결핵균 K 균주 유래항원을 이용한 면역진단 유용성 분석

연세대학교 대학원

의 과 학 과

김 아 름

결핵균 K 균주 유래항원을 이용한 면역진단 유용성 분석

연세대학교 대학원

의 과 학 과

김 아 름

결핵균 K 균주 유래항원을 이용한 면역진단 유용성 분석

지도교수 조 상 래

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2006년 6월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

김 아 름

김아름의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2006년 6월 일

감사의 글

지난 2년 동안의 노력으로 작은 열매를 맺게 되었습니다. 감사의 말씀을 드려야 할 분들이 너무나 많습니다. 한결 같은 모습으로 모범을 보여주시고 바쁘신 일정에도 불구하고 실험에서 논문 지도까지 살펴주신 조상래 교수님께 깊이 감사 드립니다. 석사 과정동안 부족한 저를 일깨워주시고 여러 모로 이끌어 주신 송택선 선생님께 머리 숙여 감사 드립니다. 저의 실험에 깊은 관심을 보여주시고 꼼꼼하게 논문을 수정해주신 김세규 교수님께도 정말 감사 드립니다. 교실 세미나 발표 때마다 귀 기울여 주시고 조언해주신 미생물학교실 여러 교수님께도 감사의 말씀 드리고 싶습니다. 이곳에서 좋은 인연을 맺고 공부할 수 있게끔 도와주신 이혜영 교수님께 감사 드리고 임상병리학과 여러 교수님들과 제가 아는 모든 임상병리학과 동기, 선후배 학우들, 대학원 선후배님들께도 감사 드리고 싶습니다.

대학원 생활 동안 몸이 고단하고 힘들어도 웃을 수 있었던 것은 하루종일 같이 생활한 우리 실험실 식구들 덕분인 것 같습니다. 조언을 부탁드릴 때마다 항상 웃는 얼굴로 같이 고민해주신 한미영 박사님, 항상 유쾌하게 대해주시는 조성애 선생님과 이종석 박사님께도 감사 드립니다. 무엇보다도 새벽까지 시험공부도 세미나 준비도 외롭지 않게 같이 한 동기 지영이, 종종 책상 정리해주느라 고생한 지연샘, 실험 막바지에 같이 고생해 준 ELISA의 여왕 민경이, 새로운 식구가 된 저랑 똑같은 이름의 아름샘, 이제 새댁이 되는 유미샘과 후배가 될 수줍은 미소의 승모샘께도 감사 드립니다. 또한 항상 웃음으로 맞아주시는 미진샘, 소소한 것까지 챙겨주시려고 하는 영미샘, 이쁜 은희샘, 이제 더 많이 고생하실 정연샘과 주영샘께도 감사 드립니다. 그리고 멀리 영국에서 공부하시는 장은샘과 미국으로 공부하러 가신 은계샘께도 감사합니다. 또한 결핵 연구원의 애교쟁이 보람이와 동갑내기 친구 현원이에게도 감사합니다. 특히 대학원 생활에 많은 힘이 되어주고 좋은 추억을 많이 만들어준 친구 같은 지원언니에게 감사하며, 든든한 승은언니, 너무 이쁜 수연이에게도 감사합니다.

누구보다 가장 깊은 감사를 드리고 싶은, 저의 모든 것과 다름없는 사랑하는 우리 가족...항상 변함없이 저를 믿어 주시고 응원해주시는 닮고싶은 엄마, 아빠, 멋진 준순이, 사랑스러운 송이와 이 기쁨을 같이 하고 싶습니다.

차 례

그림 및 표 차례
국문 요약 1

I. 서 론

1. 결핵의 현황 3
2. 결핵의 진단 4
3. 면역진단을 위한 결핵균 항원과 항체의 발굴 7
4. 결핵 균주들의 유전적 다형성 8
5. 국내 임상 분리 균주 결핵균 K 균주 10
6. 연구 목적 11

II. 재료 및 방법

1. 실험재료 12
    - 가. 사용 균주와 plasmid 12
    - 나. 효소 및 시약 12
2. 실험방법 12
    - 가. 연구 대상 유전자의 선정 12
    - 나. K 균주 단백질의 유전자 클로닝 및 발현 14
        - (1) K 균주 단백질 발현을 위한 벡터 14
        - (2) K 균주 단백질의 유전자 클로닝 14
        - (3) 재조합 단백질의 과량 발현과 정제 17
    - 다. 면역진단 21
        - (1) 혈청 21

(2) 항체 검출법 (ELISA) 21
(3) 항체 검출의 유용성 판정 22

III. 결 과

1. 연구 대상 유전자의 선정 24
2. 새로운 K 균주의 유전자 재조합 단백질의 발현과 정제 27
3. K 균주의 단백질의 혈청 진단 유용성 평가 31
4. 결핵균 항원의 항체 검출 비교 분석 36
5. 결핵균 유전자 재조합 항원의 조합을 통한 항체 검출 ...36

IV. 고 찰 43

V. 결 론 48

참고문헌 50

영문요약 58

그림 차례

그림 1. Rv1899c, Rv2407의 아미노산 서열 분석 25
그림 2. K 균주와 H37Rv 균주의 2-DE 분석 26
그림 3. 과량발현을 위한 Rv1899c와 Rv2407 유전자의
클로닝 29
그림 4. 결핵균 K 균주 유전자 재조합 단백질의
SDS-PAGE 분석 30
그림 5. Rv1899c 단백질에 대한 결핵 환자군과
건강 대조군의 IgG 항체 반응 32
그림 6. Rv2407 단백질에 대한 결핵 환자군과
건강 대조군의 IgG 항체 반응 33
그림 7. Rv3648c 단백질에 대한 결핵 환자군과
건강 대조군의 IgG 항체 반응 34
그림 8. Rv0652 단백질에 대한 결핵 환자군과
건강 대조군의 IgG 항체 반응.....35
그림 9. 결핵 환자에서 38 kDa와 Rv1899c 단백질에 대한
IgG 항체 반응의 비교 39
그림 10. K 균주의 유전자 재조합 항원들에 대한
결핵 환자의 다양한 항체 반응(1) 41
그림 11. K 균주의 유전자 재조합 항원들에 대한
결핵 환자의 다양한 항체 반응(2) 42

표 차례

표 1. 실험에서 사용된 plasmid 13
표 2. Rv1899c와 Rv2407 클로닝을 위한 primer 염기서열 16
표 3. 본 연구에서 사용한 유전자재조합 단백질 20
표 4. 결핵 환자와 건강 대조군의 IgG 항체 반응 38

국문요약

결핵균 K 균주 유래항원을 이용한
면역진단 유용성 분석

결핵은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)에 의하여 유발되는 만성 감염성 질환으로 WHO의 보고에 의하면 세계 인구의 3분의 1이 결핵균에 감염되어 있는 전 세계적으로 주요한 질병 중 하나이다. 우리나라의 경우 매년 3만 명 이상의 새 환자가 보고되고 있으며, 3,000여명이 결핵으로 사망하고 있는 실정이다. 현재 사용되는 진단법은 민감도가 낮거나 균 배양에 긴 시간이 소요되는 등의 단점이 존재하므로 보다 간편하고 빠른 혈청진단이 널리 이용될 수 있는 가능성을 지닌다.

본 연구에서는 현재 혈청진단에 이용되고 있는 주요 결핵 항원인 38 kDa, 16 kDa 등을 이용한 검사법보다 우월한 검사법을 개발하고자 국내에서 높은 빈도로 발견되는 결핵균 K 균주에서 아직 그 기능이 밝혀지지 않은 Rv1899c, Rv2407, Rv0652, Rv3369, Rv3648c 항원들의 혈청 진단 유용성을 조사하고자 하였다. 이를 위하여 H37Rv 표준 균주와의 유전체분석으로 ORF 내에 아미노산이 삽입된 Rv1899c, Rv2407와 H37Rv 표준 균주보다 많이 발견되는 단백질 Rv0652, Rv3369, Rv3648c 등을 연구 대상 유전자로 하여 대장균 내에서 발현시킨 후, Ni-NTA affinity chromatography로 정제하였다. 이들 새로운 유전자 재조합 항원들과 주요 결핵 항원인 38 kDa와 16 kDa을 대상으로 결핵 환자군 196명과 건강 대조군

147명의 혈청에서 ELISA를 이용하여 IgG 항체를 검출하였다. 결핵 환자 196명 중 185명에서 최소 한 개 이상의 유전자 재조합 항원에 대한 항체가 검출되었다. Rv0652 단백질은 결핵 환자군의 혈청에서 뿐만 아니라 건강 대조군 혈청에서 모두 높은 양성반응을 보여 면역진단항원으로서 유용성을 기대하기 어려웠다. Rv3369 단백질은 결핵 환자의 혈청에서 낮은 양성 반응을 보여 역시 혈청 진단의 항원으로서 평가할 수 없었다. Rv1899c, Rv2407, Rv3648c 항원은 각각 40.8%, 56.5%, 30.6%의 민감도와 71.4%, 69.3%, 76.6%의 특이도를 나타내었다.

본 연구에서는 특이도 저하를 최소화 시키고 민감도를 향상시키기 위하여 K 균주의 유전자 재조합 항원들의 특이도를 90%가 되도록 양성 기준을 정하였다. 38 kDa 단독 사용 시 79.2%의 민감도로 41 명의 환자를 검출해내지 못하였는데 16 kDa와의 조합으로 84.1%, Rv1899c와의 조합으로 87.3%, 그리고 Rv2407, Rv3648c와 조합할 경우 각각 85.7%, 85.7%로 총 20 명의 환자를 더 검출하여 민감도가 상승하였음을 알 수 있었다. 또한 결핵 주요 항원인 38 kDa와 16 kDa의 조합으로도 검출해낼 수 없었던 20 명의 환자 중 10 명은 K 균주의 항원인 Rv1899c, Rv2407, Rv3648c의 조합만으로 검출할 수 있었다.

본 연구 결과는 Rv1899c, Rv2407, Rv3648c의 K 균주의 유전자 재조합 항원들이 혈청진단에 유용한 단백질임을 제시하고 있으며, 다양한 결핵균 항원과의 조합으로 민감도가 향상되어 신속하고 저렴한 결핵의 혈청 진단법으로 유용할 것으로 기대된다.

핵심되는 말: 결핵, 결핵균 K 균주 유전자 재조합 항원, 혈청학적 진단

결핵균 K 균주 유래항원을 이용한
면역진단 유용성 분석

<지도교수 **조 상 래**>

연세대학교 대학원 의과학과

김 아 름

Ⅰ. 서 론

1. 결핵의 현황

결핵은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)에 의하여 유발되는 만성 감염성 질환이다. 최근의 세계보건기구 (World Health Organization; WHO)추계에 의하면 세계 인구의 3분의 1이 결핵균에 감염되었고, 그 가운데 매년 796만 명의 결핵환자가 발생하여 187만 명이 결핵으로 사망한다고 한다[1]. 우리나라의 경우 1962년에 국가 결핵 관리체계를 수립하고 이후로 1965년 전국 결핵 실태조사 결과 5.3%의 결핵 유병률을 2000년 조사 결과에서 0.5%로 감소시키는 눈에 띌 만한 성과를 거두었지만 매년 3000여명이 결핵으로 사망하고 있어, 전체 감염증에 의한 사망의 50%이상을 차지하고 있다[2]. 최근에는 특히 다제 내성 결핵(multi-drug resistant tuberculosis, MDR-TB)의 출현이 증가하고 있음에 따라 결핵에 대

한 효과적인 백신 개발뿐 아니라 효과적인 진단법의 개발이 절실한 시점이다.

2. 결핵의 진단

현재 결핵의 진단은 주로 임상적, 미생물학적, 분자생물학적, 면역학적 진단 방법에 의해 이루어진다. 새로운 결핵의 진단방법을 개발하기 위해서는 결핵에 감염되지 않은 사람, 결핵에 감염되었지만 증상이 없는 사람, 활동성 결핵인 사람을 신속하고 정확하게 구분할 수 있는 것이 요구된다[3].

가. 임상적 진단

임상적 진단은 체중감소, 객혈, 무기력증 등과 같은 임상적 징후와 흉부 X 선 촬영에 의해 이루어진다. 그러나 이와 같은 임상적 진단은 비특이적인 요소가 많으며, 방사선 소견이 판독하는 사람에 따라 다양하여 다른 폐 질환과 혼돈 되는 경우가 많고, 초기 환자를 진단하기에 어려움이 많다[4].

나. 미생물학적 진단

(1) 객담 결핵균 도말 검사: 객담 도말 검사는 검사 방법이 간단하고 신속하게 결과를 얻을 수 있어 실험실 검사법으로 가장 널리 이용되고 있다. 그러나 객담 1 ㎖당 균 수가 최소 5×10^3 의 균이 있는 경우에만 검출이 가능하며 민감도가 떨어지는 문제점이 있다[5].

