인하여 결핵 이환율과 사망률은 매우 감소 되기는 했지만 아직도 단일 질병으로는 가장 많은 환자수를 유지하고 있다. 또한 우리나라는 대한결핵협회와 국립결핵병원을 중심으로 하여 결핵 박멸을 위한 많은 노력을 기울였음에도 불구하고 그 효과는 거의 없었다고 할 수 있겠다^{1,2)}. 1989년에 미국은 결핵을 박멸하기 위한 전략을 수립하고 2010년까지 인구 100만 명당 1에 이하로 발병률을 줄이는 것을 목표로 하고 2000년까지 100만 명당 35예를 달성하는 것을 중간 목표로 설정하였으며, 매년 4000만 불의 자금을 책정하여 결핵 퇴치 사업을 벌이고 있다³⁾. 1990년에서 1992년까지 미국에서 HIV 감염 환자에서 결핵이 병원성으로 집단적으로 감염된 수차례의 경우에서 이들은 역학 조사와 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) 분석의 결과 이들이 병원내 감염에 의한 것임을 밝혀내었다^{4,5)}. 이들 원내감염은 예방 조치가 완벽하게 취해지지 못한데서 기인한 것으로 보아지며 이 전파에는 여러 요인이 관여한 것으로 보고 있다. 불충한 임상 관찰과 독특한 임상 및 방사선과적 소견, 증상이 유사한 다른 병원체의 병발 또는 acid-fast bacillus(afb) 도말 및 마이코박테리아 배양의 완료 및 결과 보고의 지연 등으로 인한 복합적인 요인에 의해 결핵 진단이 지연되어 원내 감염을 미연에 차단하지 못한 것으로 보고 있다. 최근 선진국에서는 AIDS 등의 면역결핍 환자에서 결핵에 의한 중복감염이 높은 치사율을 보이고 있으며, 개발 도상국들에서는 부적절한 항결핵약제의 사용으로 인하여 약제내성 결핵균의 발생이 증가하여 결핵관리에 큰 장애가 되고 있다. 이상적인 진단법은 배양에 소요되는 시간 없이 바로 임상검체에서 mycobacterium을 검출동정하는 것이라 하겠는데 임상검체에는 극히 소량의 균이 함유되어 있으므로 사실상 매우 어렵다. 이를 위해서는 민감도와 특이도가 극히 높은 검사법을 쓰거나 mycobacterium의 구성분을 검출 가능한 수준까지 증폭시키는 방법을 사용할 수가

있겠다. 결핵균 검출에 사용되는 증폭 방법에는 strand displacement amplification, Polymerase Chain Reaction(PCR), 그리고 reporter phage법 등이 있는데, 이중 PCR을 이용한 방법이 가장 간편하고 유용할 것으로 판단되어 가장 연구가 활발하다. 1985년에 핵산중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)이 개발된 이후 이 방법을 결핵균 검출에 이용하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 가장 큰 이유는 높은 민감도와 특이도를 제공함과 동시에 기존의 결핵균 검출에 걸리던 시간을 획기적으로 단축시킬 수 있기 때문이다.

본 연구는 결핵의 조기검출을 위하여, PCR을 이용하는데 있어서의 중요한 문제점의 하나인 임상검체로부터 결핵균을 분리 방법을 개선하여 PCR에 의한 결핵균의 DNA 검출을 보다 쉽고 안전하게 실시할 수 있도록 하는데 그 목적이 있다.

결핵균 검출을 위한 PCR을 위한 DNA추출법에는 SDS-Proteinase K법, GUSCN(Guanidinium thiocyanate)법, Bead-beating법, Microwave법 및 직접 가열법등이 있다⁶⁾. 그러나 이들 모두 많은 조작을 필요로 하여 교차 오염의 위험이 높거나, 지나치게 단순하여 검체내의 PCR 저해제를 충분히 제거해주지 못하며, 대개 ethanol침전 단계를 거쳐서 DNA를 회수하는 조작으로 인하여 전체 시간이 많이 걸리는 등의 단점을 가지고 있다. 이를 극복하기 위하여 최근에 도입된 방법으로는 Hoffmann-La Roche사에서 개발한 Amplicor™ Mycobacterium tuberculosis PCR kit에 포함된 Amplicor Sputum Specimen Precipitation kit가 널리 알려져 있으나 이는 비싼 kit 가격으로 인하여 국내에서 일반 검사실에 널리 이용되기에는 부적합하다. 최근 국내 기업에서 ethanol 침전 없이 Microwave 처리후 원침 상청액을 직접 PCR에 사용하는 방법을 개발하여 kit 화하여 시판하고 있으며, 본 연구자들은 Chelex 100 이온교환 수지를 이용한 InstaGene™ DNA분리 kit (BIORAD)가 결핵진단을 위한 PCR에 이용될 수 있음을 알게 되었다.

