

2007년도 8월

박사학위논문

Fusobacterium nucleatum subsp.
polymorphum ATCC 10953^T, subsp.
fusiforme ATCC 51190^T 및 subsp. *vincentii*
ATCC 49256^T 균주 특이 중합효소연쇄반응
프라이머 개발

조선대학교 대학원

치 의 학 과

신 환 선

Fusobacterium nucleatum subsp.
polymorphum ATCC 10953^T, subsp.
fusiforme ATCC 51190^T 및 subsp. *vincentii*
ATCC 49256^T 균주 특이 중합효소연쇄반응
프라이머 개발

*Development of strain-specific PCR primers for the
detection of Fusobacterium nucleatum* subsp.
polymorphum ATCC 10953^T, subsp. *fusiforme* ATCC
51190^T and subsp. *vincentii* ATCC 49256^T

2007년 8월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

신 환 선

Fusobacterium nucleatum subsp.
polymorphum ATCC 10953^T, subsp.
fusiforme ATCC 51190^T 및 subsp. *vincentii*
ATCC 49256^T 균주 특이 중합효소연쇄반응
프라이머 개발

지도교수 국 중 기

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2007년 4월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

신 환 선

신환선의 박사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 고영무 인

위 원 전남대학교 교수 강인철 인

위 원 조선대학교 교수 안종모 인

위 원 조선대학교 교수 김도경 인

위 원 조선대학교 교수 국중기 인

2007년 6월 일

조선대학교 대학원

목 차

표목차 -----	ii
도목차 -----	iii
<i>ABSTRACT</i> -----	iv
I. 서론 -----	1
II. 연구재료 및 방법 -----	3
III. 연구결과 -----	9
IV. 총괄 및 고안 -----	15
V. 결론 -----	18
참고문헌 -----	20

표 목 차

Table 1. The type strains of species or subspecies used in this study ----- 4

Table 2. PCR primer sequences used in this study ----- 6

도 목 차

- Fig. 1. Gradient PCR of Fp4-F2/Fp4-R2 primers (A), Fs17-F14/Fs17-R14 primers (B) and Fv35-F1/Fv35-R1 primers (C) ----- 11
- Fig. 2. Specificity test of Fp4-F2/Fp4-R2 primers (A), Fs17-F14/Fs17-R14 primers (B) and Fv35-F1/Fv35-R1 primers (C) with type strains of oral bacteria ----- 12
- Fig. 3. Specificity test of Fp4-F2/Fp4-R2 primers (A), Fs17-F14/Fs17-R14 primers (B) and Fv35-F1/Fv35-R1 primers (C) with clinical isolates of *F. nucleatum* from Koreans ----- 13
- Fig. 4. Sensitivity test of Fp4-F2/Fp4-R2 primers (A), Fs17-F14/Fs17-R14 primers (B) and Fv35-F1/Fv35-R1 primers (C) with the purified genomic DNA of *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T (A), *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T (B) and *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T, respectively ----- 14

ABSTRACT

Development of strain-specific PCR primers for the detection of Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum ATCC 10953^T, subsp. fusiforme ATCC 51190^T and subsp. vincentii ATCC 49256^T

Shin, Hwan Seon

Advisor : Prof. Kook, Joong-Ki, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University.

The objective of this study was to develop strain-specific PCR primers for the *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T and *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T based on the nucleotide sequences of previously reported subsp.-specific DNA probes, Fp4, Fs17 and Fv35, respectively.

The strain-specificity was tested against 10 type strains of *Fusobacterium* spp. or subsp., 36 clinical isolates of *F. nucleatum* from Koreans, and 5 type strains of nonFusobacterial species. The primer sensitivity was determined by testing serial dilutions (2 ng to 2 fg) of the purified genomic DNA of each type strains.

The PCR results showed the 3 pairs of PCR primers(Fp4-F2/Fp4-R2, Fs17-F14/Fs17-R14 and Fv35-F1/Fv35-R1), based on the Fp4, Fs17 and Fv35 nucleotide sequences, could produce the strain-specific amplicons from *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T and *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T, respectively. Regarding sensitivity, Fs17-F14/Fs17-R14 and Fv35-F1/Fv35-R1 could detect as little as 200 fg and 2pg

of each target strains' genomic DNA. The sensitivity of Fp4-F2/Fp4-R2 was 20 pg.

These results indicate that the Fp4-F2/Fp4-R2, Fs17-F14/Fs17-R14 and Fv35-F1/Fv35-R1 could be useful for the identification of *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T and *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T, especially in ascertaining the authenticity of the strains.

I. 서론

치주질환은 치아우식증과 더불어 구강 내에서 가장 빈번하게 발생하는 세균 감염성 질환이다. 구강 내에는 약 500 여 종(species)의 세균이 살고 있고, 이중 약 400 여 종이 치면세균막에 존재한다고 보고되었다(Paster et al., 2001). 치주질환의 발병 및 진행에 관여하는 세균들을 찾으려는 역학연구들이 많은 연구자들에 의해 현재까지 진행되고 있다. 이러한 연구들은 대부분 치주질환에 이환된 치아와 건강한 치아의 치은연하 치면세균막에 존재하는 세균 종을 비교하여, 치주질환에 이환된 부위에서 더욱 높은 빈도로 검출되는 세균을 치주질환의 원인균으로 제시하였다(Dzink et al., 1988; Haffajee and Socransky, 1994; Socransky et al. 1998; Paster et al., 2001; Kumar et al., 2003). 이러한 연구결과를 바탕으로 치주질환과 관련성이 높다고 판단되는 균종들의 표준균주의 독력인자(virulence factor)를 찾거나 치주조직과의 상호작용(bacteria-host interaction)을 연구하여 치주질환을 일으키는 기전(mechanism) 연구가 진행되고 있다(Bartold et al., 1991; Choi et al., 2005).

