

비결핵항산성균의 *rpoB* DNA 염기서열과 SSCP pattern 분석에 따른 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 임상분리균주의 동정

제주대학교 의과대학 미생물학 교실¹, 서울대학교 의과대학 미생물학교실 및
의학연구원 감염병 연구소², 결핵연구원³

김범준¹ · 이승현² · 이근화² · 박정규² · 최명식² · 김익상² · 최성배²
황응수² · 차창룡² · 김상재³ · 배길한³ · 국윤호^{2*}

=Abstract=

Identification of *Mycobacterium avium* complex (MAC) Clinical Strains to a Species Level by Sequencing and PCR-SSCP Analysis of *rpoB* DNA

Bum-Joon Kim¹, Seung-Hyun Lee², Kuen-Hwa Lee², Chung-Kyu Park²,
Myung-Sik Choi², Ik-Sang Kim², Sung-Bai Choi², Eung-Su Hwang²,
Chang-Yong Cha², Sang-Jae Kim³, Gill-Han Bai³
and Yoon-Hoh Kook^{2*}

Department of Microbiology, Cheju National University College of Medicine, Cheju 690-756¹,
Department of Microbiology and Institute of Endemic Diseases (SNUMRC), Seoul National
University College of Medicine, Seoul 110-799², The Korean Institute of Tuberculosis,
the Korean National Tuberculosis Association, Seoul 137-140³

A recent study showed that comparative sequence analysis of *rpoB* DNAs could reveal natural relationships in genus *Mycobacterium* [*J Clin Microbiol.* 37 (6). 1999]. *rpoB* DNAs showed interspecies variation and intraspecies conservation. Based on these data, we developed polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) protocols which enable species differentiation in genus *Mycobacterium*. When this assay was applied to 24 clinical isolates identified as *M. avium* complex (MAC) by biochemical test, these were successfully differentiated into *M. avium* and *M. intracellulare*. These results were concordant with those obtained by 16s rDNA analysis. It is the first report that PCR-SSCP analysis of *rpoB* DNA could be used for species differentiation of MAC strains.

Key Word: PCR-SSCP, MAC, *rpoB* DNA

접수: 2000년 1월 28일, 게재결정: 2000년 2월 11일

*책임저자: 국윤호, 110-799 서울특별시 종로구 연건동 28번지, 서울대학교 의과대학 미생물학교실 및 암연구소센터
전화: 740-8313, Fax: 743-0881, e-mail: yhkook@plaza.snu.ac.kr

*본 과제는 1996년도 서울대학교 의과대학 병원 지정진료 연구비 (02-96-222) 및 과거저 (MOST) 생명공학 연구비
97-N1-02-01-A-05의 일부지원에 의해 수행되었다.

서 론

Mycobacterium avium complex (MAC)는 대표적 인 두 종, 즉 *M. avium*, *M. intracellulare*와 이 두 종에 속하지 않는 여러 종으로 구성되어 있고²⁶⁾, 비결핵항산성균 중에서 가장 빈번하게 임상검체에서 분리되고 있다¹⁸⁾. 이들은 임상적으로 폐결핵과 유사한 폐질환을 일으키고, 어린 아이에서 cervical lymphadenitis을 일으킨다고 알려져 있다. 1980년 이후에는 Human immunodeficiency virus (HIV) 감염이 확산되면서 MAC가 면역 저하 환자에서 전신적인 파종성 감염을 유발한다고 알려진 이후로 그 중요성이 증대되고 있다²⁹⁾.

과거에는 MAC에 속하는 종들이 서로 같은 임상 증상을 일으키고, 생화학적인 특성과 치료방법도 서로 비슷하기 때문에 이 들을 서로 구분하지 않고 complex로 그룹지어 분류하였다. 그러나, 폐질환을 일으키는 MAC와 면역저하 환자에서 파종성 감염을 일으키는 MAC가 서로 다른 특성을 갖고 있다는 사실이 알려진 이후로 MAC안의 종들을 서로 구분할 필요성이 대두되고 있다. 혈청학적 검사법, 혹은 DNA의 hybridization 분석에 의해, 후천성 면역결핍증과 관련된 MAC는 *M. intracellulare* 보다는 *M. avium*에 속하는 것이 많다고 보고되었다⁹⁾. 이 중 혈청학적 검사법은 검사가 간단하고, 고가의 장비가 갖추어지지 않은 실험실에서 손쉽게 이용할 수 있기 때문에 MAC의 종들을 구분하는 데에 널리 사용되고 있다^{7,10,28)}. 그러나, 이 방법에는 여러 단점들이 있다. 즉, 혈청학적 검사 결과가 실험실 사이에서 일치하지 않고, 많은 MAC가 자발적인 응집 반응 혹은 혈청에 반응하지 않는 등의 이유로 인하여 MAC 종 분류의 어려움이 있다. 또한, 이러한 혈청학적 검사 결과는 분자생물학적 검사결과와 일치하지 않는다는 보고도 있다^{7,28)}.