본 연구에서는 기존의 방법중에서 가장 안정적인 방법으로 알려진 DNA 추출법인 Proteinase K 처리후 phenol로 추출하는 방법과 본 연구자들이 도입한 Chelex 100 이온교환 수지를 이용한 InstaGene™ DNA분

리 kit를 이용한 방법을 비교하고, Microwave 처리후 원침 상청액을 직접 PCR에 사용하는 방법과 InstaGene™법을 비교하여, 감수성, 특이성, 양성예측도 및 음성예측도 등의 지표로 이들 DNA 분리방법들의 임상적 유용성의 가능성에 대하여 검토해 보았다.

대상 및 방법

1. 대 상

본 연구에 사용된 임상검체는 국립 마산결핵병원에 1995년 5월 부터 6월까지 내원한 환자중 결핵진단을 위하여 병리과에 의뢰된 198명의 임상가검물(객담)을 대상으로 하였으며, 표준균주는 대한결핵협회 결핵연구원에서 분주받은 *M. tuberculosis* H37rv 균주를 사용하였다.

실험 1은 Proteinase K 처리후 phenol로 추출하는 방법과 Chelex 100 이온교환 수지를 이용한 InstaGene™법을 100예에서 비교하였으며, 실험 2에서는 Microwave 처리후 원침 상청액을 직접 사용하는 방법과 Chelex 100 이온교환 수지를 이용한 InstaGene™법을 98예에서 비교하였다.

2. 방 법

1) DNA 추출

AFB 도말을 위하여 NaOH로 액화 및 오염제거처리된 객담을 500 µl씩 취하여 polypropylene microcentrifuge tube에 옮겨서 각 방법으로 DNA를 분리하였으며, 최종적으로 얻어진 DNA의 1/20량을 PCR에 사용하였다. 실험 결과는 일상 검사로 실시된 AFB 도말 결과 및 균배양 결과와 비교되었다.

(1) Proteinase K법

액화된 객담 500를 microcentrifuge로 12,000 rpm에서 5분간 침전시킨 뒤 상층을 버리고 침전물에 300 µl의 TEN완충액과 25 µl의 10% SDS 및 Proteinase K(10 mg/ml) 20 µl를 가하여 충분히 vortex하여 37℃에서 2시간(~12시간) 반응시킨다. 400 µl의 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25 : 24 : 1)을 가하여 1분간 적당히 섞어준뒤 5분간 방치한다. Microcentrifuge에서 5분간 원침하여 수층을 취하여 400 µl의 chloro-

form/isoamylalcohol(24 : 1)을 가하여 vortex후 원침하고, 수층을 취한후 10 µl의 5M NaCl을 가하여 2배량의 찬 ethanol을 가하여 -70℃에 10분간 방치한다. 4℃에서 12,000 rpm으로 10분간 원침하고 ethanol을 제거한 뒤 70% ethanol로 세척하고 실온에서 약 1시간 가량 건조시켜서 40 µl의 TE 완충액에 녹여 2 µl를 PCR에 사용한다.

(2) InstaGene법

Bio Rad사의 방법을 변형하여 다음과 같이 실시하였다. 액화된 객담 500 µl를 polypropylene tube에 옮겨 12,000 rpm에서 5분간 원침하여 상층을 제거하고 잘 섞힌 InstaGene matrix 100 µl를 가하여 잘 섞어준다. 56℃에서 30분간 반응시킨후 잘 흔들어서 100℃에서 8분 더 반응시킨다. 12,000 rpm에서 3분간 원침후 상층액 5 µl를 20 µl 규모의 PCR에 사용한다. 나머지는 반드시 -20℃에 보관한다.

(3) Microwave법

이 방법의 개발사인 (주)한국생공에서 권하는 방법을 따랐다. 액화된 객담 500 µl를 12,000 rpm에서 5분간 원침하여 상층을 제거하고 세척액(500 µl)으로 2회 세척해준 후 용해액(20 µl)을 가하여 섞고 5~10분간 Microwave(750W) 처리후에 12,000 rpm에서 5분간 원침후 상층액 1 µl를 20 µl 규모의 PCR에 사용한다. 나머지는 반드시 -20℃에 보관한다.

