



Candida의 항진균제 감수성과 DNA특성

Molecular Characterization of Genomic DNA and Antifungal Susceptibility of Candida albicans

저자
(Authors) 백원기, 서민호
Won-Ki Baek, Min-Ho Suh

출처
(Source) [The Journal of the Korean Society for Microbiology 27\(2\)](#), 1992.4, 173-180 (8 pages)

발행처
(Publisher) [대한미생물학회](#)
The Korean Society For Microbiology

URL <http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE01487575>

APA Style 백원기, 서민호 (1992). Candida의 항진균제 감수성과 DNA특성. The Journal of the Korean Society for Microbiology, 27(2), 173-180.

이용정보
(Accessed) 계명대학교
114.71.5.213
2016/01/08 09:27 (KST)

저작권 안내

DBpia에서 제공되는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, 누리미디어는 각 저작물의 내용을 보증하거나 책임을 지지 않습니다.

이 자료를 원저작자와의 협의 없이 무단게재 할 경우, 저작권법 및 관련법령에 따라 민, 형사상의 책임을 질 수 있습니다.

Copyright Information

The copyright of all works provided by DBpia belongs to the original author(s). Nurimedia is not responsible for contents of each work. Nor does it guarantee the contents.

You might take civil and criminal liabilities according to copyright and other relevant laws if you publish the contents without consultation with the original author(s).

*Candida*의 항진균제 감수성과 DNA 특성

계명대학교 의과대학 미생물학교실

백 원 기 · 서 민 호

= Abstract =

Molecular Characterization of Genomic DNA and Antifungal Susceptibility of *Candida albicans*

Won-Ki Baek and Min-Ho Suh

Department of Microbiology, Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

Twenty-six strains of *Candida albicans* isolated from various clinical specimens were tested for antifungal susceptibility to 5 drugs, amphotericin B (AMB), nystatin (NST), clotrimazole (CTZ), ketoconazole (KCZ) and flucytosine (5-FC).

The range of minimum inhibitory concentration (MIC) of the drugs were as follows: AMB, 0.25-1 µg/ml; NST, 8-32 µg/ml; CTZ, <0.125-4 µg/ml; KCZ, <0.125->128 µg/ml; 5-FC, 8->1024 µg/ml. 90% MICs of the drugs to *Candida albicans* were 0.47 µg/ml for AMB, 1.9 µg/ml for CTZ, 14.9 µg/ml for NST, >128 µg/ml for KCZ and >1024 µg/ml for 5-FC.

Restriction enzyme analysis (REA) using restriction endonuclease *Bam*HI was performed to characterize the genomic DNA of *C. albicans* in molecular aspect.

The resulting gel patterns of REA revealed five intensely stained bands with ethidium bromide (8.7 Kb, 7.6 Kb, 6.6 Kb, 6.0 Kb, 3.6 Kb). These intense band patterns produced three strain types (group A, B and C). Group A had 8.7 Kb, 6.6 Kb, 3.6 Kb bands. Group B had 8.7 Kb, 6.0 Kb, 3.6 Kb bands and group C had 8.7 Kb, 7.6 Kb, 3.6 Kb bands. Among the total 26 strains, 21 strains belonged to group A. Group B had 3 strains and group C consisted of 2 strains.

In order to elucidate the *ras* oncogene expression in *C. albicans*, southern hybridization of *Bam*HI digested *C. albicans* genomic DNA with α -³²P-labeled v-Ha-*ras* probe prepared by nick translation was performed. The v-Ha-*ras* probe was hybridized to *C. albicans* genomic DNA at 4.9 Kb.

Key Words: *C. albicans*, Chromosomal DNA, Restriction enzyme analysis (REA), *Ras* gene.

서 론

*C. albicans*는 구강, 장관 및 질 등에 정상적으로 존재하는 효모양 진균으로서 구강칸디다증, 질칸디다증, 기타 기회감염 등 많은 표재성 및 전신성 감염증을 일으키는 것으로 알려져 있으며^{2,12)}, 특히 근래에 이르러 광범위한 항균제의 빈번한 투여, 장기이식 등에 따른 steroid 등의 면역억제제 사용의 증가, 항암화학요법 및 외과적 수술등으로 암환자들의 증가된 생존율과 이에 따른 병원감염의 증가로 그 중요성

이 더욱 커지고 있다^{23,24)}.

