

## *rpoB* 유전자의 PCR-RFLP를 이용한 *Mycobacterium* 균종 동정의 유용성

미육군 121 병원 진단검사의학과<sup>1</sup>, 서울보건대학 임상병리과<sup>2</sup>

유 경 래<sup>1</sup> · 박 정 오<sup>2</sup>

### Identification of *Mycobacterium* species by *rpoB* Gene PCR-RFLP

Kyong-Nae Yu<sup>1</sup> and Chung-Ho Park<sup>2</sup>

Department Pathology 121st General Hospital U.S. Army, Seoul 96205-0017, Korea<sup>1</sup>

Department of Biomedical Laboratory Science, Seoul Health College, Sungham 461-713, Korea<sup>2</sup>

Although *Mycobacterium tuberculosis* complex strains remain responsible for the majority of diseases caused by mycobacterial infections worldwide, the increase in HIV infections has allowed for the emergence of other non-tuberculous mycobacteria as clinically significant pathogens. However, *Mycobacterium* species has a long period of incubation, and requires serious biochemical tests such as niacin, catalase, and nitrate test that are often tedious. The development of rapid and accurate diagnostics can aid in the early diagnosis of disease caused by *Mycobacterium*. The current DNA amplification and hybridization methods that have been developed target several genes for the detection of mycobacterial species such as *hps65*, 16S rDNA, *rpoB*, and *dnaj*. These methods produce rapid and accurate results. In this study, PCR-restriction fragment length polymorphism analysis(PCR-RFLP) based on the region of the *rpoB* gene was used to verify the identification of non-tuberculosis *Mycobacterium* species. A total of 8 mycobacterial reference strains and 13 clinical isolates were digested with restriction enzymes such as *Msp* I in this study. The results of using this process clearly demonstrated that all 13 specimens were identified by *rpoB* gene PRA method. The PCR-RFLP method based on the *rpoB* gene is a simple, rapid, and accurate test for the identification of *Mycobacterium*.

**Key words** : PCR-restriction fragment length polymorphism analysis *rpoB* gene, *Msp* I

## I. 서 론

*Mycobacterium* 속 균종 중에서 결핵균은 전 세계적으로 심각한 보건상의 문제를 야기하는 병원성이 강한 균종이다(김 등, 2002; Fitzgetrald 등, 2003). 1980년대 이후

부터는 비결핵 *Mycobacteria* 감염증이 계속해서 증가되고 있다(Guthertz 등, 1998; Ruiz 등, 2002). 이들은 항산성, 호기성으로 일부 균주를 제외하고는 매우 느리게 성장하는 균종들로써 약 70여 종의 다른 종으로 구성되어 있으며 이중 30여 종이 인간에게 각종 심각한 질환을 야기한다고 보고 되고 있다(Cloud 등, 2002; Collins 등, 2003).

전통적인 방법은 균주의 성장속도, 색조, 균주 형태, 현미경적 형태 관찰 및 생화학적인 검사를 시행한다(Shinners

교신저자 : 유경래, (우)96205-0017 미육군 121 병원  
진단검사의학과  
Tel : 011-9004-2502  
E-mail : ryoukr@nate.com

등, 1999). Niacin, catalase, nitrate 등을 이용한 생화학적 인 방법은 균분리 이후 4~6주의 시간이 소요된다 (Collins 등, 1990). 그러나 결핵균의 신속한 동정법이 개발됨에 따라 *Mycobacteria*를 동정하는 전통적인 방법은 그 효용이 감소되고 있다. 현재 결핵균을 동정하는 모든 검사실은 신속한 동정법을 이용하도록 권고되고 있다. 신속한 동정법으로는 DNA probe 이용, PCR, DNA sequencing, 그리고 chromatography와 같이 균의 구성성분을 물리화학적 방법으로 직접 검출하는 법이 있다(김 등, 2002; Bannantine 등, 2002; Huard 등, 2003). BACTEC 12B system은 p-nitroacetyl-p-aminohydroxy-propionophenone(NAP)을 이용하여 *Mycobacterium tuberculosis*(MTB) complex와 nontuberculosis *Mycobacterium* (NTM)를 5~6일 만에 감별할 수 있다(Alcaide 등, 2003). 결핵균의 신속한 동정법이 개발됨에 따라 전통적인 동정법은 그 효용이 감소되고 있다. 현재 결핵균을 동정하는 모든 검사실은 신속한 동정법을 이용하도록 권고되고 있다. BACTEC 12B system은 NAP을 이용하여 TB complex와 NTM를 5~6일 만에 감별할 수 있다. 그러나 일부 NTM도 NAP에 의하여 억제될 수 있으므로 probe나 생화학적인 방법으로 확인하여야 한다.

