

중합효소연쇄반응을 이용한 결핵의 진단에 있어서 각종 DNA 추출방법의 비교

충남대학교 의과대학 내과학교실

김 주 옥 · 한 표 성 · 홍 석 철
이 종 진 · 조 해 정 · 김 선 영

= Abstract =

Comparison of Various DNA Extraction Methods for Diagnosis of Tuberculosis Using a Polymerase Chain Reaction

Ju-Ock Kim M.D., Pyo-Seong Han M.D., Seok-Cheol Hong M.D.,
Jong-Jin Lee M.D., Hai-Jeong Cho M.D. and Sun-Young Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, School of Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea

Background: The polymerase chain reaction (PCR) is a very sensitive method for the detecting of mycobacterial DNA. There are many reports revealing the efficacy of PCR for the diagnosis of M. tuberculosis, but there are many different methods for DNA extraction from Mycobacterium tuberculosis. Bead beater method is a very useful method for DNA extraction from clinical specimens, but its procedures are relatively complicated and time-consuming. So we studied other methods for the DNA extraction from Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv and some clinical specimens (5 smear positive sputa and 5 smear negative CSF).

Method: We extracted the mycobacterial DNA with 6 different methods from H₃₇Rv strain and clinical specimens. The methods included SDS-microwave oven method, NaOH lysis method, Triton X-100-Proteinase K method, Lysis buffer method, SDS-proteinase K method and bead beater method. The target DNA was 123bp of IS6110 and was detected by examination of ethidium bromide-stained agarose gels.

Results: Among 6 methods, SDS-proteinase K method, bead beater method, lysis buffer method and triton X-100-proteinase K method were excellent, but SDS-proteinase K method was the best method in the aspect of simplicity and cost-effectiveness.

Conclusion: We suggest that SDS-proteinase K method is a simple and convenient method and might be the best method for the extraction of mycobacterial DNA.

Key Words: Polymerase chain reaction, Tuberculosis

서 론

1965년 우리나라의 제 1 차 결핵 실태조사 이후 1990년

제 6 차 조사까지 결핵의 유병률은 매우 감소가 된 상태 이지만 아직도 우리나라에서도 매우 유병률이 높은 질환 에 속한다. 결핵을 진단하기 위한 보편적인 방법으로서 흉부 X선 검사, 검체내에서의 항산균의 염색 및 배양검 사등이 이용되고 있으나 민감도와 검사기간등이 문제가 되고 있다. 이를 보완하기 위하여 방사성 동위원소를 이 용한 BACTEC system¹⁾, 혈청학적 또는 면역학적 방 법²⁻⁴⁾, Restriction Fragment Length Polymorphism

*본 논문은 1992년도 충남대학교병원 임상연구비와 내과학교실 연구비의 보조를 받은 것임.

*본 논문의 일부는 1992년도 제75차 대한결핵 및 호흡기 학회 추계학술대회에서 발표되었음.

(RFLP)^{5,6)} 및 DNA Probe를 이용하는 여러가지 방법들⁷⁻¹³⁾이 개발되어 왔으나 역시 민감도와 검사기간등에 문제가 되어 왔다.

1985년 이후 Saiki 등^{14,15)}에 의해 Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique이 개발된 이후 결핵균의 특정 부분의 DNA를 증폭하여 결핵의 진단에 획기적으로 이용할 수 있게 되었다.¹⁶⁻²²⁾ Brisson-Neol 등¹⁶⁾은 65KD 항원을 coding하는 DNA의 일부를 증폭하여 객담내에 존재하는 결핵균을 검출할 수 있음을 밝혀 진단에 이용할 수 있음을 증명하였고 Eisenach 등¹⁷⁾은 각 결핵균 DNA에 10-16개의 copy가 있는 것으로 알려진 Insertion sequence인 IS6110의 일부를 증폭하여 결핵 진단에 매우 유용함을 보고 하였다.

최근 국내에도 여러 실험실에서 결핵균의 검출 및 결핵의 진단을 위하여 가검물내에서 PCR법을 이용하여 활발한 연구를 시행하고 있으나 각 검체에서 DNA를 분리하는 방법들이 다양하여 각 실험실마다 특정한 방법으로 PCR에 이용하고 있는 실정이다. 김 등²⁰⁾은 bead beater 법으로 결핵균 DNA를 추출하여 우수한 성적을 보고한 바 있으나 저자들이 상기방법으로 DNA를 추출하여 본 결과 PCR 성적은 매우 우수한 반면 DNA 분리 과정이 비교적 복잡하고 비교적 많은 소모품이 필요함을 느끼게 되었다.

