대한의진균학회지 제 3권 제 2호 1998

■원 저■

RAPD PCR분석에 의한 국내 피부 사상균속 분류 및 동정

국립보건원 세균질환부 병원감염과

이영선 · 유재일 · 최연화 · 주형렬 · 김봉수 · 김동한

=Abstract=

Random Amplified Polymorphic DNA for Classification and Identification of Dermatophytes

Yeong Seon Lee, Jae Il Yoo, Yeon Hwa Choi, Hyung Yeul Joo, Bong Su Kim and Dong Han Kim

Laboratory of Nosocomial Pathogens, Department of Microbiology, National Institute of Health Seoul, Korea

Backgound: Dermatophytoses are infections of keratinized tissues, that is, the epidermis, hair and nails, caused by a group of specialized fungi, the dermatophytes. Laboratory diagnoses of dermatophytes such as *Trichophyton, Microsporum* and *Epidermophyton* are made by microscopic examination and in vitro culture but they are either time consuming or lacking specificity.

Objective: In order to develop and apply more rapid and precise diagnostic tests for fungal pathogens to facilitate the improved identification of dermatophytes, we investigated random amplified polymorphism DNA for classification and identification of dermatophytes.

Methods: Amplification reactions were performed in volumes of 50μl containing 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$ 0.01% (w/v), gelatin, 200mM dNTP mixture, 50pM primer, Taq polymerase (0.025units/μl), DNA 0.001μg/μl. The optimal condition for PCR was 2 cycles (denaturing 94℃ 2min, annealing 33℃ 2min, extention 72℃ 4min), 40 cycles, and extention (72℃ 10min).

Results: RAPD showed interspecies polymorphism in *T. rubrum, T. mentagrophytes, T. tonsurans, T. violaceum, M. ferrugineum, M. canis, M. gypseum, M. audouinii* and *E. floccosum*, but it had identical patterns in intraspecies.

Conclusion: It was confirmed that RAPD PCR analysis with optimal conditions is a fast, economical and reproducible method for identification and classification of dermatophytes isolates.

[Kor J Med Mycol 3(2): 107-114]

Key Words: RAPD PCR, *Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton*

서 론

Trichophyton, Epidermophyton. Microsporum 등의 피부 사상균의 분류 및 동정은 환자의 임상학적 관찰, 분리주의 배양학적 특성, 현미경적 관찰 및 생리학적 성상, 수용성 단백질 양상, 혈청학적 특성 등의 생화학적 방법을 이용하여 왔다[1~3]. 그러나 이는 균종에 따라서는 다양한 형태의 아형을 가지고 있어 분류 동정하는데 어려운 점이 많다. 지금까지 피부 사상균의 DNA에 대한 연구는 아직은 미약하나 최근 분자생물학적 방법에 의

†별책 요청 저자: 이영선, 120-701 서울특별시 은평구 녹번동 5 국립보건원 세균질환부 병원감염과

한 분류 동정이 시도되고 있다[4]. 특히 PCR방법은 계통 분류와 집단연구를 위해 널리 이용되고 있으며 target gene sequence에 대해 알고 있어야 되는 기존의 PCR방법 보다 사전에 염기서열에 대한 정보가 필요없는 random amplified polymorphic DNA (RAPD)방법[5~8]이 cloning, restriction endonuclease digestion, southern blotting, hybridization 등의 과정이 생략되어 기존의 RFLP보다 훨씬 빠르고 경제적인 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 비교적 간단하고 매우 유용한 것으로 알려진 RAPD PCR분석에 의한 DNA 다형성을 관찰하여 국내 피부 사상균 임상 분리주의 분류 및 동정을 시도하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

임상 가검물: 국내외 균주 기관으로부터 표준 균주를 수집하고 서울 여의도 성모병원 피부과와 대구 카톨릭 피부과의원 내원 환자 중 피부 사상균 의심 환자들의 임상가검물을 대상으로 임상 분리주를 수집하였다.

표준 균주: 본 실험에 사용한 표준 균주는 *T. rubrum* (KCTC 6345, ATCC 9185), *T. mentagrophytes* (ATCC 9129, ATCC 9533, KCTC 6077), *T. tonsurans* (ATCC 9083), *M. gypseum* (ATCC 9085, ATCC 14683), *M. audouinii* (ATCC 9079), *M. canis* (ATCC 18615), *Epidermophyton floccusum* (ATCC 8376), *T. violaceum* (ATCC 8376), *M. ferrugineum* (KCTC 6351)를 사용하였다.