Fusobacterium nucleatum(*F. nucleatum*)은 그람음성의 방추형 모양인 혐기성 세균으로 치주질환의 중요한 원인균 중 하나로 알려져 있다(Bolstad et al., 1996). *F. nucleatum*은 구강 내 대부분의 세균과 응집할 수 있는 능력이 있어 초기 치면세균막 형성에 관여하는 세균(주로 연쇄상구균 및 방선균)과 혐기성 상태인 후기 치면세균막 형성에 관여하는 세균(주로 그람 음성 혐기성 세균) 간의 가교(bridge) 역할을 하는 것으로 보고되었다(Roberts, 2000). *F. nucleatum*은 치면세균막의 산소를 제거하여 치주질환의 주요한 원인균들인 혐기성 세균들이 서식할 수 있는 혐기성 상태를 유지시켜 주는 역할도 하는 것으로 보고되었다(Diaz et al., 2002). 또한, *F. nucleatum*은 치주질환의 중요한 원인균 중 하나인 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus* 속에서 *Aggregatibacter* 속으로 독립됨; Nørskov-Lauritsen and Kilian, 2006)에 대한 T-cell의 이차 면역반응을 변화시켜, *A. actinomycetemcomitans*가 숙주의 면역계로부터 살아남을 수 있도록 하는 기능도 있음이 보고되었다(Tew et

al., 1987). *F. nucleatum*은 사람의 치은각화상피에 침투하여 pro-inflammatory cytokine의 분비를 유도하고, elastase 및 조직에 독성이 있는 butyric acid와 같은 대사산물을 분비하여 치주조직을 손상시킬 수 있는 것으로 보고되었다(Singer and Buckner, 1981; Han et al., 2000).

현재 *F. nucleatum*은 5가지 아종(*nucleatum*, *polymorphum*, *vincentii*, *fusiform* 및 *animalis*)으로 분류되어 있으며, 이들은 모두 사람의 구강 내에 서식하고 있다(Dzink et al., 1990; Gharbia and Shah, 1992). 하지만, 아직까지 *F. nucleatum*의 어느 아종이 치주질환과 더 밀접한 관련이 있는지는 잘 밝혀져 있지 않다. 이러한 세균-숙주간의 병인론 연구에는 세균 종 또는 아종을 대표하는 표준균주가 주로 이용된다. 그러므로 병인론 연구에 있어서 표준균주의 지속적인 보존이 필수적이며, 이들의 진위 여부를 신속하고 정확하게 분석할 수 있는 방법이 있다면, 병인론 연구를 보다 원활하게 수행할 수 있을 것이다.

최근 *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*의 표준균주인 ATCC 25586^T에 대한 균주 특이 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 균주 특이 PCR 프라이머가 개발되어 소개되었다(Kim et al., 2005). 또한, *F. nucleatum*의 4가지 아종에 대한 아종-특이 DNA 프로브도 보고되었다(Kook et al., 2003). 이는 그들이 소개한 아종 특이 DNA 프로브가 각각의 아종 표준균주에 대한 특이성을 가질 수 있다는 것을 의미한다. 그러므로 본 연구는 Kook 등(2003)이 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T 및 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T에 대한 아종 특이 DNA 프로브라고 발표한 Fp4, Fs17 및 Fv35 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 무작위로 PCR 프라이머를 설계하고 제작하여 각각의 균주에 대한 특이적인 PCR 프라이머를 개발하고자 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 세균 및 세균배양 조건

본 연구에서 사용된 구강 내 서식하는 15개 세균의 종(species) 또는 아종(subspecies)의 표준균주들은 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA) 또는 Culture Collection, University of Göteborg(CCUG, Göteborg, Sweden)에서 구입하였다(Table 1). 한국인의 구강 치은연하세균막에서 분리 동정된 36개의 *Fusobacterium nucleatum* 임상균주들(ChDC F8, ChDC F37, ChDC F38, ChDC F47, ChDC PV-F37, ChDC PV-F42, ChDC PV-F58, ChDC F113, ChDC F119, ChDC F128, ChDC F130, ChDC F145, ChDC F165, ChDC F174, ChDC F206, ChDC F218, ChDC F175, ChDC F186, ChDC F290, ChDC F300, ChDC F305, ChDC F306, ChDC F309, ChDC F310, ChDC F311, ChDC F313, ChDC F326, ChDC F315, ChDC F316, ChDC F317, ChDC F318, ChDC F319, ChDC F324, ChDC F330, ChDC F332 및 ChDC F335)은 Korean Collection for Oral Microbiology(KCOM, Gwangju, Korea)에서 분양받아 사용하였다.

Fusobacterium spp.에 속한 균주들은 Schaedler broth(DIFCO Laboratories, Detroit, MI, USA) 배지에서, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 및 *Tannerella forsythia* 균종에 속하는 균주들은 Trypticase soy broth(DIFCO Laboratories)에 0.5% yeast extract(DIFCO Laboratories), 0.05% cysteine HCl-H₂O(Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.5 mg/ml hemin(Sigma) 및 2 µg/ml vitamin K₁(Sigma)이 첨가된 배지에서 배양 하였다.

A. actinomycetemcomitans 균주는 10% CO₂가 유지되는 배양기에서 배양하였으며, 그 이외의 모든 균주들은 85% N₂, 5% H₂, 10% CO₂의 혼합가스가 공급되는 37°C 혐기성 세균배양기(Model Bactron I, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA)에서 1~3일 동안 배양하여 다음의 실험에 이용하였다.

