

2006년 2월
박사학위논문

종-특이 중합효소연쇄반응 프라이머를
이용한 *Streptococcus mutans*의 검출

조선대학교 대학원

치의학과

최 민 호

종-특이 중합효소연쇄반응 프라이머를
이용한 *Streptococcus mutans*의 검출

*Detection of the Streptococcus mutans using
species-specific PCR primers*

2006년 2 월 일

조선대학교 대학원

치의학과

최 민 호

종-특이 중합효소연쇄반응 프라이머를
이용한 *Streptococcus mutans*의 검출

지도교수 강 동 완

이 논문을 박사학위신청 논문으로 제출함

2005년 10 월 일

조선대학교 대학원

치의학과

최 민 호

최민호의 박사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 김 명 수 인

위 원 전남대학교 교 수 이 시 은 인

위 원 조선대학교 교 수 김 도 경 인

위 원 조선대학교 교 수 국 중 기 인

위 원 조선대학교 교 수 강 동 완 인

2005년 12 월 일

조선대학교 대학원

목 차

표목차 -----	ii
도목차 -----	iii
<i>ABSTRACT</i> -----	iv
<i>I.</i> 서론 -----	1
<i>II.</i> 연구 재료 및 방법 -----	3
<i>III.</i> 연구결과 -----	8
<i>IV.</i> 총괄 및 고안 -----	15
<i>V.</i> 결론 -----	18
참고문헌 -----	19

표 목 차

Table 1. Bacterial strains used in this study -----	9
Table 2. PCR primers designed in this study for the detection of <i>S. mutans</i> ---	7
Table 3. Comparison of cell culture and nested PCR methods for the detection of <i>Streptococcus mutans</i> from the dental plaques -----	14

도 목 차

- Figure 1. Schematic diagram for the design of *Streptococcus mutans*-species specific PCR primer based on the nucleotide sequences of 16S rDNA ----- 7
- Figure 2. Gradient PCR for optimized annealing temperature of the primers (ChDC-SmF2 and ChDC-SmR2) ----- 9
- Figure 3. Specificity test of PCR with the ChDC-SmF2 and ChDC-SmR2 and purified genomic DNA of the type strains (**A**) and the clinical isolates (**B**) ----- 10
- Figure 4. Sensitivity of direct PCR with the ChDC-SmF2 and ChDC-SmR2 primers for the detection of purified genomic DNA from *S. mutans* ATCC 25175^T ----- 11
- Figure 5. The detection limits of nested PCR amplification with (**A**) 27F and 1492R primers and purified genomic DNA of *S. mutans* ATCC 25175^T or (**B**) ChDC-SmF2 and ChDC-SmR2 primers and 10-fold dilutant of the 1st PCR ----- 12
- Figure 6. Detection of the *S. mutans* from the dental plaque samples ----- 13

ABSTRACT

Detection of the Streptococcus mutans using species-specific PCR primers

Choi, Min Ho, D.D.S., M.S.D.

Advisor : Prof. Kang, Dong-Wan, D.D.S., M.S.D., Ph. D.

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

This study was undertaken to develop PCR primers for the identification and detection of *Streptococcus mutans* using species-specific forward and universal reverse primers. These primers targeted the variable regions of the 16S ribosomal RNA coding gene (rDNA). The primer specificity was tested against 11 *S. mutans* strains and 10 different species (22 strains) of oral bacteria. The primer sensitivity was determined by testing serial dilutions of the purified genomic DNA of *S. mutans* ATCC 25175^T. The data showed that species-specific amplicons were obtained from all the *S. mutans* strains tested, which was not observed in the other species. The direct and nested PCR could detect as little as 2 pg and 2 fg of the chromosomal DNA from *S. mutans* ATCC 25175^T, respectively. This shows that the PCR primers are highly sensitive and applicable to the detection and identification of *S. mutans*.

I. 서론

치아우식증은 숙주요인, 병원체요인, 식이요인 및 시간요인 등의 복합적인 원인에 의해 발병 및 진행되는 것으로 알려져 있고, 이들 중 병원체 요인에 속하는 치면세균막내 세균이 주요한 원인인 것으로 알려져 있다. 즉, 치아우식증은 일종의 세균 감염성질환이라고 할 수 있다. 현재 구강 내에는 500여 종의 세균이 존재하는 것으로 알려져 있으며(Paster et al., 2001), 이들 중 치아우식증의 주요한 원인균들을 mutans streptococci(뮤탄스 연쇄상구균)라고 총칭한다(Whiley and Beighton, 1998). 이러한 뮤탄스 연쇄상구균에는 *Streptococcus sobrinus*, *S. mutans*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. downei*, *S. macacae* 및 *S. ferus* 등이 속한다(Whiley and Beighton, 1998). Kawamura 등(1995)은 16S 라이보솜 RNA 유전자(16S rDNA)의 핵산염기서열을 바탕으로 구강 내 존재하는 연쇄상구균을 6 가지 그룹으로 분류하였으며, 전술한 뮤탄스 연쇄상구균들 중 *S. macacae*와 *S. ferus*를 제외한 5가지 균종이 유전학적으로도 가장 가까운 것으로 분류하였다.

특정 세균감염성질환의 병원성세균을 검출하는 방법으로는 병소 샘플에서 현미경을 이용하여 직접 관찰하는 방법, 세균배양법, 생화학 검사법, 간접면역형광법, DNA 프로브법, 중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction, PCR) 등이 있다. 이러한 방법들 중 뮤탄스 연쇄상구균은 선택배지인 mitis-salivarius bacitracin(MSB) agar(Gold et al., 1973)를 이용하여 분리 동정할 수 있다. 하지만, 이러한 전통적인 방법은 비교적 정확하지 않고, 시간과 노동력이 많이 든다는 단점이 있다. 또한 최근의 연구에 의하면 MSB 배지에서 뮤탄스 연쇄상구균이 아닌 *S. anginosus*, *S. sanguinis*, *Pantoea agglomerans* 등의 균종들도 자란다는 것이 보고되었다(Yoo et al., 2005). 따라서, 이러한 세균배양법의 단점을 보완할 수 있는 새로운 뮤탄스 연쇄상구균 검출법이 필요하다고 할 수 있다.

