

## 객담에서 분리한 *Aspergillus* 속의 RAPD를 이용한 분자생물학적 동정의 유용성

건양대학교 의과대학 한국진균자원센터<sup>1</sup>, 동남보건대학 임상병리과<sup>2</sup>  
건양대학교 보건복지대학원<sup>3</sup>, 건양대학교병원 진단검사의학과<sup>4</sup>

김 영 권<sup>1</sup> · 홍 성 노<sup>2</sup> · 김 상 하<sup>3</sup> · 서 충 원<sup>4</sup>

### Availability of Identification by RAPD of *Aspergillus* species from Sputum

Young-Kwon Kim<sup>1</sup>, Sung-Rho Hong<sup>2</sup>, Sang-Ha Kim<sup>3</sup>, and Choong-Wonand Seo<sup>4</sup>

Korean Collection of Medical Fungi, Medical Science College of Konyang University, Daejeon 302-718, Korea<sup>1</sup>  
Department of Clinical Laboratory Science, Dongnam Health University, Suwon 440-714, Korea<sup>2</sup>,  
Department of Public Health and Welfare, Graduate School of Konyang University, Daejeon 302-718, Korea<sup>3</sup>,  
Department of Laboratory Medicine, Konyang University Hospital, Daejeon 302-718, Korea<sup>4</sup>

On the basis of morphological characteristics, of total 128 strains of from sputum of tuberculos inpatient were identified as *A. fumigatus* (61 strains), *A. niger* (37), *A. flavus* (26), *A. versicolor* (1), *A. nidulans* (1), *A. clavatus* (1) and *Neosartorya fennelliae* (1). These strains were re-identified according to recent *Aspergillus* classification system which is mainly based on molecular characteristics. The strains were grouped by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) techniques. The representative strains from each group were sequenced with partial  $\beta$ -tubulin gene and compared with those of reference strains in the *Aspergillus* and were identified by the sequence. The identification was confirmed by morphology examination. As the results, they are reidentified as *A. fumigatus* (58), *A. niger* (11), *A. tubingensis* (26), *A. flavus* (27), *A. sydowii* (3), *A. nidulans* (1), *A. clavatus* (1) and *Neosartorya fennelliae* (1). This is the first report of *A. tubingensis* in clinical field in Korea.

Received 16 NOV 2009 / Returned for modification 11 DEC 2009 / Accepted 16 DEC 2009

**Key Words** : *Aspergillus*, Tuberculosis, Sputum, RAPD,  $\beta$ -tubulin, Aspergillosis

## I. 서 론

*Aspergillus*는 공기, 토양 등 우리 생활환경에서 가장 흔히 볼 수 있는 진균 중 하나로써 2차 대사에 의해 생산된 산, 비타민, 항생물질은 우리 생활에 도움을 주는 반면 면역력이 약한 환자에게 침입하여 침습성 폐 아스페르길

교신저자 : 김영권 (우)302-718, 대전광역시 가수원동 685, 건양대학교  
의과대학 한국진균자원센터  
TEL : 042-600-6371  
E-Mail : ykkim3245@hanmail.net

루스증과 호흡기 알러지 질환을 유발하거나 식품 등에서 진균독소를 생산하여 사람에게 다양한 질병을 일으키기도 한다. 특히 *A. fumigatus*가 생산하는 것으로 알려진 *gialotoxin*은 큰 포식세포의 식균작용과 T-림프구 의존형 면역응답을 저해함으로써 폐질환을 일으키는 중요한 독성인자로 알려져 있다(Kozakiewicz, 1989; Samson, 1994; 김 등, 2008). 현재 *Aspergillus* 속에는 180종 이상이 존재하는데, 이 중 가장 흔히 분리되는 *A. fumigatus*를 포함하여 *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. glaucus*, *A. chevalieri*, *A. ustus*, *A. nidulans* 등이 인체에 다양한 질병을 일으키는 것으로 보고 되고 있다(신 등, 2001; 정과노, 2002; 장과 김, 2002; 신 등, 2004; Snamson 등, 2004)

*Aspergillus*에 의한 호흡기 아스페르길루스증의 원인균으로는 *A. fumigatus*가 가장 발생빈도가 높고, 그 밖에 *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* 등이 보고 되고 있다. *Aspergillus*에 의한 호흡기 질환은 대부분이 공기를 통한 흡입에 의해 발생하며 정상인이 흡입하는 경우 질병을 일으키지 않지만 결핵을 앓고 공동이 생긴 환자나 면역기능이 약화된 환자의 경우 아스페르길루스증, 침습성 폐아스페르길루스증, 만성 괴사성 폐렴, 기관지천식, 과민성 폐렴 등을 유발 할 수 있다(장과 김, 2002).