Table 1. The type strains of species or subspecies used in this study

Species or subspecies
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 ^T
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>fusiforme</i> ATCC 51190 ^T
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>vincentii</i> ATCC 49256 ^T
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 ^T
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i> ATCC 51191 ^T
<i>Fusobacterium canifelinum</i> CCUG 49733 ^T
<i>Fusobacterium periodonticum</i> ATCC 33693 ^T
<i>Fusobacterium necrophorum</i> ATCC 25286 ^T
<i>Fusobacterium naviforme</i> CCUG 50052 ^T
<i>Fusobacterium simiae</i> CCUG 16798 ^T .
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ATCC 33384 ^T
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 ^T
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611 ^T
<i>Prevotella nigrescens</i> ATCC 49046 ^T
<i>Tannerella forsythia</i> ATCC43037 ^T

ATCC, American Type Culture Collection;

CCUG, Culture Collection, University of Göteborg

^T, Type strain.

2. 세균 지놈 DNA의 추출

세균 지놈 DNA는 G-spinTM Genomic DNA Extraction Kit(iNtRON Co., Seoul, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 추출하였다. 즉, 세균 배양액 1.5 ml를 $10,000 \times g$ 의 원심력을 이용하여 세균을 수확한 후 50 μ l의 Pre-incubation solution과 3 μ l의 lysozyme solution을 넣고 잘 혼합한 다음 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 여기에 250 μ l의 G-buffer solution을 넣고 잘 혼합한 다음 65°C에서 15분간 반응시키고, 250 μ l의 Binding solution을 넣고 잘 혼합한 후 교반하였다. 이러한 cell lysates를 G-spinTM column에 넣고 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. Column에 500 μ l의 washing buffer A를 넣고 다시 1분간 원심분리하였다. 여기에 500 μ l의 washing buffer B를 넣고 다시 1분간 원심분리하고, G-spinTM column을 새로운 eppendorf tube에 넣은 후 100 μ l의 elution buffer를 넣고 1분간 실온에 방치한 다음, 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다.

3. PCR 프라이머 설계 및 제작

F. nucleatum subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T 및 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T에 대한 균주 특이 PCR 프라이머를 설계하기 위하여 Fp4, Fs17 및 Fv35 DNA 프로브들의 핵산염기서열을 이용하였다. DNA 프로브들의 핵산염기서열들은 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 다운로드 받았으며, PrimerSelect 프로그램(DNASTAR Inc., USA)을 이용하여 PCR 프라이머를 설계하였다(Table 2 와 Fig. 1). 이 때 설계된 프라이머 쌍은 Bioneer사(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 제작하였다.

Table 2. PCR primer sequences used in this study

Primer names	Oligonucleotide sequences (5' → 3')	Annealing temp. (°C)	Amplicon size (bp)
<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 ^T			
Fp4-F2	TCC GTT GAC CTG ATG AG	60	470
Fp4-R2	TAG TGT TAA GAC CCC TGA GTA		
<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>fusiforme</i> ATCC 51190 ^T			
Fs17-F14	GAT GAG GAT GAA AAG AAA CAA AGT A	55	393
Fs17-R14	CCA TTG AGA AGG GCT ATT GAC		
<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>vincentii</i> ATCC 49256 ^T			
Fv35-F1	GAT ATC CCG TCA TGT GTT TT	50	255
Fv35-R1	ATG CTG ATA TTT GGG ATG T		

4. 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)

4-1. Gradient PCR

F. nucleatum subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T 및 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T를 균주 특이적으로 검출하기 위하여 설계 제작된 프라이머 쌍들의 최적 결합(annealing) 온도를 구하기 위해 gradient PCR를 시행하였다. 이때 한국인의 치은연하치면세균막에서 분리 동정된 *F. nucleatum* subsp. *fusiforme*/ *vincentii* ChDC F8을 Fp4-F2/Fp4-R2, Fv17-F14/Fv17-R14 및 Fs35-F1/Fs35-R1 프라이머 쌍의 대조군으로 사용하였다.

PCR은 *AccuPower*[®] PCR PreMix(Bioneer Corp.)와 Peltier thermal cycler(Model PTC-200 DNA engine[™], MJ Research Inc., Watertown, MA, USA)를 이용하여 시

행하였다. *AccuPower*[®] PCR PreMix에는 5 nmole씩의 4가지 deoxynucleoside triphosphate, 0.8 mole의 KCl, 0.2 mole의 Tris-HCl(pH 9.0), 0.03 mole의 MgCl₂ 그리고, 1 unit의 *Taq* DNA polymerase가 들어있다. 여기에 균주 지놈 DNA와 20 pmole의 프라이머 쌍을 넣고 PCR을 시행하였다. 이 때 PCR 조건은 다음과 같았다. 초기 변성은 94°C에서 5분간 시행하였고, 변성(94°C, 3분), 결합(50°C-65°C 사이의 12조건) 및 중합(72°C, 30초)의 세 과정을 32회 반복하고, 추가적인 중합(72°C, 30초)을 10분간 시행하였다.

PCR이 끝난 후 20 μ l의 반응물 중 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.

4-2. PCR 프라이머 쌍들의 특이성(*specificity*) 측정

F. nucleatum subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T 및 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T를 균주 특이적으로 검출하기 위해 설계 및 제작된 프라이머 쌍들의 특이도(*specificity*)를 구강 내 서식하고 있는 14개 세균 중 또는 아종의 표준균주들 및 한국인에서 분리 동정된 36 균주들의 지놈 DNA를 주형으로 PCR을 시행하였다. PCR 시행 시 결합온도는 gradient PCR 결과에서 얻은 최적의 조건에서 시행하였으며, 그 외의 조건은 상기와 동일하게 시행하였다.

