

## 말라세지아 효모균의 분자생물학적 분석으로서 집락 종합효소연쇄반응의 적용

건국대학교 의학전문대학원 피부과학교실

김상민 · 임상희 · 정보라 · 이양원 · 최용범 · 안규중

= Abstract =

### The Application of Colony PCR in the Molecular Biological Analysis of *Malassezia* Yeasts

Sang Min Kim, Sang Hee Lim, Bo Ra Jung, Yang Won Lee,  
Yong Beom Choe and Kyu Joong Ahn

Department of Dermatology, Konkuk University School of Medicine, Seoul, Korea

**Background:** *Malassezia* yeasts are lipophilic fungi that are found in 75~80% of healthy adults. The yeasts are known to be associated with pityriasis versicolor, seborrheic dermatitis, *Malassezia* folliculitis, and recently its pathogenicity is being expanded to other various skin disorders, such as atopic dermatitis and acne vulgaris. Recently, various molecular biological techniques are being preferred over morphological analysis. In order to perform a DNA-based diagnostic test, availability of a simple, rapid, and reliable DNA extraction protocol is essential.

**Objective:** We sought to implement novel molecular biology technique, namely colony PCR method using microwave as the easiest way to amplification of *Malassezia* target DNA, and assess its clinical applicability.

**Methods:** Instead of using templates of purified genomic DNA, we performed the PCR directly from *Malassezia* colonies. A fresh yeast colony transferred to the bottom of a microcentrifuge tube and microwaved for 1 min three times in the presence of a pyrex beaker containing 50 ml of sterile water to dissipate excess heat. Following this microwave lysis, PCR-reaction mixture was added directly to the microcentrifuge tube. Two DNA extraction methods (boiling method, glass beads method) were used for comparing the sensitivity and effectiveness with the colony PCR method. All reactions were performed using the primers 26S and ITS1 complementary to the rDNA region.

#### Results

1. As a result of gel electrophoresis, we recognized expected PCR products (approximately 580 bp for 26S rDNA and 250~320 bp for ITS1) from both colony PCR method and two DNA extraction methods (boiling method, glass beads method).

2. As a result of measuring nucleic acid level with the spectrophotometer, colony PCR disregarding DNA extraction process shows relatively similar PCR efficacy compared with the boiling and glass beads method. And there is no significant difference among those methods statistically ( $p>0.001$ ).

3. In conducting the PCR method, boiling method required approximately 400 minutes, and glass beads method required approximately 360 minutes, respectively. As contrasted with two methods, colony

†별책 요청 저자: 이양원, 143-729 서울시 광진구 화양동 4-12, 건국대학교병원 피부과  
전화: (02) 2030-5170, Fax: (02) 2030-5179, e-mail: 20050078@kuh.ac.kr

PCR method required approximately 150 minutes, and could be capable of saving time. In addition, colony PCR had an economic efficiency comparing with boiling method and glass beads methods.

**Conclusions:** All these findings suggest that directly application of the *Malassezia* yeasts obtained from culture colony for PCR reaction is a fast, reliable, cost-effective and simple method for performing any PCR-based protocol including diagnostic tests. [**Kor J Med Mycol 2007; 12(4): 180-188**]

**Key Words:** *Malassezia*, Colony-PCR

## 서 론

말라세지아 효모균 (*Malassezia* yeasts)은 지질 친화성 균종으로 피부의 정상 균총에 속하는 진균이며 건강한 성인의 75~98%에서 발견된다<sup>1,2</sup>. 본 효모균은 어루러기, 지루피부염, 말라세지아 모낭염 등의 피부질환과 관련되어 있다고 알려져 왔으며, 최근 아토피피부염과 심상성여드름 및 건선에 이르기까지 그 원인균으로서 병원성이 점차 대두되고 있다<sup>3-5</sup>. 최근에는 말라세지아 효모균의 동정에 있어서 amplified fragment length polymorphism (AFLP), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), random amplification of polymorphic DNA (RAPD), single strand conformation polymorphism (SSCP), terminal fragment length polymorphism (tFLP), restriction fragment length polymorphism (RFLP) 등 다양한 분자생물학적 기법을 적용하고 있으며<sup>6-14</sup>, 국내에서도 26S rDNA PCR-RFLP 방법을 이용한 말라세지아 효모균의 분자생물학적 동정에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다<sup>24</sup>. 실제 말라세지아 효모균의 동정과 진단검사에 있어 분자생물학적 기법의 임상적용 가능성 및 유용성이 요구되고 있으며 최근에는 경제적이고 효율적인 새로운 분자생물학적 기법들이 개발되고 있다. 이에 본 연구에서는 말라세지아 효모균의 분자생물학적 분석 및 진단에 있어 시간단축과 더불어 경제적이고 효율적인 방법 개발을 위해 극초단파를 이용하여 DNA 추출과정을 생략하는 집락 (colony) 중합효소연쇄반응 (PCR) 방법을 시도하였다. 집락 PCR 방법의 진단적 가치를 평가하기 위해 기존의 말라세지아 효모균으로부터 직접 DNA를 추출하는 boiling

방법과 glass beads를 이용한 방법과 비교 분석하였다<sup>16</sup>.

