

Pulsed-field Gel Electrophoresis를 이용한 *Mycobacterium fortuitum*의 유전형 분석

영남대학교 의과대학 미생물학교실

이태운 · 도인아 · 김성광

서 론

항산균을 포함한 여러 세균들의 유전형 분석을 위하여는 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 법^{1,2)} 및 arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR)법^{3,4)} 등의 방법이 사용되고 있다.

RFLP법은 게놈 DNA를 제한효소를 사용하여 작은 DNA 단편으로 소화시킨 후 이를 전기영동 및 Southern blotting하고 균주간의 차이를 발견할 수 있는 적절한 probe DNA로 hybridization 하는 분석법으로서 크기가 20 kilobases (kb) 이하의 DNA들을 대상으로 균주간의 차이를 관찰할 수 있다. 그러나, 이 방법은 균주간에 차이를 구분해 줄 수 있는 특정 probe를 필요로 하는 단점을 가지고 있다.

AP-PCR법은 비특이 primer를 사용하여 게놈 DNA의 여러 장소에 무작위적으로 결합하여 생성되는 PCR산물들의 크기가 균주마다 서로 다른 원리를 이용하는 방법이다. 이와 같이 같은 균종의 균주마다 AP-PCR유형의 차이를 보이는 것은 균주에 따라 조금씩 염기서열이 서로 다른 부위가 존재하기 때문으로 알려져 있다.

PCR에 사용되는 *Taq* polymerase가 증합할 수 있는 DNA의 크기는 그다지 크지 않으므로 수백 base pair(bp)에서 수 kb 크기의 DNA들이 증합되며 이를 전기영동하여 균주간의 차이를 관찰하게 된다. AP-PCR법은 실험조건에 따라 결과가 얼마나 반복 재현성이 있느냐에 의해 분석법의 신뢰도가 결정되는 단점이 있다. 이는 PCR이 특정 primer를 사용하는 경우에는 큰 문제가 없지만 AP-PCR과 같이 비특이 primer를 사용하는 경우에는 PCR의 조건에 따라 생성되는 PCR산물의 크기가 달라질 수 있기 때문이다. 이와 같은 변이요인에는 PCR 반응혼합액의 조성, PCR 주기의 온도 및 시간 차이, 사용되는 주형 DNA와 primer의 농도 그리고 사용하는 PCR 기계의 종류들이 포함된다.

또한 AP-PCR은 PCR을 이용한 DNA fingerprinting법으로 Southern blotting을 시행할 필요가 없으므로 RFLP법에 비하면 매우 간편하게 시행할 수 있는 장점이 있다. 1993년에 신⁵⁾ 등에 의해 *IS6110* 및 human papilloma virus type 18의 서열을 이용한 primer가 결핵균주들의 분류를 위한 AP-PCR법에 사용된 보고가 있었다. AP-PCR법은 간편한 점을 제외하면 특정 probe를 사용

본 연구는 1995년도 영남대학교 기초의학연구소연구비의 지원으로 이루어졌음

하는 RFLP법보다는 균주를 세밀히 분류하지 못하는 단점을 가지고 있어 결핵균 이외의 항산균의 분류를 위해 시도하기에는 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)법^{6,7)} 더욱 유망한 것으로 보여진다.

PFGE분석법은 상기한 두가지 분석법보다는 매우 큰 크기의 DNA를 분석하는 방법으로서 RFLP법으로는 분석할 수 없는 수십 내지 수백 kb 크기의 DNA를 분석할 수 있어⁸⁾ 기존의 RFLP법이나 AP-PCR법으로는 구분이 불가능한 균주간의 유전적 차이를 구분해 줄 수 있는 것으로 알려져 있어 항산균의 동일균종 분리에 실현성을 검색하고자 하였다.

일반적으로 gel 전기영동은 단백질이나 핵산과 같은 macromolecule들을 크기, 전하 혹은 구조에 따라 분리시킬 수 있는 방법이다. 기존의 gel 전기영동은 한 쌍의 전극만을 사용하므로 전기영동도 한 쪽 방향으로 이루어지고 50 kb 이상되는 DNA단편들은 구분할 수 없다. 이러한 제한점을 극복하기 위하여 1984년부터 여러개의 전극쌍을 사용하여 전기영동을 시행하는 PFGE법이 소개되기 시작하였고 이 방법에 의하면 2 megabases (Mb) 크기의 큰 DNA 분자까지도 크기를 구분할 수 있게 되었다.

효모나 진핵세포의 염색체 DNA 수준에서 구분해줄 수 있을 뿐만 아니라⁹⁾ 세균에서도 전 계놈 유전자지도 작성을 위해 많이 이용되고 있으며 기존의 방법으로는 구분되지 않는 여러 세균들간의 유전형도 구분해 줄 수 있는 장점이 있어 많은 연구자에 의해 활용되어 왔다.^{9,10)}

RFLP의 경우는 항산균을 대상으로 한 연구가 한국에서도 1993년 신⁵⁾에 의하여 보고된 바가 있고 사용한 probe는 결핵균의 삽입배열인 insertion sequence (IS) 6110²⁰⁻²³⁾으로 결핵균주간의 분류에 매우 적절한 probe로 확립되었다. 그

러나, 결핵균 이외의 다른 항산균주를 대상으로 이러한 보고가 드문 실정으로 이는 균주분류를 위해 적절한 probe를 찾지 못하는데 기인한다고 보여진다.

후천성면역결핍증 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)의 합병증으로 결핵 및 비정형 항산균에 의한 감염이 증가하고 있고¹⁸⁾ 이러한 현상은 조만간 우리나라에도 일어날 수도 있을 것으로 예상되고 있다. 따라서 항산균주를 분류하는 방법이 확립되어 있어야 감염의 경로를 알아낼 수 있고 이에 효과적으로 대처할 수 있을 것이므로 RFLP법 이외에도 PFGE법을 포함한다른 여러 방법들의 시도가 필요할 것이다.

실제 결핵균의 경우는 적절한 제한효소를 사용하면 PFGE법이 RFLP법에 상응하는 결과를 얻을 수 있으며 표준균주들 사이에도 PFGE유형에 차이가 있는 경우도 보고되어¹⁷⁾ RFLP를 위한 적절한 probe를 아직 찾지 못한 균주를 위하여 PFGE법은 매우 적절한 균주 분류방법이라 할 수 있다.

일반 세균의 PFGE에 의한 유전형 분석은 많은 보고가 있으나¹¹⁾ 항산균을 대상으로 한 PFGE분석은 상대적으로 보고가 드문 실정이다. 이는 일반 세균에 비하여 항산균의 발육속도가 매우 느리고 세포벽이 튼튼하여 계놈 DNA가 손상되지 않은 상태로 분리하기가 까다롭기 때문이다.

본 연구에서는 결핵의 예방을 위한 예방주사로서 널리 사용되는 *Mycobacterium bovis*(BCG) 및 신속발육항산균이면서 최근에는 AIDS 및 면역억제제 투여등 면역결핍상태의 합병증 환자에서 분리되고 있는 *M. fortuitum* 및 *M. tuberculosis* 들을 대상으로 PFGE분석법을 이용하여 항산균 감염증의 원인균 분류와 동정방법을 확립하고자 유전형 검색과 염색체 DNA수준

에서 동일군종의 균주간 유전형 차이를 규명함으로써 분자역학적인 연구에 도움을 주고자 하였다.

재료 및 방법

1. 균 주

M. bovis BCG는 결핵연구원 표준균주 및 Pasteur연구소로부터 분양받아 영남대학교 의과대학 미생물학교실에서 계대배양하고 있는 BCG균주 각 1주와 *M. tuberculosis* 3주 및 *M. fortuitum* 4주의 표준균주들 및 AIDS 환자로부터 입장에서 분리된 9주의 *M. fortuitum* 균주들은 University of Texas Health Center (Tyler, Texas, USA)로부터 분양받아 총 18주를 대상으로 사용하였다 (표 1).

Table 1. Mycobacterial strains for PFGE

Species	Number	Sources	Provided by
<i>M. bovis</i> BCG	2	standard	KIT/YUMC
<i>M. tuberculosis</i>	3	standard	UTHCT
<i>M. fortuitum</i>	4	standard	UTHCT
<i>M. fortuitum</i>	9	AIDS patients	UTHCT

* Abbreviation ;

KIT: Korean Institute of Tuberculosis
YUMC: Yeungnam University, College of Medicine
UTHCT: University of Texas Health Center at Tyler

2. 항산균주의 PFGE분석

A. 배지작성 및 균의 배양

각 항산균주는 Proskauer and Beck (PB) 액체 배지에서 배양하였다. PB배지에는 균이 덩어리지지 않게 하기 위하여 tween80을 0.1%의 농도로 첨가하였고, 보조영양분으로 oleate-albumin-dextrose (OAD)를 10%의 농도로 첨가하여 배양

에 사용하였다. 이 배지의 작성은 까다롭고 Sauton배지의 경우와는 달리 정체배양을 하지 않고 진탕배양을 하면서도 균이 서로 엉기지 않도록 해야 하는 등의 문제점이 있어 배지의 제작 및 항산균의 배양이 PFGE를 위해 가장 중요한 단계이며 그 과정을 기술하면 다음과 같다.