현재까지 개발된 세균 동정법 중에서 가장 신속하고 정확한 방법이 중합효소연쇄반응법이다. PCR법은 표적이 되는 유전자의 핵산염기서열을 바탕으로 한 쌍의 프라이머를 설계 및 제작하여 denaturation (변성, 94°C-98°C), annealing(결합, 37°C-65°C),

elongation(중합, 72°C)의 단계를 약 30회 반복하여 특정 크기의 증폭물을 얻는 방법이다. 유전질환이나 세균감염성질환의 원인 유전자 및 원인균의 검출에 많이 이용되고 있다. 현재 세균의 종 수준에서 동정을 위해 가장 많이 이용되는 표적유전자가 16S rDNA이다(Tanner et al., 1994). 16S rRNA는 구조 RNA로서 진화하는 동안 종 수준에서 잘 보존된 유전자이고, 1.5 kbp의 크기를 가지고 있으며, 모든 세균 종에서 잘 보존된 부위와 상이한 부위가 존재하기 때문에 모든 세균을 검출할 수 있는 PCR 프라이머와 특정 균종만을 동정할 수 있는 PCR 프라이머를 설계하기 용이하다(Tanner et al., 1994). 이러한 특징이 있기 때문에 구강 내 세균 종을 검출 및 동정할 수 있는 프라이머들이 많이 개발되었다(Ashimoto et al., 1996; Rupf et al., 2001).

최근 Sato 등(2001)에 의해 *S. sobrinus*를 검출하기 위한 PCR 프라이머(sm1과 sm2)가 16S rDNA 염기서열을 바탕으로 개발되었다. Sato 등(2003)은 민감도(sensitivity, PCR 프라이머로 검출할 수 있는 세균 유전체 DNA의 최소한의 양)를 높이기 위해 nested PCR을 시행하여 *S. mutans* NCTC 10449 균주 유전체 DNA 100 fg까지 검출할 수 있음을 보고하였다. *S. mutans* 유전체 DNA가 약 2 Mbp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>)이기 때문에 이는 *S. mutans* 50마리까지 검출이 가능하다는 것을 의미한다. 하지만, direct PCR에 의해 *Actinobacillus actionmycetemcomitans* 균주 10마리까지 검출할 수 있는 PCR 프라이머가 보고(Kim et al., 2005)된 점을 고려하면, nested PCR에 의해서는 균주 1마리까지 검출할 수 있을 것으로 생각된다. 그러므로, 본 연구는 Sato 등(2001, 2003)의 것보다 민감도가 뛰어난 프라이머 쌍을 개발하고자 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

II-1. 세균 및 배양 조건

본 연구에 이용한 세균 균주들은 Table 1과 같다. 이들 균주들은 American Type Culture Collection(ATCC, University Boulevard, Manassas, VA, USA) 또는 Korean Collection for Type Cultures(KCTC, Daejeon, Korea)에서 구입하거나 한국구강미생물 자원은행(Korean Collection for Oral Microbiology, College of Dentistry, Chosun University, Gwangju, Korea)에서 무상 분양받아 사용하였다. 이들 세균들 중 연쇄상구균들과 포도상구균은 Todd Hewitt broth(TH broth, Difco Diagnostics, Detroit, MI, USA) 또는 TH broth에 1.5% Bacto agar(Difco Diagnostics)를 첨가하여 만든 TH agar에 접종하여 37°C 세균배양기에서 24시간 배양하여 사용하였다. *F. nucleatum* 균주는 Schaedler broth(Difco Diagnostics)에, *A. actinomycetemcomitans* 균주들은 Trypticase Soy Broth(TSB, Difco Diagnostics)에 0.6% yeast extract(Difco Diagnostics), 5% horse serum(Difco Diagnostics), 75 µg/ml bacitracin(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) 및 5 µg/ml vancomycin(Sigma Chemical Co.)이 첨가된 배지에, 그리고 *Prevotella intermedia* 및 *Prevotella nirescens* 균주들은 TSB에 0.5% yeast extract, 0.05% cysteine HCl-H₂O, 0.5 mg/ml hemin 및 2 µg/ml vitamin K₁이 첨가된 배지에 접종하여 85% N₂, 10% CO₂, 5% H₂가 공급되는 37°C 혐기성 세균배양기에서 1-2일간 배양하여 다음 실험에 사용하였다.

II-2. 세균 유전체 DNA의 추출

세균 배양액 1.5 ml를 10,000x g의 원심력을 이용하여 수확하고, 이를 인트론사(iNtRON Co., Seoul, Korea)의 G-spinTM Genomic DNA Extraction Kit를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 세균 유전체 DNA를 추출하였다. 즉, 수확한 세균에 50 µl의 Pre-incubation solution과 3 µl의 lysozyme solution을 넣고 잘 혼합한 다음 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 여기에 250 µl의 G-buffer solution을 넣고 잘 혼합한 후 65°C에서 15분간 반응시키고, 250 µl의 Binding solution을 넣고 잘 혼합한

다음 vortexing하였다. 이러한 cell lysates를 G-spin™ column에 넣고 13,000 rpm에서 1 분간 원심분리하였다. Column에 500 μ l의 washing buffer A를 넣고 다시 1분간 원심분리하였다. 여기에 500 μ l의 washing buffer B를 넣고 다시 1분간 원심분리하고, G-spin™ column을 새로운 eppendorf tube에 넣고 100 μ l의 elution buffer를 넣고 1분간 실온에 방치한 다음 13,000 rpm에서 1 분간 원심분리하여 세균 유전체 DNA를 추출하였고, 이를 4°C에 보관하여 다음 실험에 사용하였다.

II-3. PCR 프라이머 쌍의 설계 및 제작

GenBank의 데이터 베이스에서 기존에 이미 알려진 *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. downei*, *S. rattus* 및 *S. cricetus*의 16S rRNA 핵산염기서열을 얻었다. 이를 MegAlign 컴퓨터 프로그램(Lasergene, DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)을 이용하여 상동성을 분석하였고, *S. sobrinus* 16S rDNA 염기서열을 바탕으로 하고, PrimerSelect 프로그램(DNASTAR Inc.)에서 프라이머 쌍을 설계하여 ChDC-SmF2와 ChDC-SmR2로 명명하였다(Table 2). 이 때 설계된 프라이머 쌍은 미국 미시간 주립 대학에서 제공하는 Probe Match 프로그램 (<http://rdp8.cme.msu.edu/html/analyses.html>)을 이용하여 종-특이성을 분석하였고, Bioneer사(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 프라이머 쌍을 제작하였다. 예상되는 PCR 증폭물의 크기는 356 bp이다(Fig. 1).