*C. albicans*의 감염시에 사용되는 항진균제로는 polyene계통, imidazole계통, pyrimidine계통 등이 있으며, 이중 polyene계통의 약제로 전신성 칸디다증에 많이 사용되는 amphotericin B (AMB)는 세포막의 sterol과 작용하여 antibiotic-ergosterol complex를 형성하여 세포막의 potassium ion에 대한 투과성을 변화시켜 항균효과를 나타내며, imidazole계통의 ketoconazole은 ergosterol의 합성을 억제함으로 세포막의 투과성을 변화시켜 potassium ion과 phosphorus 함유물질의 누출현상을 일으켜 항균효과를 나타

내는 것으로 알려져 있다^{1,5,12}).

진균에 감염되었을 때에는 원인균을 분리동정하고 항진균제 감수성 검사를 시행한 후 감수성인 약제의 선별사용이 원칙일 것이다. 그러나 현재 항진균제 감수성 검사법은 많은 문제점을 지니고 있는 것으로 지적되고 있으며 특히 표준화된 검사법이 없고, 접종량, 배지의 성분, 배양온도 등에 따라서 항진균제의 성장 억제농도가 많은 차이를 보이고 있다^{5,7}.

현재까지 *Candida*의 역학적 조사방법은 biotyping^{18,32}, 효소 특성검사⁹, killer toxin에 대한 감수성 검사²¹, 배양형태²⁰, 내성양상과 생화학적 성장검사¹⁸, 혈청학적 검사³¹, immunoblotting기술¹⁴과 이들의 조합으로 이루어져 왔으며, 근래 분자생물학의 발달에 힘입어 chromosomal DNA¹⁰, ribosomal DNA¹⁵, mitochondrial DNA²⁸를 추출하여 제한효소 절단상을 비교하거나 DNA탐식자를 이용한 hybridization²³, contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis (CHEF) 등³⁰을 사용한 핵형별 검사가 가능하게 되어 역학조사방법이 크게 발달되고 있다.

본 실험에서는 항진균제 검사법의 표준화에 필요한 기본검사 성적을 제공하고 임상에서의 치료방침 결정에 도움을 주고자 5종의 항진균제에 대한 감수성 검사를 시행하였으며 *C. albicans* genomic DNA의 특성을 분석하고 이와 아울러 분자생물학적 역학조사를 위한 기본자료를 제공하고자 제한효소 *Bam*HI를 이용한 genomic DNA restriction enzyme analysis와 *ras* gene탐식자를 이용한 southern hybridization을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 균주분리 및 동정

1990년 3월부터 12월 사이에 계명대학교 동산의료원의 각종 임상가검물로부터 분리된 yeast form의 균주들을 대상으로 Koneman¹³의 방법으로 혈청에서의 germ tube산생실험, cornmeal agar에서의 chlamydospore산생실험, 각종 당분해실험 등을 시행하여 *Candida albicans*로 동정된 26주를 실험에 사용하였다.

2. 항진균제 감수성 검사

Amphotericin B (E.R. Squibb & Sons, Inc.), flucytosine (Swiss Roche), clotrimazole (한국

바이엘), ketoconazole (대일약품), nystatin (E. R. Squibb & Sons, Inc.) 등 5종의 항진균제를 실험하였다. 각 약제중 clotrimazole (CTZ), nystatin (NST), ketoconazole (KCZ)은 dimethyl sulfoxide에, amphotericin B (AMB)와 flucytosine (5-FC)는 증류수에 각각 용해시킨 후 증류수로 희석하여 사용하였다.

감수성 검사는 Steers²⁷의 multiple inoculator를 이용하여 한천희석법 (agar dilution method)으로 시행하였다. Sabouraud broth에서 균주를 37°C, 18시간 배양한 후 생리식염수로 균수를 10⁶/ml로 희석하고 이를 multiple inoculator로 각 항진균제를 배수희석된 농도로 함유하는 Sabouraud한천평판배지에 접종한 다음 25°C, 48시간 배양한 후 접종부위의 균발육 유무를 보아 항진균제의 최소발육저지농도 (MIC)를 결정하였다.