최근 DNA 증폭기술의 발달로 개발된 분자유전 검사법은, *Mycobacterium* 균속 내 여러 부위의 특이적인 특정 유전자를 이용하여 보다 빠르고 정확한 진단을 위한 유전자 증폭 및 probe hybridization, 염기서열분석 등과 같은 여러 검사방법이 시도되고 있다(Kim 등, 1997). 이와 같은 진단법에 이용되는 표적유전자(target gene)에는 *hsp65*, 16S rRNA, 그리고 *dnaj* 등 여러 유전자들이 사용되고 있다(Lee 등, 1998; Kim 등, 1999; Lee 등, 2000; Braccolo 등, 2003). 하지만 이들의 방법은 결과가 정확하고 반복적이라는 장점이 있지만 고난이도의 기술과 여러 가지의 효소처리로 분석이 쉽지 않은 단점들도 있다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 대상

2005년 6월부터 8월 사이에 삼광의료재단 검사실에 의뢰된 임상 검체로부터 분리 배양된 *Mycobacteria* 13주와 한국결핵연구원(KIT)으로부터 분양한 표준균주 7주 (Table 1), 총 20주에 대하여 분석하였다. 13주의 임상분

**Table 1.** Reference strains of mycobacterial species used in this study

Species	Strain	Source
<i>M. avium</i>	ATCC <sup>a</sup> 25291	KIT <sup>b</sup>
<i>M. chelonae</i>	ATCC 35749	KIT
<i>M. goodii</i>	ATCC 14470	KIT
<i>M. kansasii</i> type I	Pasteur institute	KIT
<i>M. smegmatis</i>	ATCC 19420	KIT
<i>M. celatum</i> type I	ATCC 51130	KIT
<i>M. abscessus</i>	Pasteur institute	YUMC <sup>c</sup>
<i>M. tuberculosis</i>	ATCC 27294	KIT

<sup>a</sup>ATCC, American type culture collection

<sup>b</sup>KIT, Korea institute of tuberculosis

<sup>c</sup>YUMC, Yonsei university college of medicine

리주는 생화학적 검사로 균 동정을 확인하였다. 각 균주는 전통적인 감별 방법인 Niacin strip test와 Gen-Probe test을 실행하여 결핵균의 여부를 재평가하였으며, 불일치 균주에 대해서는 PCR을 통한 확인 실험을 실시하였다.

### 2. 핵산추출과 중합효소연쇄반응

PCR 증폭을 위한 유전자 준비는 가열파쇄 유전자 추출법을 사용하여 DNA를 추출하였다. Lowenstein-Jensen medium에서 배양된 균주의 집락을 증류수 400 µL와 screw-cap microcentrifuge tube에 넣어 5분간 boiling 하여 균체를 파쇄 하였다. 균파쇄액은 12000 rpm으로 5분간 원심분리하고 DNA가 함유된 상청액 100 µL를 상청액을 PCR에 사용하였다.

마이코박테리아 균종들의 *rpoB* 유전자를 증폭하기 위한 프라이머는 *rpoB* 유전자 염기서열(GenBank accession No. P47766) 내의 첫 번째 과변부위(V1)와 두 번째 상보적 부위(conserved region2; C2) 중 대장균(*Escherichia coli*)의 유전적 정보를 바탕으로 V1의 171 bp와 C2의 189 bp 부위에 해당하는 부분을 표적으로 하여 제작하였다. 한 쌍의 프라이머는 5'-TCAAGGAGAAGCCGTACGA-3'(RPO5')와 5'-GGATGTTGATCAGGTCTGC-3'(RPO3')로 유전자 내 902번째 염기에서부터 1261번째 염기까지 360 bp를 증폭하였다. PCR 반응은 10 pmol의 각각의 primer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM deoxynucleoside triphosphate, 1 U의 DyNAzyme I DNA polymerase(FINNZYMESY, Espoo, Finland)가 들어있는 DNA PCR Premix(M&D, Wonju,

Korea)를 이용하여 genomic DNA 10  $\mu$ L와 멸균증류수 40  $\mu$ L를 혼합하여 최종 부피가 50  $\mu$ L가 되도록 혼합물을 만들었다.