II-4. PCR 프라이머의 특이도 및 민감도 측정

앞에서 설계된 *S. mutans* 검출 및 동정을 위한 프라이머 쌍의 종-특이성을 알아보기 위하여, Table 1과 같이 *S. mutans* 표준균주(ATCC 25175^T) 및 한국인에서 분리 동정된 10균주를 포함하여 이와 유전학적으로 가장 가까운 4종의 류탄스 연쇄상구균의 표준균주들과 3종의 구강 내 다른 연쇄상구균의 표준균주 및 4종의 혐기성 세균의 표준균주 유전체 DNA를 주형으로 하여 PCR을 시행하였다.

먼저 결합 온도의 최대 한계를 알아보기 위하여 gradient PCR을 시행하였다. 이때 결합 온도는 55°C-70°C 사이를 12 단계로 나누어 시행하였고, PCR은 AccuPower[®]

PCR PreMix(Bioneer Corp.)와 Peltier thermal cycler(Model PTC-200 DNA engine™, MJ Research Inc., Watertown, MA, USA)를 이용하여 시행하였다. *AccuPower*® PCR PreMix에는 5 nmole씩의 4가지 deoxynucleoside triphosphate, 0.8 mole의 KCl, 0.2 mole 의 Tris-HCl(pH 9.0), 0.03 mole의 MgCl₂ 그리고, 1 unit의 *Taq* DNA polymerase가 들어있다. 여기에 2 ng의 세균 유전체 DNA와 20 pmoles의 ChDC-SmF2와 ChDC-SmR2 프라이머를 넣고 PCR을 시행하였다. 이 때 PCR 조건은 다음과 같았다. 초기 변성은 94°C에서 5분간 시행하였고, 변성(94°C, 30분), 결합(55°C -70°C, 30초) 및 중합(72°C, 30초)의 세 과정을 32회 반복하고, 추가적인 중합(72°C, 30초)을 10분간 시행하였다.

ChDC-SmF2와 ChDC-SmR2 프라이머 쌍만을 이용한 direct PCR과 대부분의 세균 종의 16S rDNA를 증폭할 수 있는 27F와 1942R을 이용하여 *S. mutans* ATCC 25175^T의 16S rDNA를 증폭하고, 이 증폭물을 10배 희석한 후 ChDC-SmF2와 ChDC-SmR2 프라이머 쌍을 이용하여 nested PCR 각각의 민감도(sensitivity)를 측정하였다. 이때 *S. mutans* ATCC 25175^T 유전체 DNA는 2 ng에서 2 fg까지 10배씩 희석하여 사용하였다. PCR은 전술한 바와 같이 *AccuPower*® PCR PreMix(Bioneer Corp.)와 PTC-200 DNA engine™(MJ Research Inc.)을 이용하여 시행하였다.

PCR이 끝난 후 20 μ l의 반응물중 2 μ l를 1.5% agarose gel과 Tris-acetate buffer(0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA, [pH8.0])를 이용해서 100 V에서 30분간 전기영동하였다. 증폭물은 ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator로 발색시켜 크기를 확인하였다.

II-5. 치면세균막에서 *S. mutans*의 동정

Lim 등(2005)의 연구에서 세균배양법에 의한 *S. mutans* 검출에 사용되었던 치면세균막 샘플을 이용하여, 본 연구에서 개발된 프라이머 쌍의 효용성을 알아보았다. Lim 등(2005)의 연구에서 *S. mutans*가 분리 동정된 치면세균막 샘플을 direct DNA 추출법(Lee et al., 1998)에 의해 세균 유전체 DNA를 추출하였다. 전술한 nested PCR 법에 의해 치면세균막 샘플 내의 *S. mutans*의 존재 유무를 확인하였다.

Table 1. Bacterial strains used in this study

Species	Strain	Descriptions
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175 ^T	Type strains
<i>S. mutans</i>	ChDC YM2 (=KCOM 1053)	Clinical isolate
<i>S. mutans</i>	ChDC YM4 (=KCOM 2759)	Clinical isolate
<i>S. mutans</i>	ChDC YM6 (=KCOM 1076)	Clinical isolate
<i>S. mutans</i>	ChDC YM9 (=KCOM 1055)	Clinical isolate
<i>S. mutans</i>	ChDC YM12 (=KCOM 1089)	Clinical isolate
<i>S. mutans</i>	ChDC YM15 (=KCOM 1082)	Clinical isolate
<i>S. mutans</i>	ChDC YM20 (=KCOM 1085)	Clinical isolate
<i>S. mutans</i>	ChDC YM22 (=KCOM 1086)	Clinical isolate
<i>S. mutans</i>	ChDC YM25 (=KCOM 1087)	Clinical isolate
<i>S. mutans</i>	ChDC YM27 (=KCOM 1089)	Clinical isolate
<i>Streptococcus sobrinus</i>	ATCC 33478 ^T	Type strains
<i>S. sobrinus</i>	ChDC YS1 (=KCOM 1061)	Clinical isolate
<i>S. sobrinus</i>	ChDC YS2 (=KCOM 1148)	Clinical isolate
<i>S. sobrinus</i>	ChDC YS3 (=KCOM 1149)	Clinical isolate
<i>S. sobrinus</i>	ChDC YS4 (=KCOM 1150)	Clinical isolate
<i>S. sobrinus</i>	ChDC YS5 (=KCOM 1151)	Clinical isolate
<i>S. sobrinus</i>	ChDC YS6 (=KCOM 1152)	Clinical isolate
<i>S. sobrinus</i>	ChDC YS7 (=KCOM 1153)	Clinical isolate
<i>S. sobrinus</i>	ChDC YS8 (=KCOM 1154)	Clinical isolate
<i>S. sobrinus</i>	ChDC YS9 (=KCOM 1155)	Clinical isolate
<i>S. sobrinus</i>	ChDC YS11 (=KCOM 1157)	Clinical isolate
<i>Streptococcus downei</i>	KCTC 3634 ^T	Type strains
<i>Streptococcus rattus</i>	KCTC 3655 ^T	Type strains
<i>Streptococcus cricetus</i>	KCTC 3640 ^T	Type strains
<i>Streptococcus anginosus</i>	ATCC 33397 ^T	Type strains
<i>Streptococcus thermophilus</i>	KCTC 3658 ^T	Type strains
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCTC 1621 ^T	Type strains
<i>Streptococcus mitis</i>	KCTC 3556 ^T	Type strains
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ATCC 25586 ^T	Type strains
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	ATCC 33384 ^T	Type strains
<i>Prevotella intermedia</i>	ATCC 25611 ^T	Type strains
<i>Prevotella nigrescens</i>	ATCC 33563 ^T	Type strains

ATCC, American Type Culture Collection; ChDC, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University; KCOM, Korean Collection for Oral Microbiology; KCTC, Korean Collection for Type Cultures.

