

Ribosomal DNA Intergenic Spacer의 Polymorphism을 이용한 *Trichophyton rubrum*의 균주간 구분

영남대학교 의과대학 피부과학교실, 성피부과의원*

최종수 · 신동훈 · 성준제* · 김기홍

=Abstract=

Strain Differentiation of *Trichophyton rubrum* Using Polymorphism of rDNA Intergenic Spacer

Jong Soo Choi, Dong Hoon Shin, Jun Je Seung* and Ki Hong Kim

Department of Dermatology, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu,
and Dr. Seung's Skin Clinic, Gumi, Korea*

Background: In Korea, *Trichophyton (T.) rubrum* is occupied more than 80% of causative fungi of dermatophytosis. Strain differentiation of *T. rubrum* is essential for epidemiologic study.

Objective: The aim of this study is to develop the primers for amplification of rDNA intergenic spacer(IGS) to detect polymorphism of *T. rubrum*.

Methods: The primers were designed from 25S and 18S of rDNA, and were applied to 20 strains of *T. rubrum*, which included 1 standard strain and 19 clinical isolates.

Results: Primers for amplification of polymorphic rDNA IGS were designed from the 3' end of the 25S (primer ANID25-3, 5' -GACAGGTTAGTTTTACCCTACTGA-3') and the 5' end of the 18S (TR18-2R, 5' -ATCTAATAAATACACCCCTTCCGA-3'). PCR condition was adjusted for detecting polymorphism. Best results were obtained at 55°C for annealing temperature and 3 minutes for extension time. Eight bands sized as 1.1, 2.4, 2.7, 2.9, 3.2, 3.8, 5 kb were amplified with PCR using the primers. With 4 bands sized 2.7, 2.9, 3.2 and 3.8 kb, 20 strains of *T. rubrum* could be grouped into 6 subtypes.

Conclusion: The PCR fingerprinting with the primers for rDNA IGS was able to differentiated strains of *T. rubrum*, and it can be applied in clinical and epidemiologic studies. The primer could be applied to other fungi with unknown sequences.

Key Words: *Trichophyton rubrum*, rDNA intergenic spacer, Polymorphism

*별책 요청 저자: 최종수, 705-717 대구광역시 남구 대명동 317-1, 영남대학교 의과대학 피부과학교실
전화: (053)620-3160, FAX: (053)622-2216, e-mail: jschoi@med.yu.ac.kr

*본 논문의 요지는 2001년 6월 1일 제 8차 대한의진균학회에서 발표하였음.

*본 논문은 대한의진균학회 연구비로 이루어졌음.

최종수 등: Ribosomal DNA intergenic spacer의 polymorphism을 이용한 *Trichophyton rubrum*의 균주간 구분

서 론

백선균이 피부와 피부부속기의 각질을 침범하여 백선증이 생기며, 피부질환의 10%를 차지한다. 백선균은 형태학적인 특징에 따라 *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*의 3가지 속으로 분류되며¹ 지금까지 약 42 균종이 알려져 있다.² 한국에서는 10 균종이 환자로부터 분리되었으며 *T. rubrum*이 가장 많아서 원인균의 80% 이상을 차지한다. *T. rubrum*은 2차 세계대전 중에 극동아시아에서 미국과 유럽으로 전파되었다고 추정되며, 세계적으로 백선증의 가장 흔한 원인균이다.^{3,4} *T. rubrum*은 사람에게 친화력을 갖고 있으며 사람에서 사람으로 전파된다고 알려져 있다. 그러나 아직까지 감염경로가 정확히 밝혀지지 않은 실정이다.

*T. rubrum*의 균주간 구별을 하는 것은 역학조사에서 매우 중요하며, 균의 감염경로를 추적하여 질병을 이해하고, 균의 변이를 파악할 수 있다. 또한 *T. rubrum*에 의한 조갑백선증 치료 후 재발하는 경우 재발과 재감염을 구분할 수 있다. 균의 감염 경로를 파악할 수 있어서 예방에 도움이 된다. 항진균제에 대한 내성균주 출현을 감지할 수 있다.