(2) 배양: 결핵을 배양하기 위해 egg-based media, Middlebrook media 7H10 또는 7H11 을 이용하거나 액체 배지에서 배양하는 방법(BACTEC) 등이 있다. 민감도가 높아 결핵 진단의 가장 기본이 되는 방법이지만, 결핵균의 증식 속도가 매우 느리기 때문에, 균 동정을 위한 생화학적 분석을 하기까지는 수 주가 걸린다는 단점이 있다. 또한 액체 배지 배양법의 경우, 시간을 상당히 단축시킬 수 있지만, 명확한 진단을 위해서는 최소 1 주가 소요된다. 게다가 비용이 상당히 많이 들고 개발도상국의 실험실에 널리 적용하기에는 기술적으로 많은 문제가 있다[6].

다. 분자 생물학적 방법

Polymerase chain reaction(PCR) 방법을 이용한 것으로서, 객담도말검사나 배양 방법의 장단점을 모두 극복하고 민감도와 특이도를 유지할 수 있는 장점이 있지만, 결핵이 많이 발생하고 있는 지역의 조건에서는 원활하게 실험을 수행하기에 어려운 점이 많으며, 고도의 기술 인력이 필요하고 비용이 많이 든다는 문제점이 있다[7]. 또한, 검체 간 오염에 의한 의양성의 위험이 높으며, 결핵의 유병률이 높은 지역에서는 배양 음성 가검물의 30~40%가 PCR 양성반응을 나타내 활동성 결핵 여부를 판정하는데 어려움이 있다[8].

라. 면역진단

(1) 투베르쿨린 반응 검사: 투베르쿨린 반응 검사는 지연형 과민면역반응을 이용하는 결핵 진단 방법으로, 100 년 가까이 널리 사용되고 있다[9]. 투베르쿨린 검사의 목적은 결핵의 감염여부를 밝히는 것으로 주로 결핵의 주요 역학적 지표인 감염률과 감염위험률을 파

악하고 예방 치료 대상을 색출하는데 이용된다. 그러나 이 방법은 지리적인 요건, 결핵균 이외의 마이코박테리아에의 노출 여부, BCG 백신 여부 등의 요인에 영향을 받기 때문에 그 신뢰성과 특이도에 문제점이 존재한다.

(2) 혈청진단: 혈청진단방법은 비교적 간단하고 저렴하여 널리 이용될 수 있는 검사법으로 기대된다. 이를 위해 결핵에 대한 민감도와 특이도가 높은 혈청 진단학적 검사를 고안하기 위한 광범위한 노력이 몇몇 실험실의 연구자들에 의해 이루어지고 있다 [5]. 혈청 검사법은 혈청에서 결핵균 항원에 대한 항체를 검출하는 것과 객담이나 뇌척수액에서 결핵균 항원을 검출하려는 것으로 연구되어져 왔다. 결핵균에 대한 항체 검출은 결핵균 항원의 특이도에 따라 그 결과의 유용성이 좌우되고, 현재까지의 수많은 연구에도 불구하고 항원의 종류에 관계없이 민감도와 특이도에 일관성 있는 결과를 얻지 못하고 있다. 이것은 연구 대상인 결핵 환자와 질병과의 다양한 연관성 뿐만 아니라 결핵의 진단 방법 기준 및 혈청 채취 시점, 항체 검출 방법의 민감도에 따라 그 결과가 모두 다를 수 있기 때문이다. 이러한 다양성은 단일 항원을 이용한 혈청진단을 방해하는 중요한 요인이 된다. 따라서 이를 개선하기 위해 최근에는 다양한 항원을 동시에 사용하는, 즉 cocktail 항원을 이용하여 혈청진단의 민감도를 향상시키는 방법들이 연구되어지고 있다 [10].

3. 면역진단을 위한 결핵균 항원과 항체의 발굴

현재 38 kDa lipoglycoprotein[11], MTC28[12], MPT32[13], MPT81[14], CFP10[15], MTB48[16], 19 kDa[17] 항원과 같은 많은 결핵 항원이 신속한 혈청학적 진단의 개발을 위해 검사되어져 왔다. 민감도와 특이도가 높은 결핵의 혈청진단방법의 개발을 위해서는 몇 개의 유전자 재조합 항원 또는 중요한 항원 결정기를 포함한 융합 단백질들이 필요하다. 왜냐하면 감염된 환자 개개인의 다양한 항원인식의 유전적 배경, 결핵균의 특이한 항원에의 노출, 균의 양, 환자의 건강 및 개개인의 치료 등의 요인에 의해 혈청 진단 결과가 매우 다양한 성향을 나타내기 때문이다[18].

그럼에도 불구하고 결핵의 혈청진단의 유용성에 대한 가능성은 98% 이상의 매우 높은 특이도를 보이는 38 kDa(PhoS)단백질을 이용한 진단 결과에 의해 보여졌다[9, 19]. 이는 결핵의 활동성, 재발성, 만성 환자의 감염 초기에 38 kDa 항원에 대한 항체가 발견되었다는 보고로 유추할 수 있다[19]. 또한 혈청진단에 이 항원을 사용했을 경우 높은 특이도를 보이는 것과는 반대로 다른 그룹 간에 45~80%로 매우 넓은 범위의 수치의 민감도를 나타낸다는 문제점이 보고되었다[20]. 최근 보고된 바에 따르면 결핵균의 culture filtrates 내에 존재하는 100 개 미만의 단백질 중에서 단지 26~28 개의 단백질만이 38 kDa 에 대해 항체를 갖는 활동성 결핵 환자에서 반응을 보였고, 38 kDa 에 대한 항체가 결핍된 환자는 culture filtrates 단백질의 subset 과 반응을 보인다고 했다[21]. 따라서 이러한 항원의 subset 은 38 kDa 단백질 또는 활동성 결핵 환자에서만 분비되는 항체에 반응하는 다른 항원보다 훨씬 높은 민감도를 제공

하는 항원으로 기대할 수 있다. 이렇게 결핵의 혈청진단의 특이도와 민감도를 높이는 데에 유용할 것으로 보이는 subset 은 Ag85C, MPT32, 88 kDa, MPT51 등으로 보고되고 있다[13]. 이외에도 유전자 재조합 항원인 rMTB48 과 r38 kDa 은 전반적인 민감도가 도말 양성 및 음성 환자에서 각각 30.7%와 44.8%로 나타났으나, 이 두 항원을 조합했을 경우에는 57.4%로 민감도가 높아진 것이 확인되었다. 이로 보아 MTB48 은 매우 높은 보존적 항원으로서 이것의 혈청학적 반응을 보았을 때 결핵균 감염의 검출에 있어서 38 kDa 항원을 보충할 수 있다고 할 수 있다[16].

이처럼 높은 특이도를 보이는 38 kDa 항원을 보충하여 38 kDa 항원만 사용하였을 때보다 민감도를 높일 수 있는 항원들을 발굴하여 결핵 진단에 이용하는 것이 혈청진단방법이 실용화되기 위해 필요하다.

4. 결핵 균주들의 유전적 다형성

Mycobacterium tuberculosis complex 는 그 유전체의 염기서열과 16s rRNA 서열이 99.9%의 유사성을 보임에도 불구하고 [22, 23], 숙주특이성과 병독성에 있어서 많은 차이를 보인다. 이러한 표현형의 차이에 대한 유전적인 배경을 밝혀내기 위해서는 각 균주들에 대한 비교유전체 연구가 필수적이다. 이미 1998 년에 이루어진 결핵균 표준 균주인 H37Rv 의 유전체 분석결과와 최근에 미국에서 집단 발병을 일으킨 임상 분리 균주인 CDC1551 균주 [24] 의 유전체 비교분석에 의하여 두 균주 사이에 여러 개의 large-sequence polymorphisms (LPSs)와 single-nucleotide polymorphisms

(SNPs)가 존재함이 밝혀졌지만, 이러한 유전적 다형성과 결핵 균주들의 발병력과의 관계성을 정의할 수 있는 분자적인 기반연구는 아직 미흡한 실정이다[24, 25].

현재 결핵을 진단하는 데에는 결핵균의 유전체를 이용하는 방법이 존재한다. 결핵균의 유전체에는 균종 특이적인 동일한 DNA 절편이 여러 개 존재하는데, 이 중 일부는 mobile genetic element 인 insertion sequence (IS)로 알려졌다[26, 27]. 이러한 IS element 들은 그 수와 위치가 균주에 따라 다르고, 같은 균주 내에서 배양을 하더라도 그 안정성이 유지되기 때문에 IS 를 이용하여 restriction fragment length polymorphism (RFLP)을 확인하면 같은 균주인지 여부를 확인할 수 있다[28]. 특히 IS*6110* 이 *M. tuberculosis* 에만 존재한다고 알려져 있어 결핵의 진단에 이용되고 있다[26, 27].

그러나 결핵 균주들 사이의 보다 정확하고 포괄적인 유전적 다형성의 연구를 위해서는 균주들에서 차이를 보이는 부위의 염기서열을 확보하고 유전자의 삽입 및 결손을 모두 비교 분석해야 한다. 만약 특정 유전자에 염기 서열의 삽입 혹은 결손이 일어난다면 이로 인해 유전자의 산물이 영향을 받을 수 있고 결과적으로 결핵 균주들 간에 발현되는 항원의 종류가 다양해지는 가능성을 생각해 볼 수 있기 때문이다. 이런 전제로 다양한 결핵 균주에 대한 특이적인 항원을 탐색하게 되면 이를 혈청진단의 특이도 뿐 아니라 민감도까지 향상시킬 수 있는 진단 방법을 개발하는 데에 단서로 이용할 수 있다.

5. 국내 임상 분리 균주 결핵균 K 균주

최근 한국에서 결핵 환자들로부터 분리된 임상 균주들을 IS*6110* 을 이용한 RFLP양상을 기준으로 분류하였을 때, 독특한 RFLP 양상을 보이는 균주들 중 가장 높은 빈도로 발견되는 집단의 대표적인 균주를 K 균주라 명명하였다 [28]. K 균주는 국내의 임상 균주에서 가장 높은 빈도로 발견될 뿐 아니라 고등학교에서의 집단발병에 관련이 있다는 점으로 볼 때, 발병력이 다른 집단의 균주들보다 높을 것으로 추측된다. K 균주의 유전체 염기서열의 sequencing이 최근에 완료되었고 이를 표준 균주인 H37Rv의 유전체 염기 서열과 비교해보았을 때 열 개 이상의 염기서열이 삽입된 154 가지 경우와 열 개 이상의 염기서열이 결손된 188 가지 경우를 확인할 수 있었다. 특히 단백질을 생산할 것이라고 추정되는 open reading frame (ORF)내에서 주로 3 의 배수의 염기 서열로 삽입 혹은 결손이 일어났음을 확인하였는데 그 유전자들은 주로 기능이 알려지지 않았거나 transposase, 주로 결핵균의 면역적인 특이성과 다양한 항원성을 제공하는 단백질을 생산한다고 보고되어진 PE, PPE family[29, 30, 31] 에 속하는 것으로 나타났다. 이렇듯 유전자 내의 염기서열의 삽입 혹은 결손으로 ORF가 변이되어 단백질의 생산이 도중에 종결될 수 있고 유전자 내의 몇몇의 아미노산의 삽입 혹은 결손이 유전체의 기능에도 영향을 미칠 것이라고 추정된다.

또한 K 균주에서 분비되는 단백질들을 two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE PAGE)으로 분석하였을 때 H37Rv 보다 상대적으로 많이 분비되는 8 가지의 단백질들을 확인할 수 있었고 [32], 이들 중 Rv3874 는 혈청학적 진단에 유용한 항

원으로 제시된 바 있었다[32].

이와 같은 사실들을 바탕으로 국내의 임상 균주에서 가장 높은 빈도로 발견되는 K 균주에서 결핵 진단에 유용한 항원들을 발굴하여 이를 기존의 결핵의 혈청 진단 항원과의 cocktail 항원으로 이용하게 되면 혈청진단의 특이도와 민감도 모두를 높일 수 있음이 기대된다.

6. 연구 목적

본 연구에서는 결핵균의 혈청진단의 특이도와 민감도를 향상시키기 위한 항원 단백질의 탐색을 최종적인 연구 목적으로 하였다. 특히 국내 임상분리 균주에서 가장 높은 빈도로 분리되고 있는 K 균주에 면역적인 특이성을 갖는 항원을 탐색하고 이를 결핵 항원들과 조합하여 cocktail 항원으로 이용하였을 때의 유용성을 제시하고자 하였다. 이를 위하여 K 균주의 유전체 염기서열 분석 결과와 2-DE PAGE 분석 결과에서 후보 유전자를 선택하여 재조합 항원 단백질들을 얻고자 하였다. 이 단백질들에 대하여 혈청 검사를 통하여 그 유용성을 평가하였을 때 기대되는 결과는 앞서 언급한 바와 같이 38kDa 단백질과 MPT48 과의 cocktail 항원이 혈청진단의 민감도를 증가시키는 것과 마찬가지로 국내 결핵 환자들의 혈청진단 검사 결과를 향상시키는 것이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험재료

가. 사용 균주와 plasmid

실험에 사용된 균주와 plasmid 목록은 표 1 에 정리되었다.