이에 저자들은 집락 PCR 방법을 이용하여 말라세지아 효모균의 역학적 연구 및 신속한 진단 방법으로서 적용 가능성을 제시하고 그 연구 결과를 보고한다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구대상

#### 1) 표준균주 (Standard strains)

말라세지아 효모균의 11개 표준균주를 대상으로 실험을 진행하였다. 말라세지아 효모균의 표준균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 분양 받은 *M. furfur* (KCTC 7743), *M. obtusa* (KCTC 7847), *M. pachydermatis* (KCTC 17008), *M. restricta* (KCTC 7848), *M. slooffiae* (KCTC 17431), *M. sympodialis* (KCTC 7985) 6종과 Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)에서 분양 받은 *M. globosa* (CBS 7966), *M. yamatoensis* (CBS 9725) 2종, Japanese Collection of Microorganisms (JCM)에서 분양 받은 *M. dermatitis* (JCM 11348), *M. nana* (JCM 12085), *M. japonica* (CBS 9432) 4종을 포함하여 총 11개 말라세지아 표준균주를 대상으로 하였다 (Table 1). 11개 말라세지아 표준균주를 Leeming 과 Notman 배지에 접종한 후 34°C에서 2주간 배양하였다<sup>15</sup>.

#### 2. Boiling 방법과 Glass beads 방법을 이용한 genomic DNA 분리 및 PCR

##### 1) Boiling 방법

균체를 채취하여 400 µl의 lysis buffer (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5% SDS, 30 mM EDTA)를 첨가

**Table 1.** GenBank accession numbers of 26S rRNA D1/D2 gene and ITS1 gene sequences of 11 standard species of *Malassezia* yeast used in this study

Species	Standard Strains	Accession No. of D1/D2	Accession No. of ITS1
<i>M. dermatis</i>	JCM 11348	AB070361	AB070356
<i>M. furfur</i>	KCTC 7743	AY743602	AY743634
<i>M. globosa</i>	CBS 7966	AY743604	AY743630
<i>M. japonica</i>	CBS 9432	-	AB105199
<i>M. nana</i>	JCM 12085	AB105862	AB105863
<i>M. obtusa</i>	KCTC 7847	AY743629	AB111461
<i>M. pachydermatis</i>	KCTC 17008	AY743605	AY743637
<i>M. restricta</i>	KCTC 7848	AY743607	AY743636
<i>M. slooffiae</i>	KCTC 17431	AY743606	AY743633
<i>M. sympodialis</i>	KCTC 7985	AY743626	AY743632
<i>M. yamatoensis</i>	CBS 9725	-	AB125265

KCTC: Korean Collection for Type Cultures, CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, JCM: Japanese Collection of Microorganisms, *M.*: *Malassezia*

한 후 100°C에서 15분간 가열하였다. 400 µl의 2.5 M potassium acetate를 첨가하고 -20°C에서 10분간 두었다가 다시 10분간 15,000 rpm으로 원심분리하였다. 상등액과 동량의 P/C/I (phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25 : 24 : 1, v/v)을 섞은 후 5분간 흔들었다. 10분간 15,000 rpm으로 원심분리 후 상등액을 eppendorf tube에 옮겨 동량의 C/I (chloroform : isoamyl alcohol = 24 : 1, v/v)을 넣고 다시 한 번 추출하였다. 각각의 시험관에 iso-propanol을 첨가하여 -20°C에서 2시간 DNA를 침전시킨 후 15분간 15,000 rpm으로 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후 DNA의 침전물을 70% ethanol로 세척하고 실온에서 건조시킨 후 증류수로 용해시켜 -20°C에서 보관하였다<sup>16</sup>.

