Immunoblots상의 발색밀도 차이를 이용한 결핵의 혈청학적 진단

대한결핵협회 결핵연구원

박 영 길 · 유 재 경 · 김 상 재

= Abstract =

Serodiagnosis of Tuberculosis Using Absorbance-difference on Immunoblots

Young-kil Park, Jae-kyung Yoo and Sang-jae Kim

Korean Institute of Tuberculosis, Korean National Tuberculosis Association

This study was done to develop a serodiagnostic procedure for tuberculosis.

The sera from 40 patients with pulmonary tuberculosis who were found by chest X-ray examination, smear and culture and from 25 healthy persons were reacted with antigen prepared with cell extract of *Mycobacterium tuberculosis* by immunoblotting.

Absorbance of the bands visualized by enzyme reaction was measured at 600 nm and analyzed and the results obtained are as follow.

The specificity of the 24 kD antigen was 100% and the sensitivity, 37.5%.

The specificity of the 35 kD antigen was 96% and the sensitivity, 70%.

Comparative analysis of absorbance of 24 kD, 28 kD, 29 kD and 35 kD antigens permits to diagnose active tuberculosis with the probability of more than 70%.

Thus when the absorbance-difference of these antigens is projected, it may be useful for diagnosing patients who are negative on smear and culture examination.

서 론

폐결핵 진단에는 흉부 X-선검사와 객담도말 및 배양 검사 등이 널리 이용되고 있지만 이들의 감수성 또는 특이성이 만족스럽지 못한 실정이다. 가장 확실한 방법은 배양검사이나 결과를 얻기까지 시간이 오래 걸리고, 분명한 결핵성 병변이 흉부 X-선상에 보여도 균이 검출되지 않는 경우도 많다. 도말검사는 결과도 빠르고 간편한 방법이지만 균수가 많아야 검출이 가능하고, X-선 검사는 민감하고 병변의 모양과 크기를 볼 수 있는 장점이 있으나 결핵성인지 확실히 알 수 없고 결핵성이라고 해도 활동성 여부를 판단하기도 쉽지 않은 흠이 있다. 결국 소수의 결핵균을 확실하게 검출할 수 있는 방법이 최근

에 유전자 재조합 기법등을 이용한 방법이 개발되고 있으나 널리 이용되고 있는 방법은 없다. 그러한 노력의 일환으로 혈청학적 방법도 오랫동안 연구 검토되어 왔다. 즉 여러과정을 거쳐 세포추출물을 분획으로 나누어 면역 전기영동법으로 결핵에 특이한 항원을 찾아 진단에 이용하고자 시도한 실험도 있고¹⁾, 효소 결합 면역 분석법(ELISA)을 이용한 방법도 활발하게 진행되어 왔다^{2~6)}. 또 한편으로는 단 Clone 항체로 결핵의 특이적인 항원을 찾아 진단에 이용하려는 실험도 계속되어 왔다^{7~9)}.

최근에 결핵에 특이성이 높은 항원을 Immunoblotting으로 결핵환자 혈청과 반응시킨 보고가 있으나 민감도가 50%수준이었다^{10,11)}. 즉 특이도가 100%인 항원은 민감도가 낮다는 것이다.

따라서 본 실험에서는 비교적 특이도와 민감도가 높은 항원을 여러개 선정하여 환자혈청과 Immunoblotting 기법으로 반응시켜 나타나는 발색밀도를 이용하여 진단적 가치를 제고하고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주 및 배양

인형결핵균 *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇ Rv를 37°C에서 Sauton 액체배지에서 4~6주간 배양하였다. 2%되게 석탄산을 가하고 37°C에서 24시간 처리하여 균을 사멸한 후 균괴를 3회이상 0.067 M 인산 완충액으로 세척하였다. 이렇게 사멸한 균을 동물접종 및 환자 혈청과 반응할 항원 제조에 사용하였다.

2. 면역 혈청 생산

균 200 µg (dry weight)을 인산 완충액 1 ml에 부유시켜 토기 피하 네 곳에 0.25 ml씩 접종하였고 9, 12일째날 채혈하였고 13일째날 추가접종하였고 22일째날 채혈하였다.