1990년부터 1998년까지 결핵환자의 객담으로부터 *Aspergillus* 속 균을 분리하여 *A. fumigatus* 61주, *A. niger* 37주, *A. flavus* 26주, *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. clavatus*, *Neosartorya fennelliae* 각각 1주를 동정하여 냉동 보존하였다.

최근 *Aspergillus* 속의 분류체계는 크게 변하고 있으며 특히 *Aspergillus* section *Fumigati*에서는 *A. fumigatus*와 형태적으로는 구분되지 않으나 분자적으로 매우 다른 종들이 많이 보고되고 있어, 집락의 특징과 현미경적 형태의 특징을 근거로 한 전통적 방법 만으로 정확하게 종을 동정하는 데에는 한계가 있으며(홍 등, 2005), 임상에서 분리되는 진균의 신속하고 정확한 동정은 환자에게 사용할 항균제의 선택과 치료방향을 설정하는데 중요한 역할을 하고 있다. 따라서 본 연구에서는 결핵환자의 객담에서 분리하여 집락의 특징과 현미경적 형태의 특징을 근거로 한 전통적 방법으로 동정하여 보관하고 있는 균주들을 대상으로 분자생물학적인 방법을 병행하여 유전적으로 근연관계에 있는 균주들사이의 그룹을 나누고, 이들

중 대표균주를 선발하여  $\beta$ -tubulin 유전자 염기서열 분석을 실시하여 집락의 특징과 현미경적 형태에 따른 전통적 동정의 차이를 확인하고, 최근에 구축된 *Aspergillus* 신분류체계에 따라 재동정하여 균종간 유사도가 높은 종들과의 유연관계를 알아보고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 사용균주

실험에 사용한 국내 분리균 및 국외 도입균에 대한 자세한 내용은 Table 1에 요약되어 있다. 균주들은 MEA (malt extract agar) 사면배지에 배양하여 4°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

### 2. RAPD에 의한 균주들의 유전적 다양성 조사

균주들을 MEB(malt extract broth)에 접종하고 25°C에서 3일간 진탕 배양하여 균사체를 수확하였다. 1.5 mL microtube에 수확한 균사체를 넣고 동결 건조하여 마쇄한 뒤 DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다.

분리균주들의 유전적 다양성을 알아보기 위해 PELF와 URPIF primer를 사용하여 홍 등(2005)이 사용한 방법으로 RAPD(random amplified polymorphic DNA)-PCR을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.2% agarose gel에 전기영동하여 UV 하에서 관찰 하였다.

### 3. $\beta$ -tubulin 유전자 염기서열 분석에 의한 유연관계도 작성

선발된 20균주들의  $\beta$ -tubulin 영역을 증폭하기 위해  $\beta$ t2a와  $\beta$ t2b primer를 사용하였다(홍 등, 2005). 증폭을 위한 혼합액은 홍 등(2005)이 사용한 방법과 같고 PCR 조건은 95°C에서 pre-denaturation 4분, 95°C에서 denaturation 1분, 65~70°C에서 annealing 1분, 72°C에서 extension 2분을 35회 반복하고 최종 72°C에서 extension 7분하여 일부의 exon 3~Intron 6과 일부의 exon 6을 포함하는 약 370~510 bp의 밴드를 증폭시켰다.

PCR 생성물의 염기서열을 분석하기 위해 PCR 96 Cleanup Plates(Millipore Corp. Bedford, MA, USA)를 사

용하여 정제하고 염기서열을 결정하기 위하여 정제된 PCR 생성물을 Solutions for Generic Technologies (Solgent) Co. Ltd.에 의뢰하여 염기서열을 해독하였다. 해독한 염기서열은 Lasergene사의 DNASTAR software (SeqMan Pro)를 이용하여 정리한 후 MEGA v4.0의 Neighbor-Joining(NJ)<sup>10</sup>의 방법을 이용하여  $\beta$ -tubulin 영역의 exon 3~Intron 6과 일부의 exon 6 영역을 이용하여 계통수를 작성하여 1,000회의 bootstrap 분석을 통해 신뢰도를 평가하였다. 국내 균주의 분류적 위치를 비교하기 위해서 NCBI GenBank의 염기서열을 획득하여 함께 유연관계도를 작성하였다.