임상 분리주: 수집한 임상 분리주는 총 120주로 *T. rubrum* 65주, *T. mentagrophytes* 14주, *T. tonsurans* 10주, *M. canis* 9주, *M. gypseum* 10주, *M. audouinii* 5주, *E. floccosum* 7주로 이들 임상 분리주는 다양한 임상병변으로부터 분리 수집하였다.

Primer: 본 실험에 사용한 primer는 10-mer (Operon Technologies, Inc) 20개를 구입하여 사용하였다.

2. 실험 방법

Template DNA 추출: 평판 및 액체 배양한 균의 DNA는 Liu 등[9]의 방법에 따라 추출하였다. Potato dextrose agar에 접종하여 25℃에서 2~3주간 배양하여 SET buffer (75mM NaCl, 25mM EDTA, 20mM Tris-HCl, pH 8.0) 4ml을 처리하여 40ml 원심 tube에 수집하고 주사침으로 잘게 부순다음 lysozyme (2.5mg/ml) 1ml을 넣어 30℃에서 1시간 반응시킨 후, RNase (10mg/ml) 25μl를 첨가하여 37℃에서 30분 반응시킨다. 다시 10% SDS 500μl와 proteinase K (10mg/ml) 50μl를 처리하여 37℃에서 1시간 반응시킨 후 6M NaCl 2ml과 chloroform 7.5ml을 넣어 잘 혼합하여 10,000rpm에서 15분 동안 원심 분리하였다. 원심 분리한 상청액은 새 원심 tube에 옮긴 후 cold isopropanol 7.5ml을 넣어 DNA를 침전시키고 70% ethanol로 세척한 후 TE buffer에 녹여 spectrophotometer 상에서 DNA농도를 측정하였다.

Primer 선정: 표준 균주 및 임상 분리주에 대한 primer 선정은 random primer 20개를 구입하여 PCR반응 결과를 비교하여 최적 primer #002 (5'-TGCCGAGCTG3'), #003 (5'AGTCAGCCAC3'), #011 (5'CAATCGCCGT3'), #018 (5'AGGTGACCGT3')를 선정하였다.

PCR반응 조건: 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$ 0.01% (w/v) gelatin, 200mM dNTP mixture, 50pM primer, Taq polymerase 0.025 units/μl로 하고 template DNA농도는 0.001~0.1μg/μl으로 변화를 시켜 최적 농도를 비교하면서 반응 혼합물이 50μl가 되도록 하였다. 반응 조건에서 1차로 denaturation은 94℃에서 2분, annealing 온도는 33℃~40℃에서 2분, extention은 72℃에서 4분으로 2회 반복하고 2차로 denaturation (94℃에서 2분), annealing (33℃~40℃에서 2분), extention (72℃에서 4분)의 반응 횟수를 25~45회까지 횟수를 달리하면서 실시한 후 마지막에 extention (72℃ 10분)을 시행하여 최적 PCR 반응조건을 검토하였다. Thermal cycler는 Perkin Elmer 9600을 사용하였고 증폭된 DNA는 1.5% agarose gel에서 80volt로 1시간 전기영동시킨 후 ethidium bromide로 염색하여 자외선 발광기 (UV)로 관찰하였다.

결 과

1. PCR 최적 조건 확립

분리한 주형 DNA를 0.1μg, 0.04μg, 0.02μg, 0.01μg, 0.008μg, 0.004μg, 0.001μg의 농도에서 PCR을 시행한 결과는 Fig. 1과 같다. 0.04μg 이상에서의 template DNA농도에서는 반응산물이 나타나지 않은 반면 0.02μg 이하에서는 동일한 band 양상을

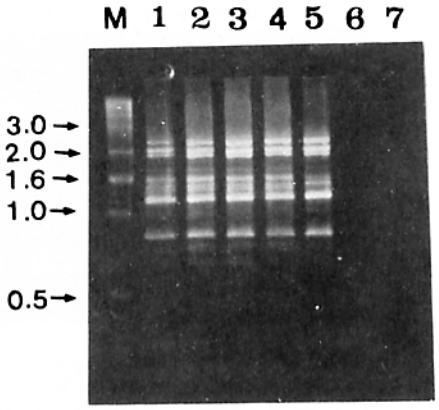

Fig. 1. Effect of the template DNA concentration on RAPD. M: 1Kb DNA ladder, 1: 0.001μg, 2: 0.004μg 3: 0.008μg, 4: 0.01μg, 5: 0.02μg, 6: 0.04μg, 7: 0.1μg.

