

## Polymerase chain reaction에 의한 동물 유래 피부사상균 DNA의 검출

김영욱, 여상건<sup>1</sup>, 최원필\*

경북대학교 수의과대학, 경상대학교 수의과대학<sup>1</sup>  
(게재승인 : 2002년 7월 31일)

### Detection of DNA from Dermatophytes by Polymerase Chain Reaction

Young-Wook Kim, Sang-Geon Yeo<sup>1</sup> and Won-Pil Choi\*

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

(Accepted : July 31, 2002)

**Abstracts :** For the development of diagnostic polymerase chain reaction (PCR) to fungal infection by dermatophytes *Trichophyton* and *Microsporum*, detection of the fungal DNA by PCR and analysis of the DNA pattern were undertaken in the present study. A total of 15 strains were tested and those consisted of 3 reference strains and 12 isolates such as: reference strains of *T mentagrophytes* (downy type, ATCC 9533), *T rubrum* (IFO 6204) and *M gypseum* (ATCC 9083), and each isolate of *T mentagrophytes* (powdery type), *T mentagrophytes* (granular type), *T mentagrophytes* (purple-red type), *T rubrum*, *T raubitschekii*, *T tonsurans*, *T equinum*, *T ajelloi*, *T verrucosum*, *M cookei*, *M nanum* and *M gypseum*.

The DNA were purely isolated from all strains of *Trichophyton* spp. and *Microsporum* spp. by a simple method partly consisted of disruption of fungal cells by lyophilization and grinding and extraction of fungal DNA without phenol treatment which is a routine procedure in DNA isolation. For the detection of fungal DNAs, optimal condition of PCR was determined as preheating once at 94°C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 38°C for 1 min and polymerization at 72°C for 2 min, and 1 cycle of final extension at 72°C for 5 min.

In PCR using arbitrary primers AP-1 (5' ACCCGACCTG3') and AP-2 (5' ACGGGCCAGT3'), DNAs in various numbers and sizes were detected from different species of *Trichophyton* and *Microsporum*, while DNAs in similar size were also detected in all strains of *Trichophyton* spp. and *Microsporum* spp. There were unique DNAs observed from certain dermatophytes by AP-1 such as 1,900 bases in *T rubrum*, 950 and 1,100 bases in *T raubitschekii*, 2,100 bases in *T equinum*, 400 bases in *T verrucosum* and 1,150 bases in *M gypseum*. The unique DNAs were also observed by AP-2 such as 1,200 bases in *T ajelloi*, 250 bases in *T verrucosum*, 1,150 bases in *M cookei* and 2,000 bases in *M nanum*.

The results indicated that PCR can detect a specific DNA from certain *Trichophyton* and *Microsporum* spp, which can be the information for further development of diagnostic PCR to dermatophytes.

**Key words :** Dermatophytes, RAPD analysis, Identification.

## 서 론

동물에서 발생하는 피부사상균증은 인수공통전염병으

로서도 그 중요성이 높다. 피부사상균은 동물의 종에 따라 다양하게 분리되고 있으며 진단에 있어서 피부사상균의 분리 및 분리군에 대한 형태학적, 생물학적 성상

\* Corresponding author: Dr. Won-Pil Choi, College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea (E-mail : wpchoi@bh.knu.ac.kr)

검사가 주로 이루어지고 있다. 특히 분리균의 배양조건, 육안적 및 현미경적 형태소견에 의하여 원인체의 진단이 이루어지고 있으나, 곰팡이 균주들은 계대배양함에 따라 흔히 그 형태상의 변화를 나타내고 있다<sup>1,2</sup>.

형태학적 동정이 어려운 경우에는 urease 생성검사, 모발천공시험 등 진균학적 검사를 시행하고 있으나 검사기간이 오래 걸리며 때로 검사를 실시한 후에도 동정이 확실하지 않을 경우도 있다<sup>1,2</sup>. 이와 같이 경험이 풍부한 진균학자들도 피부사상균의 형태학적 및 생물학적 검사만으로는 동정의 어려움을 겪고 있으며, 근년에는 이와 같은 문제를 해결하기 위한 분자생물학적 기법이 시도되고 있다<sup>3,7</sup>.

이 연구에서는 동물의 피부사상균종을 조기에 특이적으로 진단할 수 있는 polymerase chain reaction (PCR) 방법을 확립하기 위한 노력의 일환으로서, 수종의 피부사상균을 대상으로 PCR을 수행하여 균종별로 검출되는 DNA 성상의 차이를 밝히고 감별 가능성을 검토하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시 균주 및 배양

개 등 7종의 동물과 토양에서 분리, 동정하여 보유 중이던 *Trichophyton* (*T*)과 *Microsporum* (*M*)속 균의 분리주 및 대조주를 공시하였으며, 균종 및 분리되었던 동물의 종은 Table 1과 같다. 각 균주를 potato dextrose agar

(PDA; Difco, USA) 평판 배지에 접종하여 26°C에서 2~3주 배양하여 균사가 풍부하게 형성되도록 하였으며, *T. verrucosum*은 thiamine (0.2 mg/ml)과 inositol (50 µg/ml)이 첨가된 PDA를 사용하여 37°C에서 배양하여 DNA 분리에 사용하였다.