Table 2. PCR primers designed in this study for the detection of *S. mutans*

Name	oligonucleotide sequence (5' → 3')	Base position (nt)*
ChDC-SmF2	TGG GAC GCA AGG GAA CAC A	35-53
ChDC-SmR2	GCG GCG TTG CTC GGT CAG A	390-372

*Base positions of primers are from *S. mutans* ATCC 25175^T

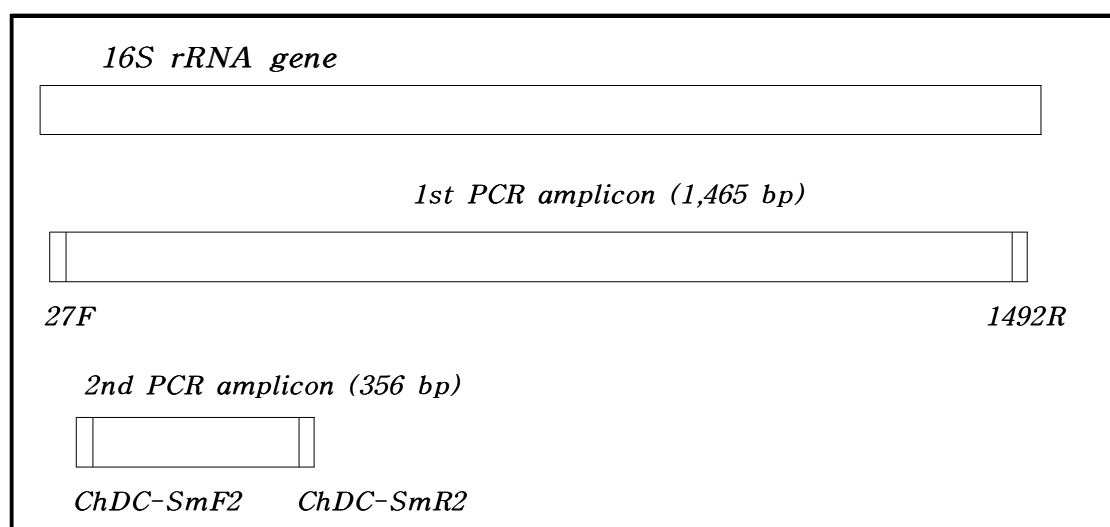


Fig. 1. Schematic diagram for the amplified region of the 16S rDNA of *Streptococcus mutans*.

III. 연구 결과

III-1. 최적의 PCR 조건 결정 및 ChDC-SmF2와 ChDC-SmR2 프라이머 쌍의 종-특이성

본 연구에서 설계된 ChDC-SmF2와 ChDC-SmR2 프라이머 쌍의 결합 온도 한계를 알아보기 위해 gradient PCR을 시행하였다. 그 결과 70°C에서도 원하는 크기의 PCR 산물이 증폭되었다(Fig. 2).

본 연구에서 설계된 ChDC-SmF2와 ChDC-SmR2의 *S. mutans*에 대한 종-특이성을 *S. mutans*의 표준균주 및 임상분리균주들과 더불어 구강 내 존재하는 연쇄상구균(*S. downei*, *S. rattus*, *S. mitis*, *S. cricetus*, *S. anginosus*, *S. thermophilus*), 포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 및 혐기성 그람 음성 세균 종들(*F. nucleatum*, *P. nigrescens*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*)의 표준균주 유전체 DNA를 대상으로 PCR을 시행한 결과 *S. mutans* 균주들에서만 예상한 것과 같은 356 bp의 증폭물이 증폭되었다(Fig. 3). 이 때 최적의 결합 온도는 70°C였으며, 이보다 낮은 온도에서는 *S. rattus*에서 비 특이적 PCR 산물이 증폭되었다. 이러한 결과를 바탕으로, 본 연구에서 ChDC-SmF2와 ChDC-SmR2 프라이머 쌍을 이용한 PCR에서는 70°C를 에서 시행하였다.

III-2. ChDC-SmF2와 ChDC-SmR2 프라이머 쌍의 민감도(sensitivity) 측정

ChDC-SmF2와 ChDC-SmR2 프라이머 쌍의 *S. mutans* ATCC 25175^T 유전체 DNA를 증폭할 수 있는 최소한의 양(민감도)은 2 pg이었다(Fig. 4). 모든 세균 종의 16S rDNA 대부분을 증폭할 수 있는 27F와 1492R 프라이머 쌍으로 일차 PCR(direct PCR)을 시행한 후, 그 PCR 산물을 주형으로 이용하여 ChDC-SmF2와 ChDC-SmR2 프라이머 쌍으로 2번째 PCR(nested PCR)을 시행한 결과 *S. mutans* ATCC 25175^T 유전체 DNA 2 fg까지 검출 할 수 있었다(Fig. 5).

III-2. ChDC-SmF2와 ChDC-SmR2 프라이머 쌍의 효능성 검증

ChDC-SmF2와 ChDC-SmR2 프라이머 쌍의 효능성을 검증하기 위하여 *S. mutans* 배양에 성공한 치면세균막 샘플에서 nested PCR을 시행한 결과, 모든 샘플에서 *S. mutans* 종-특이 PCR 산물이 증폭되었다(Fig. 6과 Table 3).