### III. 결 과

#### 1. RAPD에 의한 균주들의 유전적 다양성 조사

PELF, URP1F primer를 사용한 RAPD-PCR 결과 다양한 밴드를 형성하였고 총 9개 그룹으로 분리되었다(Fig. 1, Table 1). 먼저 기존에 *A. fumigatus*로 동정되었던 61주는 58주가 RAPD band pattern group(RP) 4에 위치하였고 나머지 3주는 RP5와 RP1 그룹에 위치하였다. 기존에 *A. niger*로 동정되었던 37주 중 11주가 RP2에, 26주가 RP3

에 위치하였다. 또한 기존에 *A. flavus*로 동정된 26주는 모두 RP1 그룹에 위치하였다. 그리고 *A. nidulans*, *A. versicolor*, *A. clavatus*, *N. fennelliae* 등은 각각 RP5, RP6, RP8, RP9에 위치하여 서로 다른 밴드양상을 보였다.

2.  $\beta$ -tubulin 유전자 염기서열 분석에 의한 계통도 작성  
 균주들의 분자적 동정을 위하여  $\beta$ -tubulin 영역의 염기서열 분석을 실시하였는데 두 개의 primer를 이용한 RAPD 결과와 균주들의 분리원, 분리연도, 등을 기준으로 16균주를 선발하여 실시하였다(Table 1). 선발된 16균주의 계통도(Fig. 1)에서 KIT 1007, KIT 1177, KIT 2110은 *A. fumigatus*와, KIT 1094, KIT 1100, KIT 1115, KIT 1214 균주는 *A. flavus*와, KIT 1103균주는 *A. niger*와 그리고 KIT 1104, KIT 1209균주는 *A. tubingensis*와 하나의 그룹을 형성하였다. 또한 KIT 1051, KIT 1070, KIT 1073은 *A. sydowii*와, KIT 1175은 *Emericella nidulans*와, KIT 1137은 *N. fennelliae*와 KIT 1102는 *A. clavatus*와 동일그룹을 형성하여 해당 종으로 동정될 가능성을 보였다.