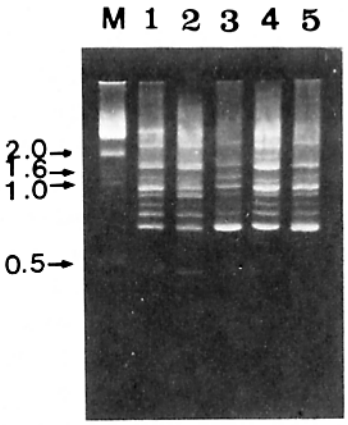

Fig. 2. Effect of the number of amplification on RAPD. M: 1Kb DNA ladder, 1: 25cycle, 2: 30cycle, 3: 35cycle, 4: 40cycle, 5: 45cycle.

나타내어 이후 주형 DNA는 0.01μg으로 하였다.

PCR의 반응 조건이 반응 결과에 미치는 영향을 알아보기 위해 반응 횟수를 달리하여 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다. 처음 반응 횟수는 2회로 하고 이후 반응 횟수를 25, 30, 35, 40 45로 반응 횟수를 달리하여 본 결과에서는 반응 횟수와 관계없이 동일한 밴드 양상을 볼 수 있었으나 40회에서 밴드가 가장 선명하게 나타났다.

Annealing 온도는 33℃에서 40℃까지 온도를 달리하여 PCR을 시행한 결과는 Fig. 3과 같다. 위 온도범위에서 온도에 따른 밴드의 수나 양상의

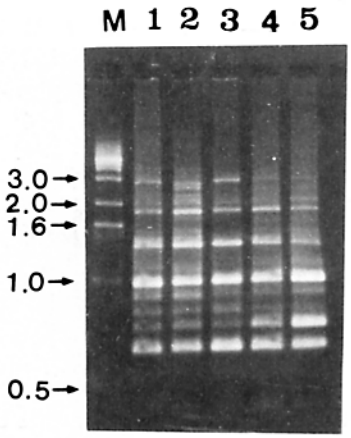

Fig. 3. Effect of the annealing temperature on RAPD. M: 1Kb DNA ladder, 1: 30℃, 2: 33℃, 3: 35℃, 4: 40℃, 5: 45℃.

차이는 나타나지 않았으나 33℃에서 비교적 좋은 결과를 얻을 수 있어 이후 annealing 온도는 33℃로 하였다.

2. 표준 균주에 대한 RAPD 분석

피부 사상균의 균속 및 균종간의 DNA 다형성을 알아보기 위해 표준 균주 *T. rubrum, T. mentagrophytes, T. tonsurans, M. gypseum, M. audouinii, E. flocossum*에 대한 RAPD PCR한 결과 primer #002, #003, #011, #018에서 비교적 다양한 밴드 양상을 나타내었다 (Fig. 4). 한편 primer #003을 가지고 표준 균주 *T. ruburm* (KCTC 6345, ATCC 9185), *T. mentagrophytes* (KCTC 6077, ATCC 9129, ATCC 9533), *T. tonsurans* (ATCC 9085). *T. violaceum* (ATCC 8376), *M. ferrugineum* (KCTC 6351), *M. gypseum* (ATCC 9083) 11주에 대한 결과는 Fig. 5와 같다. 위 결과에서는 *Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton*의 균속간의 차이 뿐만 아니라 *T. rubrum, T. mentagrophytes, T. tonsurans, M. ferrugineum, T. violaceum* 및 *M. canis, M. audouinii, M. gypseum*의 균종간에서도 뚜렷한 차이를 나타내었다.