한편, 세균의 분류에 널리 이용되고 있는 염기서열을 이용한 계통 분류학적인 분석 방법도 이용되고 있다. 현재, 16S rDNA-23S rDNA의 internal transcribed sequence (ITS), 16S rDNA, 와 RNA polymerase gene (*rpoB*) 등이 미코박테리움 속 종 분류의 표적 분자로서 사용되고 있다^{6,12,21)}. 이러한 방법은 결과가 정확하고 재연성이 높다는 장점이 있으나, 염기서열을 분석해야 되기 때문에 비용이 다소 많이 소요될 수 있다는 단점이

있다. 염기서열 분석 방법의 단점을 보완할 수 있는 비교적 간단한 방법인 PCR-SSCP 분석 방법이 미코박테리움 속 종 분류에 사용될 수 있다. 이 방법은 리팜핀 내성 결핵균을 검출하는데에 널리 이용되고 있지만^{11,13,19,23)}, 16S rDNA 그리고, *dnaJ* DNA를 표적으로 하여 균종 동정에도 이용된 바 있다^{8,25)}. PCR-SSCP 방법을 균종 동정에 이용하기 위해서는 적절한 표적 유전자를 선택하여야 한다. 즉, 염기서열 분석 방법에 의한 계통분류학적인 방법과 다르게, 이 방법은 종 안의 염기서열 변이가 (intraspecies variation) 1개만 되어도 젤 상에서 서로 다른 이동 속도를 보이기 때문에 서로 다른 종으로 오인될 수 있다. *dnaJ* DNA를 표적으로 사용하는 PCR-SSCP 분석 방법은 종간의 염기서열 차이 때문에 종 분류에 이용될 수 없었던 것도 바로 그런 이유 때문이었다²⁵⁾.

최근에 저자 등은 결핵균의 리팜핀 내성과 관련된 *rpoB* 특정 부위가 미코박테리움 속의 분류학적인 관계를 잘 반영하고, 종 사이에는 염기서열 변이 (interspecies variation)가 있으나 같은 종 안의 염기서열은 매우 잘 보존되어 (intraspecies conservation)있다는 새로운 사실을 보고하였다¹¹⁾. 이러한 결과를 토대로 RNA polymerase 유전자 (*rpoB*)를 표적으로 하여 미코박테리움 속 균종의 분류에 이용할 수 있는 PCR-SSCP 분석 방법을 개발하고자 하였다. 그리고, 이 방법을 기존의 생화학적인 방법에 의해 MAC로 동정된 24 임상 분리주에 적용하여 16S rDNA 염기서열 분석에 의해 얻어진 결과와 비교하였다. 그 결과, PCR-SSCP 분석 방법이 MAC 임상분리주를 *M. avium*과 *M. intracellulare*로 구분 동정하는 또 하나의 좋은 방법이 됨을 확인하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 미코박테리아 표준균주 및 MAC 임상분리균주

표준 균주는 결핵복합체군 2 주 (*M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis*)와 MAC 3 주 (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. paratuberculosis*)를 포함한 임상 검체에서 빈번히 분리되는 총 16 주의 완속 발육 균을 본 실험에서 사용하였다 (Table 1). MAC 임상 분리균은 결핵연구원에서 분리하여 생화학적 검사에 의해 확인된 24 주를 사용하였다.

Table 1. Mycobacteria reference strains used in this study

Species	Strain	Source
<i>M. avium</i>	ATCC 25291	KNTA
<i>M. bovis</i>	ATCC 19210	KNTA
<i>M. celatum</i> Type 1	ATCC 51131	KNTA
<i>M. goodsonae</i>	ATCC 14470	KNTA
<i>M. intracellulare</i>	ATCC 13950	KNTA
<i>M. kansasii</i>	ATCC 12478	KNTA
<i>M. marinum</i>	ATCC 927	KNTA
<i>M. nonchromogenicum</i>	ATCC 19530	KNTA
<i>M. paratuberculosis</i>	ATCC 19698	KNTA
<i>M. scrofulaceum</i>	ATCC 19981	KNTA
<i>M. simiae</i>	ATCC 25275	KNTA
<i>M. szulgai</i>	ATCC 35799	KNTA
<i>M. terrae</i>	ATCC 15755	KNTA
<i>M. triviale</i>	ATCC 23292	KNTA
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	ATCC 27294	KNTA
<i>M. ulcerans</i>	ATCC 19423	KNTA

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD

KNTA: The Korean Institute of Tuberculosis, Korean National tuberculosis Association

2. DNA 추출

Bead beater phenol (BB/P) 방법을 이용하여 DNA를 추출하였다^{3,12)}. 균의 집락을 따내, TEN buffer (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM; pH 8.0)에 부유시킨 후에 직경 0.1 mm 초자구 (diameter 0.1 mm; Biospec Products, Bartlesville, Okla., U.S.A.) 100 μ l (packing volume)와 phenol: chloroform: isopropylalcohol (50:49:1) 용액 100 μ l를 함께 부유시켜 mini beater로 1 분간 진탕하여 균체를 파쇄하였다. 균 파쇄액은 12000 rpm으로 5 분간 원심분리하고 상청액 100 μ l을 새로운 tube에 옮긴 후, 60 μ l의 isopropylalcohol을 섞고, 다시 15000 rpm으로 15 분간 원심분리하였다. 침전물은 70% 에탄올로 세척한 후 TE (pH 8.0, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) buffer 60 μ l로 DNA를 회수하였다.

3. PCR에 의한 *rpoB* 유전자 (136-bp) 증폭

MAC 균종 구분을 위한 PCR-SSCP의 표적인

136-bp의 *rpoB* 유전자 분절을 증폭시키기 위해서 forward primer M5 (5'-GGAGCGGATGACCACC-CAGGACGT-3'), reverse primer RM3 (5'-CAGCG-GGTTGTTCTGGTCCATG-3')을 사용하였다. PCR 반응은 2 U의 *Taq* polymerase, 10 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂을 포함하는 AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Korea)을 이용하였다. 주형 DNA 50 ng, primer M5, RM3 각각 20 pmol을 넣고, 증류수를 최종 부피가 20 μ l가 되도록 첨가하여 혼합물을 만들었다. PCR은 first denature 95 $^{\circ}$ C로 5분, 30 cycle로 denaturation 95 $^{\circ}$ C 30초, annealing 70 $^{\circ}$ C 30초, extension 72 $^{\circ}$ C 45초, final extension 72 $^{\circ}$ C 5분으로 수행하였다 (Model 9600 thermocycler, Perkin-Elmer cetus).