3. 항원 제조

균을 Tris 완충액 (50 mM Tris-HCl, 5% Glycerol, pH 7.8)에 1:4 (w/v)로 부유시킨 후 초음파기로 균을 파쇄하였다. 얼음물을 순환시켜 최대 60%출력으로 10분씩 4회 실시하였다. 15,000 g로 30분간 원심분리하여 상층액을 취해 이를 다시 20% Ammonium sulfate 처리한 후 원심분리하여 상층액을 증류수에 대해 투석하여 냉동 건조하였다. 이를 다시 Sephadex G-100 column (2.6 cm×60 cm)을 통해 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) 완충액으로 Gel 거르기를 하였더니 크게 두 분획으로 나눌 수 있었다.

이 분획중 먼저 유출된 분획의 중간 이후의 것을 TEA, 후에 유출된 것을 TEB라 하였다. TEA, TEB를 각각 증류수에 대해 투석하여 냉동건조하였다.

이 두분획을 1:1로 섞어 TES라하고 이를 Immunoblotting 실험에 항원으로 사용하였다. TEA를 첫째 분획이 중간 이후의 것으로 한 이유는 항원의 분자량이 낮은 것을 선택하기 위함이고 TEB를 따로 모아 TEA와 동량으로 섞은 이유는 TEB 부분의 항원성분을 충분한 양으로 함유시키기 위함이었다.

4. 사람 혈청

치료력이 3개월이내 이면서 도말 및 배양검사에서 결핵균 양성인 폐결핵환자 40명과 X-선검사에서 이상이 없는 건강한 25명의 혈청을 사용하였다.

5. 전기영동 및 Immunoblotting

Laemmli 방법¹²⁾ 의거하여 Sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 하였으며 Separating gel은 12.5%로 (14 cm×14 cm) 만들었고 Stacking gel은 4%로 하였다. 항원은 lane당 약 50 µg되게 loading하였고 30mA로 5시간 전기영동하였다.

Immunoblotting은 Lee등의 방법을 적용하였다¹³⁾. 항원을 흡착시킨 Nitrocellulose sheet는 Ponceau용액 (0.4% Ponceau, 8% Trichloro acetic acid, 2% Acetic acid)으로 염색하고 증류수로 항원이 보일 정도로 탈색하였다.

표준 단백 lane과 항원의 일부분을 잘라 Coomassie 청액으로 염색하였다. 나머지 Nitrocellulose sheet는 7 mm 간격으로 잘라 TENT 완충액 (50 mM Tris, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.25% Gelatin, 0.05% Triton X-100, pH 7.2)에서 하루밤 담귀두었다. 다음 TENT 용액에 1:50으로 희석한 혈청을 35°C에서 5시간 이상 반응시키고 TENT용액에 1:1000으로 희석한 Goat anti-human IgG peroxidase conjugate로 35°C에서 5시간이상 반응시킨 다음 기질용액 (4-Choloro-1-Naphtol)을 반응시켰다.

발색밀도는 Spectrophotometer (Gilford사 Response)로 600 nm에서 측정하였다.

결 과

1. SDS-PAGE에 의한 결핵균 항원 분석

결핵균을 파쇄하여 제조한 용해성 조항원을 Sephadex G-100 column으로 분리한 TEA의 주된 성분은 72 kD, 66 kD, 57 kD 항원이었고 52 kD, 33 kD, 22 kD는 다소 적게 분포하고 있었다. TEB에는 52 kD, 35 kD, 33 kD, 29 kD, 28 kD, 24 kD, 22 kD가 주된 항원 성분으로 함유하고 있었다. 이 두분획을 합친 TES에는 전 항원이 농축되어 나타났다 (Fig. 1).

Fig. 1. Coomassie blue stain of antigens on nitrocellulose sheet after 12.5% SDS-PAGE.

M : molecular weight markers.

TES : mixed antigen of TEA and TEB fractions.

A : TEA fraction eluted first on sephadex G-100 column.

B : TEB fraction eluted secondly on sephadex G-100 column.

Numbers indicate a relative molecular weight.

2. 결핵균체에 대한 가토 항원의 반응

TES항원에 대한 토끼의 면역 전후 혈청의 반응을 관찰한 결과를 보면 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 즉 면역 전 토끼 혈청이 72 kD, 57 kD, 52 kD, 29 kD, 28 kD 항원에 대해서는 반응하고 있으나 24 kD, 33 kD, 35 kD 항원에 대해서는 면역 접종 후 반응하고 있음을 볼 수 있다. 면역 접종 후 52 kD 항원에 대해서는 반응이 크게 증가하였다. 57 kD, 72 kD 항원에 대한 반응은 면역 전후 차이가 거의 없었다. 토끼에 추가 접종을 하였더니 이 항원들이 더욱 강하게 반응하였다(Fig. 3). 결핵 환자 혈청도 24 kD, 28 kD, 29 kD, 33 kD, 35 kD, 52 kD 항원에 대해 반응하고 있는 데 특히 24 kD와 35 kD는 사람과 토끼 공히 결핵균에 감염되거나 잠작되므로써 반응하고 있어서 흥미로웠다.