3. Chromosomal DNA분리 및 제한효소처리

Vazquez³⁰의 방법을 다소 수정하여 chromosomal DNA의 분리를 시행하였다. Sabouraud agar media에서 37°C, 36시간 *C. albicans*를 배양한 다음 단일집락을 5ml YEPD broth (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose)에 접종하여 37°C, 24시간 동안 배양한 균액을 상온에서 5,500 rpm으로 15분간 원심하여 균침사를 얻었다. 얻어진 균침사를 1ml sorbitol solution (0.9M sorbitol, 0.1M Tris-HCl, 0.5M EDTA)으로 부유시킨 후 이를 12,000 rpm으로 원심하여 다시 균침사를 얻어 이를 0.5ml sorbitol solution에 재부유시킨 다음 0.28M β -mercaptoethanol 50 μ l와 zymolyase solution 30 μ l (20 mg/ml in sorbitol solution, Kirin brewery Co.)를 첨가하여 잘 혼합한 후 37°C shaking incubator에 3시간 30분간 둔 후 12,000 rpm으로 20초 원심하고 0.5ml TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)에 재부유하여 50 μ l 10% sodium dodecyl sulfate를 가하고 65°C 항온수조에 20분간 방치한 후 200 μ l 3M potassium acetate를 가하여 잘 혼합한 다음 얼음에 30분 이상 방치하고 이를 12,000 rpm으로 5분간 원심하여 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액에 동량의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) mixture를 가하여 phenol extraction을 시행한 후 2 volume cold absolute ethanol과 0.1 volume 3M sodium acetate를 가하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 200 μ l TE buffer에 녹여 4°C에

보관하면서 사용하였다.

제한효소 처리는 TE buffer에 녹아있는 DNA 4 μ g에 해당하는 volume을 취하여 16U *Bam*HI (BRL제)으로 37°C, 6시간 처리후 10mM EDTA로 반응을 정지시켰으며 제한효소처리된 DNA는 type I gel loading buffer (0.25% BPB, 0.25% xylene cyanol, 40% (w/v) sucrose)를 적당량 첨가한 후 0.8% agarose gel을 이용하여 수평형 전기영동 장치 (Hoefler scientific Co.)로 submarine electrophoresis하였다.

4. Southern hybridization

Southern hybridization은 Sambrook 등²⁵⁾의 방법에 따라 시행하였다. 전기영동된 agarose gel을 denaturation solution (1.5M NaCl, 0.5N NaOH)로 변성시킨 후 neutralizing solution (1.5M NaCl, 1M Tris)로 중화시키고 20×SSC (3M NaCl, 0.3M sodium citrate)로 nitrocellulose (NC) filter에 transfer한 후 공기 중에서 건조시키고 vacuum oven에서 80°C로 90분간 가온하여 고정시켰다. 고정된 NC filter를 prehybridization solution (0.75M NaCl, 0.075M sodium citrate, 0.2% polyvinyl pyrrolidone, 0.2% bovine serum albumin, 0.2% ficoll, 0.1% SDS, 5% salmon sperm DNA 및 50% formamide)으로 42°C에서 20시간 prehybridization을 시행한 후 nick translation kit (BRL제)를 이용하여 ³²P로 표지시켜 특이활성화가 1×10⁸cpm/ μ g이상 되게 한 v-Ha-ras probe를 가하여 만든 hybridization solution으로 42°C 항온수조에서 40시간 반응시킨 후 상온에서 2×SSC (1×SSC; 0.15M NaCl, 0.015M sodium citrate)/0.5% SDS로 10분, 2×SSC/0.1% SDS로 20분 세척하고 0.1×SSC/0.5% SDS로 37°C에서 60분, 0.1×SSC/0.5% SDS로 60°C에서 60분, 0.1×SSC로 실온에서 10분 세척한 후 NC filter를 공기 중에서 건조시키고 강화스크린이 장치된

X-ray용 카세트를 이용하여 영하 70°C에서 X-ray film을 72시간 노출시킨 다음 현상하였다.

성 적

분리된 *C. albicans* 26주의 5종의 항진균제에 대한 감수성 검사결과를 Table 1에 나타내었다. 각 약제의 발육저지농도는, imidazole계 약제 중 clotrimazole은 <0.125 μ g/ml-4 μ g/ml, ketoconazole은 <0.125->128 μ g/ml였으며, nystatin은 8-32 μ g/ml, amphotericin B는 0.25-1 μ g/ml, flucytosine은 8->1024 μ g/ml로 나타났다. 90% 균주의 발육을 저지하는 약제농도인 90% MIC는 amphotericin B 0.47 μ g/ml, clotrimazole 1.9 μ g/ml, nystatin 14.9 μ g/ml였으며 ketoconazole과 flucytosine은 각각 >128 μ g/ml, >1024 μ g/ml로 실험최대약제농도보다 높게 나타났다.