첫 번째 pre-denaturation 과정은 94°C에서 5분 실시 후에, denaturation 94°C 20초, annealing 58°C 20초, elongation 72°C 30초로 35회 반복하였으며, 최종 elongation 72°C에서 10분간 실시하였다. Thermocycler는 model 2700 PCR system(Aplied Biosystem, Fostercity, CA)가 사용되었다. 각 PCR 과정에서 positive, negative control, PCR size maker(M&D, Wonju, Korea)를 항상 사용되었다. 양성 대조로는 *M. bovis* 표준균주를 PCR mixture에 사용하였고, 음성대조로 증류수를 사용하였다. 증폭산물은 2% agarose gel 위에서 전기영동을 한 후에 ethidium bromide(EtBr) 염색을 통해 확인하였다.

### 3. Restriction fragment length polymorphism

마이코박테리움 속 분류를 위하여 위 PCR 증폭산물을 Msp I (Boehringer Mannheim biochemicals, Mannheim, Germany)을 이용하여 소화하고 RFLP 분석을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물 15  $\mu$ L(genomic DNA 1.5  $\mu$ g)에 Msp I (10 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, 10x Msp I buffer 2  $\mu$ L, 멸균된 증류수 2.5  $\mu$ L를 넣어 20  $\mu$ L의 혼합물을 잘 섞어주고, 12,000 rpm에서 3~5초간 원심 분리하고 37°C 항온수조에서 2시간 반응하였다. 2  $\mu$ L의 loading buffer(0.25% bromophenol blue, 40% sucrose)를 각 검체에 첨가한 후, PCR-RFLP DNA size marker(M&D, wonju, Korea)와 함께 4% metaphore agarose gel(FMC Bioproducts, Rockland, Maine)에 잠적한 후에 100 V에서 60~75분간 전기영동 탱크에 얼음을 담아 전기영동 하였다.

Gel을 EtBr 염색한 후, UV transilluminator로 분절편들의 결과를 확인하였다. 결과판독은 *Mycobacteria-Nocardia* 동정 알고리즘(Fig. 4)을 참고하여 균을 동정하였다.

## III. 결 과

### 1. *rpoB* 유전자 증폭 및 제한효소 분절법을 이용한 표준균주 동정

마이코박테리움 동정에 있어서 보다 신속, 정확, 간편한 방법을 개발하기 위하여 여러 표적유전자를 이용한

유전자 증폭법이 연구되어 지고 있다. 여기서 이용한 표적유전자 *rpoB* gene은 유전자 염기서열 분석을 통하여 PCR-RFLP 법으로 마이코박테리움 동정에 적합한 유전자 구간으로 확인되었다.

*rpoB* gene PCR을 통한 *Mycobacterium*의 표준균주에 대한 동정 가능 여부를 확인하기 위하여 대표적인 표준균주 8주(Table 1)에 대하여 DNA 과변부위의 증폭으로 얻어진 산물에서의 다형태적 특성을 기초로 유전자 증폭 효소 분절 분석법을 사용하였다(Fig. 1).



**Fig. 1.** Results of PCR amplification of the *rpoB* gene using mycobacterial reference strains. PCR products were run on a 2% agarose gel. Lanes; M, DNA size marker; 1, *M. avium*; 2, *M. chelonae*; 3, *M. godonae*; 4, *M. kansasii* Type I; 5, *M. smegmatis*; 6, *M. celatum*; 7, *M. abscessus*; N, negative control; P, positive control *M. tuberculosis*.

