

Identification and Diagnostic Utility of Serologic Reactive Antigens from *Mycobacterium tuberculosis* Sonic Extracts

Yu-Mi Kwon¹, Ki-Hwan Jung², Go-Eun Choi³, A-Rum Shin¹, Byung-Su Lee¹, Choul-Jae Won¹,
Woo-Sik Kim¹, Sung-Jae Shin¹, Jeong-Kyu Park¹, Chulhun L. Chang³ and Hwa-Jung Kim^{1*}

¹Department of Microbiology, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea;

²Division of Pulmonary, Sleep and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine,

Korea University Ansan Hospital, Ansan, Korea; ³Department of Laboratory Medicine,

School of Medicine, Pusan National University, Yangsan, Korea

It is important to identify and to test serologically active antigens, so as to devise a cocktail of the best antigens or peptides. We searched for antigens that have serodiagnostic utility using two-dimensional fractionation of sonic extracts from *Mycobacterium tuberculosis* and probing with pools of sera from healthy subjects and patients with tuberculosis (TB). Reactive protein spots with patient sera were identified by tandem mass spectrometry. Three proteins, Rv0652, Rv2626c, and Rv3418c, which have not previously been described as serologic targets, were identified. Rv0652 protein among them was expressed in *Escherichia coli* and serum IgG antibodies against this antigen were measured in 150 patients with pulmonary TB and in 115 healthy subjects. The sensitivity and specificity were 39% and 92%, respectively. These results suggest that a newly identified protein, Rv0652 may be a valuable candidate to be included in a cocktail test kit for TB diagnosis.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculosis, Tandem mass spectrometry, Rv0652 protein

서 론

결핵은 결핵균 (*Mycobacterium tuberculosis*)에 의해 발생하는 만성감염성 질환으로서, 전 세계인구의 1/3이 감염되어 있으며 매년 7~8백여만 명의 신환자가 발생하고, 발생률이 매년 1%씩 증가하는 주요 보건질환이다 (1). 이러한 증가는 AIDS와 약제내성결핵 문제와 밀접한 연관이 있다. 일차결핵은 적절한 항결핵제 병합요법으로 비교적 성공적으로 치유되기 때문에 환자를 조기에 진단하

여 치료하는 것은 결핵관리의 핵심이라 할 수 있다.

현재 결핵진단은 임상증상 및 도말염색과 배양에 의존하고 있다. 그러나 acid-fast bacilli (AFB) 도말염색은 빠르고 간편하지만 민감도가 낮고, 배양은 특이도와 민감도가 높지만 많은 시간이 걸리기 때문에 조기진단에 부적합하다. 이러한 이유로 결핵조기 진단을 위한 다양한 방법들이 연구되어 왔다 (2). PCR과 같은 분자생물학적인 방법은 민감도가 높고 균종까지 감별할 수 있지만 비용이 많이 들기 때문에 다수를 대상으로 하는 검진에는 적합하지 않다. 결핵 특이항원으로 말초혈액단핵세포를 자극하여 생산되는 IFN- γ 를 측정하는 방법은 결핵발생이 적은 지역에서는 잠복결핵 진단에 효과적인 방법이지만 비용이 많이 들고 결핵발생률이 높은 나라에서는 유용성이 떨어진다 (3). 임상검체에서 항체를 측정하는 혈청학적인 방법은 간단하고 경제적이며 쉽게 어디서나 할 수 있다는 장점이 있다. 이 방법은 또한 폐외결핵이나 객담을 잘 얻을 수 없는 소아결핵 진단에 적합하다. 그

Received: October 28, 2009/ Revised: November 24, 2009

Accepted: November 30, 2009

*Corresponding author: Hwa-Jung Kim. M.D., Ph.D., Department of Microbiology, College of Medicine, Chungnam National University, 6 Munwha-Dong, Jung-Ku, Daejeon 301-747, Korea.
Phone: +82-42-580-8242, Fax: +82-42-585-3686
e-mail: hjukim@cnu.ac.kr

**This work was supported by Chungnam National University Hospital Research Fund, 2007.

려나 많은 노력에도 불구하고 임상에서 적용될 수 있는 특이도와 민감도를 가진 혈청학적인 결핵진단법이 개발되어 있지 않다. 근본적인 장애요인은 개인 간 그리고 질환 병기에 따른 항체반응의 다양성 때문이다 (4, 5). 따라서 단일항원 대신 유의성이 있는 진단항원들을 조합한 콕테일 항원을 사용하여 민감도를 높이려는 연구가 진행되고 있다 (6~8).