#### 3. *Aspergillus* 균속의 동정

$\beta$ -tubulin 유전자 염기서열 계통도에서 *A. fumigatus*와

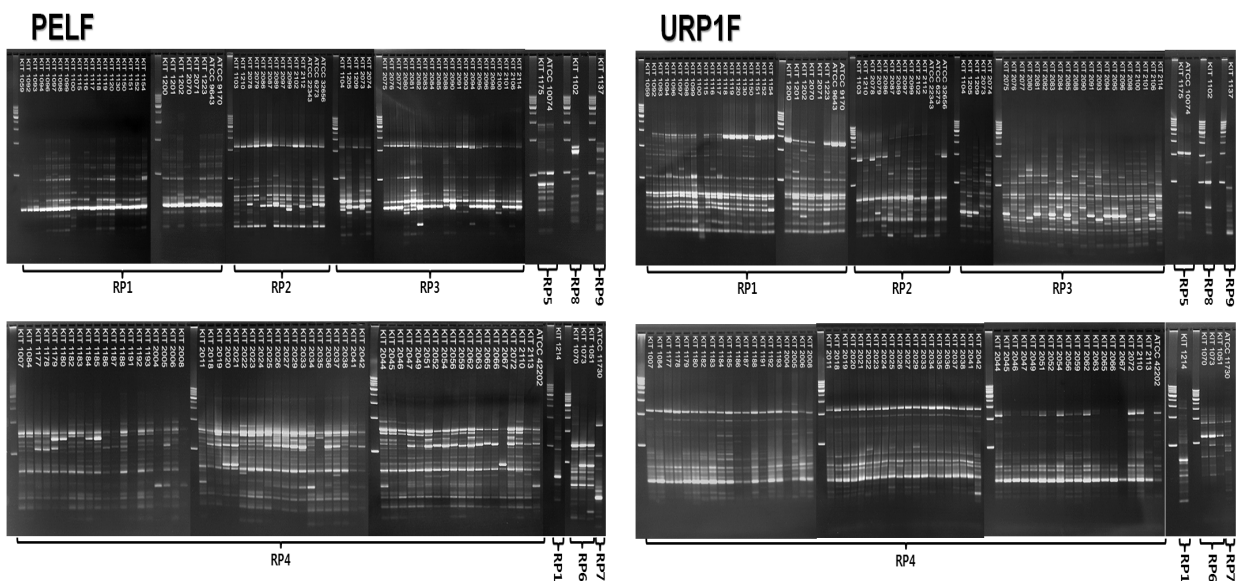


Table 1. List of Reidentified *Aspergillus* strains used in this study

Continued

Strain No.	Morphological Identification (KIT)	Reidentified in this study	RAPD group	Isolated Year	Source / Geographical origin	$\beta$ -tubulin* sequence
KIT 1059	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	RP1		Sputum / Seoul	-
KIT 1091	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1	1996	Sputum / Seoul	-
KIT 1092	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1	1994	Sputum / Seoul	-
KIT 1093	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1	1996	Sputum / Seoul	-
KACC00000 (KIT 1094)	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1	1991	Unknown / Seoul	KA000000
KIT 1096	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1	1992	Sputum / Seoul	-
KIT 1097	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1	1998	Sputum / Seoul	-
KIT 1098	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1		Sputum / Seoul	-
KIT 1099	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1	1998	Sputum / Seoul	-
KACC00000 (KIT 1100)	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1	1994	Sputum / Seoul	KA000000
KACC00000 (KIT 1115)	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1	1998	Sputum / Seoul	KA000000
KIT 1116	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1	1992	Sputum / Seoul	-
KIT 1117	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1	1998	Sputum / Seoul	-
KIT 1118	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1	1996	Sputum / Seoul	-
KIT 1119	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1	1996	Sputum / Seoul	-
KIT 1120	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1		Sputum / Seoul	-
KIT 1130	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1	1993	Sputum / Seoul	-
KIT 1150	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1	1995	Sputum / Seoul	-
KIT 1151	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1	1994	Sputum / Seoul	-
KIT 1152	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1	1995	Sputum / Seoul	-
KIT 1154	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1	1995	Sputum / Seoul	-
KIT 1200	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1	1992	Sputum / Seoul	-
KIT 1201	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1		Sputum / Seoul	-
KIT 1202	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1		Sputum / Seoul	-
KIT 2070	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1		Sputum / Seoul	-
KIT 2071	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1		Sputum / Seoul	-
ATCC 9643	<i>A. flavus</i>		RP1		Shoe sole / New Guinea	-
ATCC 9170	<i>A. flavus</i>		RP1		Unknown / Unknown	-
KACC00000 (KIT 1103)	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	RP2	1994	Sputum / Seoul	KA000000
KIT 1210	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	RP2	1996	Sputum / Seoul	-
KIT 2078	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	RP2		Sputum / Seoul	-
KIT 2079	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	RP2		Sputum / Seoul	-
KIT 2086	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	RP2		Sputum / Seoul	-
KIT 2087	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	RP2		Sputum / Seoul	-
KIT 2089	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	RP2		Sputum / Seoul	-
KIT 2097	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	RP2		Sputum / Seoul	-
KIT 2099	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	RP2		Sputum / Seoul	-
KIT 2102	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	RP2		Sputum / Seoul	-
KIT 2112	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	RP2		Unknown / Seoul	-
ATCC 22343	<i>A. niger</i>	NT	RP2	-	Induced mutant / Unknown	-
ATCC 6273	<i>A. niger</i>	NT	RP2	-	Unknown / Unknown	-
ATCC 32656	<i>A. niger</i>	NT	RP2	-	Unknown / Unknown	-
KACC00000 (KIT 1104)	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	1995	Sputum / Seoul	KA000000
KIT 1205	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Sputum / Seoul	-