4-3. PCR 프라이머 쌍들의 민감도(*Sensitivity*) 측정

균주 특이성이 검증된 프라이머 쌍의 민감도(*sensitivity*, PCR로 검출 가능한 최소한의 지놈 DNA 양)를 측정하기 위하여 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T 및 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T 지놈 DNA를 2 ng에서 2 fg까지 10배씩 희석하여 PCR을 시행

하였다. 이 때 PCR은 상기의 실험조건과 동일하게 시행하였다.

Ⅲ. 연구 결과

1. 프라이머 쌍들의 최적 결합온도 결정

Fp4, Fs17 및 Fv35 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 각각 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T 및 *vincentii* ATCC 49256^T 을 균주 특이적으로 검출할 수 있는 PCR 프라이머를 개발하기 위하여 설계 및 제작된 프라이머 쌍의 최적의 결합온도를 정하기 위하여 gradient PCR를 시행하였다. 그 결과, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T를 검출하기 위해 설계된 Fp4-F2/Fp4-R2 프라이머 쌍은 결합 온도 60.2℃까지 반응물이 생성되었고 증폭물의 양이 거의 동일하였다(Fig. 1A). *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T 균주를 검출하기 위하여 설계된 Fs17-F14/Fs17-R14 프라이머 쌍의 경우 결합 온도가 최고 62.0℃인 조건까지 PCR 증폭물이 생성되었지만 증폭물은 62.0℃에서 약 10배정도 감소하였다(Fig. 1B). *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T 균주를 검출하기 위하여 설계된 Fs17-F14/Fs17-R14 프라이머 쌍의 경우 결합 온도가 최고 51.5℃인 조건까지 PCR 증폭물이 생성되었다(Fig. 1C). Fp4-F2/Fp4-R2 프라이머 쌍, Fv35-F1/Fv35-R1 프라이머 쌍 및 Fs17-F14/Fs17-R14 프라이머 쌍의 최적의 결합 온도를 조사하기 위하여 *F. nucleatum* subsp. *fusiforme*/ *vincentii* ChDC F8 균주의 지놈 DNA를 대조군으로 사용하였다. 두 프라이머 쌍은 본 실험에서 사용한 12 조건의 결합 온도에서는 *F. nucleatum* subsp. *fusiforme*/ *vincentii* ChDC F8 균주의 지놈 DNA를 검출하지 못하였다.

2. 프라이머 쌍들의 균주 특이성 검증

F. nucleatum subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T 및 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T을 균주 특이적으로 검출하기 위하여 설계된 세 쌍의 프라이머들의 균주 특이성을 검증하기 위하여 구강 내에 서식하는 14 종의 그람음성 세균 중 또는 아종의 표준균주 및 한국인의 구강 내에

서 분리 동정된 36 균주의 *F. nucleatum* 지놈 DNA를 이용하여 PCR을 시행하였다. 그 결과 각각의 프라이머 쌍들은 표적이 되는 균주의 지놈 DNA를 주형으로 한 경우에서만 PCR amplicon을 증폭시켰다(Fig. 2 와 3). 즉, 본 연구에서 설계된 Fp4-F2/Fp4-R2 프라이머 쌍, Fs17-F14/Fs17-R14 프라이머 쌍 및 Fv35-F1/Fv35-R1 프라이머 쌍들은 각각 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T 및 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T을 균주 특이적으로 검출할 수 있음이 확인되었다.

3. 프라이머 쌍들의 균주 민감도 조사

F. nucleatum subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T 및 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T 균주들에 대해 각각 특이성이 검증된 세 가지 프라이머 쌍들이 PCR에 의해 검출할 수 있는 최소한의 지놈 DNA 양을 조사하였다. Fp4-F2/ Fp4-R2, Fs17-F14/Fs17-R14 및 Fv35-F1/Fv35-R1 프라이머 쌍은 각각 20 pg, 200 fg 그리고 2 pg까지 검출할 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 4).

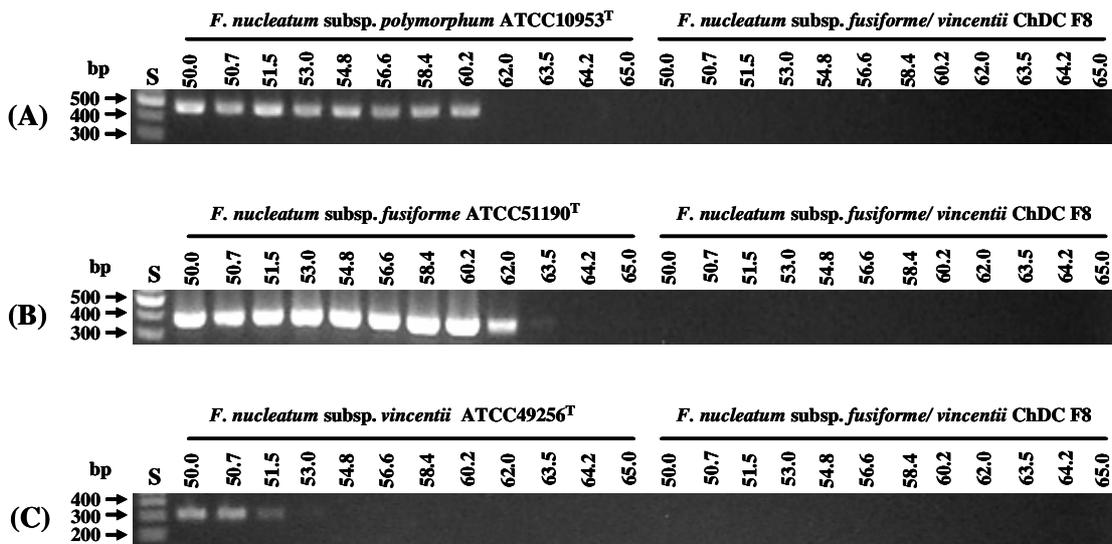


Fig. 1. Gradient PCR of Fp4-F2/Fp4-R2 primers (A), Fs17-F14/Fs17-R14 primers (B) and Fv35-F1/Fv35-R1 primers (C). Four ng of each bacterial genomic DNA were used as PCR templates and each PCR temperature. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. S, size marker.