혈청학적 결핵진단법 개발을 위해서는 진단적인 유의성이 높은 항원 즉, 건강인에서는 반응하지 않고 결핵환자에서만 반응하는 항원을 탐색하는 것이 가장 핵심적인 과제이다. 그 동안 많은 연구자들은 유의성이 높은 여러 항원을 보고하여 왔지만 (2), 혈청학적인 반응성이 강한 새로운 항원 동정이 지속적으로 필요하다는 사실은 널리 인정되고 있다. 결핵균에서 분비되는 단백질이 면역계에 의해 인식되기 때문에 많은 연구자들은 주로 결핵균 배양액으로부터 아단위 백신 또는 면역진단항원을 탐색하여 왔다 (9~11). 결핵균의 세포질 항원에도 다수의 후보 항원이 존재할 것으로 생각되지만 이에 대한 연구는 상대적으로 적다. 실제 16-kDa HspX (α -crystalline)은 세포질 항원이며, 정지거나 저산소 조건에서 발현이 증가되는 단백질으로써 진단적인 유의성이 있으며 상품화된 키트에 사용되고 있는 항원 중의 하나이다 (12, 13). 또한 결핵균체 추출액에는 세포질 항원, 세포막 항원 그리고 일부 분비항원들이 존재하기 때문에 본 연구에서는 이들 추출항원으로부터 강한 항체반응을 나타내는 3개의 새로운 단백을 동정하고, 이중 Rv0652 단백을 유전자재조합단백으로 제조하여 결핵에 대한 혈청학적 진단적 가치를 평가하였다.

재료 및 방법

혈청

폐결핵환자와 건강인 총 256명의 혈청을 본 연구에 사용하였다. 결핵환자 혈청은 고려대 안산병원 (안산, 경기도)에 내원하여 폐결핵으로 진단받은 환자로부터 치료 전 또는 치료개시 2주 내에 얻었다. 폐결핵은 임상증상, 객담도말 염색과 배양 및 흉부 X-선 사진으로 진단하였으며, 환자는 객담도말 양성 또는 배양 양성인을 포함하는 AFB 양성군 (101명)과 도말과 배양 모두 음성인 AFB 음성군 (49명)으로 구분하였다. 건강인은 결핵을 앓은 경험이 없는 충남대학교 의학과 학생 115명을 대상으로 하

였다. 대상인 모두 당뇨병이 없었고 스테로이드를 치료받은 환자도 없었으며 모두 HIV 음성이었다. 본 연구는 고려대 안산병원 생명윤리위원회로부터 승인을 얻었으며, 모든 환자로부터 혈청 제공 동의서를 받았다.

결핵균 배양과 균체 추출액

결핵균 (*M. tuberculosis* H37Rv, ATCC 27294)은 Sauton 배지에 37°C, 5~6주간 표면 배양하여 균체를 수집하였다. 균체로부터 단백질 추출은 10 mM KPB (potassium phosphate buffer, pH 7.0)로 1회 세척하고, 1 mM PMSF와 1 mM EDTA가 첨가된 10 mM KPB로 부유하여 얼음위에서 초음파 (sonication, pulse on-5sec/off-5sec; 온도 4°C; 진폭 30%)로 30분 동안 파쇄하였다. 세포를 용해시킨 후 4°C에서 22,000 rpm으로 30분 동안 원심분리하여 파쇄되지 않은 균체를 제거하고 상층액은 0.45 μ m filter membrane (Millipore, Billerica, MA, USA)으로 1차 여과하고, 0.2 μ m filter로 2차 여과멸균하였다. 여과된 추출액에 ammonium sulfate가 5% 농도가 되게 천천히 첨가한 후 20,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 불필요한 성분을 침전시켰다. 상층액에 다시 ammonium sulfate 농도가 85%가 되도록 천천히 첨가한 후 20,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하였다. 침전된 단백질 pellet은 10 mM NaCl이 첨가된 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer로 부유시킨 후 투석하고 -70°C에 보관하였다.

단백질의 농도 측정

단백질의 농도는 bovine serum albumin (BSA)를 표준으로 하여 Micro BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 Bradford method로 측정하였다.

SDS-PAGE와 immunoblotting

단백질 분석을 위한 SDS-PAGE는 15% polyacrylamide를 사용하여 Laemmli (14)의 discontinuous buffer system에 준하여 실시하였고, 전기영동 후 Coomassie blue로 염색하여 관찰하였다.

Immunoblotting은 Shin 등 (8)의 방법에 준하여 실시하였다. 약술하면 전기영동으로 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane에 전사한 후에 5% skim milk가 포함된 phosphate buffered saline (PBS)로 blocking하였다. 혈청을 100~200배 희석 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. 2차 항체는 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-human

IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 3,000배 희석하여 사용하였다.

2-차원 전기영동 (2-dimensional electrophoresis; 2-DE)과 단백 동정

2-DE는 pH 4~7의 IPG strip (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 Lee 등 (15)의 방법에 준하여 isoelectric focusing을 실시한 후 2차원은 SDS-PAGE로 단백을 분리하고 겔은 Coomassie blue로 염색하거나 immunoblotting으로 분석하였다.

단백의 동정은 2-DE 후 Coomassie blue로 염색한 겔에서 유의성이 있는 spot을 Yonsei Proteomic Research Center (Seoul, Korea)에 의뢰하여 LC-MS/MS로 동정하였다.