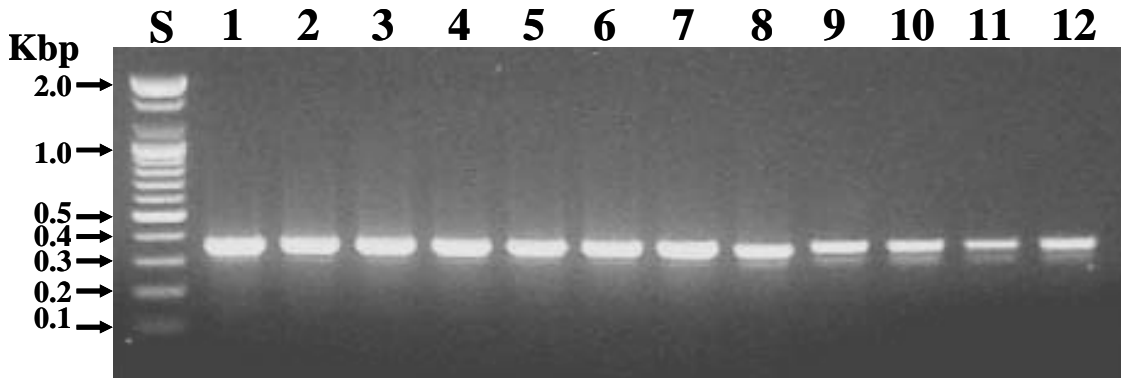


Fig. 2. Gradient PCR for optimized annealing temperature of the primers (ChDC-SmF2 and ChDC-SmR2). The PCR reactions were electrophoresed in 1.5% agarose gel. A 2 ng of each of bacterial genomic DNA was used as PCR template. Lanes: S, 100 base pair DNA ladder (Bioneer Corp.); 1, 55°C; 2, 55.4°C; 3, 56.2°C; 4, 57.5°C; 5, 59.2°C; 6, 61.4°C; 7, 63.9°C; 8, 66.1°C; 9, 67.7°C; 10, 68.9°C; 11, 69.7°C; 12, 70°C.

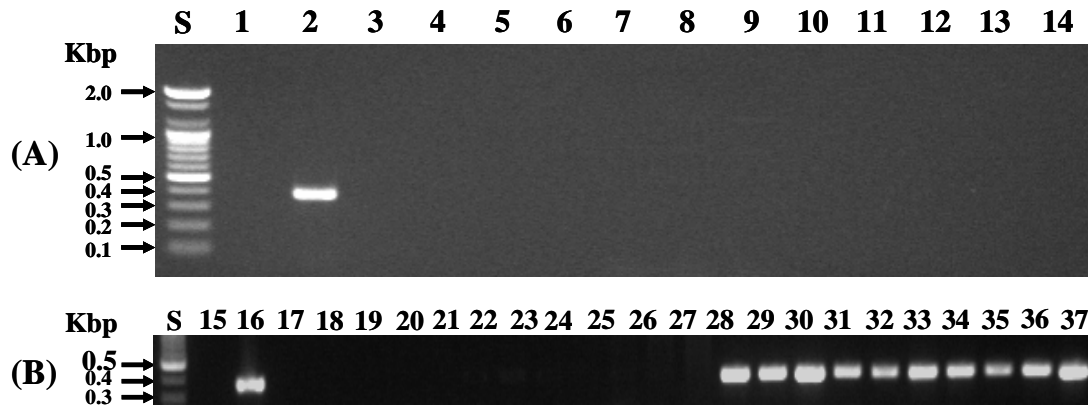


Fig. 3. Specificity test of PCR with the ChDC-SmF2 and ChDC-SmR2 and purified genomic DNA of (A) the type strains and (B) the clinical isolates. 2 ng of each bacterial genomic DNA were used as PCR templates. The PCR reactions were electrophoresed in 1.5% agarose gel. Lanes: S, 100 base pair DNA ladder (Bioneer Corp.); 1 and 15, DDW; 2 and 16, *Streptococcus mutans* ATCC 25175^T; 3 and 17, *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478^T; 4, *Streptococcus downei* KCTC 3634^T; 5, *Streptococcus rattus* KCTC 3655^T; 6, *Streptococcus cricetus* KCTC 3640^T; 7, *Streptococcus anginosus* ATCC 33397^T; 8, *Streptococcus thermophilus* KCTC 3658^T; 9, *Streptococcus aureus* KCTC 1621^T; 10, *Streptococcus mitis* KCTC 3556^T; 11, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586^T; 12, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC 33384; 13, *Prevotella intermedia* ATCC 25611^T; 14, *Prevotella nigrescens* ATCC 33563^T; 18-27, *Streptococcus sobrinus* ChDC YS1, ChDC YS2, ChDC YS3, ChDC YS4, ChDC YS5, ChDC YS6, ChDC YS7, ChDC YS8, ChDC YS9, and ChDC YS11, respectively; 28-37, *Streptococcus mutans* ChDC YM2, ChDC YM4, ChDC YM6, ChDC YM9, ChDC YM12, ChDC YM15, ChDC YM20, ChDC YM22, ChDC YM25, and ChDC YM27, respectively.

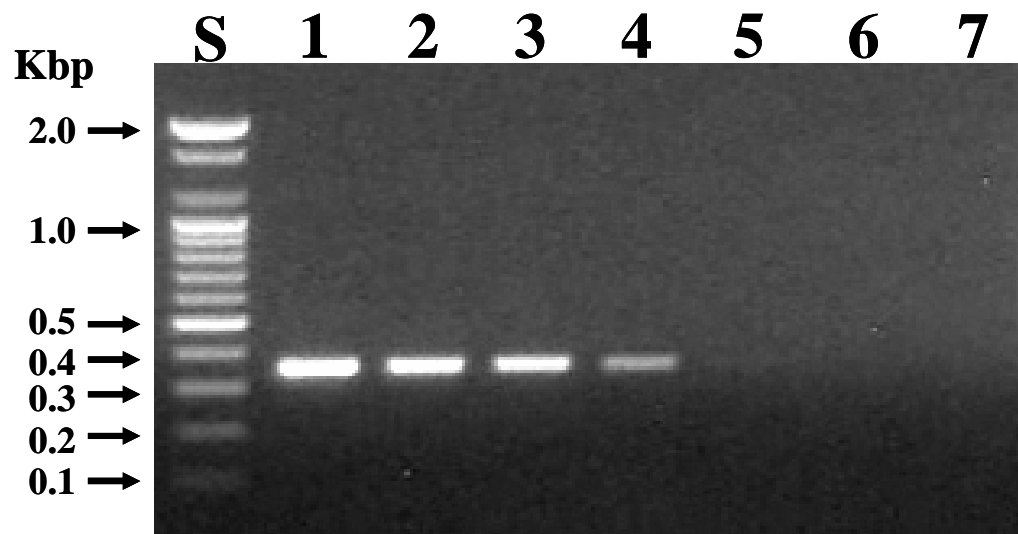


Fig. 4. Sensitivity of direct PCR with the ChDC-SmF2 and ChDC-SmR2 primers for the detection of purified genomic DNA from *S. mutans* ATCC 25175^T. The PCR products were electrophoresed in 1.5% agarose gel. Lanes: S, 100 base pair DNA ladder (Bioneer Corp.); 1-7, purified genomic DNA serially diluted 10 fold from 2 ng to 2 fg.