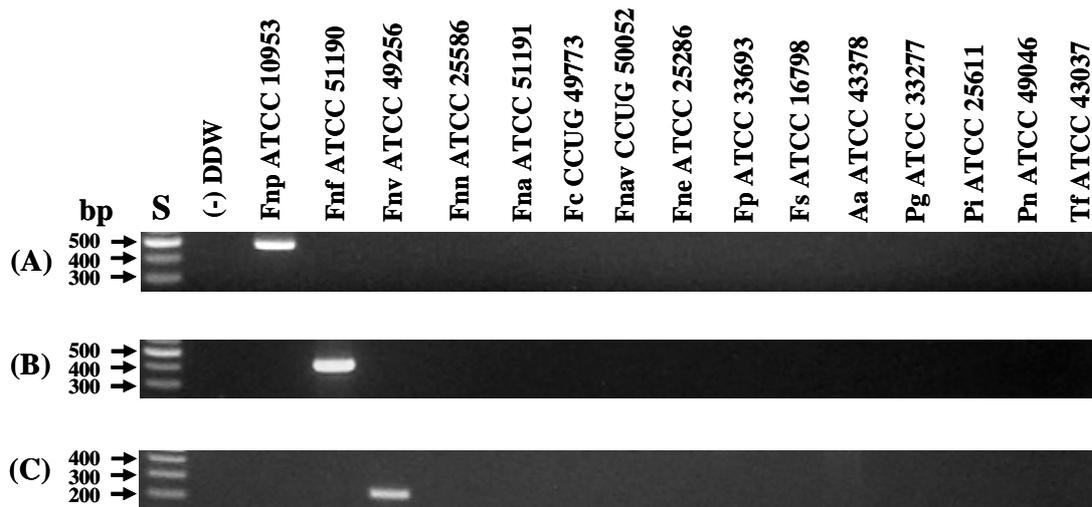


Fig. 2. Specificity test of Fp4-F2/Fp4-R2 primers (A), Fs17-F14/Fs17-R14 primers (B) and Fv35-F1/Fv35-R1 primers (C) with type strains of oral bacteria. Four ng of each bacterial genomic DNA was used as PCR templates. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. S, size marker; Fnp, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum*; Fnf, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme*; Fnv, *F. nucleatum* subsp. *vincentii*; Fnn, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*; Fna, *F. nucleatum* subsp. *animalis*; Fc, *F. canifelinum*; Fnav, *F. naviforme*; Fne, *F. necrophorum*; Fs, *F. simiae*; Aa, *A. actinomycetemcomitans*; Pg, *P. gingivalis*; Pi, *P. intermedia*; Pn, *P. nigrescens*; Tf, *T. forsythia*.



Fig. 3. Specificity test of Fp4-F2/Fp4-R2 primers (A), Fs17-F14/Fs17-R14 primers (B) and Fv35-F1/Fv35-R1 primers (C) with clinical isolates of *F. nucleatum* from Koreans. Four ng of each bacterial genomic DNA were used as PCR templates. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. S, size marker; 1, (-) negative control; 2(A), *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T; 2(B), *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC51190^T; 2(C); *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T; 3, (*F. nucleatum*) ChDC F8; 4, ChDC F37; 5, ChDC F38; 6, ChDC F47; 7, ChDC PV-F37; 8, ChDC PV-F42; 9, ChDC PV-F58; 10, ChDC F113; 11, ChDC F119; 12, ChDC F128; 13, ChDC F130; 14, ChDC F145; 15, ChDC F165; 16, ChDC F174; 17, ChDC F206; 18, ChDC F218; 19, ChDC F175; 20, ChDC F186; 21, ChDC F290; 22, ChDC F300; 23, ChDC F305; 24, ChDC F306; 25, ChDC F309; 26, ChDC F310; 27, ChDC F311; 28, ChDC F313; 29, ChDC F326; 30, ChDC F315; 31, ChDC F316; 32, ChDC F317; 33, ChDC F318; 34, ChDC F319; 35, ChDC F324; 36, ChDC F330; 37, ChDC F332; 38, ChDC F335.

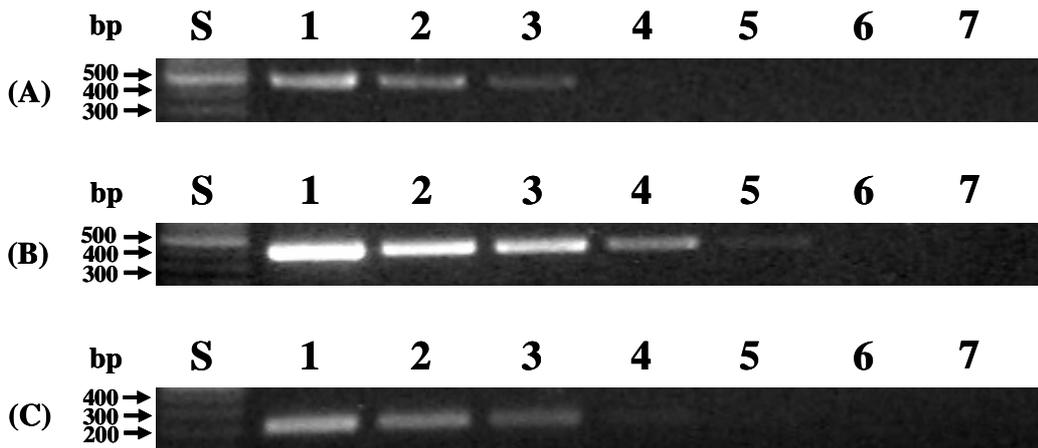


Fig. 4. Sensitivity test of Fp4-F2/Fp4-R2 primers (A), Fs17-F14/Fs17-R14 primers (B) and Fv35-F1/Fv35-R1 primers (C) with the purified genomic DNA of *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T (A), *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T (B) and *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T, respectively. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. Lanes: S, 100 base pair DNA ladder; 1 through 7, purified genomic DNA serially diluted 10-fold, from 2 ng to 2 fg.