여러 진균에서 균주간의 차이를 알 수 있는 방법이 다양하게 개발되어 있지만 아직까지 *T. rubrum*의 균주간 구별을 할 수 있는 방법은 없다. 균집락의 형태를 기준으로 김⁵은 *T. rubrum*을 5가지 아형으로 분류하였다. 그러나 용모형이 가장 많으며, 도실형과 무색소형은 거의 없으므로 균주를 구분하는데는 유용하지 않다. 또한 균집락의 형태는 계대배양 중에 배양조건에 따라 변한다.⁶

근래 개발된 여러 가지 분자생물학적 방법으로 *T. rubrum*의 균주간 구별이 힘들다. Mitochondrial DNA의 restriction fragment length polymorphism⁷⁻⁹, random amplified polymorphic DNA¹⁰⁻¹⁵등의 방법들이 균종을 구분하는데는 유용하지만 *T. rubrum*의 polymorphism을 밝히지 못했다. Graeser 등¹⁶은 random amplified monomorphic

DNA marker, amplified fragment length polymorphism 및 (AC)₁₀을 이용한 PCR fingerprinting의 3가지 방법 모두를 이용한 실험에서 *T. rubrum*의 균주간 차이를 밝히지 못하였다.

진균의 ribosomal RNA gene (이하 rDNA)에는 highly conserved 부위와 highly variable 부위가 모두 존재하며, 약 100개의 다중복제로 배열되어 있다. rDNA의 ITS (internal transcribed spacer) 부위는 빨리 진화하므로 균종간의 구분이 가능하지만 동일 균종의 균주간 구분은 할 수 없다¹⁷⁻²⁰. rDNA의 intergenic spacer (이하 IGS) 또는 nontranscribed spacer (NTS)는 rDNA 중 가장 변이가 많은 부위이며, *Candida krusei*²¹, *Aspergillus fumigatus*²²에서 동일균종의 균주 간에 차이가 많음이 밝혀졌다.

Jackson 등²³은 핵 DNA를 *EcoRI*으로 절단한 후 Southern blot과 ribosomal DNA probe로 IGS의 크기를 비교하여 *T. rubrum* 50 균주를 14가지 아형으로 구분하였다. 그러나 이 방법은 제한효소 처리와 blotting에 시간이 많이 걸리고, probe를 사용하여 하는 단점이 있다. *T. rubrum*의 핵 DNA를 제한효소로 절단하여 Southern blot하는 대신에 IGS를 PCR로 증폭하여 증폭된 크기를 비교하고, 제한효소로 절단하여 균주간의 polymorphism을 구분할 수 있다면 Jackson 등²³의 방법을 간편하고, 확실하게 개선할 수 있을 것이다.

Jackson 등²⁴은 *T. rubrum*의 IGS (NTS)에서 균주간 구분이 가능한 subrepeat elements인 TRS-1과 TRS-2를 찾아내었고, 이를 각각 증폭할 수 있는 primer를 만들어서, *T. rubrum* 101 주를 23 아형으로 분류하였다. 김 등²⁵은 동일한 primer를 사용하여 한국인에서 분리한 *T. rubrum* 65주를 13 아형으로 분류하였다. 김 등²⁶도 같은 방법으로 동일한 환자의 두 병소에서 분리된 *T. rubrum* 10 쌍 중에서 4 쌍이 서로 다름을 보고하였다.

그러나 이 primer들은 *T. rubrum*에 특이하여 다른 균종에서는 반응하지 않으며, 아직까지 IGS의 염기서열이 알려진 균종은 많지 않은 실정이다. 따라서 Southern blot²³보다는 편리하고, 염기서열을 모르는 균종에도 사용할 수 있는 방법, 즉 IGS 전체를 증폭하여 polymorphism이 있는지 여부를 알 수 있는 방법이 필요하다.

대한의진균학회지 제 9권 제 4호 2004

본 실험은 *T. rubrum*의 IGS를 증폭하기 위한 primer를 제작하고, 이상적인 PCR 조건을 찾고, 증폭산물의 크기를 비교하여 polymorphism 여부를 알아보려고 한다.

재료 및 방법

백선균

*T. rubrum*의 표준균주와 여러 가지 형태의 임상분리주를 대상으로 하였다 (Table 1). 표준균주는 일본 Chiba 대학에서 공시받아 계대배양 중인 *T. rubrum* (IFM4811)을 사용하였다. 임상분리주는 대구에 거주하는 백선증 환자의 병소에서 분리한 *T. rubrum*을 사용하였다. *T. rubrum*은 영남대학교 의과대학 부속병원 피부과와 가톨릭 피부과 의원에 내원한 백선 환자의 병소에서 분리한 19 주이었다.