이에 저자들은 Standard strain인 H₃₇Rv strain을 이용하여 DNA를 분리하는 다른 방법들을 bead beater 법과 비교하여 어느 방법들이 임상적으로 가장 짧은 시간에 우수한 PCR법의 결과를 얻는지, 또한 어느 방법이 상대적으로 간단한지를 알아보고자 본 연구를 시행하였으며 각각의 방법들에 의한 객담내 결핵균의 DNA와 결핵성 뇌막염이 의심되었으나 도말 음성이었던 환자의 뇌척수액에서 DNA를 추출하여 PCR을 시행하여 비교하여 보았다.

연구 방법

1. 표준 균주

Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv를 표준균주로 하여 적당량을 TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 부유시켰다. 사용된 Primer의 특이도를 알아보기 위하여 충남대학교 의과대학 미생물학 교실에서 제대배양중인 각종 결핵균을 사용하였다 (Table 1).

Table 1. Various Mycobacteria

<i>M. nonchromogenicum</i>	ATCC 19530
<i>M. terrae</i>	ATCC 15755
<i>M. scrofulaceum</i>	ATCC 19981
<i>M. avium</i>	ATCC 19075
<i>M. vaccae</i>	ATCC 15483
<i>M. smegmatis</i>	ATCC 607
<i>M. cholerae subsp chelonae</i>	NCTC 1046
<i>M. aurum</i>	ATCC 23366
<i>M. chitae</i>	ATCC 19627
<i>M. duvalli</i>	NCTC 8645
<i>M. neoaurum</i>	ATCC 25795
<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ RV	결핵 협회
<i>M. bovis</i> BCG	ATCC 6841

2. 각종 방법에 따른 DNA 분리

1) SDS-Microwave oven (Bollet's) Method²³⁾

TE buffer에 부유되어 있는 결핵균 (*M. tuberculosis* H₃₇Rv) 200 μl를 pellet을 만들고 1 ml TE로 wash한다. pellet을 100 μl TE에 재부유 시킨 후 10% SDS 50 μl (fine conc. 3.3%)를 넣어 30분 동안 65°C에서 incubation한다. 원심분리후 상청액을 버리고 900W oven에서 2분간 가열한다. 다시 200 μl TE로 부유시킨후 Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol (PCI) 용액을 동량 넣은후 vigorous vortexing 한후 원심분리하여 상청액을 취한다. 0.1 용적의 3M ammonium acetate 용액을 섞은 후 ice-cold 100% ethanol 2 용적을 넣는다. -70°C deep freezer에 10분이상 방치한 다음 4°C에서 12000 rpm으로 15분간 원심분리 후 speed vac (Heto)에서 건조시켜서 20 μl의 sterile tertiary distilled water (STDW)에 용해시킨 후 -20°C에 보관하였다. 만일 spectrophotometer상 DNA의 순도가 낮거나 PCR을 시행하여 전기영동 해본결과 저저분한 background가 발견되면 5)번의 방법대로 0.7M 이상의 salt 존재하에 10% CTAB/NaCl 용액으로 다시 처리하여 냉동 보관하였다.

2) NaOH Lysis Method²⁴⁾

결핵균 부유액 200 μl를 pellet을 만든후 0.1N NaOH 200 μl에 부유시킨 후 5분간 끓인 다음 원침하여 상청액을 옮긴후 동량의 Phenol-Chloroform (PC) 용액을 가한다. 원침하여 상청액을 다시 한번 PC용액과 섞은

후 원침하여 상청액을 옮긴후 3M Ammonium acetate 0.1 용적을 가하고 Ethanol down하여 상기방법과 동일하게 DNA를 분리하여 보관한다. 만일 spectrophotometer상 DNA의 순도가 낮거나 PCR을 시행하여 전기영동 해본 결과 지저분한 background나 nonspecific DNA band가 보이면 5)번의 방법대로 0.7M 이상의 salt 존재하에 10% CTAB/NaCl용액으로 처리하고 CI 및 PCI 처리한 후 ethanol down하여 보관하였다.

3) Triton X-100-Proteinase K Method

결핵균 부유액 470 μ l에 100% Triton X-100 5 μ l (final conc. 1%)를 넣고 60°C에서 30분간 방치한후 Proteinase K (20 mg/ml)를 25 μ l를 넣고 (final conc. 1 mg/ml) 60°C에서 1시간 방치한 후 10분간 끓여 Proteinase K를 불활성화 시킨다. 5)번의 방법과 동일하게 0.7M NaCl 이상의 salt 존재하에 10% CTAB/NaCl용액으로 처리하고 CI 및 PCI 처리한 후 ethanol down하여 보관하였다.