결핵균체 추출액의 일차 분획화

결핵균체 추출액의 85% ammonium sulfate 분획은 10 mM NaCl이 첨가된 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer로 평형시킨 DEAE-Sepharose column에 통과시켰다. 동일한 buffer로 충분히 세척한 후에 흡착된 단백질은 10 mM부터 0.5 M NaCl까지 salt gradient로 용출하였다. 각 분획의 단백은 SDS-PAGE를 통해 확인하였다. 유의성이 있는 15-kDa 단백 band가 포함된 분획을 모아 농축하고 PBS에 투석하고 전기영동과 immunoblotting으로 분석하였다.

유전자재조합단백질 발현 및 정제

결핵균 genomic DNA로부터 Rv0652 유전자를 증폭하기 위한 primer의 forward 쪽에는 *Bam*H I, reverse 쪽에는 *Eco*RI 제한효소 site를 넣었다. Forward primer의 sequence는 5'-GGATCCATGGCAAAGCTC-3'이고, reverse primer는 5'-GAATTCCTTGACGGT-3'이었다. PCR 유전자 산물을 T-벡터 (Promega, Madison, WI, USA)에 클로닝한 후 *Bam*H I과 *Eco*RI으로 절단한 후, 발현벡터인 pET28a에 삽입하였다.

Rv0652 유전자가 삽입된 pET28a 벡터를 형질전환시킨 *E. coli* BL-21를 600 nm에서의 흡광도 (optical density; OD)가 0.4~0.6까지 이르도록 배양한 후에 isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 1 mM 농도로 첨가하여 하룻밤 동안 배양하여 단백질 발현을 유도하였다. 발현된 단백질은 nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) agarose를 이용하여 제조사의 방법에 준하여 정제하였다. 최종적으로 정제한 재조합단백은

SDS-PAGE로 분석하였다.

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Rv0652 단백질에 대한 항체가는 Shin 등 (8)의 방법에 준하여 ELISA로 측정하였다. 약술하면 96-well microplate (Nunc, Roskilde, Denmark)에 각 well당 단백을 100 ng씩 분주하여 4℃에서 하룻밤 coating하였다. Plate는 3% BSA/PBS/Tween 20 (PBST)으로 blocking을 실시하였고, 혈청은 blocking buffer에 1:200으로 희석하여 각 well당 0.1 ml씩 분주하여 반응시켰고, 2차항체는 1:9,000으로 희석된 HRP-conjugated anti-human IgG를 well당 0.1 ml씩 분주하여 반응시켰다. 발색반응은 0.5% H₂O₂가 첨가된 tetramethylbenzidine (Sigma) 용액을 첨가하여 5분간 반응 후 1 N H₂SO₄을 첨가하여 반응을 정지시켰다. OD는 450 nm에서 ELISA microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다.

통계 분석

항체가의 양성과 음성을 구분하기 위해서 cutoff 값을 receiver operator characteristic (ROC) curve 분석을 통해 얻었다. 검사결과의 정확성을 측정하기 위해 area under the ROC curve (AUC) 값을 계산하였다. 결핵환자와 건강한 혈청의 평균 흡광도간의 통계학적인 유의성 차이는 Mann-Whitney test로 평가하였다. 통계 분석은 MedCalc statistical software를 사용하였다.

결 과

결핵균체 추출항원의 혈청학적인 분석과 항원 동정

결핵균체 추출액을 전기영동으로 분석한 결과 분자량 27-kDa 이상에서 많은 항원 band가 밀집되어 관찰되었다 (Fig. 1A). 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane에 전사한 후에 5 mm 간격으로 잘라 개개의 결핵환자 (18명)와 건강한 (20명) 혈청에서 항체반응양상을 분석하였다. 다른 보고와 동일하게 개인 간 항체반응의 다양성을 확인할 수 있었다 (Fig. 1B와 1C). 다수의 항원에 반응하는 사람부터 환자임에도 거의 반응하지 않는 사람이 있었다. 이는 단일항원으로는 민감도를 만족시킬 수 없다는 사실을 증명하는 것이다. 환자군에서 분자량 27-kDa와 47-kDa 사이에 해당되는 항원들이 집중적으로 강한 항체반응을 나타내었다. 건강한과 환자군에서 37-kDa 분자 부위에 두

릿한 band를 나타내지 않고 밀집된 반응을 나타내는 이유는 추출액에 존재하는 당지질 성분에 의한 것으로 생각된다. 19-kDa 이하에 존재하는 몇 개의 항원이 특이적으로 환자에서만 반응하였다. 특히 15-kDa 항원 band는