균배양

Sabouraud 포도당 한천배지에 접종한 후 25°C에서 1~2주간 배양한 후, 균집락을 채취하여 -70°C에 보관하였다.

DNA 분리

채취한 균집락을 주발에 넣고 액화질소로 동결된 상태에서 주발로 갈아 분말을 만들었다. 증류수로 2회 세척한 후 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1, v/v)을 섞은 후 5분간 흔들었다. 실온에서 7분간 원심분리 후 상층액을 분리하여, 3 M sodium acetate 0.1배 용적과 무수알코올 3배 용적을 가하여 -20°C에서 12시간 동안 방치하여 DNA를 침전시킨 후 진공건조하여 증류수로 용해시켜서 -20°C에서 보관하였다.

Primer

Ribosomal DNA의 IGS를 증폭하기 위하여, *T. rubrum*과 *Aspergillus nidulans*의 25S와 18S 부위 (Fig. 1)를 이용하여 primer를 제작하였다 (바이오니아사, 충북 청원).

Down stream primer : *T. rubrum*의 25S (AJ232182) 중간부위에서 TR25-1 (5'-GAGTTATCTTTTCTCT

Table 1. The list of *Trichophyton rubrum* used in this study

Code	Source	Site of isolation	IGS type
TR-1	IFM4811		D
TR-2	YUMC	Toe nail	D
TR-3	YUMC	Sole	E
TR-4	YUMC	Toe nail	B
TR-5	YUMC	Toe nail	C
TR-6	YUMC	Sole	D
TR-7	YUMC	Toe nail	D
TR-8	YUMC	Toe nail	A
TR-9	YUMC	Toe nail	C
TR-0	Chilgok	Sole	C
TR-11	Chilgok	Toe nail	C
TR-12	Chilgok	Toe nail	D
TR-13	Chilgok	Sole	F
TR-14	Chilgok	Sole	A
TR-15	Chilgok	Toe nail	F
TR-16	Chilgok	Sole	C
TR-17	Chilgok	Sole	D
TR-18	Chilgok	Toe nail	C
TR-19	Chilgok	Sole	D
TR-20	Chilgok	Toe nail	F

TR : *Trichophyton rubrum*

IFM : Institute of Food Microbiology, Chiba University

Chilgok : Catholic Skin Clinic

YUMC : Yeungnam University Medical Center

TGACGGC-3'), *Aspergillus nidulans* 25S (Z27114)의 3' 부분에서 AN25-1 (5'-ATTCGGTAAGCGTTGGATTGTTCA-3'), AN25-2 (5'-ACTAATAGGGAACGTGAGCTGGGT-3'), AN25-3 (5'-GACAGGTTAGTTTTACCCTACTGA-3'), AN25-4 (5'-AGTACGAGAGGAACCGTTGATTC-3')를 만들었다.

Up stream primer : *T. rubrum* 18S (X58570)의 5' 부위에서 TR18-1R (5'-TGATTTAATGAGCCATTCCGAGTT-3'), TR18-2R (5'-ATCTAATAAATACACCCC TTCCGA-3'), TR18-3R (5'-GCCATGCGATTCCGAGAA GTTATTA-3'), TR18-4R (5'-TCGAAAGTTGATAGGG CAGAAATT-3')을 만들었다.

최종수 등: Ribosomal DNA intergenic spacer의 polymorphism을 이용한 *Trichophyton rubrum*의 균주간 구분

PCR 증폭

반응 혼합물 50 μ l에 10 mM Tris-HCl (pH 9.0 at 25 $^{\circ}$ C), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 0.2 μ M primer, 1 Unit Ex Taq polymerase (Takara, Japan), 진균 DNA 용액 5 μ l 등을 포함한 것을 기본 농도로 하여 PCR을 시행하였다. 사용한 thermal cycler는 Perkin Elmer 480 (Perkin Elmer, Norwalk, USA)이었다.

반응조건은 처음에 denaturation (94 $^{\circ}$ C, 5분) 후, denaturation (94 $^{\circ}$ C, 30초), annealing (55 $^{\circ}$ C, 1분), extension (72 $^{\circ}$ C, 3분)을 35회 반복하였고 마지막에 extension (72 $^{\circ}$ C, 10분)을 하였다. 최적 조건을 찾기 위하여 annealing 온도는 45 $^{\circ}$ C에서 65 $^{\circ}$ C까지 변화

시키고, extension 시간을 2분에서 4분까지 변화시키면서 PCR을 시행하였다.