2. PCR Primers 선정 및 반응조건

실험 1에서는 Primer는 보고된 *M. tuberculosis* 의 IS6110반복 서열의 염기 서열을 참고하여 결정한 뒤 (주)한국생공에 주문하여 제작된 oligonucleotide를 polyacrylamide gel 전기 영동으로 정제된 것을 사용하였다. 실험2에서는 (주)한공생공의 *M. tuberculosis* 검출 Kit를 사용하였다. 실험에 사용된 primers의 염기서열을 Table 1, 2에 나타내었다.

PCR 반응 혼합액은 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dGTP, 200 µM dTTP와 20 mM의 각 primer 및 1unit의 Tag DNA polymerase(Promega, U.S.A.)로 구성되고 template DNA와 함께 총 20 µl가 되게 한다. Mineral oil 20 µl를 중

Table 1. Primers Used in PCR of Experiment 1

Target	Size	Sequence	
IS6110 (primary)	245bp	sense	5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC-3'
		antisense	5'-GCGTAGGCGTCGGTGACAAA-3'
IS6110 (nested)	188bp	sense	5'-GAACGGCTGATGACCAAACT-3'
		antisense	5'-ACGTAGGCGAACCCCTGCCCA-3'

Table 2. Primers Used in PCR of Experiment 2

Target	Size	Sequence	
IS6110 (primary)	536bp	sense	5'-CTCAAGGAGCCATCAGC-3'
		antisense	5'-TCATAGGAGCTTCCGACC-3'
IS6110 (nested)	276bp	sense	5'-CTACGGTGTTTACGGTGCCC-3'
		antisense	5'-TAGGCGTCGGTGACAAAGGC-3'

층 하여 SingleBlock thermal cycler(Ericomp, Inc., San Diego, USA)를 사용하여 우선 95℃에서 5분간 가열 후 95℃에서 1분, 60℃에서 1분, 72℃에서 2분간씩 30주기를 반복하고 마지막에 72℃에서 10분간 더 반응시킨다. 이차 PCR은 일차 PCR의 반응 조건과 같고 일차 PCR 산물을 1 μl만 사용한다. 일차 PCR결과 전기영동에서 PCR산물이 너무 많을 경우에는 10배 희석하여 1 μl를 이차 PCR에 사용하였다. 교차 오염을 방지하기 위하여 8-methoxypsoraren을 최종농도 25 μg/ml의 농도가 되도록 첨가하여 PCR 반응액을 제작하며, PCR 시작전에는 template DNA를 넣기전에 장파장 자외선을 5분이하로 조사하여 8-methoxypsoraren과 DNA를 광반응시켜 오염되었을 가능성이 있는 DNA를 불활성화시키며, 이차 PCR 까지 끝난 후에는 PCR산물을 모두 불활성화 시켜서 전기영동 등에 사용한다. PCR전후의 조작은 각각 독립된 다른 방에서 실시하며, 모든 기구는 철저히 멸균하고 임상검체 처리 및 PCR 반응액을 섞는 조작은 clean bench에서 실시하여 최대한의 주의력을 기울인다. 또한 항상 1개의 양성검체 및 2개의 음성검체(증류수)를 포함하여 PCR을 실시한다.

3. 전기영동 및 결과 판정

EtBr이 포함된 2% agarose gel 상에서 Mupid-2 (Japan) 수평전기영동조를 이용하여 100V로 30분간

전기영동하고, UV transiluminater로 UV를 조사하면서 Polaroid 사진기로 사진을 찍어 보존하였다. 분자량 표준으로 사용된 100bp ladder와 비교하여 특이적인 band가 만들어진 2차 PCR 결과를 두 실험자가 각각 비교하여 공히 양성으로 인정된 것을 “PCR 양성”으로 판정하였다.

실험결과와 임상적용 가능성의 평가는 AFB 양성 및 균배양 양성 결과와 비교된 2차 PCR 양성 결과의 감수성, 특이성, 양성예측도 및 음성예측도로 하였다.

결 과

1. PCR 결과

일차 PCR 결과에서는 Proteinase K법에서만 특이적인 PCR산물이 나왔으며, InstaGene법과 Microwave법에서는 비특이적인 산물이 비교적 많아서 결과 비교에 이용할 수 없었다(결과 생략). 따라서 일차 PCR의 결과에 관계없이 이차 PCR 결과를 보고 예상된 크기의 PCR산물이 나타나면 양성으로 판정하였다. AFB도말 및 배양검사 결과와 비교하여 Table 3, 4에 요약하였다.