증폭된 유전자를 효소 분절 분석을 위하여 사용된 Msp I은 이미 *M. tuberculosis*, *M. leprae*, and *M. smegmatis*의 *rpoB* gene 염기서열 분석정보를 통하여 선정되었다. Msp I는 DNA 염기서열 중 5'-C CGG-3', 3'-GGC C-5'에서 forward sequence의 C와 C사이와 상보적인 reverse sequence의 C와 C사이를 sticky형태로 분절시키는 효과가 있다. 효소 처리를 통한 RFLP 분석법에 의하여 표준균주 8주에 대하여 동정한 결과 4% metaphore agarose gel 위에 *Mycobacterium. avium*은 PCR product가 105, 80, 50, 45-bp로 각각 분절되어 *M. avium*만의 고유한 분절편을 형성하여 동정이 가능하였다(Fig. 2, Table 2).

*rpoB* gene으로 항산균 동정의 특이성을 확인한 후 삼광 의료재단의 임상검사실에서 임상검체로부터 분리, 배양, 동정된 임상표준균주 13주에 대해서도 PCR- restriction fragment length ploymorphism analysis (PCR- RFLP) 특이도와 정확도를 빠르고 간편하게 *Mycobacterium* species를 동정할 수 있었다

**Table 2.** PCR-RFLP profiles obtained from reference strains of mycobacteria used in this study

Reference strain of <i>Mycobacterium</i> sp.	Strain	DNA fragment size(bp)	Species identified by PCR-RFLP algorithm
<i>M. avium</i>	ATCC 25291	105, 80, 50, 45	<i>M. avium</i>
<i>M. chelonae</i>	ATCC 35749	105, 95, 80, 50, 40	<i>M. chelonae</i>
<i>M. goodnae</i>	ATCC 14470	175, 80, 45	<i>M. goodnae</i>
<i>M. kansasii</i> type I	Pasteur institute	175, 60, 45, 40	<i>M. kansasii</i> type I
<i>M. smegmatis</i>	ATCC 19420	200, 90	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. celatum</i> type I	ATCC 51130	145, 95, 45	<i>M. celatum</i> type I
<i>M. abscessus</i>	Pasteur institute	105, 95, 80	<i>M. abscessus</i>
<i>M. tuberculosis</i>	ATCC 27294	175, 80, 60, 40	<i>M. tuberculosis</i>



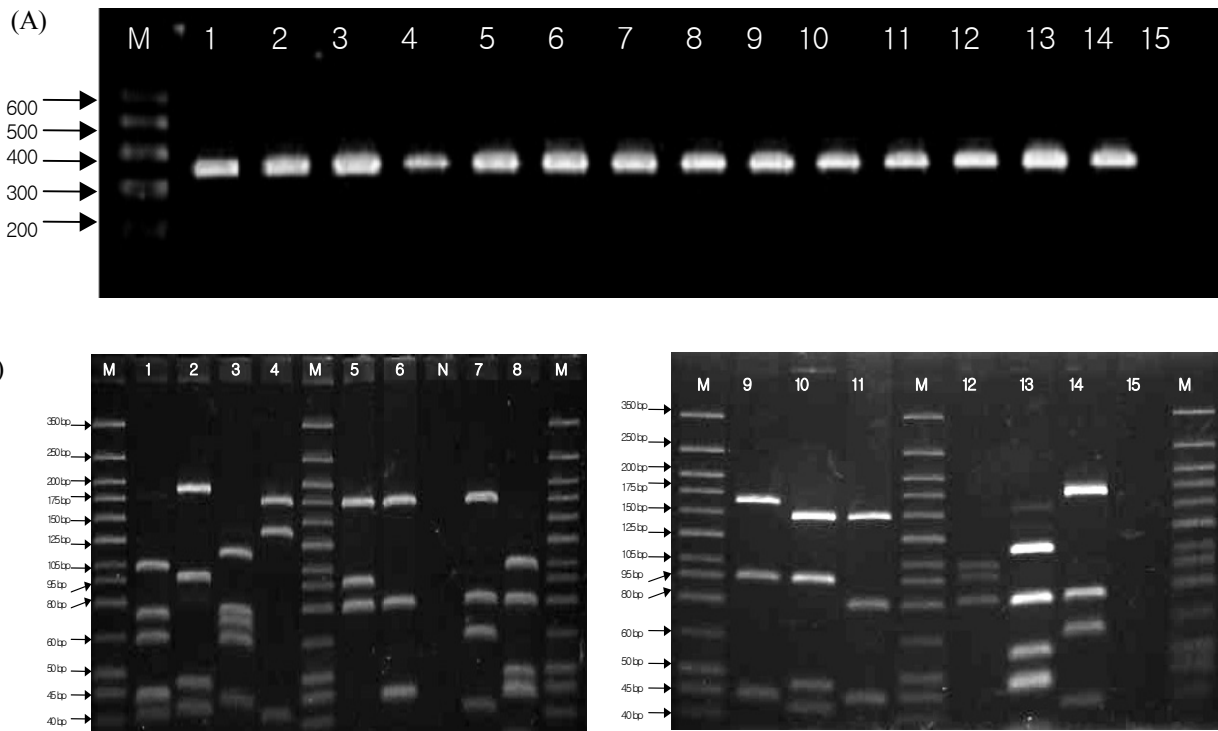
**Fig. 2.** Results of PCR-RFLP analysis of mycobacterial reference strains. A set of PCR primers, RPO5' and RPO3' was used. Amplified DNAs were digested with *Msp* I and run on a 4% metaphore agarose gel. Lanes: M, PCR-RFLP size marker; 1, *M. avium*; 2, *M. chelonae*; 3, *M. goodnae*; N, negative control; 5, *M. kansasii* Type I; 6, *M. smegmatis*; 7, *M. celatum*; 8, *M. abscessus*; P, positive control, *M. tuberculosis*