증폭된 DNA를 1% agarose gel에서 100 volt로 40~60분간 전기영동 (Mupid-2 Mini Gel Migration Trough, Cosmo Bio Co., LTD)후, ethidium bromide로 염색하여 ultraviolet transilluminator로 관찰하였다.

결 과

1. Primer(Fig. 2)

여러 primer들을 조합하여 PCR을 실시하였고, 그 중에서 증폭이 잘되고, polymorphism을 보이는 primer를 선택하였다.

Primer AN25-3 (5'GACAGGTTAGTTTTACCCTAC

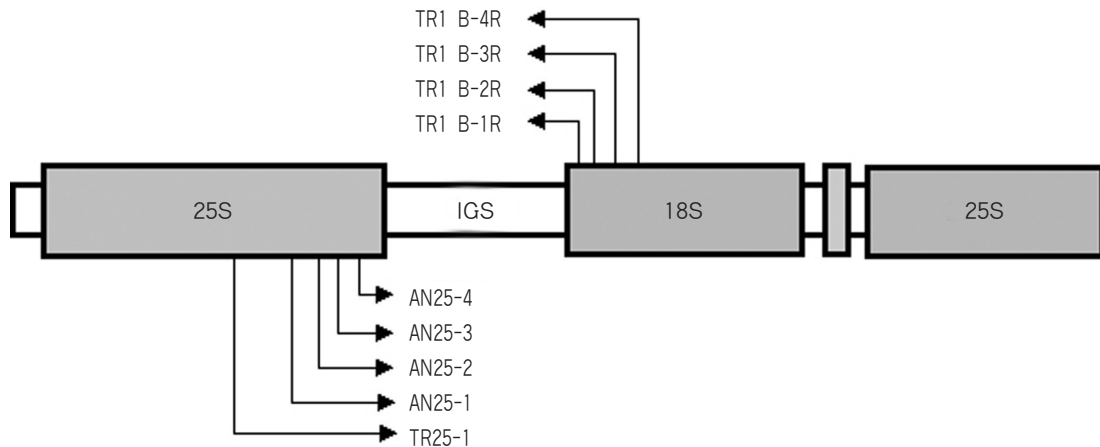


Fig. 1. Primers for amplifying ribosomal DNA intergenic spacer (IGS), which is located between 25S and 18S.

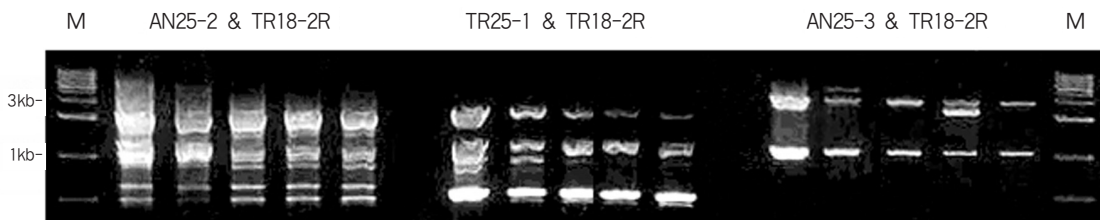


Fig 2. Screening of primer sets with 5 strains of *T. rubrum*. PCR was done with annealing at 55 $^{\circ}$ C for 1 minutes and extension at 72 $^{\circ}$ C for 3 minutes. Primer set AN25-3 and TR18-2R amplified 2.5 - 5 kb sized bands which were polymorphic among strains of *T. rubrum*. Primer set AN25-2 and TR18-2R, TR25-1 and TR18-2R amplified numerous, short bands which were same pattern among strains of *T. rubrum*.

대한의진균학회지 제 9권 제 4호 2004

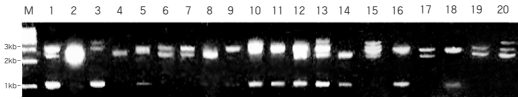


Fig. 3. PCR result of 20 strains of *T. rubrum*. Various sized bands, 1.1, 2.7, 2.9, 3.2, 3.8, 5 kb, were amplified. The amplified bands were different among strains of *T. rubrum*. M : size marker (1 kb ladder).