Fig. 1은 *C. albicans*로부터 분리한 chromosomal DNA와 RNA의 전기영동상이다. Lane A는 48.5 Kilobase (Kb)의 λ DNA, lane G는 제한효소 *Hind*III로 절단된 λ phage DNA이며, lane

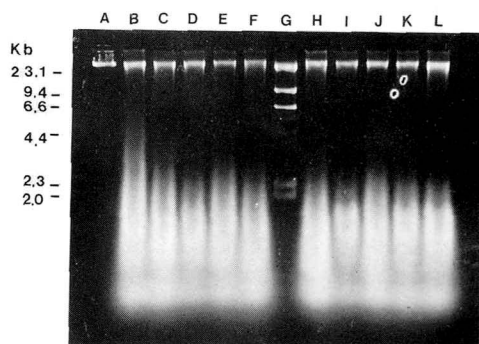


Fig. 1. Electrophoretic patterns of chromosomal DNAs and RNAs from clinical *C. albicans* isolates (0.8% agarose gel electrophoresis, 15 volt, 14 mA, 20 hours). Lanes ; A, λ DNA ; B-F and H-L, chromosomal DNAs and RNAs ; G, λ DNA digested with *Hind*III.

Table 1. Antifungal drug susceptibility of *Candida albicans* at 25°C incubation

Antifungal drugs	Range	MIC (μ g/ml) ^{a)}	
		50%	90%
Clotrimazole	<0.125-4	1.3	1.9
Ketoconazole	<0.125->128	1.25	>128
Nystatin	8-32	8.3	14.9
Amphotericin B	0.25-1	0.36	0.47
Flucytosine	8->1024	46	>1024

^{a)}50% and 90% are MICs required to inhibit 50% and 90% of the strains, respectively.

B-F, lane H-L은 *C. albicans*의 genomic DNA와 RNA의 영동상이다. Genomic DNA들은 약 70Kb, RNA들은 약 0.7-4Kb사이의 크기를 나타내었다.

Fig. 2는 *C. albicans*로부터 DNA와 RNA를 분리한 후 RNase를 처리하여 RNA를 제거하고 chromosomal DNA만 전기영동한 결과이다. Lane A-F, H-N는 genomic DNA이며 lane G는 제한효소 *Hind*III로 절단한 λ DNA size marker이며, lane O는 λ DNA이다. Genomic DNA들은 약 70Kb크기를 나타내었다.

Fig. 3는 *C. albicans*의 genomic DNA를 제한효소 *Bam*HI로 절단하여 그 분획을 전기영동한 것이다. Lane H는 23.1-0.1Kb 사이의 8개의 절편을 가지는 *Hind*III digested λ DNA의 영동상이며 Lane A-G, I-O는 genomic DNA의 제한효소 *Bam*HI절단상이다. *C. albicans*의 genomic DNA는 제한효소 *Bam*HI에 의해 수십개의 절편으로 절단되었으며 ethidium bromide (Et-Br)에 강하게 염색된 8.7Kb, 7.6Kb, 6.6Kb, 6.0Kb, 3.6Kb의 각기 다른 분자량을 가진 5개의 분획을 관찰할 수 있었다. 각 *C. albicans* strain들은 대부분에서 3개씩 강하게 염색된 이들 분획들을 가지고 있었으며 이들이 가지는 분획의 양상에 따라 각 strain들을 3개의 group으로 분류할 수 있었다.

Table 2는 Fig. 1의 강하게 염색된 분획의 양상에 따라 각 strain들을 분류하여 도표화한 것이다. Group A는 8.7Kb, 6.6Kb, 3.6Kb의 절편을 가지는 군으로서 전체균주 26주 중 21주로 가장 높은 빈도를 보였으며 8.7Kb, 6.0Kb, 3.6Kb의 절편을 가지는 group B는 3주, 8.7Kb, 7.6Kb, 3.6Kb의 절편을 가지는 group C는 2주의 빈도를 보였다.

Fig. 4는 α -³²P-dCTP로 표지된 v-Ha-ras gene probe를 이용한 southern hybridization결과로서 *Bam*HI으로 제한효소 처리된 *C. albicans* genomic DNA와 ras gene과의 hybridization이 약 4.9Kb근처에서 일어남을 관찰할 수 있었다.

고 찰

현대의료에서 악성종양에 대한 화학요법 등의 내과적 치료법과 새로운 외과적 수술법 등의 발전, 그리고 화상환자 등에 있어서 급속한 치료법의 발전은 환자의 생존률을 급격히 높여

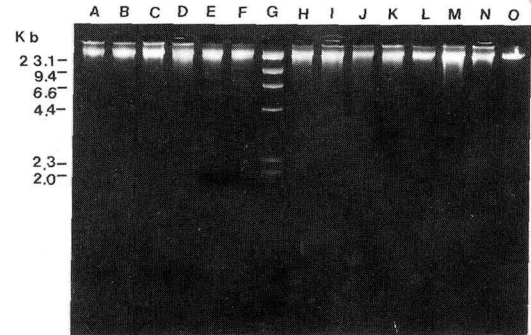


Fig. 2. Electrophoretic patterns of chromosomal DNAs from clinical *C. albicans* isolates after RNase treatment (0.8% agarose gel electrophoresis, 15 volt, 14mA, 15 hours). Lanes ; A-F and H-N, chromosomal DNAs ; G, lambda phage DNA digested with *Hind*III ; O, lambda DNA.