이와 같은 결과는 단일 효소 *Msp* I을 이용한 PCR-RFLP 방법으로 임상검사실에서 분리되어지는 거의 모든 항산균을 분리 동정 할 수 있는 것을 확인하였다(Fig. 3, Table 3).

#### IV. 고 찰

*Mycobacteria*의 배양과 동정은 성장이 매우 느리고 각 균명을 정확히 동정하는 데 많은 시간과 노력이 소요되어, *mycobacteria* 감염증 치료에 적절한 검사정보를 제공하지 못하고 있다. 특히 최근에 증가되는 AIDS 환자와 비결핵성 *mycobacteria* 감염증과의 연관성이 밝혀짐에 따라(Guthertz 등, 1998), *Mycobacterium*의 균속 동정에 더욱더 많은 연구가 필요되고 있다. 이러한 이유로 보다 신속하고 정확한 방법으로 *mycobacteria*를 동정하고자하는 연구가 진행되어 여러 가지 검사법이 소개되었다. 제한효

소와 DNA probe를 이용한 방법(Collins 등, 1990), 각 균종에 특이적으로 반응하는 *mycobacteriophage* 기법(Alcaide 등, 2003), DNA sequencing 법(Cloud 등, 2002), 그리고 PCR-RFLP 법(Kim 등, 1999; 김 등, 2002) 등이 소개되었으며, 이 중 DNA sequencing 법은 표준검사법으로 정착하고 있고 PCR-RFLP 법은 임상검사로 정착하고 있다. 최근에는 real-time PCR 법(Brocicolo 등, 2003)이 연구되고 있어 보다 쉽고 정확하게 *mycobacteria* 균속을 동정할 수 있게 될 것이다. 분자유전학적인 방법으로 *mycobacteria* 균속의 동정을 하기 위해서는 각 균종 간 변이가 심한 유전자를 선택하는 것이 중요하다. 전통적으로는 16S rDNA 유전자가 많이 사용되었다(Cloud 등, 2002) 그리고 *rpoB* 유전자(Kim 등, 1999) 등이 시도되었으며 PCR-RFLP 분석을 위해서는 *rpoB* 유전자가 가장 많이 이용되고 있다(Lee 등, 2000; 김 등, 2002). RFLP 분석에서 제한효소의 선택은 검사의 특이도를 결정하는 가장



**Fig. 3.** PCR-RFLP analysis using *rpoB* gene for species identification of clinical isolates of mycobacteria. (A). Clinical isolates of mycobacteria were used for PCR amplification using primers RPO5' and RPO3'. PCR products were run on a 2% agarose gel. M, DNA size marker; Lane M, M&D PCR DNA size marker, lanes 1-14, clinical isolates of mycobacteria, lane 15, negative control. (B), PCR-RFLP analysis of PCR products shown in (A). *Msp* I digestion of PCR products were run on a 4% metaphore agarose gel. Lane M, M&D PCR-RFLP DNA size marker, lanes 1-14, clinical isolates of mycobacteria, lane 15. negative control.