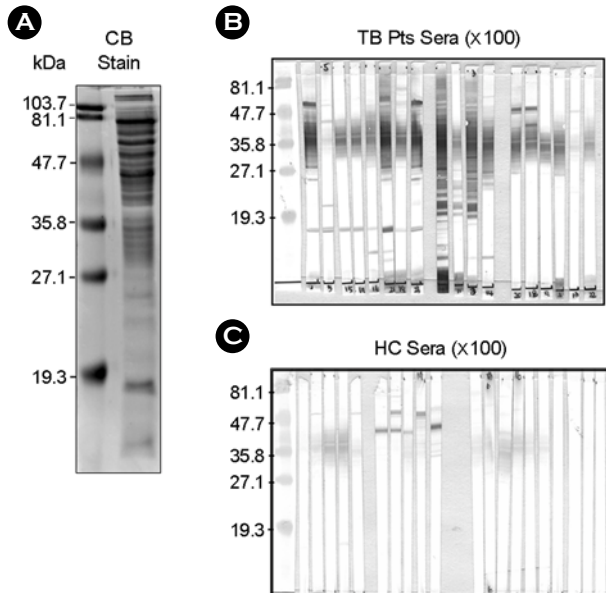


Figure 1. SDS-PAGE and immunoblot analysis of *M. tuberculosis* sonic extracts. Total protein was extracted from *M. tuberculosis* and subjected to SDS-PAGE. The gels were analyzed by Coomassie blue (A) and immunoblotting with individual tuberculosis (TB) patient sera (B) and healthy control (HC) sera (C). The sera were diluted to 1:100.

건강인에서 한 명만이 반응했기 때문에 진단적인 유의성이 있을 것으로 생각되었다.

이들 15-kDa 주위의 항원을 동정하기 위해 2-DE와 immunoblot을 시행하였다 (Fig. 2). 무작위로 결핵환자 혈청 7개와 건강인의 혈청 7개를 각각 모은 혈청을 분석에 사용하였다. 분자량 19-kDa 이하에서 환자 혈청하고만 반응하는 6개의 뚜렷한 spot이 관찰되었으며 (Fig. 2B), 이들 6개의 spot을 LC-MS/MS로 동정하였다. 그러나 1번 spot은 양적으로 적어 동정되지 않았기 때문에 균체 추출액을 ion-exchange chromatography로 일차 분획화를 실시하였다. 일반적으로 일차 분획화의 장점은 미량으로 존재하는 단백질이 농축되는 결과를 얻을 수 있다. 각각의 chromatography 분획을 SDS-PAGE로 분석하여 1번 spot이 존재하는 분획을 모아 농축하였고, 다시 2-DE와 immunoblot으로 분석하였다 (Fig. 3). 일차 분획화로 정제된 분획에서 15-kDa 항원 band를 SDS-PAGE로 확인할 수 있었고, 이들 band는 환자 혈청하고만 반응하였다 (Fig. 3A에 화살표로 표기). 2-DE로 분리한 후에 1번 spot의 단백 동정을 다시 실시하였다 (Fig. 3B와 3C).

6개의 spot을 동정한 결과는 Table 1과 같다. 2번과 5번 spot은 동일한 단백질로 HspX이었고, 3번 spot은 CFP-10 단백질로 이들 두 개의 단백질은 이미 혈청학적인 연구가 보고된 항원이다 (5). 다른 3종류의 단백질은 Rv0652, Rv-2626c와 Rv3418c (GroES)로서 혈청학적 반응성에 대한

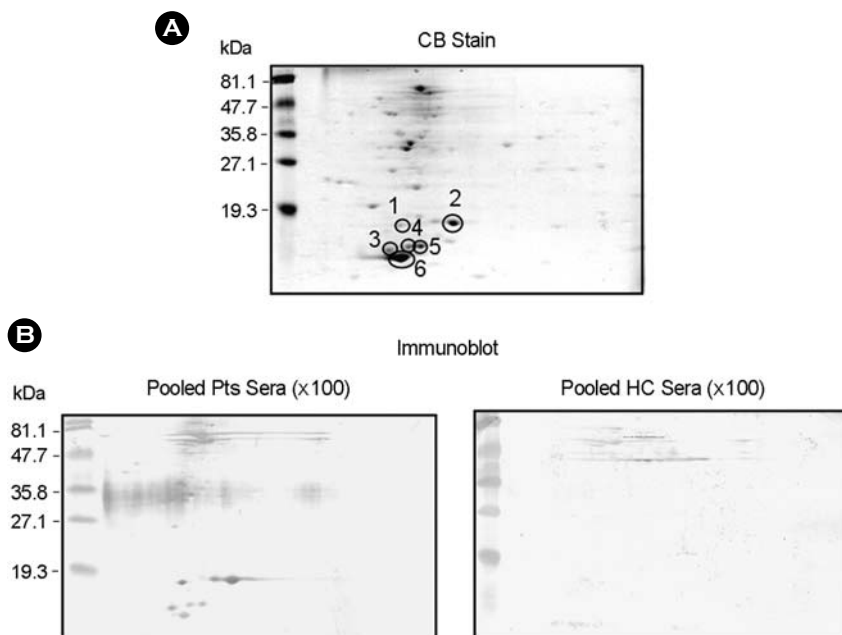


Figure 2. 2-DE analysis of sonic extracts of *M. tuberculosis*. The extract proteins (300 μ g) were separated by isoelectric focusing using a 7-cm pH gradient strip (pH 4 to 7) in the first dimension and 15% SDS-PAGE in the second dimension. The gels were stained with Coomassie blue (A) and immunoblotting using pooled sera from TB patients and healthy controls (B). The sera were diluted to 1:100. Indicated spots of panel A were seroreactive proteins.