3. 결핵균 항원에 대한 환자 및 건강인 혈청의 반응

객담 도말 및 배양검사에서 균양성인 폐결핵 환자 40

Fig. 2. Immunoblots of rabbit's sera before or after immunization with phenol-killed *M. tuberculosis*.

M : molecular weight markers.

C : Coomassie blue stained antigens.

RN : reaction of rabbit's serum before immunization.

R1 : reaction of rabbit's serum on 9 days after immunization.

R2 : reaction of rabbit's serum on 12 days after immunization.

R3 : reaction of rabbit's serum on 22 days after immunization.

명과 건강인 25명으로부터 채취한 혈청을 TES항원과 Immunoblotting으로 반응시켜 나타난 각 Bands의 흡광도를 여러 범위의 파장으로 측정 한 결과 600 nm에서 가장 적합함이 밝혀졌다(Fig. 4, 5).

각 항원에 대한 환자 및 건강인의 혈청의 반응정도를 나타내는 발색밀도 측정치는 Table 1, 2에서 보는 바와 같다.

24 kD 항원에 대한 반응은 100%였으나 민감도는 37.5%에 불과하였다. 35 kD항원에 대한 반응은 특이도가 96%이며 민감도는 70%로서 비교적 높은 반응율을 보였다. 28 kD와 29 kD 항원에 대한 반응의 특이도와 민감도는 모두 70%수준이었다. 33 kD는 특이도는 높으나 민감도가 낮고 52 kD는 민감도는 높으나 특이도가 낮았다(Table 3).

각 항원성분에 대한 환자나 건강인 혈청의 반응을 흡광도 평균치로 비교해 보면 환자군이 건강인군에 비해

2~14배 더 높게 나타났다(Table 4).

Table 1, 2에서 보면 결핵환자인 경우 24 kD 항원에

Fig. 3. Comparison of serological reaction to TES between rabbit and human sera.

RN : rabbit's preimmune serum.
RI : rabbit's hyperimmune serum.
HP : tuberculosis patient's serum.
HH : healthy human serum.

서 반응을 나타냈거나 28 kD 및 29 kD 항원의 발색밀도 값이 0.03이상 이었던지 또는 35 kD 항원의 발색밀도 값이 0.05이상이었다. 환자 40명중 31명이 그러한 반응양상을 나타내었다(77.5%). 또한 진단의 신뢰도를 높이기 위해 특이도가 100%인 24 kD 항원에 반응하였거나, 특이도가 70%이상인 28 kD, 29 kD 항원에서 발색밀도 값이 건강인의 최대치인 0.02의 4배인 0.08이상 이거나, 특이도가 96%인 35 kD 항원에서 발색밀도 값이 건강인의 최대치인 0.04의 2배인 0.08이상에 해당되는 환자는 40명중 28명으로 70%이었다.

고 찰

결핵의 혈청학적 진단방법은 오래전부터 시도되어 왔으나 아직도 실용화 되어있는 방법이 없다. 그 주된 이유는 혈청학적 진단방법이 가장 유용하게 이용될 수 있는 병리 가검물내 결핵균을 배양검사로 검출할 수 있는 경우 균검출이 어려운 활동성 결핵의 진단에 그 유용성이 증명되지 못했기 때문이다. 즉 도말검사에서 균이 검출되지 않은 활동성 결핵의 진단에 있어서 지금까지 시도되었던 각종 혈청학적 진단 방법의 감수성과 특이성이 만족스럽지 못했기 때문에 실용화 되지 못하고 있다. 그런 문제를 개선하기 위해, 본 연구는 먼저 토끼에 결핵

Fig. 4. Immunoblots of patients and healthy controls.

a-k : sera of patients Nol-10 in Table 1.

u-z : sera healthy controls Nol-6 in Table 2.

