Tuberculosis and Respiratory Diseases
□원 저□
결핵 및 호흡기질환, Vol. 49, No. 5, Nov, 2000

Oligonucleotide chip을 이용한 Rifampin 내성 결핵균의 rpoB 유전자 돌연변이 검출

부산대학교 의과대학 내과학교실[1], 생화학교실[2], 임상병리학교실[3],
(주)에스제이하이테크 부설연구소, 국립마산결핵병원 임상연구소[4]

**박순규[1], 이민기[1], 정병선[2], 김철민[2],
장철훈[3], 박희경[4], 장현정[4], 박승규[5], 송선대[5]**

= Abstract =

Detection of *rpoB* Gene Mutation in Rifampin-Resistant M. Tuberculosis by Oligonucleotide Chip

Soonkew Park, M.D.[1], Minki Lee, M.D.[1], Byungseon Chung, Ph.D.[2], Cheolmin Kim, M.D., Ph.D.[2], Chulhun L. Chang, M.D.[3], Heekyung Park, Ph.D.[4], Hyunjung Jang, M.S.[4], Seungkyu Park, M.D.[5], and Sundae Song, M.D.[5]

Department of Internal Medicine[1], Biochemistry[2], Clinical Pathology[3], College of Medicine, Pusan National University, and Institute for Biomedical Research, SJ-Hightech Co., Ltd.[4], and Institute of Clinical Research, National Masan Tuberculosis Hospital, Masan, Korea[5]

Background : Oligonucleotide chip technology has proven to be a very useful tool in the rapid diagnosis of infectious disease. Rifampin resistance is considered as a useful marker of multidrug-resistance in tuberculosis. Mutations in the *rpoB* gene coding β subunit of RNA polymerase represent the main mechanism of rifampin resistance. The purpose of this study was to develop a diagnosis kit using oligonucleotide chip for the rapid and accurate detection of rifampin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.

Method : The sequence specific probes for mutations in the *rpoB* gene were designed and spotted onto the glass slide, oligonucleotide chip. 38 clinical isolates of Mycobacterium were tested. A part of *rpoB* was ampli-

†이 논문은 1996년도 부산대학교병원 지정진료연구비에 의하여 연구되었음.

Address for correspondence :
Cheolmin Kim, M.D., Ph.D.
Department of Biochemistry, College Medicine, Pusan National University
#10, Amjdong 1 Ga, Seogu, Pusan, 602-739, Korea
Phone : 051-240-7725 Fax : 051-248-1118 E-mail : kimcm@hyowon.cc.pusan.ac.kr

fied, labelled, and hybridized on the oligonucleotide chip with probes. Results were analyzed with a laser scanner. Direct sequencing was done to verify the results.

Result : The low-density oligonucleotide chip designed to determine the specific mutations in the *rpoB* gene of *M. tuberculosis* accurately detected rifampin resistance associated with mutations in 28 clinical isolates. Mutations at codons 531, 526, and 513 were confirmed by direct sequencing analysis.

Conclusion : Mutant detection using oligonucleotide chip technology is a reliable and useful diagnostic tool for the detection of multidrug-resistance in *M. tuberculosis*. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 49 : 546-557)

Key words : Multidrug-resistance, Mycobacterium tuberculosis, *rpoB* gene, Oligonucleotide chip.

서 론

결핵 감염증은 꾸준히 감소되어 왔으나 아직도 전세계적으로 매년 약 8백만 명의 새로운 환자가 발생하고, 약 3백만 명의 환자가 사망하는 것으로 보고되고 있으며, 감염성 질환으로서는 사망률 1위를 차지하고 있다[1]. 우리 나라는 결핵치료에 노력을 기울인 결과로 감소해 가는 추세에 있지만 아직도 선진국들에 비해 높은 유병율을 나타내고 있다[2,3]. 그리고 개발도상국에서는 항결핵제의 부족으로 인한 부적절한 치료로 약제내성균을 가진 만성 배균자가 증가되었고, 선진국에서도 1980년대에 들어서면서 후천성면역결핍증(AIDS) 환자의 증가로 인하여 결핵 감소가 정체되고 오히려 증가하는 양상을 보이고 있다. 한편, 우리 나라에서는 흉부 엑스선상 활동성 폐결핵의 유병율이 1.03%, 균양성 폐결핵의 유병율은 0.22%로 환자수로 따지면 각각 429,000명 및 91,000명으로 추정되어 아직도 국민건강에 큰 문제가 되고 있다[2,4]. 5년간 35개국에서의 약제내성 결핵균에 대한 조사에 의하면 한가지 이상의 약제에 내성을 가지는 경우가 13%에 이르고, isoniazid(INH)와 rifampin(RMP)을 포함한 2가지 이상의 약제에 내성을 보이는 다제내성결핵(multidrug-resistant *M. tuberculosis*, MDR-TB)이 약 7.5%의 심각한 수준에 이르고 있다[5]. 약제 내성 결핵균은 일차 항결핵제에 내성을 나타내며, 적절한 항결핵제 치료가 요구된다. 현재 많은 검사실에서는 결핵균 항생제 감수성검사로 8~12주의 기간을 요하는 Middlebrook 배지를 이용하며 객담에서 직접법으로 시행하는 경우에도 3~4주의 장시간을 요하므로 약제내성 결핵균의 조기 진단에 어려움이 있다[6].

분자생물학적 방법에 의한 약제 내성기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. Rifampin, isoniazid, pyrazinamide(PZA), 그리고 ethambutol(EMB) 내성을 유도하는 다수의 유전적 변화가 보고되었다. 예를 들어, rifampin 내성 균주의 94~98%가 *rpoB* 유전자에 의해 암호화되는 DNA 의존성 RNA 중합효소 β subunit의 제한된 지역 내의 점돌연변이에 의해 나타난다. 이러한 내성 균주에서 염기서열 변화는 항생제 내성에 대한 probe 기반의 분석법의 발달을 가져왔다[7,8].