2. 임상적 유의성 평가

우선 기본 검사인 AFB도말과 배양검사간의 관계를 비교해 보면, Table 5에 의하여 실험 1에서 균배양에

대한 AFB검사의 감수성, 특이성, 양성예측도 및 음성 예측도는 각각 82.6%(19/23), 66.2(51/77), 42.2(19/45), 92.7(51/55)등이며, 실험 2에서 66.7%(32/48), 96.0(48/50), 94.2(32/34), 75.0(48/64) 등이고, 종합하면 71.8%(51/71), 78.0(99/127), 64.4(51/79), 83.2(99/119) 등으로서 기준검사로써의 AFB검사나 배양법의

Table 3. Summary of Laboratory and PCR Results in Experiment 1

AFB	CULTURE	PCR (proteinase)	PCR (InstaGene)	No. of cases
+	+	+	+	13
			-	1
		-	+	5
			-	0
	-	+	+	21
			-	0
		-	+	5
			-	0
-	+	+	+	3
			-	0
		-	+	1
			-	0
	-	+	+	17
			-	4
		-	+	5
			-	25

Table 4. Summary of Laboratory and PCR Results in Experiment 2

AFB	CULTURE	PCR (microwave)	PCR (InstaGene)	No. of cases
+	+	+	+	29
			-	2
		-	+	1
			-	0
	-	+	+	12
			-	0
		-	+	2
			-	2
-	+	+	+	1
			-	0
		-	+	1
			-	0
	-	+	+	13
			-	5
		-	+	2
			-	28

Table 5. Comparison of Results between AFB Smear and Culture

		Culture		
		+	-	
AFB	+	19 ^a (32)	26 (2)	45(34)
	-	4 (16)	51(48)	55(64)
		23 (48)	77(50)	100(98)

^a experiment 1, () experiment 2

Table 6. PCR Results from DNA Extracted by Proteinase K Method and Insta Gene Method in Experiment 1

Standard	Sensitivity		Specificity		Positive Predictive Value		Negative Predictive Value	
	Proteinase K	Insta-Gene	Proteinase K	Insta-Gene	Proteinase K	Insta-Gene	Proteinase K	Insta-Gene
AFB	77.8% (35/45)	97.8% (44/45)	56.4% (31/55)	52.7% (29/55)	59.3% (35/59)	62.9% (44/70)	75.6% (31/41)	96.7% (29/30)
Culture	73.9% (17/23)	95.7% (22/23)	45.5% (35/77)	37.7% (29/77)	28.8% (17/59)	31.4% (22/70)	85.4% (35/41)	96.7% (29/30)
AFB and culture	77.6% (38/49)	98.0% (48/49)	58.8% (30/51)	56.9% (29/51)	64.4% (38/59)	68.6% (48/70)	73.2% (30/41)	96.7% (29/30)

Table 7. PCR Results from DNA Extracted by Microwave Method and Insta Gene Method in Experiment 2

standard	Sensitivity		Specificity		Positive Predictive Value		Negative Predictive Value	
	Microwave	Insta-Gene	Microwave	Insta-Gene	Microwave	Insta-Gene	Microwave	Insta-Gene
AFB	89.6% (43/48)	91.7% (44/48)	62.0% (31/50)	66.0% (33/50)	69.4% (43/62)	72.1% (44/61)	86.1% (31/36)	89.2% (33/37)
culture	94.1% (32/34)	94.1% (32/34)	53.1% (34/64)	45.3% (29/64)	51.6% (32/62)	52.5% (32/61)	94.4% (34/36)	94.6% (35/37)
AFB and culture	88.0% (44/50)	92.0% (46/50)	62.5% (30/48)	68.8% (33/48)	71.0% (44/62)	75.4% (46/61)	83.3% (30/36)	89.2% (33/37)

완전함에 우선 의문의 여지가 있다.

따라서 PCR의 유의성의 평가는 AFB도말이나 배양 검사의 어느 한쪽만을 기준검사법으로 하지않고 AFB도말, 배양검사 각각 및 AFB도말과 배양검사를 동시에 비교 기준으로 하여 두 PCR용 DNA 분리법의 감수성, 특이성, 양성예측도 및 음성예측도를 비교하여 실험 1은 Table 6에, 실험 2는 Table 7에 나타내었다. AFB도말과 배양검사를 동시에 비교 기준으로한 경우에는 두 검사법중에 하나라도 양성이면 기준검사 양성으로 하고, 두 검사법에 모두 음성이어야 기준검사 음성으로 하였다.