Fig. 5. Absorbance at 600 nm of TES antigens reacted with patient's serum by immunoblotting.
peak A : 24 kD peak B : 28 kD peak C : 29 kD
peak D : 35 kD peak E : 52 kD

Table 1. Absorbance at 600nm of the Various Antigens Reacted with Patients Sera by Immunoblotting

Antigens Patient No.	24kD	28kD	29kD	33kD	35kD	52kD
1		0.04	0.06	0.01	0.08	0.01
2		0.01	0.02			
3		0.07	0.02		0.24	0.04
4	0.04	0.06	0.06		0.01	0.05
5	0.02	0.01	0.01	0.06	0.05	0.19
6		0.02	0.02		0.02	0.07
7	0.15	0.48	0.44	0.09	0.24	0.15
8	0.01	0.05	0.07		0.07	0.14
9					0.15	0.05
10	0.73	0.23	0.22	0.09	0.24	0.29
11		0.21	0.08		0.01	0.02
12	0.18	0.36	0.36		0.18	0.22
13						
14		0.03	0.03			0.18
15	0.02	0.02	0.01			0.07
16		0.02	0.01			
17						0.01
18		0.28	0.1		0.02	0.03
19	0.08	0.09	0.1		0.02	0.03
20						
21	0.03	0.02	0.02			0.02
22					0.02	0.02
23					0.02	
24					0.45	0.14
25	0.04	0.08	0.07		0.1	0.02

26		0.05	0.22		0.02	0.13
27			0.13	0.06		0.01
28		0.06	0.02	0.02	0.02	0.02
29		0.2			0.05	0.04
30						0.01
31			0.04	0.04	0.05	0.13
32			0.09	0.08		
33					0.05	0.02
34			0.34	0.21	0.04	0.07
35		0.07	0.47	0.49	0.14	0.48
36			0.3			
37			0.51	0.43	0.01	0.08
38			0.17	0.19	0.02	0.05
39		0.05	0.05	0.06	0.02	0.03
40		0.03	0.03	0.04	0.2	0.1

균을 감작시킨 다음 각종 용해성 결핵균 항원성분에 대한 항체 반응을 Immunoblotting 기법으로 관찰하였다. 관찰된 토끼의 반응 양상을 활동성 폐결핵 환자와 건강인의 항체 반응 양상과 비교하므로써 반응 민감도와 진단적 특이성이 높은 항원을 동정하고자 하였다. 그리고 Immunoblot상에 나타난 발색대의 흡광도를 Spectrophotometer로 측정하여 그 유용성도 아울러 검토하였다.

결핵균체로부터 유래한 조항원(TES)은 SDS-PAGE상에서 분자량이 다양한 많은 항원들이 함유되

Table 2. Absorbance at 600nm of the Various Antigens Reacted Healthy Control Sera by Immunoblotting

Antigens Healthy control	24kD	28kD	29kD	33kD	35kD	52kD
N 1						0.02
N 2			0.01		0.04	0.01
N 3		0.02	0.01			0.03
N 4		0.01	0.01			0.01
N 5		0.01	0.01	0.01		0.03
N 6		0.01				0.11
N 7						
N 8						
N 9		0.01				
N10						
N11						
N12						
N13						
N14						
N15						0.01
N16						0.01
N17		0.01	0.01			
N18						0.01
N19						
N20						
N21						0.01
N22			0.02			
N23						0.01
N24						0.01
N25			0.02			

Table 3. Sensitivity and Specificity of Antigens in the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis

	24kD	28kD	29kD	33kD	35kD	52kD
Sensitivity (%)	37.5	75	72.5	15	70	82.5
Specificity (%)	100	76	72	96	96	52

Table 4. Mean Absorbance of Antigen Bands on Immunoblots of tuberculosis Patients and Healthy Controls

	24kD	28kD	29kD	33kD	35kD	52kD
Smear positive tuberculosis	0.11	0.14	0.12	0.05	0.09	0.1
Healthy controls	0	0.01	0.01	0.01	0.04	0.02

어 있지만 Immunoblotting으로 비교 분석한 그들의 진단적 가치를 보면 33 kD 항원은 특이도는 높으나 민감도가 낮고 52 kD 항원은 민감도는 높으나 특이도가 낮아 진단 목적에 적합하지 않았다. 그러나 24 kD, 28 kD, 29 kD 및 35 kD 항원은 특이도와 민감도가 높아 이들의 발색밀도 차이를 이용한 진단은 적어도 70% 이상이었다. 이는 Coates 등의 45 kD 등 여러 항원을 환자 혈청과 반응시켜 나타난 결과¹¹⁾와 비교할 때 훨씬 우수한 진단적 가치를 가지고 있었다. 그러한 차이는 결과를 나타낸 방법의 차이, 항원의 차이 뿐만 아니라 Immunoblotting 과정의 차이 즉 완충액의 성분, pH, 온도, 작용시간, 항원의 농도 등 여러가지 요인이 있다고 본다.

