

## 염기서열과 PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism 분석에 의한 Mycobacteria 동정

서울대학교 의과대학 미생물학교실 및 감염병연구소

국 윤 호

=Abstract=

### Identification of Mycobacteria by Comparative Sequence Analysis and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis

Yoon-Hoh Kook

Department of Microbiology and Institute of Endemic diseases, SNUMRC,  
Seoul National University College of Medicine, Seoul 110-799, Korea

Diagnosis of mycobacterial infection is dependent upon the isolation and identification of causative agents. The procedures involved are time consuming and technically demanding. To improve the laborious identification process mycobacterial systematics supported by gene analysis is feasible, being particularly useful for slowly growing or uncultivable mycobacteria. To complement genetic analysis for the differentiation and identification of mycobacterial species, an alternative marker gene, *rpoB* encoding the  $\beta$  subunit of RNA polymerase, was investigated. *rpoB* DNAs (342 bp) were amplified from 52 reference strains of mycobacteria including *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) and clinical isolates by the PCR. The nucleotide sequences were directly determined (306 bp) and aligned using the multiple alignment algorithm in the MegAlign package (DNASTAR) and MEGA program. A phylogenetic tree was constructed with a neighborhood joining method. Comparative sequence analysis of *rpoB* DNA provided the basis for species differentiation. By being grouped into species-specific clusters with low sequence divergence among strains belonging to same species, all the clinical isolates could be easily identified. Furthermore RFLP analysis enabled rapid identification of clinical isolates.

**Key Words:** *rpoB* DNA, sequence analysis, PCR-RFLP

### 서 론

항산성균은 그 특징이 세포벽을 이루고있는 성분 중 특수한 지질 성분이 많다는 것이다. 이 항산성균의 대표적인 것이 genus *Mycobacterium*

이다. 여기는 결핵, 우형결핵, 나병과 같이 사람과 동물에 심각한 질병을 일으키는 균종 외에도 기회 감염균으로 일컬어지는 균종, 그리고 자연 환경에서 볼 수 있는 saprophytic species 등 여러 종류의 균종이 포함되어 있다<sup>18</sup>. 그 가운데 *M. tuberculosis*는 결핵의 원인균이다. 한편 AIDS 환자

가 전세계적으로 급속히 확산되면서 예전에는 별 문제가 되지 않던, 결핵균 (*M. tuberculosis*)이나 나병균 (*M. leprae*) 이외의 다른 mycobacteria (MOTT 또는 nontuberculous mycobacteria: NTM)에 의한 감염증이 증가하는 것을 볼 수 있다<sup>2</sup>.

Mycobacteria는 성장속도와 집락의 착색 여부에 따라 4 group으로 분류하여 왔다<sup>23</sup>. 그러나 이 같이 group이 아니라 균종간의 성격을 좀더 확실하게 규정하고자 하는 노력들도 있어 왔다. 바로 수치 계수법 (numerical taxonomic analysis)<sup>24</sup>, 면역학적 방법<sup>30</sup>, 세포벽 구성성분의 비교, DNA-DNA 동질성 비교<sup>30</sup>, 그리고 제한효소 사용에 의한 분석 등이 그것이다<sup>29</sup>. 최근에는 mycobacteria의 계통분석이 16S rRNA 또는 그 DNA 염기서열의 비교를 통해 보고되어 각 균종간의 연관성을 잘 표현하는 것으로 알려진 바 있다<sup>20,21,25</sup>.

세균의 계통분석은, 다른 생물체에서와 마찬가지로, 상호간의 관련성을 규명함으로써 속 또는 종을 구분하는 근거를 제공할 수 있다. 계통분석의 기준이 되는 물질로는 ribosomal rRNA (23S and 16S), elongation factors<sup>11</sup>, 그리고 ATPase subunits<sup>11</sup>, RNA polymerase 등이 사용된다<sup>17</sup>. 그중 16S rRNA가 널리 사용되고 있다. 그러나 16S rRNA를 이용한 phylogenetic analysis는 species boundaries를 명확히 규명 못할 경우가 있다는 단점이 지적된 바 있다<sup>4</sup>. 이러한 사실은 slowly growing mycobacteria에서도 나타나고 있고, 그 대체 물질로서 stress proteine-coding gene인 *dnaJ* gene이 제시되기도 하였다<sup>26,27</sup>. 그러나 이 경우에는 반대로 rapidly growing mycobacteria에서 불합리한 문제점이 발견되었다. 따라서 phenotypic relationships을 보기 위해서는 하나보다는 몇 개 유전자의 염기서열을 함께 살펴보는 것이 mycobacteria species 규정에 유용할 것이라는 것은 의심의 여지가 없다고 보여진다.

RNA polymerase는 16S rRNA를 대체할 수 있는 phylogenetic marker이다. 아단위 (subunit)로 *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, *rpoD*가 있으며 이것은 prokaryotes들 사이에 잘 보존되어진 것으로 알려져 있다<sup>16</sup>. 이 중 *rpoB*는 RNA polymerase  $\beta$  subunit를 코딩하는 것으로 대장균 (*Escherichia coli*)<sup>13</sup>, *M. tuberculosis*<sup>28</sup>, *M. leprae*<sup>9</sup>, *M. smegmatis*<sup>15</sup>의 리팜핀 내성과 관련있음이 알려져 있다. 또한 *M. tuberculosis* 이외의 마이코박테리아 간에 이 부위 염기서열이 아주 잘 보존된 것으로 알려져 있다<sup>10,31</sup>.

*Archaeobacteria*의 phylogenetic reconstruction에 사용된 예가 있으며<sup>12,14,19,32</sup>, *Staphylococcus aureus*와 다른 eubacteria<sup>22</sup>, 그리고 malaria에서도 그 유용성을 보인 바 있다<sup>7</sup>.