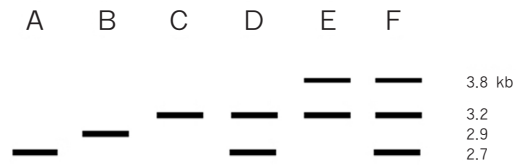


Fig. 4. The types of PCR-amplified results of *T. rubrum*. With the analysis of 4 bands (2.7, 2.9, 3.2, and 3.8kb), 20 strains of *T. rubrum* were classified into 6 types. The primer set AN25-3 and TP18-2R were used.

TGA-3')와 TR18-2R(ATCTAATAAATACACCCCTTCCGA-3')으로 증폭하면 polymorphism을 관찰할 수 있었다. Primer AN25-2(5'-ACTAATAGGGAACGTGAGCTGGGT-3')와 TR18-2R, primer TR25-1(5'-GAGTTATCTTTTCTTCTTGACGGC-3')와 TR18-2R으로 각각 증폭하면 많은 수의 짧은 band들이 나타났지만 polymorphism은 관찰할 수 없었다. 다른 primer들의 조합들도 증폭이 되지 않거나 polymorphism을 관찰할 수 없었다.

2. PCR 최적조건 찾기

1) annealing 온도

온도를 45°C, 55°C, 60°C, 65°C로 변화하였을 때, 온도가 낮을수록 0.5~2kb 정도의 짧은 band가 여러 개 증폭되었으며, 온도가 높을수록 작은 크기의 band는 없어지고, 2.4~5kb 정도의 크기가 큰 band가 증폭되었다. 60°C 이상에서는 크기가 큰 band가 증폭되었지만 증폭산물의 양이 적었다. 55°C에서는 2.4kb이상의 큰 band들이 주로 증폭되었으나 1.1kb도 있었다.

2) extension 시간

Extension 시간을 2분에서 4분까지 변화시키면서 PCR한 결과, extension 시간이 3분 이상일 때

큰 band들이 증폭되었다.

3. PCR 결과

이상의 결과를 토대로 primer AN25-3와 TR18-1R를 사용하여, annealing 55°C 1분, extension 72°C 3분으로 하여 *T. rubrum* 20 균주들을 대상으로 PCR을 실시하였다. PCR로 증폭하면 1.1, 2.4, 2.7, 2.9, 3.2, 3.8, 5kb의 band들이 나타났다 (Fig. 3). 이 중에서 뚜렷하게 나타나고, IGS의 크기와 유사할 것으로 추정되는 2.7, 2.9, 3.2, 3.8kb의 4가지 band를 비교하여 *T. rubrum* 20 균주를 6 가지 아형으로 구분할 수 있었다 (Table 1, Fig. 4). 균주가 검출된 부위와 IGS 아형간에는 연관이 없었다 (Table 1).

고 찰

*T. rubrum*은 백선의 원인균으로 가장 흔하고 감염경로를 추적하거나, 재발과 재감염을 구분하고, 내성균주를 파악하기 위해서 균주를 구분할 필요성이 많다. 그러나 지금까지 여러 가지 분자생물학적 기법을 이용하였지만 *T. rubrum*의 균주 간 구별이 힘들었다. Mitochondrial DNA의 restriction fragment length polymorphism (이하 RFLP)은 *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *E. floccosum*을 구분할 수 있으나⁷⁻⁹ *T. rubrum*의 균종내 구분은 불가능하였다. RAPD (random amplified polymorphic DNA)도 균종의 동정에 사용할 수 있지만 *T. rubrum*의 균주 간 구분은 할 수가 없다¹⁰⁻¹⁵. Mochizuki 등¹³의 보고에서 RAPD로 *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*의 균주 간에 polymorphism이 있었으나 *T. rubrum*에서는 균주 간의 차이가 없었다. Graeser 등¹⁶은 random amplified monomorphic DNA marker, amplified fragment length polymorphism 및 (AC)₁₀을 이용한 PCR fingerprinting의 3가지 방법 모두를 이용한 실험에서 *T. rubrum*의 균주 간 차이를 밝히지 못하였다. 염기서열을 직접 비교하는 방법 (direct sequencing)은 가장 확실한 방법이지만, 균주 간에 차이가 많은 부위를 미리 알아야 하며, 시간과 경비가 많이 들고 sequencing 시설이 필요하므로 임상적으로 널리 사용되지 못하고 있다. 만약 PCR fingerprinting으로 polymorphism을 파악할 수