나. 효소 및 시약

DNA polymerase 는 Solgent 사 (Daejeon, Korea) 제품을 사용하였고, 제한 효소 *Nde* I, *Bam*H I, *Eco*R I 는 DCC-BIONET (Sungnam, Korea.) 제품을 사용하였다. T4 DNA ligase 는 New England Biolabs (Beverly, MA, U.S.A.)에서 구입하였다. Ampicillin 은 Amersharm Biosciences AB (Uppsala, Sweden)에서, Chloramphenicol 은 Novagen (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. 그 외의 시약들은 Sigma 제품 (St. Louis, MO, U.S.A.)과 실험실에 구비되어 있는 양질의 시약들을 사용하였다.

2. 실험방법

가. 연구 대상 유전자의 선정

결핵균 K 균주와 결핵균 표준 균주인 H37Rv의 염기 서열을 비교하여 각 균주의 유전체 사이에서 열 개 이상의 염기서열이 삽입된 부위를 확인하고 K 균주를 H37Rv 균주와 비교하였을 때 3 의 배수의 염기 서열이 하나의 ORF내에서 삽입이 일어나더라도 해독이 종결되지 않는 것들을 선택하였다. 그리고 단백질 분석 프로그램

표 1. 실험에서 사용된 plasmid

plasmid	description	Reference 혹은 source
pTS303	pET32a with *M. tuberculosis* Rv0652 gene; Amp^r fused with the 109-a.a thioredoxin protein	Proteom Tech Inc.
pTS304	pET32a with *M. tuberculosis* Rv3648c gene; Amp^r fused with the 109-a.a thioredoxin protein	Proteom Tech Inc.
pTS305	pRSET with *M. tuberculosis* Rv3369 gene; Amp^r	Proteom Tech Inc.
pNTSP	pRSET fused with with alpha-synuclein 114-140 amino acid	ATGen Co.
pTS301	pNTSP with *M. tuberculosis* Rv1899c gene; Amp^r	this study
pTS302	pNTSP with *M. tuberculosis* Rv2407 gene; Amp^r	this study

SignalP 3.0 (http://www.cds.dtu.dk/services/SignalP)을 이용하여 결핵균의 분비 단백질이 가지고 있어야 하는 signal sequence의 존재 여부를 확인하였다. 또한 transmembrane domain의 존재 여부를 확인하기 위하여 DAS (http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/)와 HMMTOP (http://www.enzim.hu/hmmtop/)등을 이용하였다.

나. K 균주 단백질의 유전자 클로닝 및 발현

(1) K 균주 단백질 발현을 위한 벡터

재조합 단백질의 과발현을 위한 벡터로 T7 promoter를 이용하여 발현시킬 수 있는 것들을 사용하였다. pRSET벡터의 N-terminal에 alpha synuclein의 전체 아미노산의 114번째부터 140번째의 22개의 아미노산을 결합시킨 pNTSP벡터[33] 를 이용하였고, 이는 ATGen에서 제공되었다. 이 벡터를 이용하여 대상 유전자를 클로닝하고, 과발현시킨 단백질은 metal chelation chromatography를 이용하여 정제할 수 있었다.

(2) K 균주 단백질의 유전자 클로닝

새로운 K 균주의 재조합 단백질을 얻기 위해서 일반적인 클로닝 방법을 수행하였다. PCR에 사용된 primer는 표 2로 나타내었다. PCR을 위한 K 균주의 DNA는 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)을 사용한 방법에 의해 준비하였다[34]. PCR을 수행하기 위하여 20 ng의 K 균주의 genomic DNA, 12.5 mM dNTP, 10 × *pfu* buffer [50 mM Tris-Cl, 15 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.1 ㎎/㎖ BSA, 0.5% DMSO, pH8.0](Solgent Co.), 20 μM forward primer, 20 μM reverse primer, 0.5×~2.0× Band Doctor (Solgent

Co.), 그리고 2.5 U *pfu* DNA polymerase (Solgent Co.)를 넣고 증류수로 최종 반응 용량을 50 ㎕로 맞추었다. PCR은 95℃에서 5분 동안 pre-denaturation시킨 후, 95℃에서 20초간 denaturation하고 증폭시키고자 하는 각 유전자에 대한 primer들의 해당 Tm에서 30초간 annealing, 72℃에서 2분 동안 extension을 30 cycles동안 수행하였다. pNTSP에 클로닝 하고자 하는 유전자의 primer를 제작할 때에는 3' 말단에 6개의 His tag를 삽입하여 후에 metal chelation chromatography로 정제 가능하게 하였다.

PCR이 끝난 후에는 그 산물을 1% agarose gel에 전기영동하여 합성된 DNA단편을 확인하고, PCR purification kit (Solgent)를 이용하여 DNA을 정제하였다. 정제된 PCR산물과 pNTSP 벡터는 제한효소 *Hin*dⅢ, *Bam*H I으로 37℃에서 1시간 30분 동안 반응시킨 후에 1.5% agarose gel에 전기영동하고 Gel Extraction kit (Solgent)을 이용하여 DNA를 정제하였다. 클로닝 벡터와 PCR 산물을 연결시키기 위하여 DNA 단편들을 60℃에서 5분간 가열시킨 다음, 10× T4 DNA ligase buffer와 T4 DNA ligase를 첨가하여 10 ㎕의 반응물을 만들었고, 16℃에서 16시간동안 연결반응을 수행하였다. 반응물의 5 ㎕를 *E. coli* DH5α 100 ㎕에 도입시켜 ampicillin (100 ㎍/㎖)이 포함된 LB 평판 배지에 도말하고 37℃에서 16시간 동안 배양하였다. 얻어진 집락들은 같은 농도의 ampicillin이 포함된 LB 액체 배지에 접종하여 37℃에서 호기성 조건으로 8시간 동안 배양한 다음, Plasmid Miniprep kit (Solgent)를 이용하여 DNA를 정제하였다. 삽입된 유전자는 제한 효소로 잘라서 삽입된 DNA 단편을 다시 확인하고 외부기관에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다.

표 2. Rv1899c와 Rv2407 클로닝을 위한 primer 염기서열

target protein	primer sequences*
Rv1899c	Forward 5'- CGCACGGATCCCGCTGCCCCGCCTAT-3' Reverse 3'- GGTCAGAATTCCTAGTGATGGTGATGGTGATG CCGTCGAGCGGTATCT-5'
Rv2407	Forward 5'- AGGATGGATCCATGCTTGAGATCACGTTGCT-3' Reverse 3'- GTCGGGAATTCCTAGTGATGGTGATGGTGATG GCGCCGCGGGTGCA-5'

*밑줄로 표시한 GGATCC는 *Bam*HI, GAATTC는 *Hin*dⅢ의 염기서열을 나타내고, GTGATGGTGATGGTGATG는 6개의 histidine을 coding하는 염기서열을 나타낸다.

(3) 재조합 단백질의 과량 발현과 정제

목적 유전자가 클로닝된 단백질 발현 plasmid를 *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3)pLysS에 도입하여 *E. coli* BL21(DE3)은 ampicillin (100 ㎍/㎖)이 포함된 LB 평판 배지에, *E. coli* BL21(DE3)pLysS은 ampicillin (100 ㎍/㎖), chroramphenicol (34 ㎍/㎖)이 포함된 LB 평판 배지에 도말하고 37℃에서 12시간 동안 배양하였다. 얻어진 형질 전환체를 항생제를 포함하는 3 ㎖의 LB 액체 배지를 이용하여 37℃에서 하루 동안 배양한 후, 배양된 균 1 ㎖을 15 ㎖의 LB 액체 배지에 옮겨서 호기적 조건으로 37℃에서 $O.D_{600}$ 이 0.5~0.6에 이를 때까지 배양하였다. 과량 발현할 세균 배양액에 최종 농도 0.5 mM isopropyl-ß-D-1-thiogalactoside (IPTG)를 넣고 3시간 동안 단백질 발현을 유도하였다. 원심 분리하여 얻은 대장균은 20 mM Tris-Cl [pH8.0]에 재현탁 하였다 (10배 희석한 배양액의 OD_{600}가 0.25일 때 800 ㎕의 20 mM Tris-Cl [pH8.0]을 사용한다). 재현탁한 균 250 ㎕과 BugBuster protein extraction reagent (Merck, Darmstadt, Germany) 250 ㎕을 섞어 상온에서 20분간 둔 후에, lysis시킨 시료 중 전체 세포 단백질 확인을 위해 250 ㎕를 남기고 나머지를 4℃에서 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후에 얻어진 상층액은 수용성 단백질 확인하기 위한 시료로 하고, 침전물은 250 ㎕의 20 mM Tris-Cl [pH8.0]에 풀어 불용성 단백질 시료로 하였다. SDS-PAGE를 통해 과발현하지 않은 균체, 과발현한 균체의 전체 세포 단백질, 수용성 단백질 및 불용성 단백질을 분석하였고 단백질의 발현과 발현된 단백질의 수용성 여부를 확인하였다.

본 연구에서는 수용성 단백질을 대량으로 확보하기 위해 봉

입체가 존재할 경우에는 단백질의 발현온도를 37℃에서 16℃로 낮추어 수용성 단백질의 과량 발현을 유도하였다. 수용성 단백질을 과량발현 시킬 수 있는 조건을 결정한 후에는 균체 배양액의 부피를 늘여서 재조합 단백질의 대량 발현을 유도하였다.

Rv2407의 정제를 위하여 pNTSP으로 형질 전환시켜 *E. coli* BL21(DE3)pLysS에서 과량발현 하였다. 형질 전환체를 LB 액체배지를 이용하여 37℃에서 호기적인 조건으로 12시간 배양하고, 배양된 균들은 50 ㎖의 LB 액체 배지에 옮겨 37℃에서 3시간 배양하였으며, 이것을 500 ㎖의 LB 액체 배지에 옮겨 37℃에서 $O.D_{600}$이 0.5가 되었을 때 최종농도 0.5 mM의 IPTG를 넣어 16℃에서 16시간동안 수용성 단백질을 과량발현 하였다. 대량으로 키운 균을 4℃에서 4,000 rpm으로 20분 동안 원심 분리하여 회수하고, 20 mM Tris-Cl [pH8.0] 40 ㎖에 재현탁 하였다. 이를 초음파 분리기로 균체를 파괴시킨 후 4℃에서 13,000 rpm으로 30분 동안 원심분리하여 상층액만 취하여 6× His tag에 친화력이 있는 50%(v/v) Ni-NTA His・Bind resin (Merck, Darmstadt, Germany) slurry 1 ㎖을 넣고 4℃에서 1시간 이상 반응시켰다. 20 mM Tris-Cl [pH8.0], 20 mM imidazole, 300 mM NaCl로 50 ㎖씩 6번 씻어 resin에 결합되지 않은 단백질을 제거하였고 syringe column에 packing하여 20 mM Tris-Cl [pH8.0], 200 mM imidazole, 300 mM NaCl로 3 ㎖씩 단백질을 정제하였다. 얻어진 단백질은 20 mM Tris-Cl [pH8.0] 완충용액에 투석한 후 SDS-PAGE상에서 확인하였다. 단백질은 bovine serum albumin (Amersharm Biosciences AB, Uppsala, Sweden)을 표준단백질로 하여 Bradford 방법으로 정량하였다.

Rv1899c을 준비하기 위하여 Rv2407과 동일하게 과량 발현시켰다. 보다 높은 순도의 단백질을 얻기 위하여 6 M urea를 포함한 완충용액으로 4℃에서 약 1시간 동안 저속 반응하여 단백질을 용해시켰고 Ni-NTA resin으로 정제하였다. 정제한 단백질은 SDS-PAGE상에서 확인하였다.

Rv0652와 Rv3648c는 pET-32a에 형질전환 되었고, *E. coli* BL21(DE3)를 사용하여 위의 단백질을 과량발현하는 동일한 방법으로 수용성 단백질을 정제하였다. 그 후에 MonoQ column (MonoQ 5/50 GL; Amersharm Biosciences AB.)을 통한 ion-exchange chromatography를 수행하였다. 20 mM Tris-Cl [pH7.0]에서부터 20 mM Tris-Cl [pH7.0], 1 M NaCl까지 20 ㎖로 gradient를 주어 500 ㎕씩 단백질을 분리해내었다. 목적 단백질이 존재하는 fraction을 모아 SDS-PAGE로 분석하고 역시 같은 방법으로 냉장보관 하였다.