연구 보고가 없는 항원으로 본 연구에서 처음 보고하였다.

Rv0652 단백질의 발현과 진단적인 유의성

결핵균체 추출항원에서 혈청학적 반응성이 확인된 항원 Rv0652 (ribosomal protein L7/L12) 단백을 유전자재조합기술을 이용하여 대장균에서 발현하여 정제하였다. 정제된 재조합단백질은 SDS-PAGE 분석에서 약간의 오염

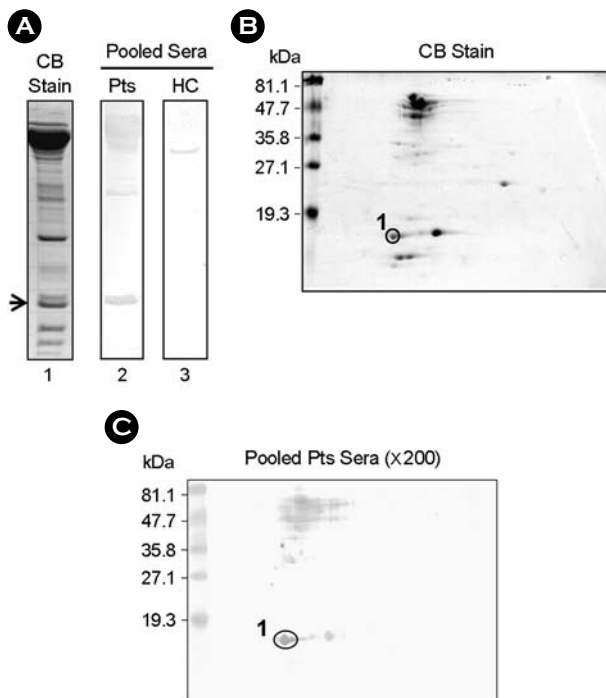


Figure 3. Partial purification and immunoblot analysis of 15-kDa protein from *M. tuberculosis* sonic extracts. The extracts were fractionated using DEAE-Sepharose chromatography. Fractions containing 15-kDa proteins were pooled, subjected to SDS-PAGE, and analyzed by Coomassie blue staining and immunoblotting (A). Partially purified protein was also separated by 2-DE and then analyzed by Coomassie blue staining (B) and immunoblotting (C).

된 band가 관찰되었지만 항체반응을 측정할 수준인 95% 이상의 순도를 나타내었다 (Fig. 4A).

결핵환자와 건강인의 혈청에서 Rv0652 단백질에 대한 IgG 항체가를 ELISA로 측정하였다. 환자군의 Rv0652 단백질에 대한 항체가는 건강인에 비해 유의하게 높았다 ($p < 0.05$) (Table 2). 그러나 AFB 양성 환자군과 음성 환자군 사이에는 뚜렷한 차이는 없었다. ROC curve 분석에서 AUC 값은 1에 근접할수록 진단적인 유의성이 높다는 것을 나타내는데, Rv0652의 AUC 값은 0.57로 진단적인 유의성이 높지 않았다. ROC curve상에서 최대의 정확도를 나타낼 때의 흡광도 값인 0.37을 cutoff 값으로 정하여 분석하였다. Fig. 4B와 같이 각 혈청의 항체가 분포도를 보면 넓은 범위로 퍼져서 분포함을 알 수 있었고, Rv0652

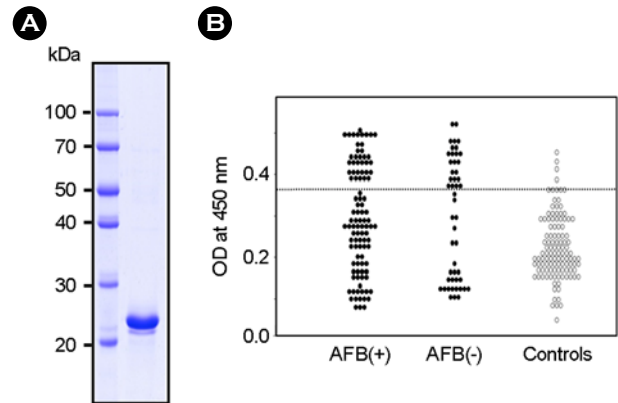


Figure 4. SDS-PAGE analysis and seroreactivity of the recombinant Rv0652 proteins. (A) The protein was expressed in *E. coli*, purified by Ni-NTA affinity chromatography, and subjected to SDS-PAGE. The gel was stained with Coomassie blue. (B) IgG antibody responses to purified Rv0652 were determined by ELISA in AFB-positive and AFB-negative groups of patients with pulmonary TB and healthy controls. The horizontal line in panel represents the cut-off value determined at the maximal accuracy on the ROC curve.