실제 임상적인 진단에 이용하기 위해서는 좀 더 많은 대상과 도말, 배양검사 음성인 사람, 타결핵 환자, 비정형 항산균 감염 환자 등의 혈청과 반응과 비교해 보아야 한다.

결 론

초음파로 파쇄한 결핵균체로 부터 유래한 항원을 SDS-PAGE로 분리하고 결핵균으로 감작시킨 토끼혈청의 항체반응을 Immunoblotting으로 경시적으로 비교 관찰한 결과 24 kD, 33 kD, 35 kD 항원에 대해서는 면역접종 후에만 반응하고 있었다.

객담도말 및 배양검사로 확진된 폐결핵 환자 40명과 건강인 20명의 혈청으로 반응시켜 나타난 발색대를 600 nm에서 흡광도를 측정해 비교 분석한 결과 24 kD 항원은 특이도가 100%이며 민감도가 37.5%이었고, 35 kD 항원은 특이도가 96%이며 민감도는 70%이었다. 그리고 24 kD, 28 kD, 29 kD 및 35 kD 항원의 발색밀도의 차이를 포함할 경우 활동성 결핵의 진단적 민감도는 70%이었다.

그러므로 이 항원들의 발색밀도 차이를 이용하면, 도말음성 배양양성 환자나 균음성인 환자에 진단에 유용할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) 배용수, 김상재, 배길한, 이승호 : 항산성균 항원 분획의 혈청학적 활성. 한국미생물학회지 24(4):377-384, 1986
- 2) 김상재, 배길한, 이승호, 홍영표 : 효소결합면역분법

- (ELISA)을 이용한 항산균 표면 항원의 상관관계에 관한 연구. 결핵 및 호흡기질환 **33**(3):147-157, 1986
- 3) Daniel TM, Debanne SM: The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis* **135**:1137-1151, 1987
 - 4) Mauch H, Fischer W, Grange JM, Kardjito T: The serodiagnosis of tuberculosis: A comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay and a solid-phase radioimmunoassay. *Zbl Bakt Hyg A* **267**:357-362 1988
 - 5) Daniel TM: Rapid diagnosis of tuberculosis: Laboratory techniques applicable in developing countries. *Rev Infect Dis* **11** (Suppl 2):S471-S478, 1989
 - 6) Maes R, Homasson JP, Kubin M, Bayer M: Development of an enzyme immunoassay for the serodiagnostic of tuberculosis and mycobacterioses. *Med Microbiol Immunol* **178**:323-335, 1989
 - 7) Young D, Kent L, Rees A, Lamb J, Ivanyi J: Immunological activity of a 38-kilo-dalton protein purified from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **54**(1):177-183, 1986
 - 8) Anderson AB, Yuan ZL, Haslow K, Vergmann B, Bennedsen J: Interspecies reactivity of five monoclonal antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* as examined by immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* **23**:446-451, 1986
 - 9) Kadival GV, Chaparas SD: Production, characterization, and species specificity of five monoclonal antibodies to *Mycobacterium tuberculosis*. **25**(1):76-80, 1987
 - 10) 이광호, 조명제, 이우곤, 강경희, 백승철, 류항희, 심영수, 김상재 : 결핵균 항원을 이용한 결핵의 혈청학적 진단. *대한미생물학회지* **24**(6):579-589, 1989
 - 11) Coates ARM, Nicolai H, Pallen MJ, Guy A, Chaparas SD, Mitchson DA: The 45 kilodalton molecule of *Mycobacterium tuberculosis* identified by immunoblotting and monoclonal antibodies as antigenic in patients with tuberculosis. *Br J Exp Path* **70**:215-225, 1989
 - 12) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**:680-685, 1970
 - 13) Lee CY, Huang YS, Hu PC, Gomel V, Menge AC: Analysis of sperm antigen by sodium dodecyl sulfate gel/protein blot radioimmunobinding method. *Anal Biochem* **123**:14-22, 1982