

## 한센병 분자생물학적 접근에서의 다중전위증폭법의 유용성

한국한센복지협회 연구원

김 종 필

- Abstract -

### The usefulness of multiple displacement amplification in the molecular studies in Hansen's disease

Jong-Pill Kim,

Institute for Leprosy Research, Korean Hansen Welfare Association

Appreciable amounts of high-quality DNA are frequently required for use in molecular diagnostic and epidemiology studies. The limited availability of DNA can be a critical obstacle to meeting research and clinical needs. And molecular methods have not been routinely applied to the obligate intracellular organism *Mycobacterium leprae* because of the difficulty of obtaining a genomic DNA template from clinical material. The MDA (multiple displacement amplification) reaction is increasingly the method of choice for many applications because of its extensive coverage of the genome, the generation of extremely long DNA products compared with older whole genome amplification methods and the high DNA yields, even from exceedingly low amounts of starting material. In the study, the author evaluated the usefulness of this method for the molecular studies in Hansen's disease.

---

Key Words: MDA (multiple displacement amplification), Hansen's disease.

## I. 서 론

분자 진단과 역학 연구에서는 고품질 DNA의 평가할 수 있을 정도의 양이 필요하다. 임상 검체에서 균의 게놈 DNA 주형을 얻기가 쉽지 않아 절대 세포내 유기체인 나균(*Mycobacterium leprae*)에서는 분자 역학 기법을 통상적으로 적용하기에 어려움이 있다. 고품질 게놈 DNA 주형에 접근하기 위하여 전 유전자 증폭법<sup>1,2)</sup>이 개발되었다. 이중 다중전위증폭법(multiple displacement amplification, 이하 MDA)<sup>3,4)</sup>으로 한센병 영역에서 나균에 대해 민감하고 다양한 양상에 대한 분자생물학적 분석에 대한 이 방법의 유용성을 평가하기 위해 본 연구를 실시하였다.

## II. 연구방법

### 1. 검체에서 나균 분리 및 나균 DNA 추출

취적저접종법에 의해 나균이 증식된 조직을 Nakamura법의 변형된 방법<sup>5)</sup>에 따라 처리하였다. 이에 따라 얻은 나균을 QIAGEN DNA mini-prep kits<sup>®</sup>를 이용하여 제조사가 지정한 방법을 이용하여 나균 DNA를 얻었는데, 이때 2개의 시료에서는 QIAGEN<sup>®</sup>사가 제공한 자료에 따른 다른 농도를 기대하고

여러 개의 시료로 나누어 추출하였다. 100ul 씩 3차례의 elution하였으며, 각 시료를 10배씩 2회 희석하여 9개씩의 시료를 준비하였다.

### 2. 다중전위증폭법

QIAGEN<sup>®</sup>사의 REPLI-g<sup>®</sup> Mini Kits 및 REPLI-g<sup>®</sup> Ultrafast Mini Kits를 사용하여 제작사가 권장하는 방법에 따라 다중전위증폭법(Multiple Displacement Amplification, MDA)을 시행하였다. 요약하면 DNA 시료에 Denaturation solution을 섞은 후 3분간 상온에서 방치한 후 Neutralization buffer를 첨가하여 섞은 후 REPLI-g master mix를 첨가하여 30°C에서 16시간(REPLI-g<sup>®</sup> Mini Kits) 또는 1시간 30분(REPLI-g<sup>®</sup> Ultrafast Mini Kits) 방치하여 증폭을 시켰다.

### 3. 중합효소연쇄반응(PCR)에 기초한 증폭 검사 및 시퀀싱

진단(RLEP<sup>6)</sup>, r1-r4<sup>7)</sup>, 역학(ttc repeat<sup>8)</sup>), 약제 내성(리팜피신, *rpoB*)에 대해 중합효소연쇄반응을 실시하였다. *rpoB*에 대해서는 새로이 제작한 시발체에 이용하여 FailSafe PCR Premix D 10ul, FailSafe PCR

---

\* 교신저자 : 김종필  
전자우편 : dr\_jpkim@hotmail.com  
주 소 : 경기도 의왕시 오전동 산86  
한국한센복지협회 연구원  
전 화 : 031-452-7094  
팩 스 : 031-455-6592

Enzyme Mix 0.5ul(1.25 Units), 시발체 각각 1ul(최종농도 0.2uM), 시료 2ul을 첨가하여 최종량 25ul로 하여 94°C 2분 초기 변성 후 94°C, 60.5°C, 72°C 각 30초씩 35회 반복 후 72°C에서 5분간 신장하는 과정을 통하여 증폭하였으며, 나머

지는 인용된 논문의 방법에 따라 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 최종산물을 전기영동에 의해 확인한 후 BIONICS사에 시퀀싱을 의뢰하여 결과를 확인하였다. 사용한 시발체는 Table. 1과 같다.