IV. 총괄 및 고안

본 연구에서 설계된 Fp4-F2/Fp4-R2, Fs17-F14/Fs17-R14 및 Fv35-F1/Fv35-R1 PCR 프라이머 쌍들은 각각 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T 및 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T 균주들을 특이적으로 검출할 수 있음을 알 수 있었다. 현재 세균을 균주 수준에서 동정할 수 있는 방법으로는 restriction fragment length polymorphism(RFLP), phage 와 bacteriocin typing, pulse field gel electrophoresis(PFGE), 혈청학적 방법, ribotyping, DNA 프로브 법 및 DNA sequencing 법 등이 알려져 있다(Krieg, 2001). 하지만, 이러한 방법들은 시간적으로나 경제적으로 제약이 따르기 때문에 현실적으로 사용되기 어려운 단점이 있다. 최근 *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T 균주 특이 DNA 프로브(Fu12)의 핵산염기서열을 바탕으로 균주-특이 PCR 프라이머가 개발되었다(Kim et al., 2005). 또한 한국인의 구강에서 분리된 *P. intermedia* 임상균주들과는 hybridization하지 않고, 서양인에서 유래된 *P. intermedia* ATCC 25611^T 및 *P. intermedia* ATCC 49046 균주들의 지놈 DNA만을 검출할 수 있는 Pig6 DNA 프로브로부터 두 균주(ATCC 25611^T 및 ATCC 49046)를 모두 검출할 수 있는 PCR 프라이머 쌍과 ATCC 25611^T균주만을 검출할 수 있는 PCR 프라이머 쌍이 개발되었다(Jeong et al., 2006). 이러한 연구 결과들은 같은 세균 종(species)에 속한다 할지라도 각각의 균주들의 지놈 DNA의 핵산염기서열의 상동성에 차이가 존재한다는 것을 의미한다. 이러한 이유로 본 연구에서도 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum*, *F. nucleatum* subsp. *vincentii* 및 *F. nucleatum* subsp. *fusiforme*에 대한 각각의 아종 특이 DNA 프로브일 것이라고 보고되었지만, 아직 증명이 안 된 세 가지 DNA 프로브(Fp4, Fs17 및 Fv35)의 핵산염기서열을 바탕으로 각각의 아종에 대한 표준균주를 특이적으로 검출할 수 있는 PCR 프라이머 쌍을 개발하게 되었다.

*F. nucleatum*은 현재 5가지 아종이 있는 것으로 알려져 있고, 이들 중 3가지 아종의 표준균주(*F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T 및 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T)에 대한

전체 지놈 DNA의 핵산염기서열결정이 진행 중에 있다. 특히, Dzink 등(1990)에 의해 분류된 *F. nucleatum* subsp. *vincentii*와 Gharbia와 Shah(1992)에 의해 분류된 *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* 표준균주들의 16S rDNA, 5-dUTPase, zine protease 및 DNA 의존성 RNA 중합효소의 베타 썬브유닛(RpoB) 유전자의 핵산염기서열의 상동성이 매우 높고(김, 2005), Gharbia와 Shah(1992)의 두 균주가 같은 아종에 속할 것이라는 보고를 참고하여, 아종 *animalis*(처음엔 동물에서만 존재하는 것으로 알았음)만을 제외한 나머지 *F. nucleatum*의 아종 표준균주의 핵산염기서열이 결정되고 있다는 것을 의미한다. 하지만 현재 치주질환과 관련된 병원성 세균의 병인론 연구에서 *F. nucleatum*에 관한 연구는 매우 적은 편이다. 이 이유는 치주질환과 관련된 역학조사 결과 *F. nucleatum*은 치주질환에 이환된 치주조직의 치은연하치면세균막이나 정상인 부위의 치은연하치면세균막 모두에서 검출이 되었다는 보고가 많았기 때문에, Koch의 가설에 입각한 병원성세균의 조건에 맞지 않았기 때문인 것으로 생각된다. 하지만, *F. nucleatum*의 초기 및 후기 치면세균막 형성을 주도하는 세균들 간의 가교 역할, 치은연하치면세균막 내의 산소제거, 숙주의 면역기능 교란, 대사산물인 butyric acid의 분비 및 초기 염증성 사이토카인 분비 유도 등의 독립인자가 밝혀지면서, *F. nucleatum*이 중요한 치주질환의 원인균으로 알려지게 되었다. 치면세균막 내에는 약 400여 종의 세균이 존재하기 때문에 역학조사 결과에서 치주질환 유무와 상관없이 모든 치면세균막에 존재하는 세균 종을 비병원성이라고 할 수는 없고, 반드시 병인론 연구를 통해서 병원성 여부를 가려야 할 것으로 생각된다. 이러한 병원성 연구에서는 우선적으로 대상 세균 종의 표준균주가 이용되기 때문에 표준균주를 신속 정확하게 동정할 수 있는 방법이 있다면 병인론 연구를 좀 더 수월하게 진행할 수 있을 것이다. 그러므로 본 연구의 균주 특이 PCR 프라이머 쌍의 개발과정은 앞으로 많은 구강 내 세균 종에 대한 표준균주 특이 PCR 프라이머 쌍을 개발하는 데 좋은 모델로 이용되리라 생각된다.

