

결핵균 검출을 위한 모세관 중합효소연쇄반응의 적정조건*

계명대학교 의과대학 임상병리학교실

전효진 · 박현찬 · 전동석 · 김재룡

서 론

결핵은 세계도처에 유행하는 감염병으로서, 최근 들어서는 면역결핍성 환자의 속발성 결핵으로 인하여 관심이 고조되고 있을 뿐만 아니라, 우리나라에서는 아직도 X-선 검사상 증명된 활동성 결핵의 유병율은 1.8%로서(1990년 현재) 환자수로는 73만 명에 이르는 등 매우 중요한 감염병중의 하나이다¹⁾. 결핵의 임상병리학적인 진단방법으로서 가검물에서의 결핵균 배양검사 및 항산균 도말검사 등을 들 수 있겠으나 민감도가 매우 낮고, 배양검사는 5주 이상의 장시간이 소요되는 단점이 있으며, 특히 결핵성 뇌막염의 경우에는 뇌척수액에 매우 소량의 결핵균이 존재하므로 진단에는 많은 어려움이 있었다^{2,3)}.

따라서 보다 정확하고 신속한 결핵진단검사법의 개발은 매우 시급하다 하겠는데, 최근들어 분자생물학의 발달에 힘입어, IS6110, IS986 및 mtp40등의 결핵균 특이의 유전자가 클론화 되어 그 염기서열이 밝혀지고⁴⁻⁶⁾, 목적으로 하는 DNA만을 시험관내에서 수백만배 증폭할 수 있는 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)이 개발됨에 따라, 외국⁷⁻²¹⁾에서는 물론 국내²²⁻²⁴⁾에서도 결핵균 검출을 위한 중합효소연쇄반응검사가 활발히 시도되고 있다.

중합효소연쇄반응은 시험관내의 반응혼합물의 온도를 인위적으로 가감하는 소위 'thermocycler'에 의해 이루어지는데, 열전도방식에 따라 heating-block법, hot-air-capillary법 및 water-bath법으로 나누어 볼 수 있다. heating-block법은 가장 일반화된 방식이기는 하나 30~50 cycle의 중합효소연쇄반응을 기준해서 볼 때 검사시간이 2~6시간 소요되고, 비교적 많은 시약이 소모되는 등 일상적이 결핵진단검사에 이용하기에는 다소 문제가 있다. hot-air-capil-

lary법에 의한 중합효소연쇄반응(이하 모세관 중합효소연쇄반응)은 아직 일반화된 방식은 아니어서 검사의 적정조건이 수립되어 있지 않기는 하나, 뜨거운 공기를 이용하고 열전도가 빠른 모세관을 반응용기로 사용함으로써 반응시간이 10~30분으로 매우 짧고, 시약의 소모도 적어 결핵진단검사로서의 가능성이 있다.

이에 저자들은 FTC-2000 [대한메디칼(주), 한국]을 이용하여, 결핵균 검출을 위한 보다 신속하고 경제적인 방식인 모세관 중합효소연쇄반응법의 적정조건을 수립할 목적으로, *M. tuberculosis* H37Rv에서 추출한 DNA를 IS986영역의 시발체(primer)에 의한 2단계 nested-PCR을 실시한 결과 약간의 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 배양된 *M. tuberculosis* H37Rv로부터 염색체 DNA분리

한국 결핵연구원으로부터 분양받은 *M. tuberculosis* 균주를 Sauton배지에 2~3주간 배양한 후 수집하여 염색체 DNA를 bead-beating법²⁵⁾에 의하여 분리하였다.

분리한 DNA는 Tris-EDTA 용액(1mM Tris, pH 8.0, 0.01mM EDTA, 이하 TE 용액)으로 각각 5,000, 500, 50, 5, 0.5 및 0.25fg / ul이 되도록 회석하여 끓는물에서 10분간 처리한 다음 중합효소 연쇄반응을 위한 표적(target) DNA로 사용하였다.

2. Primers

2단계 nested-PCR에 사용된 2쌍의 시발체는 *M. tuberculosis* complex에만 특이하게 존재하는 IS986의 일부분으로서 바깥쪽 시발체는 염기서열 631~

* 이 논문은 1993년도 계명대학교 응용연구비 및 동산의료원 조사연구비로 이루어졌다.

650 및 865~875영역에 각각 해당하는 INS1 (5'-CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC-3')과 INS2 (5'-GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA-3')로서 이들 시발체에 의한 증폭산물의 크기는 245bp이다. 안쪽 시발체는 염기서열 664~683 및 832~851 영역에 각각 해당하는 Pt3(5'-GAA CGG CTG ATG ACC AAA CT-3')과 Pt6(5'-ACG TAG GCG AAC CGT GCC CA-3')으로서 이들 시발체에 의한 증폭산물의 크기는 188bp이다. 각각의 시발체는 DNA synthetizer(Model 391 PCR-Mate EP, BioTechnology, 미국)로 합성하고 PAGE법으로 정제한후 사용하였다.