Table. 1 sequence of oligonucleotide primers.

| primer | sequence(5'-3')       |
|--------|-----------------------|
| RLEP-F | TGCATGTCATGGCCTTGAGG  |
| RLEP-R | CACCGATAACCAGCGGCAGAA |
| R1     | CGGGTAGGGGCGTTTTAGT   |
| R2     | CTAGAAGGTGCCGTATGTG   |
| R3     | GCGTTTTAGTGTGCATGTCA  |
| R4     | GGATCATCGATGCACTGTT   |
| ttc-F  | GGACCTAAACCATCCCGTTT  |
| ttc-R  | CTAGGGGGCACTTAGCTC    |
| rpoB-F | AGATCCGGGTCGGTATGTC   |
| rooB-R | CCTCGTCAGCGGTCAAGTA   |

### III. 결 과

#### 1. 중합효소연쇄반응 결과

진단(RLEP, r1-r4), 역학(ttc repeat), 약제 내성(*rpoB*)에 대한 다양한 과정의 나균 DNA의 중합효소연쇄반응 모두에서 전기영동 상 증폭양상이 관찰되었다. 그 결과는 아래와 같다(Fig. 1).

#### 2. 시퀀싱 결과

역학(ttc repeat), 약제 내성(*rpoB*)에 대한 평가를 위해 나균 DNA의 중합효소연쇄

반응에서 전기영동 상 증폭양상이 관찰되었던 시료를 가지고 시퀀싱을 하여 ttc repeat에서는 94.4%(REPLI-g® Ultrafast Mini Kit), 100%(REPLI-g® Mini Kit)에서 증폭 전과 동일한 결과가 관찰되었고, *rpoB*에서는 88.3%(REPLI-g® Ultrafast Mini Kit), 94.4%(REPLI-g® Mini Kit)에서 증폭 전과 동일한 결과가 관찰되었다(Table. 2, Table. 3, Fig. 2, Fig. 3).