4) Lysis Buffer Method

1x Lysis buffer는 50 mM KCl, 10 mM Tris (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 0.01% Gelatin, 0.45% Tween 20, 0.45% Triton X-100으로 만들었다. 결핵균 부유액 200 μ l를 pellet으로 만든후 Lysis buffer 470 μ l에 부유시킨 후 55°C에서 1시간 방치한후 100% Triton X-100을 5 μ l와 (final conc. 1%) Proteinase K (20 mg/ml)를 25 μ l (final conc. 1 mg/ml)넣어 섞은 후 80°C에서 20분간 방치한 다음 10분간 끓이고 5)번의 방법과 동일하게 0.7 M NaCl 이상의 salt 존재하에 10% CTAB/NaCl용액으로 처리하고 CI 및 PCI 용액으로 처리한 다음 ethanol down하여 보관하였다.

5) SDS-Proteinase K Method²⁵⁾

결핵균 부유액을 pellet을 만든후 567 μ l TE에 부유시키고 10% SDS 30 μ l와 (최종농도 0.5%) 3 μ l의 Proteinase K (20 mg/ml)를 넣어 (최종농도 100 μ g/ml) 섞은 후 37°C에서 1시간 방치한다. 5M NaCl 100 μ l를 넣고 섞은후 10% CTAB/NaCl 80 μ l를 넣어 잘 섞은후 65°C에서 10분간 방치한다. 10% CTAB/NaCl 용액은 80 ml STDW에 NaCl 4.1 gm과 CTAB 10 gm을 넣고 heating하며 녹인후(65°C) 최종용량을 100 ml로 하였다. 동량의 Chloroform-Isoamyl alcohol (CI) 용액을 넣어 잘 섞은 후 원침하여 상청액을 옮긴후 동량의 PCI 용액을 넣는다. 다시 원침하여 3M sodiumm

acetate는 넣지 않고 1)와 같은 방법으로 ethanol down하여 DNA를 분리하여 보관한다.

6) Bead Beater Method²⁶⁾

2 ml screw tube에 결핵균 부유액 200 μ l를 넣고 0.1 mm Zirconium bead 200 μ l를 STDW는 들어가지않게 넣은후 TEN 100 μ l와 PCI 용액 100 μ l를 넣고 bead beater에서 (Biospec products) 3분간 beating한다. 원침한후 상청액을 옮기고 동량의 CI 용액을 넣어 원침한후 상청액을 다시 옮기고 1)와 같은 방법으로 ethanol down 한 후 DNA를 분리한다. 분리된 DNA pellet에 0.4M NaCl 500 μ l와 5% CTAB 200 μ l를 넣고 잘 섞은 후 15분간 실온에 방치한다. 5% CTAB 100- μ l를 더 넣고 섞은 후 10000 rpm에서 10분간 원침한다. 상청액을 제거한 후 pellet에 1M NaCl 500 μ l를 넣고 10000 rpm에서 10분간 원침하여 상청액을 옮긴다. 동량의 CI 용액을 넣고 원침하여 상청액을 옮긴후 1)의 방법대로 ethanol down하여 DNA를 분리하여 냉동보관한다.

3. 가검물에서의 DNA 분리

1) 객담에서의 DNA 분리

도말양성인 환자 5예에서 시행하였다. 객담통에 1M NaCl 10 ml를 넣고 10분이상 방치한후 시험관에 옮긴 다음 점액질이 다 녹을 때까지 vortexing한다. 원침후 상청액을 버리고 pellet을 재부유시킨다음 200 μ l씩 검체를 취하여 상기의 6가지 방법대로 처리하여 DNA를 분리 한다.

2) 뇌척수액에서의 DNA의 분리

충남의대 신경과에서 도말음성이었지만 임상적으로 결핵성 뇌막염 진단하에 치료를 받은 5예의 환자의 뇌척수액을 10 μ l씩을 취하여 상기의 6가지 방법대로 DNA를 분리한다.

4. 각종 방법에 의해 추출된 DNA의 순도(purity)와 양의 측정

H₃₇Rv에서 추출된 DNA를 STDW 20 μ l에 녹인후 spectrophotometer (Beckman Instruments DU 650, USA)을 이용하여 OD₂₆₀/OD₂₈₀의 비가 1.8에 가까우면 순도가 충분한 것으로 하였고 OD₂₆₀의 값으로 DNA의 양을 결정하였다. 환자의 객담이나 뇌척수액에서 추출된 DNA는 순도만을 측정하였으며 양은 측정하지 않았다. 만일 순도가 1.7이하이면 다시 CI와 PCI 처리를 하

여 DNA의 순도를 다시 측정하였다.