3. *M. tuberculosis* H37Rv DNA를 검출하기 위한 중합효소 연쇄반응의 표준조건

결핵균 DNA의 증폭은 hot-air-capillary 방식인 FTC-2000을 이용하여 2단계 nested-PCR법으로 시행하였고 모세관 중합효소연쇄반응의 최적조건을 검색하기 위해 우선 아래와 같은 표준조건^[25, 26]을 설정한 다음 검사를 실시하였다. 일차 중합효소연쇄반응은 표 1에서와 같이 INS1 및 INS2 시발체가 함유된 master-mix 9ul과 표적 DNA 1ul를 섞은 반응혼합물 10ul을 모세관(10ul volume at 2 inch, Idaho Technology, 미국)에 주입한 후 alcohol lamp로 모

세관 양끝을 봉하였다. FTC-2000에 모세관을 장착한 후 94°C에서 10초간 pre-denaturation 시키고 annealing(45°C에서 1초)-elongation(72°C에서 10초간)-denaturation(94°C에서 1초)과정을 30cycle 반복한 다음 72°C에서 10초간 post-elongation을 실시하였다. 이차 중합효소연쇄반응은 Pt3 및 Pt6 시발체가 함유된 master-mix 9ul과 일차 중합효소연쇄반응 증폭산물 1ul를 섞은 반응혼합물 10ul을 일차 중합효소 연쇄반응과 동일한 방법으로 실시하였다. 이차 증폭산물을 gel-loading dye 1ul과 섞은 다음 1.5% agrose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하였으며, DNA size marker로는 repeats a 100bp DNA fragment(Gibco사, 미국)를 사용하였다.

4. 결핵균 검출을 위한 모세관 중합효소연쇄반응의 적정조건 검색

위에서 언급한 표준조건중 우혈청알부민(bovine serum albumin, BSA), MgCl₂농도 및 annealing, elongation과 denaturation 과정의 온도 및 시간을 각각 다르게 하여 중합효소연쇄반응을 실시하고, 이러한 중합효소연쇄반응 조건의 변화가 증폭산물의 양(yield) 및 예민도에 미치는 영향을 관찰하여 모세관 중합효소연쇄반응의 최적조건을 검색하였다.

Table 1. Component of Master-mix for Capillary-PCR

Component	10×Stock sol.		Final conc.
	Conc. ²	Volume(ul)	
PCR buffer	—	1	—
Tris-HCl ¹	500mM	—	50mM
BSA	2.5mg / ml	—	250ug / ml
MgCl ₂	30mM	—	3mM
dNTP	2mM ea	1	0.2M ea
Primer	5uMea	2	0.5Mea
Enzyme sol.		1	—
Tris-HCl ¹	10mM	—	—
BSA	2.5mg / ml	—	250ug / ml
Taq. polymerase	0.5U / ul	—	0.5u / 10ul
H ₂ O	—	5	—
Total	—	9	—

1. pH 8.3 at 25°C

성 적

1. BSA가 모세관 중합효소연쇄반응에 미치는 영향 (그림 1)

표준조건에서 모세관 중합효소연쇄반응 반응혼합물에 BSA만을 첨가하지 않고 모세관 중합효소연쇄반응을 실시한 결과 5pg과 500fg에서 188bp의 표적증폭산물에 해당하는 띠(band)가 관찰되었으나 500fg에서는 매우 약한 띠가 관찰되었다.

2. MgCl₂농도가 모세관 중합효소 연쇄반응에 미치는 영향(그림 2)

표준조건에서 MgCl₂의 농도만을 1~4mM까지 변화시켜 50fg의 표적 DNA를 증폭한 결과 2, 3 및 4mM에서 188bp 띠가 관찰되었으나 2mM에서는 매우 약하였다.

3. dNTP, 시발체 및 Taq polymerase가 모세관 중합효소연쇄반응에 미치는 영향

모세관 중합효소연쇄반응에 필요한 dNTP, 시발체 및 Taq polymerase의 최소 적정농도는 각각 0.2mM,

0.5uM, 0.5U / 10uL이었다.

4. Annealing 온도가 모세관 중합효소연쇄반응에 미치는 영향(그림 3)

표준조건에서 annealing 온도만을 40~47.5°C까지 변화시켜 50fg의 표적 DNA를 증폭한 결과 45°C에서 가장 뚜렷한 띠를 관찰할 수 있었다.

5. Elongation 시간이 모세관 중합효소연쇄반응에 미치는 영향(그림 4)

표준조건에서 elongation 시간만을 5초에서 20초까지 변화시켜 50fg의 표적 DNA를 증폭한 결과 5초에서는 증폭산물을 관찰할 수 없었고 10초 이상에서는 시간이 길수록 증폭강도가 강한 경향을 보였다.

6. 중합효소연쇄반응 cycle수가 모세관 중합효소연쇄반응에 미치는 영향(그림 5)

표준조건에서 중합효소연쇄반응 cycle수를 10~40회까지 변화시켰을 때 20, 30 및 40 cycle에서 띠를 관찰할 수 있었고, cycle수가 증가할 수록 증폭산물의 양은 높았다.