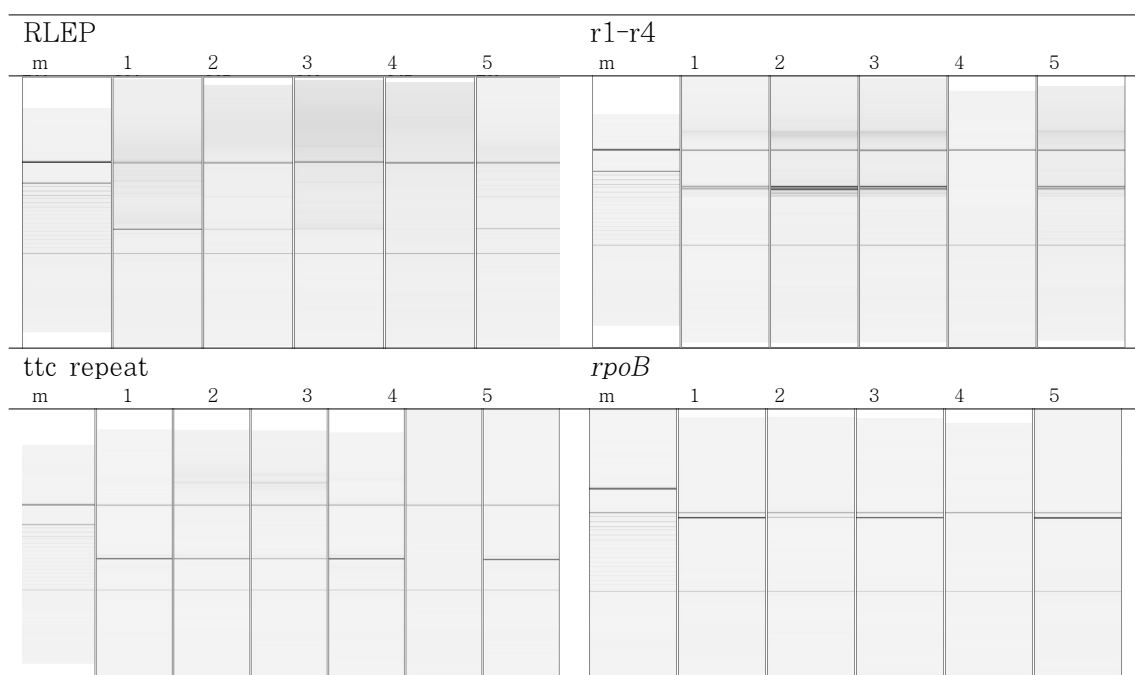


Fig. 1. Examples of PCR

M: marker, 1: non-amplification, 2: amplification by REPLI-g® Mini Kits, 3: amplification by REPLI-g® Ultrafast Mini Kits, 4: negative control, 5: positive control

Table. 2 Summary of *ttc repeat* sequencing results.

|              | Pre-Amplification | Amplification of REPLI-g® Ultrafast Mini Kit | Amplification of REPLI-g® Mini Kit |
|--------------|-------------------|----------------------------------------------|------------------------------------|
| good results | 18<br>100%        | 17<br>94.4%                                  | 18<br>100%                         |
| poor results | 0<br>0%           | 1<br>5.6%                                    | 0<br>0%                            |

Table. 3 Summary of *rpoB* sequencing results.

|              | Pre-Amplification | Amplification of REPLI-g® Ultrafast Mini Kit | Amplification of REPLI-g® Mini Kit |
|--------------|-------------------|----------------------------------------------|------------------------------------|
| good results | 18<br>100%        | 15<br>88.3%                                  | 17<br>94.4%                        |
| poor results | 0<br>0%           | 3<br>11.7%                                   | 1<br>5.6%                          |