3. 임상 분리주에 대한 RAPD 분석

완선, 조갑백선, 족부백선 등의 임상형에서 분리된 *T. rubrum* 13주에 대한 primer #002을 가지고 RAPD를 실시한 결과 (Fig. 6)에서는 동일한 밴드 양상을 보여 같은 균종에서 균주간의 DNA 다형

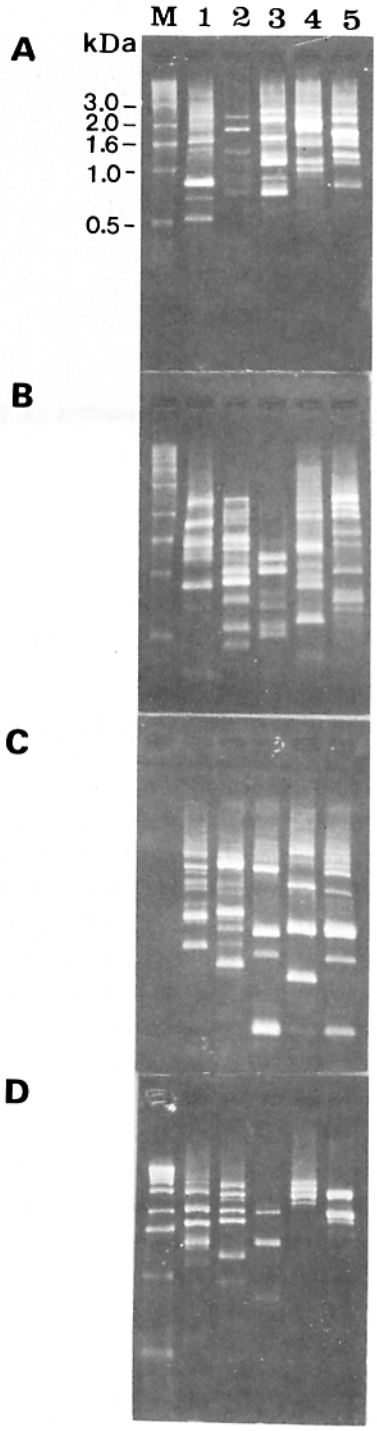

Fig. 4. RAPD products of genomic DNA of *Dermatophytes* using primer #002 (A), #003 (B), #011 (C), #018 (D). M; size maker, 1; *M. audouinii* 2; *M. gypseum*, 3; *T. mentagrophytes*, 4; *T. rubrum*, 5; *T. tonsurans*.

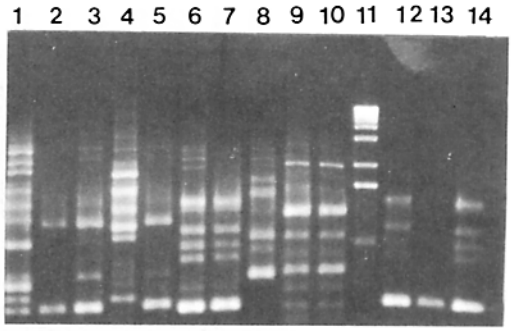

Fig. 5. RAPD products of genomic DNA of *Dermatophytes* standard strains 1: *M. gypseum* 9083, 2-3: *T. mentagrophytes* KCTC 6077, ATCC 9129, 4: *M. ferrugineum* KCTC 6351, 5: *T. mentagrophytes* ATCC 9533, 6-7: *T. rubrum* KCTC 6345, ATCC 9185, 8: *T. tonsurans* ATCC 9083, 9-10: *T. violaceum* ATCC 8376, 11: size marker, 12-14: *T. rubrum* isolates.

성의 차이 뿐 아니라 임상형에 따른 DNA 다형성의 차이는 나타나지 않았다.

완선, 체부백선, 조갑백선, 족부백선, 두부백선, 안면백선 등의 피부 병변으로부터 분리한 임상 분리주 *T. rubrum* 65주, *T. mentagrophytes* 14주, *T. tonsurans* 10주, *M. canis* 9주, *M. gypseum* 10주, *M. audouinii* 5주, *E. flocossum* 7주중 지역 및 임상형을 고려하여 일부 임상 분리주를 선정하여 primer #002, #003, #011, #018를 가지고 PCR한 결과는 각각 Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10과 같다. 표준 균주에 대한 RAPD 분석 결과와 마찬가지로 *Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton* 균속간의 차이 뿐만 아니라 *T. rubrum, T. mentagrophytes, T. tonsurans, M. canis, M. audouinii, M. gypseum,* 및 *E. flocossum*의 균종간에서도 뚜렷한 차이를 나타내었다. 반면 같은 균종내에서는 동일한 밴드 양상을 나타내어 임상형에 따른 균주간의 유전적 차이는 없는 것으로 나타났다.