Without BSA DNA(fg)

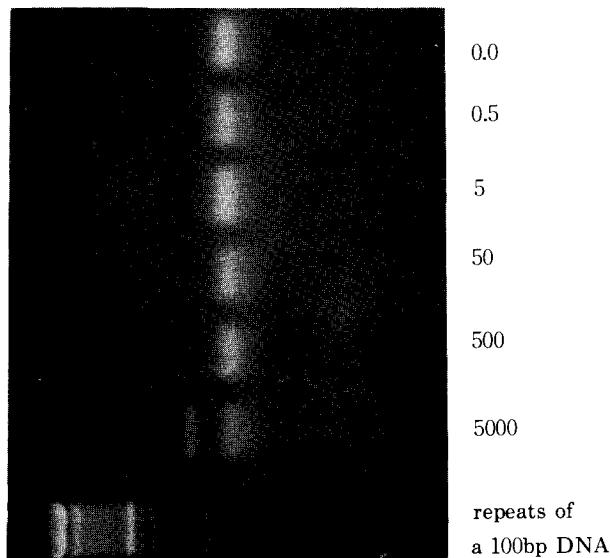


Fig. 1. Effect of bovine serum albumin on capillary-PCR for detection of *M. tuberculosis* H37Rv DNA.
DNA amplification was performed by standard condition as described in Materials and Methods except for no bovine serum albumin added in 10×PCR buffer and enzyme diluent. Lane 1 : water control. Lane 2~6 : 0.5, 5, 50, 500 and 5,000fg of template DNA. Lane 7 : repeats of a 100bp DNA fragments as a molecular size marker.

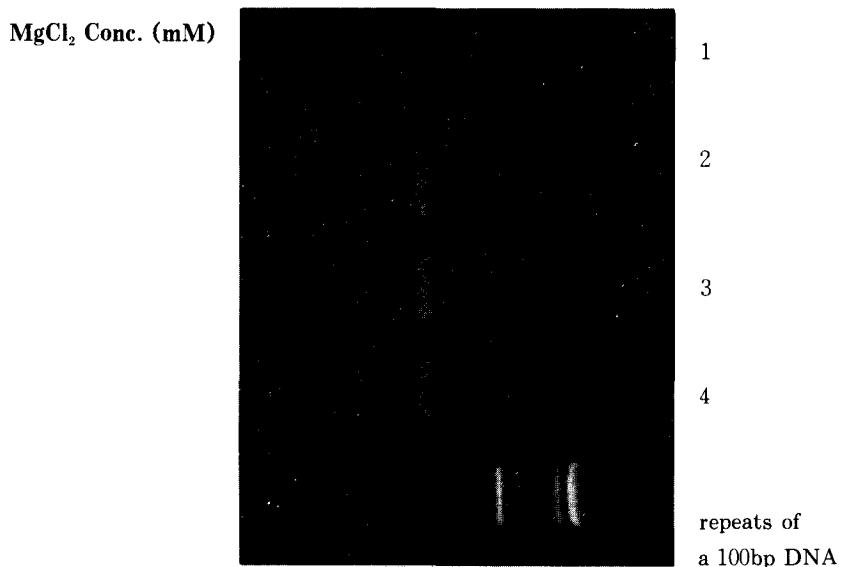


Fig. 2. Effect of MgCl₂ on capillary-PCR for detection of *M. tuberculosis* H37Rv DNA. DNA amplification was performed by standard condition with 50fg of template DNA as described in Materials and Methods except for MgCl₂ concentration varied from 1~4mM. Lane 1~4 : 1, 2, 3, and 4mM of MgCl₂. Lane 5 : repeats of a 100bp DNA fragments as a molecular size marker.

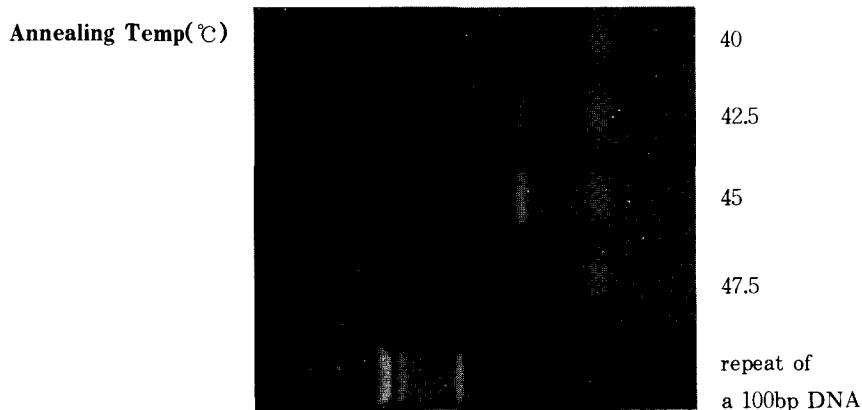


Fig. 3. Effect of annealing temperature on capillary-PCR for detection of *M. tuberculosis* H37Rv DNA. DNA amplification was performed by standard condition with 50fg of template DNA as described in Material and Methods except for annealing temperature varied from 40~60°C. Lane 1~4 : 40, 42.5, 45, and 47.5°C of annealing temperature. Lane 5 : repeats of a 100bp DNA fragments as a molecular size marker.