최근, 개발된 oligonucleotide chip 기술은 대규모의 유전적 다양성을 조사할 수 있는 새로운 방법으로서 유리 지지체의 아주 작은 공간의 정확한 위치에 많은 수의 합성된 oligonucleotide를 부착시켜 아주 적은 양의 표적 염기서열과 혼성화 반응을 함으로서 동시에 많은 유전자를 검색할 수 있게 되었다[7,9]. 이러한 oligonucleotide chip은 돌연변이 검색, 질병의 진단 또는 유전자 발현 청사진을 만드는데 많은 기여를 할 것으로 기대되고 있다[9].

본 연구는 결핵균에서 rifampin 내성의 주된 기전으로 알려져있는 *rpoB* 유전자의 69 bp의 hotspot 부위를 표적 염기서열로 하여 중요 돌연변이 부위들을

probe로 제작하여 저밀도의 oligonucleotide chip을 제작하고, 이를 이용하여 rifampin 내성 결핵균의 진단법을 개발하고자 하였다. 그 결과를 직접염기서열분석 결과와 비교하여 확인함으로서 진단용 kit로서의 개발 가능성을 확인하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

부산대학교병원 및 국립마산결핵병원을 내원하여 결핵으로 추정되어 객담 항산균 도말 및 배양검사를 실시한 환자의 세균배양균주중에서 임의로 38예를 선택하였다. 28예는 rifampin 내성이며, 10예는 rifampin 감수성이었다.

2. DNA 정제

배양이 확인된 균주의 집락을 1백금이를 따서 미세원심관에 넣고 InstaGene matrix (Bio-Rad Co. USA)를 200 $\mu\ell$ 가하여 부유 시킨 후 항온수조에서 56℃로 30분간 반응시키고 10초 동안 진탕 한 후 100℃에서 8분간 열처리하였다. 다시 10초간 진탕한 후 12,000 rpm에서 3분간 원심분리 하여 상층액을 새 원심관으로 옮겨 -20℃에 보관하였다. 분리된 DNA는 2 $\mu\ell$ 씩 PCR 반응에 사용하였다.

3. 표적 DNA 준비

1) *rpoB* 유전자의 염기서열 분석을 위해 biotin이 결합되지 않은 rpoB3(5'-TGCACGTCGCGGACCTCCA-3')와 rpoB4(5'-TCGCCGCGATCAAGGAGT-3') primer를 사용하였으며 chip 반응을 위해서는 rpoB3-biotin, rpoB4-biotin primer를 이용하였다[4,11]. 실험에 사용한 모든 primer는 Canada의 BioBasic사에 의뢰하여 Perkin-Elmer DNA synthesizer로 50 nmol 농도로 제작된 oligonucleotide를 사용하였다. PCR 반응물의 조성은 500 mM KCl, 100 mM Tris HCl (pH 9.0), 1% Triton X-100, 0.2 mM deoxynucleoside triphosphates (dATP, dGTP, dTTP and dCTP), 1.5 mM $MgCl_2$, 10 pmol primer와 1 U Taq DNA polymerase (BioBasic Inc. Canada)로 구성되었고, template DNA 2 $\mu\ell$ 와 함께 총 25 $\mu\ell$ 가 되게 하였다. 이 혼합액을 94℃에서 3분간 반응시켜 충분히 변성시킨 후 94℃에서 30초, 62℃에서 30초, 72℃에서 1분씩 35회 반응시켰으며, 마지막으로 72℃에서 10분간 연장하였다. 반응이 끝난 후 2% agarose gel에 전기영동 하여 157 bp의 PCR 산물을 확인하였다.

2) 표적 DNA labeling

*M. tuberculosis*의 *rpoB* 유전자 분석을 위한 표적 DNA는 PCR을 하여 증폭시킨 후, biotin을 이용하여 product를 37℃에서 약 1시간 가량 방치하여 random labeling 하였다.

4. Oligonucleotide chip 제작

1) Oligonucleotide 부착

이미 보고된 *rpoB* 유전자에서의 돌연변이 출연빈도가 높은 염기서열을 바탕으로 돌연변이를 검출하는 12종류의 probe와 wild type을 검출하는 6종류의 probe를 고안하였다(Table 1). 19~22 mer의 18개의 probe를 BioBasic사에 의뢰하여 제작하였다. Probe는 spotting 용액인 3×SSC 용액에 30 pmol로 희석하여 96 well microplates에 옮겨서 Microspotting 용액을 첨가하여 섞어서 사용하였다. 이와 같이 제작된 각 프로브를 Fig. 1과 같이 삼중 배열하였고. silylated된 유리 slide에 PixSys nQUAD 4500 microarrayer(Cartesian사, USA)를 이용하여 부착시킨 후, 실온에서 약 24시간 정도 정치하여 표면에 고정시켰다.

2) 고정되지 않은 probe의 세척

유리 slide 표면에 부착되지 않은 probe를 제거하기 위해 실온에서 0.2% SDS(Sodium dodecyl sulfate) 용액에 세척한 후, 증류수로 2회 세척하였다. Sodium borohydride 용액으로 세척하고 다시 끓는