고 찰

피부 사상균은 인체의 모발, 피부의 각질층 및 조갑에 기생하여 병변을 일으키고 이들이 인체에 감염을 일으키는 것은 종에 따라 차이가 있으며[10] 침범 부위, 모발의 침범 양상, Wood 등 검사에서의 형광 유무 등의 특징을 나타나고 있다. 이들의 분류는 대분생자의 형태, 소분생자의 발생 유

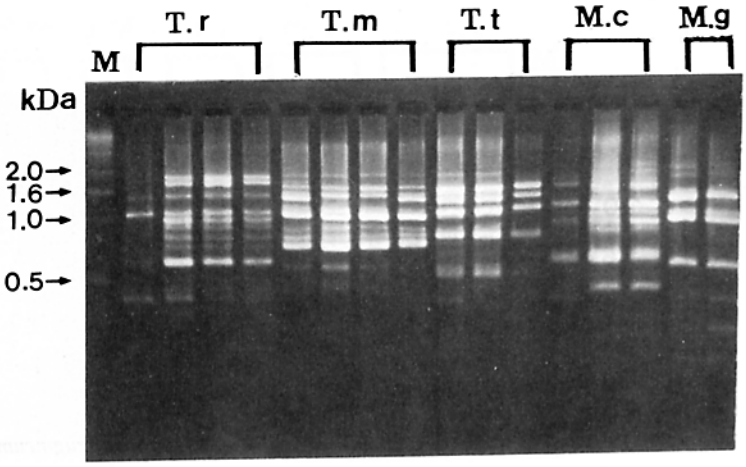

Fig. 6. RAPD products of genomic DNA from *Dermatophytes* isolates using isolates using primer #002. M; 1Kb DNA ladder, T.r; *T. rubrum*, T.m; *T.mentagrophytes*, T.t; *T.tonsurans* M.c; *M. canis*, M.g; *M. gypseum.*

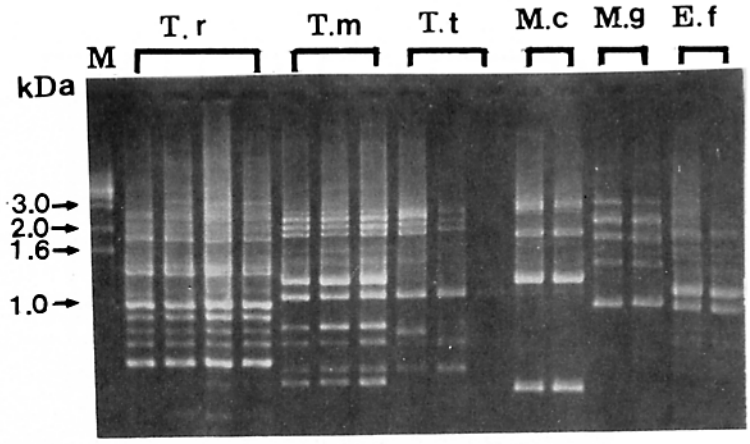

Fig. 7. RAPD products of genomic DNA from *Dermatophytes* isolates using isolates using primer #003. M; 1Kb DNA ladder, T.r; *T. rubrum*, T.m; *T.mentagrophytes*, T.t; *T.tonsurans* M.c; *M. canis*, M.g; *M. gypseum.*

무와 각각의 형태, 배열 상태에 따라 *Trichophyton, Microsporum* 및 *Epidermophyton* 속으로 분류하고 있다. 또한 개개의 균종 동정은 육안으로 집락 성장 속도와 형태, 여러 가지 배지에서의 배양학적 특성, urease test, 모발의 천공 검사 등이 쓰이고 있다. 그러나 이들 동정 방법은 숙달된 경험과 많은 시간이 필요하며 균종에 따라서는 다양한 형태의 아형을 보이기도 하며 일부 균종들은 분류학적으로 정립되어 있지 않다. 따라서 DNA분석에 의한 접근 방법이 시도되고 있으나 대개의 방법이 많은 시간을 요하고 또한 균종마다 특이한 염기 서열 등의 사전 유전 정보를 알아야 하는 어려움이 있다. 이에 비해 사전에 sequence information이 필요없는 random amplified polymorphic DNA (RAPD)는 southern blotting이나 labeled probe 없이 random primer에 의해 쉽게 유전적 동일성을 관찰할 수 있는 간편한 방법이며 또한 균종간에 공동의 밴드 또는 다형성을 보임으로서 균주의 분류 및 동일 균종내 균주간의 구별도 가능하다. 1990년 Williams 등[6]이 사람, 식물, 및 세균의 DNA에 처음으로 RNA 에 처음으로 RAPD 방법을 적용한 이후 많은 방법들이 개발되었다[5,9,11,12,16]. Liu 등은 *Trichophyton*[9]과 *Acremonium*[12]에 적용하여 균종을 동정한 바 있고 이외에도 *Cryptococcus*