Rv3369는 pRSET에 형질전환 되었고 역시 *E. coli* BL21(DE3)를 사용하여 과량발현 시켰다. 이 단백질은 위의 단백질들과는 달리 전체 단백질 중 아주 많은 부분이 SDS-PAGE상에서 불용성 단백질임을 확인하였다. 위와 동일한 방법으로 대량으로 키운 균체를 원심분리하고 침전물을 얻었고, 6 M urea를 포함한 완충용액으로 4℃에서 약 1시간 동안 저속 반응하여 단백질을 용해시켰고 Ni-NTA resin으로 정제하였다. 그리고 MonoQ column로 정제할 때 20 mM Tris-Cl [pH7.0], 6 M urea에서부터 20 mM Tris-Cl [pH7.0], 1 M NaCl, 6 M urea까지 gradient를 주어 단백질을 분리하였다.

최종적으로 얻어진 단백질들은 혈청 진단의 유용성을 분석

하기 위한 실험을 위하여 0.001%(v/v) thiomerosal을 처리하여 냉장보관 하였고 본 연구에서 사용된 단백질들은 표 3에 정리하였다.

표 3. 본 연구에서 사용한 유전자재조합 단백질

Antigen	Molecular mass (kDa)	Sources*
Rv0652·Trx	34	Proteom Tech Inc.
Rv3648c·Trx	27	Proteom Tech Inc.
Rv3369	16	Proteom Tech Inc.
Rv1899c	35	this study
Rv2407	31	this study
Rv0652	15	KIT
Rv3648c	8	KIT
Rv0934 (38 kDa)	38	SD Inc.
Rv2031c(16 kDa)	16	SD Inc.

*Proteom Tech Inc., Seoul, Korea.

KIT : Korea Institute of Tuberculosis, Seoul, Korea.

SD Inc. : Standardia Diagnostics, Inc., Suwon, Korea.

다. 면역진단

(1) 혈청

균 배양 및 임상적으로 확인된 결핵 환자 중에서 RFLP 결과가 K 균주로 분류된 환자의 혈청을 사용하였으며, 건강 대조군으로는 건강 진단 시, 흉부 X-선 검사에서 결핵의 징후가 없는 건강인의 혈청을 대상으로 실험하였다.

(2) 항체 검출법 (Enzyme-linked immunoabsorbent assay, ELISA)

새로운 유전자 재조합 단백질들을 종류에 따라 그 농도를 측정하였고, 흡착완충용액 carbonate-bicarbonate buffer [pH9.6]에 희석한 다음 100 ㎕을 96 well ELISA plate (Corning, NY, U.S.A)의 각 well에 넣은 다음 습한 용기에 담아 4℃에서 18시간 동안 흡착시켰다. 흡착이 안 된 항원 용액은 PBS-0.05% Tween 20 (PBST)용액으로 3번 씻어내고, PBST-5% normal goat serum (PBST-NGS)용액을 200 ㎕씩 각 well에 넣고 37℃에서 1시간 동안 blocking시켰다. Blocking 용액은 털어내고 PBST-5% NGS 용액에 300배로 희석시킨 혈청을 100 ㎕씩 well에 넣은 다음 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 되지 않은 혈청은 PBST 용액으로 4번 씻어낸 후 PBST-NGS 용액에 peroxidase-conjugated anti-human IgG (Calbiochem, CA, U.S.A.)를 10,000배로 희석시키고 이 중 100 ㎕씩 넣고 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 PBST 용액으로 4번 씻어내고 기질 용액인 o-phenylene-diamine (OPD)를 100 ㎕씩 넣고 실온에서 약 15분

동안 발색 반응시킨 후 2.5 N의 H_2SO_4용액을 100 ㎕씩 넣어 발색 반응을 정지시켰다. 발색의 정도는 ELISA reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 혈청마다 2개의 well을 사용하였고 평균 흡광도를 분석에 이용하였다. 각 항원의 양성 기준 값은 건강인의 평균 흡광도에 2배의 표준 편차를 더하여 정하였다.

(3) 항체 검출의 유용성 판정

항체 검출의 유용성을 평가하는 기준은 민감도 (sensitivity)와 특이도 (specificity)로 다음과 같이 정의하였다.

(가) 민감도 (sensitivity)

각 항원별로 검사에 이용한 결핵 환자의 혈청 가운데 양성인 혈청수의 비율을 민감도로 정한다.

(나) 특이도 (specificity)

각 항원별로 건강인의 혈청 중에 항체 검사에 음성인 혈청 수의 비율을 특이도로 정한다.

진단방법의 민감도(sensitivity)와 특이도(specificity)는 다음과 같은 방법으로 나타내었다.

항체	결핵		합계
	유	무	
검사결과			
양성	a	b	a+ b
음성	c	d	c+ d
합계	a+ c	b+ d	a+ b+ c+ d

a : 양성 ; b : 의양성 ; c : 의음성 ; d : 음성

통계처리 : 민감도 (sensitivity)% = a/(a+ c) × 100

특이도 (specificity)% = d/(b+ d) × 100

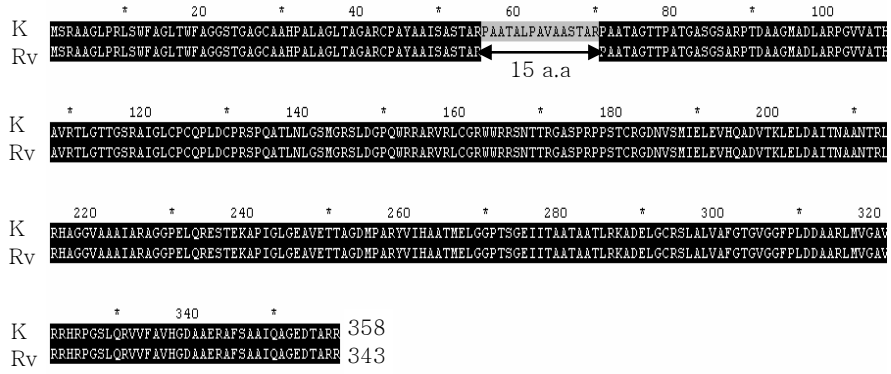
Ⅲ. 결 과

1. 연구 대상 유전자의 선정

결핵을 진단하는데 유용한 항원을 발굴하기 위하여 국내에서 가장 높은 빈도로 발견되는 K 균주를 대상으로 연구 대상 유전자들을 선정하였다. 이를 위해서 표준 균주 H37Rv와 K 균주의 염기서열을 비교한 결과 ORF내에 아미노산이 삽입되어도 해독이 종결되지 않는 21개의 유전자들을 확인할 수 있었다[35]. 이 유전자들을 대상으로 SignalP 3.0과 DAS, HMMTOP의 프로그램을 이용하여 signal peptide가 존재하거나 transmembrane domain이 존재하는지를 분석하여 Rv1899c와 Rv2407을 선택하였다. 이 두 유전자들은 각각 ORF내에 15개, 7개의 아미노산이 삽입되었지만 해독이 종결되지 않았고 (그림1), 각각 한 개의 transmembrane domain이 존재하며, Rv1899c는 signal peptide를 가지고 있다고 분석되었다. 또한 K 균주의 culture filtrate에 존재하는 단백질 중에서 표준 균주 H37Rv보다 상대적으로 많이 발견되는 Rv3369, Rv3648c (그림2)와 Rv0652를 선택하였다[32]. 이는 표준 균주 H37Rv와 염기서열을 비교한 결과 아미노산의 삽입 혹은 결손이 일어나지 않았음을 확인하였다.

위의 5가지의 유전자를 대상으로 유전자 재조합 단백질을 발현, 정제하여 항원으로서의 유용성을 평가하였다.

A. Rv1899c



B. Rv2407

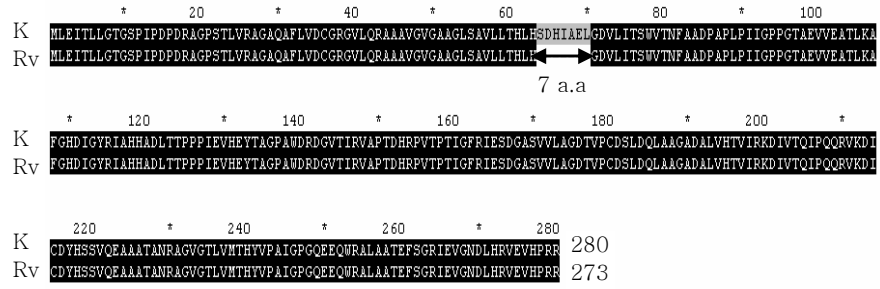


그림 1. Rv1899c, Rv2407의 아미노산 서열 분석. K 균주와 H37Rv 균주의 아미노산 서열을 비교 분석하여 ORF내에 아미노산의 삽입이 일어나도 해독이 종결되지 않은 유전자 A) Rv1899c와 B) Rv2407을 선택하였다. 아미노산 서열의 분석 결과 각각 15개와 7개의 아미노산이 삽입되어 있음을 확인하였다.

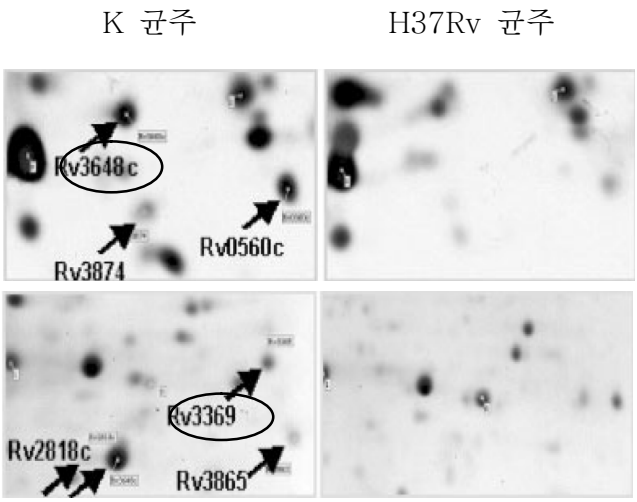


그림 2. K 균주와 H37Rv 균주의 2-DE 분석. K 균주와 H37Rv 균주의 culture filtrate을 2-DE 분석하여 K 균주에서 H37Rv 균주보다 상대적으로 많이 발견되었다고 보고된 Rv3648c, Rv3369을 선택하였다[32].

2. 새로운 K 균주의 유전자 재조합 단백질의 발현과 정제

연구 대상 유전자로 선택한 유전자들 중에서 K 균주에서 아미노산의 삽입이 확인된 Rv1899c와 Rv2407을 과량 발현시키기 위하여 T7 promoter를 포함하고 N-말단 쪽에 alpha-synuclein의 일부 아미노산 서열이 삽입(SP)되어 있는 pNTSP벡터에 클로닝 하였다. 그리고 primer를 제작할 때 Rv1899c의 signal peptide를 제거하였고, 각 유전자의 3' 말단에 histidine에 해당하는 6개의 codon을 포함시켜서 생산되는 단백질의 C-말단에 histidine tag을 갖게 하였다. K 균주의 genomic DNA을 주형으로 PCR을 하여 Rv1899c, Rv2407을 포함하는 972bp, 861bp의 절편을 증폭하였고 각각의 PCR 산물과 pNTSP벡터를 같은 제한효소로 자르고 클로닝하여 pTS301과 pTS302를 제작하였다 (그림3). 외부 기관에 의뢰하여 클로닝하여 얻은 각 plasmid내의 유전자 내에 아미노산이 삽입된 부분을 포함하여 전체 염기서열에 돌연변이는 없음을 확인하였다.

여기에 외부기관에서 얻은 plasmid들도 포함하여 *E. coli*에서 과량 발현시키고 metal chelation chromatography를 이용하여 정제하였다. Rv1899c와 Rv2407을 과량 발현시키기 위한 pTS301과 pTS302는 *E. coli* BL21(DE3)pLysS에 도입시켜 배양하였고, 0.5 mM IPTG로 16℃에서 16시간 동안 단백질 발현을 유도 시키고 cell을 깨서 Ni-NTA His・Bind resin을 사용하여 정제하였다. Rv0652, Rv3369 그리고 Rv3648c을 과량 발현시키기 위한 pTS303, pTS304 그리고 pTS305는 *E. coli* BL21(DE3)에 도입시켜 배양하여 같은 방법으로 발현, 정제하였다. 일차적으로 Ni-NTA His・Bind resin으로 정제한 후 경우에 따라 순도를 높이기 위하여 ion-exchange chromatography로 다시 정제하였다.