### 2. 피부사상균 DNA의 분리

Raina와 Chandlee<sup>3</sup>이 제시하였던 곰팡이 *Sclerotinia homoeocarpa* 균의 DNA 분리방법에 준하여 각 균주로부터 DNA를 추출하여 PCR 실험에 사용하였다. 즉, PDA 평판 배지에서 발육한 균사체를 약 200 mg씩 수확하여 멸균된 microcentrifuge 튜브에 수집하였다. 여기에 멸균 PBS (pH 7.4)를 넣고 부드럽게 진탕한 후 1,500 rpm에서 10분간 원심 분리하여 액체를 제거하였으며, 이어서 멸균 증류수로 동일하게 세척하였다.

Raina와 Chandlee<sup>3</sup>의 방법 중 균사체 마쇄를 위한 액체질소 혼합 동결방법 대신에 균사체를 동결건조기 (Maxi Dry Lyo, Heto, Germany)에서 건조시킨 후 유리 시험관에 넣고 끝 부분이 거칠게 갈아져 있는 초자봉을 이용하여 마쇄시켜 분말화 하였다. 균사체 분말에 대하여 300 µl의 extraction buffer (100 mM tris-HCl, pH 9.0, 40 mM EDTA)와 60 µl의 10% SDS 및 180 µl의 benzyl chloride의 혼합액을 가하여 부유시켰다. 이것을 50°C에서 30분 동안 가열하면서 주기적으로 vortex로써 충분히 균질화 시켰다. 균사 균질 액에 300 µl의 3 M sodium acetate (pH 5.0)를 가하고 얼음에서 1시간 정치한 후

Table 1. Dermatophyte strains used in the present study

Strains (Morphological types)	History	Animals Dermatophytes Isolated
<i>T mentagrophytes</i> (downy type)	Reference strain (ATCC 9533)	-
<i>T mentagrophytes</i> (powdery type)	Isolate	Rabbit
<i>T mentagrophytes</i> (granular type)	Isolate	Rat
<i>T mentagrophytes</i> (purple-red type)	Isolate	Dog
<i>T rubrum</i>	Reference strain (IFO 6204)	-
<i>T rubrum</i>	Isolate	Dog
<i>T raubistchekii</i>	Isolate	Dog
<i>T tonsurans</i>	Isolate	Goat
<i>T equinum</i>	Isolate	Horse
<i>T ajelloi</i>	Isolate	Soil
<i>T verrucosum</i>	Isolate	Cattle
<i>M cookei</i>	Isolate	Soil
<i>M nanum</i>	Isolate	Pig
<i>M gypseum</i>	Reference strain (ATCC 9083)	-
<i>M gypseum</i>	Isolate	Dog

16,000 xg에서 15분간 원심 분리하였다.

상층액을 수확하여 2.5배 양의 isopropanol과 섞은 다음 -20°C에서 20분 동안 정치하였으며, 16000 xg에서 5분간 원심 분리하여 pellet을 얻었다. 이 pellet을 250 µl의 TE buffer (10 mM tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)에 용해하여 65°C에서 5분간 정치한 후 16,000 xg에서 1분간 원심 분리하여 핵산을 추출하였으며 이를 3회 반복하였다. DNA 추출물에 혼합될 수 있는 다당체를 제거하기 위하여 0.35배 양의 ethanol (100%)을 천천히 넣고 즉시 섞어서 9,000 xg에서 5분간 원심 분리하였다. 이어서 DNA를 함유하고 있는 상층액을 모아서 여기에 0.1배 양의 7.5M ammonium acetate 및 0.65배 양의 ethanol (100%)을 첨가하고 -20°C에서 30분간 반응한 후 16,000 xg에서 5분간 원심 분리하여 pellet을 수확하였다. 이 pellet을 200 µl의 TE buffer에 녹이고 10 µl의 RNase A (10 mg/ml)를 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 RNA를 제거하였다. 계속하여 0.1배 양의 7.5 M ammonium acetate와 2배 양의 ethanol (100%)을 첨가하고 -20°C에서 30분간 반응시킨 후 16,000 xg에서 5분간 원심 분리하였다. DNA 분리 전 과정에서 phenol-chloroform을 이용한 추출과정은 배제하였으며, 이렇게 하여 얻은 pellet을 ethanol (70%)로 세척한 후 100 µl의 TE buffer에 녹인 후 2 µl를 취하여 1.2% agarose-gel에서 확인하였다. 이 DNA를 -20°C에 보관하면서 이후의 PCR 실험에 사용하였다.