2) Glass beads 방법

균체를 채취하여 400 µl의 lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.0% SDS, 2.0% Triton X-100, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl)를 첨가한 후 10초간 흔들었다. 다시 400 µl P/C/I (phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25 : 24 : 1, v/v)을 섞은 후 0.5 mm 직경의 glass beads 400 mg을 혼합한 후 실온에서 10분간 흔들었다. 10분간 15,000 rpm으로 원심분

리하고 상등액을 eppendorf 시험관에 옮긴 후 동량의 C/I (chloroform : isoamyl alcohol = 24 : 1, v/v)을 넣고 실온에서 10분간 흔든 후 다시 10분간 15,000 rpm으로 원심분리하였다. 상등액과 동량의 isopropanol을 첨가하고 -20°C에서 2시간 DNA를 침전시킨 후 15분간 15,000 rpm으로 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 70% ethanol로 세척하여 실온에서 건조시킨 후 증류수로 용해시켜 -20°C에서 보관하였다<sup>16</sup>.

3) 26S rDNA과 ITS1 부위의 PCR

26S rDNA을 증폭하기 위해 11종의 표준균주를 한 번에 증폭이 가능하도록 하는 염기서열을 선택하였다. 그 염기서열은 forward 5'-TAACAA-GGATTCCCCTAGTA-3', reverse 5'-ATTACGCCAG-CATCCTAAG-3'이었다<sup>17</sup>. 0.25 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTPs), 10 × PCR buffer, 5 × Q buffer, 0.25 M primer, 1 U Hot StarTaq polymerase (Qiagen, Qiagen GmbH, Hilden, Germany), genomic DNA 용액 1 µl을 포함하여 PCR 증폭을 위한 반응 혼합물이 30 µl가 되도록 하였다. PCR은 DNA Engine Dyad (MJ Research Inc, Waltham, MA, USA)를 사용하였다. 반응 조건은 pre-denaturation 단계 95°C에

서 14분, denaturation 단계 94°C에서 45초, annealing 단계 50°C에서 35초, 72°C에서 30초간 extension을 35회 반복하였고 마지막 extension은 72°C에서 7분간 시행하였다.

ITS1을 증폭하기 위해 NCBI로부터 얻어낸 11종의 표준균주 염기서열을 바탕으로 primer를 선택하였다. 그 염기서열은 forward 5'-AGGTTTCCGTAGGTGAACCT-3', reverse 5'-TTCGCTGCGTTCTTCATCGA-3'이었다<sup>17</sup>. ITS1의 PCR 조건은 26S rDNA 증폭과 동일한 방법으로 시행하였다.

증폭된 DNA는 TAE buffer상에서 1% (w/v) agarose gel을 100 volt로 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 UV 투과조명기 (UV transilluminator)로 관찰하였다.

### 3. 극초단파 (Microwave)를 이용한 집락 PCR 방법

멸균된 loop를 이용하여 단일 집락에서 균체를 채취하여 microcentrifuge tube에 옮기고 극초단파상에서 증탕 법으로 1분씩 3번 시행하였다. 곧바로 PCR 시험관을 4°C로 옮기고 26S rDNA과 ITS1 부위의 증폭을 위해 PCR 반응 혼합물을 첨가한 후 충분히 흔들어 준 후 DNA Engine Dyad (MJ Research Inc, Waltham, MA, USA)를 사용하여 PCR을 시행하였다. 이 때 PCR 반응 혼합물은 0.25 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTPs), 10× PCR buffer, 5× Q buffer, 0.5 M primer, 1.25 U Hot StarTaq polymerase, 20 mM MgSO<sub>4</sub> 용액을 포함하여 PCR 증폭을 위한 최종 반응 혼합물의 양이 30 µl가 되도록 하였다. 26S rDNA과 ITS1 부위의 PCR 반응 조건은 boiling 방법과 glass beads 방법의 PCR과 동일하게 시행하였다.

증폭된 DNA는 TAE buffer상에서 1% (w/v) agarose gel을 100 volt로 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 UV 투과조명기 (UV transilluminator)로 관찰하였다.