1리터의 PB배지 제작은 KH_2PO_4 5g, asparagine 5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6g, magnesium citrate 2.5 g, glycerol 20 ml 및 tween80 2ml을 1리터의 증류수에 순차적으로 넣었다. 이때 반드시 한 시약이 다 녹는 것을 확인하고 다음 시약을 넣도록 하였다. 이상을 다 용해시키는 데는 약 2시간이 소요되었다. 6N NaOH로 pH 7.8로 맞춘 후 고압습열멸균하면 침전물이 바닥에 가라앉는다. 실온으로 식힌 후 침전물이 섞이지 않게 상층액만을 1000ml 스크루캡 플라스크에 450ml 씩 분주한 후 다시 고압습열멸균을 시행하였다. 따로 제작하여 여과멸균한 OAD용액을 각각 50ml를 가하여 37℃ 배양기에서 24시간 배양하여 오염여부를 확인한 다음 항산균의 배양에 사용하였다.

보조영양분인 OAD용액은 다음과 같은 방법으로 만들었다. 우선 sodium chloride 8.5 g, dextrose 20 g을 플라스크에 넣고 950 ml의 증류수를 가한 후 50 g의 bovine serum albumin, fraction V (BSA)를 가해 녹였다. 이 시간은 약 1내지 2시간이 소요되었다. 다음으로 50 ml의 sodium oleate용액을 다음과 같이 만들어 상기한 albumin용액에 첨가하였다. 0.6 ml의 oleic acid를 0.05 N NaOH와 섞은 후 60℃ 내지 70℃로 가열한 후 1 N HCl로 pH 7.5로 맞췄다. Prefilter, 1.5 μm , 0.45 μm 및 0.22 μm 여과기로 여과한 후 멸균된 0.22 μm 여과지로 무균적으로 여과한 후 멸균 플라스크에 50ml씩 분주하여 37℃에서 24시간 배양하여 오염여부를 검사한 후 사용할 때까지

4℃에 보관하였다.

각 균주는 7H10 middlebrook 고체배지에서 배양하던 것을 PB액체배지를 50 ml 멸균시험관에 20ml을 넣은 후 균을 접종하여 37℃ 진탕배양기에서 *M. bovis* BCG와 *M. tuberculosis*는 2 내지 3주 배양 하였고 *M. fortuitum* 균주는 10일간 진탕 배양한 후 균을 수집하였다. 항산균의 감염력을 상실케 하기 위하여 80℃ 항온수조에서 15분간 방치한 다음 적절한 농도로 조정하여 PFGE를 위한 plug의 제조에 사용하였다.

B. Plug의 제조

1.5%의 low-melting point (LMP) agarose를 녹여 55℃ 항온수조에 미리 넣어둔 상태에서 다음 과정을 시행하였다. 400 μ l의 Tris-EDTA완충액을 새 1.5 ml 시험관에 넣고 수집한 균을 넣어 그 농도가 MacFarland scale로 3내지 4가 되게 하였다. 55℃에 보관하던 LMP agarose를 동량 가하여 피펫으로 잘 섞은 후 즉시 mold에 부어 고정하였다. 한 well에 들어가는 양은 200 μ l이었다.

C. Plug내에서 항산균으로부터 DNA 분리^{24, 25)}

Plug내 보존된 상태의 DNA를 분리하기 위하여 6 well plate에 한 well당 3개의 plug를 넣고 6 내지 7 ml의 lysozyme (2mg/ml)을 가한 후 37℃ 배양기에서 12시간내지 16시간 동안 처리하였다. 이어서 proteinase K (1g/ml) 및 SDS (1%)로 50℃ 항온수조에서 48시간 동안 처리하였다. lysozyme, proteinase K 및 SDS를 씻어내기 위하여 Tris-EDTA (pH 8.0) 완충액으로 30분내지 1시간마다 진탕하면서 5회 이상 반복하여 세척하였다. 처리된 plug들은 6-well plate의 TE (pH 8.0) 완충액내에 넣어 4℃에 넣어 보관하여 필요할 때 사용하였다.

D. DNA의 제한효소 처리

균의 농도에 따라 적절한 양의 plug조각을 잘

라내어 제한효소처리에 사용하였다. 제한효소처리는 1.5 ml tube내에서 약 100 μ l의 용적이 되도록 하여 37℃ 항온수조에서 최소한 4시간 이상 처리하였다. 제한효소처리혼합액은 10 μ l의 10배 농도 반응완충액, 60 μ l의 증류수, 약 30 μ l 정도의 용적을 차지하는 agarose plug에 10 units의 제한효소를 넣어 만들었다. 균주들의 차이를 알기 위하여는 적절한 제한효소는 너무 많은 절단부위가 있어도 안되고 절단부위가 없어도 안되므로 적절한 수의 절단부위를 갖는 제한효소를 선별하여 본 실험에 사용하였다. 항산균의 PFGE분석에 적절한 제한효소는 *Xba*I, *Dra*I 및 *Asn*I을 사용하였다.

E. 제한효소로 처리된 plug의 PFGE

제한효소처리 후 plug을 1% agarose gel의 well에 넣고 well의 나머지 부분을 1%의 LMP agarose로 채워 균핵 plug이 전기영동시에 완충액에 잠긴 후 뜨지 않게 하였다. 0.5배의 Tris-borate-EDTA (TBE) 완충액을 사용하여 PFGE를 실시하였다. 사용한 PFGE장비는 BioRad사의 CHEF-DRII이었고 PFGE는 최초 pulse 및 최종 pulse의 시간을 여러가지로 조정하여 DNA 띠들이 서로 잘 구분되는 조건을 설정 하였다. 전기영동시의 전압은 200V로 하였고 전기영동시간은 균주 및 제한효소의 종류에 따라 달랐으나 14 내지 22시간 정도였다. 전기영동시의 완충액의 온도는 BioRad사의 Minichiller (Model 1000)를 사용하여 14℃로 고정시켰고 이를 위하여 전기영동완충액은 가변속도펌프로 계속 순환시켰다. 전기영동후 gel을 ethidium bromide로 약 15분간 염색한 후 증류수에 16 내지 20시간 동안 담가 탈염색을 하여 배경을 최소화한 후 자외선 투조기(UV transilluminator)상에서 전기영동상을 관찰하였다. 양화 및 음화필름 모두를 만드는 Polaroid 665 film을 사용하여 사진을 찍었다. 음화 film은 증류

수에 1시간 정도 담가 고정시킨 후 건조하여 scanning한 다음 컴퓨터에 입력하였다.

3. PFGE 유형의 컴퓨터 입력

각 PFGE 유형들은 각 사진의 음화 film을 Hewlett-Packard ScanJetIIcx scanner에 X-ray 필름 영상을 읽을 수 있는 adaptor를 부착하여 gray scale로 300dpi의 해상도로 Macintosh Quadra 650 컴퓨터에 입력하였다. Adobe photoshop software를 사용하여 명암 및 대비를 조절하여 DNA 띠간의 차이를 보다 잘 관찰할 수 있게 조절하였다. 조절된 영상은 그래프용지에 확대 프린트하여 각 DNA 띠들의 이동거리를 쉽게 측정할 수 있도록 하였다. Marker DNA의 이동도에 따라 편대수 그래프에 표준곡선을 그리고 이를 근거로 각 DNA 띠들의 크기를 결정하였다. 각 균주들의 PFGE유형은 DNA띠의 크기 별로 정리하여 이를 cluster analysis로 분석하였다.