최종수 등: Ribosomal DNA intergenic spacer의 polymorphism을 이용한 *Trichophyton rubrum*의 균주간 구분

있다면 매우 간편하고 빠른 방법이므로 임상적 적용이 쉬울 것이다.

rDNA에는 ITS와 IGS가 있다. ITS는 300~500 bp 크기의 ITS1과 ITS2로 이루어지며 비교적 변이가 많아서 균종간의 구별이 가능하다. 그러나 동일균종내 균주간 차이는 거의 없다¹⁷⁻²⁰. 이에 비하여 IGS 부위는 rDNA의 25S와 18S 사이에 위치하며 크기가 3~5kb로 ITS1이나 ITS2 부위에 비해 크기가 충분히 크고, 염기서열의 변이가 많아 균주 구분을 위한 polymorphism에 이용할 수 있는 가능성이 높다²¹⁻²³.

PCR fingerprinting을 쉽게 하려면 이상적인 PCR 조건을 찾는 것은 매우 중요하다. Radford 등²²은 *A. fumigatus*의 IGS 부위를 45°C에서 annealing하는 PCR을 하여 균주간의 polymorphism을 관찰하였다. 그러나 증폭된 band들의 크기가 매우 작아서 비특이 반응일 가능성이 높았다. 본 실험에서 extension 시간은 2분에서 4분까지 변화시켜보면, 시간이 길어질수록 크기가 큰 band가 증폭되었다. Annealing 온도를 45°C~65°C까지 변화시켜 보면 60°C 이상에서는 2.7~5kb의 band가 나타났지만 증폭량이 적거나 증폭되지 않았다. 55°C에서는 2.7kb이상의 큰 band들이 주로 증폭되었으나 1.1kb도 있었다. IGS의 크기가 2.7kb 이상이므로 이보다 작은 크기의 band들은 IGS 일부가 증폭되었거나 IGS 이외의 부위가 증폭된 비특이 반응으로 추정되었을 가능성이 크다. 주형 DNA의 양에 따라 band 양상이 다소 차이가 있었다. 앞으로 증폭량이 많으면서 비특이 반응이 적으며 재현성이 높은 PCR 조건을 찾는 작업이 필요하다.

Jackson 등²³은 *T. rubrum* 50 주의 genomic DNA를 *EcoRI*으로 절단한 후 Southern blot한 결과 IGS 부위가 2.7kb에서 3.8kb 사이의 band로 나타났으며 14가지 형으로 구분하였고, 이 중 단일 band 6가지 (A~F), 2~4 band 9가지 (G~N)이었다고 보고하였다. *T. rubrum* 50 주 중에서 A형 (2.7kb) 19주, B형 (2.9kb) 9주, C형 (3kb) 5주, D형 (3.1kb) 6주이였으며 각 형 사이의 크기는 100~150b 정도 차이가 있었다. 본 실험에서는 1.1, 2.4, 2.7, 2.8, 2.9, 3.2, 3.8, 5kb 크기의 증폭산물들이 있었으며, Jackson 등의 보

고에서 나타난 2.7~3.8kb 결과와 일치하는 부분이 많았다. 그러나 본 실험에서 대부분의 균주들이 여러 개의 band를 동시에 보여 Jackson 등²³의 50주 중 9주가 여러 band를 보였다는 보고와는 다소 차이가 있다. 이는 IGS 이외의 부위가 증폭되었기 때문으로 추정된다. 본 실험에서는 7가지의 band 중 선명하게 나타나는 4가지 band (2.7, 3.2, 3.8, 5 kb)를 토대로 20 주의 *T. rubrum*을 6가지 아형으로 구분할 수 있었다.

Carlotti 등²¹은 *C. krusei*의 IGS에 165bp 크기의 repeat가 존재하며, 종특이하고, polymorphism을 나타낸다고 하였다. Jackson 등²³은 100~150bp 크기의 repeat가 *T. rubrum*의 IGS에 존재하며 polymorphic할 것으로 추측하였다. Jackson 등²⁴은 *T. rubrum*의 IGS 염기서열을 분석하여 TRS-1은 200bp, TRS-2는 77bp 크기의 차이를 보인다고 하였다. 김 등²⁵도 같은 방법으로 동일한 결과를 얻었다. 한편 김 등²⁶은 *T. rubrum* 20주의 TRS-2가 모두 동일하고 TRS-1은 차이가 있다고 보고하였다. 본 실험에서도 band 간에 약 200bp 크기의 차이가 있었으며 이는 TRS-1의 크기가 다름을 의미한다.