### 3. PCR

각종 피부사상균으로부터 분리된 DNA에 대하여 arbitrary primer를 사용하여 PCR을 수행하였으며, primer의 종류에 따른 DNA 검출 상을 조사하였다. PCR에 사용되었던 시약의 농도는 Table 2와 같으며, 각 primer의 염기서열 (참고문헌 2, 3)은 Table 3과 같다. 먼저 primer의 최적 annealing 온도를 측정하기 위하여 *Trichophyton* 속의 각 균종별 1주씩 7주를 대상으로 94°C에서 5분간 preheating한 후 29.5°C, 33.7°C, 38°C, 42.3°C 또는 45.6°C에서 1분간 annealing을 실시하였으며, 이들 annealing 온도마다 공통적으로 94°C에서 1분간 denature 및 72°C에서 2분간 polymerization을 1 회전으로 하여 총 35회 동안 T-gradient thermocycler (Biometra, Germany)에서 PCR을 실시하였고 72°C에서 5분간 최종 extension을 하였다. 이 실험의 결과에 의하여 수립된 최적 annealing 온도를 이후의 PCR에 적용하였다.

### 4. 전기 영동

PCR에 의하여 검출된 DNA를 관찰하기 위하여 각 DNA 10 µl를 2 µl의 6X DNA loading dye와 혼합한 후 TAE buffer로 용해한 0.6% agarose-gel에서 40-60 volts로 전개하였다. 이어서 gel을 4%의 ethidium bromide 용액에서 10분간 염색하였고, rocker platform에서 증류수로 10분간 2회 세척한 후 UV illuminator 상에서 관찰하였다.

Table 2. Concentration of reagent mixture used in PCR

Reagents	Volume (µl)	Final concentrations
dH <sub>2</sub> O	27.0	-
10 X PCR buffer	5.0	1 X
25 mM MgCl <sub>2</sub>	6.0	3 mM
2.5 mM dNTPs	4.0	200 µM
20 µM primer	2.5	1 µM
Fungal DNA	5.0	10%
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 units/µl)*	0.5	-
Total	50.0	

\*; Perkin-Elmer

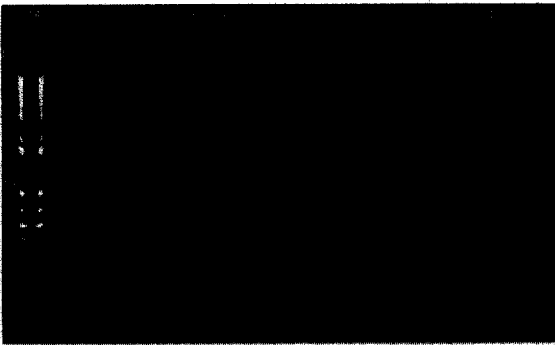
Table 3. Arbitrary primers used in PCR

Primers	Nucleotide Sequences	Mers	%GC	References
AP-1	5' -ACCCGACCTG-3'	10	70	2
AP-2	5' -ACGGGCCAGT-3'	10	70	3

## 결 과

### 1. 피부사상균 DNA의 분리

피부사상균의 균사를 동결 건조시킨 후 마쇄하여 얻은 분말을 SDS와 benzyl chloride가 함유된 extraction buffer에 용해한 후, phenol-chloroform 추출과정을 배제한 것을 제외하고는 통상적인 방법에 따라 DNA를 분리하였다. 그 결과 Fig 1에서와 같이 전 공시 균주로부터 RNA와 단백질이 혼합되지 않은 순수한 DNA를 얻을 수 있었으며, 이 DNA를 PCR 실험에 사용하였다.



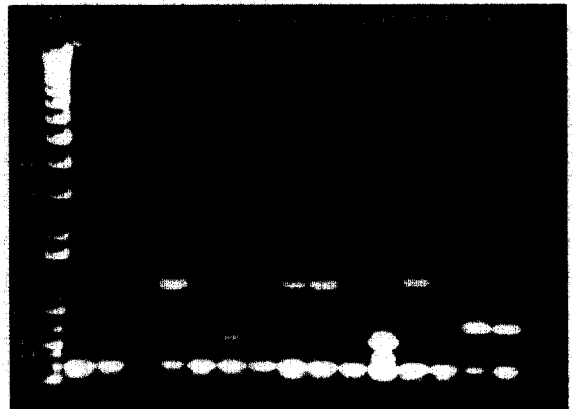
**Fig 1.** DNAs extracted from 15 strains of *Trichophyton* and *Microsporium* spp on 1.2% agarose-gel: 1, *T mentagrophytes* (downy type, ATCC 9533); 2, *T mentagrophytes* (powdery type); 3, *T mentagrophytes* (granular type); 4, *T mentagrophytes* (purple-red type); 5, *T rubrum* (IFO 6204); 6, *T rubrum*; 7, *T raubitschekii*; 8, *T tonsurans*; 9, *T equinum*; 10, *T ajelloi*; 11, *T verrucosum*; 12, *M cookei*; 13, *M nanum*; 14, *M gypseum* (ATCC 9083); 15, *M gypseum*; M, 1 kb DNA plus marker (GibcoBRL).