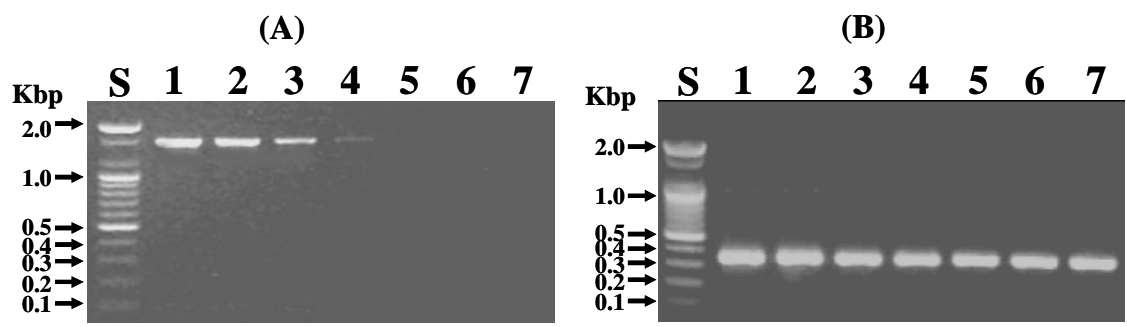


Fig. 5. The detection limits of nested PCR amplification with (A) 27F and 1492R primers and purified genomic DNA of *S. mutans* ATCC 25175^T or (B) ChDC-SmF2 and ChDC-SmR2 primers and 10-fold dilutant of the 1st PCR. The PCR products were electrophoresed in 1.5% agarose gel. Lanes: S, 100 base pair DNA ladder (Bioneer Corp.); 1-7, purified genomic DNA serially diluted 10 fold from 2 ng to 2 fg.

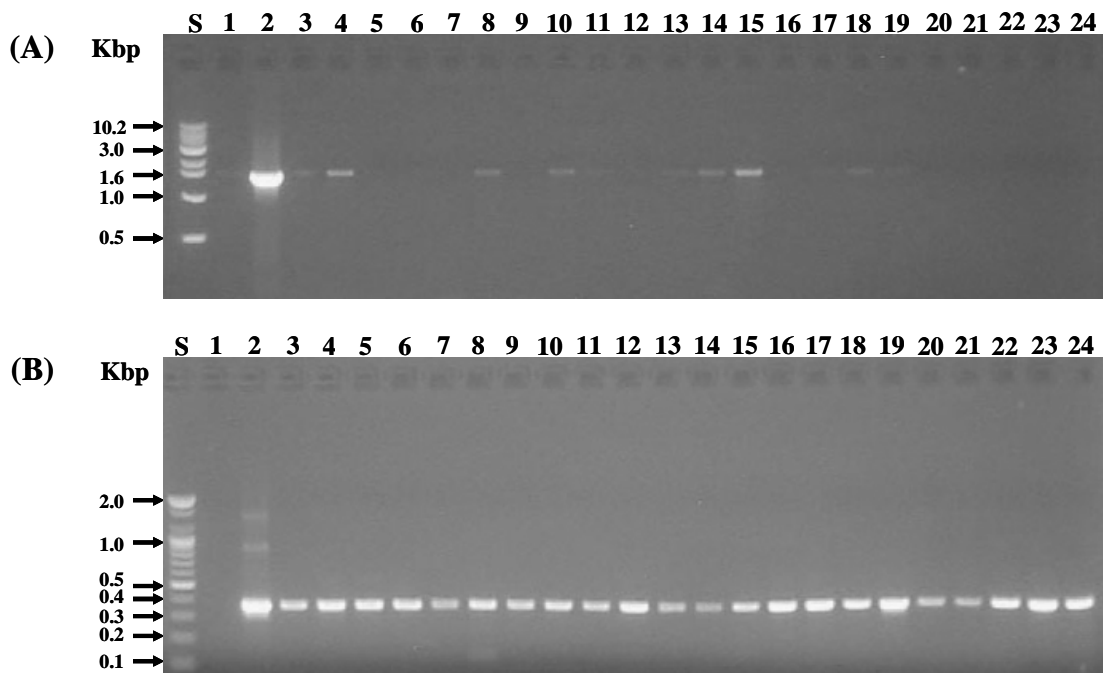


Fig. 6. Detection of the *S. mutans* from the dental plaque samples. (A) The first PCR was performed with 27F and 1492R primers and dental plaques. (B) The nested PCR was performed with the 10-fold dilutant of the first amplification mixture (2 μ l) and ChDC-SmF2 and ChDC-SmR2 primers. The PCR reactions were electrophoresed in 1.5% agarose gel. Lanes: S, 1 kbp (A) or 100 bp (B) DNA ladder (Bioneer Corp.); 1. DDW; 2. *S. mutans* ATCC 25175^T; 3. No.1; 4. No.2; 5. No. 3; 6. No.4; 7. No.9; 8. No.10; 9. No.13; 10. No.14; 11. No.16; 12. No.20; 13. No.21; 14. No.22; 15. No.25; 16. No.31; 17. No.32; 18. No.35; 19. No.36; 20. No.37; 21. No.38; 22. No.40; 23. No.41; 24. No.42.

Table 3. Comparison of cell culture and nested PCR methods for the detection of *Streptococcus mutans* from the dental plaques

Sample No.(Lim <i>et al.</i> , 2005)	Gender (year, month)	Detection of <i>Streptococcus mutans</i>	
		Cell culture (Lim <i>et al.</i> , 2005)	Nested PCR
1	Male (19, 10)	+	+
2	Male (26, 2)	+	+
3	Male (28, 0)	+	+
4	Female (29, 4)	+	+
9	Female (15,0)	+	+
10	Female (21, 3)	+	+
13	Male (20, 9)	+	+
14	Male (27, 11)	+	+
16	Male (18, 11)	+	+
20	Male (15, 3)	+	+
21	Female (15, 3)	+	+
22	Male (17, 1)	+	+
25	Male (19, 4)	+	+
31	Female (21, 7)	+	+
32	Female (22, 7)	+	+
35	Female (21, 8)	+	+
36	Female (21, 3)	+	+
37	Female (15, 9)	+	+
38	Male (14, 4)	+	+
40	Female (20, 6)	+	+
41	Female (22, 7)	+	+
42	Female (26, 10)	+	+