**Table 3.** PCR-RFLP profiles obtained from clinical isolates of mycobacteria used in this study

Species identified by biochemical test	DNA fragment size(bp)	Species identified by PCR-RFLP algorithm
<i>M. ulcerans</i>	105, 70, 60, 42, 40	<i>M. ulcerans</i>
<i>M. kansasii</i> type II	195, 80, 70, 60	<i>M. kansasii</i> type II
<i>M. malmoense</i>	110, 75, 70, 60, 45	<i>M. malmoense</i>
<i>M. cleatum</i> type II	175, 140, 42	<i>M. cleatum</i> type II
<i>M. intracellulare</i> type II	150, 100, 80	<i>M. intracellulare</i> type II
<i>M. gordonae</i> IV	175, 80, 45	<i>M. gordonae</i> IV
<i>M. tuberculosis</i>	175, 80, 60, 40	<i>M. tuberculosis</i>
<i>M. avium</i>	105, 80, 50, 45	<i>M. avium</i>
<i>M. godonae</i> type III	160, 95, 45	<i>M. godonae</i> type III
<i>M. celatum</i> type I	150, 95, 47, 42	<i>M. celatum</i> type I
<i>M. gordonae</i> type II	150, 80, 45	<i>M. gordonae</i> type II
<i>M. abscessus</i>	190, 120, 42, 40	<i>M. abscessus</i>
<i>M. avium</i>	105, 80, 50, 45	<i>M. avium</i>
<i>M. tuberculosis</i>	175, 80, 60, 40	<i>M. tuberculosis</i>