### 2. PCR에 의한 DNA의 검출

일차적으로 2종의 arbitrary primer의 annealing에 적합한 온도를 조사하기 위하여 *Trichophyton* 속의 균종별로 1주씩 7주에 대하여 29.5°C, 33.7°C, 38°C, 42.3°C 또는 45.6°C를 적용하였을 때, 각 온도 조건에서 증폭된 DNA band를 관찰할 수 있었던 바 특히 38°C에서 annealing 시에 DNA 증폭 효과 및 band의 구별상태가 가장 좋았다. 따라서 이후의 PCR 실험에서는 38°C를 annealing 온도로 정하였다.

피부사상균 15주를 대상으로 AP-1 primer를 이용하여 DNA를 검출하였던 결과는 Fig 2 및 Table 4에서와 같다. *Trichophyton*속 균 중 *T mentagrophytes* 4주에서 형태학적으로 용모형인 대조주 (ATCC 9533)와 분리주 중 분말형 주 및 과립형 주에서 동일하게 크기가 약 300, 500, 700, 800, 1,000 bases인 5개의 DNA가 관찰되었으며, 분

리주 중 도실형 주에서는 이 5개 외에도 약 1,200, 1,300, 1,650, 2,000 bases 크기의 DNA가 추가로 확인되었다. 따라서 도실형 분리주의 DNA band의 pattern이 타 분리주 및 대조주와 상이한 것이 인정되었다. *T rubrum* 2주에서는 대조주 (IFO 6204)와 분리주에서 동일하게 약 300, 500, 700, 1,000, 1,400, 1,900 bases 크기인 6개의 DNA가 관찰되었다. *T raubitschekii* 분리주 1주에서 약 300, 500, 650, 950, 1,100, 2,200 bases 크기의 6개, *T tonsurans* 분리주 1주에서는 약 300, 500, 700, 1,000, 1,200, 2,200 크기의 6개가 관찰되었다. *T equinum* 분리주 1주에서 약 300, 500, 700, 800, 1,000, 1,200, 2,100 bases 크기의 7개, *T ajelloi* 분리주 1주에서는 약 300, 500, 650, 1,000, 1,200 bases 크기의 5개가 관찰되었다. *T verrucosum*의 경우에는 1회의 PCR 후에 전기영동 시에 DNA를 관찰할 수 없었으나 이것을 template로 하여 동일한 반응 조건으로 PCR을 재 수행하였을 때 분리주 1주에서 약 300, 400, 500, 700 bases 크기의 4개가 관찰되었다. *Microsporium*속 균 중 *M. cookei*에서 약 300, 500, 700, 1,200, 1,400 bases 크기의 5개, *M nanum*에서 약 300, 500, 700, 1,000 bases 크기의 4개, *M gypseum* 대조주 (ATCC 9083) 1주와 분리주 1주에서는 약 300, 500, 700, 1,150, 1,650 bases 크기의 5개가 관찰되었다.



**Fig 2.** DNAs fragment amplified from 15 strains of *Trichophyton* and *Microsporium* spp by PCR using arbitrary primer AP-1 on 0.6% agarose-gel: 1, *T mentagrophytes* (downy type, ATCC 9533); 2, *T mentagrophytes* (powdery type); 3, *T mentagrophytes* (granular type); 4, *T mentagrophytes* (purple-red type); 5, *T rubrum* (IFO 6204); 6, *T rubrum*; 7, *T raubitschekii*; 8, *T tonsurans*; 9, *T equinum*; 10, *T ajelloi*; 11, *T verrucosum*; 12, *M cookei*; 13, *M nanum*; 14, *M gypseum* (ATCC 9083); 15, *M gypseum*; M, 1 kb DNA plus marker (GibcoBRL).