고 찰

일차 PCR 결과에서는 proteinase K법에서만 특이적인 PCR산물이 나왔으며, InstaGene법과 Microwave법에서는 비특이적인 산물이 비교적 많아서 이들 두 DNA 분리법이 일차 PCR만을 실시 할 경우에는 불만족스러웠다. 그러나 이차 PCR 까지 실시 할 경우에는 적정조건하에서 비특이적인 PCR산물의 생산은 거의 관찰할 수 없었다. 이는 신속한 DNA분리를 위하여 개발된 두 방법이 DNA 순도를 높이는 데는 한계가 있으며, PCR 반응을 저해하지 않는 정도의 순도를 가지는 정도까지 정제되기 때문인 것으로 사료된다. 그러나 DNA의 순도를 높이는 과정에서 동반되는 교차오염의 가능성 증가 및 기타 단점들과 비교하여 보면, DNA의 순도는 비교

적 낮지만 이를 nested PCR로서 극복 가능한 InstaGene법과 Microwave법이 임상에 도입될 수 있는 장점이 있는 것으로 사료되어 본 연구를 수행하였다.

세 DNA 분리법으로 실시한 PCR결과에서 모두 특이성과 양성예측도가 매우 낮았다. 이는 본 연구에 사용된 임상검체가 결핵에 관한한 3차 의료기관에 해당하는 국립결핵병원의 환자를 대상으로 하였기 때문에 나타나는 편향일 것으로 사료된다. 따라서 이를 보완하기 위하여 타검사 음성이면서 PCR 양성인 환자를 대상으로 하여 추적조사를 실시하여, 검사결과 양성으로 전환되거나 임상적으로 결핵의 양상을 보이게 되는 빈도가 어느 정도인지 알아 볼 필요가 있을 것으로 사료되어 계속적인 연구 수행중이다. 이러한 자료가 보완되면 실제 특이성과 양성예측도는 상당히 높아질 것으로 사료되며, 임상적인 유의성도 더욱 높아질 것으로 사료된다.

실험 1에서 두가지 DNA 분리방법을 비교하여 보면 Proteinase K 법에 의한 경우 보다 InstaGene을 이용한 경우에 약 20% 높은 감수성과 11%~23% 높은 음성예측도를 보였으며, 특이성은 2%~8% 낮고 양성예측도는 2.5%~4% 높은 것으로 나타났다. 실험 2에서는 Microwave 법에 의한 경우와 InstaGene을 이용한 경우에 거의 비슷한 감수성, 특이성, 양성예측도 및 음성예측도를 보였다. 다만 현재로서는 Microwave법에서 필요로하는 잔류 NaOH 제거를 위한 세척단계가 비교적 많은 검체를 대상으로 검사를 실시할 경우에는 번거로우며, 이 단계에서 교차오염의 가능성을 남기고 있는

점등이 InstaGene법에 비한 미비점에 해당된다고 본다. 동일한 검체를 사용한 결과가 아니므로 직접적인 비교는 되지않겠으나 Proteinase K법에 비하여 Microwave법은 모든 지표에서 Proteinase K법보다 나은 것으로 나타났다.

위의 결과는 본 연구에서 사용된 음성대조검체에서 전혀 양성이 나온적이 없었으며, InstaGene법이 이론상 교차오염의 가능성이 거의 없다는 점등으로 보아 위양성에 의한 오류는 배제할 수 있을 것으로 사료되며, InstaGene법과 Microwave법이 PCR에서의 양성률이 높았던 것은 Proteinase K법보다 DNA 회수율이 좋음으로 인한 것으로 보아진다.

또한 실용성을 비교하여 보면 Microwave법은 세척 단계만 배제할 수 있도록 개선되면 매우 실용적일 것으로 사료된다. 그리고 InstaGene법은 30분에서 1시간 이내에 해당에서 DNA분리가 완료될 수 있고, 56℃와 100℃의 가온 수조 또는 열판과 원심분리기외에는 특별한 기기가 필요없으며, 검체 처리를 위하여 사용되는 micropipette tip이 단 3개이면 충분하고, 용해된 해당 검체를 원침하여 상층을 제거한 뒤 InstaGene matrix를 넣어준 뒤에는 tube를 여는 조작이 전혀 없으므로 조작에 의한 교차오염의 가능성이 거의 없고 처리 시간이 짧으며 조작이 매우 간단하다. 또한 두검사법 모두 한 검체당 1,000원 이하의 비용으로 DNA 분리를 완료할 수 있다는 경제성도 장점이 될 수 있을 것이다.

