



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2009년 2월  
박사학위논문

Inverted dot blot hybridization  
검색법을 이용한 mitis 군  
연쇄상구균 종-특이 DNA  
프로브 및 PCR 프라이머 개발

조선대학교 대학원

치 의 학 과

박 순 낭



Inverted dot blot hybridization  
검색법을 이용한 mitis 군  
연쇄상구균 종-특이 DNA  
프로브 및 PCR 프라이머 개발

Development of the species-specific DNA probes and  
PCR primers for the identification of mitis group  
streptococci using the inverted dot blot hybridization  
screening method

2009년 2월 25일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

박 순 낭

Inverted dot blot hybridization  
검색법을 이용한 mitis 군  
연쇄상구균 종-특이 DNA  
프로브 및 PCR 프라이머 개발

지도교수 김 도 경

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2008년 10월

조선대학교 대학원

치 의 학 과

박 순 낭

# 박순낭의 박사학위 논문을 인준함

위원장   조선대학교   교수   김홍중   인

위원   전남대학교   교수   강인철   인

위원   조선대학교   교수   국중기   인

위원   조선대학교   교수   임성훈   인

위원   조선대학교   교수   김도경   인

2008년 12월

조선대학교 대학원

# 목 차

<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>I. 서론</b> .....	1
<b>II. 연구재료 및 방법</b> .....	4
1. 세균 및 세균배양 조건 .....	4
2. 세균 genomic DNA의 추출 .....	4
3. Multilocus sequence typing(MLST) .....	6
4. PCR 증폭물의 클로닝과 플라스미드 DNA 추출 및 핵산염기서열 결정 .....	6
5. 무작위 클로닝법에 의한 세균 DNA 절편 클로닝. ....	8
6. DNA 프로브의 정제 및 표지 .....	8
7. IDBH 검색 및 Southern blot 분석 .....	9
8. 프로브 핵산염기서열결정 및 PCR 프라이머의 설계 및 PCR .....	10
<b>III. 연구 결과</b> .....	12
1. MLST법에 의한 mitis 군 연쇄상구균의 종 수준에서의 동정 .....	12
2. IDBH 검색 및 Southern blot 분석법을 통한 종-특이 DNA 프로브의 개발	25
3. 프로브 핵산염기서열결정, 종-특이 PCR 프라이머의 설계 및 PCR .....	25
<b>IV. 총괄 및 고안</b> .....	39
<b>V. 결론</b> .....	43

VI. 참 고 문 헌 .....	31
VII. <i>FIGURE LEGENDS</i> .....	35
VIII. <i>FIGURES</i> .....	40



## 표 목 차

Table 1. Isolation site of mitis group streptococci .....	5
Table 2. PCR primer sequences used in this study .....	7
Table 3. Identification of <i>rpoB</i> gene sequence .....	14
Table 4. Proportion of identification according to <i>rpoB</i> gene .....	16
Table 5. The results of homologous search (BLASTn) of DNA probes .....	19
Table 6. Sequences of the primers designed from probes .....	20
Table 7. Specificity of the primers designed from probes .....	21

## 도 목 차

Fig. 1	Comparative phylogenetic trees of <i>rpoB</i> and <i>sodA</i> partial gene sequences and 16S rRNA gene using the type strains of all mitis group streptococci. ....	40
Fig. 2.	Phylogenetic trees of <i>rpoB</i> partial gene sequences using the type strains, reference strains and isolates. ....	41
Fig. 3.	Phylogenetic trees of <i>sodA</i> partial gene sequences using the type strains, reference strains and isolates. ....	43
Fig. 4.	Phylogenetic trees of 16S rDNA partial gene sequences using the type strains, reference strains and isolates. ....	45
Fig. 5.	Composite summary of inverted dot blot hybridization screening. ...	47
Fig. 6.	Southern blot analysis confirmed the specificity of the DNA fragments using the type strains. ....	48
Fig. 7.	Southern blot analysis confirmed the specificity of the cloned DNA fragment inserted into Sgo41 plasmid ....	49
Fig. 8.	Southern blot analysis confirmed the specificity of the cloned DNA fragment inserted into Spa17 plasmid. ....	50
Fig. 9.	Southern blot analysis confirmed the specificity of the cloned DNA fragment inserted into Sor24 plasmid. ....	51
Fig. 10.	Southern blot analysis confirmed the specificity of the cloned DNA fragment inserted into Smi21 plasmid. ....	52
Fig. 11.	Southern blot analysis confirmed the of specificity of the cloned DNA fragment inserted into Spn8 plasmid. ....	53
Fig. 12.	Specificity test of Sgo41-F1/R1 primers with purified genomic DNA of type strains(A), clinical isolates(B) and reference strains(C) of mitis group. ....	54

Fig. 13. Specificity test of Ssa21-F3/R2 primers with purified genomic DNA of type strains(A), clinical isolates(B) and reference strains(C) of mitis group. .... 55

Fig. 14. Specificity test of Smi21-f-F2/R2 primers with purified genomic DNA of type strains(A), clinical isolates(B) and reference strains(C) of mitis group. .... 56

Fig. 15. Specificity test of Smi21-b-F/R primers with purified genomic DNA of type strains(A), clinical isolates(B) and reference strains(C) of mitis group. .... 57

Fig. 16. Specificity test of Spn8-F1/R1 primers with purified genomic DNA of type strains(A), clinical isolates(B) and reference strains(C) of mitis group. .... 58

Fig. 17. Specificity test of Spa17-F/R primers with purified genomic DNA of type strains(A), clinical isolates(B) and reference strains(C) of mitis group. .... 59

## *ABSTRACT*

### *Development of the Species-Specific DNA probes and PCR primers for the identification of mitis group streptococci using the Inverted Dot Blot hybridization screening method*

*Park, Soon-Nang*

*Advisor : Prof. Do Kyung Kim, Ph.D.*

*Department of Dentistry,*

*Graduate School of Chosun University*

The purpose of this study was to develop of species-specific DNA probes of mitis group streptococci (MGS) and species-specific PCR primers base on the nucleotide sequences of the DNA probes. A collection of 95 strains consisting of 81 clinical isolates, 8 reference strains and 6 type strains of MGS were examined. The identification of 81 clinical isolates was performed by phylogenetic analysis using multilocus sequence typing (MLST) method using three housekeeping genes, 16S rRNA gene (16S rDNA), RNA polymerase beta-subunit encoding gene (*rpoB*) and manganese superoxide dismutase gene (*sodA*). The *Hind*III-digested genomic DNAs from the type strains were cloned by random cloning method. To screen the species-specific probes of *Streptococcus mitis*, *S. pneumoniae*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. sanguinis* and *S. gordonii*, IDBH were performed and confirmed the specificity of the DNA probes by southern blot analysis method. The species-specific PCR primers were designed base on the nucleotide sequences of the species-specific DNA probes. The MLST data revealed that 93% of clinical isolates were classified into 11 species of MGS by *rpoB* gene. *SodA* gene is not

adequate for the identification of *S. mitis* and *S. pneumoniae* and did not coincide with the results obtained by the *rpoB* gene. The data showed that the Sgo41, Sor24, Spa17 and Ssa21 DNA probes were species-specific for *S. gordonii*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, and *S. sanguinis*, respectively. Interestingly, the strain-specific probes for *Streptococcus mitis* KCTC 3556<sup>T</sup>, Smi21 DNA probe, was developed. The PCR data showed that species-specific PCR primer for *S. gordonii*, Sgo41-F1/R1, and two pairs of *S. mitis* KCTC 3556<sup>T</sup>-specific primers, Smi21-f-F2/R2 and Smi21-b-F/R were developed. These results indicate that Sgo41-F1/R1 primer could be useful in the identification of *S. gordonii* and this primer is suitable for the detection of *S. gordonii* in clinical samples. In addition, two PCR primer sets, Smi21-f-F2/R2 and Smi21-b-F/R, have proven useful for the identification of *S. mitis* KCTC 3556<sup>T</sup>, especially with regard to the maintenance of the strain.

## I. 서론

현재 streptococci(연쇄상구균)는 50종 이상의 균종(bacterial species)으로 분류되어 있고, 각 세균종 표준균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열 비교 분석법에 의해 mitis, mutans, anginosus, bovis, pyogenic 및 salivarius 등의 여섯 개 phylogenetic 군으로 나누어진다(Hoshino *et al.*, 2005, Kawamura *et al.*, 1995). 그중 구강 내에 존재하는 mitis group(군) 연쇄상구균들은 치아표면에 주된 집락을 이루며 구강질환의 원인균들이 치아에 부착하는 것을 촉진하거나 저해하기도 한다. 예를 들어 mitis 군에 속하는 *Streptococcus gordonii*는 획득피막의 타액 단백질에 결합할 수 있고(Gibbons *et al.*, 1991, Scannapieco *et al.*, 1995), 치주질환의 주요한 원인균종 중 하나인 *Porphyromonas gingivalis*와 결합할 수 있는 부위를 제공한다(Lamont *et al.*, 1993). 반면에 이들 mitis 군 연쇄상구균들은 치아우식증의 주요한 원인균종인 mutans 군 연쇄상구균들과 경쟁적으로 치아 표면에 부착한다(Nyvad *et al.*, 1990).

Mitis 군 연쇄상구균에 속하는 균종들은 치의학뿐만 아니라 의학에서도 중요한 균주이다. 이들은 상기도에 공생하며 특히, *S. pneumoniae*는 국소적 또는 전신감염의 주요 원인 균주이고 다른 mitis 군 연쇄상구균은 아급성세균성 심내막염(Baddour *et al.*, 1994, Douglas *et al.*, 1993), neutropenic 암환자에게 두드러지게 나타나는 패혈증(Beighton *et al.*, 1994, Bochud *et al.*, 1994, Jacobs *et al.*, 1995), 수막염(Cabellos *et al.*, 1999) 및 안구감염(Arbique *et al.*, 2004)의 중요 병인체로도 알려져 있다.

Mitis 군 연쇄상구균들을 종 수준으로 정확하게 동정하는 것은 기회감염의 발병기전과 균주들의 증가하는 항생제 내성에 관한 분자역학 등을 이해하는 필수 조건이다. 현재 임상에서 연쇄상구균 균주들을 동정하기 위해, Rapid ID 32 STREP system(BioMérieux, La Balme les Grottes, France)과 STREPTOGRAM(Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan)과 같은 세균의 특정 효소활성 여부를 검사하는 일종의 phenotypic 실험 키트를 일반적으로 사용하고 있다. 하지만, 이들의 종 수준에서의 동정률은 30-50%인 것으로 보고되었다(French *et al.*, 1989, Hinnebusch *et al.*, 1991).