### 4. 핵산 (nucleic acids)의 농도와 순도 측정

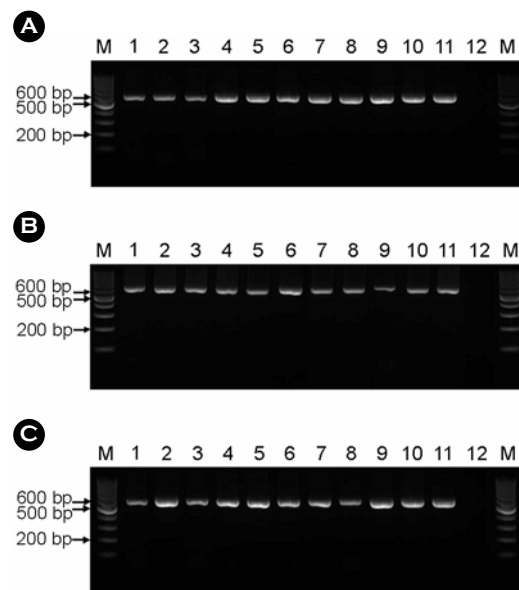
정제된 DNA의 농도 및 순도는 흡광도 측정

(Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer; Nanodrop Technologies, Rockland, USA)을 통해 확인하였다. 260 nm의 파장에서 핵산의 농도를 측정하였고 pipette의 사용과 pedal 사이의 표면장력의 변화에 의한 측정값의 오차를 줄이기 위하여 3회 반복하여 평균을 내었다. 또한 A260/A280 (흡광도 비율)을 계산하여 DNA의 순도를 확인하였다.

## 결 과

### 1. Boiling 방법, Glass beads 방법, 극초단파를 이용한 집락 PCR 방법의 26S rDNA과 ITS1 부위의 PCR

11종의 말라세지아 효모균으로부터 직접 DNA를 추출하는 boiling 방법, glass beads 방법과 함께 genomic DNA를 추출하는 과정 없이 극초단파를



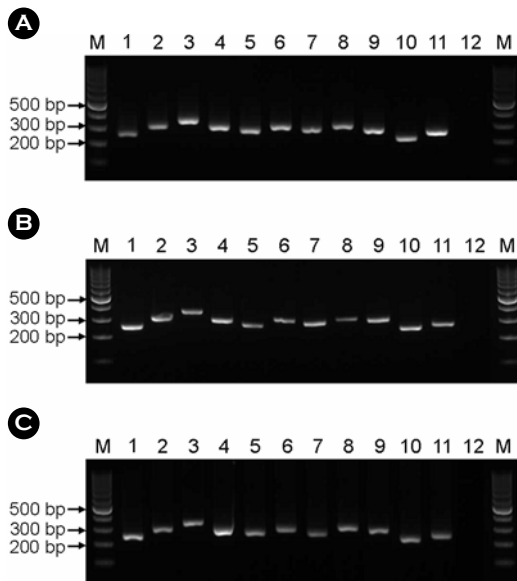
**Fig. 1.** 26S rDNA PCR products of 11 *Malassezia* on three different methods: boiling method (A), glass beads method (B) and colony PCR method (C). Lane M; 100 bp DNA ladder, Lane 1; *M. furfur* (KCTC 7743), Lane 2; *M. sympodialis* (KCTC 7985), Lane 3; *M. globosa* (CBS 7966), Lane 4; *M. restricta* (KCTC 7848), Lane 5; *M. slooffiae* (KCTC 17431), Lane 6; *M. pachydermatis* (KCTC 17008), Lane 7; *M. japonica* (CBS 9432), Lane 8; *M. nana* (JCM 12085), Lane 9; *M. dermatitis* (JCM 11348), Lane 10; *M. obtusa* (KCTC 7847), Lane 11; *M. yamatoensis* (CBS 9725), Lane 12; negative control.

이용한 집락 PCR 방법을 시도하여 26S rDNA 부위와 ITS1 부위의 PCR을 성공적으로 수행하였다. 그 결과 11가지 표준균주에서 모두 각각 예상되는 크기의 PCR 띠 (band)를 확인할 수 있었다 (Fig. 1, Fig. 2). 세 가지 방법을 통하여 확인된 26S rDNA PCR 증폭 산물의 크기는 대략 580 bp이었고 ITS1 PCR 증폭 산물의 크기는 대략 250~320 bp이었다.

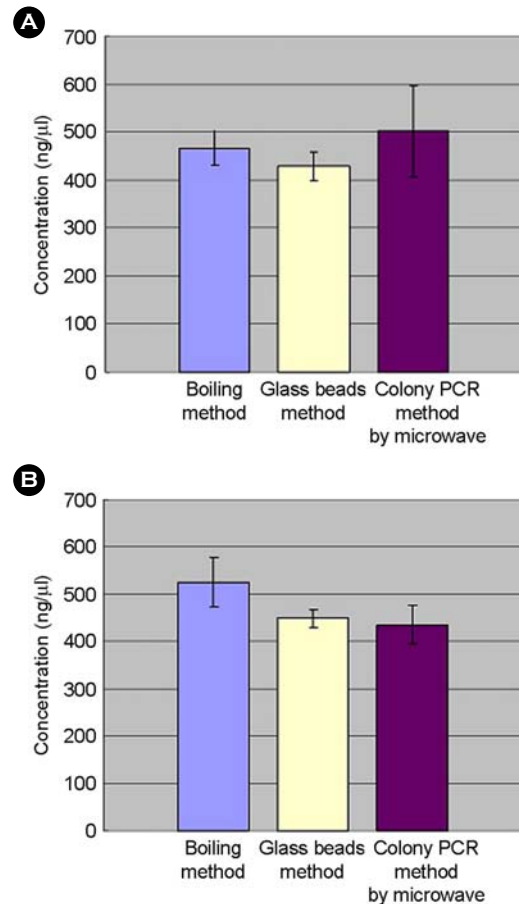
2. 말라세지아 효모균의 DNA 추출 방법에 따른 PCR 효율의 비교 분석