본 연구에서 사용한 결핵균 유전자 단백질들의 분자량과 순도를 확인하기 위하여 Rv0652, Rv3369, Rv3648c, Rv1899c, Rv2407의 5가지 단백질들과 외부기관에서 정제한 Rv0652, Rv3648c를 대상으로 SDS-PAGE 분석을 시행하였다. 그림 4는 *M. tuberculosis*의 정제된 유전자 재조합 단백질들의 SDS-PAGE 결과를 보여준다. 특히 Rv1899c와 Rv2407은 예측되는 것보다 더 큰 분자량을 보였는데 이는 각각의 단백질에 6개의 histiding tag이 첨가되어 단백질의 이동성이 변화한 것으로 생각된다. 또한 pTS303, pTS304에서 발현된 Rv0652와 Rv3648c는 thioredoxin이 결합되어 본래 단백질의 분자량보다 약 10 kDa 정도 크게 확인되었다. 유전자 재조합 단백질들의 면역 진단의 유용성을 평가하는 데에는 thioredoxin에 결합된 형태와 그렇지 않은 단백질 모두를 대상으로 하였다. 본 연구에서 혈청 진단에의 유용성을 평가하기 위한 충분한 양의 단백질이 얻어졌다고 판단되어 기존 결핵균의 항원인 38 kDa와 16 kDa을 포함하여 ELISA를 시행하였다.

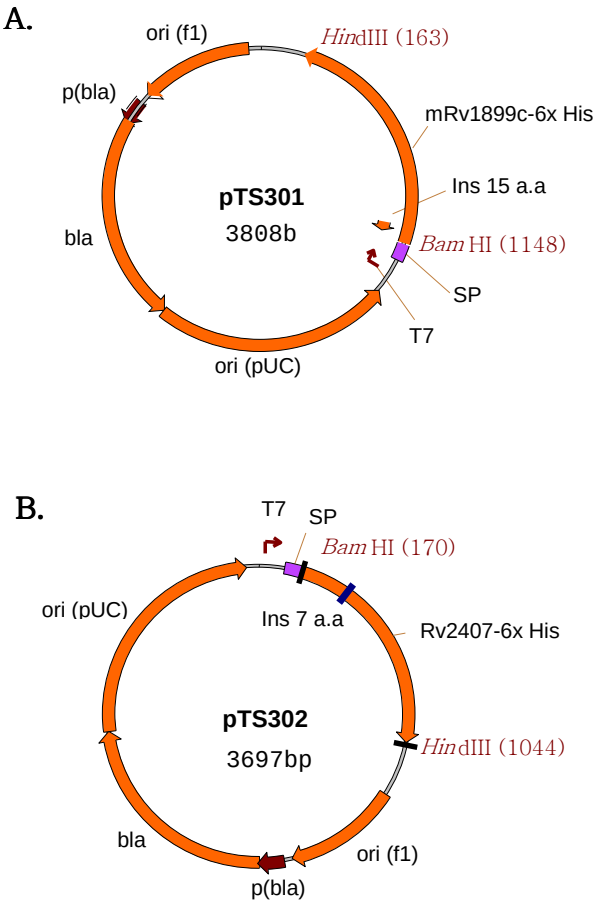
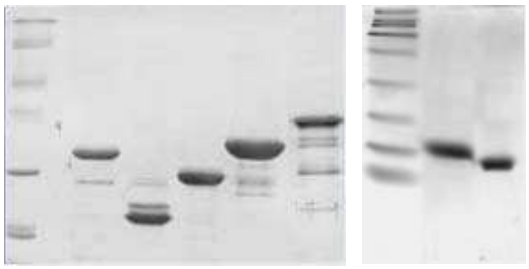


그림 3. 과량발현을 위한 Rv1899c와 Rv2407 유전자의 클로닝.

A, B의 과량발현을 위하여 3'말단에 6개 histidine의 codon을 첨가하여 T7 promoter 를 포함하는 pNTSP에 클로닝하였다. 각 유전자는 N-말단에 alpha-synuclein의 일부 아미노산 (SP)에 결합되어 발현되도록 하였다. 각 유전자의 중간에 삽입된 아미노산을 표기하였다.



M 1 2 3 4 5 M 6 7

그림 4. 결핵균 K 균주 유전자 재조합 단백질의 SDS-PAGE 분석.

새로운 결핵균 단백질을 대장균에서 과량 발현시키고 정제하여 SDS-PAGE로 확인하였다. 각 gel 사진의 첫번째 줄의 M은 broad molecular marker이다. Lanes: 1, thioredoxin와 결합된 Rv0652; 2, Rv3369; 3, thioredoxin과 결합된 Rv3648c; 4, Rv2407; 5, Rv1899c; 6, Rv0652; 7, Rv3648c.

3. K 균주의 단백질의 혈청 진단 유용성 평가

ELISA에 이용할 재조합 단백질의 최적 농도를 결정하기 위하여 예비실험을 실행하였다. 그 결과 38 kDa, Rv1899c, Rv2407, Rv3648c는 5 ㎍/㎖의 농도로, Rv0652는 1 ㎍/㎖, 16 kDa는 2 ㎍/㎖의 농도로 결정되었다. Rv3369는 예비실험에서 결핵 환자에 대해 반응을 거의 보이지 않는 것으로 나타나 평가에서 제외되었다.

K 균주의 유전자 재조합 단백질들이 혈청진단에 응용될 수 있는지의 여부를 판단하기 위하여 196명의 결핵 환자 혈청과 147명의 건강 대조군을 대상으로 하였다. 각 재조합 단백질의 양성 기준은 건강 대조군의 재조합 단백질에 대한 항체 반응 정도를 측정하여 얻어진 평균값에 표준편차의 2배를 더한 값으로 정하였다. 이들의 혈청 내의 IgG와 Rv1899c, Rv2407, Rv0652, Rv3648c의 K 균주 재조합 단백질과의 반응을 ELISA를 통해서 알아보았고 그 결과는 그림 5 ~ 그림 8으로 나타내었다. Rv1899c (그림 5), Rv2407 (그림 6)와 Rv3648c (그림 7)의 경우 결핵 환자군에서 정상 대조군에 비해 양성 기준보다 훨씬 높은 항체가를 보여 38 kDa 항원과 조합하였을 때 어느 정도의 민감도의 증가를 기대할 수 있었다. 그러나 그림 8의 Rv0652의 결과를 볼 때 결핵 환자의 혈청과 $O.D_{490}$값의 최대값이 3.0 이상으로 높은 양성반응을 보였지만 더 많은 건강 대조군의 혈청에서 $O.D_{490}$값의 최대값이 오히려 결핵 환자에서의 값보다 높은 양성 반응을 보임으로써 면역 진단으로의 유용성을 기대할 수 없었다.

한편 Rv0652와 Rv3648c는 ELISA를 실시한 결과 fusion 단백질인 thioredoxin과 결합되었는지의 여부에 상관없이 각 혈청에 대해 유사한 항체가를 보이는 것으로 나타났다.

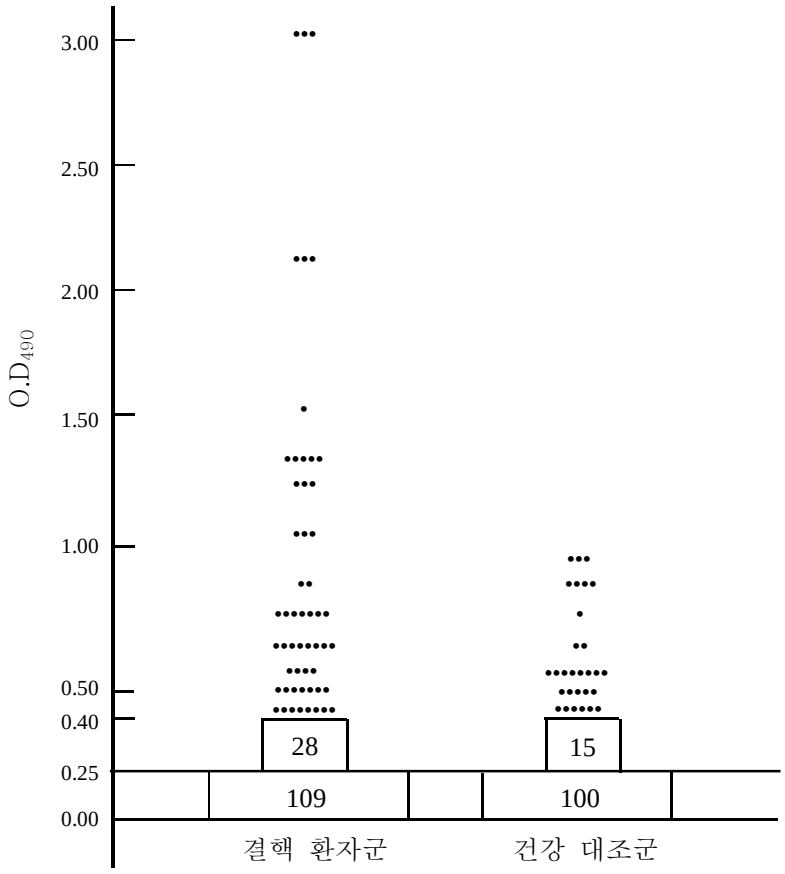


그림 5. Rv1899c 단백질에 대한 결핵 환자군과 건강 대조군의 IgG 항체 반응. Rv1899c 단백질은 5 ㎍/㎖의 농도로 coating하고 혈청은 300배 희석하였으며 HRP-conjugated anti-Human IgG는 10,000배로 희석하여 사용하였다. OPD로 발색하여 490 nm의 흡광도에서 O.D값을 측정하였다. 각각의 점은 개개인의 혈청과의 반응을 나타내고 box안의 숫자는 해당 범위 내의 혈청 수를 나타낸다 (양성기준 0.25).

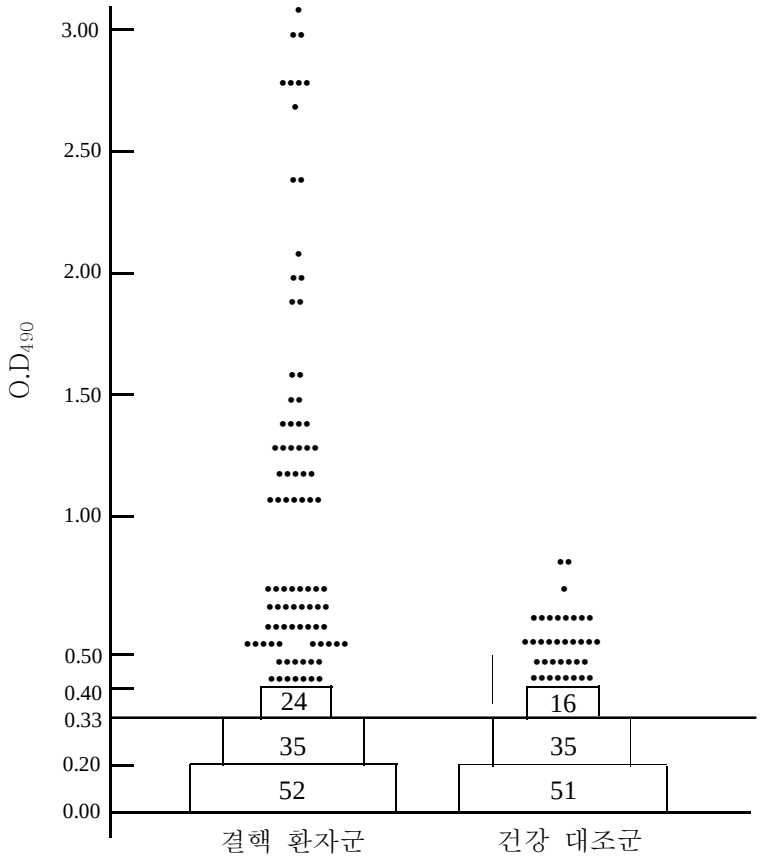


그림 6. Rv2407 단백질에 대한 결핵 환자군과 건강 대조군의 IgG 항체 반응. Rv2407 단백질은 5 ㎍/㎖의 농도로 coating하고 혈청은 300배 희석하였으며 HRP-conjugated anti-Human IgG는 10,000배로 희석하여 사용하였다. OPD로 발색하여 490 nm의 흡광도에서 O.D값을 측정하였다. 각각의 점은 개개인의 혈청과의 반응을 나타내고 box안의 숫자는 해당 범위 내의 혈청 수를 나타낸다 (양성기준 0.33).