세균의 종 수준에서의 동정에 있어서 일종의 황금기준(golden standard)은 DNA-DNA hybridization 법과 16S rRNA 유전자(16S rDNA) 핵산염기서열 비교분석법이다(Krieg 2001). 특히, 세균종들의 16S rDNA 핵산염기서열은 진화론적 측면에서 종간에 잘 보존되어 있으며, 데이터베이스가 잘 구축되어 있으며, 다른 분류학적 방법

들에 비해 수월하기 때문에 가장 널리 사용되고 있다. 그러나 mitis 군 연쇄상구균 종 중의 *S. pneumoniae*, *S. mitis* 및 *S. oralis*의 경우는 16S rDNA 핵산염기서열들은 서로 99%의 상동성을 가지고 있다(Hoshino *et al.*, 2005). 그래서 *Streptococcus* 속에 속하는 균종을 동정하기 위해, 여러 housekeeping 유전자의 핵산염기서열을 비교분석하는 multilocus sequence typing(MLST)법이 이용되고 있다. 즉, 기능 RNA를 코딩하는 유전자인 RNA subunit of endonuclease P(*rnpB*)(Tapp *et al.*, 2003), 단백질을 코딩하는 유전자인 D-alanine:D-alanine ligase(*ddl*)(Garnier *et al.*, 1997, Kawamura *et al.*, 1999, Hoshino *et al.*, 2005),  $\beta$  subunit of RNA polymerase(*rpoB*)(Drancourt *et al.*, 2004), heat shock protein(*groESL*)(Teng *et al.*, 2002), elongation factor Tu(*tuf*)(Picard *et al.*, 2002), glutamate dehydrogenase(*gdh*)(Hoshino *et al.*, 2005) 및 manganese-dependent superoxide dismutase(*sodA*)(Hoshino *et al.*, 1999) 유전자들이 이용되고 있다. 그러나 이용되는 housekeeping 유전자에 따라 연쇄상구균의 종 수준에서의 분류가 틀린 결과가 나오는 균주들이 있기 때문에, 특정 한 가지 유전자의 핵산염기서열만을 비교분석하여 모든 연쇄상구균 균주를 종 수준으로 동정하기는 어렵다.

세균을 종 수준으로 동정하는 데 이용되는 방법 중 하나가 DNA 프로브법이다. 이때 사용되는 DNA 프로브는 세균 전체 지놈 DNA, 특정 유전자, oligonucleotides 및 무작위 클로닝법에 의한 세균 지놈 DNA 일부분 등이 있다. 이들 DNA 프로브의 종 특이성을 검증하기 위해서는 southern blot 분석법을 시행해야 한다. 즉, 10개의 DNA 프로브의 종 특이성을 검증하기 위해서는 10번의 Southern blot 분석법을 시행해야 하기 때문에 무작위 클로닝법에 의해 DNA 프로브를 개발하는 경우 많은 시간적 및 경제적 제약이 따랐다. 하지만, 최근 inverted dot blot hybridization(IDBH) 검색법이 개발되어 한번의 dot blot hybridization에 의해 96개의 DNA 프로브의 종 특이성을 검색할 수 있고, 여기에서 일차 선발된 DNA 프로브를 이용해 Southern blot 분석법으로 종 특이성을 최종 확인하는 방법이 개발되었다(Kook *et al.*, 2003a). 이 방법을 이용하여 최근 무작위 클로닝법과 southern blot 분석법에 의해 세균의 종-특이뿐만 아니라 균주-특이 DNA 프로브까지 개발되었으며, 이들 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 종-특이 및 균주-특이 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 프라이머까지 개발되었다(Gang *et al.*, 2002, Kim *et al.*, 2005, Shin *et al.*, 2006).

실제 임상에서 특정 질환과 관련된 병원성세균을 종 수준으로 동정하기 위해서는 신속성, 경제성 및 정확성이 요구되기 때문에 DNA-DNA hybridization 법이나 16S

rDNA 핵산염기서열 비교분석법을 이용하기는 어렵다. 그러므로 현재까지 개발된 여러 방법들 중에서 중합효소연쇄반응(PCR)법이 비교적 신속 정확하게 세균을 종 수준으로 동정할 수 있는 것으로 알려져 있다. 그러므로 병소부위에서 세균을 직접 또는 배양 후 종 수준으로 검출 또는 동정하기 위해서는 PCR법을 이용하여 세균을 종-수준으로 동정하는 것이 현실적으로 최선의 방법이라고 생각된다.

그러므로 본 연구는 한국인의 구강에서 분리되어 16S rDNA 핵산염기서열 비교 분석법으로 *mitis* 군의 연쇄상구균으로 동정된 균주를 *rpoB*와 *sodA* 유전자를 클로닝하여 핵산염기서열을 결정하여 MLST법으로 종 수준으로 동정하고, IDBH 검색법 및 Southern blot 분석법으로 *mitis* 군에 속하는 연쇄상구균들 중 6개의 세균 종에 대한 종-특이 DNA 프로브를 개발하며, 이 프로브들의 핵산염기서열을 바탕으로 종-특이 PCR 프라이머를 개발하고자 시행되었다.



## II. 연구재료 및 방법

### 1. 세균 및 세균배양 조건

본 연구에서 이용된 균주들 중 *S. mitis* KCTC, 3556<sup>T</sup>, *S. oralis* CCUG 24891<sup>T</sup>, *S. pneumoniae* CCUG 28588<sup>T</sup>, *S. gordonii* CCUG 25608<sup>T</sup>, *S. sanguinis* CCUG 17826<sup>T</sup>, *S. parasanguinis* CCUG 30417<sup>T</sup>, *Streptococcus oralis*(KCTC 5605, KCCM 41567), *Streptococcus pneumoniae*(KCTC 3932, KCCM 40410, KCCM 41569, KCCM 41570), 및 *Streptococcus* sp.(KCTC 5606/JCM 5702, KCTC 5607/JCM 5704) 등의 표준균주 및 참고균주들은 CCUG(Culture Collection, University of Göteborg, Sweden), KCTC(Korean Collection for Type Cultures, Biological Resource Center, Daejeon, Korea) 또는 KCCM(Korean Culture Center of Microorganism, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 또한, 임상에서 분리 동정된 균주들은 한국구강미생물 자원은행(KCOM, Korean Collections of Oral Microbiology, Gwangju, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 이들 임상균주들은 악골골수염 병소 부위, 치수염 부위, 상악동염 병소부위 그리고 교정 환자나 소아의 치면세균막에서 분리되었다(임 등 2004, 임 등 2006, 최 등 2006)(Table 1).

본 연구에 사용된 모든 연쇄상구균 균주들은 BHI(Brain heart infusion, Difco Laboratory, Detroit, MI, U.S.A.)배지로 37°C 세균배양기에서 24시간 동안 배양하여 다음 실험에 사용하였다.

### 2. 세균 *genomic DNA*의 추출

세균의 지놈 DNA는 G-spin<sup>TM</sup> Genomic DNA Extraction Kit(iNtRON Co., Seoul, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 DNA를 추출하였다. 즉, 세균 배양액 1.5 ml를 10,000 × *g*의 원심력을 이용하여 세균을 수확한 다음 50 $\mu$ l의 Pre-incubation solution과 3 $\mu$ l의 lysozyme solution을 넣고 잘 혼합한 다음 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 여기에 250 $\mu$ l의 G-buffer solution을 넣고 잘 혼합한 다음 65°C에서 15분간 반응시키고, 250 $\mu$ l의 Binding solution을 넣고 잘 혼합한 다음 vortexing하였다. 이러한 cell lysates를 G-spin<sup>TM</sup> column에 넣고 13,000rpm에서 1분간 원심분리하였다. Column에 500 $\mu$ l의 washing buffer A를 넣고 다시 1분간 원심분리하였다. 여기에 500  $\mu$ l의 washing buffer B를 넣고 다시 1분간 원심분리하고, G-spin<sup>TM</sup> column을 새로운

Table 1. Isolation site of mitis group streptococci

Patient number	Isolation	Number of isolates
구강외과 3	Lt Mn angle area	3
구강외과 5	Osteomyelitis	23
구강외과 10	Both Maxillary sinusitiss POMC.(Lt)	8
구강외과 12	Maxillary sinusitis (POMC)	13
구강외과 13	Maxillary sinusitis	2
구강외과 14	Chronic osteomelitis	5
예방 16	Subgingival dental plaque, Gingivitis	1
예방 18	Subgingival dental plaque, Gingivitis	1
예방 20	Subgingival dental plaque, Periodontitis	2
예방 22	Subgingival dental plaque, Gingivitis	1
예방 29	Subgingival dental plaque, Gingivitis	1
보존 EN86	Acute pulpitis	1
보존 EN93	Acute pulpitis	3
보존 EN95	Periapical abscess	4
보존 EN99	Acute pulpitis	2
보존 EN102	Acute pulpitis	2
보존 EN104	Acute pulpitis	1
보존 EN107	Acute pulpitis	2
보존 EN112	Acute pulpitis	2
소아 10	normal	1
교정 35	normal	2
교정 47	normal	1
Total		81

eppendorf tube에 넣고 100 $\mu$ l의 elution buffer를 넣고 1분간 실온에 방치한 다음 13,000rpm에서 1분간 원심분리하였다.

### 3. Multilocus sequence typing(MLST)

본 연구에서 분석하고자 한 16S rDNA, *rpoB*, *sodA* 유전자를 PCR법으로 증폭하기 위해 참고 문헌에 보고되었던 프라이머들(Lane *et al.* 1985, Drancourt *et al.*, 2004, Kawamura *et al.* 1999)을 사용하였고, 이들 프라이머는 Bioneer사(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 제작하였다. 본 연구에서 사용된 각 유전자를 증폭하기 위한 프라이머와 프라이머 핵산염기서열 그리고 증합효소연쇄반응 조건을 Table 2에 정리하였다.

### 4. PCR 증폭물의 클로닝과 플라스미드 DNA 추출 및 핵산염기서열 결정

PCR 증폭물은 pGEN-T easy vector(Promega Crop., Madison, WI, USA)에 제조회사의 지시에 따라 클로닝하고, *E. coli* DH5a에 형질전환 하였다. 재조합 플라스미드는 AccuPrep<sup>TM</sup> Plasmid Extraction Kit(Bioneer Corp., Daejeon, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시대로 추출하였다. 즉, 세균배양액 1ml를 30초간 원심분리(12,000  $\times$  g)하고, 얻어진 세균 덩어리를 250 $\mu$ l의 Resuspension buffer를 가하여 잘 현탁한 후, 250 $\mu$ l Lysis buffer를 첨가하여 천천히 잘 혼합한 다음, 350  $\mu$ l의 Neutralization buffer를 첨가한 즉시 잘 섞은 후에 얼음에 5분간 방치하였다. 이것을 10분간 원심분리(12,000  $\times$  g)하여 상층액을 Binding column tube에 옮기고, 1분간 원심분리(12,000  $\times$  g)하였다. 여과액은 버리고, Binding column tube에 80% 에탄올을 700 $\mu$ l 넣은 후 1분간 원심분리(12,000  $\times$  g)하였다. Binding column tube에 남아있을 여분의 에탄올을 제거하기 위해 여과액을 버리고, 다시 30초간 원심분리(12,000  $\times$  g) 하였다. Binding column을 새로운 eppendorf tube로 옮기고, 여기에 100 $\mu$ l의 Elution buffer를 넣고 1분간 기다린 다음 다시 1분간 원심분리(12,000  $\times$  g)하여 여과액을 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하여 핵산염기서열 결정에 사용하였다. 각 유전자의 핵산 염기서열 결정을 위해 16S rDNA는 ChDC-GEM-F(5'-TTC CCA GTC ACG ACG TTG TAA AA-3'), ChDC-GEM-R(5'-GTG TGG AAT TGT GAG CGG ATA AC-3')과 Seq-F1(5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')을 사용하였고, *rpoB*는 ChDC-GEM-F/R 프라이머를 사용하였다. *sodA* 유전자 의 핵산염기서열 결정은 PCR 증폭물을 PCR quick spin<sup>TM</sup> PCR product purification Kit

Table 2. PCR primer sequences used in this study

Gene	Primer name; oligonucleotide sequences (5' → 3')	PCR condition*	
		ID temp, time D temp, time A temp, time E temp, time FE temp, time	Ampli -con size (bp)
16S rDNA	27F; AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	94°C, 2min	1502
	1492R; TACGGYTACCTTGTTACGACTT	94°C, 1min 55°C, 30sec 72°C, 1min 72°C, 10min	
<i>rpoB</i>	Strepto F; AARYTNGGMCCTGAAGAAAT	95°C, 2min	740
	Strepto R; TGNARTTTRTCATCAACCATGTG	94°C, 10sec 51°C, 10sec 60°C, 2min 72°C, 5min	
<i>sodA</i>	SOD-UP; TRCAYCATGAYAARCACCAT	95°C, 10min	435
	SOD-DOWN; ARRTARTAMGCRTGYTCCCARACRTC	94°C, 1min 51°C, 1min 72°C, 90sec 72°C, 10min	

\* The number of PCR cycle was 30; ID, initial denaturation; D, denaturation; A, annealing; E, extension; FE, final extension.