11종의 말라세지아 표준균주를 대상으로 분광광도계 (spectrophotometer)를 이용하여 핵산의 농도를 측정된 결과 26S rDNA의 경우 boiling 방법을 이용한 PCR은 411.3~519.1 ng/μl, glass beads 방법을 이용한 PCR은 409.6~514.2 ng/μl, colony

PCR 방법을 이용한 PCR은 429.1~719.8 ng/μl로 세 가지 방법 간에 유의한 결과의 차이는 없었다 ( $p>0.001$ ). ITS1의 경우도 boiling 방법을 이용한 PCR은 407.4~577.2 ng/μl, glass beads 방법을 이용한 PCR은 423.1~485.3 ng/μl, colony PCR 방법을 이용한 PCR은 400~523.6 ng/μl으로 세 가지



**Fig. 2.** ITS 1 PCR products of 11 *Malassezia* on three different methods: boiling method (A), glass beads method (B) and colony PCR method (C). Lane M; 100 bp DNA ladder, Lane 1; *M. furfur* (KCTC 7743), Lane 2; *M. sympodialis* (KCTC 7985), Lane 3; *M. globosa* (CBS 7966), Lane 4; *M. restricta* (KCTC 7848), Lane 5; *M. slooffiae* (KCTC 17431), Lane 6; *M. pachydermatis* (KCTC 17008), Lane 7; *M. japonica* (CBS 9432), Lane 8; *M. nana* (JCM 12085), Lane 9; *M. dermatis* (JCM 11348), Lane 10; *M. obtusa* (KCTC 7847), Lane 11; *M. yamatoensis* (CBS 9725), Lane 12; negative control.



**Fig. 3.** Comparison of DNA yields of 26S rDNA PCR product (A) and ITS 1 PCR product (B) amplified from 11 *Malassezia* standard strains following three different methods: boiling method, glass beads method and colony PCR method. The concentration of nucleic acids was measured in spectrophotometer (Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Rockland, USA)). The 26S rDNA were 411.3~519.1 ng/μl by boiling method, 409.6~514.2 ng/μl by glass beads method and 429.1~719.8 ng/μl colony PCR method, respectively ( $p>0.001$ ). And the ITS1 were 407.4~577.2 ng/μl by boiling method, 423.1~485.3 ng/μl by glass beads method and 400~523.6 ng/μl colony PCR method, respectively ( $p>0.001$ ).

**Table 2.** Summary of the three methods

Method	DNA Yield		Time (min)*	A260/A280	Cost/Sample (won)
	Total DNA	PCR Sensitivity			
Boiling	High	sensitive	400	1.84~1.88	< 800
Glass beads	High	sensitive	360	1.85~1.87	< 1000
Colony PCR	ND**	sensitive	150	1.78~1.85	< 500

\*Average lengths of whole preparation time for PCR amplification of 11 *Malassezia* yeasts., \*\*ND: not detect

방법 간에 유의한 결과의 차이는 없었다 ( $p > 0.001$ ). 또한, A260/A280 (흡광도 비율)을 계산하여 DNA의 순도를 측정된 결과 집락 PCR 방법은 직접 DNA를 추출하는 방법인 boiling 방법, glass beads 방법과 비교하여 유사한 결과를 보였다 (Fig. 3).

결과적으로 말라세지아 효모균의 분자생물학적 분석 및 진단에 있어 극초단파를 이용한 집락 PCR 방법은 boiling 방법, glass beads 방법과 비교하여 PCR 민감도와 PCR 효율적 측면에서는 유사한 결과를 보였다. DNA의 순도 (A260/A280)는 11종의 말라세지아 효모균에서 boiling 방법의 경우 1.84~1.88, glass beads 방법의 경우 1.85~1.87, 집락 PCR 방법의 경우 1.78~1.85의 범위에서 측정되었다.