본 연구는 이 *rpoB* gene의 一部分節 (342 bp; *Escherichia coli* amino acid numbering 447-561)을 52種 mycobacteria 표준 균주로부터 증폭시켜 그 염기서열을 결정하고 그들간의 관계를 알아봄으로서 이 DNA 분절의 염기서열이 mycobacteria 균종 구분의 근거가 된다는 것을 확인하고자 하였다. 또한 각 종의 DNA 분절에서 특정 제한효소로 절단되는 위치를 찾아 PCR에 이은 제한효소 절단과 전기영동의 절차만으로 1일 안에 mycobacteria 각 종을 구별할 수 있다는 것을 보이고자 한 것이다.

기존의 PCR 또는 PCR-RFLP를 이용하는 방법은 그 표적이 16S rRNA gene, *dnaJ* gene 또는 IS 6110 등이었다. 또한 그 방법에 있어서도 결핵균 또는 특정 균만을 찾는 것이었다. 즉, *M. tuberculosis*, *M. avium* complex 등 해당 균종에 대한 특이 primer로 PCR 후 species specific probe로 hybridize시키거나, RFLP 분석하는 것이었다. 이러한 기존의 방법과는 다르게 표적 DNA를 *rpoB*로 하여, TB complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*) 뿐만 아니라 MOTT를 한꺼번에 탐지할 수 있는 마이코박테리아 특이, PCR primer로 염기서열 분석과 RFLP에 의해 species까지 동정할 수 있다는 것을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. Mycobacteria

사용한 mycobacteria 菌種은 모두 52種이었다 (Table 1). 여기에는 인체에 질환을 일으키는 결핵균, 牛形결핵균 등과 분류학적으로 중요한 균종, 그리고 AIDS 환자에서 분리되는 것으로 알려진 균종까지 포함하였다. 이들은 대한결핵협회 결핵연구원 또는 ATCC에서 분양받아 사용하였다.

### 2. Polymerase chain reaction (PCR) amplification.

각 균종의 DNA는 초자구를 이용하여 genomic DNA를 추출하는 Bead-beater/phenol (BB/P)법을 사용하였다. 균을 TEN buffer (Tris-HCl 10 mM,

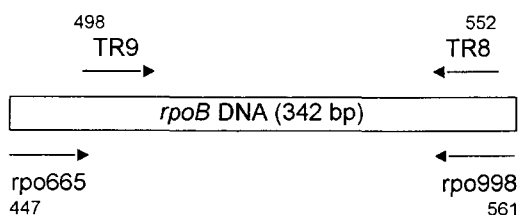
**Table 1.** Mycobacteria used for the sequence analysis of *rpoB*

Species	Strain	Species	Strain
<i>M. abscessus</i>	CAP97E-03	<i>M. acapulcensis</i>	ATCC 14473
<i>M. africanum</i>	ATCC 25420	<i>M. agri</i>	ATCC 27406
<i>M. asiaticum</i>	ATCC 25276	<i>M. aurum</i>	ATCC 23366
<i>M. austroafricanum</i>	ATCC 33464	<i>M. avium</i>	ATCC 25291
<i>M. bovis</i>	ATCC 19210	<i>M. bovis</i> BCG French strain 1173P2	
<i>M. celatum</i> Type 1	ATCC 51131	<i>M. celatum</i> Type 2	ATCC 51130
<i>M. chelonae</i>	ATCC 35749	<i>M. chitae</i>	ATCC 19627
<i>M. diernhoferi</i>	ATCC 19340	<i>M. fallax</i>	ATCC 35219
<i>M. flavescens</i>	ATCC 14474	<i>M. fortuitum</i>	ATCC 6841
<i>M. fortuitum</i>	ATCC 49403	<i>M. gastri</i>	ATCC 15754
<i>M. genavense</i>	ATCC 51233	<i>M. gilvum</i>	ATCC 43909
<i>M. gordonae</i>	ATCC 14470	<i>M. haemophilum</i>	ATCC 29548
<i>M. interjectum</i>	ATCC 51457	<i>M. intermedium</i>	ATCC 51848
<i>M. intracellulare</i>	ATCC 13950	<i>M. kansasii</i>	ATCC 12478
<i>M. leprae</i>	Thai 53 strain	<i>M. lepraemurium</i>	IHD, CUMC
<i>M. malmoense</i>	ATCC 29571	<i>M. marinum</i>	ATCC 927
<i>M. microti</i>	ATCC 11152	<i>M. moriokaense</i>	ATCC 43059
<i>M. neoaurum</i>	ATCC 25795	<i>M. nonchromogenicum</i>	ATCC 19530
<i>M. paratuberculosis</i>	ATCC 19698	<i>M. phlei</i>	ATCC 11758
<i>M. peregrinum</i>	ATCC 14467	<i>M. pulveris</i>	ATCC 35154
<i>M. scrofulaceum</i>	ATCC 19981	<i>M. senegalense</i>	ATCC 35796
<i>M. shimoidei</i>	ATCC 27962	<i>M. simiae</i>	ATCC 25275
<i>M. smegmatis</i>	ATCC 19420	<i>M. szulgai</i>	ATCC 35799
<i>M. terrae</i>	ATCC 15755	<i>M. thermoresistibile</i>	ATCC 19527
<i>M. triviale</i>	ATCC 23292	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	ATCC 27294
<i>M. ulcerans</i>	ATCC 19423	<i>M. vaccae</i>	ATCC 15483
<i>M. xenopi</i>	ATCC 19250	<i>R. equi</i>	ATCC 10146

EDTA 1 mM, NaCl 100 mM)에 부유시키고, 초자구를 (직경 0.1 mm, Biospec Products, glass bead 11079-110) 100  $\mu$ l를 넣고, phenol: chloroform: isopropyl alcohol (50: 49: 1)을 100  $\mu$ l를 넣어 Mini bead beater (Biospec Products, 74005-0722)로 1분간 진탕하였다. 균체 파쇄 후에 12000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 옮긴 후 10  $\mu$ l의 3M sodium acetate, 250  $\mu$ l의 에탄올을 넣고 -20 $^{\circ}$ C에 10분간 방치하여 DNA 침전물을 만들었다.