(iNtRON Co., Seoul, Korea)를 이용해 정제한 후 sodA-F3(5'-AGA AAA ACA CCC TGA AAT CGG-3')와 sodA-R4(5'-TGA CAA CCA ACC ATG CCC AAC C-3') 프라이머를 사용해 PCR 증폭물을 direct sequencing하였다.

#### 5. 무작위 클로닝법에 의한 세균 DNA 절편 클로닝.

세균 DNA 프로브를 클로닝하기 위하여, 세균 지놈 DNA를 *Hind*III(TaKaRa Bio Inc. Japan) 제한효소로 절단하였다. 이들 DNA 절편을 *Hind*III 제한효소로 절단하고, bacterial alkaline phosphatase(TaKaRa)로 5'의 인산기를 제거한 pBluescript II KS(+) vector(stratagene, La Jolla, CA, USA)를 DNA ligase(TaKaRa)로 ligation한 후 이들 ligation 혼합물을 *E. coli* DH5a에 형질전환하였다.

#### 6. DNA 프로브의 정제 및 표지

DNA 프로브의 정제는 QIAEX II<sup>®</sup>(QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 정제하였다. 즉, 1.5% 아가로스 젤 상에서 전기영동한 후 DNA 절편이 있는 부분을 깨끗하게 절제하여 1.5ml eppendorf tube에 담고, buffer QX1을 아가로스 젤 250mg당 600 $\mu$ l를 넣은 후 QIAEX II를 30초간 희석한 다음 20 $\mu$ l를 넣고, 50 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 증탕하여 젤을 완전히 녹인 후, 30초간 원심분리(13,000 $\times g$ )하여 상층액은 버리고, buffer QX1 500 $\mu$ l로 압착결정을 세척한 다음 30초 동안 원심분리(13,000 $\times g$ )하였다. buffer PE 500 $\mu$ l로 2회 세척하여 30초 동안 원심분리(13,000 $\times g$ )한 후 10~15분 정도 압착결정을 건조시킨 다음 10 mM Tris-Cl(pH 8.5) 20 $\mu$ l로 elution하여 실험에 사용하였다.

DNA 프로브로 사용될 세균 지놈 DNA 및 *Hind*III로 절단하여 클로닝된 DNA 절편은 DIG-High Prime(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)을 이용하여 표지하였다. 1 $\mu$ g의 세균 지놈 DNA 또는 20ng의 *Hind*III로 분해된 DNA 절편을 최종 부피가 16 $\mu$ l가 되도록 증류수로 희석하였다. 이를 넣고 끓는 물에서 10분간 가열하여 DNA를 변성시킨 후 재빨리 얼음에 넣어 식혔다. 여기에 4 $\mu$ l DIG-High Prime을 첨가하여 잘 섞고 잠깐 원심분리한 후 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 배양하였다. 배양 후 0.2M EDTA를 넣어 반응을 정지시켰다. 표지된 DNA는 AccuPrep<sup>TM</sup> PCR Purification kit(Bioneer Co.)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 정제하였다. 즉, 표지된 DNA 20 $\mu$ l당 PB buffer 100 $\mu$ l를 넣어 희석한 다음 binding column tube에 담아 실온에서 1분간 원심분리(13,000 $\times$

g) 하여 column을 통과한 여과액은 버리고, 다시 W buffer 250 $\mu$ l를 넣어 2회 반복하였다. 여분의 W buffer를 완전히 제거하기 위해 담아 실온에서 1분간 원심분리(13,000 $\times$  g) 하여 column을 통과한 여과액은 버리고, 다시 W buffer 250 $\mu$ l를 넣어 2회 반복하였다. 여분의 W buffer를 완전히 제거하기 위해 2분간 원심분리(13,000 $\times$  g) 한 후 column을 새로운 1.5ml eppendorf tube에 옮기고 여기에 30 $\mu$ l의 E buffer를 넣고 실온에서 1분간 원심분리 하여 여과액을 실험에 사용하였다.

## 7. IDBH 검색 및 Southern blot 분석

Mitis 군 연쇄상구균 중 6균종의 중-특이 DNA 프로브 후보를 IDBH 검색법으로 찾기 위해, 각 균종의 표준균주들인 *S. mitis* KCTC, 3556<sup>T</sup>, *S. oralis* CCUG 24891<sup>T</sup>, *S. pneumoniae* CCUG 28588<sup>T</sup>, *S. gordonii* CCUG 25608<sup>T</sup>, *S. sanguinis* CCUG 17826<sup>T</sup> 및 *S. parasanguinis* CCUG 30417<sup>T</sup>의 지놈 DNA로 부터 무작위 클로닝 된 *Hind*III 제한효소 DNA 절편이 삽입된 재조합 플라스미드들 중 각각의 균주로부터 16개씩을 선택하였다. 이들 재조합 플라스미드(20ng)를 10분간 끓여서 변성시키고, 얼음에서 5분간 방치하였다. 그 후 변성된 재조합 플라스미드를 Nylon membrane (Roche Diagnostics)에 옮긴 다음, 120 $^{\circ}$ C 진공오븐에서 30분 동안 baking하여 DNA를 membrane에 고정시켰다.

Southern blot을 시행하기 위해 각 세균에서 추출한 5 $\mu$ g의 지놈 DNA를 *Hind*III (TaKaRa) 제한효소로 절단한 다음 0.8% Agarose gel에 전기영동하고 Vacuum Blotter(Model 785, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 통상의 vacuum transfer법으로 Nylon membrane(Roche Diagnostics)에 transfer하고, 120 $^{\circ}$ C 진공오븐에서 30분 동안 baking하여 DNA를 membrane에 고정시켰다.

Hybridization은 통법으로 시행하였다. 즉, membrane을 hybridization 용액(5 $\times$  SSC, 50% formamide, 0.1% sodium-lauroylsarcosine, 0.02% SDS, 2% Blocking Reagent)으로 2시간 동안 prehybridization시킨 다음 이를 버리고, 새로운 hybridization 용액에 DIG-High Prime(Roche Diagnostics)을 이용하여 labeling시킨 각 세균의 전체 지놈 또는 DNA 프로브를 첨가하여 12시간 hybridization시켰다. Membrane을 실온에서 5분간 2 $\times$  wash 용액(2 $\times$  SSC, 0.1% SDS)으로 2회 세척하고 다시 0.5 $\times$  wash 용액(0.5 $\times$  SSC, 0.1% SDS)으로 68 $^{\circ}$ C에서 15분간 2번 세척하였다.

표지된 DNA 프로브가 membrane 상의 표적 DNA 가닥과 hybridization됨을 알아보

기 위한 detection 과정은 Roche Diagnostics사의 chemiluminescent detection kit를 사용하였으며, 제조회사의 지시대로 시행하였다. 즉, membrane을 100ml의 Blocking solution(buffer 2)에 넣고 30분간 배양한 후 buffer 2에 anti-DIG-AP conjugate를 75 mU/ml(1:10000) 첨가하여 희석한 20ml antibody solution에 membrane을 넣고 30분간 반응시켜서 15분간 100ml의 washing buffer로 2회 세척하였다. Membrane을 20ml의 Detection buffer(buffer 3)에서 2~5분간 안정되게 하였다. DNA쪽이 위로가게 하여 membrane을 polyethylene film상에 놓고 약 1 ml의 기질 (CSPD<sup>®</sup>)용액을 적용한 후, 즉시 반대 측 sheet로 덮어 기질이 membrane상에 고루 퍼질 수 있게 하였다. 5분간 상온에서 반응 후 과량의 액을 제거하고 film의 가장자리를 봉하여, luminescent reaction이 일어나도록 37℃ 배양기에서 15분간 반응시킨 후, 상온에서 X-ray film(Lumi-film chemiluminescent<sup>®</sup>, Roche Diagnostics)에 1~3 시간 노출시켰다.

#### 8. DNA 프로브 핵산염기서열결정 및 PCR 프라이머의 설계 및 PCR

DNA 프로브의 핵산 염기서열 결정을 위해 ChDC-F(5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG AA-3')와 ChDC-R(5'-CCT CAC TAA AGG GAA CAA AAG C-3') 프라이머를 사용해 분석하였고 프로브의 사이즈가 큰 Spn8의 경우 ChDC-F/ChDC-R 로 읽힌 염기서열을 바탕으로 프라이머 Spn8F-F(5'-ACG ACG TCC GCT AAT CTT TTC ATA-3')와 Spn8F-R(5'-ATG TCG AGG CAG CCA AGT TTT T-3')을 설계하여 핵산염기서열을 결정하였다.

종-특이 프라이머를 개발하기 위하여 본 실험에서 선택된 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 프라이머를 설계하여 그 프라이머 쌍들의 종 특이도를 PCR로 확인하였다. 이때 PCR 조건은 초기변성과 변성의 조건을 95℃에서 2분 94℃에서 1분 시행하고 결합은 각 프라이머의 적정 온도에서 45초 중합은 72℃에서 45초로 변성, 결합, 중합의 조건을 30회 반복한 후 추가 중합을 72℃에서 5분간 시행하였다. 선택된 프로브를 바탕으로 설계한 프라이머는 Sgo41-F1/R1, Smi21-f-F2/R2, Smi21-b-F/R, Spn8-F1/R1, Sor24-F1/R1, Spa17-F/R, Ssa21-F3/R2이고, 이들의 결합온도는 각각 54℃, 50℃, 50℃, 61℃, 59℃, 59℃, 70℃이다(Table 2).

### III. 연구 결과

#### 1. MLST법에 의한 *mitis* 군 연쇄상구균의 종 수준에서의 동정

한국구강미생물자원은행에서 분양받은 *mitis* 군 연쇄상구균의 16S rDNA, *rpoB*, *sodA* 유전자들을 PCR법으로 증폭한 결과 각각 약 1502bp, 740bp 그리고 430bp 크기의 증폭물을 얻어 핵산염기서열을 결정하였다. 본 연구에서 16S rDNA 핵산염기서열을 재결정하여 이들이 모두 *mitis* 군의 연쇄상구균임을 확인하였다(Table 3). *Mitis* 군의 13군종 중 보유하지 않은 7군종 *S. pseudopneumoniae*, *S. peroris*, *S. oligofermentans*, *S. infantis*, *S. sinensis*, *S. australis*, *S. cristatus* 표준균주의 16S rDNA, *rpoB*, *sodA* 유전자의 핵산염기서열을 GenBank의 데이터베이스에서 다운받아 사용하였다.