Fp4 DNA 프로브의 핵산염기서열(841 bp)을 Blastn 검색한 결과 *F. nucleatum* PK1594 균주의 hemolysin 유전자[GenBank Accession No.: AF525507]와 99%(840/843) 일치하였다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). *F. nucleatum* PK1594 균주는 서양인의 구강 내에서 분리된 균주이다. 이러한 결과는 본 연구에서 설계된 Fp4-F2/Fp4-R2 PCR 프라이머 쌍은 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum*

ATCC 10953^T 균주뿐만 아니라 *F. nucleatum* PK1594도 검출할 수 있다는 것을 의미한다. 그러므로 Fp4-F2/Fp4-R2 PCR 프라이머 쌍은 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T 균주 및 *F. nucleatum* PK1594 균주들에 대한 특이 PCR 프라이머라고 해야 할 것이다. 현재 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T의 전체 지놈 DNA 핵산염기서열의 진행 중에 있어 데이터가 공개되지 않았기 때문에 Fp4 DNA 프로브의 핵산염기서열과의 상동성 비교는 하지 못하였다.

Fs17 DNA 프로브의 핵산염기서열(8,215 bp)을 Blastx 검색한 결과 *Spiroplasma citri* GII3-3X 균주의 hypothetical helicase 단백질[GenBank Accession No.; CAK99830]과 아미노산 수준에서 34%(139/407) 일치하는 것으로 나타났다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). 이러한 결과는 아직 *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T 균주의 전체 지놈 핵산염기서열이 밝혀져 있지 않았기 때문에 현재로서는 단정할 수 없지만, 클로닝 과정에서 다른 세균의 지놈 DNA가 오염될 수 있을 가능성이 있기 때문에 향후 연구에서 이를 확인해야 할 것으로 사료된다.

또한 Fv35 DNA 프로브의 핵산염기서열(1,190 bp)을 Blastx 분석한 결과 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T의 sugar epimerase/ dehydratase 단백질[GenBank Accession No.; ZP_00143770]과 아미노산 수준에서 100%(273/273) 상동성을, hypothetical 단백질[GenBank Accession No.; ZP_00143771]과는 아미노산 수준에서 99%(294/296) 상동성을 보였다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). 이러한 결과는 Fv35 DNA 프로브가 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T의 지놈 DNA에서 유래된 것이기 때문에 당연하다고 할 수 있다.

이상의 결과를 종합할 때, 본 연구에서 개발된 세 가지 프라이머 쌍들 Fp4-F2/Fp4-R2, Fs17-F14/Fs17-R14 및 Fv35-F1/Fv35-R1은 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T 및 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T를 균주-특이적으로 검출할 수 있어 이들의 병인론 연구 및 균주들의 보존적 측면에서 유용하게 이용 가능하리라 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T 및 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T에 대한 균주 특이 PCR 프라이머를 개발하기 위하여 시행하였다. 각각의 균주에 대한 PCR 프라이머는 Fp4, Fs17 및 Fv35 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 설계 및 제작되었으며, 이들 프라이머들의 균주 특이성은 10개의 *Fusobacterium* 속(family)에 속하는 종(species) 또는 아종(subspecies) 표준균주, 36 균주의 한국인에게서 분리 동정된 *F. nucleatum* 임상균주 및 *Fusobacterium* 속이 아닌 5 종류 세균 종의 표준균주를 대상으로 시행하였다. 이들 프라이머들의 민감도는 각각의 균주 지놈 DNA를 2 ng에서 2 fg까지 10배씩 희석하여 PCR를 시행하여 조사하였다.

1. Fp4, Fs17 및 Fv35 의 핵산염기서열을 바탕으로 각각 Fp4-F2/Fp4-R2, Fs17-F14/Fs17-R14 및 Fv35-F1/Fv35-R1 프라이머 쌍들을 설계하였다.
2. 균주 특이성 test 결과, Fp4-F2/Fp4-R2, Fs17-F14/Fs17-R14 및 Fv35-F1/Fv35-R1 프라이머 쌍들은 각각 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T 및 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T 균주에 대한 특이성이 있었다.
3. 민감도 test 결과, Fp4-F2/Fp4-R2, Fs17-F14/Fs17-R14 및 Fv35-F1/Fv35-R1 프라이머 쌍들은 각각 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T 및 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T 균주 지놈 DNA를 각각 20 pg, 200 fg, 2 pg까지 검출할 수 있었다.

이상의 결과를 종합할 때, 본 연구에서 개발된 세 가지 프라이머 쌍들 Fp4-F2/Fp4-R2, Fs17-F14/Fs17-R14 및 Fv35-F1/Fv35-R1은 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T 및 *F.*

nucleatum subsp. *vincentii* ATCC 49256^T를 균주-특이적으로 검출할 수 있어 이들의 병인론 연구 및 균주들의 보존적 측면에서 유용하게 이용 가능하리라 사료된다.

참 고 문 헌

- 김화숙, 한국인의 정상 치주조직 및 치주질환 병소의 치면세균막에서 *Fusobacterium nucleatum*의 발현빈도 비교. 조선대학교 대학원 박사학위 논문, 2006.
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 2001;183:3770-83.
- Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1988;15:316-23.
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 1994;5:78-111.
- Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9:55-71.
- Bartold PM, Gully NJ, Zilm PS, Rogers AH. Identification of components in *Fusobacterium nucleatum* chemostat-culture supernatants that are potent inhibitors of human gingival fibroblast proliferation. *J Periodontal Res.* 1991;26:314-322.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25:134-44.
- Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res.* 2003;82:338-44.
- Bartold PM, Gully NJ, Zilm PS, Rogers AH. Identification of components in *Fusobacterium nucleatum* chemostat-culture supernatants that are potent inhibitors of human gingival fibroblast proliferation. *J Periodontal Res.* 1991;26:314-22.