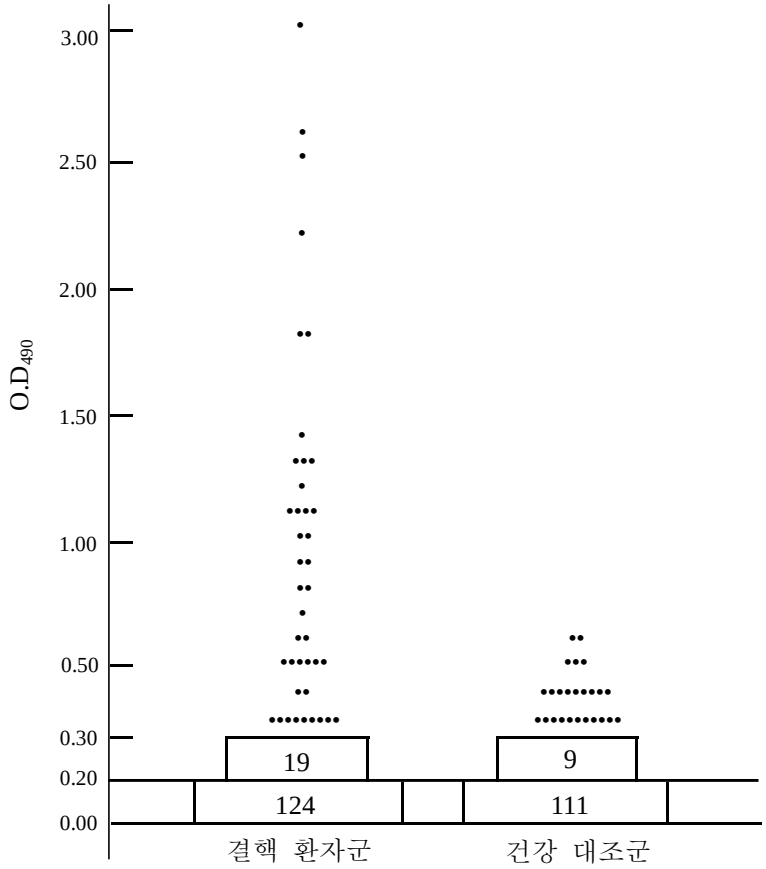


그림 7. Rv3648c 단백질에 대한 결핵 환자군과 건강 대조군의 IgG 항체 반응. Rv3648c 단백질은 5 ㎍/㎖의 농도로 coating하고 혈청은 300배 희석하였으며 HRP-conjugated anti-Human IgG는 10,000배로 희석하여 사용하였다. OPD로 발색하여 490 nm의 흡광도에서 O.D값을 측정하였다. 각각의 점은 개개인의 혈청과의 반응을 나타내고 box안의 숫자는 해당 범위 내의 혈청 수를 나타낸다 (양성기준 0.20).

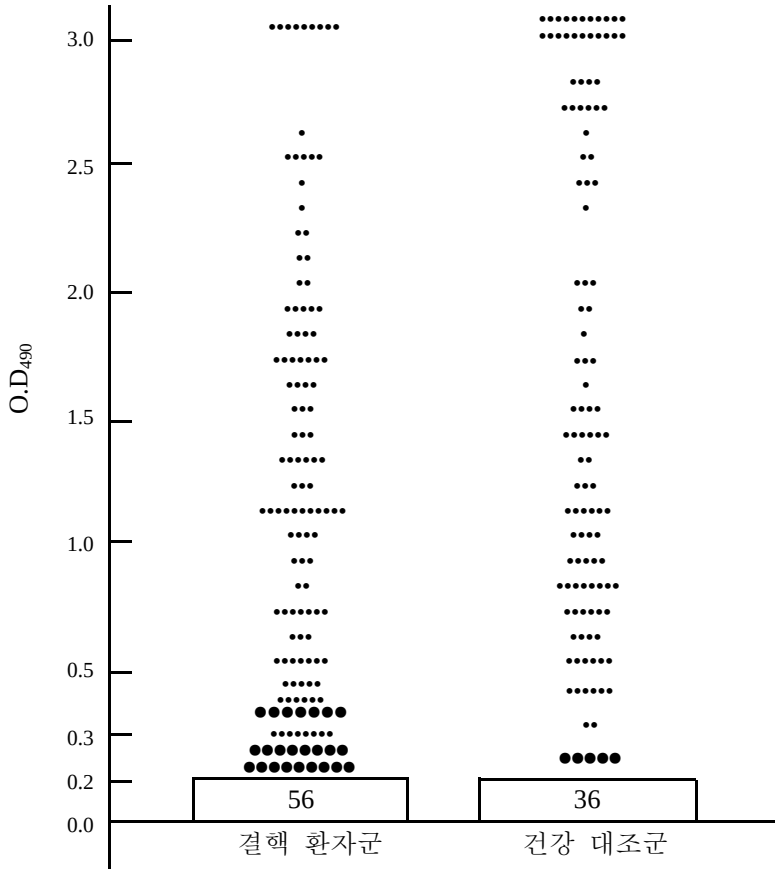


그림 8. Rv0652 단백질에 대한 결핵 환자군과 건강 대조군의 IgG 항체 반응. Rv0652 단백질은 1 ㎍/㎖의 농도로 coating하고 혈청은 300배 희석하였으며 HRP-conjugated anti-Human IgG는 10,000배로 희석하여 사용하였다. OPD로 발색하여 490 nm의 흡광도에서 O.D값을 측정하였다. 각각의 점은 개개인의 혈청과의 반응을 나타내고 box안의 숫자는 해당 범위 내의 혈청 수를 나타낸다.

4. 결핵균 항원의 항체 검출 비교 분석

결핵 환자 196명에 대해서 ELISA를 실시한 결과 95.4%에 해당하는 185명에서 최소 한 개 이상의 결핵균 유전자 재조합 단백질에 대하여 유의성 있는 항체가 검출되었다. 이는 결핵균 항원을 이용하여 일차적인 결핵 환자의 검진이 가능하다는 것을 의미한다. 결핵균 항원의 IgG에 대한 항체 검출을 비교 분석하기 위하여 각 단일 항원의 민감도와 특이도를 분석하여 표 4에 정리하였다. 실험 결과 각 항원에 대해 30.6%에서 79.2%까지의 양성 반응률을 보였고, 건강 대조군의 혈청과의 반응에서는 69.2%에서 97%에 이르는 특이도를 보였다.

현재 결핵의 혈청 진단에 사용되는 항원 중에서 단일 항원으로 이용하였을 때 높은 민감도와 특이도를 보인다고 보고되어 있는 38 kDa의 경우 41명을 제외한 79.2%에 해당하는 156명의 결핵 환자를 검출해 내었고 건강 대조군에서는 97%의 높은 특이도를 보였다. 또한 16 kDa의 경우 38 kDa보다는 낮은 51%의 민감도와 84.1%의 특이도를 보였다.

본 연구에서 준비한 Rv1899c, Rv2407, Rv3648c은 각각 40.8%, 56.5%, 30.6%의 양성 반응률을 보였고, 건강 대조군에서 71.4%, 69.2%, 76.6%의 특이도를 보여 38 kDa의 경우처럼 단일 항원만으로는 면역 진단에 사용되기에 문제가 있다고 생각된다.

5. 결핵균 유전자 재조합 항원의 조합을 통한 항체 검출

표 4에서 알 수 있듯이 38 kDa와 16 kDa의 결핵 항원을 단독으로 사용할 경우에는 민감도가 낮은 문제점이 존재한다. 이를 보완하기 위해서 다양한 유전자 재조합 항원들을 조합하는 방법을 생각

할 수 있다. 본 연구결과에서 일부 결핵 환자의 혈청은 38 kDa와 16 kDa의 주요 결핵 항원에 대한 반응보다 오히려 Rv1899c, Rv2407, Rv3648c에 대하여 더 높은 반응성을 보임을 알 수 있었다. 예를 들어 Rv1899c와 38 kDa을 조합하였을 때 어느 정도 민감도를 높일 수 있는지 여부를 분석하여 그래프로 나타내었다(그림 9). 결핵 환자 196명을 주요 결핵 항원인 38 kDa을 단독으로 하여 검사하였을 때 41명의 결핵환자를 검출해내지 못하였지만, Rv1899c와 조합하였을 때에는 양성 기준인 0.25($O.D_{490}$)을 넘는 14명의 결핵환자를 더 검출해내는 것을 확인할 수 있었다. Rv1899c 항원 뿐만 아니라 본 연구에서 사용된 Rv2407, Rv3648c을 16 kDa, 38 kDa와 조합하여 민감도가 어느 정도 향상되었는지 분석하여 그림 10으로 정리하였다. 그림에서 보듯이 38 kDa으로 검출해내지 못한 41명의 환자를 어느 하나 이상의 항원과 조합하였을 때 각 항원의 민감도가 향상되어 27명의 환자를 더 검출하였음을 알 수 있다. 이처럼 환자마다 결핵균 특이 항원에 반응하는 양상이 다르므로 한 개 이상의 항원을 조합하게 되면 민감도를 향상 시킬 수 있다는 것을 알 수 있다.

그러나 실제로 혈청진단에 이용되기 위해서는 결핵균 항원들을 조합하였을 때 민감도가 증가하는 것 뿐만 아니라 동시에 높은 특이도가 유지될 수 있어야 한다. 본 연구에서 준비한 K 균주의 Rv1899c, Rv2407, Rv3648c 항원의 특이도는 각각 71.4%, 69.3%, 76.6%정도로 낮기 때문에 38 kDa의 주요 결핵 항원과 조합할 경우 민감도는 향상되겠지만 동시에 특이도가 많이 저하되는 문제점이 우려된다. 그래서 각 항원의 특이도가 약 90%정도가 될 수 있도록 양성 기준을 정하였다. 그 결과 Rv1899c, Rv2407, Rv3648c 항원

표 4. 결핵 환자와 건강 대조군의 IgG 항체 반응

Antigen	TB patients (196)	Healthy controls (147)
	Seropositive %*	Seronegative %**
Rv0934 (38 kDa)	79.2	97.0
Rv2031c(16 kDa)	51.0	84.1
Rv1899c	40.8	71.4
Rv2407	56.5	69.3
Rv3648c	30.6	76.6

* sensitivity.
** specificity

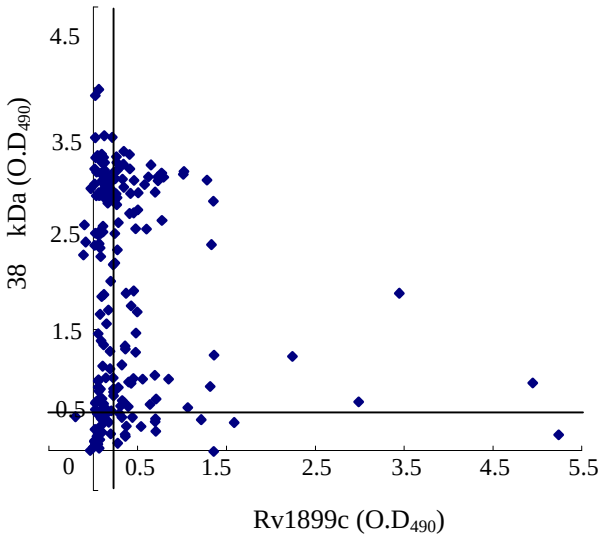


그림 9. 결핵 환자에서 38 kDa와 Rv1899c 항원에 대한 IgG 항체 반응의 비교. 각각의 점은 개개인의 혈청을 나타낸다. 38 kDa의 양성기준인 0.45에 미치지 못하여 검출하지 못했던 41명의 환자를 Rv1899c와 조합하면 양성기준인 0.25를 넘는 14명의 환자를 더 검출해 낼 수 있다.

의 양성기준이 그림 5~그림 7의 결과와는 달리 높아졌고 이를 38 kDa, 16 kDa의 결핵 항원들과 조합하였을 때에 38 kDa 단일 항원으로 검출 할 때보다 민감도가 어느 정도 향상되는지 분석하여 그림 11에 나타내었다. 41명의 환자들 중에서 21명은 어느 항원으로도 검출되지 못했지만 Rv1899c, Rv2407, Rv3648c와 조합하였을 때 각각 8명, 6명, 3명의 환자를 더 검출해 낼 수 있었다. 이들 항원이 중복하여 검출했던 12번, 34번 환자를 포함하여 38 kDa와 조합한 결과 10명의 환자를 더 검출해 낸 것을 알 수 있었다.

즉, 38 kDa 단일 항원을 사용할 때의 민감도는 79.2%였지만 이를 K 균주의 항원인 Rv1899c, Rv2407, Rv3648c와 조합하였을 때 90% 정도의 특이도를 유지하면서도 각각 87.3%, 85.7%, 85.7%으로 민감도가 향상되었다는 것을 확인할 수 있었다. 이로 미루어 K 균주의 항원을 38 kDa 등의 주요 결핵 항원과 조합할 경우 결핵의 혈청진단에 유용성이 있음을 알 수 있다.