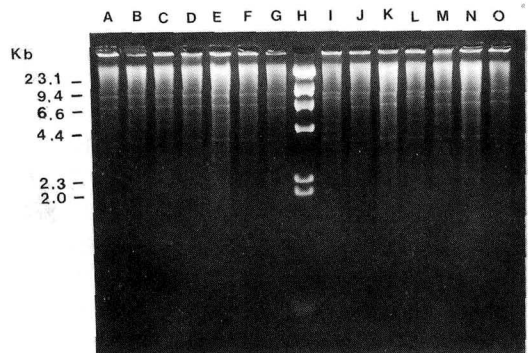


Fig. 3. REA of *C. albicans* chromosomal DNAs after digestion with *Bam*HI and electrophoresis on 0.8% agarose gel (12 volt, 11mA, 20 hours). Lanes ; A-G and I-O, *C. albicans* restricted chromosomal DNAs ; H, λ DNA *Hind*III digested.

Table 2. Comparative analysis of *C. albicans* strain types based on *Bam*HI restriction patterns

Group	Size (kilobase) of restriction fragmetns					No. of isolated strains
	8.7	7.6	6.6	6.0	3.6	
A	+		+		+	21
B	+			+	+	3
C	+	+			+	2

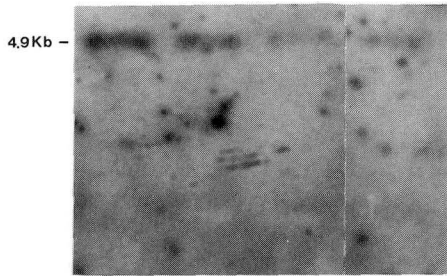


Fig. 4. Southern blot analysis of genomic DNAs from *C. albicans* digested with *Bam*HI and probed with the α - 32 P-dCTP labeled v-Ha-ras gene.

놓았다. 그러나 이와 동시에 발전된 의료기술법으로 생존을 연장한 환자에 있어서의 병원감염율의 증가는 심각한 문제점으로 대두되고 있으며 이들 중 진균감염증 특히 *C. albicans*에 의한 감염증은 그 중요성이 크게 증가되어 있다³⁰⁾.

각종 진균증에 사용되는 항진균제는 근래 많은 종류가 개발되어 polyene계통, imidazole계통, pyrimidine계통 등의 약제들이 주로 사용되고 있으며 각 진균증에 대한 이들 약제의 선택은 항진균제 감수성 검사를 시행한 뒤 결정되어야 한다. 그러나 항진균제의 실험실적 감수성 검사는 많은 문제점을 내포하고 있다. 예를 들면 AMB는 산에 불안정하며, 5-FC는 감수성 검사 배지내의 nucleoside와 길항작용을 나타내고 근래에 개발되어 임상치료에서 유용하게 사용되고 있는 itraconazole은 실험실적 감수성 검사에서는 효과가 전혀 없거나 매우 미약하게 나타나는 것으로 보고되어 있으며³⁾ 이와 더불어 공통적으로 받아들여질 수 있는 표준 항진균제 감수성 검사법조차 아직 없는 상태이다.

본 실험에서는 항진균제를 함유한 Sabouraud dextrose media를 사용하여 25°C에서 48시간 배양하는 방법으로 5종 항진균제에 대한 감수성 검사를 실시한 결과 균의 성장을 억제하는 MIC범위는 약제에 따라 많은 차이를 보였으며 90% 균의 성장을 억제하는 농도인 90% MIC는 AMB가 0.47 μ g/ml로 나타나 감수성이 가장 높은 것으로 나타났고, 그 다음으로는 CTZ 1.9 μ g/ml, NST 14.9 μ g/ml의 순이었으며 KCZ와 5-FC는 모두 실험최대약제농도 이상으로 나타났다. 일반적으로 보고된 *C. albicans*에 대한 항진균제 감수성 검사 결과를 살펴보면 보고자에 따라 많은 차이를 보이고 있는데 특