한센병 분자생물학적 접근에서의 다중전위증폭법의 유용성 : 김종필

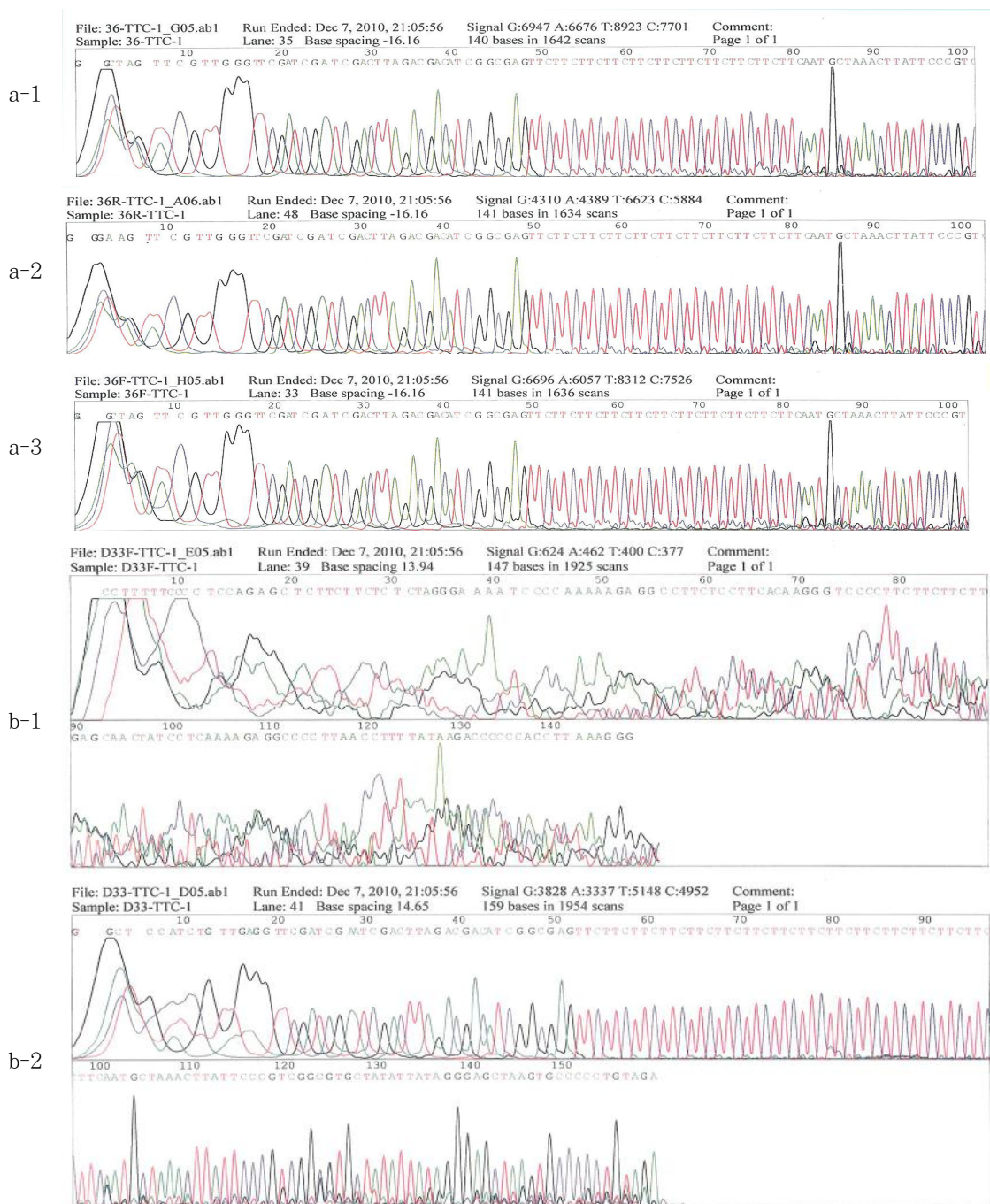


Fig. 2. Examples of ttc repeat sequencing results.

successful cases:a-1: non-amplification, a-2: amplification by REPLI-g® Mini Kits, a-3: amplification by REPLI-g® Ultrafast Mini Kits  
fail cases:b-1: amplification by REPLI-g® Ultrafast Mini Kits, b-2: non-amplification