5. PCR 반응

PCR에 사용된 primers는 결핵균 DNA내에 10-16 copies가 존재한다고 알려진 IS6110의 일부분으로서 sequence는 5' -CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG -3' 와 5' -CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG-3'이며 123bp 를 target으로 하고 있다¹⁷⁾. Primers는 국내의 기초과학 지원센터에 의뢰하여 합성하였다. PCR에 사용된 buffer (Cat No. 1271 318), dNTP (1277 049) 및 Taq DNA polymerase (1418 832)는 Boehringer Mannheim사의 제품을 구입하여 사용하였다.

총 반응액의 조성은 STDW 27.5 μ l, buffer 5 μ l (최종농도 1x), dNTP 4 μ l (최종농도 100 pM), primer 각각 1.25 μ l (0.5 μ M), Taq polymerase 1 μ l (1.25 unit) 및 template DNA 10 μ l로서 50 μ l로 조정하였고 40 μ l의 mineral oil을 가하여 증발을 막았다. template DNA의 양은 H₃₇Rv DNA의 경우 spectrophotometer를 이용하여 양을 결정하였고 임상검체에서 추출된 DNA의 양은 측정하지 않았으며 purity만을 측정하였다. PCR반응은 Easy cycler (Ericomp Inc.)를 사용하여 Denaturation 94°C, annealing 68°C, extension 72°C로 하였으며 각각의 작용시간은 2분으로 하여 총 30 cycles을 시행하였고 처음의 denaturation은

95°C에서 그리고 마지막 extension은 10분으로 하였다.

6. Target DNA의 확인

agarose를 0.5x TBE buffer에 2%가 되도록 넣은후 microwave oven에서 3분간 가열하였고 약간 식힌후에 ethidium bromide (최종농도 0.5 μ g/ml)를 넣어 잘 흔든후 minigel (Mupid, Japan)에 부어 gel을 만들어 0.5x TBE buffer하에서 전기영동을 하여 marker DNA (123 DNA ladder; BRL, USA)의 123bp 위치에 band가 있는가를 확인하였다.

결 과

1. 사용된 Primers의 특이도

Table 1에 열거된 각종 결핵균의 DNA는 4)번의 lysis buffer법으로 분리하여 PCR을 시행하여 특이도를 관찰한 결과 Fig. 1에서 보이는 바와같이 M. tuberculosis H₃₇Rv strain 과 M. bovis BCG strain 에서만 123bp DNA band를 확인할 수 있다.

2. 각각의 방법에 따른 PCR의 예민도

상기 6가지 방법으로 H₃₇Rv 부유액에서 염색체 DNA를 추출하여 각각 serial dilution한 DNA로 PCR을 시행하여 ethidium bromide로 염색한 agarose gel



Fig. 1. Amplification of 123bp DNA band from various mycobacteria. The single band is seen at lanes of Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv and Mycobacterium bovis BCG. The DNA was extracted by lysis buffer method.

lane 1	M. nonchromogenicum	8	M. aurum
2	M. terrae	9	M. chitae
3	M. scrofulaceum	10	M. duvalii
4	M. avium	11	M. neoaurum
5	M. vaccae	12	M. tuberculosis H ₃₇ Rv
6	M. smegmatis	13	M. bovis BCG
7	M. cholerae subsp chelonei		

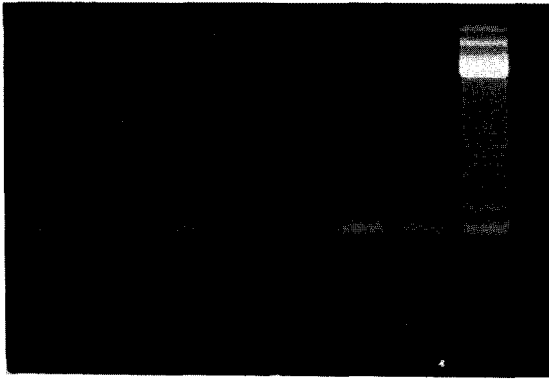


Fig. 2. PCR results $H_{37}Rv$ DNA extracted by various method.

- lane 1 amplified 123bp DNA band by SDS-microwave oven method (50fg)
- 2 NaOH lysis method (50fg)
- 3 Triton X-100-Proteinase K method (5fg)
- 4 Lysis buffer method (5fg)
- 5 SDS-proteinase K method (5fg)
- 6 Bead beater method (5fg)
- 7 positive control ($H_{37}Rv$)
- 8 Marker DNA (123 DNA ladder)

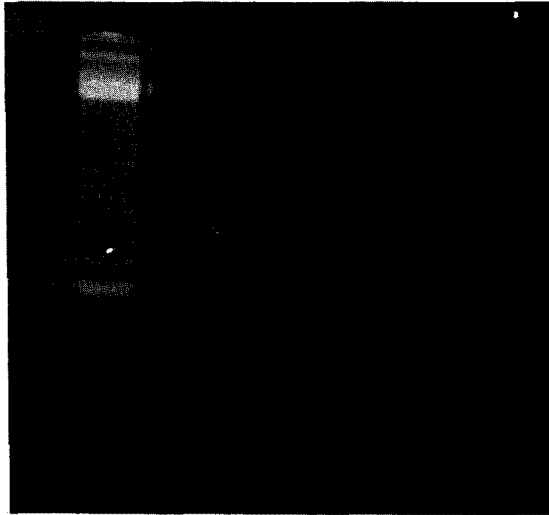


Fig. 3. PCR results of smear-positive sputum of case 1.