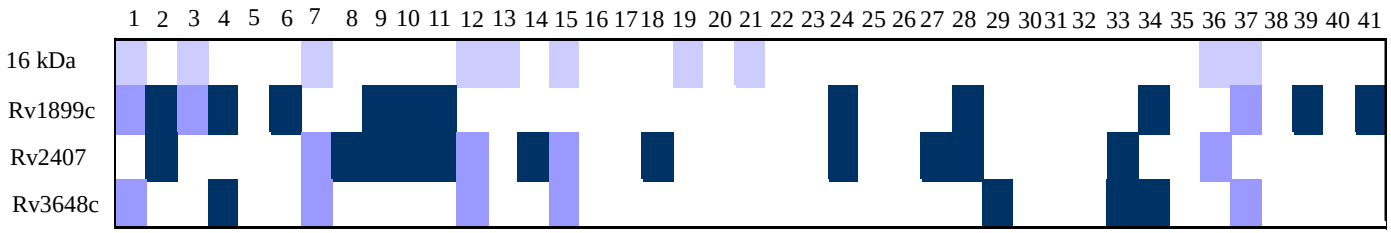


그림 10. K 균주의 유전자 재조합 항원들에 대한 결핵 환자의 다양한 항체 반응(1). 38 kDa 단일 항원으로 검출되지 못한 41명의 환자를 대상으로 16 kDa의 결핵 항원을 포함한 K 균주의 항원과 조합하였을 때의 IgG 반응을 ELISA으로 검사하였다. 이 때 각 항원에 대한 특이도는 고려되지 않았다. 각각의 네모칸 하나는 한 개의 혈청을 나타낸다. , 16 kDa의 결핵 항원에 의해 검출된 결핵 환자; , 16 kDa와 함께 K 균주의 항원에 의해 검출된 결핵 환자; , K 균주의 항원에 의해서만 검출된 결핵 환자.

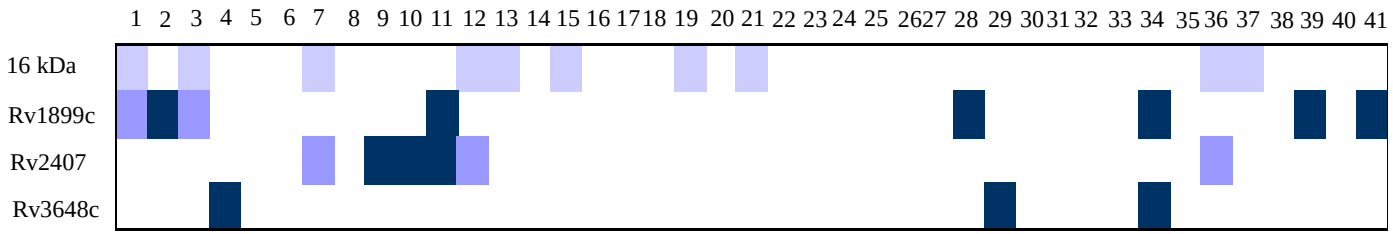


그림 11. K 균주의 유전자 재조합 항원들에 대한 결핵 환자의 다양한 항체 반응(2). 38 kDa 단일 항원으로 검출되지 못한 41명의 환자를 대상으로 16 kDa의 결핵 항원을 포함한 K 균주의 항원과 조합하였을 때의 IgG 반응을 ELISA으로 검사하였다. 이 때 각 항원의 특이도는 90%이다. 각각의 네모칸 하나는 한 개의 혈청을 나타낸다. , 16 kDa의 결핵 항원에 의해 검출된 결핵 환자; , 16 kDa와 함께 K 균주의 항원에 의해 검출된 결핵 환자; , K 균주의 항원에 의해서만 검출된 결핵 환자.

Ⅳ. 고 찰

결핵을 예비 진단하는데 혈청 검사의 활용을 기대할 수 있는 까닭은 다른 진단 방법에 비해 상대적으로 간편하고 시간이 절약된다는 장점이 존재하기 때문이다. 혈청진단은 일부 감염증의 진단에 사용되고 있는데 유전자 재조합 항원의 민감도와 특이도에 따라 그 적합성이 결정된다. 결핵 검진에 혈청학적 방법을 도입하기 위하여 몇몇 항원의 유용성이 평가되어 사용되고 있기는 하지만 그 민감도와 특이도를 모두 높이기 위해 새로운 항원을 발굴하는 노력은 계속 필요한 실정이다. 왜냐하면 결핵 환자의 항체는 다양한 결핵 항원에 반응을 보이는 특징을 가지고 있기 때문이다. 예를 들어 현재까지는 38 kDa항원이 98% 이상의 높은 특이도를 보임으로써 혈청진단에 유용한 항원으로 보고되어지고 있는데 [9, 19] 이를 MPT48과 조합할 경우에 그 민감도가 증가한다고 보고된 바가 있다[16]. 이렇듯 결핵균의 새로운 항원의 조합으로 혈청진단의 민감도를 높일 수 있는 혈청 진단법이 개발되어야 한다.

본 연구에서는 이와 같이 주요 결핵 항원인 38 kDa를 이용한 혈청진단보다 우월한 검사법을 개발하기 위하여 결핵균 K 균주에서 새로운 항원들을 탐색하여 평가하였다. K 균주는 국내에서 가장 높은 빈도로 발견되는 균주로 H37Rv 표준 균주와 비교하였을 때 염기서열분석과 2-DE PAGE 분석 결과에서 차이점이 존재함을 알게 되었다. 이를 바탕으로 아직 그 유용성이 알려지지 않은 K 균주의 Rv1899c, Rv2407, Rv0652, Rv3369, Rv3648c 유전자들을 연구 대상 유전자로 선정하고 *E. coli*에서 발현시키고, metal chelation

chromatography를 이용하여 정제하였다.

Rv1899c와 Rv2407은 H37Rv 표준 균주의 염기서열을 비교하였을 때 ORF내에 각각 15개, 7개의 아미노산이 삽입되었지만 해독이 종결되지 않았고 signal peptide 혹은 transmembrane domain을 가지고 있어 항원성을 가질 가능성이 있는 유전자이다. 보고에 따르면 혈청 진단으로서 유용성이 있는 것으로 밝혀진 MPT64, MPT51, 85A, 85B 등의 항원은 signal peptide을 가지고 있기 때문에 [36] 이들 단백질 또한 혈청학적 진단에 유용성이 있는 항원으로 기대되었다. 또한 Rv0652, Rv3369, Rv3648c는 2-DE PAGE 분석 결과에서 H37Rv 표준 균주에 비해 많이 발견되는 culture filtrate의 단백질로서 역시 연구 대상 유전자로 선택하였다.

본 연구에서 사용한 유전자 재조합 단백질들 가운데 비특이적 반응을 보인 Rv0652와 민감도가 낮았던 Rv3369를 제외한 나머지 K 균주의 항원인 Rv1899c, Rv2407, Rv3648c들은 혈청 진단 항원으로서 가능성을 보였다. Rv1899c는 결핵 환자군 196명 중 80명이 양성 기준을 넘어 40.8%의 민감도를 보였고, Rv2407의 경우 109명이 양성 기준을 넘어 51.0%의 민감도를 나타내었다. 한편 60명의 결핵 환자만이 양성 기준을 넘긴 Rv3648c의 민감도는 30.6%으로 가장 낮게 나타났다. 이처럼 K 균주의 각 항원에 대한 민감도는 단독으로 사용하기에는 낮았지만, 이를 38 kDa와 조합하여 민감도가 향상되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 결핵을 진단하는데 혈청 진단법이 상용화되려면 여러 가지 유용성이 있는 결핵균 유전자 재조합 항원들의 조합을 통해 민감도를 향상시키는 것만큼이나 높은 특이도를 유지하는 것 또한 중요하다. 보고에 의하면 38 kDa, 85C, 88 kDa을 단일 항원으로 사용했을 때 각각 100%의 특이도를 보였

지만 이들을 조합하였을 때에는 98%로 낮아지는 경우가 있어서[11] 민감도를 향상시키면서도 특이도의 감소가 최소화 될 수 있는 조합을 찾는 것이 중요하다. 그래서 본 연구에서는 Rv1899c, Rv2407, Rv3648c의 K 균주의 항원들의 특이도가 90%정도가 되도록 양성 기준을 정하였고 38 kDa와 조합하면 역시 38 kDa의 단일 항원으로 결핵 환자군을 검사하였을 때보다 각각 항원들의 민감도가 향상되었음을 알 수 있었다. 특히 16 kDa와의 조합으로 검출해낸 10명 중에서 5명의 환자는 Rv1899c, Rv2407와의 조합으로도 검출이 가능하였다. 또한 16 kDa을 제외한 K 균주의 항원들인 Rv1899c, Rv2407, Rv3648c와 조합하였을 때에는 20명의 절반인 10명의 환자를 검출해낼 수 있었다. 각 항원의 민감도가 16.4%에서 33.2%로 낮은 것을 감안하면 이 결과에 의의가 있다고 생각된다.

본 연구의 목적은 결핵의 혈청진단에 유용한 새로운 항원을 발굴해내는 것이고 특히 국내에서 가장 높은 빈도로 나타나는 임상분리 균주인 K 균주의 항원에 초점을 두었다. Rv1899c는 lipoprotein으로 알려져 있고 Rv2407는 아직 그 기능이 알려져 있지 않았는데 H37Rv 표준 균주와 비교하였을 때 ORF내에 아미노산이 삽입되어 있으며 이것이 유전자의 기능에 미치는 영향은 아직 밝혀지지 않았지만 아미노산이 삽입되어 단백질의 3차 구조가 달라질 수 있는 가능성이 존재한다. Rv3648c 역시 H37Rv 표준 균주보다 많이 발견되는 단백질로서 cold shock protein으로 알려져 있다. 이 단백질들이 K 균주에 특이적인 항원인지 보다 정확한 분석을 위해서 H37Rv 표준 균주에서도 이 유전자들을 발현시키고 그 항원성을 비교하는 연구가 필요하다.

본 연구에서는 위의 항원들 외에도 결핵의 혈청진단에 유용할

것이라고 보고되어지고 있는 PE, PPE family에 속하는 단백질에 대해서도 시도하였다. PE, PPE family는 아직 그 생물학적 기능이 알려져 있지 않지만 결핵균의 항원성을 제공한다고 보고되어지고 있다[37, 38, 39]. 예를 들어 PE family에 속하는 Rv3367 단백질은 정상인의 혈청과는 반응을 보이지 않지만 HIV와 결핵에 같이 감염되어 아직 증상이 나타나지 않은 환자의 혈청에서 반응을 보임으로써 활동성 결핵 또는 잠복기 결핵의 진단에 이용될 수 있는 가능성을 지니고 있다[37]. 또한 PPE family에 속하는 Rv1196과 Rv0915c 단백질들도 결핵균에 감염시킨 사람의 말초혈액단세포와 반응을 시켰을 때 면역 반응을 보였고, 특히 Rv0915c를 C57BL/6 마우스에 감염시키면 CD4와 CD8 T cell에 특이적인 면역반응이 유도된 것이 밝혀졌다[38]. PE family에 속하는 또 하나의 단백질 Rv1818c는 결핵균에서 아주 높은 항원성을 보이는 것으로 보고되었는데, 결핵 균주들 간의 염기서열의 다양성에 따라 그 항원성도 다양해지는 사실도 밝혀졌다[39]. 본 연구에서도 이와 같은 보고에 기초하여 PE, PPE family에 속하는 단백질들을 대상으로 K 균주와 H37Rv 균주의 유전체 염기 서열을 비교 분석해보았다. 그 결과 K 균주의 Rv1818c의 ORF내에서 3개의 아미노산이 삽입되어 있음을 알 수 있었다. 그래서 Rv1818c를 포함한 몇 개의 PE, PPE family에 속하는 유전자들을 대장균에서 발현시켜 ELISA를 실시하고자 하였으나, PE, PPE family의 특성인 높은 G, C 비율로 인하여 PCR을 통한 증폭이 용이하지 않았고, 클로닝이 제대로 되었더라도 대장균에서 발현이 확인되지 않는 문제점이 존재하였다. 여러 가지 방법들을 시도하여 이를 해결한다면 결핵 진단에 유용한 항원들을 더 발굴할 수 있을 것으로 기대된다.

현재 우리나라를 비롯한 개발도상국에서 사용하고 있는 결핵의 진단방법은 흉부X-선 촬영과 투베르쿨린 반응검사를 주로 이용하고 있다. 그러나 흉부X-선 촬영은 간접적인 방법으로서 판독하는 사람에 따라 소견이 다를 수 있으며, 다른 폐질환과 구분하기 어렵다. 또한 투베르쿨린 반응 검사는 BCG 백신을 맞은 나라에서는 50%이상이 양성 반응으로 나오며, 2-3일 후에야 양성 여부를 판단할 수 있고 다른 환경의 mycobacteria에 의한 감염과 교차반응의 문제점이 존재한다. 따라서 본 연구결과에서 제시한 바와 같이 다양한 결핵균의 유전자 재조합 항원을 조합하여 ELISA 방법을 결핵 검진에 사용한다면 신속하고 저렴하게 초기 검진에 유용할 것으로 기대된다.

본 연구결과를 요약하면 현재 혈청진단에 사용되고 있는 주요 결핵 항원인 38kDa 의외에 K 균주로부터 발현시킨 Rv1899c, Rv2407, Rv3648c의 세 가지 유전자 재조합 항원이 결핵 환자에게서 항체를 검출하는데 유용하다는 것을 제시하였다. 나아가 이 항원들을 실제로 38 kDa 등의 주요 결핵 항원과 cocktail항원으로 이용하였을 때 민감도를 증가시키면서도 특이도 저하를 최소화 시킬 수 있는 조합인지 추후 연구가 필요하다.