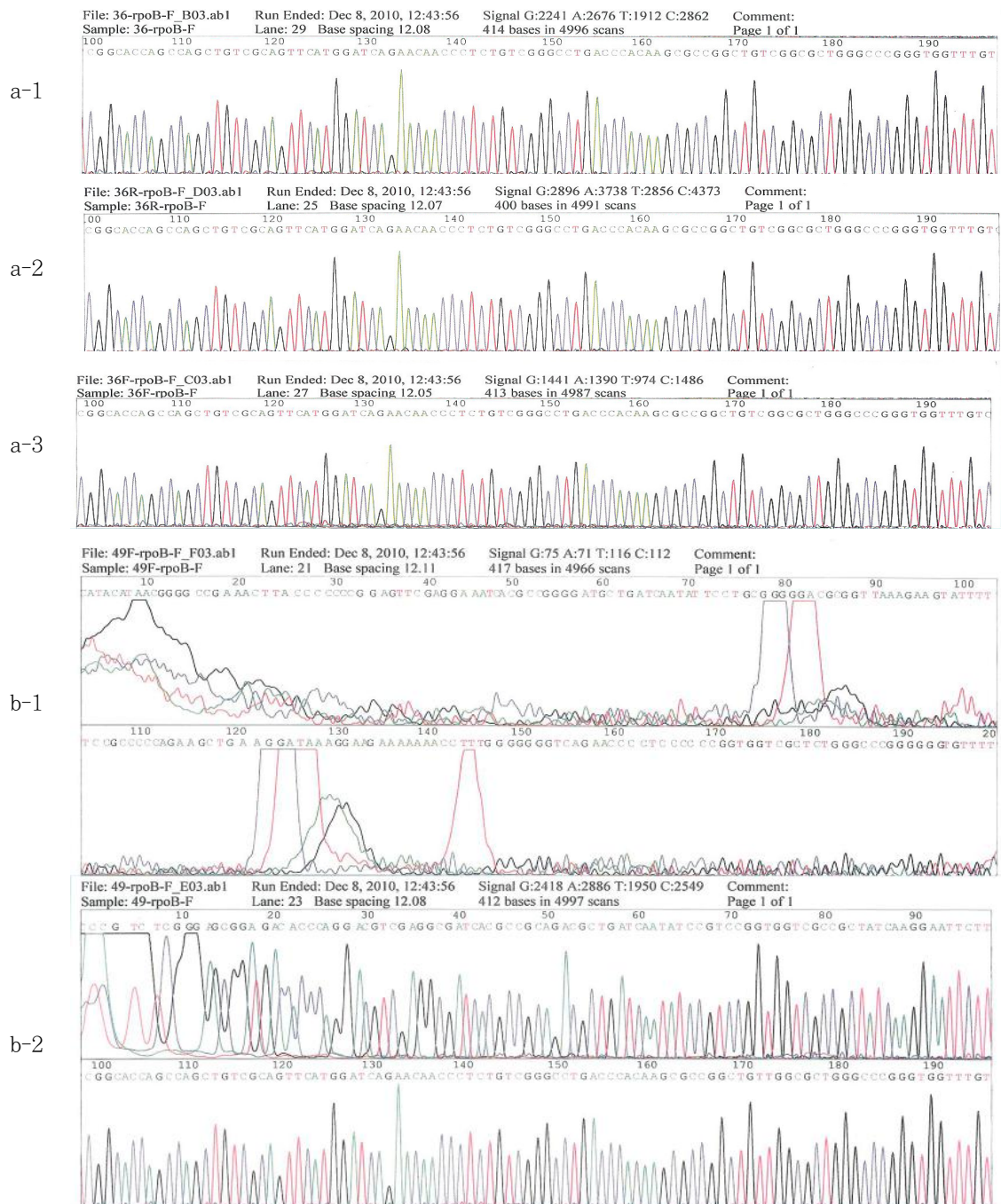


Fig. 3. Examples of *rpoB* sequencing results.

successful cases:a-1: non-amplification, a-2: amplification by REPLI-g® Mini Kits, a-3: amplification by REPLI-g® Ultrafast Mini Kits  
fail cases:b-1: amplification by REPLI-g® Ultrafast Mini Kits, b-2: non-amplification

## IV. 고찰 및 결론

유전자학 기술의 발전은 질병 역학과 전파의 새로운 인식을 제공해주는 분자생물학에 기초한 역학 연구를 매우 용이하게 하였다. 또한 총 게놈 염기배열에 대한 증가된 어레이는 질병의 유전적 결정자(유전자)의 발현의 가능성으로 임상 분리주와 검사실 분리주 간의 비교를 가능하게 하였다. 비록 유전자 분석 전략이 많은 감염병의 역학 연구에 상당한 영향을 갖고 있기는 하지만 많은 게놈 시퀀싱과 검출법을 위해 주형 DNA가 필요하다<sup>9)</sup>. 중합효소연쇄반응과 같은 높은 민감성을 갖는 분석방법에서 서로 다른 유전자 loci(유전자 좌)의 다수를 한 시료에서 검사해야 하는 경우 종종 주형 DNA의 제한된 양의 문제가 필연적으로 발생된다. 동시에 임상 시료 상의 다양성과 어려움은 급속히 증가하고 있다. 미생물 생태학은 유전자와 많은 환경에서의 사회를 조사하고 있다<sup>10)</sup>. 병원체의 검출은 적은 수라는 한계에 봉착한다. 특히 절대 세포내 유기체인 나균(*Mycobacterium leprae*)에 의한 한센병에서의 어려움은 크다. 일차적 이유는 나균을 배양할 수 없고 특히 희균형에서는 임상 시료에서 직접 총 게놈 DNA를 분석할 수 없다는 것이다. 분자 유형 분류의 최근 접근법은 microsatellite analysis 같은 유전자 자리 간의 비교이다. 그러나 밀접한 연관성이 있는 세균 균주 간에 대한 고해상 분석의 적용이 질병의 이해를 높이기 때문에, 유전자 자리의 적은 단위의 연구가 진행되어야 하는데, 만약 충분한 양의 완전한 게놈 DNA를 얻을 수 있다면 이러한 방법의 수행은 가능할 것이다.