본 실험에서의 문제점으로, 크기가 큰 band들 간의 77bp 정도의 미세한 크기 차이를 정확히 구분하기 힘들었다. 전기영동 방법을 개선하거나 제한효소 처리를 한다면 구분이 가능할 것이다. 본 실험에서 여러 크기의 band가 나타났으며, 1.1, 2.4, 5kb 크기의 band들은 *T. rubrum*의 IGS 크기에 비해 지나치게 작거나 크다. 이는 IGS와는 관계없는 부위가 증폭되었기 때문으로 추정된다. Nested PCR을 시행한다면 비특이 band들을 제거할 수 있을 것이다.

Genbank에 등록된 많은 진균들이 본 실험에서 사용한 primer와 동일한 염기서열을 갖고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 아직 염기서열이 알려지지 않은 진균에서도 PCR을 시행하여서 IGS에 polymorphism을 보이는 부위가 있는지 여부를 점검할 수 있다.

앞으로 더 많은 *T. rubrum* 균주를 대상으로 본 실험을 시행하고, 각각의 band들이 IGS부위에서 증폭되었음을 Southern hybridization, subrepeat element 부위 PCR, 제한 효소 처리 등으로 확인할 필요

대한의진균학회지 제 9권 제 4호 2004

가 있다. 또한 비특이 band들의 정체와 의미를 파악하고, 이 primer들이 얼마나 많은 균종의 진균들에 유용한지도 알아보아야 한다.

결 론

우리나라 백선의 원인균 중 대부분을 차지하고 있는 *T. rubrum*에 대해 균주간 구분을 하는 것은 역학적 연구에 매우 필요하다. *T. rubrum*의 균주간 구분을 할 수 있는 polymorphism을 찾기 위해 rDNA의 intergenic space를 증폭할 수 있는 primer를 제작하였고, 최적의 PCR 조건을 찾고자 하였다. 이를 토대로 표준균주 1주와 임상분리균주 19주를 대상으로 실험한 성적은 다음과 같다.

rDNA 25S의 3' 부위와 18S의 5' 부위에서 각각 제작한 primer ANID25-3 (5'-GACAGGTTAGTTTTAC CCTACTGA-3')과 TR18-2R (5'-ATCTAATAAATACA CCCCTTCCGA-3')로 증폭하면 polymorphism을 관찰할 수 있었다.

Polymorphism을 나타내는 PCR 최적조건으로는 annealing 온도 55°C, extension 시간 3분이 알맞았다.

*T. rubrum*을 PCR로 증폭한 결과 1.1, 2.4, 2.7, 2.9, 3.2, 3.8, 5 kb 크기의 증폭산물들을 관찰할 수 있었으며, 이 중에서 2.7, 2.9, 3.2, 3.8kb의 4개 band를 조합하여 *T. rubrum* 20 균주를 6 가지 아형으로 구분할 수 있었다.

이상을 종합하면 이 primer들을 이용하여 *T. rubrum*의 균주간 구분을 쉽게 할 수 있게 되었고, 역학적 연구에 기여할 것으로 생각된다. 앞으로 이 primer들을 이용하여 염기서열이 알려지지 않은 균종들의 polymorphism 여부를 알 수 있는 검사를 시행할 수 있을 것으로 예상된다.