### 3. 말라세지아 효모균의 DNA 추출 방법에 따른 시간적, 경제적 측면의 비교 분석

PCR을 시행하기 위해 소요되는 대략적인 시간은 각각 boiling 방법의 경우 400분, glass beads 방법의 경우 360분이었으나 이와 대조적으로 극초단파를 이용한 집락 PCR 방법의 경우 150분으로 다른 두 가지 방법에 비해 절반 정도 시간이 절약되었다. 또한, 한 표본 당 비용을 비교했을 때에도 집락 PCR 방법이 boiling 방법, glass beads 방법 보다 매우 저렴하여 시간과 경제적 비용 측면에서 그 효율성을 확인하였다 (Table 2).

## 고 찰

말라세지아 효모균은 피부의 정상 균총에 속하

는 진균이며 건강한 성인의 75~98%에서 발견된다<sup>1</sup>. 1996년 Guého 등<sup>18</sup>이 형태학적, 생물학적으로 말라세지아 효모균을 총 7개 균종 (*M. furfur*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. pachydermatis*, *M. restricta*)으로 재분류한 이후 말라세지아 효모균의 진균학적 연구는 형태학적 특징에 의한 분석 (morphological analysis)과 생화학적인 분석 (biochemical analysis)을 통해 이루어져 왔다<sup>19</sup>. 그러나 최근 유전형질을 분석하기 위한 분자생물학적 기법들이 진균간의 분류 및 감별에 이용되고 있고, 이를 토대로 최근 일본에서는 새로운 4가지 균종 *M. dermatis*<sup>20</sup>, *M. japonica*<sup>21</sup>, *M. nana*<sup>22</sup>, *M. yametoensis*<sup>23</sup>를 보고하였다.

현재 형태학적인 분류의 많은 한계점을 극복하고자 유전자의 구조 및 특징을 이용하는 분자계통학적 방법이 전 세계적으로 보편화 되어가고 있으나 국내의 현실은 아직도 대부분 고전적인 방법에 의존하고 있는 실정이다. 따라서 최근에는 말라세지아 효모균의 동정 및 분류함에 있어 PCR, PFGE, AFLP, DGGE, RAPD, SSCP, tFLP, RFLP 등 다양한 분자생물학적 기법을 이용한 새로운 접근들이 시도되고 있고, 이를 분석하는 장비와 소프트웨어가 개발되고 있다<sup>6-14</sup>. 국내에서도 말라세지아의 동정기법으로 증폭된 26S rDNA를 제한효소로 분절시킨 후 잘려진 절편의 크기와 수에 따른 pattern을 분석하는 RFLP 방법을 적용하여 유전적 다양성을 확인하였으며, 이 방법이 신속, 정확하고 비용 면에서 경제성을 확인한 바 있다<sup>24</sup>.

그러나 분자생물학적 방법은 직접 진균으로부터 DNA를 추출하기 위해 boiling 방법과 glass

beads 방법 등을 이용<sup>16</sup>하고 있어 DNA 추출과정에서 한 번에 여러 개의 표본을 처리하기 어렵고 phenol, chloroform과 같은 발암성 물질에 노출될 수 있다는 단점이 있다. 또한, glass beads 방법은 한번 실험에 사용한 beads를 회수하기 어렵기 때문에 상대적으로 비용이 많이 들며, boiling 방법은 비용적인 면에서는 저렴하나 많은 시간을 필요로 한다. 뿐만 아니라, 이러한 방법들은 DNA 추출을 위해 많은 양의 균체를 필요로 하기 때문에 말라찌지아 균종에 따라 집락이 천천히 자라거나 적은양의 집락이 배양될 경우 임상적 적용이 어렵다는 한계가 있다. 이러한 한계점들을 극복하고자 본 연구에서는 말라찌지아 효모균의 분자생물학적 분석 및 진단에 있어 DNA 추출과정을 생략하고 극초단파를 이용한 집락 PCR 방법을 시도하였고 본 방법의 진단적 가치를 평가하기 위해 boiling 방법 및 glass beads 방법과 비교 분석하였다. 또한, 극초단파를 이용한 집락 PCR 방법을 이용하여 말라찌지아 효모균의 역학적 연구와 신속한 진단 방법으로서의 적용 가능성을 평가하였다.