- lane 1 123bp DNA band extracted by SDS-microwave oven method
- 2 Marker DNA (123 DNA ladder)
- 3 NaOH lysis method
- 4 Triton X-100-Proteinase K method
- 5 Lysis buffer method
- 6 SDS-proteinase K method
- 7 Bead beater method

을 자외선 투사기로 관찰한 결과 SDS-Microwave oven method 및 NaOH법은 50 fg까지 양성 있었고 Triton X-100-proteinase K 법, Lysis buffer 법, SDS-proteinase K 법 및 Bead beater 법은 5 fg까지 PCR 양성이었다(Fig. 2).

3. 각각의 DNA 분리 방법에 소요된 시간

SDS-microwave method는 약 1시간, NaOH lysis 법은 약 1시간, Triton X-100-proteinase K법은 1시간 40분, lysis buffer 법은 약 1시간 30분, SDS-proteinase K법은 약 2시간 및 bead beater법 약 2시간이 소요되었다.

4. 각 DNA 분리방법에 따른 도말양성 객담에서의 PCR 성적

각각의 방법으로 분리된 DNA로 PCR을 5예에서 시행한 결과 전예에서 양성이었다. Fig. 3는 6가지 방법으

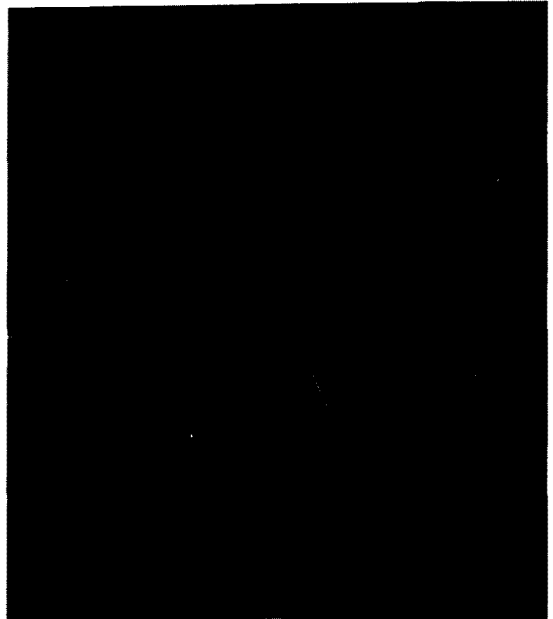


Fig. 4. PCR results of smear-negative CSF of case 2. lane 1 123bp DNA band extracted by SDS-microwave oven method

- 2 NaOH lysis Method
- 3 Triton X-100-Proteinase K method
- 4 Lysis buffer method
- 5 SDS-proteinase K method
- 6 Bead beater method

로 양성인 case 1의 PCR 양성을 보이고 있다(Table 2).

5. 뇌척수액에서의 PCR 결과

임상적으로 결핵성 뇌막염이 의심되어 결핵치료를 시작하기 직전의 환자 5예의 뇌척수액 10 μ l를 취하여 각각의 방법으로 DNA를 추출하여 PCR을 시행한 결과 SDS-MWO 방법과 NaOH lysis방법으로는 각 3예에서 양성이었다고 나머지 4가지가 방법에서는 각가 4예에서 양성이었다(Table 3). 5예 모두의 환자들은 항결핵요법을 1년간 시행하여 모두 완치된 환자이었다. Fig. 4는 6가지 방법 모두에 PCR 양성인 case 2를 보여 주고 있다(Table 3).

고 찰

본 연구는 여러가지 방법으로 DNA를 추출하여 어떤 방법이 가장 짧은 시간에 만족할 만한 성적을 얻을수 있는가를 밝히고자 하였다.

종래의 보고대로²⁶⁾ bead beater방법이 상당히 좋은 결과를 보여주고 있음을 확인할 수 있었으며 단지 이 방법의 단점은 너무 손이 많이 간다는 번잡성과 다른 방법과 비교하여 비교적 시간이 많이 걸린다는 점이다. 따라서 bead beater법의 성과와 같은 결과를 보이는 방법들로서는 Triton X-100-proteinase K법, Lysis buffer법 및 SDS-proteinase K법 등을 확인한 것에 의의를 둘 수 있다.