**Table 4.** Numbers and sizes determined from DNAs amplified from 15 strains of *Trichophyton* and *Microsporium* spp by PCR using arbitrary primer AP-1

Strains (Morphological types)	Strains	Numbers of DNA bands	Approximate Sizes of DNA bands (bases)
<i>T mentagrophytes</i> (downy type)	ATCC 9533	5	300, 500, 700, 800, 1,000
<i>T mentagrophytes</i> (powdery type)	Isolate	5	300, 500, 700, 800, 1,000
<i>T mentagrophytes</i> (granular type)	Isolate	5	300, 500, 700, 800, 1,000
<i>T mentagrophytes</i> (purple-red type)	Isolate	9	300, 500, 700, 800, 1,000, 1,200, 1,300, 1,650, 2000
<i>T rubrum</i>	IFO 6204	6	300, 500, 700, 1,000, 1,400, 1900
<i>T rubrum</i>	Isolate	6	300, 500, 700, 1,000, 1,400, 1900
<i>T raubitschekii</i>	Isolate	6	300, 500, 650, 950, 1,100, 2,200
<i>T tonsurans</i>	Isolate	6	300, 500, 700, 1,000, 1,200, 2,200
<i>T equinum</i>	Isolate	7	300, 500, 700, 800, 1,000, 1,200, 2,100
<i>T ajelloi</i>	Isolate	5	300, 500, 650, 1,000, 1,200
<i>T verrucosum</i>	Isolate	4	300, 400, 500, 700
<i>M cookei</i>	Isolate	5	300, 500, 700, 1,200, 1,400
<i>M nanum</i>	Isolate	4	300, 500, 700, 1,000
<i>M gypseum</i>	ATCC 9083	5	300, 500, 700, 1,150, 1,650
<i>M gypseum</i>	Isolate	5	300, 500, 700, 1,150, 1,650

한편 *Trichophyton*속 및 *Microsporium*속 균 중 특정 균종에서 유일하게 관찰되는 DNA로서 *T rubrum*에서 1,900 bases, *T raubitschekii*에서 950 bases 및 1,100 bases, *T equinum*에서 2,100 bases, *T verrucosum*에서 400 bases, *M gypseum*에서 1,150 bases의 DNA가 인정되었다. 특징의 2 균종에서만 관찰되는 것으로서 *T mentagrophytes*와 *T equinum*에서 800 bases, *T raubitschekii*와 *T ajelloi*에서 650 bases, *T raubitschekii*와 *T tonsurans*에서 2,200 bases, *T rubrum*과 *M cookei*에서 1,400 bases의 DNA가 인정되었다. 또한 *T raubitschekii*와 *T ajelloi*를 제외한 *Trichophyton* 및 *Microsporium*속의 전 균종에서 약 300, 500 및 700 bases 크기의 DNA로 구성된 pattern이 공통적으로 관찰되었으며, *T raubitschekii*와 *T verrucosum*을 제외한 *Trichophyton*속의 전 균종에서 약 1,000 bases 크기의 DNA가 공통적으로 관찰되었다.

AP-2 primer를 이용하여 DNA를 검출하였던 결과는 Fig 3 및 Table 5에서와 같다. *Trichophyton*속 균 중 *T mentagrophytes* 4주에서 용모형인 대조주 (ATCC 9533)와 분리주 중 분말형 주 및 과립형 주에서 동일하게 크기가 약 200, 350, 650, 800, 1,300 bases인 5개의 DNA가 관찰되었으며, 분리주 중 도실형 주에서는 약 200, 450, 600, 850, 1,000, 1,100, 1,400 bases 크기의 7개 DNA가 관찰되었다. 따라서 AP-2 primer에 의하여 증폭된 도실형 분리주의 DNA band의 pattern이 타 분리주 및 대조주와

상이한 것으로 확인되었다. *T rubrum* 2주에서는 대조주 (IFO 6204)와 분리주에서 동일하게 약 500, 1,000, 1,500 bases 크기인 3개의 DNA가 관찰되었다. *T raubitschekii* 분리주 1주에서 약 200, 300, 550, 700, 1,100, 1,900 bases 크기의 6개, *T tonsurans* 분리주 1주에서는 약 200, 300, 450, 550, 700, 1,100, 1,900 bases 크기의 7개가 관찰되었다. *T equinum* 분리주 1주에서 약 100, 850 bases 크기의 2개, *T ajelloi* 분리주 1주에서는 약 100, 350, 400, 500, 650, 850, 900, 1,100, 1,200, 1,400, 1,500 bases 크기의 11개, *T verrucosum* 분리주 1주에서는 약 250, 300, 450, 500, 650, 700, 1,100 bases 크기의 7개가 관찰되었다.

*Microsporium*속 균 중 *M. cookei*에서 약 350, 650, 850, 1,100, 1,150, 1,400 bases 크기의 6개, *M nanum*에서 약 350, 450, 500, 900, 1,000, 2,000 bases 크기의 6개, *M gypseum* 대조주 (ATCC 9083) 1주와 분리주 1주에서는 약 400, 450, 500, 850, 1,400 bases 크기의 5개가 관찰되었다.