본 실험에서 젤 전기영동을 이용하여 PCR 띠를 확인한 결과, 집락 PCR 방법 및 boiling 방법, glass beads 방법에서 PCR이 성공적으로 이루어졌고 모두 예상되는 크기의 PCR 띠를 확인할 수 있었다 (Fig. 1, Fig. 2). 분광 광도계를 이용한 DNA의 농도 및 순도의 흡광도 측정에서도 집락 PCR 방법은 직접 DNA를 추출한 후 PCR을 시행한 두 가지 방법과 유사한 효율을 보였다 (Fig. 3). Mirhendi 등<sup>26</sup>이 *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*을 집락 PCR 방법에 적용한 연구에서도 예상되는 크기의 PCR 띠가 관찰되어 집락 PCR 방법은 표적 DNA를 증폭하기에 신속하고, 경제적이며 효율적인 진단 방법임을 보고하였다.

Luo 등<sup>25</sup>은 *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*의 효모균 집락으로부터 직접 PCR을 시도함으로써 genomic DNA를 주형으로 한 PCR과 비교하여 효율성과 민감도

측면에서 우수한 방법이며 임상적용에 있어 효과적임을 밝혔다. 본 연구에서도 극초단파를 이용한 집락 PCR 방법은 정량적인 의미가 적고 실험에 사용한 DNA 표본을 보관할 수 없다는 단점과 집락의 상태에 따라 PCR 결과가 달라질 수 있다는 한계점이 있다. 그러나 genomic DNA 추출과정을 생략하여 방법을 간소화 시켰을 뿐 아니라 위에서 확인한 바와 같이 효율성과 민감도 측면에서도 DNA를 직접 추출한 다른 방법들과 비교하여 동등하였고, 시간적, 경제적 측면에서도 효율적이었다. 또한, 이 방법은 표적 DNA를 증폭하는 데 있어 단일 집락을 사용하기 때문에 집락 오염의 위험성이 적으며, 하나의 배지에서 두 가지 이상의 균주가 같이 자랄 경우 균주가 섞일 가능성이 적다. 뿐만 아니라, 균주에 따라 집락이 천천히 자라거나 적은 양의 집락이 형성될 경우에도 실험의 진행이 가능하고 원하는 결과를 도출할 수 있다는 장점이 있다<sup>26</sup>.

결과적으로 극초단파를 이용한 집락 PCR 방법은 향후 말라찌지아의 동정과 진단 방법에 있어 높은 정확성과 신뢰성 그리고 신속한 분석 방법으로 적용 가능할 뿐 아니라 이 방법을 이용하여 다양한 균주의 동정, 분류 및 진단검사 방법으로 시도할 수 있을 것이라 생각된다. 앞으로 기존 방법의 단점을 보완하는 보다 발전된 분자생물학적 기법에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

본 연구에서는 말라찌지아 효모균의 분자생물학적 분석 및 진단에 있어 시간단축과 더불어 경제적이고 효율적인 방법 개발을 위해 DNA 추출과정을 생략하는 극초단파를 이용한 집락 PCR 방법을 시도하였고 본 방법의 임상적용 가능성 및 유용성을 평가하고자 하였다. DNA를 직접 추출하는 boiling 방법 및 glass beads 방법과 함께 11개 표준균주를 대상으로 젤 전기영동을 시행하였고, 분광 광도계를 이용하여 DNA의 농도 및

순도의 흡광도를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 젤 전기영동을 시행하여 PCR 띠를 확인한 결과 극초단파를 이용한 집락 PCR 방법과 boiling method 방법, glass beads method 방법에서 예상되는 크기의 PCR 띠가 관찰되었다. 세 가지 방법을 통하여 확인된 26S rDNA PCR 증폭 산물의 크기는 580 bp이었고 ITS1 PCR 증폭 산물의 크기는 250~320 bp이었다.

2. 분광 광도계를 이용하여 핵산의 농도를 측정할 결과, DNA 추출과정을 생략하였음에도 불구하고 극초단파를 이용한 집락 PCR 방법은 boiling 방법 및 glass beads 방법과 유사한 PCR 효율을 보였고 세 방법 간에 유의한 차이는 없었다 ( $p>0.001$ ). 또한, A260/A280 (흡광도 비율)을 계산하여 DNA의 순도를 측정할 결과에서도 집락 PCR 방법은 다른 두 가지 방법과 유사하였다.

3. PCR을 시행하기 위해 소요되는 시간은 boiling 방법의 경우 400분, glass beads 방법의 경우 360분이었으나 집락 PCR 방법의 경우 150분으로 다른 두 가지 방법에 비해 두 배 이상 시간 절약이 가능하였다.

4. 한 표본 당 비용을 비교했을 때에도 집락 PCR 방법이 boiling 방법, glass beads 방법보다 매우 저렴하여 시간과 경제적 비용 측면에서 그 효율성을 확인하였다.