4. PCR-SSCP

PCR-SSCP 반응은 PCR 혼합물에 [α -³²P] dCTP를 0.1 μ l (0.1 μ Ci) 첨가하여 136-bp *rpoB* 분절을 증폭시키는 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였다¹¹⁾. 표지된 PCR 산물 2 μ l에 4 μ l의 gel loading

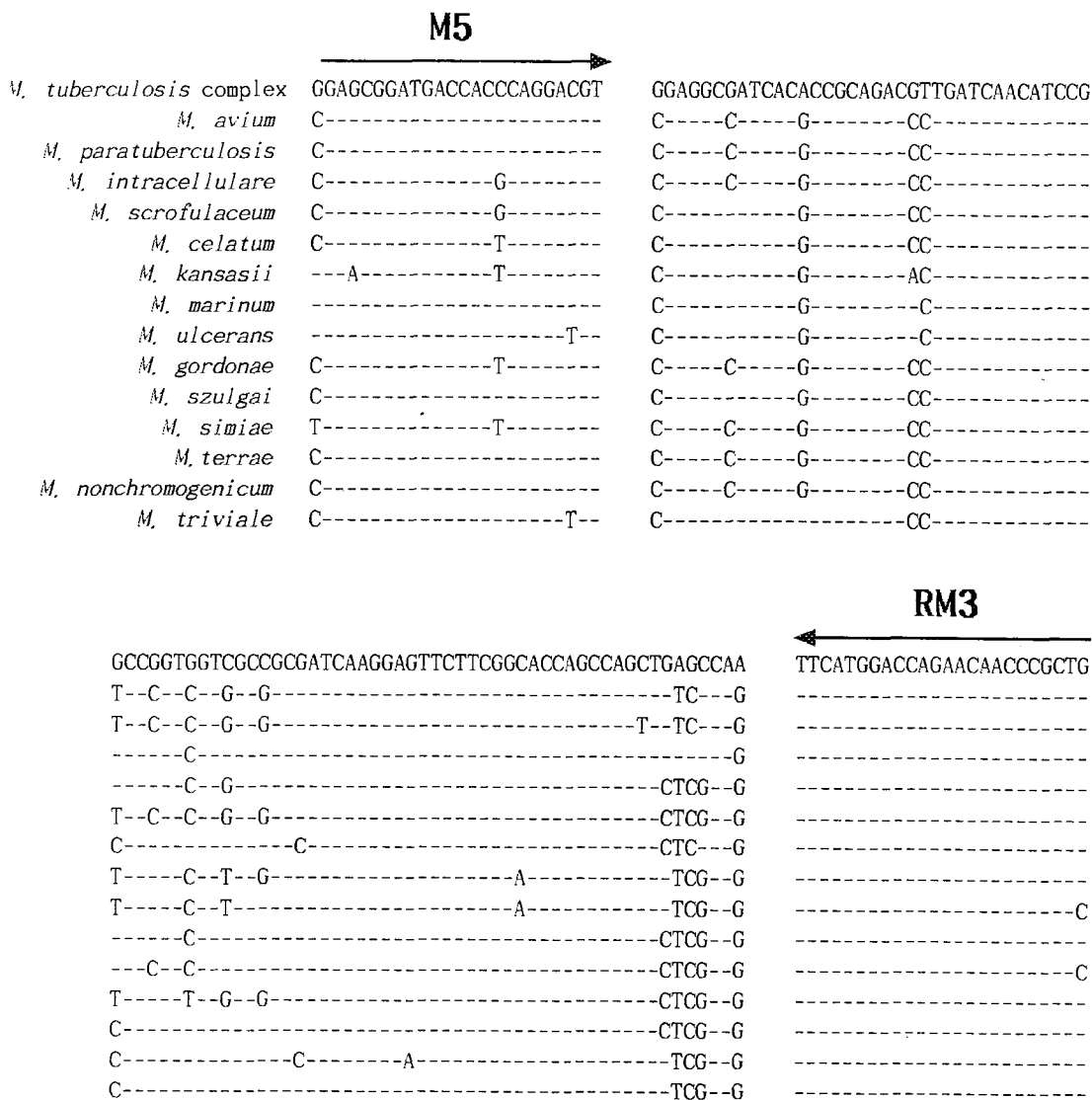


Figure 1. *rpoB* DNA (136-bp) alignment, which was used as PCR amplification products for SSCP analysis in this study. M5 (forward primer) and RM3 (reverse primer) were used for amplification of all mycobacteria strains containing MAC. In case NTM (nontuberculous mycobacteria) sequences corresponding to respective primer were compared to those of *M. tuberculosis*, only sequence differences of less than two were observed. Comparative alignment of 88-bp, excluding sequences corresponding to both primers revealed interspecies variation, which enabled migration pattern specific to respective strains in SSCP analysis. Dashes indicate nucleotides identical to those of *M. tuberculosis*.

buffer (95% formamide, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol, 20 mM EDTA)를 섞은 후에 이 혼합물을 95°C에서 5 분간 처리하였다. 이 산물을 0.5 X MDE gel (AT Biochem, Malvern, Pa)에서 0.6 X TBE buffer (0.45 M Tris-borate, 10 mM EDTA)로 실온에서 8 시간 동안 전기영동한 후, -70°C에서 12 시간 동안 X-ray 필름에 노출시켰

다. 비결핵항산성균 SSCP 양상을 비교 분석하기 위해서 *M. tuberculosis*, H37Rv를 대조로 사용하였으며, MAC 임상분리균을 구분하기 위해서는 대표적인 두 표준균주, *M. avium* (ATCC 25291), *M. intracellulare* (ATCC 13950)을 대조로 사용하였다.