한편 *Trichophyton*속 및 *Microsporium*속 균 중 특정 균종에서 유일하게 관찰되는 DNA로서 *T ajelloi*에서 1,200 bases, *T verrucosum*에서 250 bases, *M cookei*에서 1,150 bases, *M nanum*에서 2,000 bases의 DNA가 인정되었다. 또한 특징의 2 균종에서만 관찰되는 DNA로서 *T rubrum*과 *M nanum*에서 1,000 bases, *T rubrum*과 *T ajelloi*에서 1,500 bases, *T raubitschekii*와 *T tonsurans*에서 550 bases

및 1,900 bases, *T equinum*과 *T ajelloi*에서 100 bases, *T ajelloi*와 *M gypseum*에서 400 bases, *T ajelloi*와 *M nanum*에서 900 bases의 DNA가 인정되었다.

### 고 찰

최근에 진균 감염증의 원인체 진단에 있어서 유전자의 검출이 가능한 restriction fragment-length polymorphism analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, PCR 등의 분자생물학적 기법이 활용되고 있다<sup>6</sup>. 이와 같은 분자생물학적 진단의 재료로서 일차적으로 순수하게 분리된 곰팡이 DNA가 요구된다. 즉, DNA에 혼입되는 다당체는 PCR, restriction endonuclease digestion, ligation 등에 있어서 방해 요소가 된다<sup>8-10</sup>. 하지만 곰팡이 세포의 구성 성분으로 존재하는 다당체가 흔히 대량으로 DNA 추출물에 혼입되므로, 비교적 크기가 큰 곰팡이 DNA를 순수 분리함에 어려움이 많다. 따라서 곰팡이 균체로부터 다당체, 단백질 등을 제거하고 순수한 DNA를 분리하고자 여러 가지 방법이 이용되고 있으나, 액체 질소를 이용한 곰팡이 균체 냉동, phenol-chloroform에 의한 추출 등이 전제되어 있다. 또한 Liu 등<sup>5</sup>은 균체를 파괴시켜 DNA를 추출하고자 주사기로 균체 부유액을 수회 반복 통과시키는 방법을 제시하고 있으나 그 효과는 낮은 것으로 생각된다.

본연구에서는 *Trichophyton* 및 *Microsporium*속 균에 대하여 Raina와 Chandlee<sup>3</sup>가 제시하였던 곰팡이 (*Sclerotinia homoeocarpa*)의 DNA 추출과정 중 액체질소를 이용한 균체 냉동방법 대신에 동결건조 방법을 적용한 후 마쇄시켰으며, DNA 분리 시에 통상적으로 이용되는 phenol-

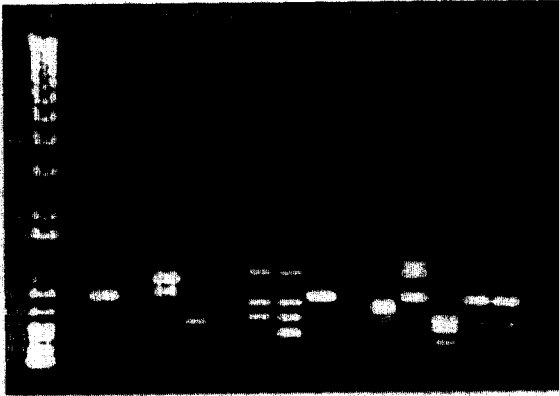


Fig 3. DNAs fragments amplified from 15 strains of *Trichophyton* and *Microsporium* spp. by PCR using arbitrary primer AP-2 on 0.6% agarose-gel: 1, *T mentagrophytes* (downy type, ATCC 9533); 2, *T mentagrophytes* (powdery type); 3, *T mentagrophytes* (granular type); 4, *T mentagrophytes* (purple-red type); 5, *T rubrum* (IFO 6204); 6, *T rubrum*; 7, *T raubitschekii*; 8, *T tonsurans*; 9, *T equinum*; 10, *T ajelloi*; 11, *T verrucosum*; 12, *M cookei*; 13, *M nanum*; 14, *M gypseum* (ATCC 9083); 15, *M gypseum*; M, 1 kb DNA plus marker (GibcoBRL).