DNA는 TE buffer 60  $\mu$ l로 용해시켜 농도측정 후 염기서열 분석과 PCR-RFLP 분석을 위한 template DNA로 사용하였다.

Mycobacteria specific primer (*Rpo665998*)는 일반 세균 DNA의 증폭 없이 모든 mycobacteria의 *rpoB* gene을 증폭시키기 위해 이미 알려진 *M. tuberculosis*의 *rpoB* 염기서열로부터 고안하여 사용하였다 (Fig. 1). PCR은 상용으로 구입할 수 있는 AccuPower Pre-Mix Top (Bioneer)을 사용하여 각



**Figure 1.** Primers used for the amplification of *rpoB* DNA (R<sub>454</sub>~H<sub>554</sub>; amino acid numbering of *E. coli*) of mycobacteria.

primer 20 pmol과 template DNA 50 ng을 첨가한 뒤 증류수로 최종 용적 20 μl로 하여 Cetus, Model 9600 Thermocycler로 30 cycle (95℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 45초, 72℃ 5 분)을 시행하였다.

### 3. 염기서열 결정

PCR 산물은 3% agarose gel에 전기영동 후, Qiaex을 이용하여 정제하였다 (Qiaex, Qiagen, Hilden, Germany). 이 정제된 DNA를 template DNA로 하여 ABI automatic sequencer로 염기서열을 결정하였다. Automatic sequencing은 template DNA 60 ng, primer 3.2 pmol, 증류수를 혼합하여 10.5 μl을 만든 다음, 5X TACS buffer 4 μl, dNTP mixture 1 μl, termination mixture 4 μl, Taq polymerase 0.5 μl (5 U/μl)을 섞어 PCR을 수행하였다 (95℃ 15초, 50℃ 10초, 60℃ 4분; 30 cycle). 반응이 끝난 sample은 G50 spin column을 이용하여 정제한 후, 6.75% acrylamide gel에서 1X TBE buffer에서 40 watt로 12시간 전기영동하였다.

### 4. 염기서열 분석과 phylogenetic tree

결정된 각 mycobacteria의 *rpoB* 염기서열을 컴퓨터 프로그램 Genetyx (Genetyx-MAC 6.02, Genetics Computer Group, Madison, WI, USA)로 각 DNA의 제한효소 절단부위를 비교, 분석하였다. 이 결과에 따라 TB complex를 다른 MOTT들과 구별할 수 있는 제한효소들을 찾았다.

系統圖 구성을 위해서는 outgroup으로 *Rhodococcus equi*의 *rpoB* 염기서열을 포함하였다. MegAlign package (Windows Version 3.12e, DNASTAR, Madison, Wis)의 pairwise distance method로 multialignment를 시행하여 clustal method로 phylogenetic tree를 구성하였다.

**Table 2.** Amino acids containing signature nucleotide sequences (Numbering of *E. coli* amino acid)

Species	Amino acids
TB complex	484, 488, 513, 524, 529
<i>M. kansasii</i>	477, 491
<i>M. haemophilum</i>	524
<i>M. paratuberculosis</i>	511
<i>M. scrofulaceum</i>	548
<i>M. genavense</i>	458
<i>M. xenopi</i>	533, 534
<i>M. goodii</i>	547
<i>M. celatum</i>	453, 465, 467, 531, 532
<i>M. gastri</i>	495, 502
<i>M. malmoense</i>	545
<i>M. triviale</i>	537, 538
<i>M. fortuitum</i>	508, 509
<i>M. smegmatis</i>	467
<i>M. phlei</i>	552
<i>M. chelonae</i>	521, 539, 541
<i>M. vaccae</i>	468, 488

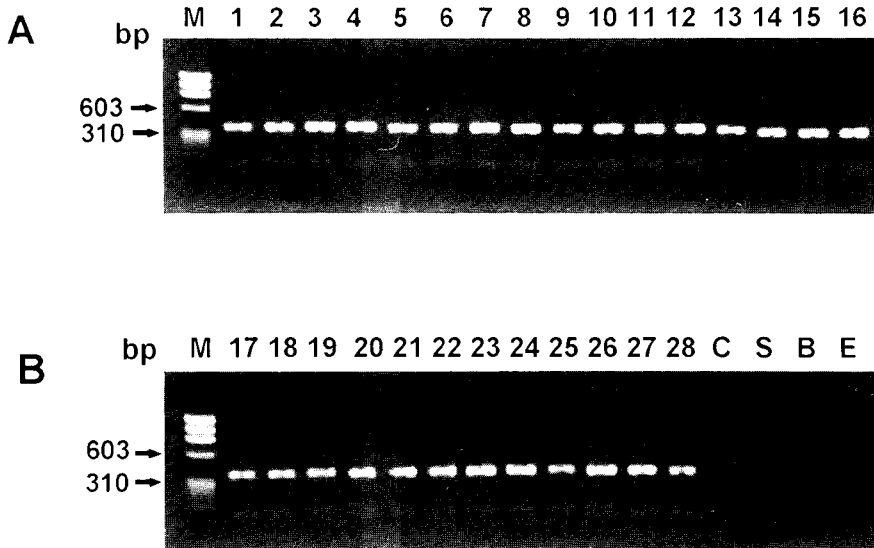
### 5. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis

PCR로 증폭된 산물 10 μl를 다른 튜브에 옮겨 제한효소 처리를 하였다. 절단된 DNA mixture는 3% agarose gel 상에서 전기영동하여 관찰하였다.