Table 1. Probes used in rpoB oligonucleotide chip assay

Probe name*	Sequence
rpo 511-WL	5' -ACCAGCCAGC**T**GAGCCAATT- 3'
rpo 511-MP	5' -ACCAGCCAGC**C**GAGCCAATT- 3'
rpo 513-WQ	5' -CAGCTGAGCC**A**ATTCATGGAC- 3'
rpo 513-ML	5' -CAGCTGAGCC**T**ATTCATGGAC- 3'
rpo 516-WD	5' -CCAATTCATGG**A**CCAGAACAAC- 3'
rpo 516-MV	5' -CCAATTCATGG**T**CCAGAACAAC- 3'
rpo 516-MY	5' -CCAATTCATG**T**ACCAGAACAAC- 3'
rpo 522-WS	5' -ACCCGCTGT**C**GGGGTTGAC- 3'
rpo 522-ML	5' -ACCCGCTGT**T**GGGGTTGAC- 3'
rpo 526-WH	5' -GGGTTGACC**C**ACAAGCGCC- 3'
rpo 526-MY	5' -GGGTTGACC**T**ACAAGCGCC- 3'
rpo 526-MD	5' -GGGTTGACC**G**ACAAGCGCC- 3'
rpo 526-MR	5' -GGGTTGACCC**G**CAAGCGCC- 3'
rpo 526-ML	5' -GGGTTGACCC**T**CAAGCGCC- 3'
rpo 526-MP	5' -GGGTTGACCC**C**CAAGCGCC- 3'
rpo 531-WD	5' -GCCGACTGT**C**GGCGCTGGG- 3'
rpo 531-ML	5' -GCCGACTGT**T**GGCGCTGGG- 3'
rpo 531-MW	5' -GCCGACTGT**G**GGCGCTGGG- 3'

The variable sequences are in bold print.
W mean wild type. M mean mutant type.
*Characters following W or M refer to amino acid types encoded by codon at mutation region.

증류수에 세척하였다. 실온에서 0.2% SDS와 증류수를 이용하여 세척한 후 원심분리기를 이용하여 slide를 완전하게 건조시켜 oligonucleotide chip 제작을 완료하였다.

5. Oligonucleotide chip을 이용한 돌연변이 검출

1) 혼성화 반응(Hybridization)

Label된 표적 DNA를 단일 가닥으로 사용하기 위해 boiling 한 후, 4℃로 냉각시켰다. 1~5 $\mu\ell$ 의 DNA를 포함하는 혼성화 반응 용액 10 $\mu\ell$ 를 제작하였다. Probe 부착과 세척을 마친 slide에 혼성화 반응용액을 분주하고 기포가 생기지 않도록 cover slip을 덮은 뒤 64℃에서 약 1시간 정도 반응시켰다.

2) 결합되지 않은 DNA의 세척

혼성화 과정에서 혼성화 반응을 하지 않은 잔여의 DNA를 세척하기 위해 2×SSC(300mM NaCl, 30mM Na-Citrate, pH 7.0)/0.2% SDS 용액을 이용하여 cover slip을 제거한 후에 2×SSC/0.2% SDS 세척 용액과 2×SSC, 그리고 0.2×SSC 용액 순으로 slide를 세척하였다. 마지막으로 원심분리기를 이용하여 세척한 slide를 완전하게 건조시켰다.

3) Dye 결합

PCR 산물과 probe와의 결합유무를 확인하기 위해, Cy5-streptavidin(Amersham pharmacia biotech, USA)을 SSC와 BSA(Bovine Serum Albumin)를 이용하여 희석한 후 약 40 $\mu\ell$ 를 slide에 분주하여

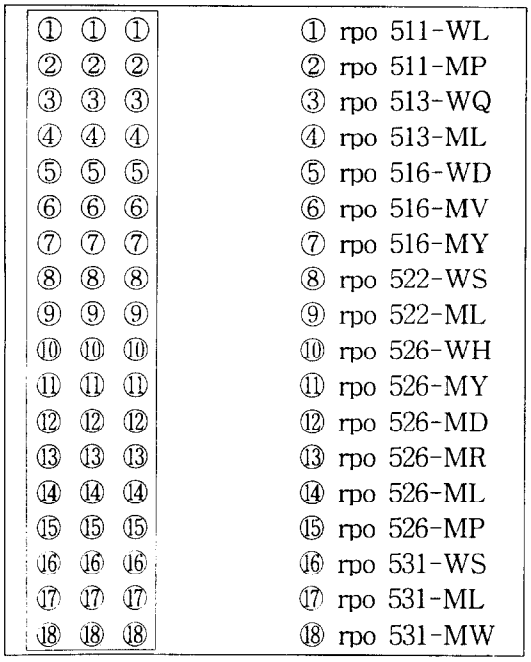

Fig. 1. Schematic showing the probe layout for the 19～22 mer oligonucleotide sequences noted in Table 1. The oligonucleotide probes are patterned as triplet arrays.

cover well을 덮고 빛을 차단한 후 50℃에서 약 20분간 반응시켰다. 반응 후 slide를 2×SSC, 그리고 0.2×SSC 용액을 사용하여 세척하였다. 분석을 위해 비공초점 레이져 스캐너(non-confocoal laser scanner)인 GenePix 4000A(Axon Instruments, USA)를 이용하여 결과를 분석하였다. 이에 대한 예상결과 분석법을 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에는 rifampin 감수성 분석결과인 Wild type과 출현빈도가 높은 12종류의 돌연변이 검출을 위한 oligonucleotide chip 실험의 예상 결과 분석은 L511P, Q513L, D516V, D516Y, S522L, H526Y, H526D, H526R, H526L, H526P, S531L, S531W로 나타냈다. 그러나 동일한 codon이지만 probe에는 선정되지 않은 돌연변이 경우의 예상결과 분석은 L511?, Q513?, D516?, S522?, H526?. S531?로 나타냈다. 그 외 출현빈도가 높지 않아 probe 선정에서 제외된 codon의 oligonucleotide chip 실험에서의 예상결과 분석은 codon 512의 경우 S512?로 나타냈다.

6. DNA 염기서열 분석

DNA 염기서열 분석은 ABI 377A 자동염기서열분석기(PE Biosystems, USA)를 이용하여 분석하였다. 주형 DNA 농도를 20 ng/$\mu\ell$, primer 농도를 1.6 pmol로 하여 ABI prism BigDye terminator sequencing kit를 이용하여 반응시키고, 95℃에서 5분간 반응시킨 후, 96℃에서 10초, 50℃에서 5초, 70℃에서 4분씩 25회 반응시켰으며, 마지막으로 72℃에서 10분간 연장시켰다. 반응이 끝난 후 PCR 산물을 에탄올로 침전시킨 후 건조시켜 loading buffer인 formamide/50mM EDTA (5:1) 6 $\mu\ell$ 에 녹여 90℃에서 2분간 변성시켰다. ABI 377A DNA sequencer에서 전기영동하고 염기서열 분석프로그램으로 결과를 분석하였다.