본 연구에서 사용된 *mitis* 군 연쇄상구균들의 16S rDNA, *rpoB*, *sodA* 유전자의 핵산염기서열을 분석하여 종 수준으로 동정하기 위하여 MegAlign(DNASTAR Inc., USA) 프로그램을 이용하여 Clustal V 방법에 의해 phylogenetic tree로 도식화 하였다(Fig.1-4). *Mitis* 군 연쇄상구균에 속하는 13종 표준균주들만의 분석결과 16S rDNA는 *S. mitis*, *S. pneumoniae*, *S. oralis*, *S. pseudopneumoniae*의 핵산염기서열의 상이성이 0.5%이내인 것을 알 수 있었고, *sodA* 유전자의 경우 *S. pneumoniae*와 *S. pseudopneumoniae* 균주의 핵산염기서열이 거의 100% 일치하여 두 균주의 분류는 어려운 것으로 나타났다(Fig. 1). *rpoB* 유전자의 경우 16S rDNA로 분류가 어려운 균주들의 핵산염기서열의 상이성이 2-4%로 더 높았고 세 유전자 중 13균주의 핵산염기서열의 상이성이 가장 높은 것을 알 수 있었다(Fig. 1). 이러한 이유로 본 연구에서 사용된 균주들의 최종 종 수준의 동정은 표준균주들의 *rpoB* 유전자 핵산염기서열을 기준으로 분류하였다(Table 3).

임상에서 분리된 81개의 균주들 및 8개의 참고 균주들을 13개의 표준균주들의 세 유전자의 핵산염기서열들을 기준으로 상동성을 비교 분석한 결과 이들 대부분은 11종의 군종에 속하는 것으로 알 수 있었다(Fig 2.-Fig. 4). *Mitis* 군 내의 어떤 군종 중에도 속하지 않은 균주(*Streptococcus* sp.)들은 16S rDNA, *rpoB*, *sodA* 유전자들 각각을 기준으로 하여 41균주, 7균주, 22균주로 분석되었다. 표준균주들의 16S rDNA로 분류가 어려웠던 *S. mitis*, *S. pneumoniae*, *S. oralis* 군종의 분류는 *rpoB* 유전자에 의해 참고



균주와 임상균주가 각각 8균주, 3균주 그리고 22균주로 명확히 분류되었다. 참고균주 Streptococcus sp. KCTC 5607의 경우 표준균주들의 *rpoB*와 *sodA* 유전자 핵산염기서열을 기준으로 분석할 경우 모두 *S. oralis* cluster에 포함되어 *S. oralis*로 동정하였고, Streptococcus sp. KCTC 5606과 함께 ChDC B677, ChDC B685, ChDC B686 임상균주들이 *S. pneumoniae*와 *S. oralis* cluster 사이에 다른 cluster로 분류되어 새로운 종으로의 분류가 가능할 것으로 생각된다. 표준균주들의 *sodA* 유전자 핵산염기서열을 기준으로 할 경우 *S. pneumoniae*와 *S. pseudopneumoniae*가 분류가 불가능 하였고, 표준균주들의 *rpoB* 유전자 핵산염기서열을 기준으로 할 경우 *S. mitis*(bootstrap value 52.6% 이상)로 분류되었던 임상균주 8개중 5개(ChDC B183, ChDC B188, ChDC B231, ChDC B242, ChDC PV-F28)가 *S. mitis*와 *S. pneumoniae*/*S. pseudopneumoniae* cluster 사이에 분류되었다. 즉. 이 5개의 임상균주는 *S. mitis*/*S. pneumoniae*/*S. pseudopneumoniae* 세 균주의 구분이 모호해 *sodA* 유전자로는 동정이 불가능 하였다. 또한 *rpoB* 유전자에 의해 *S. mitis*로 분류된 ChDC B300은 *sodA*에 의해서는 *S. pneumoniae*/*S. pseudopneumoniae* cluster 내에 포함되었다. *RpoB*에 의해 *S. oligofermentans*(bootstrap value 100%)로 동정된 ChDC B689는 *sodA*에 의해서는 *S. oralis*(bootstrap value 26%이하)로 동정되었고, *sodA*에 의해서 *S. oligofermentans*(bootstrap value 20.9%)로 동정된 ChDC B186은 *rpoB*에 의해서 *S. pneumoniae*(bootstrap value 63% 이상)로 동정되었다. 또한 본 연구에 사용된 8개의 참고균주 중 *rpoB*에 의해서는 Streptococcus sp. KCTC 5606이 그리고 *sodA*에 의해서는 Streptococcus sp. KCTC 5606와 *S. oralis* KCCM 41567 균주들이 *S. oralis*로 분류되지 않고, 어느 균종에도 포함되지 않는 것으로 나타났다.

본 연구에서 사용된 표준균주들의 세 가지 유전자 모두에서 동일한 종으로 분류된 균종은 *S. gordonii*로, 6개의 임상균주가 동일하게 동정되었다. 16S rDNA와 *sodA* 유전자의 핵산염기서열 분석에 의해 *S. sanguinis*로 분류되었던 임상균주들을 *rpoB* 유전자의 핵산염기서열을 분석한 결과 16균주 중 11개의 균주들만이 *S. sanguinis*로 분류되었고 나머지 5균주는 *S. sinensis*로 분류되었다. 또한 16S rDNA와 *rpoB*에 *S. parasanguinis*로 10개의 임상균주가 동정되었는데, *sodA* 유전자로는 이들 10개의 균주와 함께 *rpoB*에 의해 *S. australis*로 동정되었던 ChDC B330 임상균주가 더 포함되었다.

본 연구에서 임상균주들의 종 수준으로 동정을 표준균주들의 *rpoB* 유전자 핵산염기

서열을 기준으로 하여, *sodA*와 16S rDNA 유전자들의 핵산염기서열을 가지고 종 수준으로 동정한 결과와의 일치도를 백분율(%)로 정리하였다(Table 4).

Table 3. Identification of streptococci clinical isolates by the comparison analysis by the *rpoB* gene oligonucleotide sequence at the species level.

Species and strain	KCOM <sup>1</sup> No./ChDC <sup>2</sup> No.	Species and strain	KCOM No./ChDC No.
<i>Streptococcus mitis</i>	KCOM 1350/ChDC B183	<i>S. oralis</i>	KCOM 1501/ChDC B674- I
<i>S. mitis</i>	KCOM 1355/ChDC B188	<i>S. oralis</i>	KCOM 1502/ChDC B674- II
<i>S. mitis</i>	KCOM 1379/ChDC B231	<i>S. oralis</i>	KCOM 1503/ChDC B676
<i>S. mitis</i>	KCOM 1388/ChDC B242	<i>S. oralis</i>	KCOM 1505/ChDC B678
<i>S. mitis</i>	KCOM 1050/ChDC B300	<i>S. oralis</i>	KCOM 1507/ChDC B680
<i>S. mitis</i>	KCOM 1295/ChDC F276	<i>S. oralis</i>	KCOM 1508 /ChDC B681
<i>S. mitis</i>	KCOM 1285/ChDC PV-F26	<i>S. oralis</i>	KCOM 1518 /ChDC B691
<i>S. mitis</i>	KCOM 1286/ChDC PV-F28	<i>S. oralis</i>	KCOM 1293/ChDC F221
<i>S. pneumoniae</i>	KCOM 1353/ChDC B186	<i>S. infantis</i>	KCOM 1358/ChDC B194
<i>S. pneumoniae</i>	KCOM 1360/ChDC B196	<i>S. infantis</i>	KCOM 1375/ChDC B227
<i>S. pneumoniae</i>	KCOM 1016/ChDC B302	<i>S. infantis</i>	KCOM 1377/ChDC B229
<i>S. oralis</i>	KCOM 1401/ChDC B253	<i>S. peroris</i>	KCOM 1475/ChDC B648
<i>S. oralis</i>	KCOM 1407/ChDC B258	<i>S. australis</i>	KCOM 1371/ChDC B218
<i>S. oralis</i>	KCOM 1408/ChDC B260	<i>S. australis</i>	KCOM 1386/ChDC B239
<i>S. oralis</i>	KCOM 1414/ChDC B279	<i>S. australis</i>	KCOM 1439/ChDC B315
<i>S. oralis</i>	KCOM 1416/ChDC B286	<i>S. australis</i>	KCOM 1441/ChDC B317
<i>S. oralis</i>	KCOM 1422/ChDC B297	<i>S. australis</i>	KCOM 1027/ChDC B330
<i>S. oralis</i>	KCOM 1423/ChDC B298	<i>S. australis</i>	KCOM 1444/ChDC B340
<i>S. oralis</i>	KCOM 1442/ChDC B338	<i>S. australis</i>	KCOM 1296/ChDC F297
<i>S. oralis</i>	KCOM 1447/ChDC B402	<i>S. australis</i>	KCOM 1496/ChDC B669
<i>S. oralis</i>	KCOM 1493/ChDC B666	<i>S. australis</i>	KCOM 1498/ChDC B671

<sup>1</sup> KCOM, Korean Collection for Oral Microbiology

<sup>2</sup> ChDC, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University;

(continued on next page)

Table 3. (continued)

Species and strain	KCOM No./ChDC No.	Species and strain	KCOM No./ChDC No.
<i>Streptococcus gordonii</i>	KCOM 1347/ChDC B180	<i>S. sanguinis</i>	KCOM 1428/ChDC B305- I
<i>S. gordonii</i>	KCOM 1357/ChDC B193	<i>S. sanguinis</i>	KCOM 1019/ChDC B305-II
<i>S. gordonii</i>	KCOM 1364/ChDC B211	<i>S. sanguinis</i>	KCOM 1434/ChDC B331
<i>S. gordonii</i>	KCOM 1369/ChDC B216	<i>S. sanguinis</i>	KCOM 1070/ChDC YSA1
<i>S. gordonii</i>	KCOM 1387/ChDC B241	<i>S. sanguinis</i>	KCOM 1169/ChDC YSA2
<i>S. gordonii</i>	KCOM 1506/ChDC B679	<i>S. sanguinis</i>	KCOM 1171/ChDC YSA4
<i>S. parasanguinis</i>	KCOM 1352/ChDC B185	<i>S. sanguinis</i>	KCOM 1192/ChDC YSA201
<i>S. parasanguinis</i>	KCOM 1359/ChDC B195	<i>S. sinensis</i>	KCOM 1372/ChDC B219
<i>S. parasanguinis</i>	KCOM 1365/ChDC B212	<i>S. sinensis</i>	KCOM 1017/ChDC B304-I
<i>S. parasanguinis</i>	KCOM 1366/ChDC B213	<i>S. sinensis</i>	KCOM 1427/ChDC B304- II
<i>S. parasanguinis</i>	KCOM 1368/ChDC B215	<i>S. sinensis</i>	KCOM 1018/ChDC B304-III
<i>S. parasanguinis</i>	KCOM 1370/ChDC B217	<i>S. sinensis</i>	KCOM 1576/ChDC OS38
<i>S. parasanguinis</i>	KCOM 1415/ChDC B285	<i>Streptococcus sp.</i>	KCOM 1349/ChDC B182
<i>S. parasanguinis</i>	KCOM 1497/ChDC B670	<i>Streptococcus sp.</i>	KCOM 1425/ChDC B303- I
<i>S. parasanguinis</i>	KCOM 1585/ChDC OS49	<i>Streptococcus sp.</i>	KCOM 1426/ChDC B303- II
<i>S. parasanguinis</i>	KCOM 1294/ChDC F229	<i>Streptococcus sp.</i>	KCOM 1504 /ChDC B677
<i>S. sanguinis</i>	KCOM 1567/ChDC B203	<i>Streptococcus sp.</i>	KCOM 1512 /ChDC B685
<i>S. sanguinis</i>	KCOM 1014/ChDC B259	<i>Streptococcus sp.</i>	KCOM 1513 /ChDC B686
<i>S. sanguinis</i>	KCOM 1419/ChDC B294	<i>S. oligofermentus</i>	KCOM 1516/ChDC B689
<i>S. sanguinis</i>	KCOM 1420/ChDC B295		

<sup>1</sup> KCOM, Korean Collection for Oral Microbiology<sup>2</sup> ChDC, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University;

Table 4. Proportion of identification according to *rpoB* gene.