히 polyene계의 약제보다 imidazole계의 약제에서 차이가 심하게 나타나고 있다¹¹⁾. 본 실험의 검사성적과 다른 보고자들의 결과를 비교해보면 AMB의 MIC는 Moeprich등¹¹⁾의 0.96-2.4 μ g/ml, Bannatyne등⁴⁾의 0.5-1.0 μ g/ml와 비슷한 결과를 보였으며, NST는 Brass등⁶⁾의 6.25-12.5 μ g/ml보다 높은 8-32 μ g/ml를 나타내었고, imidazole계통의 약제인 CTZ과 KCZ는 <0.125-4 μ g/ml, <0.125->128 μ g/ml로 정복숙 등³⁾의 0.25-16 μ g/ml, 0.25-32 μ g/ml에 비하여 CTZ는 조금 낮게 그러나 KCZ는 훨씬 높은 MIC를 나타내었다. MIC90 또한 Pfaller등¹⁹⁾의 KCZ 31 μ g/ml에 비하여 훨씬 높은 >128 μ g/ml를 보였다. 이러한 차이의 원인은 아직까지 항진균제 감수성 검사에 대한 표준방법이 제시되어 있지 않아 각 실험자에 따른 배지의 종류와 pH, 접종균수, 배양온도와 시간 등의 차이에 따라 결과가 달리 나타났기 때문이라 생각된다. 그러므로 빠른 시일내에 다양화되어 있는 항진균제 감수성 검사법의 표준화가 필요하다고 사료된다.

현재까지 *C. albicans*에 대한 형별검사는 많은 방법이 개발되어 사용되고 있으나 이들은 주로 발현된 형질의 특성에 의거하여 분류하고 있으며 이러한 방법들은 역학적 조사에 필요한 감수성이 부족하거나 재생성의 결여, 관찰자의 편견(Bias)등의 문제점을 내포하고 있는 것으로 알려져 있다³⁰⁾. 근래 분자생물학의 급격한 발달에 기인하여 Restriction enzyme analysis (REA)등에 의한 DNA분석법으로 바이러스, 박테리아, 곰팡이 등의 strain간의 연관성에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으며, cloned DNA polymorphism, ribosomal DNA의 repetitive sequence등을 이용한 방법들도 많이 개발되어 있다.^{10, 15, 28, 30)} 이중 REA를 이용한 *C. albicans*의 genomic DNA의 핵형별에 대한 보고들을 살펴보면 Vazquez등³⁰⁾은 제한효소 *Eco*RI과 *Msp*I를 이용하여 35 strain의 *C. albicans*에서 17가지 핵형별을 관찰 보고하였으며, Matthews등¹⁶⁾은 제한효소 *Eco*RI를 사용하여 96 strain의 REA를 시행하여 16가지 핵형별이 관찰된다 하였다. 또한 Clemons등¹⁰⁾은 13 strain에서 6가지 핵형별을 보고하였고, Scherer등²⁸⁾은 *Eco*RI으로 제한효소처리 결과 2.5-3 Kb, 3.7 Kb, 4.2 Kb, 6.7 Kb의 Ethidium Bromide에 진하게 염색되는 4개의 band를 관찰할 수 있음을 보고하였다.

본 실험에서는 제한효소 *Bam*HI을 이용하여 *C. albicans* genomic DNA의 REA를 시행한 결과 8.7 Kb, 7.6 Kb, 6.6 Kb, 6.0 Kb, 3.6 Kb의 *Et*-Br에 진하게 염색되는 5개의 band를 관찰할 수 있었으며, 이 중 분자량이 가장 큰 8.7 Kb와 가장 작은 3.6 Kb의 두개의 band들은 실험한 26주 모두에서 관찰되었고 그 사이의 분자량을 가지는 7.6 Kb와 6.6 Kb, 6.0 Kb등 3가지의 band들의 존재여부로 3 group으로 나눌 수 있었다. 이 중 가장 많은 strain이 속하는 group은 8.7 Kb, 6.6 Kb, 3.6 Kb등 3개의 진한 band를 가지는 A group으로서 26군주 중 21군주가 여기에 속해 있었다.

근래 발암기전의 분자생물학적 연구의 결과로 많이 밝혀져 있는 수많은 oncogene들 중에서 *ras* gene family는 많은 척추동물들과 *Drosophila melanogaster* 그리고 yeast들에서 발견되어 있으며 특히 yeast의 *ras* gene은 human *ras* gene과 약 65%의 homology를 가지며 그 기능이 성장과 대사 그리고 유사핵분열과 감수분열에 필수적이며 spore의 viability에도 관계되는 것으로 알려져 있다^{22, 29)}.