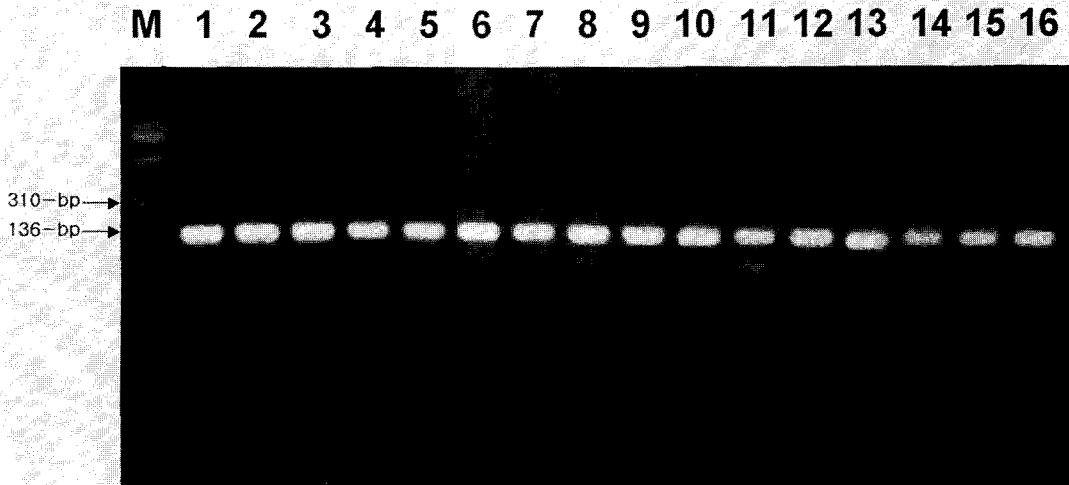


Figure 2. Amplification of *rpoB* DNA (136-bp) by PCR using M5-RM3 primer set. M: Φ X174, 1: *M. tuberculosis* H37Rv, 2: *M. bovis*, 3: *M. intracellulare*, 4: *M. avium*, 5: *M. paratuberculosis*, 6: *M. celatum*, 7: *M. scrofulaceum*, 8: *M. terrae*, 9: *M. nonchromogenicum*, 10: *M. triviale*, 11: *M. gordonae*, 12: *M. szulgai*, 13: *M. kansasii*, 14: *M. ulcerans*, 15: *M. marinum*, 16: *M. simiae*.

5. 16S rDNA의 염기서열 분석

PCR-SSCP 분석에 의한 MAC의 동정결과와 비교하기 위하여, 실험에 사용한 24 개의 임상분리 균주를 대상으로 16S rDNA 염기서열 분석을 수행하였다.

미코박테리움 속 균종의 분류를 가능하게 하는 과변이부위 2 곳 중에서 대장균의 16S rDNA의 전체 염기서열을 기준으로 129-bp에서 202-bp에 해당하는 과변이 부위 A를 표적으로 하여 MAC 임상분리균의 분류에 이용하였다¹⁹⁾. 전체 16S rDNA 중에서 대장균의 염기서열을 기준으로 9-bp에서 1046-bp에 해당하는 부위를 PCR로 증폭시킨 후, 직접 염기서열 분석방법으로 분석하였다. PCR은 AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Korea)을 이용하였고, forward primer로 285 (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 대장균 기준 9-20-bp), reverse primer로 264 (5'-TGCACACAGGCCACAAGGGA-3', 대장균 기준 1027-1046-bp)를 사용하여 16S rDNA 절편을 증폭시켰다¹⁹⁾. PCR 반응은 first denature 95℃로 5분, 30 cycle로 denaturation 95℃ 60초, anealing 60℃ 45초, extension 72℃ 60초, final extension 72℃ 5분으로 수행하였다. 증폭된 산물은 QIAEX II Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)에 의해 정제하여 Applied Biosystems 373A 자동염기서열 분

석기와 BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (PE Applied Biosystems, Warrington, U.K.)을 이용하였다. 염기서열 분석을 위하여, 정제된 주형 DNA 60 ng, primer 244 (5'-CCCACTGCTGCCTCCGTAG-3', 대장균 기준 341-361-bp)¹⁹⁾ 3.2 pmol, BigDye Terminator RR mix (PE Applied Biosystems, Part No. 4303153) 8 μ l를 섞은 다음, 증류수를 첨가하여 20 μ l의 혼합물을 만들었다. 반응은 95℃에서 15초, 60℃에서 10초, 60℃에서 4분으로 30 cycle 수행하였다¹²⁾.

결 과

Mycobacterium genus specific primer 제작

미코박테리움 속 모든 균주의 *rpoB* 유전자를 증폭시킬 수 있고, 또한 SSCP 분석에 용이한 유전자 분절을 증폭시킬 수 있는 primer를 제작하고자 기존에 발표된 미코박테리아 *rpoB* 염기서열을 분석하였다. 그 결과 비록 모든 미코박테리아에 공통적인 염기서열은 아니지만, 상당히 보존되어 있는 두 부위 (M5: 24-bp, RM3: 24-bp)를 찾을 수 있었다. Forward primer와 reverse primer 부위를 결핵 이외의 다른 미코박테리아와 비교해볼 때, forward primer 부위는 24-bp 중에서 단지 2-bp 이하의 염기서열이 다르고, reverse primer 부위는 *M. ulcerans*와 *M. szulgai*에서만 1-bp의 염