배양이 되지 않은 세균에서는 특히 임상 시료에서 충분한 양의 게놈 DNA를 취하기가 어렵다<sup>11)</sup>.

제한된 DNA 샘플의 양을 증가시키는 방법으로 전 유전자 증폭법<sup>1,2)</sup>이 개발되었다. DNA 검체량은 한정되어 있으나, 많은 해석이 필요할 때 이것은 유용하다. 프로토콜과 복제의 정확성에 모두 차이가 있는 다양한 전 유전자 증폭법이 개발되었다. 전 유전자 증폭은 다중전위증폭(MDA)<sup>4,12)</sup>, Primer extension preamplification (PEP법)<sup>2)</sup>, degenerate oligonucleotide primed PCR(DOP법)<sup>1)</sup> 등 세 개의 형태로 개발되어 왔다.

퇴행성 올리고뉴클레오티드 효소중합연쇄반응(Degenerate Oligonucleotide PCR, DOP-PCR)<sup>1)</sup>과 시발체 확장 전증폭법(Primer Extension Preamplification (PEP))<sup>2)</sup> 등 효소중합연쇄반응 기반의 전 유전자 증폭 기술이 2가지 있다. 이 기법 사이의 주요 차이점은 DOP - PCR이 semidegenerate oligonucleotides와 증가된 효소중합연쇄반응 결합온도를 사용하는 반면 PEP는 임위 시발체와 낮은 결합온도를 사용하는 점이다. PCR 기반의 전유전체증폭법(DOP-PCR, PEP)은 2차 DNA의 구조에 의해 영향을 받는다. 이러한 구조는 효소 편차<sup>13)</sup>와 효소의 분리를 일으킬 수 있는데, 이로 인하여 비 특이 증폭, loci의 불완전 획득, 작은 DNA 조각(1kb 이하) 등이 발생한다<sup>4)</sup>.

MDA(multiple displacement amplification, 다중변위증폭법)<sup>3,4)</sup> (Fig. 3)은 임위 시발

체가 전체 주형 DNA를 대상으로 사용된다. 반응성이 뛰어나고, 강력한 성분변위성을 갖는 *Bacillus subtilis* bacteriophage Phi 29에서 유래된 Phi 29 DNA 중합효소가 사용된다<sup>14)</sup>. 이 중합효소는 시발체 주형에 결합하여 평균 70,000개의 뉴클레오티드를 붙인다<sup>15)</sup>. 이는 중합효소가 동시에 먼저 확장된 산물이 변위하는 동안 새로운 시발체가 확장하면서 같은 주형에서 여러번 복사하는 특성에 의한다. 지수증폭 가지가 있는 DNA 중간구조를 통하여 지수증폭이 이루어진다. MDA의 다른 양상은 2개의 3' 말단 뉴클레오티드의 phosphorothioate 결합에 의한 임위 시발체의 방어이다<sup>3)</sup>. 이는 변화된 시발체로부터 DNA 중합효소의 3'-5' exonuclease 교정능력을 보호하는데 필수적이다. 이 교정 능력의 장점은 MDA에서의 변이의 최소화에 있다<sup>16)</sup>. MDA에 의해 증폭된 시료를 사용한 DNA 시퀀싱에서의 기본적인 오류는 증폭하지 않은 주형에 비해 크게 구분할 수 없었고, 일부 시퀀스의 소실이 MDA 중 발생하였으나, 99.8%의 게놈이 존재하였다<sup>17,18)</sup>. 매우 적은 양의 주형 사용은 보다 높은 증폭을 가능케 하지만, 높은 증폭 오류를 야기한다<sup>10)</sup>. MDA는 보고에 의하면 여러 증폭법 중 가장 낮은 오류를 보인다고 한다<sup>19)</sup>. MDA는 DNA시료의 준비와 증폭을 위한 간편한 방법으로 많

이 사용되고 있다. 유전자형 분석 부분에서 다양하게 사용되고 있다<sup>9,16,19-22)</sup>. 감염병의 경우에는 한센병 환자의 피부에서 분리한 나균을 게놈 분석을 위해 다중전위증폭법으로 증폭하였다. 나종형 한센병 환자의 조직에서 분리된 시료를 사용하여, 증폭 정확도, 게놈 회복 정도, 국소 증폭 편중을 평가했다. 증폭된 유전자 물질의 충실도는 변하지 않았고, 비교 미세배열 분석을 통한 전체 증폭 효율성에서 국소적 차이는 증폭된 게놈 DNA의 높은 일치 정도가 관찰되었다. 또, 한센병 환자에서 얻은 보관된 조직에 대한 짧은 염기서열 반복에 의한 분자 유형 분류를 목적을 위해 이 방법을 적용하였는데, 그 결과 오류 발생 없이 성공률은 25%에서 92%로 증가되었다고 보고하였다<sup>11)</sup>.