Taxon	% of strains (number of strains)		
	<i>rpoB</i>	<i>sodA</i>	16S rDNA
<i>S. gordonii</i>	100 (6)	100 (6)	100 (6)
<i>S. oralis</i>	100 (22)	86.4 (19)	40.9 (9)
			<i>S.mitis/S.oralis</i> (19)
<i>S. mitis</i>	100 (8)	25 (2)	0 (0)
			<i>S.mitis/S.pneumoniae</i> (5)
<i>S. pneumoniae</i>	100 (7)	0 (0)	0 (0)
<i>S. pseudopneumoniae</i>	0 (0)	<i>S.pseudopneumoniae</i> <i>/S.pneumoniae</i> (6)	<i>S.pseudopneumoniae</i> <i>/S.pneumoniae</i> (6)
<i>S. parasanguinis</i>	100 (10)	91 (11)	100 (10)
<i>S. sanguinis</i>	100 (11)	75 (16)	75 (16)
<i>S. sinensis</i>	100 (5)	0 (0)	0 (0)
<i>S. australis</i>	100 (9)	11.1 (1)	44.4 (4)
<i>S. peroris</i>	100 (1)	33.3 (3)	100 (1)
<i>S. infantis</i>	100 (3)	75 (4)	75 (4)
<i>S. oligofermentans</i>	100(1)	0 (1)	0 (0)
<i>Streptococcus sp.</i>	6	22	41

## 2. IDBH 검색 및 Southern blot 분석법을 통한 종-특이 DNA 프로브의 개발

Mitis 군 연쇄상구균의 균주 중 *S. gordonii*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. pneumoniae*, *S. parasanguinis* 그리고 *S. sanguinis* 균종들의 종-특이 프로브를 개발하기 위해서 IDBH 검색법에 의해 각 세균종들의 표준균주 지놈 DNA를 *Hind*III로 절단한 DNA 절편 중 크기가 0.5-2.0 kbp 정도 되는 종-특이 DNA 프로브 후보들(Sgo41, 708bp; Sor24, 1029bp; Smi21, 1020bp; Spn8, 1568bp; Spa17, 669bp; Ssa21, 938bp)을 선택하였다(Fig 5).

선택된 프로브의 종-특이도를 검증하기 위해 먼저 표준균주의 지놈 DNA를 이용하여 Southern blot hybridization을 시행하였다(Fig. 6). 그 결과 Sgo41, Sor24, Smi21과 Ssa21 프로브는 각각 *S. gordonii*, *S. oralis*, *S. mitis*, 및 *S. sanguinis*에 대한 종 특이성이 있음을 알 수 있었다. Spn8의 경우 6종의 표준균주 모두에서 양성반응을 보였으며, Spa17 프로브는 *S. parasanguinis* CCUG 30417<sup>T</sup>와 *S. sanguinis* CCUG 17826<sup>T</sup> 두 균주 지놈 DNA에 양성반응을 보였다(Fig. 6). 각 프로브들의 종-특이성을 표준균주들의 *rpoB* 유전자 핵산염기서열 비교 분석에 의해 동정된 임상균주로 검증한 결과 Sgo41, Spa17, Sor24 프로브는 각각의 세균 종에 대한 특이성이 있음을 알 수 있었다(Fig.7, 8, 9). Spn8은 표준균주에서의 결과와는 일관성을 보이지 못하였으며(Fig.11), Ssa21은 종-특이 프로브로 생각되나 임상균주에 의한 검증과정은 시행하지 못했다. 표준균주에서는 종-특이 프로브로 확인되었고, 시험한 어느 임상균주에서도 양성반응이 확인되지 않은 Smi21은 *Streptococcus mitis* KCTC 3556<sup>T</sup> 에 균주-특이 프로브로 확인되었다(Fig. 10).

## 3. 프로브 핵산염기서열결정, 종-특이 PCR 프라이머의 설계 및 PCR

선택된 6개의 DNA 프로브 핵산염기서열을 결정하여 blastn search한 결과 Sgo41은 transcription regulator인 *lysR* 유전자 92%의 상동성을 갖는 것으로 확인되었고, Smi21은 앞쪽의 570bp는 glycosyl transferase로 뒤쪽의 약 400bp는 Eps9H로 99%의 상동성을 확인하였으며 Spn8은 phosphoglucomutase로 99% 상동성을 Ssa21은 hypothetical protein Hydrolase 94%인 것을 알 수 있었다. 그 외 Sor24과 Spa17은 각 균종에서는 아직 밝혀지지 않은 유전자인 것으로 확인되었다.

각 프로브들의 핵산염기서열을 바탕으로 PCR 프라이머를 디자인 하여 중합연쇄반응을 시행한 결과 Sgo41-F1/R1는 *S. gordonii*에 대한 종-특이 프라이머로 확인되었고

(Fig. 12), Ssa21-F3/R2 프라이머의 경우 *sodA*와 16S rDNA에 의해 동정된 16개의 *S. sanguinis*에서 증폭물이 확인되었다(Fig. 13).

Smi21-f-F2/R2와 Smi21-b-F/R 프라이머 쌍은 균주-특이 프로에서 검증된 것과 같이 *Streptococcus mitis* KCTC 3556<sup>T</sup>에 균주-특이적인 프라이머로 확인되었다(Fig. 14와 15).

Sor24 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 디자인된 5 쌍의 프라이머들을 이용하여 PCR을 수행한 결과 *mitis* 군 표준균주에서는 *S. oralis* 종-특이 적으로 확인되었으나, 참고균주 중 KCTC 5605와 KCTC 5607 두 균주와 임상균주 18균주 중 11균주에서만, 즉 *S. oralis* 균주 중 59%에서 증폭물이 확인되었다. 또한 Spn8 프로브를 바탕으로 디자인된 프라이머 쌍 중 *S. pneumoniae* 표준균주와 참고균주 모두에서 증폭물이 확인된 프라이머들 모두 임상균주에서는 어떤 증폭물도 확인되지 않았다(Fig. 16).

Spa17-F/R 프라이머의 경우 *rpoB* 유전자에 의해 *S. parasanguinis*로 동정된 10균주와 ChDC B330 임상균주 지놈 DNA에서 증폭물이 생성되었다(Fig17). 이 11개의 균주는 *sodA* 유전자에 의해 *S. parasanguinis*로 동정된 균주들이다.

Table 5. The results of homologous search (BLASTn) of DNA probes.

Probe	gene name [species]	Locus Name	Identity (%)	Length (bp)
Sgo41	transcription regulator, <i>LysR</i> family [ <i>S. gordonii</i> Challis NCTC7868 <sup>T</sup> ]	SGO_1088 <sup>a</sup>	445/479 (92)	708
Smi21	glycosyl transferase, group 2 family protein (V) [ <i>S. mitis</i> NCTC 12261 <sup>T</sup> ]	SMT0223 <sup>a</sup>	573/576 (99)	1020
	Eps9H [ <i>S. mitis</i> NCTC 12261 <sup>T</sup> ]	SMT0222 <sup>a</sup>	357/359 (99)	
Spn8	Phosphoglucomutase [ <i>S. pneumoniae</i> R6 ]	spr1351 <sup>a</sup>	577/579 (99%)	1568
	preprotein translocase, SecA subunit (secA-2) [ <i>S. pneumoniae</i> TIGR4]	SP_1759 <sup>a</sup>	727/992 (73%)	
Sor24	secA2, verified frameshift (secA2) [ <i>S. gordonii</i> Challis NCTC7868]	SGO_0974 <sup>a</sup>	598/901 (66%)	1029
	preprotein translocase, SecA chain (secA) [ <i>S. agalactiae</i> 515]	SAL_1526 <sup>a</sup>	619/1005 (61%)	
Spa17	conserved hypothetical protein [ <i>S. gordonii</i> Challis NCTC7868]	SGO_1664 <sup>a</sup>	383/571 (67%)	669
	hypothetical protein homologus [ <i>S. pneumoniae</i> G54]	SPN03121 <sup>a</sup>	384/590 (65%)	
	conserved hypothetical protein [ <i>S. mutans</i> UA159]	SMU_1703c <sup>a</sup>	403/636 (63%)	
	conserved hypothetical protein [ <i>S. mitis</i> NCTC 12261]	SMT0270 <sup>a</sup>	368/574 (64%)	
Ssa21	Conserved hypothetical protein Hydrolase, alpha/beta superfamily, putative [ <i>S. sanguinis</i> SK36 ]	CP000387 <sup>b</sup>	891/938 (94%)	938

<sup>a</sup> TIGR locus name in the genomic database of TIGR.

<sup>b</sup> GenBank accession number.



Table 6. Sequences of the primers designed from probes.

Probe	Oligonucleotide sequences (5' → 3')	Annealing Temp.(°C)	Amplicon size (bp)
Sgo41	Sgo41 F1-ATT CCC TTA GTG TTC TGA TTG TT Sgo41 R1-GAC CCT CCG TTT CTT TAT GA	54	527
	Smi21-f-F2-TTG GGC TCA GAT AAA ATA AT Smi21-f-R2-TTT GAA ACG TTG TCT TGA A	50	351
Smi21	Smi21-b-F-ATT AAA ATA GCG ATG ATA CG Smi21-b-R-AGA CCA GGA AAA ATT AAC TCA AAA	50	259
	Spn8 F1-CTG TGC CCC TCT TTG ATG GA Spn8 R1-CTA CAC CGC GTT CTT TCT CGT T	61	409
Sor24	Sor24 F1-ACG GGG AGA GCC TGC GAT AAT Sor24 R1-GGC TGA GAT GAA TAC GGG TGA GG	59	409
	Spa17 F-ATG GCC CAA ATC ACT CCT T Spa17 R-TTA TCC GCA YYA TCT TTT ATT TTG	59	509
Ssa21	Ssa21 F3-TGG AGC AGC CTG TCG TCA TCA T Ssa21 R2-AGG CAG ACC AGC GAG TTT TCA TTT	70	635

Table 7. Specificity of the primers designed from probes.