4. Cluster analysis를 이용한 PFGE유형의 분석

IBM 호환 486Dx250 컴퓨터에서 cluster analysis software²⁶⁾를 사용하여 PFGE유형을 분석하였다. 이들 수 많은 종류의 DNA띠들은 각각 하나의 고유의 DNA띠로 인식되어 cluster analysis에 사용되었다. *M. fortuitum* 9개 임상분리 균주에서 발견되는 모든 DNA띠를 크기순으로 고유의 번호를 부여하고 각 고유번호의 DNA띠가 각 균주에 존재하는지 여부를 관찰하고 존재하면 1로 존재하지 않으면 0으로 표시하여 cluster analysis라는 software에 입력하였다. Cluster analysis과정에서 각 고유의 DNA 띠의 존재 여부를 입력하면 part II. pair-wise distances between sampling unit (SU)에서 동일 균종의 균주간 유전적 거리를 수치로서 볼 수 있다. 여러

가지 종류의 분석이 가능한데 이중 percent dissimilarity값을 구하였고 이 값이 크면 균주간의 유전적거리가 큰 것이고 작으면 가까운 것으로 해석할 수 있다.

part III에서 cluster analysis output 는 dendrogram을 그릴 수 있는 바탕이 된다. 즉, 서로 가까운 균주거리 cluster level별로 모아져 있고 이를 근거로 낮은 유사치를 갖는 균주들을 묶어서 그림으로 표현해주면 이것이 dendrogram이 된다.

성 적

1. PFGE조건의 확립

적절한 PFGE조건은 각 제한효소별로 다음과 같았다.

*DraI*의 경우는 두단계로 나누어 전기영동을 시행하였다. 제1단계의 initial pulse는 10초, final pulse는 15초였으며, 제 2단계는 initial pulse는 60초 final pulse는 70초이었다. 전기영동시간은 각 단계마다 각각 14시간씩이었다.

*XbaI*의 경우는 제2단계 없이 initial pulse가 3초, final pulse가 12초였고 전기영동시간은 22시간이었다.

*AsnI*의 경우는 제2단계 없이 initial pulse가 5초, final pulse가 25초였고 전기영동시간은 22시간이었다. 이러한 조건은 항산균주간에 공통되게 적용할 수 있었고 균주간에 조건을 달리할 필요는 없었는데 이는 항산균주간의 유전적 거리가 전반적으로 가까움을 시사하였다.

2. *M. bovis* BCG 및 결핵균주의 PFGE 분석

결핵연구원에서 분양받은 *M. bovis* BCG 균주 및 프랑스 Pasteur연구소에서 분양받아 영남대학

교 의과대학 미생물학교실에서 계대배양하고 있는 *M. bovis* BCG균주의 DNA를 *Xba*I로 처리해 PFGE 분석을 한 결과 그 유형의 차이를 관찰할 수 없었다. 이들 236kb 이하에서 관찰된 DNA의 PFGE유형을 정리한 것이 그림 1에 도시되어 있다.

또한 표준결핵균주 3주의 DNA를 *Dra*I로 처리하여 681kb와 238kb이하에서 관찰된 DNA의 PFGE분석한 결과 모두 같은 유형을 보였다 (그림 2).

3. 표준 균주 *M. fortuitum*의 PFGE분석



4주의 표준 *M. fortuitum*균주들을 *Dra*I로 처리하여 936kb이하에서 관찰된 DNA의 PFGE유형을 비교한 결과 모두 같은 유형을 보였다. 표준결핵균주의 681kb이하에서 관찰된 DNA의 PFGE 유형과 비교하여 정리한 것이 그림3 A 및 B에 제시된 바와 같다.

4. 분리주 *M. fortuitum*의 PFGE분석

A. *Asn*I로 처리한 *M. fortuitum*의 PFGE 분석

총 9주의 *M. fortuitum*분리균주들을 *Asn*I로 처리하여 PFGE분석을 시행한 결과 MF5 및 MF

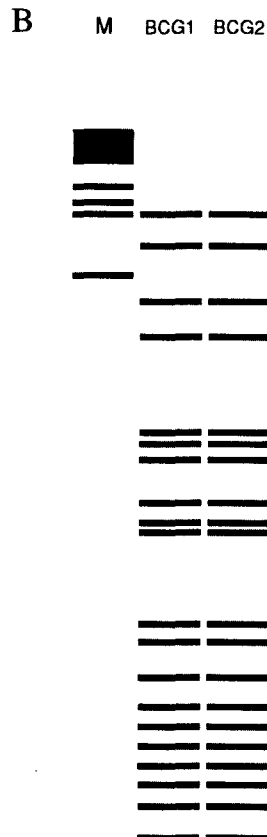


Fig. 1. A. PFGE patterns of 2 standard *M. bovis* BCG strains (lanes 1 and 2). B. Summary of PFGE patterns of 2 standard *M. bovis* BCG strains. M represents DNA size marker which contains yeast chromosomes. The sizes of the marker DNA are 238 kb, 263 kb, 335 kb, 427 kb, and 581 kb, form bottom to top.

6 두 균주가 서로 같은 PFGE유형을 보였고 나머지 균주들은 이 제한효소처리에 의해 PFGE유형으로 분류가 가능하였다 (그림 4). 이들의 PFGE유형을 알기 쉽게 정리한 것이 그림5에 도시된 바와 같다.

이를 cluster analysis하여 균주간의 유전적거리를 유사치로 분석한 수치를 보여주는 것이 그림 6 A 및 B이다.

AsnI의 경우 짝을 지운 유사치는 0.00에서 0.88사이였으며 가장 가까운 균주는 유사치가 0.00인 MF5 와 MF6 균주들이고 그 다음으로 가까운 균주는 MF8 및 MF9로서 유사치는 0.42이었다. 가장 거리가 먼 균주는 MF3과 MF7로서

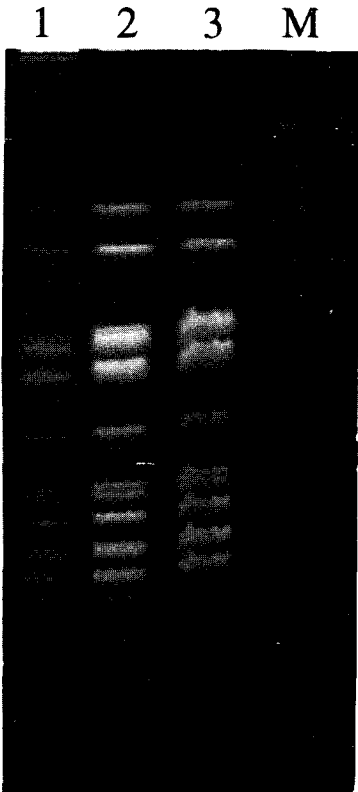


Fig. 2A PFGE patterns of 3 standard *M. tuberculosis* strains(IA34, IA25, and IA36). M represents DNA size marker which contains yeast chromosomes.

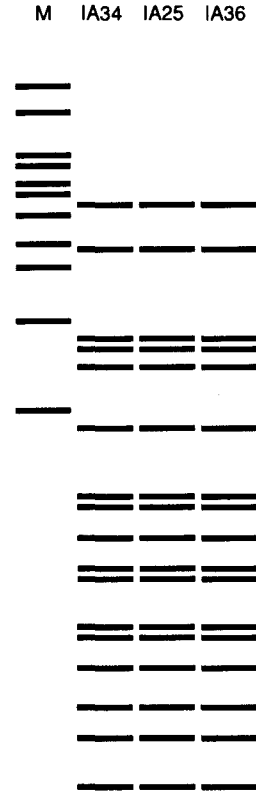


Fig. 2B Summary of the PFGE patterns of 3 standard *M. tuberculosis* strains(IA34, IA25, and IA36). M represents DNA size marker which contains yeast chromosomes. The sizes of the marker DNA are 238 kb, 263 kb, 335 kb, 427 kb, 581 kb, 681 kb, 774 kb, 832 kb, 913 kb, 936 kb, and 1020 kb from bottom to top.

유사치는 0.88이었다(그림 6 A).

그러나 dendrogram을 그리기 위한 단위 유사치는 0.00에서 0.74사이에 분포되어 있으므로 단위를 무시한 동일균종 균주간의 유전적거리를 보려면 part II의 pair-wise distances SUs을 보아야 함을 알 수 있었다 (그림 6 B). 이를 근거로 낮은 유사치를 갖는 균주들을 묶어서 그림으로 표현해주면 이것이 dendrogram이 된다 (그림 7).

B. *Xba*I으로 처리한 *M. fortuitum*의 PFGE분석

*AsnI*으로는 MF5 및 MF6 균주가 서로 같은 유형을 보여 균주간의 구분이 불가능하였다. 이 두 균주를 분류할 수 있는 제한효소를 검색한 결과 *XbaI*으로 9주의 *M. fortuitum*균주들이 모두 다른 PFGE유형을 보여 *M. fortuitum* 균주분류에 *XbaI*이 *AsnI*보다 적합한 제한효소임을 알 수 있었다 (그림 8).

또한 *Asn I*으로 처리한 PFGE에 DNA띠의 수에 비하여 *XbaI*으로 처리한 PFGE경우는 보다 많은 수의 DNA띠를 나타내어 동일 균종 균주간의 구분을 보다 잘 할 수있는 제한효소임을 알 수 있었다. 이를 정리한 것이 그림 9와 같다.