참 고 문 헌

- Emmons CW. Dermatophytes : Natural groupings based on the form of spores and accessory organs. Arch Dermatol Syphilol 1934; 30: 337-362
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Medical mycology. Lea and Febiger, Philadelphia: 1992; 105-161
- Binazze M, Pappini M, Simmonetti S. Skin mycoses-geographic distribution and presentday pathomorphosis. Int J Dermatol 1983; 2: 92-97
- Lyngsoe Svejgaard E. Epidemiology of dermatophytes in Europe. Int J Dermatol 1995; 34: 525-528
- 김기홍, 문병천, 최종수. 대구지역 백선환자에서 분리된 *Trichophyton* 속의 진균학적 성상 및 아형의 분류. 의진균지 1997; 2: 129-143
- Summerbell R, Kane J. Physiological and other special tests for identifying dermatophytes. In Kane J and Summerbell R : Laboratory handbook of dermatophytes, Belmont: Star Publishing Co., 1997; 45-79
- de Bievre C, Dauguet C, Nguyen VH, Ibrahim-Granet O. Polymorphism in mitochondrial DNA of several *Trichophyton rubrum* isolates from clinical specimens. Ann Inst Pasteur Microbiol 1987; 138: 719-727
- Kawasaki M, Aoki M, Ishizaki H, Nishimura K, Miyaji M. Phylogeny of *Epidermophyton floccosum* and other dermatophytes. Mycopathologia 1996; 134: 121-128
- Mochizuki T, Watanabe S, Uehara M. Genetic homogeneity of *Trichophyton mentagrophytes* var *interdigitale* isolated from geographically distant regions. J Med Vet Mycol 1996; 34: 139-143
- 최종수, 황계영, 김기홍 등. Arbitrarily primed PCR을 이용한 백선균의 동정 및 분류. 대피연지 1996; 3: 39-50
- Liu D, Coloe S, Pedersen J, Baird R. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to differentiate *Trichophyton dermatophytes*. FEMS Microbiol Lett 1996; 136: 147-150
- Kano R, Matshushiro H, Watari T, Tsujimoto H, Hasegawa A. Differentiation of *Arthroderma* spp. by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and Southern hybridization. Mycoses 1997; 40: 335-341
- Mochizuki T, Sugie N, Uehara M. Random amplification of polymorphic DNA is useful for the differentiation of several anthropophilic dermatophytes. Mycoses 1997; 40: 405-409
- Zhong Z, Li R, Li D, Wang D. Typing of common dermatophytes by random amplification of

최종수 등: Ribosomal DNA intergenic spacer의 polymorphism을 이용한 *Trichophyton rubrum*의 균주간 구분

- polymorphic DNA. Jpn J Med Mycol 1997; 38: 239-246
15. Graeser Y, El Fari M, Presber W, Sterry W, Tietz HJ. Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. Br J Dermatol 1998; 138: 576-582
 16. Graeser Y, Kaehnisch J, Presber W. Molecular markers reveal exclusively clonal reproduction in *Trichophyton rubrum*. J Clin Microbiol 1999; 37: 3713-3717
 17. White TJ, Burns T, Lee S, Tayler J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ: PCR protocols: A guide to methods and application. San Diego: Academic Press, 1990; 315-322
 18. Makimura K, Mochizuki T, Hasegawa A, et al. Phylogenetic classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 region. J Clin Microbiol 1998; 36: 2629-2633
 19. Mochizuki T, Kawasaki M, Ishizaki H, Makimura K. Identification of several clinical isolates of dermatophytes based on the nucleotide sequence of internal transcribed spacer 1 (ITS 1) in nuclear ribosomal DNA. J Dermatol 1999; 26: 276-281
 20. Graeser Y, Vilgalys R, Kuijpers AFA, et al. Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. Medical Mycology 1999; 37: 105-114
 21. Carlotti A, Chaib F, Couble A et al. Rapid identification and fingerprinting of *Candida krusei* by PCR-based amplification of the species-specific repetitive polymorphic sequence CKRS-1. J Clin Microbiol 1997; 35: 1337-1343
 22. Radford SA, Johnson EM, Leeming JP, et al. Molecular epidemiological study of *Aspergillus fumigatus* in a bone marrow transplantation unit by PCR amplification of ribosomal intergenic spacer sequences. J Clin Microbiol 1998; 36: 1294-1299
 23. Jackson CJ, Barton RC, Evans EG. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. J Clin Microbiol 1999; 37: 931-936
 24. Jackson CJ, Barton RC, Kelly SL, Evans EG. Strain identification of *Trichophyton rubrum* by specific amplification of subrepeat elements in the ribosomal DNA nontranscribed spacer. J Clin Microbiol 2000; 38: 4527-34
 25. 김정애, 허창훈, 문상은. 분자생물학적 방법에 의한 *Trichophyton rubrum*의 동정 및 형별 판정. 의진균지 2001; 6: 219-228
 26. 김현철, 신동훈, 최종수, 김기홍. Ribosomal DNA nontranscribed spacer의 분석을 이용한 동일 환자의 두 병소에서 분리된 *Trichophyton rubrum*의 균주간 구분. 의진균지 2002; 7: 69-77