본 실험에서는 상업적으로 소개된 MDA 중 QIAGEN®사의 REPLI-g® Mini Kits 및 REPLI-g® Ultrafast Mini Kits을 사용하였다. REPLI-g® Mini Kit 증폭은 쉽고 빠른 setup이 가능한 진보된 기술로서 다양한 시료에서 부터 재현성 있는 증폭이 제공되고, 연구에 필요한 충분한 DNA를 획득함으로써 귀중한 시료에서 더 많은 분석이 가능하고, 자동화된 신뢰성 있는 protocol을 가짐으로서 믿을 수 있는 일관적 결과를 얻을 수 있는 장점을 가지고 있다. 특히 최근에는

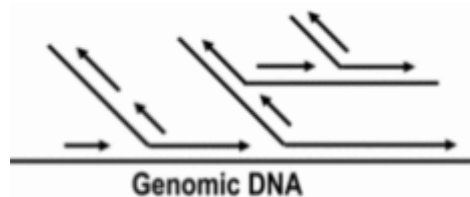


Fig. 3. MDA(multiple displacement amplification<sup>23)</sup>)

REPLI-g® Ultrafast Mini Kit가 개발되었는데 이는 60~90분 이내의 빠르고 간단한 시료를 증폭하여 시간 절감 효과를 얻을 수 있다고 한다. REPLI-g® Mini Kit 및 REPLI-g® Ultrafast Mini Kit을 통한 증폭 실험에서 모두에서 통계적 의의를 보였고, 진단(RLEP, r1-r4), 역학(ttc repeat), 약제 내성(*rpoB*)에 대한 다양한 과정의 나균 DNA의 중합효소연쇄반응 모두에서 전기영동 상 증폭양상이 관찰되었다. 그러나 시퀀싱에 경우에는 REPLI-g® Mini Kit에서는 단지 약제 내성(*rpoB*)에서만 1예에서 판독이 불가하였으나, REPLI-g® Ultrafast Mini Kit에서는 역학(ttc repeat), 약제 내성(*rpoB*) 모두에서 각각 1예, 3예에서 판독이 불가하였다. 이로 보아 증폭 시간이 60~90분 이내로 REPLI-g® Ultrafast Mini Kit가 시간 절감 효과를 얻을 수 있으나, 그 정확성 면에서는 REPLI-g® Mini Kit 보다 못한 것으로 시료된다. 또한 그 증폭량도 REPLI-g® Mini Kit의 경우 50ul인 반면, REPLI-g® Ultrafast Mini Kit의 경우 20ul이므로, 급한 경우가 아니면, REPLI-g® Mini Kit을 통한 증폭을 이용하는 것이 좀 더 효율적이라 사료된다.

한센병의 경우 질병 속성 상 다양한 접근을 위한 시료(나균 균체, 파생 세포물질, DNA 등)의 확보가 어렵고, 한센병 저유병 국가는 물론 고유병 국가에서도 한센병에 대한 관심 저하로 인하여 숙련된 관련자가 부족하다. 이에 효율적이고 간편한 분자생물학적 접근을 위한 체계적인 접근법을 정립할 필요가 있다. 따라서 다양한 분자생물학적 기법의 효율적인 체계를 정립함으로써 한센병 관리의 효과를 높일 수 있다. 그러기

위하여 검체에서 나균 DNA를 분리한 후 이를 REPLI-g Mini Kit을 이용하여 증폭한 후 다양한 분자생물학적 접근을 시도하는 것이 효율적인 접근이라 사료된다. 향후 이를 표준화하기 위한 다양한 경우 및 좀더 농도를 위한 나균 DNA는 물론 이번 연구에서 실시하지 못했던 다른 분자생물학적 분석법의 적용을 위한 표준안의 개발을 위해 지속적인 연구가 필수적이라 판단된다.