Species and strain		primer						
		Sgo41 F1/R1	Smi21-f F2/R2	Smi21 b-F/R	Sor24 F1/R1	Spn8 F1/R1	Spa17 F/R	SSa21 F3/R2
<i>Streptococcus gordonii</i> CCUG 25608 <sup>T</sup>		+	-	-	-	-	-	-
<i>S. mitis</i> KCTC 3556 <sup>T</sup>		-	+	+	-	-	-	-
<i>S. oralis</i> CCUG 24891 <sup>T</sup>		-	-	-	+	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i> CCUG 28588 <sup>T</sup>		-	-	-	-	+	-	-
<i>S. parasanguinis</i> CCUG 30417 <sup>T</sup>		-	-	-	-	-	+	-
<i>S. sanguinis</i> CCUG 17826 <sup>T</sup>		-	-	-	-	-	-	+
<i>S. oralis</i> KCCM 41567		-	-	-	-	-	-	-
<i>S. oralis</i> KCTC 5605		-	-	-	+	-	-	-
<i>Streptococcus sp.</i> KCTC 5606		-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus sp.</i> KCTC 5607		-	-	-	+	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i> KCCM 40410		-	-	-	-	+	-	-
<i>S. pneumoniae</i> KCCM 41569		-	-	-	-	+	-	-
<i>S. pneumoniae</i> KCCM 41570		-	-	-	-	+	-	-
<i>S. pneumoniae</i> KCTC 3932		-	-	-	-	+	-	-
Species and strain	KCOM No./ChDC No.							
<i>S. gordonii</i>	KCOM 1347/ChDC B180	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. gordonii</i>	KCOM 1357/ChDC B193	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. gordonii</i>	KCOM 1364/ChDC B211	+	-	-	+	-	-	-
<i>S. gordonii</i>	KCOM 1369/ChDC B216	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. gordonii</i>	KCOM 1387/ChDC B241	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. gordonii</i>	KCOM 1506/ChDC B679	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. parasanguinis</i>	KCOM 1352/ChDC B185	-	-	-	-	-	+	-
<i>S. parasanguinis</i>	KCOM 1359/ChDC B195	-	-	-	-	-	+	-
<i>S. parasanguinis</i>	KCOM 1365/ChDC B212	-	-	-	-	-	+	-
<i>S. parasanguinis</i>	KCOM 1366/ChDC B213	-	-	-	-	-	+	-
<i>S. parasanguinis</i>	KCOM 1368/ChDC B215	-	-	-	-	-	+	-
<i>S. parasanguinis</i>	KCOM 1370/ChDC B217	-	-	-	-	-	+	-
<i>S. parasanguinis</i>	KCOM 1415/ChDC B285	-	-	-	-	-	+	-
<i>S. parasanguinis</i>	KCOM 1497/ChDC B670	-	-	-	-	-	+	-
<i>S. parasanguinis</i>	KCOM 1585/ChDC OS49	-	-	-	-	-	+	-
<i>S. parasanguinis</i>	KCOM 1294/ChDC F229	-	-	-	-	-	+	-
<i>S. oligopermentus</i>	KCOM 1516/ChDC B689	-	-	-	-	-	-	-

(continued on next page)

Table 7. (continued in previous page)

Species and strain	KCOM No./ChDC No.	primer							
		Sgo41	Smi21-f	Smi21-b	Sor24	Spn8	Spa17	Ssa21	
		F1/R1	F2/R2	F/R	F1/R1	F1/R1	F/R	F3/R2	
<i>S. oralis</i>	KCOM 1401/ChDC B253	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. oralis</i>	KCOM 1407/ChDC B258	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. oralis</i>	KCOM 1408/ChDC B260	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. oralis</i>	KCOM 1414/ChDC B279	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. oralis</i>	KCOM 1416/ChDC B286	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. oralis</i>	KCOM 1422/ChDC B297	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. oralis</i>	KCOM 1423/ChDC B298	-	-	-	+	-	-	-	
<i>S. oralis</i>	KCOM 1442/ChDC B338	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. oralis</i>	KCOM 1447/ChDC B402	-	-	-	+	-	-	-	
<i>S. oralis</i>	KCOM 1493/ChDC B666	-	-	-	+	-	-	-	
<i>S. oralis</i>	KCOM 1501/ChDC B674- I	-	-	-	+	-	-	-	
<i>S. oralis</i>	KCOM 1502/ChDC B674- II	-	-	-	+	-	-	-	
<i>S. oralis</i>	KCOM 1503/ChDC B676	-	-	-	+	-	-	-	
<i>S. oralis</i>	KCOM 1505/ChDC B678	-	-	-	+	-	-	-	
<i>S. oralis</i>	KCOM 1507/ChDC B680	-	-	-	+	-	-	-	
<i>S. oralis</i>	KCOM 1508 /ChDC B681	-	-	-	+	-	-	-	
<i>S. oralis</i>	KCOM 1518 /ChDC B691	-	-	-	+	-	-	-	
<i>S. oralis</i>	KCOM 1293/ChDC F221	-	-	-	+	-	-	-	
<i>S. pneumoniae</i>	KCOM 1353/ChDC B186	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. pneumoniae</i>	KCOM 1360/ChDC B196	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. pneumoniae</i>	KCOM 1016/ChDC B302	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. mitis</i>	KCOM 1350/ChDC B183	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. mitis</i>	KCOM 1355/ChDC B188	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. mitis</i>	KCOM 1379/ChDC B231	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. mitis</i>	KCOM 1388/ChDC B242	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. mitis</i>	KCOM 1050/ChDC B300	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. mitis</i>	KCOM 1295/ChDC F276	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. mitis</i>	KCOM 1285/ChDC PV-F26	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. mitis</i>	KCOM 1286/ChDC PV-F28	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. peroris</i>	KCOM 1475/ChDC B648	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. sinensis</i>	KCOM 1372/ChDC B219	-	-	-	-	-	-	+	
<i>S. sinensis</i>	KCOM 1017/ChDC B304-I	-	-	-	-	-	-	+	

(continued on next page)

Table 7. (continued in previous page)

Species and strain	KCOM No./ChDC No.	primer							
		Sgo41	Smi21-f	Smi21-b	Sor24	Spn8	Spa17	SSa21	
		F1/R1	F2/R2	F/R	F1/R1	F1/R1	F/R	F3/R2	
<i>S. sinensis</i>	KCOM 1427/ChDC B304-II	-	-	-	-	-	-	+	
<i>S. sinensis</i>	KCOM 1018/ChDC B304-III	-	-	-	-	-	-	+	
<i>S. sinensis</i>	KCOM 1576/ChDC OS38	-	-	-	-	-	-	+	
<i>S. sanguinis</i>	KCOM 1567/ChDC B203	-	-	-	-	-	-	+	
<i>S. sanguinis</i>	KCOM 1014/ChDC B259	-	-	-	-	-	-	+	
<i>S. sanguinis</i>	KCOM 1419/ChDC B294	-	-	-	-	-	-	+	
<i>S. sanguinis</i>	KCOM 1420/ChDC B295	-	-	-	-	-	-	+	
<i>S. sanguinis</i>	KCOM 1428/ChDC B305- I	-	-	-	-	-	-	+	
<i>S. sanguinis</i>	KCOM 1019/ChDC B305-II	-	-	-	-	-	-	+	
<i>S. sanguinis</i>	KCOM 1434/ChDC B331	-	-	-	-	-	-	+	
<i>S. sanguinis</i>	KCOM 1070/ChDC YSA1	-	-	-	-	-	-	+	
<i>S. sanguinis</i>	KCOM 1169/ChDC YSA2	-	-	-	-	-	-	+	
<i>S. sanguinis</i>	KCOM 1171/ChDC YSA4	-	-	-	-	-	-	+	
<i>S. sanguinis</i>	KCOM 1192/ChDC YSA201	-	-	-	-	-	-	+	
<i>S. infantis</i>	KCOM 1358/ChDC B194	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. infantis</i>	KCOM 1375/ChDC B227	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. infantis</i>	KCOM 1377/ChDC B229	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. peroris</i>	KCOM 1475/ChDC B648	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. australis</i>	KCOM 1371/ChDC B218	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. australis</i>	KCOM 1386/ChDC B239	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. australis</i>	KCOM 1439/ChDC B315	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. australis</i>	KCOM 1441/ChDC B317	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. australis</i>	KCOM 1027/ChDC B330	-	-	-	-	-	+	-	
<i>S. australis</i>	KCOM 1444/ChDC B340	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. australis</i>	KCOM 1296/ChDC F297	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. australis</i>	KCOM 1496/ChDC B669	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. australis</i>	KCOM 1498/ChDC B671	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Streptococcus sp.</i>	KCOM 1349/ChDC B182	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Streptococcus sp.</i>	KCOM 1425/ChDC B303- I	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Streptococcus sp.</i>	KCOM 1426/ChDC B303- II	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Streptococcus sp.</i>	KCOM 1504 /ChDC B677	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Streptococcus sp.</i>	KCOM 1512 /ChDC B685	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Streptococcus sp.</i>	KCOM 1513 /ChDC B686	-	-	-	-	-	-	-	

#### IV. 총괄 및 고안

Mitis 군 연쇄상구균에는 13개의 종이 속해 있지만, 16S rDNA 핵산염기서열 결정법에 의해 분류가 되지 않는 종들이 있다. 본 연구는 한국인의 구강에서 16S rDNA 핵산염기서열결정법에 의해 mitis 군 연쇄상구균으로 동정된 81개의 임상균주와 8개의 참고균주를 표준균주들의 *rpoB* 및 *sodA* 유전자 핵산염기서열을 바탕으로 종 수준으로 다시 동정하고, IDBH 검색법 및 Southern blot 분석법을 통하여 종-특이 DNA 프로브를 개발하며, 이들 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 종-특이 PCR 프라이머를 개발하고자 시행되었다.

본 연구 결과 표준균주들의 *rpoB* 유전자 핵산염기서열을 비교 분석한 결과가 종간의 상이성이 가장 컸고, 또한 종간의 분류가 용이하였다. 이러한 이유로 본 연구에서는 *rpoB* 핵산염기서열을 81개 임상분리 균주들을 종 수준으로의 동정 기준으로 정하였다. 그 결과 74개 임상균주가 11개 균종으로 분류되었으며, 나머지 7개 균주는 새로운 종으로 재분류될 가능성이 있는 것으로 분석되었다. Michel 등(2004)에 의하면 mitis 군 연쇄상구균의 *rpoB* 유전자의 핵산염기서열 유사성이 94%인 것으로 보고되었고, *sodA*는 92%–96%(Kawamura *et al.*, 1999, Poyart *et al.*, 2000), *groESL*는 95.1%–91.5%(Vandamme *et al.*, 1997)로 알려져 있다. Kawamura 등(1999)은 mitis 군 연쇄상구균을 *sodA* 부분 핵산 염기서열(366bp)을 비교 분석한 결과 *S. pneumoniae*를 제외한 mitis 군 연쇄상구균 각 종의 cluster가 분리되었고 *S. pneumoniae*도 *S. mitis* cluster 내에 별개의 cluster를 이루어 모든 균종의 분류가 가능한 것으로 보고하였다. 또한 Hoshino 등(2005)은 nonhemolytic 연쇄상구균을 *sodA* 유전자에 의해 동정한 결과 실험한 nonhemolytic 연쇄상구균 중 96.6%가 성공적으로 동정되었고 mitis 군 균주들 포함한 모든 nonhemolytic 연쇄상구균이 100% 정확하게 동정되었다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 앞선 연구결과와는 다르게 *sodA* 유전자에 의한 동정 성공률은 78.6%에 그쳤고, *S. pneumoniae*와 *S. pseudopneumoniae*의 구별은 불가능하였으며, *S. pneumoniae*와 *S. mitis*의 구별이 모호한 것으로 나타났다. Hoshino 등(2005)은 *rpoB* 유전자 핵산염기서열을 이용한 연구 결과, *S. sanguinis* SK36 한개의 균주를 제외한

모든 nonhemolytic 연쇄상구균을 종 수준으로 동정하였다고 보고하였다. 하지만, 본 연구에서는 *rpoB* 유전자의 핵산염기서열을 기준으로 종 수준에서의 동정이 되지 않는 균주도 7균주가 있어서, 동정 성공율은 93%였다. 이러한 차이는 숙주에 따라 분리되는 연쇄상구균의 종의 다양성이 존재하기 때문인 것으로 생각된다.