## 결 과

### 1. *rpoB* 염기서열 분석

*rpoB* DNA 분절은 342 bp의 크기로서 사용한 모든 mycobacteria로부터 모두 증폭되었다 (Fig. 2-A). 그러나 대조로 시행한, 호흡기에서 분리될 수 있는 일반세균 (비항산성균) 즉, *Corynebacterium diphtheriae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* 등의 DNA는 증폭되지 않는 것을 볼 수 있다 (Fig. 2-B). 이렇게 증폭된 *rpoB* DNA에서 양쪽 primer 위치를 제외한 부위



**Figure 2.** Amplification of *rpoB* DNA (342-bp) from 28 mycobacteria (A: lane 1-16, B: lane 17-28) and non-mycobacteria (B: Lane C, S, B, E) using the mycobacteria specific primer set (Rpo665998). Nothing was amplified from those 4 non-mycobacteria. M: marker DNA ( $\phi$ X174/*Hae*-III digest), 1: *M. tuberculosis* H37Rv, 2: *M. bovis*, 3: *M. bovis* BCG, 4: *M. africanum*, 5: *M. avium*, 6: *M. paratuberculosis*, 7: *M. scrofulaceum*, 8: *M. intracellulare*, 9: *M. terrae*, 10: *M. nonchromogenicum*, 11: *M. triviale*, 12: *M. gordonae*, 13: *M. szulgai*, 14: *M. kansasii*, 15: *M. ulcerans*, 16: *M. marinum*, 17: *M. simiae*, 18: *M. xenopi*, 19: *M. haemophilum*, 20: *M. gastri*, 21: *M. malmoense*, 22: *M. fortuitum*, 23: *M. chelonae*, 24: *M. smegmatis*, 25: *M. phlei*, 26: *M. vaccae*, 27: *M. celatum*, 28: *M. genavense*, C: *C. diphtheriae*, S: *S. aureus*, B: *B. subtilis*, E: *E. coli*.

(306 bp)의 염기서열을 automatic sequencer로 결정하였다. Mycobacteria의 특징은 G+C ratio가 높은 (62~70%) 것인데 여기서도 모든 균종에서 63~69%로 높은 것을 볼 수 있었다. 또한 염기서열 분석결과 TB complex와 MOTT group은 각각 특징적인 signature nucleotide sequence를 갖는 amino acid가 있는 것을 알 수 있었다 (Table 2).

## 2. 균종간의 *rpoB* 염기서열 동질성

확인된 각 균종의 염기서열 동질성을 살펴 본 결과, 예상대로 증폭된 *rpoB* DNA 분절은 306 bp 가운데 212 bp가 같아 (69.3%) 매우 보존되어 있는 부분이었다 (자료표시는 생략함). 또한 기존의 complex로 나누어 group 지었던 균종끼리도 높은 동질성을 보이는 것을 알 수 있었다. 이는 mycobacteria 간의 *rpoB* 염기서열이 상당히 보존되어 있지만, 각 균종의 서로 다른 염기서열로 균종 구분이 가능한 것을 의미한다고 볼 수 있다. 실제로 환자에서 분리되어 종래의 생화학적 방법 등으로 이미 동정된 균의 염기서열을 분석한 결과, 표준 균종들과의 염기서열의 변화는 1% 미만, 즉 1~2개 염기의 변화만이 있는 것을

알 수 있었다 (Table 3). 이는 *rpoB* 염기서열 동질성 비교에 의해 mycobacteria 동정이 가능하다는 것을 보여주는 것이다.

## 3. Phylogenetic tree

결정된 52 종의 *rpoB* 분절 염기서열을 토대로 계통도를 구성하였다 (Fig. 3-A). 전반적으로 각종의 위치는 이전에 알려진 것과 큰 차이가 없다. 그러나 매우 특징적인 점이 몇 가지 있음을 알 수 있다. 많은 수의 인체 병원성균이 포함된 slowly growing mycobacteria와 rapidly growing mycobacteria가 다른 group으로 나뉘는 것을 볼 수 있다. 또한 TB complex가 *M. leprae*와 같은 다른 병원성 균종과 같이 무리지어 나타난다. 또 다른 특징은 MAIS complex와 최근 알려진 새로운 species의 위치이다. *M. scrofulaceum*은 MAIS complex에서 제외하여야 한다는 의견들이 있으나<sup>21</sup>, 여기서는 *M. avium*과 함께 무리를 이루고 있다. 또한 *M. paratuberculosis*는 이 결과로 본다면 *M. avium* complex로 불리워도 무방할 것이다. 흥미로운 것은 *M. intracellulare*의 위치이다. 이 균종은 예전부터 *M. avium*과 아주 가까운 종으

**Table 3.** Sequence pair distances of clinical isolates (●) compared to the reference strains of mycobacteria using the Clustal program with weighted residue weight table\*