## <참 고 문 헌>

1. Telenius H, Carter NP, Bebb CE, et al: Degenerate oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 1992;13:718-725
2. Zhang L, Cui X, Schmitt K, et al: Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:5847-5851.
3. Dean FB, Nelson JR, Giesler TL et al: Rapid amplification of plasmid and phage DNA using  $\phi$ 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res.* 2001;11:1095-1099
4. Dean FB, Hosono S, Fang L, et al: Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002;99:5261-5266

5. Matsuoka M, Kashiwabara Y, Namisato M.: A *Mycobacterium leprae* isolate resistant to dapsone, rifampin, ofloxacin and sparflaxacin. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2000;68(4):452-455.
6. Donoghue HD, Holton J, Spigelman M.: PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. *J Med Microbiol.* 2001;50(2): 177-182
7. Wang HY, Whang JH, Kim JP, et al: Improved Detection of *Mycobacterium leprae* by One-tube Nested Polymerase Chain Reaction. *J. Exp. Biol. Med. Sci.* 2007;13:319-324
8. Shin YC, Lee H, Walsh GP. et al: Variable numbers of TTC repeats in *Mycobacterium leprae* DNA from leprosy patients and use in strain differentiation. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38:4535-4538
9. Lasken RS, Egholm M: Whole genome amplification: abundant supplies of DNA from precious samples or clinical specimens. *Trends Biotechnol.* 2003;21:531-535
10. Binga EK, Lasken RS, Neufeld LD: Something from (almost) nothing: the impact of multiple displacement amplification on microbial ecology. *ISME J.* 2008;2:233-241
11. Grothouse NA, Brown SE, Knudson DL, et al: Isothermal amplification and molecular typing of the obligate intracellular pathogen *Mycobacterium leprae* isolated from tissues of unknown origins. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44:1502-1508
12. Lage JM, Leamon JH, Pejovic T, et al: Whole genome analysis of genetic alterations in small DNA samples using hyperbranched strand displacement amplification and array-CGH. *Genome Res* 2003;13:294-307.
13. Viguera E, Canceill D, Ehrlich SD: Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *EMBO J.* 2001;20: 2587-2595
14. Blanco L, Salas M: Characterization and purification of a phage  $\phi$  29-encoded DNA polymerase required for the initiation of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1984;81:5325-5329
15. Blanco L, Bernad A, Lazaro JM, et al: Highly efficient DNA synthesis by the phage  $\phi$ 29 DNA polymerase: symmetrical mode of DNA replication. *J. Biol. Chem.* 1989;264:8935-8940
16. Nelson JR, Cai YC, Giesler TL, et al: TempliPhi,  $\phi$ 29 DNA polymerase based rolling circle amplification of templates for DNA sequencing. *BioTechniques* 2002;32(Suppl.):44-47
17. Paez JG, Lin M, Beroukhir R, et al: () Genome coverage and sequence

- fidelity of  $\phi$ 29 polymerase-based multiple-strand displacement whole-genome amplification. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:e71
18. Zhang K, Martiny AC, Reppas NB, et al: Sequencing genomes from single cells by polymerase cloning. *Nat. Biotechnol.* 2006;24: 680-686
  19. Hosono S, Faruqi AF, Dean FB, et al: Unbiased whole-genome amplification directly from clinical samples. *Genome Res.* 2003;13:954-964
  20. Detter JC, Jett JM, Lucas SM, et al: Isothermal strand-displacement amplification applications for high-throughput genomics. *Genomics* 2002;80:691-698
  21. Barker DL, Hansen MS, Faruqi AF et al: Two methods of whole-genome amplification enable accurate genotyping across a 2320-SNP linkage panel. *Genome Res.* 2004;14:901-907
  22. Spits C, Le Caignec C, De Rycke M, et al: Optimization and evaluation of single-cell whole-genome multiple displacement amplification. *Hum. Mutat.* 2006;27: 496-503
  23. Lasken RS. Genomic DNA amplification by the multiple displacement amplification (MDA) method. *Biochem Soc Trans.* 2009;37(Pt 2):450-3.