본 실험에서 *Bam*HI으로 제한효소 처리된 *C. albicans* genomic DNA에 v-Ha-*ras* gene probe를 이용하여 hybridization을 시행한 결과 4.9 Kb 근처에서 hybridization이 일어남이 관찰되었다.

본 실험에서는 *C. albicans*의 DNA특성 규명을 위하여 REA를 시행하고 *ras* gene과의 hybridization여부를 관찰하여 보았다. 이 중 *Bam*HI을 이용한 REA는 역학조사의 한 방법으로서 유용할 것으로 생각되며 이에 더하여 electrophoretic karyotyping^{8, 17)}, ribosomal DNA probe를 이용한 restriction fragment length polymorphism (RFLP)등¹⁵⁾의 실험이 추가된다면 더욱 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

각종 임상가검물로부터 분리한 26주의 *C. albicans*를 대상으로 5종의 항진균제에 대한 감수성을 조사하고, *C. albicans* genomic DNA의 분자생물학적 특성을 규명하고자 restriction enzyme analysis (REA)를 이용한 핵형별 검사법의 일환으로 제한효소 *Bam*HI을 이용하여 REA를 시행하였으며, 제한효소처리된 *C. albicans*의 genomic DNA를 대상으로 α -³²P labeled

v-Ha-*ras* gene probe를 이용하여 southern hybridization을 시행하였다.

5종의 항진균제에 대한 감수성 검사 결과, MIC범위는 flucytosine (5-FC) 8-1024 μ g/ml, ketoconazole (KCZ) <0.125-128 μ g/ml, nystatin (NST) 8-32 μ g/ml, clotrimazole (CTZ) <0.125-4 μ g/ml, amphotericin B (AMB) 0.25-1 μ g/ml였으며, 90% MIC는 5-FC >1024 μ g/ml, KCZ >128 μ g/ml, NST 14.9 μ g/ml, CTZ 1.9 μ g/ml, AMB 0.47 μ g/ml로 나타났다.

*Bam*HI을 이용한 *C. albicans*의 genomic DNA REA결과 ethidium bromide에 진하게 염색되는 8.7 Kb, 7.6 Kb, 6.6 Kb, 6.0 Kb, 3.6 Kb의 5개의 band를 관찰할 수 있었다. 실험한 대부분의 군주는 8.7 Kb와 3.6 Kb의 band는 모두 가지면서 그 사이의 3가지 분자량의 band중 각 1개씩을 가지고 있어 이에 따라 8.7 Kb, 6.6 Kb, 3.6 Kb의 band들을 가지는 A군과 8.7 Kb, 6.0 Kb, 3.6 Kb를 가지는 B군, 그리고 8.7 Kb, 7.6 Kb, 3.6 Kb의 3 band를 가지는 C군으로 각 strain들을 분류할 수 있었다. 각 군에 대한 군주의 분포는 실험된 26주 중 21주가 A군에 속하여 가장 많았으며 그 다음으로 B군 (3주), C군 (2주)순이었다.

제한효소 *Bam*HI처리후 전기영동된 *C. albicans* genomic DNA를 α -³²P labeled v-Ha-*ras* probe로 hybridization을 시행하여 autoradiography한 결과 약 4.9 Kb 근처에서 hybridization이 일어남을 관찰할 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) 고춘명, 김수기 : *Candida albicans*의 amphotericin B 및 ketoconazole에 대한 감수성과 성장기와의 상호관계. 대한미생물학회지, 22 : 435-443, 1987.
- 2) 장세홍, 설성용, 조동택, 전도기 : 구강내 *Candida*의 분포 및 항진균제에 대한 감수성. 대한화학요법학회지, 3 : 45-56, 1985.
- 3) 정복숙, 김희선, 김성광 : 질강에서 분리한 *Candida* species의 항진균제에 대한 감수성상. 대한미생물학회지, 24 : 523-526, 1989.
- 4) Bannatyne R and Cheung R : Susceptibility of *Candida albicans* to miconazole. Antimicrob Agents Chemother, 13 : 1040-1041, 1978.
- 5) Borgers M : Mechanism of action of antifungal drugs with special reference to the imidazole derivatives. Rev Infect Dis, 2 : 520-525,