Cluster analysis결과 짝을 지운 유사치는 0.

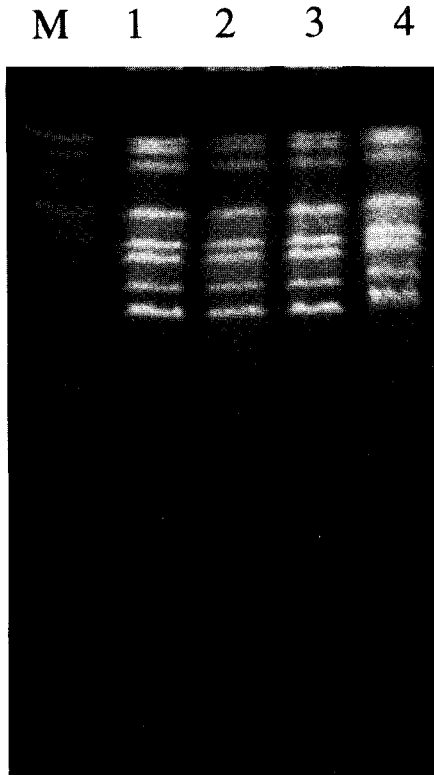


Fig. 3A PFGE patterns of 4 standard *M. tuberculosis* strains(CDC1, CDC2, CDC3, and CDC4). M lane is same as Fig. 2.

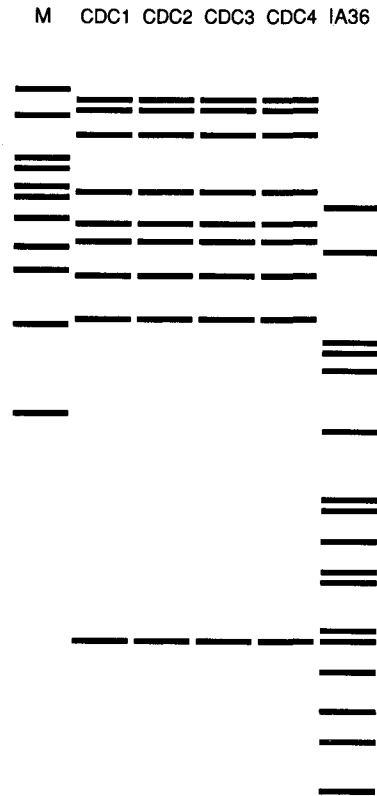


Fig. 3B Summary of the PFGE patterns of 4 standard *M. fortuitum* strains(CDC1, CDC2, CDC3, and CDC4). compared with one standard *M. tuberculosis* strain (IA36). M lane is same as Fig. 2.

26에서 0.91사이였으며 가장 가까운 균주는 유사치가 0.26인 MF8 와 MF9 균주들이고 그 다음으로 가까운 균주는 MF1 및 MF2로서 유사치는 0.32이었다. MF1 및 MF2균주들은 두 제한효소에서 모두 낮은 유사치를 보였다. 가장 거리가 먼 균주는 MF6 과 MF8로서 유사치는 0.91이었다 (그림 10A).

그러나 dendrogram 그리기 위한 그룹별 유사치는 0.26에서 0.75사이에 분포되어 있었다 (그림 10B). 이를 dendrogram으로 그린 것이 그림 11에 도시된 바와 같다.

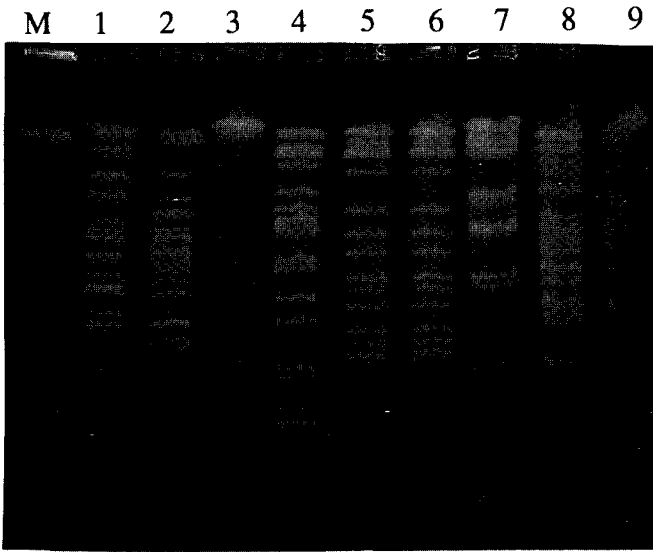


Fig. 4. *AsnI*-PFGE patterns of *M. fortuitum* isolates(MF1 to MF9). M lane is same as Fig. 2.

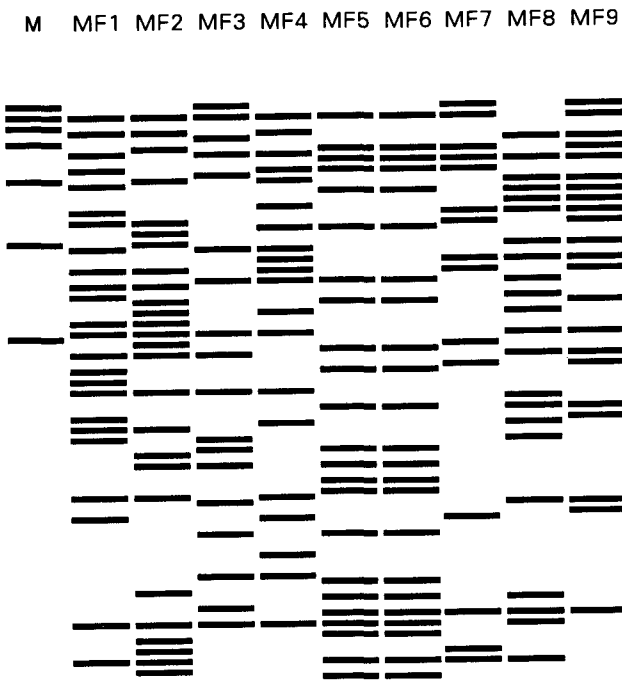


Fig. 5 Summary of the *AsnI*-PFGE patterns of 9 *M. fortuitum* isolates(MF1 to MF9). M lane is same as Fig. 2. The 4 uppermost yeast DNA bands on the M lane are not separated as detectable bands.

-----PART II. PAIR-WISE DISTANCES BETWEEN SUs -----

Index is Percent Dissimilarity (PD)

SU1) PAIRED DISTANCES with other SUs					
2) 0.46	3) 0.63	4) 0.48	5) 0.79	6) 0.79	
7) 0.65	8) 0.67	9) 0.70			
SU2) PAIRED DISTANCES with other SUs					
3) 0.73	4) 0.58	5) 0.76	6) 0.76	7) 0.67	
8) 0.68	9) 0.63				
SU3) PAIRED DISTANCES with other SUs					
4) 0.59	5) 0.71	6) 0.71	7) 0.88	8) 0.66	
9) 0.70					
SU4) PAIRED DISTANCES with other SUs					
5) 0.77	6) 0.77	7) 0.72	8) 0.64	9) 0.77	
SU5) PAIRED DISTANCES with other SUs					
6) 0.00	7) 0.68	8) 0.65	9) 0.69		
SU6) PAIRED DISTANCES with other SUs					
7) 0.68	8) 0.65	9) 0.69			
SU7) PAIRED DISTANCES with other SUs					
8) 0.74	9) 0.46				
SU8) PAIRED DISTANCES with other SUs					
9) 0.42					

Fig. 6A Pairwise genetic distances between *M. Fortuitum* isolates analyzed by *Asn*I-PFGE. The PFGE patterns were analyzed by Cluster analysis software.

-----PART III. CLUSTER ANALYSIS OUTPUT-----

Cluster Cycle	No. GRPS	Cluster LEVEL	Ref. S.U.	SUs in the Group
1	8	0.00	5	6
2	7	0.42	8	9
3	6	0.46	1	2
4	5	0.53	1	2 4
5	4	0.60	7	8 9
6	3	0.64	1	2 3 4
7	2	0.68	5	6 7 8 9
8	1	0.74	1	2 3 4 5 6 7 8 9
8	1	0.74	1	ALL SU's FORM ONE GROUP

Fig. 6B Cluster analysis output of *M. fortuitum* isolates analyzed by *Asn* I -PFGE. This result was used for drawing dendrogram.