Table 1. List of Reidentified *Aspergillus* strains used in this study

Continued

Strain No.	Morphological Identification (KIT)	Reidentified in this study	RAPD group	Isolated Year	Source / Geographical origin	$\beta$ -tubulin <sup>*</sup> sequence
KACC00000 (KIT 1209)	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	1996	Sputum / Seoul	KA000000
KIT 2073	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2074	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2075	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2076	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2077	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2080	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2081	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2082	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2083	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2084	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2085	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2088	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2090	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2091	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2093	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2094	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2095	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2096	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2098	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2100	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2101	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2106	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2114	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	RP3	-	Unknown / Seoul	-
KACC00000 (KIT 1007)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	RP4	1990	Sputum / Seoul	KA000000
KIT 1084	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	1993	Sputum / Seoul	-
KACC00000 (KIT 1177)	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	1995	Sputum / Seoul	KA000000
KIT 1178	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	1995	Sputum / Seoul	-
KIT 1179	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	1995	Sputum / Seoul	-
KIT 1180	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	1995	Sputum / Seoul	-
KIT 1182	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	1995	Sputum / Seoul	-
KIT 1183	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	1995	Sputum / Seoul	-
KIT 1184	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	1995	Sputum / Seoul	-
KIT 1185	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	1995	Sputum / Seoul	-
KIT 1186	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	1995	Sputum / Seoul	-
KIT 1187	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	1995	Sputum / Seoul	-
KIT 1188	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	1995	Sputum / Seoul	-
KIT 1191	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	1997	Sputum / Seoul	-
KIT 1192	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	1993	Horse / Seoul	-
KIT 1193	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	1995	Sputum / Seoul	-
KIT 2004	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2005	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2006	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-

**Table 1.** List of Reidentified *Aspergillus* strains used in this study

Continued

Strain No.	Morphological Identification (KIT)	Reidentified in this study	RAPD group	Isolated Year	Source / Geographical origin	$\beta$ -tubulin <sup>*</sup> sequence
KIT 2008	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2011	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2018	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2019	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2020	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2021	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2022	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2023	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2024	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2025	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2026	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2027	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2029	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2033	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2034	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2035	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2036	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2037	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2038	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2041	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2042	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2044	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2045	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2046	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2047	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2049	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2051	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2052	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2054	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2056	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2059	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2062	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2063	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2065	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2066	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2067	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KIT 2072	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	-
KACC00000 (KIT 2110)	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Sputum / Seoul	KA000000
KIT 2113	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	RP4	-	Unknown / Seoul	-
ATCC 42202	<i>A. fumigatus</i>	NT	RP4	-	Sputum / USA	-
KACC00000 (KIT 1214)	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	RP1	1996	Sputum / Seoul	KA000000
KACC00000 (KIT 1070)	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. sydowii</i>	RP6	1992	Sputum / Seoul	KA000000

Table 1. List of Reidentified *Aspergillus* strains used in this study

Continued

Strain No.	Morphological Identification (KIT)	Reidentified in this study	RAPD group	Isolated Year	Source / Geographical origin	$\beta$ -tubulin sequence
KACC00000 (KIT 1073)	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. sydowii</i>	RP6	1993	Sputum / Seoul	KA000000
KACC00000 (KIT 1175)	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>	RP5	1996	Horse / Seoul	KA000000
ATCC 10074	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>	RP5	-	Unknown / Belgium	-
KACC00000 (KIT 1051)	<i>A. versicolor</i>	<i>A. sydowii</i>	RP6	1995	Sputum / Seoul	KA000000
ATCC 11730	<i>A. versicolor</i>	<i>A. versicolor</i>	RP7	-	Cellophane gas mask / India	-
KACC00000 (KIT 1102)	<i>A. clavatus</i>	<i>A. clavatus</i>	RP8	1994	Sputum / Seoul	KA000000
KACC00000 (KIT 1137)	<i>Neosartorya fennelliae</i>	<i>Neosartorya fennelliae</i>	RP9	1974	Unknown / Unknown	KA000000
NRRL1 <sup>T</sup>	<i>Aspergillus clavatus</i>	NT	NT	-	Unknown / Unknown	EF669802
NRRL163 <sup>T</sup>	<i>A. fumigatus</i>	NT	NT	-	Chicken, lung / USA	EF669791
NRRL187 <sup>T</sup>	<i>Emericella nidulans</i>	NT	NT	-	Unknown / Belgium	EF652251
NRRL238 <sup>T</sup>	<i>A. versicolor</i>	NT	NT	-	Unknown / Unknown	EF652266
NRRL250 <sup>T</sup>	<i>A. sydowii</i>	NT	NT	-	Unknown / Unknown	EF652274
NRRL326 <sup>T</sup>	<i>A. niger</i>	NT	NT	-	Tannin-gallic acid fermentation / USA	EF661089
NRRL1957 <sup>T</sup>	<i>A. flavus</i>	NT	NT	-	Cellophane diaphragm of an optical mask / South Pacific	EF661485
NRRL5535 <sup>T</sup>	<i>Neosartorya fennelliae</i>	NT	NT	-	Rabbit eye / USA	EF669850