	Percent Similarity													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. <i>M. leprae</i>		99.3	90.5	90.2	90.8	90.8	89.5	89.2	88.6	88.6	85.9	86.3	87.3	87.3
2. Lep-clin.●	0.7		90.5	90.2	91.2	91.2	90.2	89.9	89.2	89.2	86.6	86.9	87.9	87.9
3. <i>M. tuberculosis</i>	10.2	10.2		99.7	91.5	91.5	89.9	89.5	90.8	90.8	86.3	86.3	87.3	87.3
4. Tub-clin.●	10.6	10.6	0.3		91.2	91.2	89.5	89.2	90.5	90.5	85.9	85.9	86.9	86.9
5. <i>M. kansasii</i>	9.8	9.4	9.0	9.4		100.0	90.8	91.2	89.9	89.9	85.0	85.3	86.9	86.9
6. Kan-clin.●	9.8	9.4	9.0	9.4	0.0		90.8	91.2	89.9	89.9	85.0	85.3	86.9	86.9
7. <i>M. avium</i>	11.3	10.5	10.9	11.3	9.8	9.8		99.7	92.8	92.8	90.2	90.5	91.5	91.5
8. MAC-clin.1●	11.6	10.9	11.3	11.6	9.4	9.4	0.3		92.5	92.5	89.9	90.2	91.2	91.2
9. <i>M. intracellulare</i>	12.4	11.6	9.8	10.1	10.9	10.9	7.6	8.0		100.0	89.5	89.9	89.9	89.9
10. MAC-clin.2●	12.4	11.6	9.8	10.1	10.9	10.9	7.6	8.0	0.0		89.5	89.9	89.9	89.9
11. <i>M. fortuitum</i>	15.6	14.8	15.6	16.0	16.8	16.8	10.5	10.9	11.3	11.3		99.7	93.8	93.8
12. For-clin.●	15.2	14.4	15.2	15.6	16.4	16.4	10.1	10.5	10.9	10.9	0.3		94.1	94.1
13. <i>M. abscessus</i>	14.2	13.2	14.0	14.4	14.4	14.4	9.0	9.4	10.9	10.9	6.5	6.1		100.0
14. Abs-clin.●	14.2	13.2	14.0	14.4	14.4	14.4	9.0	9.4	10.9	10.9	6.5	6.1	0.0	

Percent Divergence

\* MegAlign package (Windows Version 3.12e, DNASTAR, Madison, Wis).

로 여겨져서 *M. avium-intracellulare*라고 불려왔으나 *M. avium*과는 떨어져 나타나고 있다. 한편 이와 같은 방법은 국내 환자에서 분리된 배양균, 환자의 생검조직, 또는 객담과 혈액에서 mycobacteria를 탐지하고 그 균종을 동정하는데 적용할 수 있었으며 MAC으로 동정된 균들을 *M. avium*과 *M. intracellulare*로 동정한 대표적인 예를 보이고 있다 (그림 3-B).

#### 4. Restriction enzyme site 분석 및 RFLP

각 균종의 *rpoB* 분절 염기서열을 컴퓨터 프로그램 (Genetix)로 restriction enzyme site 및 절단되어 나오는 DNA의 크기를 분석하였다. 일반적으로 흔히 사용되는 여러 제한효소 중 TB complex를 다른 MOTT 균종과 구분할 수 있는 것으로 *Hind-II*가 있다. 증폭된 TB complex의 *rpoB* DNA가 *Hind-II*에 의해 절단되어 2개의 조각 (110 bp,

232 bp)으로 나뉘어지는 반면, 같은 크기로 증폭되었더라도 MOTT의 DNA는 절단되지 않기 때문에 그대로 (342 bp) 남아 쉽게 두 group을 쉽게 감별할 수 있다. 이를 모식도로 보이고있다 (Fig. 4-A.)

한편 TB complex 외에 MOTT들도 결핵과 비슷한 질환을 일으킬 수 있다. 이중 가장 흔한 것이 바로 MAIS complex로서 (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*) 이들이 약 65%를 차지한다<sup>6,8</sup>. 기존의 배양방법으로 이들을 분리, 동정하려면 배양시간 외에도 혈청화적인 동정과정을 거쳐야 하는 번잡함이 따른다. 그러나 *rpoB* 분절을 절단하는 방법으로는 간단히 이들 종간의 구별이 가능하다. *M. avium*과 *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*와는 쉽게 구분되었다. *Mva-I*을 사용하면 *M. avium*의 경우 절단 부위가 1곳 있어 2개의 DNA 조각 (105 bp, 237 bp)이 생기나, *M. in-*

*tracellulare*에서는 절단 위치가 달라 크기가 다른 2조각 (48 bp, 294 bp)으로 잘라진다. 반면 *M. scrofulaceum*의 *rpoB* DNA는 *Mva-I* site가 없어 절단되지 않은 342 bp 크기 그대로 남아있다. 환자에서 흔히 볼 수 있는 이들 균종의 RFLP 양상을 모식도로 보이고 있다 (Fig. 4-B).

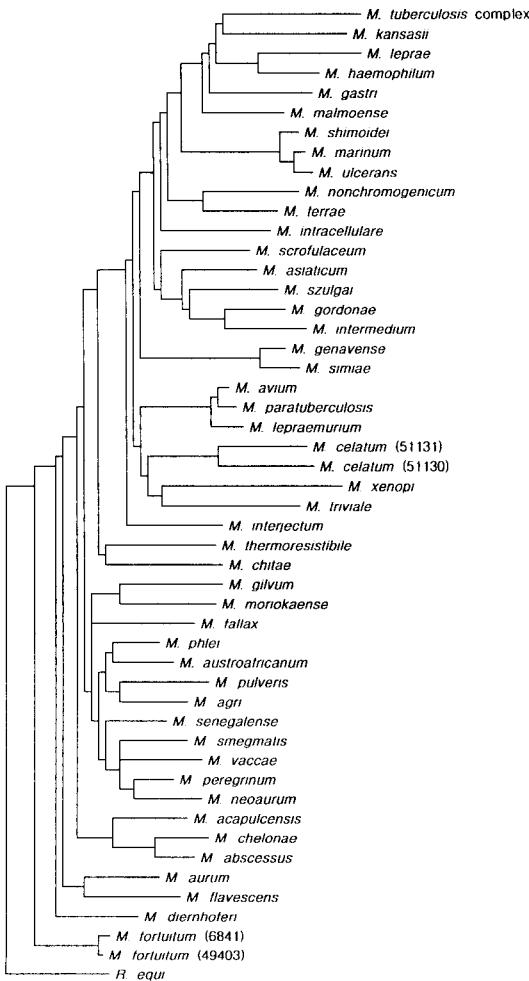
5. PCR-RFLP에 의한 환자 분리균 동정

위와 같이 *rpoB* 분절을 표적으로 하는 PCR-RFLP 분석법이 prototype의 균주 뿐 아니라 환자에서 분리되는 균들에도 정확하게 적용될 수 있는가를 염기서열 분석법과 마찬가지로 환자에서 분리된 균종에 대하여 시행한 결과를 보이고 있다. 검체는 *Hind-II*에 의하여 절단되어 2 band