- 1980.
- 6) Brass C, Shainhouse J, Shainhouse Z and Stevens DA : Variability of agar dilution replicator method of yeast susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother*, **34** : 246-249, 1979.
- 7) Calhoun DL and Galgiani JN : Analysis of pH and buffer effects on flucytosine activity in broth dilution susceptibility testing of *Candida albicans* in two synthetic media. *Antimicrob Agents Chemother*, **26** : 364-367, 1984.
- 8) Carle GF and Olson MV : An electrophoretic karyotype for yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82** : 3756-3760, 1985.
- 9) Casal-Roman M and Linares-Sicilia MJ : Preliminary investigation of *Candida albicans* biovars. *J Clin Microbiol*, **18** : 430-431, 1983.
- 10) Clemons KV, Shankland GS, Richardson MD and Stevens DA : Epidemiologic study by DNA typing of a *Candida albicans* outbreak in heroin addicts. *J Clin Microbiol*, **29** : 205-207, 1991.
- 11) Hoepfich PD and Huston AC : Effect of culture media on the antifungal activity of miconazole and amphotericin B methylester. *J Infect Dis*, **134** : 336-341, 1976.
- 12) Joklik WK, Willett HP, Amos DB and Wilfert CM : *Zinsser Microbiology*. 19th ed, USA, Appleton & Lange, pp 931-936, 1988.
- 13) Koneman EW, Allen SD, Dowell VR Jr, Janda WM, Sommers HM and Winn WC Jr : *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 3rd ed, Philadelphia, JB Lippincott Co, pp 573-636, 1988.
- 14) Lee WL, Burnie J and Matthews R : Fingerprinting *Candida albicans*. *J Immunol Methods*, **93** : 177-182, 1986.
- 15) Magee BB, D'souza TM and Magee PT : Strain and species identification by restriction fragment length polymorphism in the ribosomal DNA repeat of *Candida* species. *J Bacteriol*, **169** : 1639-1643, 1987.
- 16) Matthews R and Burnie J : Assessment of DNA fingerprinting for rapid identification of outbreaks of systemic candidiasis. *Br Med J*, **298** : 354-357, 1989.
- 17) Merz WG, Connelly C and Hieter P : Variation of electrophoretic karyotypes among clinical isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*, **26** : 842-845, 1988.
- 18) Odds FC and Abott AB : A simple system for the presumptive identification of *Candida albicans* biovars. *J Clin Microbiol*, **18** : 430-431, 1980.
- 19) Pfaller MA, Segal JJ and Krogstad DJ : Activity of ketoconazole and its deacyl derivative against *Plasmodium falciparum* and *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, **22** : 917-919, 1982.
- 20) Phongpaichit S, Mackenzie DW and Fraser C : Strain differentiation of *Candida albicans* by morphotyping. *Epidemiol Infect*, **99** : 421-428, 1987.
- 21) Polonelli L, Archibusacci C, Sestito M and Morace G : Killer system : a simple method for differentiation *Candida albicans* strains. *J Clin Microbiol*, **17** : 774-780, 1983.
- 22) Reddy EP, Skalka AM and Curran T : *The oncogene handbook*. 1st ed, Netherlands, Elsevier Science Publishers BV, pp 257-304, 1988.
- 23) Regan DR, Pfaller MA, Hollis RJ and Wenzel RP : Characterization of the sequence of colonization and nosocomial candidemia using DNA fingerprinting and a DNA probe. *J Clin Microbiol*, **28** : 2733-2738, 1990.
- 24) Rogers TE and Galgiani JN : Activity of fluconazole (UK49, 858) and ketoconazole against *Candida albicans* in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*, **30** : 418-422, 1986.
- 25) Sambrook J, Fritsch E and Maniatis T : *Molecular Cloning*. 2nd ed, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 26) Scherer S and Stevens DA : Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J Clin Microbiol*, **25** : 675-679, 1987.
- 27) Steers E, Plotz EL and Graves BS : Inocular replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot Chemother*, **9** : 307-311, 1959.
- 28) Su CS and Meyer SA : Characterization of

- mitochondrial DNA in various *Candida* species: isolation, restriction endonuclease analysis, size, and base composition. *Int J Syst Bacteriol*, **41** : 6-14, 1991.
- 29) Tatchell K, Chaleff DT, DeFeo-Jones D and Scolnick EM: Requirement of either of a pair of *ras*-related genes of *Saccharomyces cerevisiae* for spore viability. *Nature*, **309** : 523-527, 1984.
- 30) Vazquez JA, Beckely A, Sobel JD and Zervos MJ: Comparison of restriction enzyme analysis and pulsed-field gradient gel electrophoresis as typing systems for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*, **29** : 962-967, 1991.
- 31) Warnock DW: Typing of *Candida albicans*. *J Hosp Infect*, **5** : 244-252, 1984.
- 32) Williamson MI, Samaranayake LP and Macfarlane TW: A new simple method for biotyping *Candida albicans*. *Microbiols*, **51** : 159-167, 1987.
-