결 과

1. Oligonucleotide chip에 의한 *rpoB* 돌연변이 검출

본 연구의 oligonucleotide chip 분석에는 rifampin 내성 균주 28예와 감수성 균주 10예로서 모두 38예의 *M. tuberculosis* 균주를 사용 하였다. Oligonucleotide chip 실험결과 rifampin 감수성 균주 10예 모두에서는 Fig. 2에서의 wild type 예상 분석결과 유형과 같이 probe rpo 511-WL, rpo 513-WQ, rpo 516-WD, rpo 522-WS, rpo 526-WH, 그리고 rpo 531-WS의 6종류의 wild type probe와 반응하여 rifampin 감수성 균주임을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). 내성균주의 경우 Table 1과 Fig. 1의 출현빈도가 높은 돌연변이를 검출하는 12종류의 probe와의 반응에서 6가지의 유형으로 나타났다(Fig. 3). 두 유

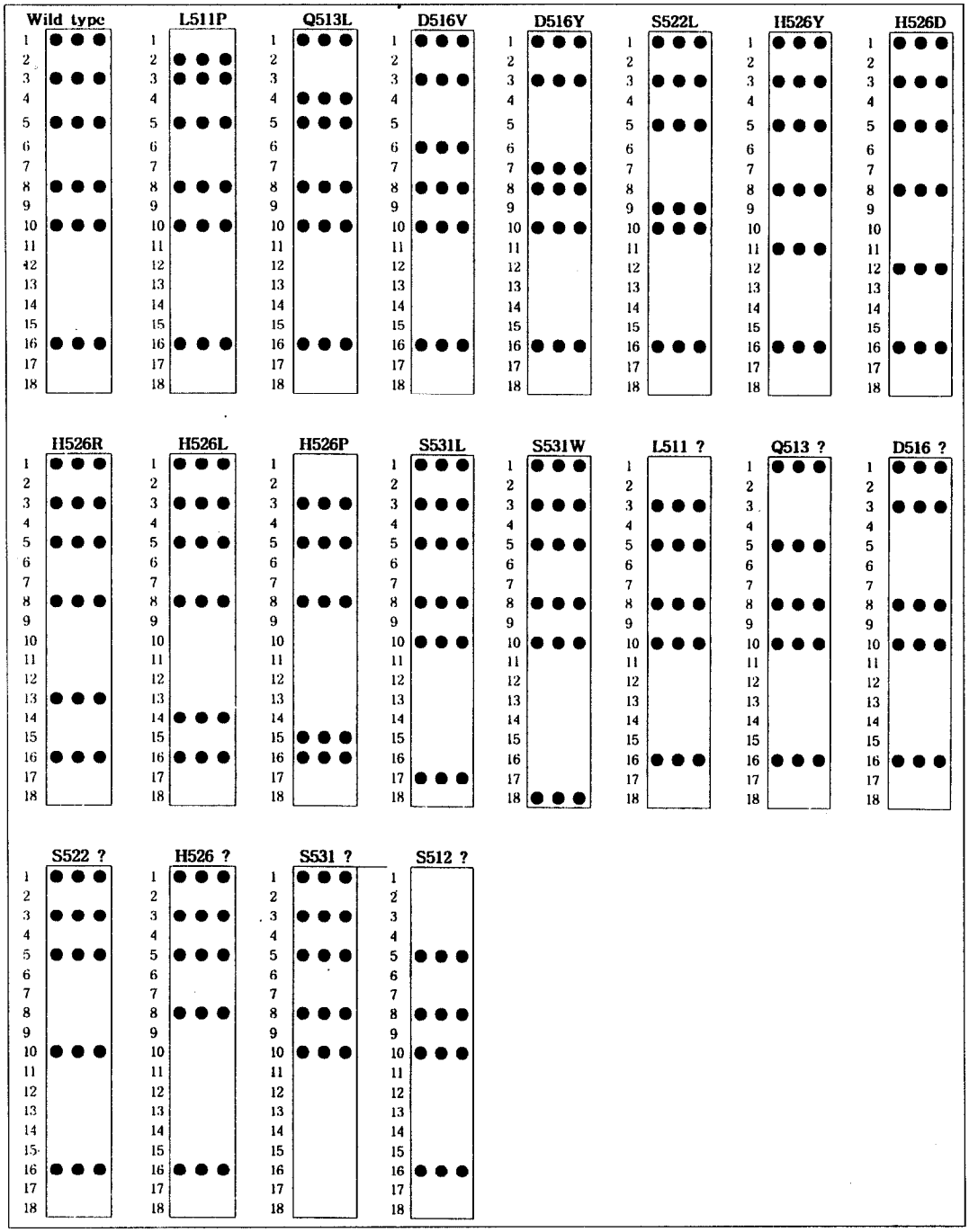

Fig. 2. Interpretation of results an oligonucleotide chip for rpoB mutation detection. The numbers on left side means probe number on Fig. 1.