요 약

연구배경: 본 연구는 결핵의 조기검출을 위하여, PCR을 이용하는데 있어서의 중요한 문제점의 하나인 임상검체로부터 결핵균을 분리 방법을 개선하여, 교차오염의 가능성을 최소화하고 PCR에 의한 결핵균의 DNA검출을 보다 쉽고 안전하게 실시하여 대량의 검체를 처리해야하는 일상 임상검사법으로 정착시키고자 하는데 그 목적이 있다.

방법: 다양한 방법으로 DNA를 검출하여 동일한 방법으로 PCR을 수행하여 이차 PCR 산물의 전기영동 결과를 AFB도말 및 배양검사 결과와 함께 비교하여 감수성, 특이성, 양성예측도 및 음성예측도의 항목으로

비교분석하였다. 실험 1은 Proteinase K 처리후 phenol로 추출하는 방법과 Chelex 100 이온교환 수지를 이용한 InstaGene법을 100예에서 비교하였으며, 실험 2에서는 Microwave 처리후 원침 상청액을 직접 사용하는 방법과 Chelex 100 이온교환 수지를 이용한 InstaGene법을 98예에서 비교하였다.

결과: 세 DNA 분리법으로 실시한 PCR결과에서 모두 특이성과 양성예측도가 매우 낮았다. 실험 1에서 Proteinase K 법에 의한 경우 보다 Insta Gene을 이용한 경우에 약 20% 높은 감수성과 10%~20% 높은 음성예측도를 보이고 있으며, 특이성은 2%~8% 낮고, 양성예측도는 2.5%~4% 높은 것으로 나타났다. 실험 2에서는 Microwave법과 Insta Gene을 이용한 경우에 거의 비슷한 결과를 보였다.

결론: 결핵진단시 PCR을 위한 해당검체에서의 DNA 분리시에 Microwave법과 InstaGene™ DNA분리 kit가 매우 효율적이며, 특히 InstaGene법이 교차오염의 가능성이 거의 없고, 처리 시간이 짧으며, 조작이 매우 간단하며 매우 경제적인 것으로 나타났다. 다만 특이성을 더욱 높일 수 있도록 연구가 추가되어야 할 것이며 일반 인구집단에서 충분한 임상검체를 대상으로 연구가 추가되면 InstaGene법의 유용성이 더욱 확실히 검증 될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) 보건 사회부, 대한결핵협회: 제 6차 전국결핵실태조사 결과 1991
- 2) 대한 결핵협회: 한국의 결핵 실태(현황과 전망). 1993
- 3) Centers for Disease Control: A strategic plan for the elimination of tuberculosis in the United states. MMWR 38(Suppl. S-3):1, 1989
- 4) Centers for Disease Control: Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected persons, Florida and New York. 1988-1991. MMWR 40:585, 1991
- 5) Fishl MA, Daikos GL, Uttamchandani RB: Clinical presentation and outcome of patients with

- HIV infection and tuberculosis caused by multiple-drug-resistant bacilli. *Ann Intern Med* **117**: 184, 1992
- 6) 최철석, 이경옥, 이규범: PCR을 이용한 결핵균 진단에 있어 효과적인 DNA 추출법. *대한미생물학회지* **29**:147, 1994
 - 7) 박영길, 심명섭, 조상현, 배길한, 김상재: 핵산중합효소 연쇄반응에 의한 결핵균 검출을 위한 여러가지 primer이 연구. *대한미생물학회지* **29**:263, 1994
 - 8) 김상재, 박영길, 조상현, 심명섭: 핵산중합효소 연쇄반응에 의한 병리검체내 결핵균의 검출. I primer의 선택과 반응조건. *대한미생물학회지* **27**: 35, 1992
 - 9) 심명섭, 이성연, 조상현, 박영길, 배길한, 김상재: 결핵균 검출에 있어서 시발체 종류에 따른 핵산중합효소 연쇄반응의 효율. *대한미생물학회지* **28**: 391, 1993
 - 10) Portillo PD, Murillo, Patarroyo: Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. *J Clin Microbiol* **29**:2163, 1991
 - 11) Mullis KB, Faloona FA: Specific synthesis of DNA in vitro a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**:335, 1987