본 연구에서 사용한 primers는 Eisenach 등¹⁷⁾이 사용한 것과 동일한 IS6110의 일부인 123bp DNA 절편을 증폭하였는데 본 연구에서도 *M. tuberculosis* H₃₇Rv와 *M. bovis* BCG strain에서만 123bp의 DNA 절편의 증폭만을 확인할 수 있었다.

세균중 특히 결핵균은 DNA를 싸고 있는 back bone을 얼마나 제거하느냐가 PCR을 시행할 경우 단일 DNA band가 나타나는지 혹은 저저분한 background을 없앨 수 있는 방법이라 할 수 있다. 이러한 polysaccharide를 제거하기 위해 Hurley 등²⁷⁾과 Darby 등²⁸⁾은

Table 2. PCR Results of Smear-Positive Sputa According to Various Methods

Methods	PCR results of cases				
	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5
SDS-MWO	+	+	+	+	+
NaOH lysis	+	+	+	+	+
Triton X-100 - PK*	+	+	+	+	+
Lysis buffer	+	+	+	+	+
SDS - PK*	+	+	+	+	+
Bead beater	+	+	+	+	+

* Proteinase K.

Table 3. PCR Results of Smear-Negative CSF According to Various Methods

Methods	PCR results of cases				
	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5
SDS-MWO	-	+	-	+	+
NaOH lysis	-	+	-	+	+
Triton X-100 - PK*	-	+	+	+	+
Lysis buffer	-	+	+	+	+
SDS - PK*	-	+	+	+	+
Bead beater	-	+	+	+	+

* Proteinase K.

cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)를 적당한 농도의 NaCl 존재하에 결핵균 DNA와 반응시킴으로서 backbone을 제거할 수 있었다. 본 연구에서도 bead beater법에서는 첫 ethanol down 후에 0.4M NaCl 500 μ l에 5% CTAB 200 μ l를 첨가하여 nucleic acid-CTAB complex를 침전시킨후 1M NaCl 500 μ l를 넣어 다시 nucleic acid를 CTAB와 분리시키고 CTAB-salt complex를 침전시킴으로서 backbone을 제거하였다. SDS-proteinase K법에서는 1% SDS와 100 μ g/ml의 proteinase K에 검체를 넣은 후 37°C에서 1시간 반응시킨후 5M NaCl을 100 μ l가하여 salt의 농도가 0.7M 이상이 되도록하여 CTAB가 cell wall debris, 변성된 단백질 및 polysaccharide와 complex를 만들어 침전하도록 하여 bead beater법에서의 방법의 복잡함 및 각종 eppendorf tube의 손실을 줄였다. SDS-microwave oven법과 NaOH lysis법에서도 PCR을 시행한 후 nonspecific band나 전기영동상 저저분한 background가 많이 나올 경우에는 SDS-proteinase K법과 같이 0.7M 이상의 salt 존재하에 CTAB를 첨가하여 single DNA band가 나타나도록 하였다. Lysis buffer 법이나 triton X-100-proteinase K법에서도 single band DNA의 증폭을 위해 0.7M 이상의 salt 존재하에 CTAB를 처리함으로써 DNA의 순도를 높힐 수 있었다.

또한 bead beater법이 결핵균 DNA를 추출하는 데에 있어서 매우 우수한 방법임은 이미 다른 보고들이 있으나²⁶⁾ 그 과정의 번잡성이 매우 큰 문제라고 할 수 있어서 본래 저자등도 bead beater법으로 처음에는 PCR을 시행하였으나 각종 시약이나 tube 등의 손실이 심하고 비교적 시간이 많이 걸리는 등 다른 방법을 찾기에 이르러 마침내 5가지의 다른 DNA의 분리방법을 찾을 수 있었다. 새로운 5가지의 방법들은 bead beater법에 비해 조작이 매우 편리하고 각 실험실에서 항상 준비되어 있는 water bath나 microwave oven 등을 이용하여 DNA를 추출함으로써 특별한 기구가 필요없다는 점이며 번잡함을 감소시킬 수 있었다는 것과 tube 등의 소모품을 감소시킬 수 있는 점등이 매우 좋은 방법이라 할 수 있다. 본 연구에서 사용했던 Bead beater법에서 CTAB처리한 방법을 0.4M NaCl로 5% nucleic acid-CTAB complex로 침전시킨 후 다시 1M NaCl을 가하여 nucleic acid와 분리시키는 방법을 SDS-Proteinase K법에서도