참고균주들 중 KCTC 5607/JCM 5704와 KCTC 5606/JCM 5702들은 Bridge and Sneath에 의해 1982년에 *S. oralis*로 분리·동정되었으나, 최근 일본의 JCM(Japan Collection of Microorganisms)에서는 종 수준에서의 분류가 되지 않는 균주로 소개되었다(<http://www.jcm.riken.go.jp>). 본 연구에서 KCTC 5607/JCM 5704 균주는 표준균주의 *rpoB*와 *sodA* 두 유전자의 핵산염기서열과 상동성을 비교 분석한 결과 *S. oralis*로 동정되었다. 하지만, KCTC 5606/JCM 5702의 경우는 세 개의 임상균주들(ChDC B677, ChDC B685, ChDC B686)과 함께 다른 표준균주들과는 별개의 cluster를 이룬 것으로 보아 새로운 균종으로 분류될 수 있는 가능성이 높은 것으로 생각된다. 그러므로 분류학적으로 세균의 종 수준에서의 동정에 있어서 일종의 황금기준인 DNA-DNA hybridization법 및 여러 다른 세균 동정법을 시행하여 새로운 균종인지를 검증하는 연구가 시행되어야 할 것으로 생각된다.

본 연구에서 5개 임상균주가 *rpoB* 유전자 핵산염기서열을 이용하여 비교 분석한 결과 5개 임상균주가 *S. sinensis*로 분류되었다. 이들 5개 임상균주들은 16S rDNA와 *sodA* 유전자에 의해서는 *S. sanguinis*로 분류되었다. 최근 Hoshino 등(2005)은 11개의 *S. sanguinis* 중 한 균주(SK36)가 *rpoB* 유전자에 의해 *S. sinensis*로 잘못 동정되었다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 *rpoB* 유전자 분석법에 의해 *S. sinensis*로 동정된 5개의 임상균주들에 대한 종 수준에서의 재동정이 필요할 것으로 생각된다.

본 연구 결과, IDBH 검색법 및 Southern blot 분석법에 의해 *S. gordonii*, *S. oralis*, *S. parasanguinis* 및 *S. sanguinis* 각각에 대한 종-특이 DNA 프로브인 Sgo41, Sor24, Spa17, 그리고 Ssa21을 개발하였다. 이들 중 Sgo41 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 *S. gordonii*에 대한 종-특이성이 있는 PCR 프라이머(Sgo41-F1/R1)가 개발되었다. 하지만, 나머지 4개의 종-특이 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 한 종-특이 PCR 프라이머는 개발되지 못하였다. 이는 각 세균 종에 속하는 임상균주들의

DNA 프로브에 해당하는 유전자의 핵산염기서열의 변이가 높기 때문인 것으로 생각된다. 그러므로, 앞으로 각 DNA 프로브에 해당되는 유전자를 각 균주들에서 모두 클로닝하여, 이들의 핵산염기서열을 결정한 다음에 종-특이 PCR 프라이머를 설계하는 연구가 필요하리라 생각된다.

본 연구에서 *Streptococcus mitis* KCTC 3556<sup>T</sup> 균주 특이 DNA 프로브(Smi21)와 두 쌍의 PCR 프라이머들(Smi21-f-F2/R2와 Smi21-b-F/R)가 개발되었다. 이는 Kim 등(2005)이 *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586<sup>T</sup> 균주-특이 DNA 프로브인 Fu12를 바탕으로 *F. nucleatum* ATCC 25586<sup>T</sup> 균주-특이 PCR 프라이머 세 쌍의 보고한 것과 유사한 결과이다. 이는 같은 종에 속하는 균주들이라도 유전자형의 차이가 상당히 존재함을 시사한다고 할 수 있다.

또한, Spn8-F1/R1 프라이머쌍에 의해 서양인에서 분리 동정된 *S. pneumoniae*의 표준균주와 참고균주 모두에서 PCR 산물이 증폭되었지만, 한국인에서 분리 동정된 임상균주에서는 어떤 증폭물도 얻지 못했다. 최근 정 등(2006)은 서양인에게서 분리 동정된 *Prevotella intermedia*의 표준균주와 참고균주에 특이적인 DNA 프로브인 Pig6 및 Pig6-F3/R3 프라이머 쌍을 개발하여 보고하였다. 이들의 결과는 본 연구와 동일한 것으로, 이는 서양인과 한국인에게서 분리된 동일한 균종의 구강미생물의 유전자형에 차이가 있음을 시사하는 것이라 생각된다.

MLST에 이용되는 유전자의 핵산염기서열을 바탕으로 세균의 종-특이 프라이머가 개발되기도 한다. Fabien 등(1997)은 D-alanin:D-alanin ligases(*ddl*) 유전자 내의 특정 증폭물을 가지고 *viridans* 군과 *milleri* 군 연쇄상구균을 동정할 수 있는 프라이머를 개발하였다. 이 연구에서 개발된 *S. mitis*와 *S. oralis*에 대한 종-특이 프라이머(F-1/F-2와 G-1/G-2)를 이용하여, 본 연구에서 이용된 한국인에서 분리 동정된 임상균주 지놈 DNA들을 이용하여 PCR을 시행하였다(Data not shown). 그 결과 *S. mitis* 종-특이 프라이머에 의해서는 본 연구에서 동정된 임상균주 중 한 균주에서만 증폭물이 확인되었다. *S. oralis* 종-특이 프라이머에 의해서는 *S. oralis*로 동정된 임상균주에서는 양성 반응을 보였지만, 표준균주에서는 PCR 산물이 증폭되지 않았는데, 이는 Kawamura 등(1999)의 연구 결과와 일치한 것이었다. 이러한 결과들을 비교할 때, 본 연구에서 *mitis*

군 연쇄상구균을 종 수준으로 가장 잘 동정할 수 있는 *rpoB* 유전자의 핵산염기서열을 바탕으로 종-특이 PCR 프라이머를 개발하는 연구를 차후에 수행하는 것도 좋을 것으로 생각된다.

이상의 연구 결과를 종합하면, *rpoB* 유전자의 핵산염기서열을 바탕으로 *mitis* 군 연쇄상구균의 종 수준에서의 동정이 현재로써는 DNA-DNA hybridization법을 제외하고는 정확도가 가장 높은 것으로 생각되며, IDBH 검색법 및 Southern blot 분석법이 세균 종의 종-특이 DNA 프로브 개발 및 종-특이 PCR 프라이머 개발에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.



## V. 결 론

본 연구는 한국인의 구강에서 16S rDNA 핵산서열결정법에 의해 mitis 군 연쇄상구균으로 동정된 81개의 임상균주와 8개의 참고균주를 표준균주들의 *rpoB* 및 *sodA* 유전자 핵산염기서열을 바탕으로 종 수준으로 다시 동정하고, IDBH 검색법 및 Southern blot 분석법을 통하여 6개 종-특이 DNA 프로브를 개발하고, 이들 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 종-특이 PCR 프라이머를 개발하고자 시행되었으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 한국인의 임상균주에서 분리된 81균주의 mitis 군 연쇄상구균들은 *rpoB* 유전자의 핵산염기서열을 바탕으로, 6균주가 *S. gordonii*, 10균주가 *S. parasanguinis*, 11균주가 *S. sanguinis*, 8균주가 *S. mitis*, 3균주가 *S. pneumoniae*, 18균주가 *S. oralis*, 3균주가 *S. infantis*, 9균주가 *S. australis*, 5균주가 *S. sinensis*, 1균주씩의 *S. peroris* 및 *S. oligofermentans*로 동정되었고, 나머지 7 균주는 새로운 균종일 가능성이 있는 것으로 생각된다.
2. IDBH 검색법 및 Southern blot 분석법에 의해 *S. gordonii*, *S. oralis* 및 *S. parasanguinis* 각각에 대한 종-특이 DNA 프로브인 Sgo41, Sor24, 그리고 Spa17이 개발되었다. 이들 중 Sgo41 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 *S. gordonii*에 대한 종-특이성이 있는 PCR 프라이머(Sgo41-F1/R1)가 개발되었다.
3. *Streptococcus mitis* KCTC 3556<sup>T</sup> 균주 특이 DNA 프로브(Smi21)와 두 쌍의 PCR 프라이머들(Smi21-f-F2/R2와 Smi21-b-F/R)가 개발되었다.
4. 분리 동정된 표준균주와 참고균주의 *S. pneumoniae*에 특이적인 Spn8-F1/R1 프라이머 쌍이 개발되었다.

이상의 연구 결과를 종합하면, *rpoB* 유전자의 핵산염기서열을 바탕으로 mitis 군 연쇄상구균의 종 수준에서의 동정이 현재로서는 DNA-DNA hybridization법을 제외하고는

정확도가 가장 높은 것으로 생각되며, IDBH검색법 및 Southern blot 분석법이 세균종의 종-특이 DNA 프로브 개발 및 종-특이 PCR 프라이머 개발에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

## VI. 참 고 문 헌

- 임상수, 김미광, 민정범, 김민정, 박순낭, 황호길, 국중기. 2006. 감염근관에서 분리 배양한 세균의 수종 항생제에 대한 감수성 검사. *Kor. J. Microbiol.* 43, 185-194.
- 임석균, 김수관, 김미광, 국중기. 2004 악골골수염에서 분리된 연쇄상구균의 수종 항생제에 대한 감수성 검사. *Kor. J. Microbiol.* 42, 185-194
- 최영옥, 김수관, 김학균, 김영중, 최동국, 김미광, 박순낭, 김민정, 국중기. 2006. 상악동염 병소 부위에서 세균의 분리 동정 및 항생제 감수성에 대한 연구. *대구외지.* 32, 436-446
- Arbique, J. C., C. Poyart, P. Trieu-Cuot, G. Quesne, G. C. Mda, A. G. Steigerwalt, R. E. Morey, D. Jackson, R. J. Davidson, and R. R. Facklam. 2004. Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4686-4696.
- Baddour, L. M. 1994. Virulence factors among gram-positive bacteria in experimental endocarditis. *Infect. Immun.* 62, 2143-2148.
- Beighton, D., A. D. Carr, and B. A. Oppenheim. 1994. Identification of viridans streptococci associated with bacteraemia in neutropenic cancer patients. *J. Med. Microbiol.* 40, 202-204.
- Bochud, P. Y., P. Eggiman, T. Calandra, G. Van Melle, L. Saghafi, and P. Francioli. 1994. Bacteremia due to viridans streptococcus in neutropenic patients with cancer: clinical spectrum and risk factors. *Clin. Infect. Dis.* 18, 25-31.
- Bridge PD., PH. Sneath. 1983 Numerical taxonomy of Streptococcus. *J Gen Microbiol.* 129, 565-597.
- Cabellos, C., P. F. Viladrich, J. Corredoira, R. Verdager, J. Ariza, and F. Gudiol. 1999. Streptococcal meningitis in adult patients: current epidemiology and clinical spectrum. *Clin. Infect. Dis.* 28, 1104-1108.
- Chen, C. C., L. J. Teng, S. Kaiung, and T. C. Chang. 2005. Identification of clinically relevant viridans streptococci by sequence analysis of the 16S-23S