IV. 총괄 및 고안

본 연구 결과에 의하면, ChDC-SmF2와 ChDC-SmR2 프라이머 쌍은 nested PCR에 의해서는 *S. mutans* ATCC 25175^T 유전체 DNA를 2 fg까지 검출할 수 있을 만큼 민감도가 뛰어나고, *S. mutans*와 유전학적으로 가장 가까운 *S. rattus*를 포함한 다른 류탄스 연쇄상구균들의 유전체 DNA와 구별할 수 있는 뛰어난 특이도를 가지고 있었다. 이는 최근 Sato 등(2003)에 의해 개발된 nested PCR보다 민감도가 50배 높은 것이다. Sato 등(2003)의 연구에서는 16S rDNA를 증폭한 첫 번째 PCR의 증폭반응물을 희석하지 않고 1 μ l를 nested PCR에 주형으로 사용하였고, 35 cycles로 PCR을 시행한 점을 감안한다면, 본 연구에서 개발된 ChDC-SmF2와 ChDC-SmR2 프라이머 쌍은 *S. mutans*의 검출에 있어서 특이도가 뛰어나고 민감도가 높게 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 치면세균막 샘플을 이용한 *S. mutans* 동정 결과도 세포 배양법에 의한 방법에서와도 동일한 결과(Table 3)를 보였기 때문에, 역학연구에 있어서 본 연구에서 개발된 프라이머 쌍이 유용하게 이용되리라 생각된다.

본 연구에서 확립한 nested PCR법은 첫 번째 PCR에서 모든 세균 종으로부터 16S rDNA를 증폭할 수 있는 프라이머 쌍으로 증폭한 다음, *S. mutans* 종-특이 프라이머 쌍으로 두 번째 PCR을 시행하였고, 이 증폭물을 10배 희석해서 사용하였기 때문에 *S. mutans* 이외의 구강 내 많은 세균종의 검출에 다시 이용할 수 있어, 한번의 샘플링으로 치아우식증뿐만 아니라 치주질환을 포함한 여러 구강 내 감염성질환의 원인균도 검출할 수 있는 장점이 있다.

치아우식증의 주요한 원인균이라 알려진 류탄스 연쇄상구균의 치아우식증과의 역학관계 연구 및 치아우식활성검사 등의 목적을 위해 많은 방법들이 고안되어 사용되고 있다. 가장 고전적인 방법은 타액이나 치면세균막 샘플을 류탄스 연쇄상구균의 선택배지인 MSB agar plate(Gold et al., 1973)에 도말하여 균락의 모양과 생화학적 검사를 시행하는 것이다(Beighton et al., 1991). 세균배양법을 기본으로 하는 이러한 방법은 많은 시간과 노동력이 필요로 하는 단점이 있다. 또한 최근 Yoo 등(2005)의 보고에 의하면, MSB 배지에서 류탄스 연

쇄상구균뿐만 아니라 *S. anginosus*, *S. sanguinis*, *Pantoea agglomerans* 균종들도 배양된다고 보고되었다. 그러므로 이러한 방법들보다 간편하고, 정확성이 뛰어난 방법들이 필요하며, 이를 위해 DNA 프로브법(Ida *et al.*, 1999)과 PCR법(Igarashi *et al.*, 2001; Igarashi *et al.*, 2000; Oho *et al.*, 2000; Poyart *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2003)이 개발되었다. 이들 중 DNA 프로브법은 시간, 노동력 및 경제적 측면에서 PCR법에 비해 비효과적인 단점이 있다. 그러므로, 특이도와 민감도가 뛰어난 PCR법이 많이 개발되고 또한 역학연구에 많이 이용되고 있다. 현재 *S. sobrinus*를 검출 및 동정하기 위해 이용되는 표적 유전자로는 glucosyltransferase, dextranase, manganese 의존성 superoxide dismutase 및 16S rRNA 유전자들이 있다. 이들 중 16S rRNA 유전자만이 구조 유전자이고, 나머지는 특정 화학반응을 촉매하는 기능 유전자들이다. 특히 기능 유전자들은 모든 세균 종에 존재하는 것이 아니고, 경우에 따라서는 유전학적으로 매우 유사한 균종들간에 존재 유무가 달라 쉽게 균종들을 구별하는 데 이용할 수 있다는 장점이 있다. 그 대표적인 예가 *S. intermedius*와 *S. constellatus*를 구별하기 위한 프라이머 쌍이다(Takao *et al.*, 2004). 즉, *S. intermedius*와 *S. constellatus* 두 세균 종은 연쇄상구균 속 중 *anginosus* 그룹에 속하고, 그들의 16S rDNA 염기서열이 99% 동일하여, 이로는 두 균종을 구별할 수가 없다. 하지만, *S. intermedius*는 *S. constellatus*와는 달리 *intermedilysin(ily)* 유전자를 가지고 있어 이를 이용한 PCR법으로 두 균종을 쉽게 구별할 수 있다. 하지만, 이러한 기능 유전자를 이용하는 방법은 임상균주에 따라 DNA 수준에서 돌연변이가 잘 일어날 가능성이 많기 때문에 이럴 경우 표적을 삼았던 균종의 검출이 위음성으로 나타날 수 있다는 단점이 있다. 반면에 구조 유전자인 16S rRNA 유전자는 돌연변이가 잘 일어나지 않고, 진화론적 측면에서 종간에 잘 보존 된다는 장점이 있다.

Igarashi 등(2001)은 *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. downei*, *S. rattus* 및 *S. cricetus* 5종의 dextranase 유전자 핵산염기서열을 바탕으로 설계된 프라이머 쌍을 이용하여 중합효소연쇄반응을 실시하고, 이들의 반응산물을 *HaeIII* 제한효소로 절단한 다음 이들의

제한효소절편길이다양성을 전기영동으로 관찰하여 이들을 동시에 동정하는 방법을 개발하였다. 하지만, 이러한 방법은 중합효소연쇄반응을 시행한 다음, 그 증폭 산물을 다시 제한효소로 절단해야하는 번거로움이 있고, 사람의 구강 내에서는 주로 *S. mutans* 와 *S. sobrinus* 두 종이 주로 존재하기 때문에 굳이 5종 모두를 개별적으로 구별해야 할 필요성이 있는 경우가 아니라면, 위에 소개한 종-특이 중합효소연쇄반응 프라이머 쌍을 이용하는 방법이 더욱 효과적이라 생각된다.