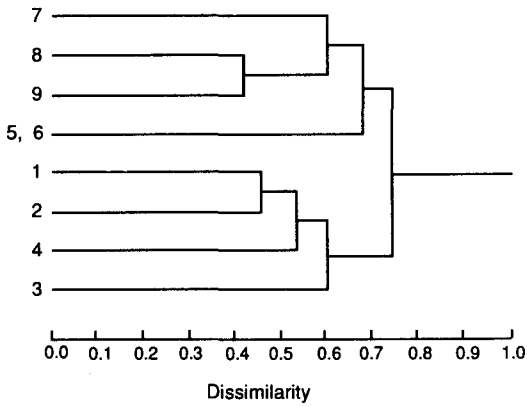


Fig. 7. Dendrogram of *AsnI*-PFGE patterns of *M. fortuitum* isolates. The dissimilarity value was calculated by Cluster analysis and IBM compatible 486Dx2 computer.

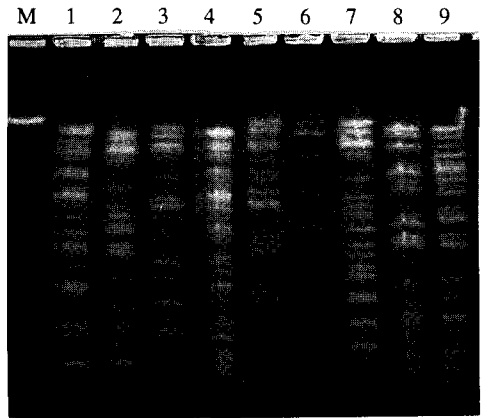


Fig. 8. *XbaI*-PFGE patterns of 9 *M. fortuitum* isolates (MF1 to MF9). M lane is same as Fig. 2.

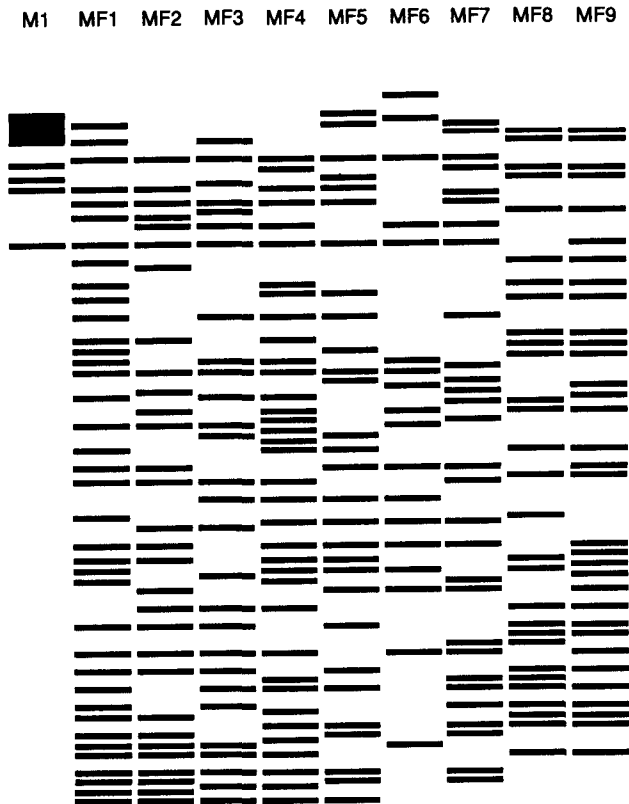


Fig. 9 Summary of the *XbaI*-PFGE patterns of 9 *M. fortuitum* isolates(MF1 to MF9). M lane is same as Fig. 2. The 7 uppermost yeast DNA bands on the M lane are not separated as detectable bands.

-----PART II. PAIR-WISE DISTANCES BETWEEN SUs-----

Index is Percent Dissimilarity (PD)

SU1) PAIRED DISTANCES with other SUs					
2) 0.32	3) 0.42	4) 0.47	5) 0.40	6) 0.64	
7) 0.58	8) 0.58	9) 0.55			
SU2) PAIRED DISTANCES with other SUs					
3) 0.45	4) 0.56	5) 0.49	6) 0.54	7) 0.55	
8) 0.76	9) 0.65				
SU3) PAIRED DISTANCES with other SUs					
4) 0.52	5) 0.58	6) 0.61	7) 0.64	8) 0.72	
9) 0.61					
SU4) PAIRED DISTANCES with other SUs					
5) 0.49	6) 0.58	7) 0.55	8) 0.68	9) 0.67	
SU5) PAIRED DISTANCES with other SUs					
6) 0.57	7) 0.47	8) 0.72	9) 0.68		
SU6) PAIRED DISTANCES with other SUs					
7) 0.65	8) 0.91	9) 0.73			
SU7) PAIRED DISTANCES with other SUs					
8) 0.72		9) 0.67			
SU8) PAIRED DISTANCES with other SUs					
9) 0.26					

Fig. 10A Pairwise genetic distances between *M. Fortuitum* isolates analyzed by *Xba*I-PFGE. The PFGE patterns were analyzed by Cluster analysis software.

-----PART III. CLUSTER ANALYSIS OUTPUT-----

Cluster Cycle	No. GRPS	Cluster LEVEL	Ref. S.U.	SUs in the Group
1	8	0.26	8	9
2	7	0.32	1	2
3	6	0.44	1	2 3
4	5	0.47	5	7
5	4	0.52	1	2 3 4
6	3	0.54	1	2 3 4 5 7
7	2	0.60	1	2 3 4 5 6 7
8	1	0.75	1	2 3 4 5 6 7 8 9
8	1	0.75	1	ALL SU's FORM ONE GROUP

Fig. 10B Cluster analysis output of *M. fortuitum* isolates analyzed by *Xba*I -PFGE. This data was used for drawing dendrogram.

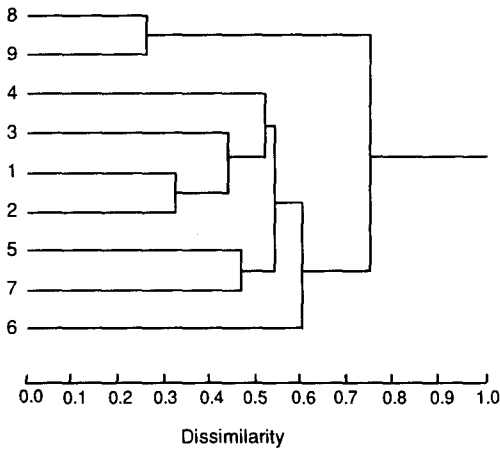


Fig. 11. Dendrogram of *XbaI*-PFGE patterns of *M. fortuitum* isolates. The dissimilarity value was calculated by Cluster analysis and IBM compatible 486Dx2 computer.

고 찰

항산균감염이 발생할 때 처음 발생한 장소를 찾기 위하여 균주들을 구분해 줄 수 있는 특징적인 표현형들이 오랜 기간동안 사용되어 왔다. 여기에는 흔치 않은 항생제 내성유형이라든지 항산균 박테리오파아지 감수성등이 포함되며 이러한 방법들을 통하여 항산균감염의 전파나 병인론 등의 지식이 축적되어 왔다.²⁷⁻²⁹⁾

표현형에 근거하여 균주를 분류하는 방법은 최근들어 DNA fingerprinting과 같은 분자생물학적인 방법에 의하여 대체되고 있다.³⁾ 이러한 새로운 기술을 이용함으로써 현재의 역학적인 연구에 보다 새로운 분야를 개척해 주고 기존의 분류방법들을 보다 정확하게 평가해 주는 것이 가능하게 되었다.

분자역학이란 어떤 병인체의 특정 균주를 추적하기 위하여 기존에 어떤 집단내의 역학조사를 위해 사용되던 도구들에 분자생물학적인 기술을 통합시킨 학문이다. 분자역학에 사용되는 분자생물학적인 기술로는 균주간의 차이를 구분해 줄 수 있는 probe와 Southern blot hybridization

법을 이용한 RFLP법^{1,2)}과 비특이적 PCR을 이용하여 균주간의 차이를 보는 AP-PCR법^{3,4)}이 많이 사용되어 왔다. 최근 들어서는 세균의 전 게놈의 유전자지도를 작성하는 목적으로 매우 크기가 큰 DNA를 크기별로 전기영동에 의해 분리하는 PFGE법⁷⁾이 사용되어 왔다.

본 연구에서는 PFGE법으로 동일균종의 항산균주를 분류하는 방법을 확립하기 위하여 *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* 및 *M. fortuitum* 표준균주를 사용하여 PFGE를 위한 제한효소를 검색하였고 선별된 각 제한효소 마다 적절한 PFGE 조건을 찾고자 하였다. 또한 이와 같이 확립된 PFGE법을 사용하여 *M. fortuitum* 임상분리균주들을 사용하여 실제 동일균종 균주간의 유전형에 의한 균주분류에 적용하여 보았다. 이러한 연구는 이제까지 확립되어 있는 RFLP나 AP-PCR법에 또다른 분자역학적인 방법을 추가함으로써 항산균감염증의 분자역학적인 연구에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각되었다.