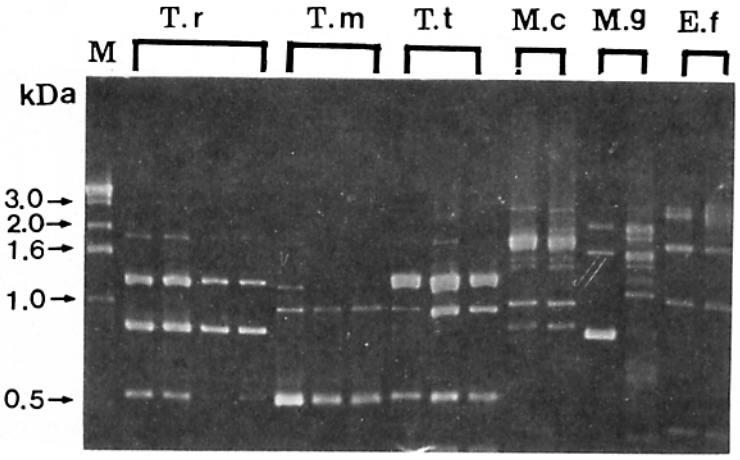

Fig. 8. RAPD products of genomic DNA from *Dermatophytes* isolates using isolates using primer #011. M; 1Kb DNA ladder, T.r; *T. rubrum*, T.m; *T.mentagrophytes*, T.t; *T.tonsurans* M.c; *M. canis*, M.g; *M. gypseum.*

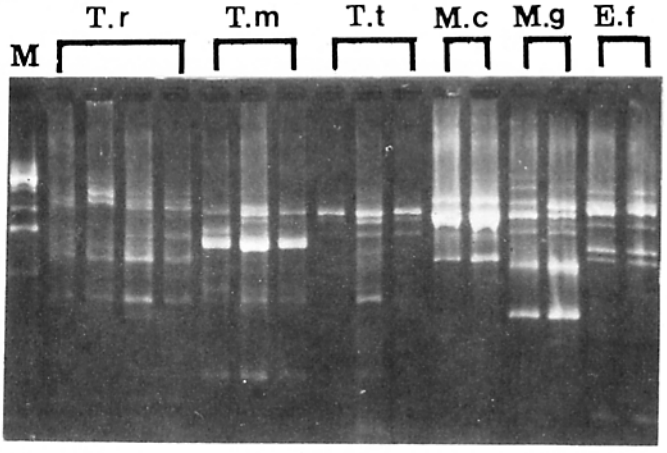

Fig. 9. RAPD products of genomic DNA from *Dermatophytes* isolates using isolates using primer #018. M; 1Kb DNA ladder, T.r; *T. rubrum*, T.m; *T.mentagrophytes*, T.t; *T.tonsurans* M.c; *M. canis*, M.g; *M. gypseum.*

neoformans[13], *Histoplsma capsulaum*[14], *Aspergillus*[15], *Candida*[17~18] 균종에 대한 RAPD PCR분석을 시도한 바 있다.