H 1 H 2 H 3 H 4 H 5 H 6 H 7 H 8 H 9 H 10 H 11 H 12 H 13 H 14 H

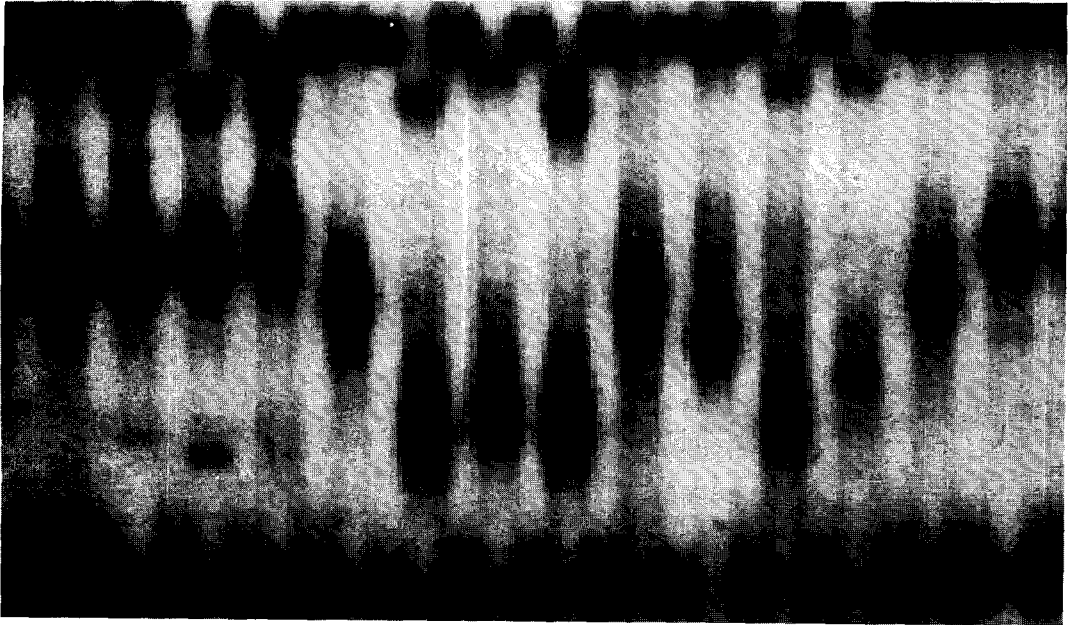


Figure 3. Differentiation of mycobacteria reference strains by PCR-SSCP. H: *M. tuberculosis* H37Rv, 1: *M. intracellulare*, 2: *M. avium*, 3: *M. paratuberculosis*, 4: *M. celatum*, 5: *M. scrofulaceum*, 6: *M. terrae*, 7: *M. nonchromogenicum*, 8: *M. triviale*, 9: *M. gordonae*, 10: *M. szulgai*, 11: *M. kansasii*, 12: *M. ulcerans*, 13: *M. marinum*, 14: *M. simiae*.

기서열이 다르고, 나머지 균종에서는 전부 일치하였다. 또한, PCR 증폭에 가장 큰 영향을 미치는 양 primer의 3' 말단의 염기서열은 모든 균종이 공통적인 염기서열을 가지고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

본 실험에서 사용된 *rpoB* 분절이 SSCP 분석에 의한 균종 사이의 감별에 이용될 수 있기 위해서는 사용된 염기서열이 각 균종에 특이적이어야 한다. *rpoB* 분절의 균주 특이성을 살펴본 결과, 양 primer 사이의 염기서열 (88-bp)이 미코박테리움 속 균종마다 서로 다르다는 것을 확인할 수 있었다. 16S rDNA의 염기서열 분석에 있어서 서로 구분되기 힘든 *M. marinum-M. ulcerans*와 *M. avium-M. paratuberculosis*도 1-bp의 염기서열이 서로 달랐다 (Fig. 1).

이들 primer로 미코박테리움 속 균종 (16 주)을 증폭시킨 결과, 모두 SSCP 분석에 사용할 수 있는 136-bp의 *rpoB* 분절을 생산함을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

PCR-SSCP에 의한 미코박테리움 속 표준 균종의 감별

비결핵항산성균 14 주의 SSCP 양상을 결핵균과 비교해 보았을 때, 이들은 모두 결핵균과 다른 band의 이동 양상을 보였고, 또한 서로 구별되는 독특한 이동 양상을 보였다. 특히 MAC의 주요 균종인 *M. avium*과 *M. intracellulare*는 뚜렷이 구분되었을 뿐만 아니라, 16S rDNA의 염기서열 분석에 있어서 서로 구분이 힘든 *M. avium-M. paratuberculosis*와 *M. marinum-M. ulcerans*도 비록 *rpoB* 분절 염기서열에 있어서 각각 1 개의 염기서열이 달랐지만, SSCP 분석상에서는 서로 다른 이동양상을 보여주고 있다 (Fig. 3).