(110, 232 bp)로 나타나고 있어 *M. tuberculosis*임을 알 수 있다 (Fig. 5-A). 한편 매우 드문 예이지만, *M. avium*으로 의심되던 한 검체는 *Mva-I* 절단 결과, *M. avium*과 *M. intracellulare*가 혼합되어있는 것도 알 수 있었다 (Fig. 5-B). 이는 *rpoB* 유전자를 표적으로 한 PCR-RFLP 분석법의 유용성을 보여주는 결과라고 할 수 있다.

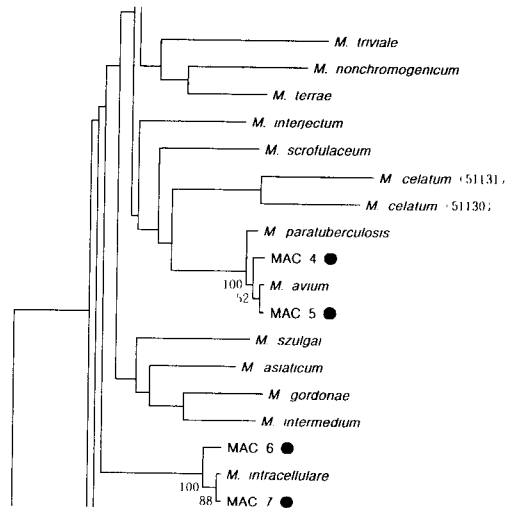
고찰

결핵을 비롯한 mycobacteria 감염증의 진단에 있어 가장 큰 장애는 균의 특성에서 비롯된다. 투과성이 좋지 않은 세포벽, 느린 성장속도 등이 바로 그것이다. 배양하여 동정 완료까지 4~8주가 걸리며 여러 종류의 까다로운 생화학적 검사와, 면역학적 검사 등을 거쳐야한다. 여러 방법들이 동원되지만 근래에 들어 유전자를 표적으로 하는 빠르고 간편한 방법들이 점차 많이 사용되고있다. 즉 특정 유전자를 대상으로 genus spe-



Scale: each -- is approximately equal to the distance of 0.705106

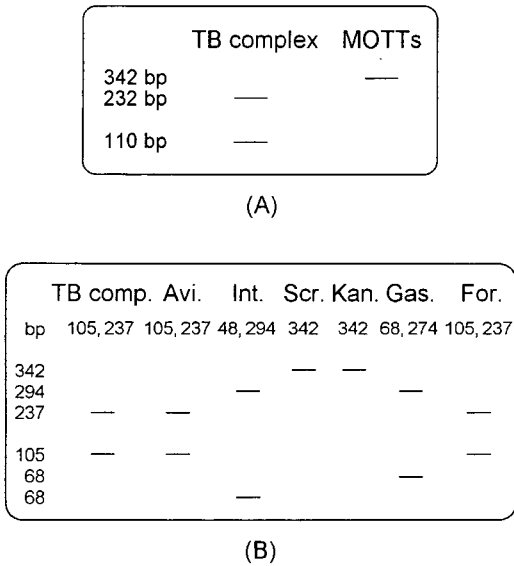
Figure 3. A



Scale: each — is approximately equal to the distance of 0.005306

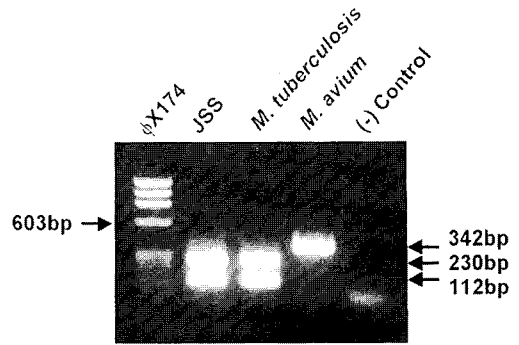
Figure 3. B

Figure 3. Phylogenetic tree based on the *rpoB* sequences of 52 mycobacteria (A). Clinical isolates (●) could be identified by referring their sequences to those of reference strains (B). MegAlign package (Version 3.12e, DNASTAR) was used to construct the tree. ATCC numbers of *M. celatum* and *M. fortuitum* are shown in the parenthesis. (B) Topology was also evaluated by bootstrap analysis (MEGA program, 100 repeats; *R. equi* as the outgroup). The values in the tree represent bootstrap results.