Table 5. Numbers and sizes determined from DNAs amplified from 15 strains of *Trichophyton* and *Microsporium* spp. by PCR using arbitrary primer AP-2

Strains (Morphological types)	Strains	Numbers of DNA bands	Approximate Sizes of DNA bands (bases)
<i>T mentagrophytes</i> (downy type)	ATCC 9533	5	200, 350, 650, 800, 1,300
<i>T mentagrophytes</i> (powdery type)	Isolate	5	200, 350, 650, 800, 1,300
<i>T mentagrophytes</i> (granular type)	Isolate	5	200, 350, 650, 800, 1,300
<i>T mentagrophytes</i> (purple-red type)	Isolate	7	200, 450, 600, 850, 1,000, 1,100, 1,400
<i>T rubrum</i>	IFO 6204	3	500, 1,000, 1,500
<i>T rubrum</i>	Isolate	3	500, 1,000, 1,500
<i>T raubitschekii</i>	Isolate	6	200, 300, 550, 700, 1,100, 1,900
<i>T tonsurans</i>	Isolate	7	200, 300, 450, 550, 700, 1,100, 1,900
<i>T equinum</i>	Isolate	2	100, 850
<i>T ajelloi</i>	Isolate	11	100, 350, 400, 500, 650, 850, 900, 1,100, 1,200, 1,400, 1,500
<i>T verrucosum</i>	Isolate	7	250, 300, 450, 500, 650, 700, 1,100
<i>M cookei</i>	Isolate	6	350, 650, 850, 1,100, 1,150, 1,400
<i>M nanum</i>	Isolate	6	350, 450, 500, 900, 1,000, 2,000
<i>M gypseum</i>	ATCC 9083	5	400, 450, 500, 850, 1,400
<i>M gypseum</i>	Isolate	5	400, 450, 500, 850, 1,400

chloroform 추출과정을 생략하였다. 그 결과 다당체, 단백질, RNA 등이 거의 제거된 순수한 DNA를 균일하게 얻을 수 있었다. 따라서 취급하기에 어려움이 있는 액체 질소나 독성이 있는 phenol의 사용을 배제하면서 *Trichophyton* 및 *Microsporum*속 균의 DNA를 순수하게 분리할 수 있는 효과적인 방법이었다.

피부사상균으로부터 DNA를 검출하기 위하여 Liu 등<sup>4</sup>이 제시하였던 arbitrary primer인 AP-1을 사용하여 PCR을 실시하였을 때, *T. mentagrophytes* 4주에서 형태학적으로 용모형인 ATCC 9533주, 분리주 중 분말형 (powdery type) 주 및 과립형 (granular type) 주에서 각각 동일한 크기의 DNA 5개가 관찰되어 DNA pattern이 일치하였다. 반면에 분리주 중 도실형 주에서는 이 5개 외에도 크기가 약 1,200-2,000 bases 범위의 4개의 DNA가 더 관찰됨으로써 DNA pattern이 상이하였다. 이와 같이 도실형 주에서 확인된 DNA pattern의 차이가 형태학적인 표현형의 차이를 나타낸 요인의 하나인 것으로 미루어 생각할 수 있겠으나, 도실형 주에서만 DNA pattern의 상이점이 있는 것은 더 추구하고 그 이유가 밝혀져야 하겠다. 한편 전 균주에서 일부 유사한 크기의 DNA와 함께 균종별로 다양한 크기와 숫자의 DNA가 관찰되었던 바, 전반적으로 볼 때 DNA pattern에 따른 *Trichophyton* 속 및 *Microsporum* 속의 균종 구별이 가능할 것으로 생각되었다. 특히 특정 균종에서 유일하게 관찰되는 DNA로서 *T. rubrum*에서 1,900 bases, *T. raubitschekii*에서 950 bases 및 1,100 bases, *T. equinum*에서 2,100 bases, *T. verrucosum*에서 400 bases, *M. gypseum*에서 1,150 bases의 DNA가 인정되었던 바, 이 DNA band 상에 의하여 타 균종으로부터 이들 균종의 감별이 가능할 것으로 생각되었다.

Liu 등<sup>5</sup>의 arbitrary primer인 AP-2를 사용하여 DNA를 검출하였을 때에도 *T. mentagrophytes* 4주에서 도실형 주는 용모형인 ATCC 9533 주, 분리주 중 분말형 주 및 과립형 주와 상이한 DNA pattern을 나타내었는데, 그 이유에 관하여 추후 더 규명되어야 할 것이다. AP-2 primer에 의하여도 균종별로 다양한 크기와 숫자의 DNA가 관찰되었던 바, DNA pattern에 따른 *Trichophyton* 속 및 *Microsporum*속의 균종 구별이 가능할 것으로 생각되었다. 또한 특정 균종에서 유일하게 관찰되는 DNA로서 *T. ajelloi*에서 1,200 bases, *T. verrucosum*에서 250 bases, *M. cookei*에서 1,150 bases, *M. nanum*에서 2,000 bases의 DNA가 인정되어, 이 DNA 상에 의하여 타 균종으로부터 이들 균종의 감별이 가능할 것으로 생각되었다.