그러나 RAPD에 의한 미지의 균종 동정을 위해서는 미리 많은 표준 균주를 확보하여 비교하여야 하고 또한 이들 DNA 다형성은 사용한 primer와 PCR 반응 조건에 따라 영향을 받으므로 최적 primer와 반응 조건을 검토하여야 한다. 따라서 본 연구에서는 주형 DNA농도, annealing 온도, 반응 횟수 등을 검토한 결과 주형 DNA농도는 0.04μg/μl 이상에서는 반응 산물이 나타나지 않은 반면 0.02μg/μl 이하에서는 동일한 band 양상을 볼 수 있었다. 한편 annealing 온도와 증폭 횟수를 각각 33℃에서 40℃와 25에서 45회까지 달리하여 PCR을 시행한 결과에서는 거의 동일한 결과를 나타내었다. 또한 random primer 20개를 사용하여 비교한 결과에서는 primer #002, #003, #011, #018가 비교적 DNA 다형성을 나타내어 4개의 primer를 선정하여 사용하였다. Williams 등[6]은 확실한 결과를 얻기 위해서는 적어도 4개의 primer를 사용하는 것이 바람직하며 이들 각각의 primer는 1개의 base만 치환되더라도 매우 다른 다른 결과를 나

타내고 또한 template DNA 1개의 base만 치환되더라도 검출이 가능하여 그 민감도가 매우 높다고 할 수 있다. 이와 같이 사용한 각각의 primer에 따라 *Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton* 균속에 대한 여러개의 밴드가 증폭된다는 것은 유사한 염기 서열 부분이 있는 것으로 추정되지만 균종에 따라 특징적인 밴드양상을 가지는 것으로 보아 균종에 따른 유전적 차이가 있음을 뚜렷이 알 수 있다. 또한 RAPD 분석은 어느 방법에 비해도 매우 빠르고 정확한 분류 방법이며 DNA를 확보하고 있으면 24시간 이내에 분석이 가능하여 동시에 많은 균주를 수행할 수 있으며 DNA 수준에서 유전적 차이를 검색하기 때문에 외부 환경 요인에 따른 영향을 배제할 수 있는 잇점이 있다. 또한 재현성이 높아 PCR 반응 조건만 정확하게 하면 항상 동일한 결과를 얻을 수 있다. 앞으로는 임상검체 자체에서 직접 동정이 가능한지를 연구할 필요가 있고, 더욱 나아가서는 *Trichophyton* 등 각 균종에 특이한 DNA sequence를 확보하여 Dermatophytes 뿐만 아니라 다른 곰팡이까지 유전적 유연 관계가 확립될 수 있으리라 본다.

이상의 결과에서 4개의 primer #002 (5'TGCCGAGCTG3'), #003 (5'AGTCAGCCAC3'), #011 (5'CAATCGCCGT3'), #018 (5'AGGTGACCGT3')를 이용한 표준 균주 *T. rubrum, T. mentagrophytes, T. tonsurans, M. ferrugineum, T. violaceum, M. gypseum, M. audouinii*와 국내 피부 사상균속의 임상 분리주 *T. rubrum, T. mentagrophytes, T. tonsurans, M. canis, M. gpseum, E. flocossum*에 대한 RAPD분석은 DNA수준에서의 동정이 가능하였을 뿐 아니라 신속하고 정확한 것으로 나타났다. 균종에 따라서는 균주간의 유전적 차이도 알 수 있으며 동시에 여러 균종 및 많은 균주를 동시에 처리할 수 있어 그 유용성이 매우 높다고 볼 수 있다.

결 론

RAPD PCR분석에 의한 DNA 다형성을 관찰하여 국내 피부 사상균 임상 분리주의 정확한 종의 분류 및 동정 방법을 확립하기 위해 최적 반응 조건을 점검하고 표준 균주 및 임상 분리주에 대한 동정을 실시하였다.

1. 표준 균주 *T. rubrum, T. mentagrophytes, T. tonsurans, T. violaceum, M. ferrugineum, M. gypseum, M. audouinii, M. canis, E. floccusum*과 국내 임상 분리주 *T. rubrum* 65주, *T. mentagrophytes* 14주, *T. tonsurans* 10주, *M. canis* 9주, *M. gypseum* 10주, *M. audouinii* 5주, *E. floccosum* 7주를 대상으로 4개의 random primer #002 (5'TGCCGAGCTG3'), #003 (5'AGTCAGCCAC3'), #011 (5'CAATCGCCGT3'), #018 (5'AGGTGACCGT3')로 PCR을 실시하였다.

2. PCR은 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$ 0.01% (w/v) gelatin, 200mM dNTP mixture, 50pM primer, Taq polymerase 0.025units/μl, template DNA농도 0.001μg/μl으로 하였고, 반응 조건은 처음에 denaturation은 94℃에서 2분, annealing은 34℃에서 2분, extention은 72℃에서 4분은 2회 반복하고 2차로 denaturation (94℃, 2분), annealing (34℃, 2분), extention (72℃, 4분)을 40회, 마지막에 extention (72℃, 10분)을 시행하였다.