PCR-SSCP에 의한 MAC 임상분리 균주의 감별

기존의 생화학적 방법에 의해 동정된 24개의 MAC 임상 분리 균주를 대상으로 PCR-SSCP 분석법을 적용하였다. 24 주 모두 *M. avium*, 혹은 *M. intracellulare* 표준 균주와 같은 단일나선 DNA의 이동양상을 보였다. 이 가운데 7 주는 *M. avium*과

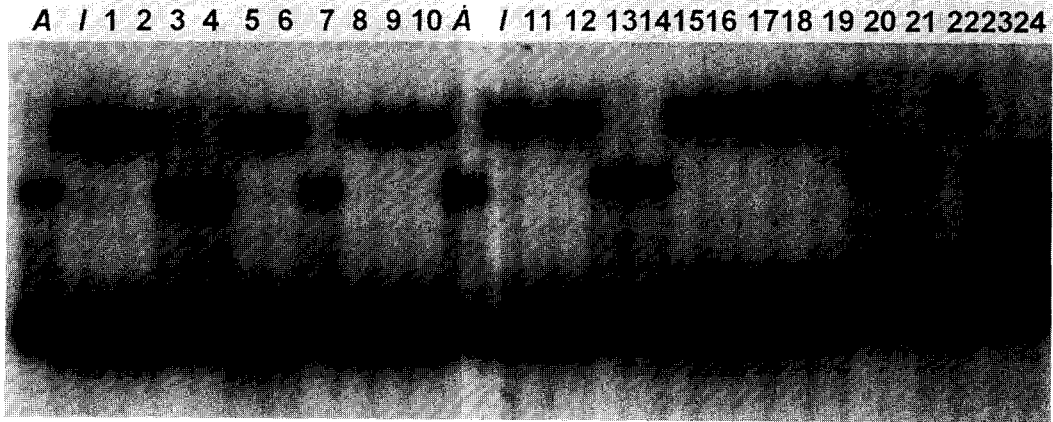


Figure 4. Differentiation of MAC clinical isolates into species level by PCR-SSCP. A: *M. avium*, I: *M. intracellulare*, 1-24: MAC clinical isolates.

Table 2. Differentiation of MAC clinical isolates to species level by PCR-SSCP and 16S rDNA analysis

Method	No. of isolates identified as		
	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>	other strain
PCR-SSCP	7	17	0
16s rDNA	7	17	0

같은 이동양상을 보였고, 나머지 17 주는 *M. intracellulare*와 같은 이동양상을 보였다 (Fig. 4). SSCP에 의한 결과는 16S rDNA에 의해 얻어진 결과와 100% 일치하였다 (Table. 2).

고찰

과거에는 결핵을 일으키는 *M. tuberculosis*가 임상적으로 제일 중요하고 비결핵항산성균은 단지, 질병과는 무관하게 결핵균 배양시 오염된 것이거나, 아니면 면역기능이 저하된 환자나 노약자에서 질병을 일으키는 기회감염균으로 간주되어 왔었다. 그러나 이러한 비결핵항산성균이 면역기능 저하가 없는 환자에게도 질병을 일으키는 것이 드물지 않게 발견되었다. 또한 HIV 감염이 확산되고, 비결핵항산균이 후천성 면역 결핍증 환자에서 전신적인 과중성 감염을 일으킨다는 것이 알려지면서 비결핵항산성균에 대한 관심이 높아지고 있다^{6,29)}. 마찬가지로 우리나라에서도 결핵유병율이 점차 감소하고 있고, 후천성

면역 결핍증 환자가 점차 증가하는 추세에 있기 때문에 상대적으로 비결핵항산성균에 의한 감염의 빈도가 더욱 높아질 가능성도 지적되고 있다^{2,20)}.

비결핵항산성균은 흔히 사용되는 항결핵제들에 내성인 경우가 있기 때문에 각 종에 따라 임상적 중요성과 치료방침이 달라질 수 밖에 없다. 이러한 이유로, 결핵균과 비결핵항산성균의 분리 동정 또는 비결핵항산성균 사이의 동정이 과거와 달리 중요한 문제로 대두되고 있다. 비결핵항산성균은, 비록 분리되는 비율이 지역에 따라 다르지만, MAC가 어느 지역에서나 높은 빈도로 분리되고 있다. 국내에서도 MAC가 가장 많은 빈도로 분리되고 있다. 따라서, 비결핵항산성균 중에서 MAC의 동정이 가장 큰 비중을 차지한다고 할 수 있다.

일반적으로 미코박테리움 속 균종은 독특한 균의 성질 때문에 염색성, 성장속도, 집락의 착색여부, 기타 특징적인 세포벽 성분 검사등과 더불어 약 20여가지의 생화학적인 동정방법이 사용되고 있다.그러나, 이러한 방법은 배양 시간이 많이 소요되기 때문에 치료시기를 놓칠 수 있다는 문제점이 있다. 또한 비결핵항산성균 중에 큰 비중을 차지하는 MAC 종을 분리 동정하기 위해서는 그 외에 혈청학적 검사까지 필요하다는 문제점이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해서 미코박테리움 속 균종의 계통적 관계를 잘 반영하는 16S rDNA, *dnaJ* 유전자, 혹은 16S-23S internal transcribed sequence (ITS) 등을 표적으로 하여 PCR을 이용한 염기서열 분석방법, 혹은 탐지자

를 이용한 hybridization 방법 등을 이용하여 균종 동정에 사용하고 있다. 이러한 방법은 정확한 반면 상대적으로 비용이 많이 소요된다. 이러한 방법 이외에 유전자 변이를 쉽게 찾을 수 있는 방법인 PCR-SSCP 분석을 미코박테리움 속 균종의 동정에 이용할 수 있다. 이 방법은 결핵균 리팜핀 내성을 유발하는 *rpoB* 유전자의 변이를 검출하기 위해서 사용된 바 있고, 16S rDNA, *dnaJ* 등을 표적으로 하여 균종 동정에도 이용되었다. 그러나, 염기 1개의 변이도 단일 나선 DNA의 이동양상에 영향을 미칠 수 있기 때문에, PCR-SSCP 분석 방법이 균종 동정에 이용되기 위해서는 반드시 표적이 되는 미코박테리움 균종 사이의 유전자의 염기서열 변이 (interspecies variation)와 같은 균종의 염기서열 보존 (intraspecies conservation)이 분석되어야 한다.