\* The sequences of KA numbers were possible obtain or download from KACC homepage(<http://kacc.rda.go.kr>) and that of EF and AY numbers were from NCBI GenBank. NT : not tested, - : unknown. RP : RAPD band pattern group

같은 그룹을 형성한 RP4의 대표균주인 KIT 1007, KIT 1177, KIT 2110 균주들은 형태적으로 확인한 결과 *A. fumigatus*와 유사한 특징을 보여 RP4에 속한 균주들은 *A. fumigatus*로 동정되었다. 그리고 *A. flavus*와 같은  $\beta$ -tubulin 유전자 그룹을 형성한 KIT 1094, KIT 1100, KIT 1115, KIT 1214가 속한 RP1의 균주들은 형태적으로도 *A. flavus*와 유사하여 *A. flavus*로 동정 되었다. 또한 *A. niger*의  $\beta$ -tubulin 유전자 그룹에 속한 RP2의 KIT 1103 균주와 *A. tubigensis*의  $\beta$ -tubulin 유전자 그룹에 속한 RP3의 KIT 1104, KIT 1209 균주들은 형태적 특징 확인결과 두 그룹이 유사하였지만 유전적 특징에 의해 각각 *A. niger*와 *A. tubigensis*로 동정되었다. 그 밖에  $\beta$ -tubulin 유전자 염기서열 계통도에서 *A. sydowii*와 같은 그룹에 속한 KIT 1051, KIT 1070, KIT 1073 균주들과 *A. nidulans*와 같은

그룹에 속한 KIT 1175 균주, *A. clavatus*와 같은 그룹에 속한 KIT 1102 균주, *N. fennelliae*와 같은 그룹에 속한 KIT 1137 균주는 각각 형태적 특징으로도 동일 결과를 보여 각각  $\beta$ -tubulin 유전자 그룹과 같은 종으로 동정되었다.

#### IV. 고 찰

최근 *Aspergillus*를 포함한 진균의 분류체계는 DNA 염기서열을 이용한 방법으로 바뀌고 있다. DNA 염기서열 전체를 분석하여 동정하기 보다는 진균의 특정부위의 DNA 염기서열을 이용하여 동정하는데, 그 방법 중 흔히 쓰이는 방법으로는 internal transcribed spacer(ITS)와  $\beta$

-tubulin, calmodulin, actin, LSU, rDNA 영역 등이 있다 (홍 등, 1998; 홍 등, 2005; Balajee 등, 2007; Varga 등, 2007; Samson 등, 2007; Peterson, 2008). 이 중  $\beta$ -tubulin 영역은 종간 분별력이 높고 비교 염기서열의 획득이 용이한 유전자 중 하나이다.

PELF와 URPIF primer를 이용한 RAPD 분석결과 실험에 사용한 *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. nidulans*, *A. versicolor*, *A. sydowii*, *A. clavatus*, *Neosartorya riafennelliae* 등 9종이 다른 유전자 밴드를 형성하여 각 종간의 유전적 분류가 가능하였다. 신 등(2001)의 임상 검체에서 분리된 63주, 6종의 *Aspergillus* 균속에 대한 RAPD 분석결과 실험에 사용한 *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. sydowii* 균주들 중 *A. niger* 2균주와 *A. nidulans* 1균주를 제외한 나머지 60균주가 RAPD 분석으로 종 분류가 가능하여 본 실험과 유사한 결과를 보였다.