Table 1. The identification of seroreactive proteins from *M. tuberculosis*-sonic extracts

Spot no.	Protein (Gene number or name)	Score	Nominal mass	Calculated pI
1	Ribosomal protein L7/L12 (Rv0652, <i>rplL</i>)	93	13,440	4.30
2	α -crystalline, MMP ^a (Rv2031c, <i>HspX</i> , <i>acr</i>)	101	16,086	5.0
3	CFP-10 (Rv3874, <i>esxB</i>)	103	10,696	4.45
4	Conserved hypothetical protein (Rv2626c)	45	15,517	4.77
5	α -crystalline, MMP (Rv2031c, <i>HspX</i> , <i>acr</i>)	58	16,086	5.0
6	10-kDa Chaperonin GroES (Rv3418c, <i>groES</i>)	112	10,667	4.62

^aMMP: major membrane protein

Table 2. Sensitivity and specificity of Rv0652 antigen

Patient group (no. of subjects)	Mean OD \pm SD ^a	No. of positive individuals ^b	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Pulmonary TB				
AFB-positive (101) ^c	0.29 \pm 0.13*	35	34.7	
AFB-negative (49) ^d	0.30 \pm 0.15*	23	46.9	
Total (150)	0.30 \pm 0.13*	58	39.0	
Healthy Control (115)	0.23 \pm 0.08 [#]	9		92.2

^a Mann-Whitney *U*-test for multiple comparisons of means was used to determine whether there were significant difference between the results for the three groups. The different symbols (*, #) indicate significant difference ($p < 0.05$) between the means of antibody titers for the three groups.

^b The cut-off value was determined when the accuracy was maximal on the ROC curve.

^c AFB-positive group consisted of smear-positive and/or culture-positive patients.

^d AFB-negative group consisted of smear and culture-negative patients

단백의 민감도는 AFB 양성 환자군에서 35%, AFB 음성 환자군에서는 47%, 전체적으로 39%를 나타내었다. 특이도는 92%를 나타내었다.

고 찰

결핵균은 복잡한 항원구조와 다양한 면역학적인 활성을 나타내는 면역성분들을 포함하고 있다. 혈청학적 진단용 항원뿐만 아니라 T-림프구 자극항원, 아단위 백신 후보항원 등이 결핵균 배양액 및 균체항원에서 동정되고 있다 (11). 본 연구에서는 결핵균 배양액에 비해 연구가 상대적으로 미흡한 균체추출항원을 2-DE와 immunoblot으로 분석하여 항체반응을 강하게 유도하는 항원을 동정한 결과 총 6개의 단백질항원을 동정할 수 있었다. 혈청학적인 연구가 보고되지 않은 3종류의 단백질을 새로 확인하였다. 이들 중 Rv0652 단백질에 대한 재조합단백질을 제조하여 혈청학적인 유의성을 평가한 결과 기대만큼의 민감도는 얻을 수 없었다.

HspX는 주요 세포막단백으로써 (16), 저산소 조건에서 발현이 증가되는 단백질로, 혈청학적 진단을 위한 민감도는 보고자에 따라 32~75%였다 (5, 12, 13). 또한 상품화된 혈청학적 진단키트인 Pathozyme TB complex에 포함된 항원성분 중의 하나이다. 본 연구에서 2번과 5번 spot은 모두 HspX로 동정되었는데 (Fig. 2), 동일한 단백질 분리를 약간 변성되었거나 post-translational modification 때문일 것으로 생각된다 (2). CFP-10은 *M. bovis* BCG 균

주에는 없는 단백질로, 잠복결핵진단키트 (QuantiFERON-TB)에 사용되는 주요 T-세포 자극항원이다 (11). CFP-10의 혈청학적 진단을 위한 민감도는 29~60%이다 (5). Rv2626c는 hypothetical protein으로 혈청학적인 항원으로 본 연구에서 처음 동정하였다. Rv3418는 heat shock protein으로 여러 가지 스트레스 조건에 반응하는 단백질이며 또한 결핵환자에서 T-세포 자극항원으로 보고된 바 있다 (17). Rv0652 단백질은 50S ribosomal protein L7/L12이다 (18). L7과 L12를 코딩하는 유전자는 Rv0652(*rplL*)로써 L7의 아미노말단부위가 acetylation된 것을 제외하고는 동일한 단백질이다. 특히 이 단백질은 우리나라에서 흔히 분리되는 임상균주인 K-균주의 배양액에는 표준균주에 비해 비교적 풍부히 존재하는 단백질이다 (19). Ribosomal protein들은 중요한 면역기능을 담당하는 것으로 알려져 있다 (20). 따라서 일차적으로 Rv0652 단백질을 선택하여 재조합단백질을 제조하여 혈청학적 진단적인 유의성을 평가하였다.