16S rDNA는 이미 여러 연구자에 의해 미코박테리움 속 균종 사이의 염기서열 변이와 동종 안의 염기서열 보존이 검증이 되었기 때문에 PCR-SSCP 분석으로 균종을 구분할 수 있었다. 그러나, 최근에 *M. terrae*나 *M. celatum*과 같은 균은 16S rDNA를 두 copy 가지고 있고, 또한 이들의 염기서열이 서로 다르다고 보고되었다^{15,16)}. 이는 PCR-SSCP에 있어서 문제를 일으킬 수 있음을 의미하는 것이다. *dnaJ* 유전자를 표적으로 하는 PCR-SSCP 분석 방법은 균종 사이의 염기서열 변화는 있지만, 동종 안의 염기서열이 보존되어 있지 않기 때문에 균종 동정에 사용하기에 적합하지 않다고 알려져 있다²⁵⁾.

최근에 저자들은 결핵균에 리팜핀 내성을 유발하는 *rpoB* 분절 염기서열이 미코박테리움 속 균종간의 계통적 관계를 잘 반영하고, 각 균종간의 염기서열 변이와 동종 간의 염기서열이 보존되어 있다는 것을 검증한 바 있다.

PCR-SSCP 분석 방법이 미코박테리움 속 균종 동정에 이용될 수 있기 위해서는 먼저 이들 균종을 전부 증폭시킬 수 있는 미코박테리움 속 특이적인 primer의 개발이 선행되어야 한다. 본 실험에 사용된 미코박테리움 속 특이적인 primer인 M5, RM3는 기존에 발표된 염기서열을 분석하여 미코박테리움 속 균종에서 잘 보존되어 있고, 또한 이 primer 사이의 염기서열이 각각의 종에 따른 다양성을 보일 수 있는 부위를 이용하여 제조하였다. *M. avium*과 *M. intracellulare*의 분리 균주의 염기서열을 분석해 본 결과 본 실험에서

표적으로 사용한 부위에는 거의 염기서열 변화가 관찰되지 않았다.

PCR-SSCP를 15 주의 표준균주에 적용하였을 때에 이들 모두가 염기서열 특이적인 SSCP 이동양상을 보였기 때문에 균종간의 감별이 가능하였다. 또한, 이 방법을 국내에서 분리된 MAC 24주에 적용한 결과, 이들은 MAC의 대표적인 두 균주인 *M. avium*과 *M. intracellulare*의 이동양상과 정확히 일치하였다. 이러한 사실은 본 실험에서 개발된 *rpoB* 유전자를 이용한 PCR-SSCP 방법이 미코박테리움 속 균종 동정에 이용될 수 있음을 보여주는 것이라 할 수 있다.

국내에서 분리된 24 주의 MAC 임상분리균은 모두 *M. avium*이나 *M. intracellulare* 두 종에 속한다는 것을 확인하였다. MAC에 속하는 균은 대표적인 이 두 균종 이외에 무명의 여러 다른 종으로 구성되어 있고 이들은 16S rDNA 혹은 16S rDNA-23S rDNA internal transcribed sequence (ITS)의 염기서열을 비교 분석하였을 때, 이 두 종과 서로 다른 염기서열을 보인다. 본 실험에서 사용된 24 주는 16S rDNA의 과변이 부위 A의 염기서열 분석상에서 모두 *M. avium*, 혹은 *M. intracellulare*의 염기와 같다는 것을 확인할 수 있었기 때문에 이 두 종 이외의 다른 종은 본 연구에서 염기서열이나 SSCP band 이동양상을 관찰할 수 없었다.

본 실험에서는 비결핵항산성균 중에서 임상적으로 가장 중요하고, 가장 높은 빈도로 분리되는 MAC 임상분리균을 대상으로 PCR-SSCP를 적용하였다. 그러나, MAC 이외에 *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae-abscessus* complex도 임상적으로 중요한 비결핵항산성균이고, 또한 국내에서도 높은 빈도로 분리되고 있다. 저자들은 이 균종들도 역시 동종간의 *rpoB* 유전자 염기서열이 잘 보존되어 있음을 확인하였고¹²⁾, *M. kansasii*의 경우에는 subspecies간의 염기서열 보존도 이미 확인하였다 (data not shown). 따라서, MAC에 뿐만 아니라 다른 비결핵항산성균의 동정에도 *rpoB* DNA를 표적으로 하는 PCR-SSCP 분석 방법을 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

미코박테리움 속 균종의 동정을 신속하고 저렴하게 수행할 수 있는 *rpoB* 유전자 분절을 이용한

새로운 PCR-SSCP 방법을 24 주의 MAC 임상 분리균에 적용하여 대표적인 두 종인 *M. avium*과 *M. intracellulare*로 성공적으로 감별할 수 있었다.