같이 0.7M NaCl 존재하에서 10% CTAB/NaCl 처리를 하여 직접 nucleic acid와 분리되도록 방법을 바꾼다면 bead beater법 역시 매우 간편한 방법으로 될 것을 확신할 수 있다. 저자등이 상기 6가지 방법으로 DNA를 추출하여 PCR을 시행하며 느낀 것중의 하나는 bead beater법중 CTAB 처리를 SDS-proteinase K법처럼 바꾸면 bead beater법과 SDS-proteinase K법이 매우 유용한 방법이 될 것이라는 것이어서 현재 본 실험실에서는 SDS-proteinase K법을 가장 많이 사용하고 있으며 CTAB 처리를 바꾼 bead beater법도 많이 쓰고 있는 방법이다. 반면 lysis buffer법이나 triton X-100-proteinase법 등은 proteinase K가 비교적 많이 소모되는 방법이라 경제적 측면에서 현재는 쓰고 있지 않다는 점을 밝히고 싶다.

또한 임상 가검물을 가지고 상기 6가지 방법으로 PCR을 시행한 결과 도말양성 객담에서는 5예 전부에서, 임상적으로 결핵성 뇌막염이 의심되어 항결핵요법을 받은후 완치판정을 받은 5예의 환자중 3예에서는 SDS-microwave oven법과 NaOH법에서 양성되었고 4예에서는 나머지 4가지 방법에서 각각 양성인 것으로 미루어 상기 6가지 방법중 어느 것이든 좋은 방법이라고 할 수 있음을 확인할 수 있었다.

본 연구에 있어서 아쉬운 점은 target DNA를 확인하는 Southern blot hybridization을 시행하지 않았다는 점이나 이것은 기존의 보고들^{17,21,26)}에서 수차례 밝혔기 때문에 커다란 문제는 없을 것으로 생각되며 임상가검물의 PCR 성적에 대한 결과가 부족하다는 점을 들 수 있으나 본 연구의 목적이 bead beater법과 비슷한 혹은 동일한 정도의 yield를 갖는 방법을 찾는 것이었기 때문에 역시 큰 문제는 되지 않을 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 : 결핵은 아직도 한국에서는 중요한 질병의 하나이지만 결핵을 진단하기 위한 보편적인 방법들이 단점인 예민도와 검사기간등이 문제가 되고 있다. 최근 분자유전학에 PCR 기법이 도입된 이래 결핵균의 DNA를 추출하여 짧은 시간내에 결핵을 진단하고자 하는 많은 보고들이 있어 왔다. 그러나 보고된 방법들의 다양성과 각 방법에 따른 소요시간등이 매우 다른 것이 문제가 되고 있고 임상에서 빠른 시간내에 비교적 간단한 방법으로

로 결핵균의 DNA를 분리한다면 보다 빨리 결핵을 진단하여 치료를 할 수 있다고 생각되어 결핵균의 DNA를 분리하는 방법중 가장 좋은 방법을 확인하고자 하였다.

방법 : 결핵균의 DNA를 추출하는 방법은 총 6가지의 방법으로서 SDS-microwave oven method, NaOH lysis method, Triton X-100-proteinase K method, Lysis buffer method, SDS-proteinase K method 및 Bead beater method를 사용하여 비교하였으며 사용된 균주는 Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv strain 이었고 임상가검물중 도말양성 객담 5예 및 결핵성 뇌막염이 의심되고 도말음성이었으나 항결핵제 투여로 완치판정을 받은 환자의 뇌척수액 5예를 대상으로 하였다. 사용된 primer는 IS6110의 123bp를 target DNA를 하였고 PCR반응은 각각 94°C, 68°C 및 72°C로 각각 2분씩 총 30주기를 시행하였다.

결과 : H₃₇Rv strain에서 각 방법으로 추출된 DNA를 10배씩 serial dilution하여 PCR을 시행한 결과 SDS-microwave oven법과 NaOH lysis법은 50 fg까지 양성이었으며 나머지 4가지 방법에서는 5 fg까지 양성이었다. 또한 각각의 방법으로 도말양성 환자의 객담에서 PCR을 시행한 결과 전예에서 양성되었고 결핵성 뇌막염이 의심스러운 환자의 뇌척수액에서는 SDS-microwave법과 NaOH lysis법으로는 5예중 3예에서 양성되었고 나머지 4가지 방법으로는 5예중 4예에서 양성이었다.

결론 : 이상의 실험으로 경제적이고 간편한 측면에서 볼 때 SDS-proteinase K법이 가장 좋은 방법임을 알 수 있었다.