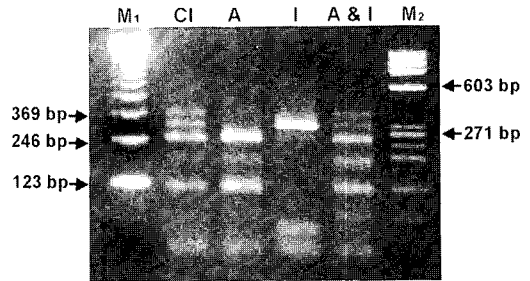


**Figure 4.** Schematic figure showing the result of *Hind*-II (A) and *Mva*-I PRA (B). [Panel A] TB complex: *M. tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*), MOTT: mycobacteria other than *M. tuberculosis* complex, [Panel B] TB comp.: *M. tuberculosis* complex, Avi.: *M. avium*, Int.: *M. intracellulare*, Scr.: *M. scrofulaceum*, Kan.: *M. kansasii*, Gas.: *M. gastri*, For.: *M. fortuitum*.

cific 혹은 species specific한 nucleic acid probe를 이용하는 것이다. Mycobacteria의 경우 5 균종 (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, MAC, *M. kansasii*, *M. gordonae*)에 대해 商品化된 nucleic acid probe가 있다<sup>5</sup>. 이는 매우 한정적인 균종에 국한된 것으로 mycobacteria의 존재를 탐지하는 것 뿐 아니라 균 동정에도 큰 도움이 되질 못한다. 다양하지 못하나마 5종의 probe를 사용하면 대표적으로 인체에 질환을 일으키는 균종들에 대한 동정을 할 수는 있다. 그러나 문제점이 없는 것이 아니다. 이들 probe들이 최근에 분리 동정되는 균종들과 cross-hybridization을 보인다는 것이다<sup>3</sup>. 결핵균을 제외한 MOTT에 의한 감염 예가 증가하고 이중 가장 많은 비율을 MAC이 차지한다는 것, 그리고 이전에는 알려지지 않았던 새로운 species에 의한 감염증이 계속 나타나 이러한 우려가 현실로 드러나는 것을 알 수 있는 것이다. 각 균종에 특이적인 유전자를 찾기에 어려움이 있는 것도 사실이지만 겨우 5종에 대한 probe만이 사용 가능한 것 역시 부족하다는 것으로 지적되어야 할



**Figure 5A**



**Figure 5B**

**Figure 5.** Identification of clinical isolate by *Hind*-II and *Mva*-I PRA. *rpoB* DNAs of Clinical isolates were amplified and analyzed by *Hind*-II (A) and *Mva*-I PRA (B) on a 3% agarose gel. [Panel A] RFLP pattern of clinical isolate (JSS) was same as that of prototype strain of *M. tuberculosis*. JSS: clinical isolate, 174: 174/RF DNA/*Hae*-III digest. [Panel B] Clinical isolate (CI) seemed to be a mixture of *M. avium* and *M. intracellulare* (A & I). Prototype strains of *M. avium* (A) and *M. intracellulare* (I) showed different patterns. M1: DNA ladder (123 bp), CI: clinical isolate, A: *M. avium* (ATCC 25291), I: *M. intracellulare* (ATCC 13950), A&I: mixed sample of *M. avium* and *M. intracellulare*, M2: 174/RF DNA/*Hae*-III digest.

것이다. 이들은 16S rRNA gene, *dnaJ* gene, IS 6110 등을 표적으로 한 것인데 가능하다면 다른 유전자를 사용할 수도 있을 것이다. 우리는 여기서 RNA polymerase  $\beta$  subunit를 코딩하는 *rpoB* 유전자를 유용한 표적으로 제시하고자 하였다.

RNA polymerase 유전자는 16S rRNA와 같이 phylogenetic marker molecule로 적당한 것으로 보고된 바 있으며<sup>14</sup> (Klenk, 1994), 등록된 그람 양성 세균, 그람 음성세균, 마이코플라즈마 및 나선균 등의 염기서열을 포함하여 구성한 계통도에서



이들의 생물학적 및 구조적인 차이점에 따른 분류가 그대로 반영되는 것을 볼 수 있었다. 즉 phenotypic difference가 phylogenetic tree에 반영된다는 것이다. 더욱 중요한 것은 시험에 사용한 균종들의 위치도 그간 중을 나누던 기준에 거의 부합되게 나타나고 있음을 볼 수 있었다. 따라서 *rpoB* 분절을 표적으로 하는 자동 염기서열 분석에 따른 동질성 비교와 PCR-RFLP에 의해 mycobacteria의 동정이 가능하다는 것이다.

## 결 론

Mycobacteria의 *rpoB* DNA만이 특이적으로 증폭되고 다른 세균의 *rpoB* DNA는 증폭되지 않는 mycobacteria 특이 primer set를 考案하여 결핵균을 포함한 52 표준 균주의 *rpoB* DNA (342 bp)를 PCR로 증폭하여 염기서열 (*E. coli* amino acid No. 447-561)을 분석한 결과, mycobacteria 각 균종에 특징적인 염기서열들이 있음을 확인하였다. 또한 증폭된 *rpoB* DNA 안의 restriction enzyme site를 이용하여 RFLP 분석으로 mycobacteria 각 균종의 동정이 가능하였다. 이는 *rpoB* 유전자를 표적으로 하는 염기서열 분석과 RFLP 분석방법이 결핵균을 포함한 mycobacteria 존재의 탐지뿐만 아니라, 신속한 감별이 가능하며 (TB complex와 MOTT), 더 나가 균종 동정에 이용할 수 있다는 것을 보여주는 것이다.