PFGE법은 인식부위가 드문 제한효소²⁸⁻³⁰⁾를 사용하여 세균의 DNA를 소화시키고 이에 따라 생성되는 수백 kb 내지 수 Mb에 이르는 큰 DNA를 특정한 방법에 의하여 전기영동으로 구분하여 동일 균종의 균주간에 차이를 보는 방법이다. 예를 들어 게놈의 guanine+cytosine % content가 항산균과 같이 매우 높은 경우³¹⁾에는 제한효소가 인식하는 염기서열이 thymine이나 adenine이 많은 제한효소를 사용하여야 한다. 통상적인 전기영동과는 달리 PFGE기구는 3쌍의 전극을 가진 육각형의 모양을 취하고 있으며, 각 전극쌍은 30도의 각도가 차이나게 전극의 방향을 달리하고 있다. 따라서 PFGE를 하게 되면 시간에 따라 때로는 제1전극쌍, 제2 및 제3전극쌍을 축으로 하여 전기영동이 이루어지게 된다. 이에 따라 이동하는 DNA는 30도 혹은 60도씩

이동 각도가 달라지게 되며 보통 직선축으로 이동해서는 크기를 구분할 수 없는 매우 큰 DNA도 이와 같이 이동 각도를 여러 방향으로 이동시키면 크기에 따른 구분이 가능하다.

또한 PFGE법은 매우 큰 DNA를 취급하므로 DNA분리방법에 있어 보통과는 다른 방법을 사용하였다. 수백 kb 이상의 큰 DNA는 수십 kb이하의 작은 DNA들 보다 매우 손상되기 쉬우므로 균체로부터 DNA를 분리한 후 전기영동하지 않고 균체를 전기영동에 사용되는 agarose내에 고르게 부유시킨 상태에서 세균의 세포벽을 파괴시키고 제한효소를 처리하였다. 이와 같이 PFGE법에 있어서 DNA조작은 모두 agarose gel로 만들어진 벽돌 (block)내에서 수행되었다. 이를 적절한 크기로 잘라서 전기영동시에 포함되어 있는 홈 (well)에 꽂아서 전기영동에 사용하게 되므로 agarose plug이라 부르기로 하였다.

항산균의 PFGE유형 분석은 일반 세균에 비하여 매우 까다롭다. 우선 항산균의 배양이 매우 오랜 시간이 걸리고, 지질성분을 다량 함유하고 있는 세포벽의 특성상 항산균은 서로 균락을 이루어 붙어서 자라게 된다. PFGE유형 분석을 위하여는 균체가 골고루 부유되어야 깨끗한 전기영동상을 얻을 수 있으므로 이러한 항산균의 특성은 PFGE유형 분석에 방해가 된다. 본 실험에서는 계면활성제인 tween80을 사용하여 항산균체들을 서로 엉기지 않도록 배양 하는데 유의 하였고 배지내의 tween80의 농도를 높일 수록 서로 엉기는 것은 저지할 수 있었다. 항산균 배양을 위한 배지로서 본 실험에서는 PB배지에 OAD를 보조영양분으로 첨가하여 사용하였다. PB-OAD배지는 상품화되어 쉽게 사용할 수 있는 7H10 MiddleBrook배지에 비하여 항산균의 발육속도가 빠른 장점이 있었다. Sauton배지가 무단백 배지로서 항산균의 배양에 많이 사용되나

이는 정제배양을 하여야 하므로 균이 표면균막 형성 상태로 서로 엉겨 자라게 되어 PFGE유형 분석을 위하여는 적합하지 않았다.

Agarose gel plug내에서 균으로부터 DNA를 분리하기 위하여는 이들 plug을 lysozyme, proteinaseK 및 SDS로 처리하였는데 이들은 모두 다음단계에서 사용할 제한효소를 파괴하거나 그 활성을 억제하는 효과가 있기 때문에 이들을 제거하는 충분한 세척단계를 거쳐야 제한효소에 의한 소화가 잘 되므로 세척은 DNase의 활성을 방해하는 EDTA가 함유된 Tris-EDTA완충액을 사용하였다. 세척시간이 길다고 해서 DNA의 농도가 감소하거나 DNA가 파괴되는 것은 관찰할 수 없었다.

먼저 *M. bovis* BCG를 사용하여 PFGE를 시행하였다. 결핵연구원의 BCG균주와 영남대학교 의과대학 미생물학교실에서 계대배양하고 있는 BCG균주 (그림 1의 BCG 1 및 2는 PFGE유형에 차이를 관찰할 수 없었다. 이는 이들 균주간에 유전적인 차이가 있을 가능성이 매우 적음을 시사한다. 또한 영남대학교 의과대학 미생물학교실에서 계대배양하고 있는 BCG균주에 있어서 Sauton배지에 의한 계대횟수에 따른 10회 계대까지 PFGE유형의 변화를 관찰하였는데 이들 BCG균주들의 PFGE유형은 계대횟수에 따른 차이를 보이지 않아 유전적으로 매우 안정되어 있음을 알 수 있었다. 이는 항산균의 증식속도가 매우 느리므로 그만큼 변이가 일어날 확률도 떨어지기 때문으로 생각되었다.

Texas 대학에서 분양받은 3주의 결핵균 표준균주(그림 2의 IA34, IA25 및 IA36)들을 *DraI*로 처리하여 PFGE유형의 변화를 관찰한 결과 모두 같은 유형을 보였다. 결핵균에는 삽입배열 (insertion sequence)인 IS6110 이 있다. IS6110의 내부에는 제 330번째의 염기서열에 *DraI*의 인식

부위인 TTTAAA서열이 1군데 존재하므로 *DraI*에 의한 PFGE에 의한 DNA띠의 숫자는 그 결핵균주의 IS6110의 copy수와 일치한다. IS6110은 균주마다 삽입되어 있는 장소가 다르므로 *DraI*에 의해 PFGE 유형에 차이가 생긴다면 이는 IS6110의 전위(transposition)에 의한 것이라고 생각할 수 있을 것이다. 표준결핵균주의 하나인 H37Rv주는 IS6110-RFLP을 실시하면 11개의 DNA띠를 보이는데 비하여 본 실험에서 PFGE에 사용된 표준결핵균주들은 모두 16개의 DNA띠를 보여 서로 다른 표준균주임을 확인할 수 있었다.

표준균주 *M. fortuitum*를 사용한 PFGE유형에도 4균주(그림 3의 CDC 1, 2, 3 및 4가 모두 같은 유형을 나타내었다. *M. fortuitum* 균주들의 DNA띠가 표준결핵균주(그림2, IA36)에 비하여 전반적으로 크기가 큰 것을 알 수 있었다. 또한 BCG균주를 *XbaI*으로 처리했을 때에 비하여 표준결핵균주나 표준 *M. fortuitum* 균주들을 *DraI*으로 처리했을 때에 DNA띠의 수가 작음을 알 수 있었는데 이는 항산균주의 게놈에는 *DraI*이 인식하는 소화부위가 *XbaI*에 비하여 적은 것으로 생각되었다.

결핵균주의 경우는 *DraI*으로 처리한 PFGE 유형에서 그 결과를 IS6110과 연관시킬 수 있으나 IS6110은 *M. fortuitum*에는 존재하지 않으므로 *M. fortuitum*의 PFGE유형과 IS6110은 서로 무관하였다. 표준 *M. fortuitum* 균주를 *DraI*으로 처리한 PFGE유형에서 불과 9개의 DNA띠만이 관찰되었다. 대부분의 *M. fortuitum* 주들이 9개의 *DraI* 절단부위를 가진다고 가정할 때 이 방법으로는 최대 81개의 유전형만을 구분해 줄 수 있으므로 *DraI*을 사용한 PFGE유형 분석은 *M. fortuitum* 균주들의 유전형분석에는 그다지 적합하지 않음을 시사해주었다.

임상에서 분리된 *M. fortuitum* 주들을 구분하기 위하여 먼저 *AsnI* 제한효소로 균주들을 처리하여 PFGE를 시행하였다. 관찰된 DNA띠의 수는 18개부터 27개 사이였는데 두 균주(MF5와 MF6)는 서로 같은 유형을 나타내었다. 이들 두 균주간에 차이를 보이는 염기서열부위에는 *AsnI* 제한효소에 의하여 인식되어 절단되는 부위가 없음을 의미한다. 이들 PFGE유형에서는 표준 *M. fortuitum*을 *DraI*으로 처리했을 때에 비하여 보다 많은 DNA 띠를 관찰할 수 있었는데 이는 *M. fortuitum* 게놈에는 *DraI* 보다는 *AsnI*에 의하여 인식되어 절단되는 부위가 훨씬 많음을 보여주었다.