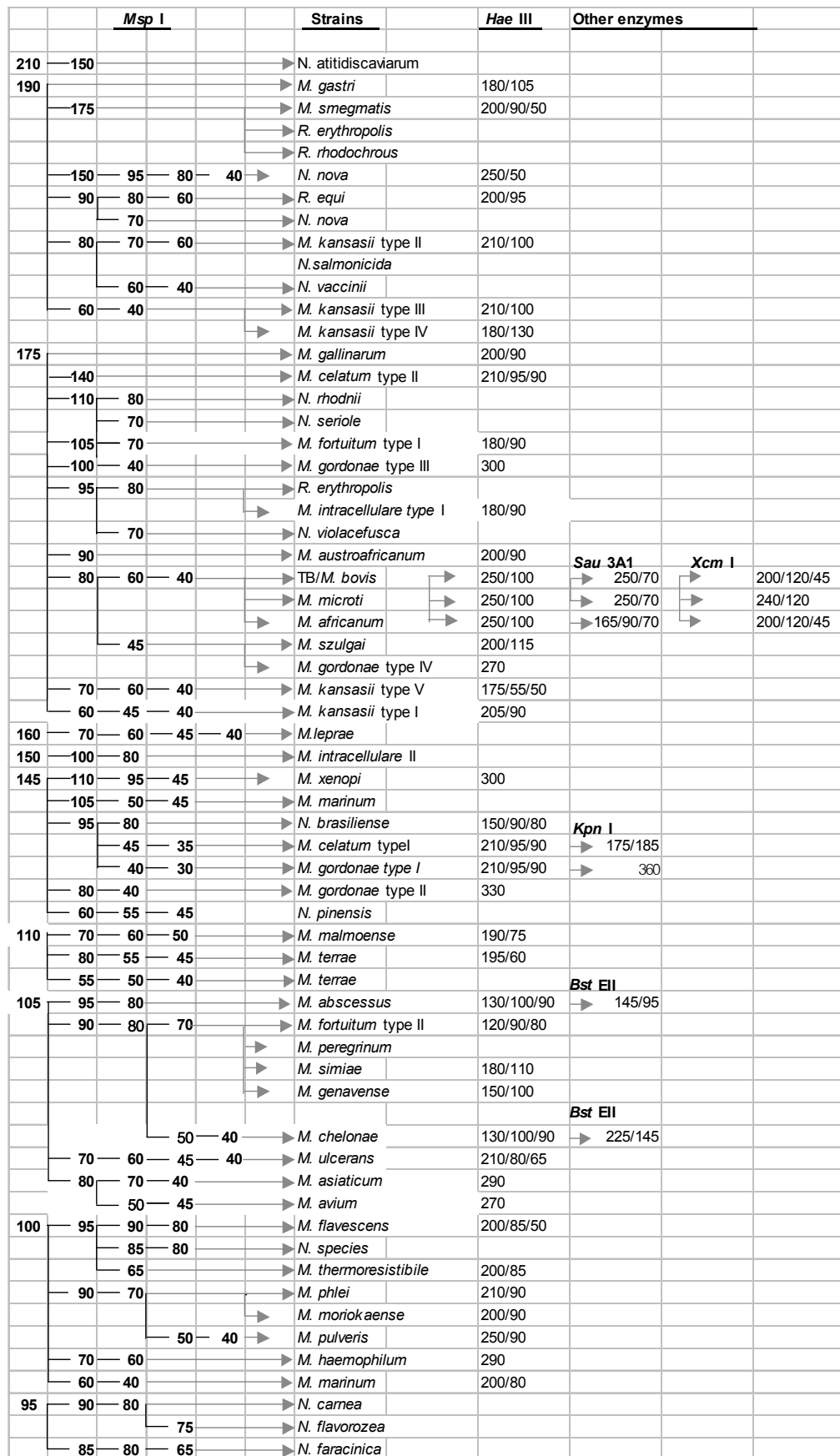


Fig. 4. The algorithm used the species identification of mycobacteria in this study(Lee, 등, 2000)

중요한 변수이다. *rpoB* 유전자의 각 균종 간 변이가 많은 부위에 *Msp I* 제한효소 자리가 분포하여 *Mycobacterium* 균종 간 차이를 잘 표현하는 것으로 알려졌다(Lee 등, 2000). *Msp I*는 DNA 염기서열 중 5'-C/CGG-3' 부위의 C와 C사이를 sticky 형태로 분절시킨다. 본 연구에서 임상 검체에서 가장 흔하게 분리되는 8종의 *Mycobacterium* 표준균주는 상호 교차반응이나 해석상의 어려움이 없이 정확하게 감별되었다. 또한 13주의 임상균주도 동일한 성적을 보였다. Kim 등(1999), Lee 등(2000), 그리고 김 등(2002)의 결과와 큰 차이가 없었으며 현재 임상검사실에서 결핵균 동정진단에 가장 널리 사용되고 있는 방법은 Gen-Probe로 전통적인 방법인 niacin 시험보다 빠르고 정확하다고 평가되고 있다. 그러나 비용이 많이 들고 비결핵균성 mycobacteria의 감별에는 적용하기가 어려워 *M. tuberculosis*와 NTM과의 감별검사로만 사용되고 있는 실정이다. 따라서 여러 검사실에서 NTM의 감별동정을 위해 검사를 참고검사실(reference laboratory)로 의뢰하는 실정이다.

*rpoB* 유전자를 대상으로 하는 PCR-RFLP 방법은 최근 Kit system으로 개발되면서 검체 및 시약조작의 편의성, 결과의 정확성 및 재현성을 높여서 임상검사실에서 분리된 결핵균 집락을 이용하여 쉽게 이용할 수 있도록 하였다. 이 방법은 앞으로 임상검사실에서도 NTM 동정에 쉽게 적용될 것으로 기대된다. 검체로부터 직접 PCR-RFLP를 적용하여 mycobacteria를 동정하는 방법을 적용하면, 상재균으로 인하여 해석상 문제가 생기는 검체를 제외하고는, 매우 유용한 적용방법이 될 것으로도 기대한다.