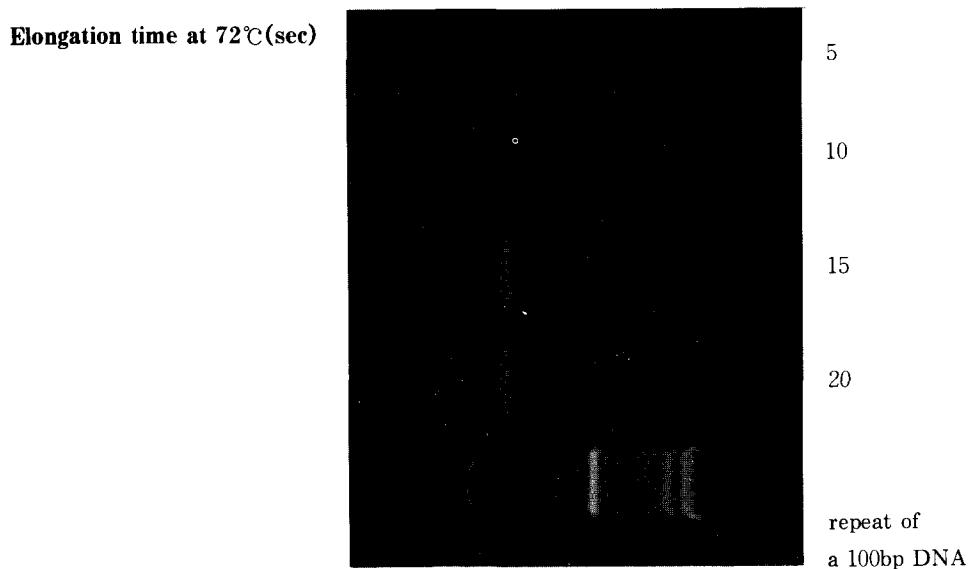


Fig. 4. Effect of elongation time on capillary-PCR for detection of *M. tuberculosis* H37Rv DNA. DNA amplification was performed by standard condition with 50fg of template DNA as described in Materials and Methods except for elongation and post-elongation time varied from 5–20 sec. Lane 1–4 : 5, 10, 15 and 20 sec of elongation and post-elongation time. Lane 5 : repeats of a 100bp DNA fragments as a molecular size marker.

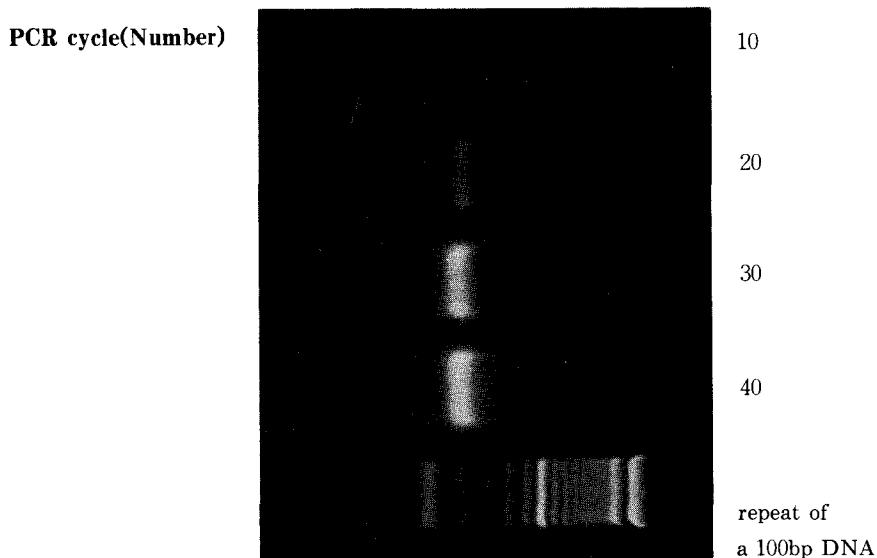


Fig. 5. Effect of PCR cycles on capillary-PCR for detection of *M. tuberculosis* H37Rv DNA. DNA amplification was performed by standard condition with 50fg of template DNA as described in Materials and Methods except for number of cycles varied from 10–40sec. Lane 1–4 : 10, 20, 30 and 40 cycles of PCR. Lane 5 : repeats of a 100bp DNA fragments as a molecular size marker.