의학적으로 중요한 진균 중 가장 흔히 볼 수 있는 *A. fumigatus*의 경우 61균주 중 대부분의 균주인 58균주가 *A. fumigatus*로 재동정 되었고 2균주가 *A. sydowii*로 재동정 되었으며 나머지 1균주는 *A. flavus*로 재동정 되었다. 홍 등(1998)의 연구에서 *A. fumigatus* 141균주를 대상으로 한 RAPD와  $\beta$ -tubulin 유전자 분석을 이용하여 재동정한 결과 6균주가 형태적으로 유사한 *A. lentulus*, *A. viridinutans*, *Neosartorya nishimurae*, *N. udagawae*로 재동정 되었다. 하지만 본 실험에서는 *A. fumigatus* 61균주의 경우 대부분의 균주들이 *A. fumigatus*로 재동정 되었다. 반면, *A. sydowii*, *A. flavus*로 동정된 3균주는 잘못 동정된 것으로 생각된다.

형태적으로 *A. niger*로 동정된 37균주들의 경우 11균주만이 *A. niger*로 재동정 되었고 나머지 26균주들은 *A. tubingensis*로 재동정 되었다. Black aspergilli(*Aspergillus section Nigri*)는 형태적으로 유사하여 분류와 동정이 어려운 그룹 중 하나이지만 최근 분자생물학적 특징을 이용한 동정방법이 개발되었을 뿐만 아니라 rDNA-ITS영역을 이용한 종특이 primer도 개발이 되었다(Varga 등, 2007). 이처럼 형태적으로 유사한 특징을 보이는 *A. niger*와 *A. tubingensis*를 구분하기 위해서는 분자생물학적 특징 분석이 필수적인 것으로 생각된다. 그리고 본 실험에서 사용한 RAPD와  $\beta$ -tubulin 유전자 분석 또한 두 종을 구

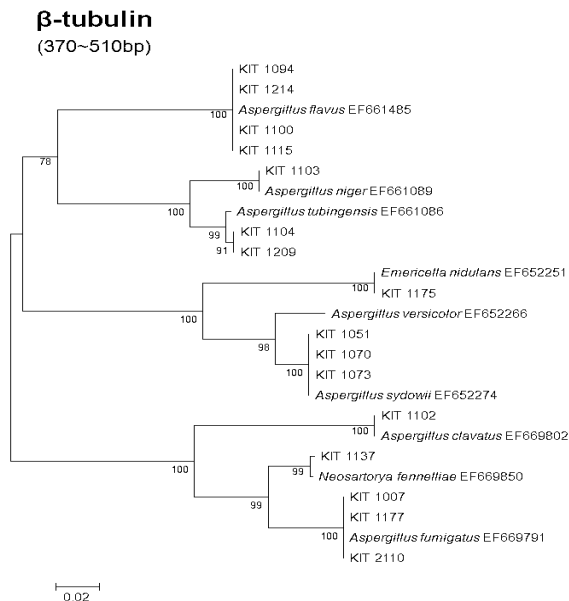
분할 수 있는 특징으로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

형태적으로 *A. versicolor*로 동정된 1균주의 경우 *A. sydowii*로 재동정 되었는데 두 종의 경우 형태적으로 균종의 색깔이나 conidia의 차이로 구분되지만(김 등, 2008), 형태적 차이만으로 종을 구분하기는 쉽지 않다. Peterson(2008)의 calmodulin, ITS와 LSU, rDNA, RNA polymerase II를 이용한 MLST(multi-locus sequence-based typing) 분석에서 두 종의 구분이 가능하였다. 본 실험에서의 분자생물학적 특징 분석결과 RAPD 분석과  $\beta$ -tubulin 유전자 분석 모두에서 두 종을 구별할 수 있었다. 이 또한 PELF와 URPIF primer를 이용한 RAPD 분석과  $\beta$ -tubulin 유전자 분석이 *A. niger*와 *A. tubingensis*의 구분 뿐만 아니라 *A. versicolor*와 *A. sydowii* 두 종을 구분할 수 있는 특징으로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

형태적으로 *A. flavus*로 동정된 26균주의 경우 분자생물학적 분석결과 모든 균주들이 *A. flavus*로 재동정 되어 형태적 동정결과와 동일한 결과를 보였다. 또한 형태적으로 *A. nidulans* 1균주, *A. clavatus* 1균주, *N. fennelliae* 1균주로 동정된 균주들의 경우 분자생물학적으로도 형태적인 동정과 동일한 결과를 보였다.