이들 유형을 정리하여 균주간의 유전적거리가 없는 경우 즉 모든 DNA띠의 유형이 차이를 보이지 않을 경우는 유사치가 0으로 표시하게 되고 반대로 동일 균종의 두 균주간에 공통되는 DNA띠가 하나도 존재하지 않으면 1을 표시하게 되어 유사치는 항상 0에서 1 사이의 값으로 표시되었다. 유사치도 균주간의 유전적거리를 나타내는 값이 있고, 균주들이 서로 집단을 이루었을 때 집단간의 유전적거리를 나타내는 값이 있는데 균주간의 유전적거리는 cluster analysis software중 Part II에서 알 수 있었고, 집단간의 유전적거리는 Part III에서 알 수 있었다. Part III에서 얻은 유사치를 보면 유사치가 한 집단과 어떤 균주(reference sampling unit, Ref. S. U.)간의 유사치들이 작은 값에서 큰 순서로 cluster level이라는 항목에 정리되어 있어 Part III에서 나오는 유사치를 근거로 하여 가까운 집단끼리 유사치를 그림으로 표시한 것이 그림 7과 같다. 제한효소 *AsnI*에 의한 *M. fortuitum* 분리균주들의 PFGE유형은 크게 두개의 집단으로 나뉘어지는 것으로 나타내었다. 서로 유형이 같은 MF 5 및 MF 6 균주들은 동일 유형으로 취급

되었다. *AsnI*에 의하여 서로 구분되지 않는 균주 (MF5와 MF6)들을 분류할 수 있는 제한효소를 찾은 결과 *XbaI*으로 PFGE를 시행하면 이들 균주들이 서로 다른 양상을 보임을 알 수 있었다. DNA 띠의 수는 균주마다 18개에서 38개로 제한효소 *AsnI*으로 처리한 경우보다는 많은 것을 알 수 있었고 따라서 *AsnI*처리에 의하여 서로 구분되지 않는 동일 균종의 균주간 분류가 가능하였다.

유사치를 계산하여 dendrogram을 그린 후 *AsnI*처리에 의한 PFGE시의 dendrogram과 비교해본 결과 *AsnI*처리의 경우에서 서로 유전적으로 가까운 것으로 나타났던 MF1 및 MF2의 균주는 제한효소 *XbaI*처리의 경우에서도 낮은 유사치를 보여 서로 일치하는 결과임을 알 수 있었다. 또한 *AsnI*처리의 경우에서 한 집단을 이루었던 MF 1, 2, 3 및 4의 균주들이 *XbaI*의 경우에서도 역시 한 집단을 이루는 것을 볼 수 있었다. 그러나, *AsnI*의 경우에서 한 집단을 이루었던 MF 5, 6, 7, 8 및 9의 균주는 *XbaI*처리의 경우에서 MF 5과 7 및 8과 9의 균주들만이 낮은 유사치를 나타내어서 *XbaI* 제한효소는 동일 균종의 균주들 간에 차이를 보이는 부위의 염기서열을 절단하는 것을 알 수 있었다.

전반적으로 제한효소 *AsnI*처리에 의한 PFGE 유형의 dendrogram에 비하여 *XbaI*에 의한 PFGE 유형의 dendrogram은 보다 복잡한 양상을 보였는데 이는 *XbaI*처리에 의하여 임상분리균 *M. fortuitum* 균주들의 DNA가 보다 많은 조각으로 절단됨을 보여주었다.

본 연구에서는 임상에서 분리되는 항산균들의 유전형을 분석하여 동일균종 균주간의 차이를 구분해 줄 수 있는 방법으로서 PFGE법을 확립하여 보았다. *M. fortuitum*에 의한 감염증은 한국에서 보고된 바는 찾아 볼 수 없으나 이는 적극적으로 균의 동정을 시도하지 않았던 것에 일

부 그 원인이 있다고 보여진다. 또한 면역결핍증이나 면역억제제 투여환자 그리고 암환자등의 면역능력이 떨어진 환자에서는 *M. fortuitum*에 의한 비정형 항산균증이 충분히 일어날 수 있을 것으로 생각된다.

PFGE법은 병원성이 강한 결핵균주를 대상으로 유전형 분류를 시도하기 보다는 발육신속 균주이면서도 비교적 병원성이 약한 *M. fortuitum*을 사용하여 PFGE법의 여러 조건을 확립하고자 하였다. 동일 균종에 균주간의 유전적 거리를 구분해 주는 방법의 우수성은 최고 유전적 거리를 나타내는 유사치가 높을 수록 우수한 것으로 판정된다. *M. fortuitum*과 직접 비교는 불가능하나 결핵균의 경우 IS6110을 probe로 한 RFLP법은 0.97, IS6110의 INS1 primer와 human papilloma virus type 18의 G primer를 동시에 사용한 AP-PCR법은 0.59인데 비하여³²⁾, *Xba I*을 사용한 PFGE법에서는 0.75의 비교적 높은 유사치를 보였다. 이는 PFGE법이 RFLP법에 보완되는 정도의 동일 균종의 균주분류가 가능함을 간접적으로 시사해 주는 것으로 생각되었다.

본 연구의 결과는 PFGE분석법이 항산균의 유전적거리를 통한 동일 균종 균주분류에 있어서 RFLP와 함께 유용하게 분자역학적 수단으로 사용될 수 있음을 보여 주었고 본 연구에서 확립된 PFGE 방법을 근거로 보다 많은 항산균종의 균주 분리의 PFGE유형 결과를 축적한다. 동일 균종 균주분류에 있어서 기초적인 자료제시뿐만 아니라 실제적으로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

항산균 감염증의 예방 및 치료를 위하여는

역학적인 연구가 중요하다. 본 연구에서는 감염 증의 분자역학적 연구를 위한 기법중 아직 항산균을 대상으로 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 분석법을 확립하고자 하였다.

PFGE분석에 적절한 제한효소는 *DraI*, *AsnI* 및 *XbaI* 등이었고 각 제한효소마다 최적의 PFGE조건은 서로 달랐다. *DraI*의 경우는 두단계로 나누어 전기영동을 시행하였다. 제1단계의 initial pulse는 10초 final pulse는 15초였으며 제2단계는 initial pulse는 60초 final pulse는 70초이었다. 전기영동시간은 각 단계마다 각각 14시간씩이었다. *XbaI*의 경우는 제2단계 없이 initial pulse가 3초 final pulse가 12초였고 전기영동시간은 22시간이었다. *AsnI*의 경우는 제2단계 없이 initial pulse가 5초 final pulse가 25초였고 전기영동시간은 22시간이었다. 모든 경우에 있어서 전압은 200V로 하였다.

표준균주로는 *M. bovis BCG*, *M. tuberculosis* 및 *M. fortuitum*등을 사용하였는데 PFGE분석상 동일균종내에서 표준균주들 간의 차이는 발견할 수 없었다.

임상에서 분리된 9주의 *M. fortuitum* 균주를 대상으로 *AsnI* 제한효소로 PFGE분석을 시행한 결과 2주만을 제외하고는 서로 간의 유전형 분류가 가능하였다. 균주간의 유전적 거리를 결정하기 위하여 cluster analysis를 시행한 결과 *M. fortuitum* 균주들은 크게 두 집단으로 나뉘었다.

제한효소 *AsnI*으로 동일 균종의 분류가 안되는 *M. fortuitum* 균주들은 *XbaI* 제한효소를 사용한 PFGE분석으로 유전형의 구분이 가능하였다. Cluster analysis를 시행한 결과 크게 두 집단으로 나뉘었던 *M. fortuitum* 균주들은 보다 복잡한 집단으로 분류되어 *XbaI*을 사용한 PFGE분석법이 *M. fortuitum* 균주분류를 위하여는 보다 적절함을 알 수 있었다.