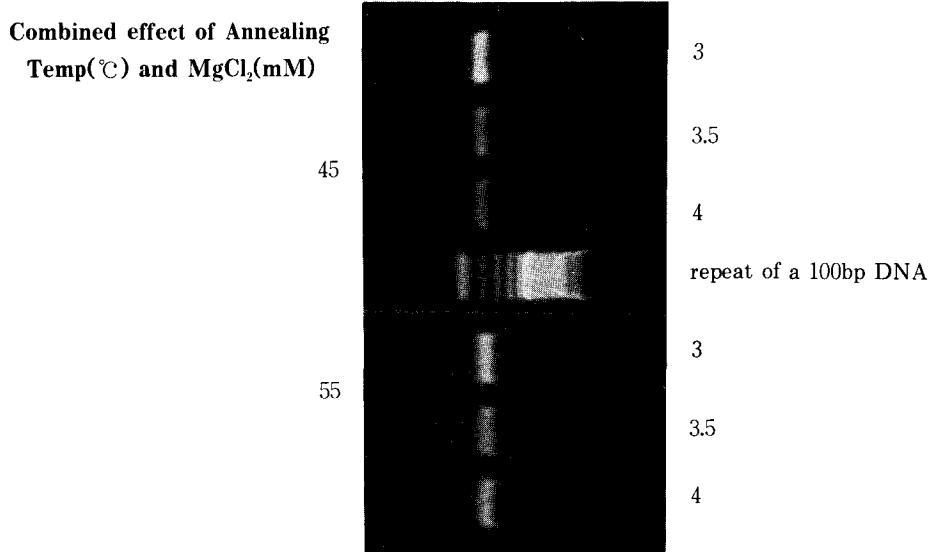


Fig. 6. Combined effect of $MgCl_2$ concentration and annealing temperature on capillary-PCR for detection of *M. tuberculosis* H37Rv DNA. DNA amplification was performed by standard condition with 50fg of template DNA as described in Materials and Methods except for $MgCl_2$ concentration varied from 3~4mM at two different annealing temperature(45°C and 55°C). Lane1~3 : 3, 3.5 and 4mM of $MgCl_2$ concentration at the annealing temperature of 45°C. Lane 4 : repeats of a 100bp DNA fragments as a molecular size marker. Lane 5~7 : $MgCl_2$ concentration 3, 3.5, and 4mM at the annealing temperature of 55°C.

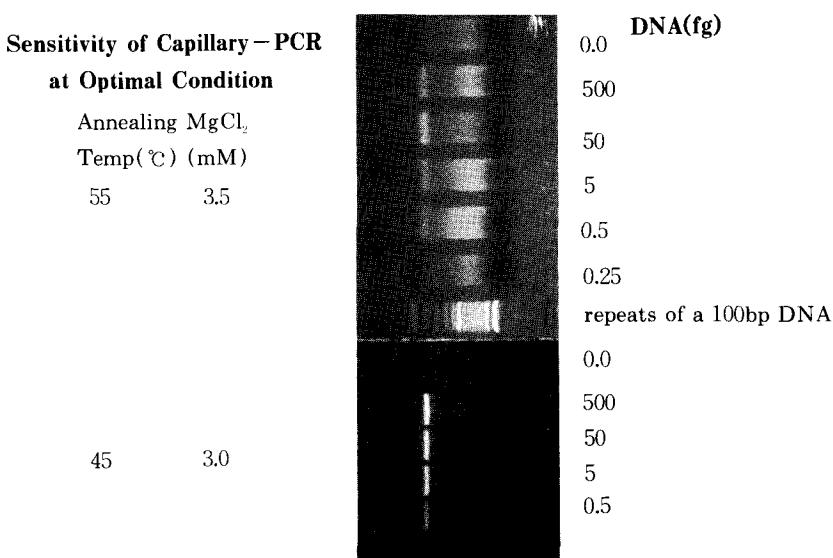


Fig. 7. Sensitivity of capillary-PCR at optimal condition for detection of *M. tuberculosis* H37Rv strain. DNA amplifications were performed by 2 different optimal conditions : Condition(a), annealing temperature -45°C, $MgCl_2$ concentration -3.5mM. ; Condition(b), annealing temperature -55°C, $MgCl_2$ concentration -3.5mM. Lane 1 : water control of condition(a). Lane 2~6 : 500, 50, 5, 0.5 and 0.25 fg of template DNA of condition(a). Lane 7 : repeats of a 100bp DNA fragment as a molecular size marker. Lane 9~13 : 500, 50, 5, 0.5 and 0.25 fg of template DNA of condition(b). Lane 8 : water control of condition(b).

7. 기타 중합효소연쇄반응과정의 온도조건 및 시간의 변화가 모세관 중합효소연쇄반응에 미치는 영향

Annealing 및 denaturation 시간을 표준조건에서 제시한 1초 보다 연장하여도 중합효소연쇄반응의 증폭효율은 변화가 없었다.

8. MgCl₂ 농도와 annealing 온도가 모세관 중합효소연쇄반응에 미치는 상호작용(그림 6)

Annealing 온도가 45°C 및 55°C에서 MgCl₂ 농도를 3, 3.5, 4mM로 각각 변화시켜 본결과 annealing 온도가 47°C에서는 MgCl₂의 농도가 낮을 수록 뚜렷한 띠를 관찰할 수 있었고, annealing 온도가 55°C에서는 MgCl₂ 농도에 관계없이 띠의 강도는 같았으나 MgCl₂ 농도 3.5mM에서 예민도가 가장 높았다(0.5fg의 표적 DNA).

9. 적정조건에서 모세관 중합효소연쇄반응의 예민도(그림 7)

모세관 중합효소연쇄반응의 예민도가 가장 높은 조건은 annealing 온도 45°C에서 MgCl₂ 농도가 3.0mM일 때(0.5 fg의 표적 DNA)와 annealing 온도 55°C에서 MgCl₂ 농도가 3.5mM일 때(0.25fg의 표적 DNA)였고 기타의 조건은 표준조건과 같았다.

고 찰

우리나라에서 결핵은 과거에 비해 상당히 감소하는 추세에 있으나 김¹¹등에 의하면 X-선 소견상 활동성 결핵이 의심되는 환자수는 전인구의 1.8%로서 약 73만명에 이를 것으로 추산되는 등 아직도 한국인의 중요한 감염병중의 하나이다. 그러나 결핵의 고전적인 진단방법인 결핵균 배양검사 및 항산균 도말검사는 예민도가 매우 낮고 배양검사의 경우 5주 이상의 검사시간이 소요되기 때문에, 폐결핵은 물론 가검물내에서 결핵균 수가 매우 적게 검출되는 결핵성 뇌막염, 결핵성 늑막염 및 신결핵등의 진단에는 특히 어려움이 많고^{2,3,17}, 또한 단기요법을 실시하더라도 6개월 이상의 장기 투여가 요하는 항결핵요법의 심각한 부작용을 고려한다면 보다 신속하고 예민도 및 특이도가 높은 새로운 결핵 진단검사법의 개발이 시급하다 하겠다.