Ⅴ. 결 론

1. 본 연구에서는 결핵의 혈청진단에 유용한 항원을 탐색하기 위하여 국내에서 가장 높은 빈도로 발견되는 결핵균 K 균주의 단백질을 대장균에서 발현시키고 정제하였다.

2. K 균주와 H37Rv 표준 균주의 염기서열을 비교하여 ORF내에 각각 15개, 7개의 아미노산이 삽입되어도 해독이 종결되지 않은 Rv1899c, Rv2407와 H37Rv 표준 균주의 culture filtrate에서 많이 발견되는 Rv0652, Rv3369, Rv3648c를 연구 대상 유전자로 선정하였다.

3. 결핵균 환자군 196명과 건강 대조군 147명을 대상으로 ELISA를 통해 유전자 재조합 항원들과 주요 결핵 항원인 38 kDa, 16 kDa의 항체 반응을 살펴본 결과 Rv0652와 Rv3369를 제외한 각 항원에서 30.6%에서 79.2%의 민감도와 69.3%에서 97%의 특이도를 나타냈다.

4. Rv0652는 결핵 환자군 뿐만 아니라 건강 대조군에서도 높은 항체가를 보여 혈청진단에 유용하지 않은 항원으로 판단하였고 Rv3369는 결핵 환자군에서 낮은 양성 반응을 보여 역시 유용성을 기대하기 어려웠다.

5. K 균주의 항원인 Rv1899c, Rv2407, Rv3648c의 특이도를 90%

가 되게 양성 기준을 정하였을 때 그 민감도는 각각 18.4%, 33.2%, 16.4%였다. 주요 결핵 항원인 38 kDa의 경우 79.2%의 민감도와 97.0%의 특이도를 나타내었고 16 kDa 항원은 51.0%의 민감도와 84.1%의 특이도를 나타내었다.

6. 38 kDa을 단일 항원으로 사용 할 때보다 특이도 저하를 최소화 시키면서 민감도를 향상시키기 위해 K 균주의 유전자 재조합 항원인 Rv1899c, Rv2407, Rv3648c와 조합한 결과 79.2%였던 38 kDa의 민감도는 각각 87.3%, 85.7%, 85.7%로 향상되었다.

7. 주요 결핵 항원인 38 kDa와 K 균주의 항원들을 조합하면 16 kDa와의 조합으로도 검출해내지 못했던 10명의 환자를 더 찾아낼 수 있었다. 또한 16 kDa와의 조합으로 검출해낸 5명의 환자는 Rv1899c, Rv2407와의 조합으로도 검출이 가능하였다. 이로 보아 한국인에게서 많이 발견되는 K 균주의 항원을 이용하여 혈청진단에 사용할 경우 유용할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pahtania V, Raviglinoe MC. Consensus statement. Global burden of tuberculosis; estimated incidence, prevalence, and morality by country. WHO Global Survveillance and Monitoring Project. JAMA 1999;282:677-686.

2. 질병관리본부, 결핵관리지침, 2006.

3. Gennaro ML. Immunologic diagnosis of tuberculosis. Clin Infect Disease. 2000;30(suppl 3):S243-246.

4. Gordin F, Slutkin G. The validity of acid-fast smears in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Arch Pathol Lab Med 1990;114:1025-1027.

5. Daniel TM. Immunodiagnosis of tuberculosis, In W.N. Rom and S. Gatay (ed.) Tuberculosis. Little, Brown, and Company. Inc. Boston, Mass. 1996;223-231.

6. Stager CE, Libonati JP, Siddiqi SH, Davis JR, Hooper NM, Baker JF, Carter ME. Role of solid media when used in conjunction with BACTEC system for mycobacterial

isolation and identification. J Clin Microbiol 1991;29:154-157.

7. Kolk AH, Schuitema AR, Kuijper S, Van Leewen J, Hermams PW, Van Embden JD, Hartskeeri RA. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system. J Clin Microbiol 1992;31;1688-1694.

8. Richeldi L, Barnini S, Saltini C. Molecular diagnosis of tuberculosis. Eur Respir J suppl 1995;20:689s-700s.

9. Koch R. Weitere Mitteilungen uber ein Heilmittle gegen. Tuberculose Dtsh Med Wschr 1891;17:101-102.

10. Grange JM. The humoral immune response in tuberculosis: its nature, biological role and diagnostic usefulness. Adv Tuberc Res 1984;21:1-78.

11. Anderson AB, Hansen EB. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular weight protein of *Mycobacterium tuberculosis.* Infect Immun 1989;57:2481-2488.

12. Manca C, Lyashchenko K, Colangeli R, Gennaro ML.

MTC28, a novel 28-kilodalton proline-rich secreted antigen specific for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Infect Immun 1997;65:4951-4957.

13. Samanich KM, Belisle JT, Sonnenberg MG, Keen MA, Laal S. Delineation of human antibody responses to culture filtrate antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis 1998;178:1534-1538.

14. Hendrickson RC, Douglass JF, Reynolds LD, McNeill PD, Carter D, Reed SG, Houghoton RL. Mass spectrometric identification of Mtb81, a novel serological marker for tuberculosis. J Clin Microbiol 2000;38:2354-2361.

15. Dillon DC, Alderson MR, Day CH, Bement T, Campos-Neto A, Skeiky YA, Vedvick T, Badaro R, Reed SG, Houghton R. Molecular and immunological characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10, an immunodiagnostic antigen missing in *Mycobacterium bovis* BCG. J Clin Microbiol 2000;38:3285-3290.

16. Lodes MJ, Dillon DC, Mohamath R, Day CH, Benson DR, Reynolds LD, *et al*. Serological expression cloning and immunological evaluation of MTB48, a novel *Mycobacterium tuberculosis* antigen. 2001;144:3137-

3142.

17. Ashbridge KR, Prestidge RL, Booth RJ, Watson JD. The mapping of an antibody-binding region on the *Mycobacterium tuberculosis* 19 kilodalton antigen. J Immunol 1990;144:3137-3142.

18. Foulds J, O'Brien R. New tools for the diagnosis of tuberculosis : The perspective of developing countries. Int J Tuberc Lung Dis 1998;2:778-783.

19. Bothamley GH, RuddR, Festenstein F, Ivanyi J. Clinical value of the measurement of *Mycobacterium tuberculosis* specific antibody in pulmonary tuberculosis. Thorax 1992;47:270-275.

20. Espitia C, Cervera I, Gonzalez R, Mancilla R. A 38 kDa *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serological evaluation. Clin Exp Immunol 1989;77:373-377.

21. Samanich KM, Belisle JT, Sonnenberg MG, Keen MA, Laal S. Delineation of human antibody responses to culture filtrate antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis 1998;178:1534-1538.

22. Boddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blocker H,, Bottger EC. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. J Clin Microbiol 1990;28:1751-1759.

23. Sreevatsan S, Pan X, Stockerbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:9869-9874.

24. Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA, Carpenter L, White O, Peterson J *et al*. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. J Bacteriol 2002;184:5479-5490.

25. Gutacker MM, Smoot JC, Migliaccio CA, Ricklefs SM, Hua S, Cousins DV *et al*. Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. Genetics 2002;162:1533-1543.

26. Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V,

Nguyen S, Guesdon JL *et al*. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS*6110*, and its application in diagnosis. J Clin Microbiol 1990;28:2668-2673.

27. Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B *et al*. IS*6110*, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Nucleic Acids Res 1990;18:188.

28. Kim SJ, Bai GH, Lee H, Kim HJ, Lew WJ, Park YK, Kim Y. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* among high school students in Korea. Int J Tuberc Lung Dis 2001;5:824-830.

29. Singh KK, Zhang X, Patibandla AS, Chien P Jr, Laal S. Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* expressed during preclinical tuberculosis: serological immunodominance of proteins with repetitive amino acid sequences. Infect Immun 2001;69:4185-4191.

30. Skeiky YA, Ovendale PJ, Jen S, Alderson MR, Dillon DC, Smith S *et al.* T cell expression cloning of a *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding a protective antigen associated with the early control of infection. J

Immunol 2000;165:7140-7149.

31. Talarico S, Cave MD, Marrs CF, Foxman B, Zhang L, Yang Z. Variation of the *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS 33 gene among clinical isolates. J Clin Microbiol 2005;43:4954-4960.

32. Bahk YY, Kim SA, Kim JS, Euh HJ, Bai GH, Cho SN *et al*. Antigens secreted from *Mycobacterium tuberculosis*: identification by proteomics approach and test for diagnostic marker. Proteomics 2004;11:3299-3307.

33. Park SM, Ahn KJ, Jung HY, Park JH, Kim J. Effects of novel peptides derived from the acidic tail of synuclein (ATS) on the aggregation and stability of fusion proteins. Protein Eng Des Sel 2004;17:251-260.

34. Musser JM, Amin A, Ramaswamy S. Negligible genetic diversity of *mycobacterium tuberculosis* host immune system protein targets: evidence of limited selective pressure. Genetics 2000;155:7-16.

35. 김지원, Genetic polymorphisms among clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*. 연세대학교 의과학과;2005.

36. 김지수, Production and characterization of new recombinant proteins of *Mycobacterium tuberculosis* for the serodiagnosis of tuberculosis. 연세대학교 의과학과;2002.

37. Singh KK, Zhang X, Patibandla AS, Chien P Jr, Laal S. Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* expressed during preclinical tuberculosis: serological immunodominance of proteins with repetitive amino acid sequences. Infect Immun 2001;69:4185-4191.

38. Skeiky YA, Ovendale PJ, Jen S, Alderson MR, Dillon DC, Smith S *et al*. T cell expression cloning of a *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding a protective antigen associated with the early control of infection. J Immunol. 2000;165:7140-7149.

39. Talarico S, Cave MD, Marrs CF, Foxman B, Zhang L, Yang Z. Variation of the *Mycobacterium tuberculosis* PE-PGRS33 gene among clinical isolates. J Clin Microbiol 2005;43:4954-4960.

ABSTRACT

Identification of recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis* K strain for serodiagnosis of tuberculosis

Ah Reum Kim

Department of Medical science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by professor Sang-Nae Cho)

Tuberculosis (TB), a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, is one of the major public health problems in the world. In Korea, there have been over 30,000 new TB patients and approximately 3,000 deaths each year. For effective control of TB, early detection of TB is essential. However, the current diagnostic methods have some limitations such as low sensitivity for sputum smear microscopy and long turn over time for culture. Therefore, there have been numerous efforts to develop serological screening tests that are simple, rapid, and inexpensive.

In this study, to identify antigens that would improve the accuracy of serological diagnosis of active tuberculosis, the

genes encoding five potential proteins were selected based on proteomic and sequence analysis of *M. tuberculosis* K strain, the most prevalent strain in Korea. Rv1899c and Rv2407 in the K genome have amino acid insertion compared to those of the H37Rv genome, and Rv0652, Rv3369, Rv3648c proteins were more abundant in culture filtrate of K strain than that of the H37Rv strain. Each gene was cloned from the K strain genome, expressed in *E. coli* using T7 expression system, and its protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography. In addition, 38 kDa and 16 kDa antigens that had been widely used in serological tests were also included in this study.

ELISA was then employed to examine each protein for its reactivity with sera from in sera from 196 active tuberculosis patients and 100 healthy controls. Of the 196 TB patients, 185 (94.4%) had a significant level of IgG antibodies to at least one of these antigens. When cut-off was determined by adding 2 s.d. to the mean absorbance of health controls, sensitivity of Rv1899c, Rv2407, and Rv3648c proteins were 40.8%, 56.5%, and 30.6%, respectively, and specificity was 71.4%, 69.3%, and 76.6%, respectively. The Rv0652 protein was not useful due to low specificity and Rv3369 due to low sensitivity, respectively.

As expected, the 38 kDa protein gave the highest sensitivity of 79.2% and specificity of 97%. When both 38 kDa and 16 kDa antigens were used, sensitivity reached 84.1%. In order to find a combination of antigens giving the maximum sensitivity while

maintaining relatively high specificity, cut-off for each antigen was newly determined to the level giving 90% specificity. With the new cut-off value, addition of Rv1899c to 38 kDa gave a sensitivity of 87.3%. Likewise, addition of Rv2407 or Rv3648 gave a sensitivity of 85.7%. Interestingly, of 20 sera that were negative to 38 kDa or 16 kDa, 10 (50%) gave a positive reaction to Rv1899c, Rv2407 or Rv3648.

In conclusion, this study suggests that Rv1899c, Rv2407, and Rv3648c recombinant antigen of K strain may be useful for serodiagnostic tests, particularly if these antigens are combined with 38 kDa, the most widely-used antigen. It looks, therefore, promising to develop a rapid and inexpensive screening test for TB using a cocktail antigen.

Key words : tuberculosis, serodiagnosis, *M. tuberculosis* K strain, recombinant antigen