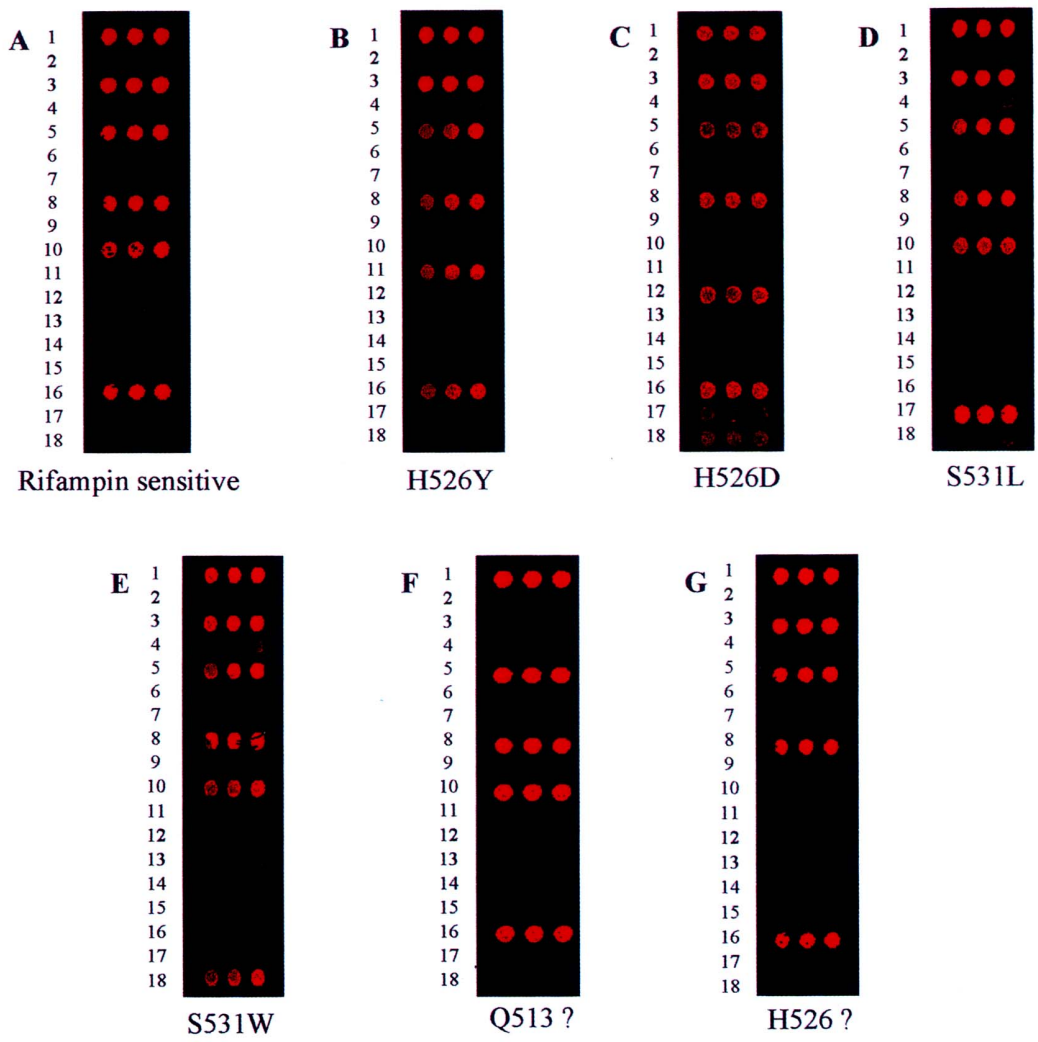

Fig. 3. Hybridization patterns produced on an oligonucleotide chip. A total of 18 oligonucleotide probes were used to interrogate each of the 157 bp in the amplified product. A; rigampin-sensitive *M. tuberculosis*, presence of all 6 wild-type probes, B; riampin-resistant *M. tuberculosis (codon 526 His → Tyr), C; riampin-resistant M. tuberculosis* (codon 526 His → Asp), D; riampin-resistant *M. tuberculosis* (codon 531 Ser → Leu), E; riampin-resistant *M. tuberculosis* (codon 531 Ser → Trp), F; riampin-resistant *M. tuberculosis* (codon 513 Gln → Lys), G; riampin-resistant *M. tuberculosis* (codon 526 His → Thr).

형인 Fig. 3B와 C는 예상분석 결과인 Fig. 2에서처럼 각각 codon 526의 돌연변이 probe와 반응한 H526Y와 H526D 유형으로 나타났는데 Fig. 3C의 경우는 codon 526의 mutant probe와는 정확하게 반응이 일어났으며 codon 531에서는 wild type과 mutant type probe에서 모두 반응을 보였으나 wild