최근들어 분자생물학이 급속히 발달함에 따라 결

핵균 특이 유전자가 클론화 되어 그 염기서열이 밝혀지고⁴⁻⁶, 시험관내에서 원하는 DNA를 수백만배 증폭할 수 있는 중합효소연쇄반응법이 개발됨에 따라, 결핵 진단검사에 있어서 이러한 시도가 매우 활발히 진행되고 있다⁷⁻²⁴. 중합효소연쇄반응에 이용되는 thermocycler는 열전도 방식에 따라 heating-block법, hot-air-capillary 및 water-bath법 등으로 나눌 수 있는데, heating block법이 가장 보편적인 방법이다. 그러나 heating-block법은 eppendorf tube를 반응용기로 사용하기 때문에 열전달 속도가 빠르고, 따라서 30~50 cycle의 중합효소연쇄반응을 기준할 때 2~6시간의 검사시간이 소요되고, 시약의 소모도 많은 등 상용검사로서는 다소 문제가 있었다. Hot-air-capillary법은 모세관을 반응용기로 하여 뜨거운 공기를 강제순환시켜 열전달을 하기 때문에 검사시간이 매우 짧고(10~30분) 시약소모도 적어(10ul) 경제적이기는 하나, 재현성이 떨어지고 취급이 불편하다는 점 때문에 그동안 보편화되질 못하였다.^{25,26} 이에 저자들은 hot-air-capillary 방식인 FTC-2000이 국내에서 최초로 개발된 중합효소연쇄반응용 기기라는 점과 온도 및 시간 조절이 computer에 의해 제어됨으로써 재현성이 비교적 좋다는 점을 고려하여, 이방식에 의한 중합효소연쇄반응의 적정조건을 검색하고 결핵 진단검사로서의 타당성 여부를 조사하고자 하였다.

임상가검물에서 결핵균등의 미생물 DNA를 중합효소연쇄반응법으로 증폭할 경우, 가검물내에 방해물질이 존재하거나, 목적으로하는 DNA가 아닌 사람의 자ansom DNA 혹은 다른 미생물 유래의 DNA가 다양 존재할 경우 간섭이 일어나 중합효소연쇄반응의 증폭효율 및 특이성을 감소시키게 된다. 특히 이러한 현상은 표적 DNA량이 극소량일 경우 더욱더 심각하여 15 cycle에서부터 급격히 증폭효율이 떨어지는 소위 'anemic mode'에 도달한다. anemic mode에 일단 도달하면 cycle 수를 늘인다 해도 증폭산물은 크게 늘어나지 않으며, 결과적으로 전기영동후 ethidium bromide 염색을 해도 목적으로 하는 DNA 띠를 관찰할 수 없게 된다^{27,28}. 따라서 임상가검물내에서 중합효소연쇄반응 검사로 결핵균 검색을 할 경우에는 예민도 및 특이도가 매우 높은 방법인 nested-PCR법⁸⁾을 이용하거나, 중합효소연쇄반응 결과분석시 전기영동법보다 특이도 및 예민

도가 뛰어난 Southern blot, dot blot, slot blot 또는 RNA-DNA 보합결합 등의 방법⁷⁾을 택해야 한다.

본 실험에서는 2단계 nested-PCR로 결핵균 DNA를 검색하였으며, 시발체는 IS986 영역에 속하는 것으로 바깥쪽 시발체로는 INS1과 INS2, 안쪽 시발체로는 Pt3와 Pt6를 사용하였으며, IS986은 *M. tuberculosis* complex에만 특이하게 존재하는 염색체 DNA의 insertion sequence의 일종으로 *M. tuberculosis* H37Rv 균주에는 copy 수가 8~12개인 것으로 밝혀져 있으며⁴⁻⁶⁾, Kolk 등⁷⁾에 의해 국내 환자의 가검물에서 유래된 *M. tuberculosis*에 중합효소연쇄반응검사의 시발체로서 시도된 바 있다.

본 실험에 사용된 반응혼합물의 조성 및 농도는 표 1에 보는 바와 같이 heating-block법의 그것과는 상당한 차이를 보이고 있는데 이는 반응용기에 따른 열전달속도의 차이 및 반응용기 재질의 차이 때문에 기인하는 것으로 보인다.

시발체를 선택함에 있어, Wittwer 등²⁵⁾에 의하면 모세관 중합효소연쇄반응법의 증폭산물의 양을 높히기 위해서는 G-C 함유량이 높을 수록 (50~60%), bp의 수가 많을 수록 (25~30nt) 좋다고 하였는데 본 실험에 이용된 INS1, INS2, Pt3 및 Pt6의 GC 함유량은 약 50%정도였고 bp의 수는 20nt였다.