Rv0652 단백질의 계산된 분자량은 13.4-kDa이지만 실제 native 단백질은 15-kDa이며 대장균에서 발현된 단백질은 22-kDa 정도였다. 이는 다른 보고에서처럼 재조합단백질로 발현되는 경우 poly His이 부착되어 분자량이 증가된 것으로 생각된다 (8). Figure 1에서 결핵환자 혈청의 50%는 15-kDa에 해당되는 band에 반응하였다. 2-DE 분석 상 Rv0652는 HspX의 spot과 동일한 위치에 있기 때문에 이들 중 하나의 단백질에 반응해도 일차원적인 전기영동과 immunoblot에서는 모두 양성으로 나올 수 있다. 따라서 ELISA 분석에서 Rv0652의 민감도가 기대한 것 보다 낮은 39%를 나타낸 것으로 생각된다. 또한 민감도와 특이

도는 cutoff 값을 어떻게 결정하느냐에 따라 좌우된다. 보통은 건강인의 항체가 평균에 3배의 표준편차를 더한 값을 cutoff 값으로 정하게 된다. 최근에는 cutoff 값을 ROC curve에서 가장 높은 정확도를 나타낼 때의 값으로 정하기도 한다 (8, 21). 두 경우 모두 cutoff 값은 건강대조군의 항체가에 좌우된다. 본 연구에서는 건강인 혈청에서도 Rv0652에 대한 항체반응이 비교적 높기 때문에 민감도가 낮았다. 건강인 혈청에서 항체가가 높은 이유로는 immunoblot 분석에서 인식되지 않는 conformational epitope이 ELISA 분석에서는 인식되기 때문에 이들 epitope이 건강인의 혈청에 존재하는 항체와 교차반응을 할 수 있다. 또한 Rv0652는 다른 세균에 존재하는 ribosomal protein L7/L12 단백질과의 항원적인 유사성에 의해서도 교차반응이 나타날 수 있다. 또 다른 가능성은 Rv0652 단백질이 *M. bovis*에도 존재하기 때문에 BCG 접종 양성 건강인뿐만 아니라 잠복결핵감염자인 PPD 양성인에서도 Rv0652 단백질에 대한 항체가가 높을 가능성이 있다. 따라서 Rv0652로부터 진단적인 유의성이 높은 peptide만을 동정하여 사용하면 교차반응하는 epitope을 배제할 수 있기 때문에 더 좋은 결과를 얻으리라 생각된다.

혈청학적인 연구들을 분석해보면 대부분 항원의 민감도는 AFB 음성군 보다 양성군에서 민감도가 높은 편이다 (5, 11). 대표적인 예로 38-kDa 항원의 민감도는 AFB 양성군에서 음성군에 비해 유의하게 높다고 알려져 있다. 그러나 HspX의 민감도는 음성 환자군에서 높다 (2, 11). 이유를 정확하게 설명할 수 없지만, HspX는 대수증식기에는 발현되지 않고 주로 제자리성장기 때 발현이 되기 때문이라고 생각된다 (12). 본 연구에서도 Rv0652 단백질의 민감도는 AFB 양성군보다 AFB 음성군에서 더 높았다. 이는 Rv0652 단백질은 세포질 항원이기 때문에 초기보다는 질병이 진행되거나 면역반응에 의해 결핵균들이 제거되는 시점에서 항원이 면역계에 노출되기 때문이라고 생각된다.

혈청학적인 진단법 개발 연구에서 가장 큰 장애요인은 항체반응의 다양성이다. 본 연구에서 개개인의 혈청 모두를 2-DE로 분석할 수 없기 때문에 몇 명의 환자혈청을 모아서 분석하였지만, 이 중 하나의 혈청만 강하게 반응해도 양성으로 판단될 수 있는 단점이 있다. 또 다른 장애요인은 결핵균 항원계의 복잡성이다. 본 연구에서도 균체 추출액 전체를 2-DE로 분리할 경우 1번 spot인

Rv0652를 동정할 수 없었고 일차 분획화로 부분 정제된 후에 동정할 수 있었다. 최근 결핵균 단백질을 다단계 분획화로 960개의 분획으로 나눈 후에, microarray로 항체반응을 분석하여 4종류의 새로운 B-세포 항원을 보고한 바 있다 (22). 따라서 항원의 분획화를 통해 분석하면 보다 많은 단백질을 동정할 수 있을 것이다.