## 참 고 문 헌

- Alcaide F, Gali N, Dominguez J, Berlanga P, Blanco S, Orus P, Martin R. Usefulness of a New Mycobacteriophage-Based Technique for Rapid Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. *J Clin Microbiol* 41:2867-2871, 2003.
- Bannantine JP, Baechler E, Qing Z, LingLing Li, Kapur V. Genome Scale Comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* Reveals Potential Diagnostic Sequence. *J Clin Microbiol* 40:1303-1310, 2002.
- Broccolo F, Scarpellini P, Locatelli G, Zingale A, Brambilla AM, Cichero P, Sechi L A, Lazzarin A, Lusso P, Maltati MS. Rapid diagnosis of Mycobacterial Infections and Quantitation of *Mycobacterium tuberculosis* Load by Two Real-Time Calibrated PCR assay. *J Clin Microbiol* 41:4565-4572, 2003.
- Cloud JL, Neal H, Rosenberry R, Turenne CY, Jama M, Hillyard DR, Carroll KC. Identification of *Mycobacterium* spp. by using a Commercial 16S Ribosomal DNA Sequencing Kit and Additional Sequencing Libraries. *J Clin Microbiol* 40:400-406, 2002.
- Collins DM, Gabric DM, de Lisle GW. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease and DNA hybridization *J Clin Microbiol* 28:1519-1596, 1990.
- Collins DM, Zoete MD, Cavaignac SM. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Strains from Cattle and Sheep can be distinguished by a PCR test based on a Novel DNA Sequence difference. *J Clin. Microbiol* 40:4760-4762, 2002.
- Fitzgetrald SD, Zwick LS, Berry DE, Church SV, Kaneene JB, Reed WM. Experiential inoculation of pigeons(*Columba livia*) with *Mycobacterium bovis*. *Avian disease* 47:470-474, 2003.
- Guthertz LS, Damasker B, Bottone EJ, Ford EG, Midura TF, Janda JM. *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infection in patients with and without AIDS. *J Infect Dis* 160:1037-1041, 1998.
- Huard RC, Lazzarini LC de O, Butler WR, Sooligen DV, Ho JL. PCR-Based method to differentiate subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex on the Basis of Genomic Deletions. *J Clin Microbiol* 41:1637-1650, 2003.
- 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 the RNA Polymerase gene(*rpoB*). *J Clin Microbiol.* 37:1714-1720, 1999.
- Kim BJ, Lee SH, Lee MA, Lyu SJ, Kim GH, Bai SJ, Kim GT, Chae EC, Kim CY, Cha, KooK YH.

- Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J Clin Microbiol* 37:1724-1720, 1990.
12. Lee, HY, Park HJ, Cho SN, Bai GH, Kim SJ. Species Identification of Mycobacteria by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism of the *rpoB* Gene. *J Clin Microbiol* 38:2966-2971, 2000.
  13. Lee H, Cho SH, Bang HE, Lee JH, Bae GH, Kim SJ, Kim JD. Molecular analysis of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from Korea by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism sequence analysis. *Int J Tuberc lung dis* 2:585-589, 1998
  14. Kim bj, Kim SY, Park BH, Lyu MA, Park IK, Bai GH, KIm SJ, Cha CY, Kook YH. Mutations in the *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis* that interfere with PCR-single-strand conformation polymorphism analysis for rifampin susceptibility testing. *J Clin Microbiology* 35(2):492-494, 1997.
  15. Ruiz. P, gutierrez J, Zerolo J. Cassl M. Geno Type Mycobacterium Assay for identification of Mycobacterial Species Isolated from Human Clinical Samples by Using Liquid Medium. *J Clin Microbiol* 40:3076-3078, 2002.
  16. Shinnors D, Yeager H Jr. Nontuberculous mycobacterial infection; clinical syndromes and diagnosis; overview, In Schollossberg D(ed.). Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections, 4th ed., p341-350, W.B. Sanuders Co. Philadelphia, Pa, 1999.
  17. 김범준, 변경희, 배길한, 김상재, 이근화, 황응수, 차창룡, 국윤호. DT1-DT6 PCR에 의한 국내 분리 *Mycobacterium avium* complex의 감별. *Korean J Bacteriol Virol* 32:33-38, 2002.