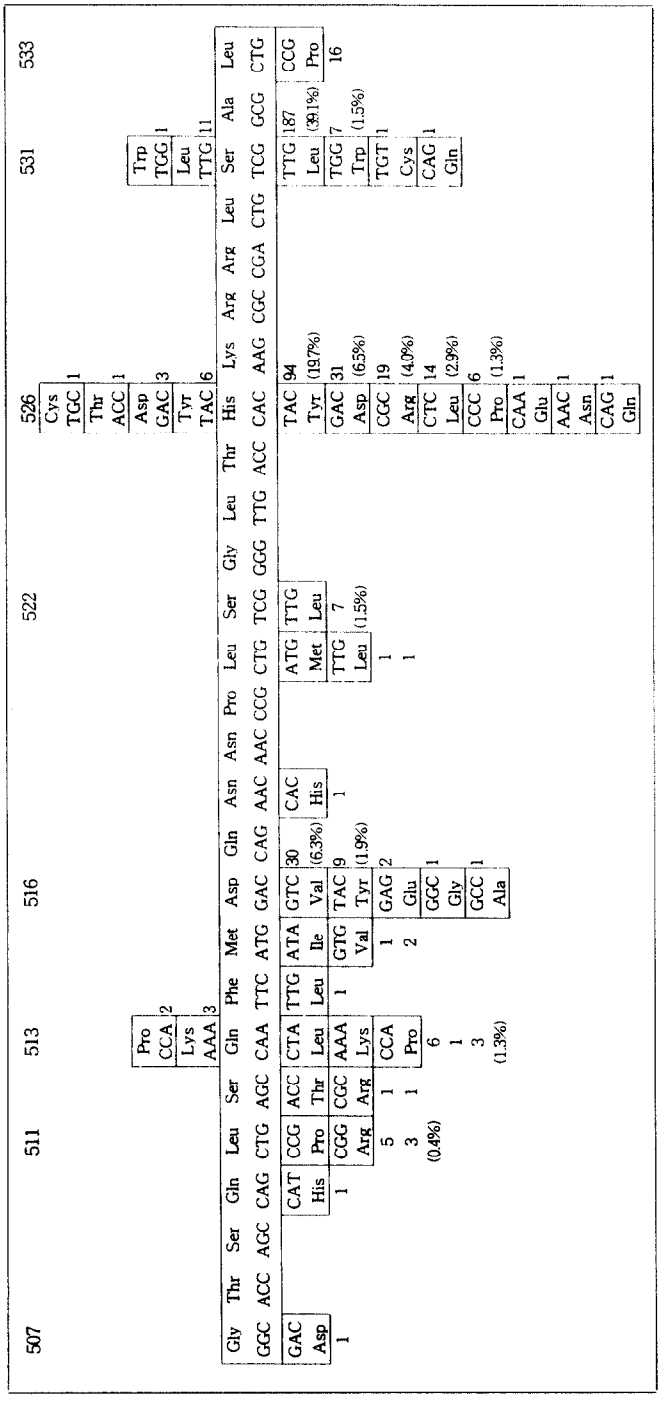

Fig. 4. Mutations located in codons 507 through 533 of the *M. tuberculosis rpoB* gene in RMP^R isolates. Above the wild-type nucleotide sequences indicate the results of the present study; below, those quoted from the published articles(Ref. 12 and 13). The parenthetic numbers indicate percent among total 478 rifampin-resistant strains. The codon numbers are designated on the basis of alignment of the translated *E. coli rpoB* sequence with the homologous part of the translated *M. tuberculosis* sequences and are not the positions of the actual *M. tuberculosis rpoB* codons.

type에서 보다 강하게 signal을 나타내어 mutant probe와는 비특이적인 반응이 일어난 것으로 추정되었다(Fig. 3B, C). 다른 2가지 유형은 Fig. 2와의 비교에서 각각 codon 531의 돌연변이 probe와 반응한 결과인 S531L과 S531W 유형으로 나타났다(Fig. 3D, E). 나머지 두 유형중 하나는 codon 513의 rpo 513-WQ와 rpo 513-ML probe 어느것과도 반응을 나타내지 않은 Fig. 2의 Q513? 결과와 같은 유형을 나타냈으며(Fig. 3F), 다른 한 유형은 codon 526의 wild type probe인 rpo 526-WH와 5가지의 돌연변이 probe인 rpo 526-MY, rpo 526-MD, rpo 526-MR, rpo 526-ML, rpo 526-MP 어느 것과도 반응이 일어나지 않은 Fig. 2의 H526? 결과 유형을 나타냈다(Fig. 3G).

이상에서와 같이, oligonucleotide chip을 이용한 실험에서는 우선 rifampin 감수성 균주를 정확하게 검출할 수 있었으며, 내성 균주 역시 감수성 균주와 확실한 차이를 볼 수 있었다. Oligonulceotide chip을 이용한 내성 균주 검출 결과의 정확성과 정확한 돌연변이의 유형을 알아내기 위해 직접염기서열 결정을 실시하였다.

2. 염기서열 분석

본 연구에 사용된 38검체 중 rifampin 내성인 28균주와 감수성인 10검체를 대상으로 rpoB 유전자의 hot spot 부위를 rpo3과 rpo4 primer를 이용하여 codon 511에서 codon 533의 69 bp를 포함하는 157 bp를 증폭시켜 DNA 염기서열을 분석하였다. 그 결과는 Table 2에 요약하였다. 직접염기서열 분석 결과 10예의 감수성 균주인 경우 돌연변이가 관찰되지 않은 정상 염기서열을 보였으며 이는 oligonucleotide chip 실험에 사용한 wild type의 균주와 정확하게 일치하였다. 28예의 rifampin 내성 균주의 직접염기서열 분석 결과 21.4%에 해당하는 6예에서는 H526Y 돌연변이가 검출되었으며 3예에서는(10.7%) H526D의 돌연변이를 나타냈다. 이는 Fig. 3B와 C에서 사용한 균주와 일치하는 것으로 oligonucleotide chip의 결과와 정확하게 일치함을 알 수 있었다. 본 연구의 돌연변이 출현빈도 중 가장 높은 39.3%와 3.6%를 차지한 S531L의 돌연변이와 S531W 돌연변이 역시 Fig. 3D, E의 oligonucleotide chip 결과와 일치하는 결과를 나타냈다. 다음으로 codon 513에 돌연변이가 일어난 경우로 Q513K와 Q513P가 각각 10.7%와 7.1%로 차지하였다. 이는 Fig. 3F에 사용된 균주의 염기서열로 본 연구에서 돌연변이 출현빈도가 높지 않아 probe에서 제외된 경우로서 codon 513의 wild type과 mutant type(Q513L) probe 어느 것과도 반응하지 않은 513 mutation 유형으로 oligonucleotide chip 분석결과와 일치하였다(Fig. 2). Codon 526에서의 또 다른 염기서열 분석 결과인 H526C 돌연변이는 Fig. 3G 실험에 사용한 균주로서 codon 526의 wild type probe와 5가지의 mutant type probe 어느 것과도 반응하지 않은 Fig. 2의 526 mutation 결과로서 chip 실험 결과와 직접염기서열 분석 결과가 일치하였다.

3. *rpoB* 돌연변이 출현빈도

기존에 보고된 *M. tuberculosis rpoB* 유전자의 codon 507~533까지의 돌연변이 출현빈도와 본 연구에서의 *rpoB* 유전자 돌연변이 분석 결과를 비교하여 Fig. 4에 나타내었다. Codon 531의 S531L은 39.3%로서 가장 높은 빈도를 나타냈으며, 다음으로는 codon 526의 H526Y의 21.4%가 높은 돌연변이 출현빈도를 보였다. 이는 이미 보고된 자료에서도 각각 39.1%와 19.7%로 높은 돌연변이 출현빈도를 보이고 있음을 확인할 수 있었다. 보고된 자료와는 달리 본 실험에서는 codon 513의 Q513K가 10.7%로서 상당히 높은 빈도를 나타내었다(Table 2).