모세관 중합효소연쇄반응 반응혼합물 중 절대적인 구성성분은 BSA와 MgCl₂의 농도이며 BSA는 Taq polymerase가 모세관 벽에 흡착되어 변성이 되는 것을 방지하므로 heating-block용 10배수 중합효소연쇄반응 완충액을 사용할 때에는 반드시 BSA의 농도가 500ug/ml이 되게 첨가시켜주어야 한다²⁵⁾. MgCl₂의 농도는 본 실험에서는 최종농도가 2~4mM이 적정농도였는데 annealing 온도가 높을 수록 MgCl₂의 농도는 낮추는 것이 좋고 annealing 온도가 낮을 수록 MgCl₂의 농도를 높여주는 것이 좋다. 본 실험에서는 annealing 온도가 45°C인 경우에는 MgCl₂의 농도를 3.0 mM로, annealing 온도가 55°C일 때는 MgCl₂의 농도를 3.5mM로 하는 것이 증폭산물의 양 및 예민도가 가장 높았으며 결핵균이 1개에 해당하는 0.5fg의 *M. tuberculosis* H37Rv DNA를 검출할 수 있었다.

본 실험에서 0.5~1U일 경우 적정조건이었는데 한번의 중합효소연쇄반응에서 Wittwer 등²⁵⁾에 의하면 어떤 종류의 효소든 중합효소연쇄반응은 일어나나 효소에 따라 그 조건이 달라진다고 하였으므로 한 종류의 효소를 사용하는 것이 바람직하다고 사료된다.

중합효소연쇄반응 각 단계별 온도 및 시간의 적정 조건 중 절대적인 영향을 미치는 경우는 elongation 시간과 annealing 온도로서, elongation 시간이 길수록 증폭산물의 양 및 특이도가 높은 것을 관찰할 수 있었으나 중합효소연쇄반응 증폭산물의 크기가 500bp 내외이면 10~20초사이에는 큰 차이가 없음을 관찰할 수 있었고, annealing 온도는 MgCl₂의 농도와 밀접한 상관관계가 있음은 전술한 바와 같다.

이상의 결과에서 hot-air-capillary 방식을 채택한 FTC-2000을 이용하여 IS986영역의 시발체에 의한 2단계 nested-PCR을 시행한 결과 결핵균 1개에 해당하는 0.5fg의 *M. tuberculosis* H37Rv DNA를 검색할 수 있고 비교적 안정된 재현성을 보였으므로 임상검체에서 이용한 결핵진단검사로 타당성이 인정된다. 그러나 모세관 벽에 Taq polymerase가 부착되는 현상을 해소시키 위해서는 반응혼합물의 구성성분 및 농도에 대한 재검토가 있어야 되겠고, 모세관을 봉합하고 개봉하는 과정에서 증폭산물에 의한 오염의 가능성이 높으므로 세심한 주의가 요구되고, 보다 간편하게 모세관을 취급하는 방법이 연구되어져야 하겠다.

요 약

결핵균검출을 위한 모세관 중합효소연쇄반응(capillary-polymerase chain reaction)의 적정조건을 알아보기 위하여, hot-air-capillary 방식인 FTC-2000 [대한메디칼(주), 한국]을 이용하여 *M. tuberculosis* H37Rv에서 추출한 DNA로부터 IS986의 일부분인 바깥쪽 시발체 INS1과 INS2 및 안쪽 시발체 Pt3와 Pt6에 의한 2단계 nested-PCR을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

모세관 중합효소연쇄반응에 소요되는 반응혼합물의 양은 heating-block법의 1/10에 해당하는 10ul이었으며, 각 구성성분의 최종 적정농도는 시발체가 각각 0.5 uM, dNTP가 각각 0.2mM, Tris-HCl이 50mM(pH 8.3), 우혈청 일부분이 500ug/ml 및 MgCl₂가 2~4mM이었으며, Taq polymerase는 0.5~1U가 요구되었다. 모세관 중합효소연쇄반응의 각 과정별 적정온도와 시간은 pre-denaturation이 94°C에서 10초 annealing이 45~55°C에서 1초, elongation이 74°C에서 10~20초, denaturation이 94°C에서 1초 및 post-elongation이 72°C에서 10~20초였다. 중합효소연쇄반응 횟수는 30~50 cycle이

적당하였으며 이때 각 중합효소연쇄반응에 소요된 시간은 10~30분으로서 heating block 중합효소연쇄 반응의 약 1/10에 해당하였다.