REFERENCES

- Peterson EM, Floyd RC, Nakasone A, Friedly G, Maza LM: Direct identification of Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare from amplified primary cultures in BACTEC media using DNA probes. J Clin Microbiol 27:1543-1547, 1989
- Kadival GV, Mazarelo TBMS, Chaparas SD: Sensitivity and specificity of enzyme linked immunosorbent assay in the detection of antigen in tuberculous meningitis cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 23: 901-904, 1986
- Krambobitis E, McIlmurray MB, Lock PE, Hendrickse W, Holzel H: Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by latex particle agglutination. Lancet ii:1229-1231, 1984
- Yanez MA, Coppola MP, Russe DA, Delaha E, Chaparas SD, Yeager H: Determination of mycobacterial antigens in sputum by enzyme immunoassay. J Clin Microbiol 23:822-825, 1986
- Collins DM, Lisle GW: DNA restriction endonuclease analysis of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis BCG. J Gen Microbiol 130: 1019-1023, 1984
- Patel R, Kvach J, Mounts P: Isolation and restriction endonuclease analysis of mycobacterial DNA. J Gen Microbiol 132:541-551, 1986
- Drake TA, Hindler JA, Berlin OGW, Bruckner DA: Rapid identification of Mycobacterium avium complex in culture using DNA probes. J Clin Microbiol 25:1442-1445, 1987
- Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH: Repetitive DNA sequences as probes for Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol 26:2240-2245, 1988
- Kiehn TE, Edwards FF: Rapid identification using a DNA probe of Mycobacterium avium complex from patients with acquired immunodeficiency syndrome. J Clin Microbiol 25:1551-1552, 1987
- Musial CE, Tice LS, Stockman L, Roberts GD: Identification of mycobacteria from culture by using Gen-probe rapid diagnosis system for Mycobacterium avium complex and Mycobacterium tuberculosis complex. J Clin Microbiol 26:2120-2123, 1988
- Patel RJ, Piessens WF, David JR, Wirth DF: A cloned DNA fragment for identification of Mycobacterium tuberculosis. Rev Infec Dis 11 (Suppl 2): S411-S419, 1989
- Roberts MC, McMillan C, Coyle MB: Whole chromosomal DNA probes for rapid identification of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium complex. J Clin Microbiol 25:1239-1243, 1987
- Shoemaker SA, Fisher JH, Scoggin CH: Techniques of DNA hybridization detect small numbers of mycobacteria with no cross-hybridization with non-mycobacterial respiratory organisms. Am Rev Resp Dis 131:760-763, 1985
- Saiki RT, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science

- 230:1350-1354, 1985
- 15) Saiki RT, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis JB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491, 1988
 - 16) Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, Levy Frerault V, Nassil X, Hance AJ: Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet* **ii**:1069-1071, 1989
 - 17) Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT: Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* **161**:977-981, 1990
 - 18) Hance AJ, Grandchamp B, Levy-Frerault V, Lecossier D, Rauzier L, Bocart D, Gicquel B: Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA, *Mol Microbiol* **3**:843-849, 1989
 - 19) Pao CC, Yen TSB, You JB, Maa JS, Fiss EH, Chang CH: Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *J Clin Microbiol* **28**:1877-1880, 1990
 - 20) Patel RJ, Fries JW, Piessens WF, Wirth DF: Sequence analysis and amplification by polymerase chain reaction of a cloned DNA fragment for identification of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **28**:513-518, 1990
 - 21) Eisenach KD, Sifford MD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT: Detection of mycobacterium tuberculosis in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am Rev Resp Dis* **144**:1160-1163, 1991
 - 22) Shankar P, Manjunath N, Mohan KK, Prasad K, Behari M, Ahuja GK: Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. *Lancet* **337**:5-7, 1991
 - 23) Bollet C, Gevaudan M, de Lamballerie X, Zandotti C, de Micco P: A simple method for the isolation of chromosomal DNA from Gram Positive or acid-fast bacteria. *Nucleic acid Research* **19**:1955, 1991
 - 24) Bio-Medical workshop : 한국과학기술원 생명과학과. 1992
 - 25) Unit 2.4: Preparation of genomic DNA from bacteria. p 2.4.1 in *Current protocols in molecular biology*. 1990
 - 26) 김호중, 유철규, 김영환, 한성구, 심영수, 김건열, 한용철 : Polymerase chain reaction을 이용한 결핵균의 확인 방법에 관한 연구. 제73차 대한결핵 및 호흡기학회 초록집. p. 54, 1991
 - 27) Hurley SS, Splitter GA, Welch RA: Rapid lysis technique for *Mycobacterial* species. *J Clin Microbiol* **25**:2227-2229, 1987
 - 28) Darby GK, Jones AS, Kennedy JF, Walker RT: Isolation and analysis of the nucleic acids and polysaccharide from *Clostridium welchii*. *J Bacteriol* **103**:159-165, 1970