이상의 결과를 종합하면, 본 연구에서 개발된 ChDC-SmF2와 ChDC-SmR2 프라이머 쌍들은 *S. mutans* 균주를 종-특이적으로 동정 및 검출할 수 있고, 높은 민감도를 가지고 치면세균막에서도 *S. mutans* 균주를 검출할 수 있어 치아우식증의 역학연구 및 병인론 연구에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결론

본 연구는 치아우식증의 주요한 원인균 중 하나인 *S. mutans*를 종 수준에서 특이적이고, 민감도가 뛰어난 PCR 프라이머 쌍을 개발하고자 시행하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *S. mutans*의 표준균주(ATCC 25715^T)의 16S rDNA 염기서열을 바탕으로 ChDC-SmF2와 ChDC-SmR2 프라이머 쌍을 설계하였다.
2. *S. mutans* 11 균주와 구강 내 12개 세균 종(22 균주)의 유전체 DNA를 대상으로 PCR을 시행한 결과 ChDC-SmF2와 ChDC-SmR2 프라이머 쌍은 *S. mutans* 균주들에서만 예상한 것과 같은 356 bp의 증폭물을 증폭시켰다.
3. ChDC-SmF2와 ChDC-SmR2 프라이머 쌍이 *S. mutans* ATCC 25715^T 유전체 DNA를 증폭할 수 있는 최소의 양은 2 pg이었으며, nested PCR에 의해서는 2 fg 까지 증폭시켰다.
4. ChDC-SmF2와 ChDC-SmR2 프라이머 쌍을 이용한 PCR결과 치면세균막 샘플에서도 *S. mutans*를 세포배양법의 결과와 일치하게 검출할 수 있음이 확인되었다.

이상의 결과를 종합할 때, 본 연구에서 개발된 ChDC-SmF2와 ChDC-SmR2 프라이머 쌍들은 *S. mutans* 균주를 종-특이적으로 동정 및 검출할 수 있고, 높은 민감도를 가지고 치면세균막에서도 *S. mutans* 균주를 검출할 수 있어 치아우식증의 역학연구 및 병인론 연구에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Ashimoto, A., C. Chen, I. akker, and J. Slots. 1996. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol. Immunol.* 11, 266-73.
- Beighton, D., R.R.B. Russell, and R.A. Whiley. 1991. A simple biochemical for the differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. 25, 174-178.
- Gold, O.G., H.V. Jordan, and J. Van Houte. 1973. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 18, 1357-64.
- Ida H., T. garashi, A. Yamamoto, N. Goto, and R. Sasa. 1999. A DNA probe specific to *Streptococcus sobrinus*. *Oral Microbiol. Immunol.* 14, 233-7.
- Igarashi, T., K. Ichikawa, A. Yamamoto, and N. Goto. 2001. Identification of mutans streptococcal species by the PCR products of the *dex* genes. *J. Microbiol. Methods.* 46, 99-105.
- Igarashi, T., A. Yamamoto, and N. Goto. 2000. PCR for detection and identification of *Streptococcus sobrinus*. *J. Med. Microbiol.* 49, 1069-74.
- Jordan, H.V. 1986. Cultural methods for the identification and quantitation of *Streptococcus mutans* and lactobacilli in oral samples. *Oral Microbiol. Immunol.* 1, 23-30.
- Kawamura, Y., X.G. Hou, F. Sultana, S. Liu H. Yamamoto, and T. Ezaki. 1995. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 406-408. Erratum in: *Int. J. Sys. Bacteriol.* 1995. 45, 882.
- Kim, S.-G., S.-H. Kim, M.-K. Kim, H.-S. Kim, and J.-K. Kook. 2005. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using species-specific 16S rDNA primers. *J. Microbiol.* 43(2), 209-12.

- Lee, S.E., S.Y. Kim, S.J. Kim, H.S. Kim, J.H. Shin, S.H. Choi, S.S. Chung, and J.H. Rhee. 1998. Direct identification of *Vibrio vulnificus* in clinical specimens by nested PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2887-2892.
- Lim, H.H., S.Y. Yoo, K.-W. Kim, and J.-K. Kook. 2005. Frequency of species and biotypes of mutans streptococci isolated from dental plaque in the adolescents and adults. *J. Bacteriol. Virol.* 35, 197-201
- Oho, T., Y., Yamashita, Y. Shimazaki, M. Kushiya, and T. Koga. 2000. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol. Immunol.* 15, 258-62.
- Paster, B.J., S.K. Boches, J.L. Galvin, R.E. Ericson, C.N. Lau, V.A. Levanos, A. Sahasrabudhe, and F.E. Dewhirst. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.* 183, 3770-83.
- Poyart, C., G. Quesne, S. Coulon, P. Berche, P. Trieu-Cuot. 1998. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J. Clin. Microbiol.* 36, 41-7.
- Rupf, S., K. Merte, K. Eschrich, L. Stosser, and S. Kneist. 2001. Peroxidase reaction as a parameter for discrimination of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Caries Res.* 35, 258-64.
- Sato, T., J.P. Hu, J. Matsuyama, and N. Takahashi. 2001. Rapid identification of cariogenic bacteria by 16S rRNA genes PCR-RFLP analysis. *Cariology Today* 2, 8-13.
- Sato, T., J.P. Hu, K. Ohki, M. Yamaura, J. Washio, J. Matsuyama, and N. Takahashi. 2003. Identification of mutans streptococci by restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction-amplified 16S ribosomal RNA genes. *Oral Microbiol. Immunol.* 18, 323-6.
- Sato, T., J. Matsuyama, T. Kumagai, G. Mayanagi, M. Yamaura, J. Washio, N,

- Takahashi. 2003. Nested PCR for detection of mutans streptococci in dental plaque. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 66-9.
- Takao, A., H. Nagamune, and N. Maeda. 2004. Identification of the anginosus group within the genus *Streptococcus* using polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol. Lett.* 233, 83-9.
- Tanner, A., M.F. Maiden, B.J. Paster, and F.E. Dewhirst. 1994. The impact of 16S ribosomal RNA-based phylogeny on the taxonomy of oral bacteria. *Periodontol.* 2000. 5, 26-51.
- Whiley, R.A., and D. Beighton. 1998. Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol. Immunol.* 13, 195-216.
- Yoo, S.Y., P.S. Kim, H.-K. Hwang, S.-H. Lim, K.-W. Kim, S.-J. Choe, B.-M. Min, and J.-K. Kook. 2005. Identification of non-mutans streptococci organisms in dental plaques recovering on mitis-salivarius bacitracin agar medium. *J. Microbiol.*