Table 2. Sequence analysis of 28 rifampin-resistant *M. tuberculosis strains*

Mutation Type[a]	Nucleotide substitution	Amino acid substitution	Frequency of substitution[b]
Q513K	CAA → AAA	Gln → Lys	3 (10.7%)
Q513P	CAA → CCA	Gln → Pro	2 (7.1%)
H526Y	CAC → TAC	His → Tyr	6 (21.4%)
H526D	CAC → GAC	His → Asp	3 (10.7%)
H526T	CAC → ACC	His → Thr	1 (3.6%)
H526C	CAC → TGC	His → Cys	1 (3.6%)
S531L	TCG → TTG	Ser → Leu	11 (39.3%)
S531W	TCG → TGG	Ser → Trp	1 (3.6%)

[a]The numbers correspond to *E. coli* RNA polymerase codon alignment
[b]Numbers of isolates and percent among total 28 rifampin-resistant strains

고 찰

결핵균의 약제 내성은 내성 유전자의 획득에 의해서가 아니라 약제 내성 균주의 94~98%가 관련 유전자인 *rpoB* 유전자의 점돌연변이에 의해서 생긴다[8]. 그래서 결핵균은 이전에 항결핵제에 노출되지 않더라도 무작위 돌연변이로 약제내성을 가지게 되지만, 적절한 약제의 조합으로 극복 할 수 있다. 이러한 점돌연변이를 검출하기 위해 많은 방법을 사용하고 있다. Telenti 등[11]은 *rpoB* 유전자를 염기서열 결정을 실시하여 rifampin 내성에 관련된 돌연변이 부위를 분석하였다. 이러한 직접 염기서열 분석 방법은 다수의 유전자와 고가의 장비를 필요로 한다는 단점 때문에 사실상의 실험실에서는 적용하기가 어렵다. 따라서, 유전자 증폭 방법인 PCR을 이용한 PCR-SSCP (PCR-single strand conformational polymorphism)와 PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism) 방법을 사용하여 유전자 구조변화를 조사함으로써 내성 유전자를 검출할 수 있었다[4]. 최근에, rifampin 내성 검출을 위해 혼성화 반응 차이에 기초를 둔 line hybridization assay (INNO-LiPA Rif. TB kit ; Innogenetics, Belgium)가 개발되어 사용하고 있다[4,6,14]. 이러한 방법은 기존의 다른 방법에 비해 상당히 개선되었으나, probe가 filter에 흡수되어있는 방법이기 때문에 strip상에 위치하는 다수의 line이 제한되어있다. rifampin 내성에 관련된 더 많은 돌연변이가 포함된다면, 많은 종류의 filter를 준비해야하는 문제점이 있다[4].

Oligonucleotide chip이란 유전자 검색용으로써, 기존에 널리 이용되는 유전자 분석방법인 Southern과 Northern blot의 문제점인 한번에 수십 개 이상의 유전자들을 검색하기 어려운 점을 극복하기 위해 많은 종류의 probe를 고밀도로 고형지지체에 붙여놓은 것을 말한다. 본 연구에 이용된 oligonucleotide chip은 157 bp 내에서 결핵균의 rifampin 내성을 일으키는 *rpoB* 돌연변이 출현빈도가 높은 12가지를 포함하는 것으로 지금까지 보고된 rifampin 내성 결핵균의 90 % 이상을 검출할 수 있도록 디자인되었다(Table 1). Fig. 3의 결과에서 rifampin 감수성 균주에서는 각 codon의 wild type probe만이 반응하였고, codon 526에 돌연변이가 있는 경우 codon 526을 제외한 다른 부위에서는 wild type probe가 발현되었으며 codon 526에서는 돌연변이 검출 가능한 5종류의 프로브 중 염기서열이 정확히 일치하는 하나의 probe와 반응하는 것을 Fig. 2의 예상 분석결과와 함께 알 수 있었다. Codon 531의 경우 codon 526의 경우에서

처럼 codon 531을 제외한 부분에서는 wild type probe가 반응하였으나 codon 531의 경우에는 역시 해당되는 염기서열이 존재하는 돌연변이 probe만이 반응하여 예상 결과분석 유형과 일치함을 알 수 있었다(Fig. 2). 12개의 돌연변이 probe에서 제외된 균주의 경우 해당하는 codon은 wild type과 돌연변이 probe 모두에서 반응이 일어나지 않음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 직접 염기서열 분석 실험을 통해 그 결과가 일치함을 또한 확인할 수 있었다.

Oligonucleotide chip 분석과 직접 염기서열 분석 결과 *rpoB* 유전자의 돌연변이 양상을 살펴보면, 본 연구에서 rifampin 내성 결핵균주의 82%가 codon 531과 526에서 돌연변이가 검출되었다. Codon 531과 526에서의 돌연변이 빈도는 Table 3과 Fig. 4에서처럼 보는 것처럼 기존의 돌연변이 빈도와 비교했을 때 codon 531의 serine이 leucine으로 치환된 경우가 39.3%를 나타냈으며 codon 526의 histidine이 tyrosine으로 치환된 경우는 21.4%, aspartic acid로 치환된 경우는 10.7%를 나타내어 두 codon 531과 526의 3가지 돌연변이가 본 연구 *rpoB* 돌연변이의 71%를 차지하는 것으로 나타났다. codon 531과 526을 제외한 돌연변이 부위로는 codon 513에서 17.8%을 나타냈다. rifampin 내성 결핵균주의 80% 이상이 codon 531과 526에서 돌연변이가 분포한다는 연구보고에서처럼[6,10] 본 연구에서도 82%가 이 부위에서 검출된 결과로 보아 rifampin 내성의 주 기전은 *rpoB*의 돌연변이 임을 알 수 있었으며 그 중에서도 codon 531과 526의 돌연변이가 큰 비중을 차지함을 알 수 있었다.