모세관 중합효소연쇄반응에 결정적인 영향을 미치는 요소는 우혈청 알부민, MgCl₂농도와 annealing 온도였는데, annealing 온도가 45℃이고 MgCl₂ 농도가 3mM일 경우 혹은 annealing 온도가 55℃이고 MgCl₂ 농도가 3.5mM일 경우 일 이차 중합효소연쇄 반응을 같은 조건에서 40 cycle 각각 실시했을 때 증폭산물의 양 및 예민도가 가장 높았으며 결핵균 1개에 해당하는 0.5fg의 *M. tuberculosis* H37Rv DNA를 검출할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. 김상재: 결핵균의 형태, 생리 및 병원성. 결핵 및 호흡기질환 1982; 29: 49-59.
2. Barn EJ, Finegold SM: *Diagnostic Microbiology*, ed 8. St. Louis, CV Mosby 1990, pp 213-222.
3. Kaneko K, Onodera O, Mijatake T, et al: Rapid diagnosis of tuberculosis meningitis by polymerase chain reaction(PCR). *Neurology* 1990; 40: 1617-1618.
4. Hermans PWM, van Soolingen D, Dale JW, et al: Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2051-2058.
5. van Soolingen D, Hermans PWM, de Haas PEW, et al: Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2578-2586.
6. von Soolingen D, Hermans PWM, de Haas PEW, et al: insertion element IS1081-associated restriction fragment length polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1772-1777.
7. Kolk AHJ, Schuitema ARJ, Kuijper S, et al: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2567-2575.
8. Pierre C, Lecossier D, Boussougant Y, et al: Use of reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 712-717.
9. Altamirano M, Kelly MT, Wong A, et al: Characterization of a DNA probe for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2173-2176.
10. Savie B, Sjöbring U, Alugupalli S, et al: Evaluation of polymerase chain reaction, tuberculostearic acid analysis and direct microscopy for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum. *J Infect Dis* 1992; 166: 1177-1180.
11. Narita M, Shibata M, Togashi T, et al: Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Paediatr* 1992; 81: 141-144.
12. Soini H, Skurnik M, Liippo K, et al: Detection and identification of mycobacteria amplification of a segment of the gene coding for the 32-kilodalton protein. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2025-2028.
13. Eisenach KD, Sifford MD, Cave MD, et al: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 1160-1163.
14. Cousins DV, Wilton SD, Francis BR, et al: Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 255-258.
15. Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, et al: Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1990; 161: 977-981.
16. Hermans PWM, Schuitema ARJ, van Soolingen D, et al: Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2567-2575.

- cobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1204-1213.
17. de Lassence A, Lecossier D, Pierre C, et al: Detection of mycobacterial DNA in pleural fluid from patients with tuberculosis pleurisy by means of the polymerase chain reation: comparison of two protocols. *Thorax* 1992; 47: 265-269.
18. Folgueira L, Delgado R, Palenque E, et al: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples by using a simple lysis method and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1019-1021.
19. Victor T, du Toit R, van Helden PD: Purification of sputum samples through sucrose improves detection of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1514-1517.
20. Buck GE, O'Hara LC, Summersgill JT, et al: Rapid, simple method for treating clinical specimens containing *Mycobacterium tuberculosis* to remove DNA for polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1331-1334.
21. Wilson SM, McNerney R, Nye PM, et al: Progress toward a simplified polymerase chain reaction and its application to diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 776-782.
22. 조상래, 이태윤, 윤경한 등: 중합효소 연쇄반응을 이용한 가검물내 *Mycobacterium tuberculosis*의 검출. 대한미생물학회지 1990; 25: 491-499.
23. 윤경한, 이태윤, 조상래 등: 가검물내 결핵균 검출에 있어서 DNA 분리방법에 따른 중합효소 연쇄반응의 민감도 비교. 대한미생물학회지 1991; 26: 159-166.
24. Yoon KH, Cho SN, Lee TY, et al: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples from patients with tuberculosis or other pulmonary diseases by polymerase chain reaction. *Yonsei Medical Journal* 1992; 33: 209-216.
25. Wittwer CT, Garling DJ: Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. *BioTechniques* 1991; 10: 76-82.
26. Rasmussen R, Reed G: Optimizing rapid cycle DNA amplification reactions: buffers and reaction component for rapid cycling. *The Rapid Cyclist* 1992; 1: 1-7.
27. Mullis KB: The polymerase chain reaction in an anemic mode: how to avoid cold oligodeoxyribonuclear fusion. *PCR Methods and Applications* 1991; 1: 1-4.
28. Eckert KA, Kunkel TA: DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *PCR Methods and Applications* 1991; 1: 17-24.

=Abstract=

Optimization of Capillary-Polymerase Chain Reaction for Detection of *M. tuberculosis*

Hyo Jin Chun, MD; Hean Chan Park, MD;
Jae Ryong Kim, MD; Dong Seok Jeon, MD

Department of Clinical Pathology, Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea

For detection of *M. tuberculosis* using hot-air capillary-thermocycler, FTC-2000 [Daehan Medical System Co. Korea], We amplified 188 base pair IS986 fragment from chromosomal DNA of *M. tuberculosis* H37Rv strain by two-step nested method, and the concentrations of each component of polymerase chain reaction(PCR) mixture and the temperatures and times of each PCR stage were individually optimized.

When compared to conventional heating-block method, only one tenth of reaction volume and time were required, i. e. 10ul and 10–30 minute, respectively. Final concentrations of each component at optimal condition were 0.5uM each primer, 0.2mM each dNTP, 50mM Tris-HCl(pH 8.3), 500ug/ml bovine serum albumin(BSA), 4mM MgCl₂ and 0.5–1U Taq polymerase per reaction. Optimal temperatures and times of each stage were 94°C and 1 sec of predenaturation, 45–55°C and 1 sec of annealing, 72°C and 10–20 sec of post-elongation, and optimal cycles of each nested-PCR were 30–50.

Among various condition of capillary-PCR, BSA, annealing temperature and MgCl₂ effect most critically on PCR result. At an annealing temperature of 45°C with 3.5mM MgCl₂ or 55°C with 3mM MgCl₂, two-step nested-PCR gave greatest yield and highest sensitivity. At these optimal condition of capillary-PCR, 0.5fg of *M. tuberculosis* H37Rv DNA(same amount of DNA extracted from a single tubercle bacillus) was amplified effectively.

Key Words: Capillary, *M. tuberculosis*, Optimal condition, Polymerase chain reaction