이로서 *rpoB* DNA을 이용한 PCR-SSCP는 균종 감별 및 동정 방법으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) 최철석, 이경옥, 이규범: PCR을 이용한 결핵균 진단에 있어서 효과적인 DNA 추출법. 대한 미생물 학회지 **29**: 147-152, 1994.
- 2) Bai GH, Park KS, Kim SJ. Clinically isolated Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis* from 1980 to 1990 in Korea. *J Korean Soc Microbiol* **28**: 1-5, 1993.
- 3) Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PME, Van Der Noordaa J: Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* **28**: 495-503, 1990.
- 4) Devallois A, Picardeau M, Paramasivan CN, Vincent V, Rastogi N. Molecular characterization of *Mycobacterium avium* complex isolates giving discordant results in AccuProbe tests by PCR-restriction enzyme analysis, 16s rRNA sequencing, and DT1-DT6 PCR. *J Clin Microbiol* **35**: 2767-2772, 1997.
- 5) Guthertz LS, Damsker B, Bottone EJ, Ford EG, Midura TF, Janda JM. *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infections in patients with and without AIDS. *J Infec Dis* **160**: 1037-1041, 1989.
- 6) Horsburgh CR Jr. *Mycobacterium avium* complex infection in acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* **324**: 1332-8, 1991.
- 7) Horsburgh CR Jr, Cohn DL, Roberts RB, Masur H, Miller RA, Tsang AY, Iseman MD. *Mycobacterium avium*-*M. intracellulare* isolates from patients with or without immunodeficiency syndrome. *Antimicrob Agents Chemother* **30**: 955-7, 1986.
- 8) Hunt JM, Roberts GD, Stockman L, Felmler TA, Persing DH. Detection of a genetic locus encoding resistance to rifampin in mycobacterial cultures and in clinical specimens. *Diagn Microbiol. Infec Dis* **118**: 219-227, 1994.
- 9) 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.
- 10) Kiehn TE, Edwards FF, Brannon P, Tsang AY, Maio M, Gold JW, Whimbey E, Wing B, McClatchy JK, Armstrong D. Infections caused by *Mycobacterium avium* complex in immunocompromised patients: diagnosis by blood culture and fecal examination, antimicrobial susceptibility tests, and morphological and seroagglutination characteristics. *J Clin Microbiol* **21**: 168-73, 1985.
- 11) Kim BJ, Kim SY, Park BH, Lyu MA, Park LK, Bai GH, Kim SJ, Cha CY, Kook YH: Mutation in the *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis* that interfere with PCR-single-strand conformation polymorphism analysis for rifampin susceptibility testing. *J Clin Microbiol* **35**: 492-494, 1997.
- 12) Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, Kim SJ, Bai GH, Kim SJ, Chae GT, Kim EC, Cha CY, Kook YH. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of RNA polymerase gene (*rpoB*). *J Clin Microbiol* **37**: in press, 1999.
- 13) Lee HY, Cho SN, Bang HE, Lee JH, Bae GH, Kim SJ, Kim JD. Evaluation of PCR-SSCP vs. PCR-sequence analysis for detecting rifampin resistance of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Korean Soc Microbiol* **32**: 635-632, 1997.
- 14) Lisitsyn NA, Sverdlov ED, Moiseyeva EP, Danilevskaya ON, Nikiforov VG: Mutation to rifampin resistance at the beginning of the RNA polymerase beta subunit gene in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **196**: 173-174, 1984.
- 15) Ninet B, Monad M, Elmer S, Pawlowski J, Metral C, Rohner P, Auckenthaler R, Hirschel B: Two different 16s rRNA genes in a mycobacterial strain. *J Clin Microbiol* **34**: 2531-6, 1996.
- 16) Reischl U, Fredmann K, Naumann L, Gaugler BJ, Ninet B, Hirschel B, Elmer S: 16s rRNA

- sequence diversity in *Mycobacterium celatum* strains caused by presence of two different copies of 16s rRNA gene. *J Clin Microbiol* **36**: 1761-4, 1998.
- 17) Richard F, Kenneth HW. Molecular phylogeny of in *Mycobacterium avium* complex demonstrates clinical meaningful divisions. *J Infect Dis* **169**: 305-312, 1994.
 - 18) Roberts GD, Koneman EW, Kim YK. Mycobacterium. In: Balows A. Hausler WJ. Herrmann KL. Isenberg HD. Shadomy HJ. eds. Manual of clinical microbiology. 5th ed. Washington. DC: American Society for Microbiology. 304-39, 1991.
 - 19) Scarpellini P, Braglia S, Brambilla AM, Dalesandro M, Cichero P, Gori A, Lazzarin A: Detection of rifampin resistance by single-strand conformation polymorphism analysis of cerebrospinal fluid of patients with tuberculosis of central nervous system. *J Clin Microbiol* **35**: 2802-2806, 1997.
 - 20) Scientific committee in Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Diseases: National survey of mycobacterial diseases other than tuberculosis in Korea. *Tuberculosis and Respiratory Disease* **42**: 277-93, 1995.
 - 21) Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Bottger EC. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol* **34**: 296-303, 1996.
 - 22) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole ST, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T: Detection of rifampin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* **341**: 647-650, 1993.
 - 23) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Schmidheini T, Bodmer T: Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrob Agents Chemother* **37**: 2054-2058, 1993.
 - 24) Tokue Y, Sugano K, Noda T, Saito D, Shimamoto Y, Ohkura H, Kakizoe T, Sekiya T. Identification of mycobacteria by nonradioisotopic single strand conformation polymorphism analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* **23**: 129-33, 1995.
 - 25) Victor TC, Jordaan AM, Van Schalkwyk EJ, Coetzee GJ, Van Helden PD. Strain-specific variation in the *dnaJ* gene of mycobacteria. *J Med Microbiol* **44**: 332-9, 1996.
 - 26) Wayne LG, Sramek HA. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial disease. *Clin Microbiol Rev* **5**: 1-25, 1992.
 - 27) Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, Crawford JT, Portaels F, Salfinger M, Nolan CM, Abe C, Sticht-Groh V, Gillis TP: Characterization of rifampin resistance in pathogenic Mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 2380-2386, 1994.
 - 28) Yakrus MA, Good RC. Geographic distribution, frequency, specimen source of *Mycobacterium avium* complex serotypes isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol* **28**: 926-9, 1990.
 - 29) Zakowski P, Fligel S, Berlin GW, Johnson L Jr. Disseminated *Mycobacterium avium-intracellulare* infection in homosexual men dying of acquired immunodeficiency. *JAMA* **248**: 2980-2, 1982.