한편 이와 같이 특정 균종에서만 관찰되는 DNA band를 이용하여 균종을 감별함에 있어서, 유사한 크기의

DNA가 타 균종에서도 출현하기 때문에 다소 세심한 관찰이 필요할 것으로 생각된다. 따라서 특정 균종에서만 관찰되는 DNA를 대상으로 하여 추후 그 염기서열 및 타 균종과의 염기서열의 동질성 여부를 조사하여 균종별로 특이성이 있는 DNA가 선별될 때, 그 DNA를 증폭시킬 수 있는 PCR법이 개발될 수 있을 것이다.

## 결 론

동물에서 발생하는 피부사상균증을 조기에 특이적으로 진단할 수 있는 polymerase chain reaction (PCR) 법의 개발을 위한 연구의 일환으로서, 수종의 *Trichophyton* 및 *Microsporum*속 균을 대상으로 PCR을 수행하여 균종에 따라 검출되는 DNA 성상의 차이 및 감별 가능성을 밝히고자 연구를 수행하여 그 결과를 얻었다. 따라서 이 연구의 결과를 추후 각종 피부사상균으로부터 특정한 DNA band만을 검출할 수 있는 PCR 진단법의 개발을 위한 기초 자료로 제시하고자 한다.

*Trichophyton* 및 *Microsporum*속 균의 DNA 분리를 위한 균사체 파괴 방법으로 균사체에 대하여 동결건조 및 초자봉에 의한 마쇄 방법을 적용하였을 때, 이후의 DNA 분리 시에 통상적인 phenol-chloroform 추출과정을 배제하였음에도 순수한 DNA를 분리할 수 있었다. *Trichophyton* 및 *Microsporum*속 균의 DNA 검출을 위한 PCR 조건으로서 94°C에서 5분간 preheating 1회, 35회전의 94°C에서 1분간 denature, 38°C에서 1분간 annealing 및 72°C에서 2분간 polymerization 및 72°C에서 5분간 extension 1회 반응이 적합하였다.

Arbitrary primer AP-1 및 AP-2에 의한 PCR 시에 전 균주에서 일부 유사한 크기의 DNA와 함께 균종별로 다양한 크기와 숫자의 DNA가 관찰되었던 바, *Trichophyton* 속 및 *Microsporum*속의 균종에 따른 DNA pattern의 차이가 인정되었다. AP-1 primer에 의하여 특정 균종에서만 유일하게 관찰되는 DNA로서 *T. rubrum*에서 1,900 bases, *T. raubitschekii*에서 950 bases 및 1,100 bases, *T. equinum*에서 2,100 bases, *T. verrucosum*에서 400 bases, *M. gypseum*에서 1,150 bases의 DNA가 인정되었다. 또한 AP-2 primer에 의하여 특정 균종에서 유일하게 관찰되는 DNA로서 *T. ajelloi*에서 1,200 bases, *T. verrucosum*에서 250 bases, *M. cookei*에서 1,150 bases, *M. nanum*에서 2,000 bases의 DNA가 인정되었다.

## 참고문헌

1. Carter GR and Cole JR. Diagnostic procedures in

- veterinary bacteriology and mycology. Academic Press, Inc 5th edn, Toronto, 381-404, 1994.
2. Schmidt A. Diagnostic results in animal dermatophytoses. *J Vet Med B*, 43, 539-543, 1996.
  3. Raina K and Chandlee JM. Recovery of genomic DNA from a fungus (*Sclerotinia homoeocarpa*) with high polysaccharide content. *Biotechniques*, 21, 1030-1032, 1996.
  4. Liu D, Coloe S, Pedersen J and Baird R. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to differentiate *Trichophyton* dermatophytes. *FEMS Microbiology letters*, 136, 147-150, 1996.
  5. Liu D, Coloe S, Baird R, et al. Rapid differentiation of *Microsporum* dermatophytes based on arbitrarily primed PCR amplification. *Opportunistic Pathogens*, 9, 3-6, 1997.
  6. Mitchell JJ, Roberts PJ and Moss ST. Sequence or structure? a short review on the application of nucleic acid sequence information to fungal taxonomy. *Mycologist*, 9, 67-75, 1995.
  7. Kac G. Molecular approaches to the study of dermatophytes. *Med Mycol*, 38, 329-336, 2000.
  8. Do N and Adams RP. A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from DNA. *Biotechniques*, 10, 162-166, 1991.
  9. Furukawa K and Bhyavanandan VP. Influences of amniotic polysaccharides on DNA synthesis in isolated nuclei and by DNA polymerase: correlation of observed effects with properties of the polysaccharides. *Biochem Biophys Acta*, 740, 466-475, 1983.
  10. Shioda M and Murakami-Murofushi K. Selective inhibition of DNA polymerase by a polysaccharide purified from slime of *Physarum polycephalum*. *Biochem Biophys Res Commun*, 146, 61-66, 1987.