이와 같이 형태적인 동정결과 만으로 종 분류를 하는 것은 어려움이 있다. 하지만 RAPD,  $\beta$ -tubulin 등 분자생물학적 특징들을 함께 이용할 경우 보다 정확한 종 분류가 가능할 것이다. 진균 분류에 있어서 형태적인 특징이 중요하긴 하지만 그 비중이 상대적으로 줄어들고 분자생물학적 특징의 역할이 커져가고 있는 실정이다. 뿐만 아니라 분자생물학적인 특징은 형태적 특징에 비해 연구자들간의 정보공유에 있어서 보다 정확하고 편리하다는 장점을 지니고 있다. 상대적으로 그 중요성이 커지고 있는 분자생물학적 특징뿐만 아니라 형태적 특징을 효과적으로 활용하기 위해서는 균주들의 효과적인 관리가 시급한 상황이다. 본 연구에서 사용한 균주들은 결핵연구원에서 1990-1998년 동안 수집한 균주들로 사용하였지만 전문 보존기관이 아닌 일반 연구소에서 많은 균주를 장기간 보존하는 일은 경제적으로나 시간적으로 쉽지 않은 일이다. 국내 균주들을 활용한 연구를 위해 전문 보존기관을 이용하는 것이 앞으로의 연구에 많은 도움이 될 것으로 생각된다.





**Fig. 2.** Phylogenetic tree of *Aspergillus* spp. isolated from sputum of tuberculosis patient in Korea. The tree was constructed from Neighbor-Joining analysis of  $\beta$ -tubulin-sequence. The numbers above then odesre present boot strap values(outof1,000boots traprepplication).

## 감사의 글

본 연구는 동남보건대학 연구지원비로 이루어졌음.

## 참고 문헌

- Balajee SA, Houbraken J, Verweij PE, Hong SB, Yaghuchi T, Varga J, Samson RA. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Stud Mycol* 59:39-46, 2007.
- Hong SB, Go SJ, Shin HD, Frisvad JC, Samson RA. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia* 97(6):1316-1329, 2005.
- Klich MA. Identification of common *Aspergillus* species. The Netherlands: Central bureau voor Schimmel cultures, Utrecht, 2002.
- Kozakiewicz Z. *Aspergillus* species on stored products. *Mycological paper* 161:1-25, 1989.

- Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5:150-163, 2004.
- Peterson SW. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* 100:205-226, 2008.
- Samson RA. Taxonomy-Current concepts of *Aspergillus* systematic. In: Smith JE. edited. *Aspergillus*. p1-18, Plenum Press, New York, 1994.
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC. Identification of the common food-borne fungi. In: Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, editors. Introduction to food and air-borne fungi. 7th ed. p64-97, The Netherlands: Central bureau voor Schimmel cultures, Utrecht, 2004.
- Samson RA, Noonim P, Meijer M, Houbraken J, Frisvad JC, Varga J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Stud Mycol* 59:129-145. 2007.
- Varga J, Kocsubé S, Tóth B, Frisvad JC, Perrone G, Susca A, Meijer M, Samson RA. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *Int J Syst Evol Microbiol* 57(Pt 8):1925-1932, 2007.
- 김영권, 김태운, 김봉철, 김성권, 김수정. 임상진균학, 제 3판. p44-45, 고려의학, 서울, 2008.
- 장운석, 김유영. 호흡기 아스페르길루스증 -알레르기성 기관지폐 아스페르길루스증을 중심으로-. 대한의진균학회지 7(2):63-68, 2002.
- 정유선, 노병인. 피부 아스페르길루스증. 대한의진균학회지 7(1):6-13, 2002.
- 신종희, 이창재, 이지연, 송정원, 기승정, 서순팔, 양동욱. 임상검체에서 분리된 *Aspergillus* species에 대한 Random Amplified Polymorphic DNA 분석. 대한임상미생물학회지 4:33-39, 2001.
- 신종희, 박미라, 송정원, 신동현, 정숙인, 박영규. 한국인의 임상분리 아스페르길루스 균주에 대한 보리코나졸의 생체외 감수성. 대한의진균학회지 9:166-173. 2004.