국내외적으로 다제내성 결핵균의 증가가 치료에 큰 장애가 되고 있는데[4] 그중 다제내성 결핵균에서 rifampin 내성이 가장 흔히 나타나는 것으로 내성을 일으키는 돌연변이가 *rpoB* 유전자의 한정된 지역인 codon 511에서 codon 533에 이르는 69 bp에 집중적으로 몰려있으므로 이 부위의 돌연변이 검출이 다제내성 결핵균주의 중요한 표지자로 이용될 수 있다[4,6].

본 연구에 이용된 oligonucleotide chip 기술은 국외에서는 Affymatrix에서 고밀도의 oligonucleotide chip을 제작하여 연구결과를 보고하고 있으나 국내에서는 저밀도의 chip이지만 최신의 기술을 처음으로 적용하여 보고함에 그 의의를 둘 수 있을 것이다. 이러한 oligonucleotide chip 기술은 유전자 발현, 유전자 변이, 다형성(polymorphism), 그리고 DNA 염기서열분석 등의 연구에 활용 될 것으로 기대하고 있다.

요 약

연구배경 :

결핵발병률과 다제내성 결핵균주의 증가로 효과적인 치료 및 관리를 위해 보다 신속하고 정확한 약제내성의 진단이 필요한 실정이다. 이에 다제내성 결핵균의 중요한 표지자인 rifampin 내성의 주요 기전인 *rpoB* 유전자 돌연변이 검출을 위해 기존의 직접 염기서열분석과 최근 유전자 발현, 유전자 변이 및 다형성, 그리고 염기서열분석 등의 연구에 중요한 기술로 이용되어지는 oligonucleotide chip 기술을 이용하기 위한 간편하고 정확한 돌연변이 검출법을 개발하고자 시행하였다.

방 법 :

본 연구에는 rifampin 내성 결핵 균주 28예와 10예의 감수성 균주 총 38예의 rifampin 내성 결핵 균주를 선택하였고, wild type probe 6종류와 돌연변이 출현빈도가 높은 12종류의 probe를 제작하여 총 18종류의 oligonucleotide probe를 고형지지체에 부착시킨 저밀도 oligonucleotide chip을 제작하였으며 oligonucleotide chip을 이용한 *rpoB* 돌연변이 검출과 결과를 직접염기서열 분석 결과와 비교하였다.

결 과 :

Oligonucleotide chip 분석 결과 rifampin 감수성 균주에서 모두 각 codon의 wild type probe와 반응이 나타났으며, 내성 균주에서는 돌연변이가 나타난 codon을 제외한 codon의 경우는 wild type probe와 반응이 일어났으며, 각 균주 별 돌연변이가 나타난

codon은 정확하게 그에 해당하는 돌연변이 probe와 반응함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 직접 염기서열 분석 결과와 서로 일치함을 알 수 있었다. 또한 oligonucleotide chip 분석 결과와 염기서열 분석 결과에서 *rpoB* 유전자의 codon 531과 526에서 대부분 돌연변이가 검출되어 *rpoB* 유전자의 돌연변이 중 큰 비중을 차지함을 또한 알 수 있었다.

결 론:

결핵균의 rifampin 내성 획득에 중요한 기전인 *rpoB* 유전자의 돌연변이를 저밀도의 oligonucleotide chip을 이용하여 검출할 수 있었으며 향후 지속적인 개선에 의하여 항생제 내성 진단의 자동화를 위한 유용한 수단이 될 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. Tubercule 1991;72:1-6
2. 보건복지부 · 대한결핵협회. 제7차 전국 결핵 실태조사결과 1995
3. 대한결핵 및 호흡기학회 학술위원회 : 비결핵항산균증 전국 실태조사. 결핵 및 호흡기 질환 1995; 42:277
4. 이민기, 김윤성, 이효진, 전두수, 윤상명, 박삼석, 김철민, 박순규. 염기서열결정과 Line Probe 분석법에 의한 Rifampin 내성 결핵균의 rpoB 유전자 분석. 결핵 및 호흡기 질환 1997;44:251-63
5. 장철훈, 손한철, 김철민. 다제내성 결핵균과 감수성 검사. 대한화학요법학회지 1998;16:187-203
6. 이미애. 객담에서 중합효소연쇄반응과 Line Probe Assay를 이용한 rifampin 내성 결핵균 의 직접검출법. 대한임상병리학회지 1998;18:71-6
7. Troesch A, Nguyen H, Miyada CG, Desvarenne S, Gingeras TR, Kaplan PM, et al. Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. J Clin Microbiol 1999;37:49-55
8. Brown TJ, Tansel, French GL. Simultaneous identification and typing of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates by analysis of pncA and rpoB. J Med Microbiol 2000;49:651-6
9. Thomas RG, Ghassan G, Eugene W, Anthony B, Peter MS, Francis D, David A, et al. Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic mycobacterium DNA Arrays. J Clin Microbiol 1998;8:435-48
10. Valim AR, Rossetti ML, Ribeiro MO, Zaha A. Mutations in the rpoB gene of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Brazil. J Clin Microbiol 2000;38:3119-22
11. Telenti A, Lowrie D, Matter L, Imboden P, Cole S. Detection of rifampicin-resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis. Lancet 1993; 341: 647-50
12. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis : 1998 update. Tuber Lung Dis 1998;79:3-29
13. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria : Molecular genetic insights. Clin Microbiol Rev 1995;8:496-514
14. Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, De Rijk P, Portaels F. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of Mycobacterium tuberculosis complex and its resistance to rifampin. Antimicro Agents Chemother 1997;41:2093-8