- Choi EK, Park SA, Oh WM, Kang HC, Kuramitsu HK, Kim BG, Kang IC. Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in endothelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005;44:51-8.
- Roberts GL. Fusobacterial infections: an underestimated threat. *Br J Biomed.* 2000;57:156-62.
- Diaz PI, Zilm PS, Rogers AH. *Fusobacterium nucleatum* supports the growth of *Porphyromonas gingivalis* in oxygenated and carbon-dioxide-depleted environments. *Microbiology.* 2002;148:467-72.
- Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor dependent and V factor independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56:2135-46.
- Dzink JL, Sheenan MT, Socransky SS. Proposal of three subspecies of *Fusobacterium nucleatum* Knorr 1922: *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* subsp. nov., comb. nov.; *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* subsp. nov., nom. nev., comb. nov.; and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii* subsp. nov., nom. rev., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1990;40:74-78.
- Gharbia SE, Shah HN. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *fusiforme* subsp. nov. and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *animalis* subsp. nov. as additional subspecies within *Fusobacterium nucleatum*. *Int J Syst Bacteriol.* 1992;42:296-298.
- Tew JG, Thomas SS, Ranney RR. *Fusobacterium nucleatum*-mediated immunomodulation of the in vitro secondary antibody response to tetanus

- toxoid and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Periodontal Res. 1987;22:506-12.
- Singer RE, Buckner BA. Butyrate and propionate: important components of toxic dental plaque extracts. Infect Immun. 1981;32:458-63.
- Han YW, Shi W, Huang GT, Kinder Haake S, Park NH, Kuramitsu H, Genco RJ. Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. Infect Immun. 2000;68:3140-6.
- Kim HS, Song SK, Yoo SY, Jin DC, Shin HS, Lim CK, Kim MS, Kim JS, Choe SJ, Kook JK. Development of strain-specific PCR primers based on a DNA probe Fu12 for the identification of *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T. J Microbiol. 2005;43:331-6. Erratum in: J Microbiol. 2005;43:473.
- Kook JK, Kim MK, Seong JH, Kim DK, Kim BO, Park JC, Kim KK, Choe SJ, Min BM. A new method for rapid screening of bacterial species- or subspecies-specific DNA probes. FEMS Microbiol Lett. 2003;219:121-7.
- Krieg NR. Identification of Prokaryotes, p. 33-38. In G. Garrity (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2th ed. 2001. Springer Verlag, New York, U.S.A.
- Jeong SU, Yoo SY, Kang SJ, Kim MK, Jang HS, Lee KY, Kim BO, Kook JK. Development of *Prevotella intermedia* ATCC 49046 Strain-Specific PCR Primer based on a Pig6 DNA Probe. Kor. J. Microbiol. 2006;42:89-94.

저작물 이용 허락서

학 과	치 의 학과	학 번	20057483	과 정	박사
성 명	한글: 신환선 한문 : 申桓先 영문 : Hwan Seon Shin				
주 소	경기도 시흥시 신천동 737번지 2층 시흥치과				
연락처	031-314-2828	E-MAIL	car7355@hitel.net		
논문제목	한글 : <i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 ^T , subsp. <i>fusiforme</i> ATCC 51190 ^T 및 subsp. <i>vincentii</i> ATCC 49256 ^T 균주 특이 중합효소연쇄반응 프라이머 개발				
	영어 : Development of strain-specific PCR primers for the detection of <i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 ^T , subsp. <i>fusiforme</i> ATCC 51190 ^T and subsp. <i>vincentii</i> ATCC 49256 ^T				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함.
다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의() 반대()

2007년 8 월 일

저작자: 신 환 선 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하

(국문초록)

Fusobacterium nucleatum subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T 및 subsp. *vincentii* ATCC 49256^T 균주 특이 중합효소연쇄반응 프라이머 개발

신 환 선
조선대학교 대학원 치의학과
(지도교수: 국 중 기)

본 연구는 *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T 및 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T에 대한 균주 특이 PCR 프라이머를 개발하기 위하여 시행하였다. 각각의 균주에 대한 PCR 프라이머는 Fp4, Fs17 및 Fv35 DNA probes의 핵산염기서열을 바탕으로 설계 및 제작되었으며, 이들 프라이머들의 균주 특이성은 10개의 *Fusobacterium* 속(family)에 속하는 종(species) 또는 아종(subspecies) 표준균주, 36 균주의 한국인에서 분리 동정된 *F. nucleatum* 임상균주 및 *Fusobacterium* 속이 아닌 5 종류 세균 종의 표준균주를 대상으로 시행하였다. 이들 프라이머들의 민감도는 각각의 균주 지놈 DNA를 2 ng에서 2 fg까지 10배씩 희석하여 PCR를 시행하여 조사하였다. 연구결과 세 종류의 프라이머 쌍(Fp4-F2/Fp4-R2, Fs17-F14/Fs17-R14 및 Fv35-F1/Fv35-R1 PCR)들은 각각 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T 및 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T 균주에 대한 특이성이 있었다. 민감도 test 결과, Fp4-F2/Fp4-R2, Fs17-F14/Fs17-R14 및 Fv35-F1/Fv35-R1 프라이머 쌍들은 각각 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T 및 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T 균주 지놈 DNA의 20 pg, 200 fg 및 2 fg까지 검출할 수 있었다. 이상의 결과를 종합할 때, 본 연구에서 개발된 세 가지 프라이머 쌍들 Fp4-F2/Fp4-R2, Fs17-F14/Fs17-R14 및 Fv35-F1/Fv35-R1은 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T 및 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T를 균주-특이적으로 검출할 수 있어 이들의 병인론 연구 및 균주들의 보존적 측면에서 유용하게 이용 가능하리라 사료된다.