3. 표준 균주에 대한 RAPD PCR을 실시한 결과 4개의 primer 모두 *Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton*의 균속은 물론 *T. rubrum, T. mentagrophytes, T. tonsurans, T. violaceum. M. ferrugineum, M. gypseum, M. audouinii*의 균종간 동정이 가능하였다. 국내 피부 사상균속의 임상 분리주 *T. rubrum* 65주, *T. mentagrophytes* 14주, *T. tonsurans* 10주, *M. canis* 9주, *M. gypseum* 10주, *E. flocossum* 7주에 대한 RAPD 분석 결과에서도 서로 다른 균종에서는 뚜렷한 차이를 나타낸 반면 같은 균종내에서는 동일한 밴드 양상을 나타내어 RAPD PCR에 의한 동정 가능성을 확인 할 수 있었다. 또한 동일 균종내에서 밴드 양상이 같은 것으로 보아 균주간의 유전적 차이는 없는 것으로 나타났다. 따라서 RAPD PCR분석은 피부 사상균속에 대한 DNA수준에서의 동정은 물론 다양한 균종 및 많은 균주를 동시에 처리할 수 있어 신속하고 정확하여 그 유용성이 매우 높음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Kim KH. Identification of Dermatophytes. Kor J Med Mycol 1997; 2: 1-8
2. 김성권, 김승곤, 김영권 등. 임상진균학, 고려의학, 1993; 81-114
3. Kwon-Chung KJ, Bennet J. Medical Mycology. th ed. Philadelphia: Lea & Febigger, 1992; 105-

161

4. Mitchell TG, Sandin RL, Bowman BH, et al. Molecular mycology: DNA probes and application of PCR technology. J Med Vet Mycol 1994; 32 (Suppl. 1): 351-366
5. Welsh J, NcClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res 1990; 18: 7213-7218
6. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res 1990; 18: 6531-6535
7. Mazurek GH, Reddy V, Narston BJ, Haas WH, Crawford JT. DNA fingerprinting by infrequent-restriction site amplification. J Clin Microbiol 1996; 34: 2386-2390
8. Hamelin RC, Ouellette GB, Bernier L. Identification of *Bremmeniella abietina* races with random amplified polymorphic DNA markers. Appl Environ Microbiol 1993; 59: 1752-1755
9. Liu D, Coloe S, Baird PR. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to differentiate *Trichophyton mentagrophytes*. FEMS Microbiol Lett 1996; 136: 147-150
10. 서순봉. 우리나라의 피부사상균증과 원인균의 변천. Kor J Med Mycol 1996; 1: 1-10
11. Beckmann JS. Oligonucleotide polymorphisms: A new tool for genomic genetics. Biotechnol 1988; 6: 1061-1064
12. Liu D, van Heeswijck R, Latch G, et al. Rapid identification of *Acremonium lolii* and *Acremonium coenophialum* endophytes through arbitrarily primed PCR. FEMS Microbiol Lett 1995; 133: 95-98
13. Crampin AC, Mathews RC, Hall D, Evans EGV. PCR fingerprinting *Cryptococcus neoformans* by random amplification of polymorphic DNA. J Med Vet Mycol 1993; 31: 463-465
14. Kerwulyte D, Woods JP, Keath EJ, Goldman WE, Berg DE. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reactio with arbitrary primers. J Bacteriol 1992; 174: 7075-7079
15. Aufauvre-Brown A, Cohe J, Holden DW. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers to distinguish isolates of *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol 1992; 30: 2991-2993
16. MaClelland M, Welsh J. DNA fingerprinting using arbitrarily primed PCR. In: Dieffenach CW. Cveksler GS, eds. PCR primer a laboratory mannual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1995: 203-211
17. Schonian G, Meusel O, Tietz H-J, et al. Identification of clinical strains of *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the polymerase chain reaction. Mycoses 1993; 36: 171-179
18. 조해욱, 신동훈, 최종수. Random amplified polymorphic DNA를 이용한 *Candida* 속의 분류에서 최적화 조건의 검토와 그 이용. 대한피부과학회지 1997; 35: 71-81