주요 항원을 조합한 혼합항원의 진단적인 유용성과 높은 면역원성을 나타내는 항원의 peptide를 이용한 진단법의 유용성이 보고되고 (23) 있기 때문에, 본 연구에서 동정된 단백질들은 이러한 연구의 중요한 후보항원이 될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) World Health Organization. Global Tuberculosis Control-Surveillance, Planning, Financing, WHO report 2005, Wolrd Health Organization, Geneva.
- 2) Abebe F, Holm-Hansen C, Wiker HG, Bjune G. Progress in serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Scand J Immunol 2007;66:176-91.
- 3) Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part I. Latent tuberculosis. Expert Rev Mol Diagn 2006;6:413-22.
- 4) Lyashchenko K, Colangeli R, Houde M, Al Jahdali H, Menzies D, Gennaro ML. Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. Infect Immun 1998;66:3936-40.
- 5) Steingart KR, Dendukuri N, Henry M, Schiller I, Nahid P, Hopewell PC, Ramsay A, Pai M, Laal S. Performance of purified antigens for serodiagnosis of pulmonary tuberculosis: a meta-analysis. Clin Vaccine Immunol 2009;16:260-76.
- 6) Houghton RL, Lodes MJ, Dillon DC, Reynolds LD, Day CH, McNeill PD, Hendrickson RC, Skeiky YA, Sampaio DP, Badaro R, Lyashchenko KP, Reed SG. Use of multiepitope polypeptides in serodiagnosis of active tuberculosis. Clin Diagn Lab Immunol 2002;9:883-91.
- 7) Zhang SL, Zhao JW, Sun ZQ, Yang EZ, Yan JH, Zhao Q, Zhang GL, Zhang HM, Qi YM, Wang HH, Sun QW. Development and evaluation of a novel multiple-antigen ELISA for serodiagnosis of tuberculosis. Tuberculosis 2009; 89:278-84.
- 8) Shin AR, Shin SJ, Lee KS, Eom SH, Lee SS, Lee BS, Lee JS, Cho SN, Kim HJ. Improved sensitivity of diagnosis of tuberculosis in patients in Korea via a cocktail enzyme-linked

- immunosorbent assay containing the abundantly expressed antigens of the K strain of *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Vaccine Immunol 2008;15:1788-95.
- 9) Malen H, Softeland T, Wiker HG. Antigen analysis of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv culture filtrate proteins. Scand J Immunol 2008;67:245-52.
 - 10) Ben Amor Y, Shashkina E, Johnson S, Bifani PJ, Kurepina N, Kreiswirth B, Bhattacharya S, Spencer J, Rendon A, Catanzaro A, Gennaro ML. Immunological characterization of novel secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. Scand J Immunol 2005;61:139-46.
 - 11) Laal S, Skeiky YA. Immune-based methods, In: Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN, Jacobs WR Jr, editors. Tuberculosis and the Tubercle Bacillus. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press; 2005. p.71-83.
 - 12) Yuan Y, Crane DD, Simpson RM, Zhu YQ, Hickey MJ, Sherman DR, Barry CE 3rd. The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95: 9578-83.
 - 13) Raja A, Uma Devi KR, Ramalingam B, Brennan PJ. Immunoglobulin G, A, and M responses in serum and circulating immune complexes elicited by the 16-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9:308-12.
 - 14) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227: 680-5.
 - 15) Lee KS, Park JK, Lim JH, Kim SY, Shin AR, Yang CS, Oh JH, Kwon YM, Song CH, Jo EK, Kim HJ. Identification of proteins induced at hypoxic and low pH conditions in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. J Bacteriol Virol 2006;36:59-68.
 - 16) Lee BY, Hefta SA, Brennan PJ. Characterization of the major membrane protein of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 1992;60:2066-74.
 - 17) Chua-Intra B, Wilkinson RJ, Ivanyi J. Selective T-cell recognition of the N-terminal peptide of GroES in tuberculosis. Infect Immun 2002;70:1645-7.
 - 18) Camus JC, Pryor MJ, Medigue C, Cole ST. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Microbiology 2002;148:2967-73.
 - 19) Bahk YY, Kim SA, Kim JS, Euh HJ, Bai GH, Cho SN, Kim YS. Antigens secreted from *Mycobacterium tuberculosis*: identification by proteomics approach and test for diagnostic marker. Proteomics 2004;4:3299-307.
 - 20) Gregory RL. Microbial ribosomal vaccines. Rev Infect Dis 1986;8:208-17.
 - 21) Rosenkrands I, Aagaard C, Weldingh K, Brock I, Dziegiel MH, Singh M, Hoff S, Ravn P, Andersen P. Identification of Rv0222 from RD4 as a novel serodiagnostic target for tuberculosis. Tuberculosis 2008;88:335-43.
 - 22) Sartain MJ, Slayden RA, Singh KK, Laal S, Belisle JT. Disease state differentiation and identification of tuberculosis biomarkers via native antigen array profiling. Mol Cell Proteomics 2006;5:2102-13.
 - 23) Singh KK, Sharma N, Vargas D, Liu Z, Belisle JT, Potharaju V, Wanchu A, Behera D, Laal S. Peptides of a novel *Mycobacterium tuberculosis*-specific cell wall protein for immunodiagnosis of tuberculosis. J Infect Dis 2009;200:571-81.