Cluster analysis에서 얻은 최대 % dissimilarity 값은 0.74 (*AsnI*) 및 0.75 (*XbaI*)로서 이 값은 arbitrarily primed polymerase chain reaction(AP-PCR)법보다는 높고 restriction fragment length polymorphism(RFLP) 법보다는 낮아 PFGE법이 RFLP를 보완하거나 대체할 수 있는 세균 유전형 분석법임을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Cave MD, Eisenach KD, McDermott KD, Bates JH, Crawford JT: IS6110 conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. Mol Cell Probes 5: 73-80. 1991.
2. Lee TY, Shin SG, Kim SK: Restriction fragment length polymorphism analysis in differentiating *Mycobacterium tuberculosis* strains. J Kor Soc Microbiol 27: 155-161, 1992.
3. Loudon KW, Burnie J P, Coke AP, Matthews RC: Application of polymerase chain reaction to fingerprinting *Aspergillus fumigatus* by amplification of polymorphic DNA. J. Clin. Microbiol. 31: 1117-1121. 1993.
4. Williams JGK, Kubelik AK, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535, 1990.
5. 신승구: Restriction fragment length polymorphism을 이용한 항산균의 유전형분석. 박사학위논문, 영남대학교 대학원, 1993, 쪽 479-517.
6. Birren BW, Lai E, Clark SM, Hood L, Simon

- MI: Optimized conditions for pulsed field gel electrophoretic separations of DNA. *Nucleic Acids Res* 16: 7563-7582, 1988.
7. Burrett EN, Reyner EL, Gorski JL: Human-specific amplification of radiation hybrid DNA fractionated by pulse-field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 19: 401, 1990.
 8. Chu G, Vollrath D, Davis RW: Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234: 1582-1585, 1986.
 9. Smith CL, Enconome JG, Schutt A, Klco S, Cantor CR: A physical map of the *Escherichia coli* K12 genome. *Science* 236: 1448-1453, 1987.
 10. Arbeit RD, Arthur M, Dunn R, Kim C, Selander RK, Goldstein R: Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. *J Infect Dis* 161: 230-235, 1990.
 11. Christian C, Allardet-Servent A, Bourg G, Audurier A, Ramuz M: DNA polymorphism in strains of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* 29: 1351-1355, 1991.
 12. Burns DN, Wallace RJ, Schultz ME, Zang Y, Zubairi SQ, Pang Y, Gibert CL, Brown BA, Noel ES, Gordin FM: Nosocomial outbreak of respiratory tract colonization with *Mycobacterium fortuitum*: Demonstration of the usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in an epidemiologic investigation. *Am Res Respir Dis* 144: 1153-1159, 1991.
 13. Canard B, Saint-Joanis B, Cole ST: Genomic diversity and organization of virulence genes in the pathogenic anaerobic *Clostridium perfringens*. *Mol Microbiol* 6: 1421-1429, 1992.
 14. Goering RV, Winters MA: Rapid method for epidemiological evaluation of gram-positive cocci by field inversion gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 30: 577-580, 1992.
 15. Kwok K, McClelland M: A *BlnI* restriction map of the *Salmonella typhimurium* LT2 genome. *J Bacteriol* 174: 1656-1661, 1992.
 16. Liu SL, Sanderson KE: A physical map of the *Salmonella typhimurium* LT2 genome made by using *XbaI* analysis. *J Bacteriol* 174: 1662-1672, 1992.
 17. Zhang Y, Mazurek GH, Cave MD, Eisenach KD, Pang Y, Murphy DT, Wallace RJ: DNA polymorphisms in strains of *Mycobacterium tuberculosis* analyzed by pulsed-field gel electrophoresis: a tool for epidemiology. *J Clin Microbiol* 30: 1551-1556, 1992.
 18. Hector JSR, Pang Y, Mazurek GH, Zhang Y, Brown BA, Wallace RJ: Large restriction fragment patterns of genomic *Mycobacterium fortuitum* DNA as strain-specific markers and their use in epidemiologic investigation of four nosocomial outbreaks. *J Clin Microbiol* 30: 1250-1255, 1992.
 19. Mazurek GH, Hartman S, Zhang S, Brown BA, Hector JSR, Murphy D, Wallace RJ: Large DNA restriction fragment polymorphism in the *Mycobacterium avium*-*M. intracellulare* complex: a potential epidemiologic tool. *J Clin Microbiol* 31: 309-394, 1993.
 20. Wallace RJ, Zang Y, Brown BA, Fraser V, Mazurek GH, Maloney S: DNA large restriction fragment patterns of sporadic and epidemic

- nosocomial strains of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. J Clin Microbiol 31: 2697-2701, 1993.
21. Thierry D, MD Cave, KD Eisenach, JT Crawford, B Gicquel, JL Guesdon: IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Nucleic Acids Res. 18: 188 1990.
 22. Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, Nguyen S, Gusdon J, Gicquel B: Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. J Clin Microbiol 28: 2668-2673, 1990.
 23. McAdam RA, Hermans PWM, van Soolingen D, Zainuddin ZF, Catty D, van Embden JDA, Dale JW: Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. Mol Microbiol 1: 283-291, 1990.
 24. Smith CL, Cantor CR: Purification, specific fragmentation, and separation of large DNA molecules. Methods Enzymol 155: 449-467, 1987.
 25. Levy-Frebalt VV, Thorel MF, Varnerot A, Gicquel B: DNA polymorphism in *Mycobacterium paratuberculosis*, "wood pigeon mycobacteria," and related mycobacteria analyzed by field inversion gel electrophoresis. J Clin Microbiol 27: 2823-2826, 1989.
 26. Ludwig, JA and Reynolds JF, Statistical ecology: a primer on methods and computing. John Wiley & Sons, Inc, NY, 1988, pp 1-10.
 27. Snider DE Jr, Jones WD, Good RC: The usefulness of phage typing *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Am Rev Respir Dis 130: 1095-1099, 1984.
 28. McClland M, Jones R, Patel Y, Nelson M: Restriction endonucleases for pulsed field mapping of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 15: 5985-6005, 1987.
 29. Allardet-Servent A, Bouzuges N, Carles-Nurit MJ, Bourg G, Gouby A, Ramuz M: Use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases for DNA analysis in epidemiological investigations of nosocomial bacterial infections. J Clin Microbiol 27: 2057-2061, 1989.
 30. Murray BE, Singh KV, Death JD, Sharma BR, Weinstock GM: Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. J Clin Microbiol 28: 2059-2063, 1990.
 31. Wayne JD, Gross WM: Base composition of deoxyribonucleic acid isolated from mycobacteria. J Bacteriol 96: 1915-1919, 1968.
 32. Lee TY, Lee TJ, Kim SK: Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* by arbitrarily primed polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. Yonsei Med J 35: 286-294, 1994.

-Abstract-

Genomic analysis of *Mycobacterium fortuitum* by pulsed-field gel electrophoresis

Tae Yoon Lee, In A Do, Sung Kwang Kim

*Department of Microbiology
College of Medicine, Yeungnam University
Taegu, Korea*

Epidemiological studies are important in both the prevention and treatment of mycobacterial infections. This study was initiated to establish the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) method, which are not yet extensively studied.

The most appropriate restriction endonucleases included *DraI*, *AsnI*, and *XbaI*. The optimal PFGE condition was different according to the enzymes used. Two stage PFGE was performed, in case of *DraI* first stage was performed with 10 seconds of initial pulse and 15 seconds of final pulse, while the second stage was performed with 60 seconds of initial pulse and 70 seconds of final pulse. The electrophoresis time for *DraI*-PFGE was 14 hours for each stage. Electrophoresis was performed for 22 hours, in case of *XbaI*, with 3 seconds of initial pulse and 12 seconds of final pulse. Electrophoresis was performed for 22 hours, in case of *AsnI*, with 5 seconds of initial pulse and 25 seconds of final pulse. In all cases the voltage of the electrophoresis was maintained constantly at 200 voltage.

Standard mycobacterial strains, which included *Mycobacterium bovis* BCG, *M. tuberculosis*, and *M. fortuitum*, could not be differentiated by PFGE analysis.

PFGE analysis was performed to differentiate 9 clinically isolated *M. fortuitum* strains using *AsnI*. All *M. fortuitum* strains showed different genotypes except 2 strains. Cluster analysis divided *M. fortuitum* strains into 2 large groups.

PFGE analysis was performed to further differentiate *M. fortuitum* isolates using *XbaI*. The undifferentiated 2 *M. fortuitum* strains showed different PFGE patterns with *XbaI*. Cluster analysis of the *XbaI*-PFGE patterns showed more complex grouping than *AsnI*-PFGE patterns, which showed that *XbaI*-PFGE analysis was better than *AsnI*-PFGE in *M. fortuitum* genotyping.

The top dissimilarity values of *AsnI*-PFGE and *XbaI*-PFGE were 0.74 and 0.75, respectively. This value was higher than that of arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) analysis and lower than that of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. This suggested that PFGE can be used as a supportive or alternative genotyping method to RFLP analysis.

Key Words: Pulsed-field gel electrophoresis, *Mycobacterium fortuitum*, Dissimilarity, Dendrogram