본 연구에서 시행한 극초단파를 이용한 집락 PCR 방법은 말라세지아 효모균을 동정 및 분류함에 시간단축과 더불어 경제적이고 효율적인 방법이었다. 따라서 말라세지아 효모균에 의한 질병의 진단검사 방법으로 유용할 것으로 생각한다. 앞으로 진균동정 및 진균질환의 역학적 조사에 활용될 수 있도록 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각한다.

## 참 고 문 헌

1. Alison SK, Ann GM, Michael PH. Yeast infection: candidiasis, Pityriasis (Tinea) versicolor. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolf K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, eds. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. 6th ed. New York: McGraw-Hill, 2003: 2006-2018
2. Ahn KJ. Taxonomy of the genus *Malassezia*. Kor J Med Mycol 1998; 3: 81-88
3. Baillon EH. Traite de botanique medicale cryptogamique, suivi du tableau de droguier de la Faculte de medecine de Paris. Doin, Paris, 1889. Cited from reference 1
4. Ljubojevic S, Skerlev M, Lipozencic J, Basta-Juzbasic A. The role of *Malassezia furfur* in dermatology. Clin Dermatol 2002; 20: 179-182
5. Kanda N. The skin fungus-induced Th1- and Th2-related cytokine, chemokine and prostaglandin E2 production in peripheral blood mononuclear cells from patients with atopic dermatitis (AD) and psoriasis vulgaris (PV). Clin Exp Allergy 2002; 32: 1243-1250
6. Gupta AK, Boekhout T, Theelen B, Summerbell R, Batra R. Identification and typing of *Malassezia* species by amplified fragment length polymorphism and sequence analyses of the internal transcribed spacer and large-subunit regions of Ribosomal DNA. J Clin Microbiol 2004; 38: 1869-1875
7. Theelen B, Silvestri M, Guho E, Van Belkum A, Boekhout T. Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). FEMS Yeast Res 2001; 1: 79-86
8. Gandra RF, Simao RC, Matsumoto FE, et al. Genotyping by RAPD-PCR analyses of *Malassezia furfur* strains from pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis patients. Mycopathologia 2006; 162: 273-280
9. Gaitanis G, Veleqraki A, Alexopoulos EC, et al. Distribution of *Malassezia* species in pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis in Greece. Typing of the major pityriasis versicolor isolate *M. globosa*. Br J Dermatol 2006; 154: 854-859



10. Gemmer CM, DeAngelis YM, Theelen B, Boekhout T, Dawson TL. Fast, noninvasive method for molecular detection and differentiation of *Malassezia* yeast species on human skin and application of the method to dandruff microbiology. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3350-3357
11. Guillot J, Deville M, Berthelemy M, Provost F, Guho E. A single PCR-restriction endonuclease analysis for rapid identification of *Malassezia* species. *Lett Appl Microbiol* 2000; 31: 400-403
12. Makimura K, Tamura Y, Kudo M, et al. Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J Med Microbiol* 2000; 49: 29-35
13. Gaitanis G, Velegriaki A, Frangoulis E, et al. Identification of *Malassezia* species from patient skin scales by PCR-RFLP. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 162-173
14. Mirhedi H, Makimura K, Zomorodian K, et al. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. *J Microbiol Methods* 2005; 61: 281-284
15. Leeming JP, Notman FH. Improved methods for isolation and enumeration of *Malassezia furfur* from human skin. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 2017-2019
16. Yamada Y, Makimura K, Merhedi H, et al. Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. *Jpn J Infect Dis* 2002; 55: 122-125
17. Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, et al. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. *J Microbiol Methods* 2005; 61: 281-284
18. Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek* 1996; 69: 337-355
19. Guillot J, Guého E, Lesourd M, et al. Identification of *Malassezia* species. A practical approach. *J Mycol Med* 1996; 6: 103-110
20. Sugita T, Takashima M, Shinoda T, et al. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1363-1367
21. Hirai A, Kano R, Makimura K, et al. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; 54: 623-627
22. Sugita T, Takashima M, Kodama M, Tsuboi R, Nishikawa. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4695-4699
23. Sugita T, Tajima M, Takashima M, et al. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiol Immunol* 2004; 48: 579-583
24. 이양원, 임상희, 안규중. *Malassezia* 효모균 동정에 26S rDNA PCR-RFLP 기법의 적용. *의진균지* 2006; 11: 141-153
25. Luo G, Mitchell TG. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 2860-2865
26. Mirhendi H, Diba K, Rezaei A, et al. Colony-PCR is a rapid and sensitive method for DNA amplification in yeasts. *Iranian J Publ Health* 2007; 36: 40-44