## 참 고 문 헌

- 1) Baldauf SL, Palmer JD, Doolittle WF: The root of the universal tree and the origin of eukaryotes based on elongation factor phylogeny. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** (15): 7749-7754, 1996.
- 2) Barnes P, Bloch AB, Davidson PT, Snider Jr. DE: Tuberculosis in patients with immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* **324**: 1644-1650, 1991.
- 3) Buttler WR, O'connor SP, Yakrus MA, Gross WM: Cross-reactivity of genetic probe for detection of *Mycobacterium tuberculosis* with newly described species *Mycobacterium celatum*. *J Clin Microbiol* **32** (2): 536-538, 1994.
- 4) Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtschink PJ: How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 166-170, 1992.
- 5) Frederick SN, Beverly M: **Ch. 31.** *Mycobacterium* in 'Manual of clinical Microbiology', 400-437, 1995.
- 6) Gail LW, Washington II JA: Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*: Review of microbiology and clinical aspects. *Rev Inf Dis* **9** (2): 275-294, 1987.
- 7) Gardner MJ, Goldman N, Barnett P, Moore PW, Rangachari K, Strath M, Whyte A, Williamson DH, Wilson RJ: Phylogenetic analysis of the *rpoB* gene from the plastid-like DNA of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **66**: 221-231, 1994.
- 8) Good RC, Snider, Jr DS: Isolation of non-tuberculous mycobacteria in the united states, 1980. *J Inf Dis* **146** (6): 829-833, 1982.
- 9) Honore, NT, Bergh S, Chanteau S, Doucet-Populaire F, Eiglmeier K, Gamier T, Georges C, Launois P, Limpaboon T, Newton S, Niang K, Del Portillo P, Ramesh GR, Reddi P, Ridet PR, Sittisombut N, Wu-Hunter S, Cole ST: Nucleotide sequence of the first cosmid from the *Mycobacterium leprae* genome project: structure and function of the Rif-Str regions. *Mol Microbiol* **7** (2): 207-214, 1993.
- 10) Hunt JM, Roberts GD, Stockman L, Felmiee TA, D. H. Persing: Detection of a genetic locus encoding resistance to rifampin in mycobacterial cultures and in clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* **18**: 219-227, 1994.
- 11) Iwabe N, Kuma K, Hasegawa M, Osawa S, Miyata T: Evolutionary relationship of archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **86** (23): 9355-9359, 1989.
- 12) Iwabe N, Kuma K, Kishino H, Hasegawa M, Miyata T: Evolution of RNA polymerases and branching patterns of the three major groups of Archaeobacteria. *J Mol Evol* **32**: 70-78, 1991.
- 13) Jin D, Gross CA: Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J Mol Biol* **202**:

- 45-58, 1988.
- 14) Klenk HP, Zillig W: DNA-dependent RNA polymerase subunit B as a tool for phylogenetic reconstructions: branching topology of the archaeal domain. *J Mol Evol* **38**: 420-32, 1994.
  - 15) Levin ME, Hatfull GF: *Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase: DNA supercoiling, action of rifampin and mechanism of rifampin resistance. *Mol Microbiol* **8** (2): 277-285, 1993.
  - 16) Lill UI, Behrendt EM, Hartmann GR. Hybridization in vitro of subunits of the DNA-dependent RNA polymerase from *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus*. *Eur J Biochem* **52** (3): 411-420, 1975.
  - 17) Ludwig W, Schleifer KH. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Rev* **15**: 155-73, 1994.
  - 18) Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC: *Manual of Clinical Microbiology* 6th Ed. ASM Press, Washington, D.C. Frederick SN and Metchock B. p. 400-437, 1995.
  - 19) Puhler G, Leffers H, Gropp F, Palm P, Klenk HP, Lottspeich F, Garrett RA, Zillig W: Archaeobacterial DNA-dependent RNA polymerases testify to the evolution of the eukaryotic nuclear genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**: 4569-73, 1989.
  - 20) Rogall T, Flohr T, Bottger EC: Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. *J Gen Microbiol* **136** (Pt 9): 1915-1920, 1990a
  - 21) Rogall T, Wolters J, Flohr T, Bottger EC: Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int J Syst Bacteriol* **40**: 323-330, 1990b.
  - 22) Rowland GC, Aboshkiwa M, Coleman G. Comparative sequence analysis and predicted phylogeny of the DNA-dependent RNA polymerase beta subunits of *Staphylococcus aureus* and other eubacteria. *Biochem Soc Trans* **21**: 40S, 1993.
  - 23) Runyon EH: Identification of mycobacterial pathogens utilizing colony characteristics. *Am J Clin Pathol* **54**: 578-586, 1970.
  - 24) Sneath PHA, Sokal RR. Numerical taxonomy. W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1973.
  - 25) Stahl DA, Urbance JW. The division between fast-and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *J Bacteriol* **172**: 116-124, 1990.
  - 26) Takewaki S, Okuzumi K, Ishiko H, Nakahara K, Ohkubo A, Nagai R: Genus-specific polymerase chain reaction for the mycobacterial *dnaJ* gene and species-specific oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol* **31**: 446-450, 1993.
  - 27) Takewaki<sup>b</sup> S, Okuzumi K, Manabe I, Tanimura M, Miyamura K, Nakahara K, Yazaki Y, Ohkubo A, Nagai R. Nucleotide sequence comparison of the mycobacterial *dnaJ* gene and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacterial species. *Int J Syst Bacteriol* **44**: 159-166, 1994.
  - 28) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T: Detection of rifampin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* **341**: 647-650, 1993a.
  - 29) Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T: Rapid identification of Mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* **31** (2): 175-178, 1993b.
  - 30) Wayne LG, Good RC, Tsang A, Buttler R, Dawson D, Groothuis D, Gross W, Hawkins J, Kilburn J, Kubin M, Schroder KH, Silcox VA, Smith C, Thorel MF, Woodley C, Yakus MA: Serovar determination and molecular taxonomic correlation in *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*: a cooperative study of the international working group on mycobacterial taxonomy. *Int J Syst Bacteriol* **43** (3): 482-489, 1993.
  - 31) Whelen AC., Felmler TA, Hunt JM, Williams DL, Roberts GD, Stockman L, Persing DH: Direct genotypic detection of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistance in clinical specimens by using single-tube heminested PCR. *J Clin Microbiol* **33**: 556-561, 1995.
  - 32) Zillig W, Klenk HP, Palm P, Puhler G, Gropp F, Garrett RA, Leffers H: The phylogenetic re-

Yoon-Hoh Kook: Identification of mycobacteria by PCR-sequencing and RFLP

lations of DNA-dependent RNA polymerases  
of archaeobacteria, eukaryotes, and eubacteria.

*Can J Microbiol* **35**: 73-80, 1989.

---