- ribosomal DNA spacer region. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2651-2657.
- DiRiezo, J.M., S. Cornell, and H. Boehringer. 1991 Use of randomly cloned DNA fragmenst for the identification of oral spirochetes. *Oral Microbiol Immunol.* 6, 88-96.
- Douglas, C. W. I., J. Heath, K. K. Hampton, and F. E. Preston. 1993. Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. *J. Med. Microbiol.* 39, 179-182.
- Drancourt, M., V. Roux, P. E. Fournier, and D. Raoult. 2004. *rpoB* gene sequence-based identification of aerobic gram-positive cocci of the genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia*, and *Granulicatella*. *J. Clin. Microbiol.* 42, 497-504.
- French, G. L., H. Talsania, J. R. Charlton, and I. Phillips. 1989. A physiological classification of viridans streptococci by use of the API-20STREP system. *J. Med. Microbiol.* 28, 275 - 286.
- Friedrichs, C., A. C. Rodloff, G. S. Chhatwal, W. Schellenberger, and K. Eschrich 2007. Rapid Identification of Viridans Streptococci by Mass Spectrometric Discrimination. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2392-2397
- Gang SW, DK. Kim, JH. Seong, BO. Kim, JJ. Han, JK. Kook. 2002. Study on isolation of *Prevotella nigrescens* 9336-specific DNA probes using random cloning method. *J Korean Acad Periodontol.* 32, 269-80.
- Garnier, F., G. Gerbaud, P. Courvalin, and M. Galimand. 1997. Identification of clinically relevant viridans group streptococci to the species level by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2337-2341.
- Gibbons RJ, DI. Hay, DH. Schlesinger. 1991. Delineation of a segment of adsorbed salivary acidic proline-rich proteins which promotes adhesion of *Streptococcusgordonii* to apatitic surfaces. *Infect Immun.* 59, 2948-2954.
- Hinnebusch, C. J., D. M. Nikolai, and D. A. Bruckner. 1991. Comparison of API Rapid Strep, Baxter MicroScan Rapid Pos ID Panel, BBL Minitex Differential Identification System, IDS RapID STR System, and Vitek GPI to conventional biochemical tests for identification of viridans streptococci. *Am. J. Clin. Pathol.*

96, 459 - 463.

- Hoshino, T., M. Kawaguchi, N. Shimizu, N. Hoshino, T. Ooshima, and T. Fujiwara. 2004. PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using *gtf* genes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 48, 195-199.
- Hoshino T., T. Fujiwara, M. Kilian. 2005. Use of Phylogenetic and Phenotypic analyses To Identify Nonhemolytic Streptococci Isolated from Bacteremic Patients. *J. Clin. Microbiol.* 43, 6073-85.
- Jacobs, J. A., H. C. Schouten, E. E. Stobberingh, and P. B. Soeters. 1995. Viridans streptococci isolated from the bloodstream. Relevance of species identification. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 22, 267-273.
- Jeong SU, Yoo SY, Kang SJ, Kim MK, Jang HS, Lee KY, Kim BO, Kook JK. 2006. Development of *Prevotella intermedia* ATCC 49046 Strain-Specific PCR Primer based on a Pig6 DNA Probe. *Kor. J. Microbiol.* 42, 89-94.
- Kawamura, Y., Hou, X-G, Sultana, F., Muira, H., Ezaki T. 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.
- Kawamura, Y., R. A. Whiley, S.-E. Shu, T. Ezaki, and J. M. Hardie. 1999. Genetic approaches to the identification of the mitis group with the genus *Streptococcus*. *Microbiology.* 145, 2605-2613.
- Kim HS, SK. Song, SY. Yoo, DC. Jin, HS Shin, CK. Lim, MS Kim, JS Kim, SJ. Choe, JK. Kook. 2005. Development of strain-specific PCR primers based on a DNA probe Fu12 for the identification of *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586<sup>T</sup>. *J. Microbiol.* 43, 331-336. Erratum in: *J. Microbiol.* 43, 473.
- Kook JK, Kim MK, Seong JH, Kim DK, Kim BO, Park JC, Kim KK, Choe SJ, Min BM. 2003a. A new method for rapid screening of bacterial species- or subspecies-specific DNA probes. *FEMS Microbiol Lett.* 219, 121-7.
- Kook JK, Han JJ, Kim HS, Seong JH, Kim DK, Baek DH, Choe SJ. 2003b. Cloning of a potentially strain-specific DNA probe of *Prevotella intermedia* ATCC

- 25611 by inverted dot blot hybridization screening method. *J Microbiol Biotechnol.* 13, 282-6.
- Kook, J.-K., J.-J. Han,, H.-S. Kim,, J.-H. Seong, D.-K. Kim,, D.-H. Baek and S.-J Choe. 2003. Cloning of a potentially strain-specific DNA probe of *Prevotella intermedia* ATCC 25611 by inverted dot blot hybridization screening method. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 282-286.
- Krieg NR. Identification of Procaryotes .2th ed. 2001. *In* G. Garrity (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer Verlag, New York, U.S.A. p. 33-38
- Kumar, M., P. Vairamani, M. Raju, N. P. Lobo, C. Anbumani, N. Girish Kumar, C. P. Menon, and S. Shanmugasundaram. 2004. Rapid discrimination between strains of beta haemolytic streptococci by intact cell mass spectrometry. *Indian J. Med. Res.* 119, 283-288.
- Lamont RJ, Bevan CA, Gil S, Persson RE, Rosan B. 1993. Involvement of *orphyromonas gingivalis* fimbriae in adherence to *Streptococcus gordonii*. *Oral Microbiol Immunol* 8, 272 - 276.
- Lane D.J., B. Pace, G.J. Olsen, D.A. Stahl, M.L. Sogin, and N.R. Pace. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6955-6959.
- Marjo H., J. Jalava, P. Huovinen, O. Meurman, and K. Rantakokko-Jalava 2007. Identification of Alpha-Hemolytic Streptococci by Pyrosequencing the 16S rRNA Gene and by Use of VITEK 2. *J. Clin. Microbiol.* 45, 762-770.
- Nyvad B, Kilian M. 1990. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res* 24, 267-272.
- Okwumabua, O., M. O'Connor, and E. Shull. 2003. A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. *FEMS Microbiol. Lett.* 218, 79-84.
- Poyart, C., G. Quesne, and P. Trieu-Cuot. 2000. Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of

- enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 38, 415-418.
- Picard, F. J., D. Ke, D. K. Boudreau, M. Boissinot, A. Huletsky, D. Richard, M. Ouellette, P. H. Roy, and M. G. Bergeron. 2004. Use of *tuf* sequences for genus-specific PCR detection and phylogenetic analysis of 28 streptococcal species. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3686-3695.
- Rupf, S., K. Breitung, W. Schellenberger, K. Merte, S. Kneist, and K. Eschrich. 2005. Differentiation of mutans streptococci by intact cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Oral Microbiol. Immunol.* 20, 267-273.
- Scannapieco FA, Torres GI, Levine MJ. 1995. Salivary amylase promotes adhesion of oral streptococci to hydroxyapatite. *J. Dent Res.* 74, 1360 - 1366.
- Shin YK, Jeong SU, Yoo SY, Kim MK, Kim HS, Kim BO, Kim DK, Hwang HK, Kook JK. 2006. P130 DNA probe may be useful for the identification of *Prevotella intermedia* at the species or strain level. *Microbiol Immunol.* 48(12). 931-6.
- Tapp, J., M. Thollesson, and B. Herrmann. 2003. Phylogenetic relationships and genotyping of the genus *Streptococcus* by sequence determination of the *RNase P RNA* gene, *rnpB*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1861-1871
- Teng, L. J., P. R. Hsueh, J. C. Tsai, P. W. Chen, J. C. Hsu, H. C. Lai, C. N. Lee, and S. W. Ho. 2002. *groESL* sequence determination, phylogenetic analysis, and species differentiation for viridans group streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3172-3178.
- Vandamme, P., L. A. Devriese, B. Pot, K. Kersters, and P. Melin. 1997. *Streptococcus difficile* is a non-hemolytic group B, type Ib *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 81 - 85.
- Yoo, S.Y., Kim, P. S., Hwang, H-K., Lim, S-H, Kim, K-W., Choe, S-J., Min B-M. and Kook, J-K. 2005. Identification of non-mutans streptococci organisms in dental plaques recovering on mitis-salivarius bacitracin agar medium. *J. Microbiol.* 43, 204-208

## VII. FIGURE LEGENDS

Fig 1. *Comparative phylogenetic trees of rpoB and soda partial gene sequences and 16S rRNA gene using the type strains of mitis group streptococci.*

Fig 2. *Phylogenetic trees of rpoB partial gene sequences using the type strains, reference strains and isolates.*

Fig 3. *Phylogenetic trees of soda partial gene sequences using the type strains, reference strains and isolates.*

Fig. 4. *Phylogenetic trees of 16S rDNA partial gene sequences using the type strains, reference strains and isolates.*

Fig. 5. *Composite summary of inverted dot blot hybridization screening.* The 96 recombinant plasmid DNAs containing genomic DNA fragments derived from six strains of mitis group streptococci were hybridized with DIG-labeled genomic DNAs. The genomic DNAs were from: (A) *S. gordonii* CCUG 25608<sup>T</sup>, (B) *S. mitis* KCTC 3556<sup>T</sup>, (C) *S. oralis* CCUG 24891<sup>T</sup>, (D) *S. parasanguinis* CCUG 30417<sup>T</sup>, (E) *S. pneumoniae* CCUG 28588<sup>T</sup>, (F) *S. sanguinis* CCUG 17826<sup>T</sup>.

Fig. 6. *Southern blot analysis confirmed the specificity of the DNA fragments using the type strains.* The *hind*III-digested genomic DNAs were electrophoresed and transferred to nylon membranes. Hybridization was performed with the DIG-labeled inserted probes Sgo41(A), Smi21(B), Sor24(C), Spa17(D), Spn8(E), Ssa21(F). The *hind*III-digested genomic DNAs were from: (1), *S. gordonii* CCUG 25608<sup>T</sup>; (2), *S. mitis* KCTC 3556<sup>T</sup>; (3), *S. oralis* CCUG 24891<sup>T</sup>; (4), *S. parasanguinis* CCUG 30417<sup>T</sup>; (5) *S. pneumoniae* CCUG 28588<sup>T</sup>; (6), *S. sanguinis* CCUG 17826<sup>T</sup>. Lane S, 1Kb DNA ladder.



Fig. 7. *Southern blot analysis confirmed the specificity of the cloned DNA fragment inserted into Sgo41 plasmid.* The *Hind*III-digested genomic DNAs were electrophoresed and transferred to nylon membranes. Hybridization was performed with the DIG-labeled inserted DNA fragment. *Hind*III-digested genomic DNAs were from type strains and isolates. Lane S, 1Kb DNA ladder. ↓ , indicate the same species strains.

Fig. 8. *Southern blot analysis confirmed the specificity of the cloned DNA fragment inserted into Spa17 plasmid.* The *Hind*III-digested genomic DNAs were electrophoresed and transferred to nylon membranes. Hybridization was performed with the DIG-labeled inserted DNA fragment. *Hind*III-digested genomic DNAs were from type strains and isolates. Lane S, 1Kb DNA ladder. ↓ , indicate the same species strains.

Fig. 9. *Southern blot analysis confirmed the specificity of the cloned DNA fragment inserted into Sor24 plasmid.* The *Hind*III-digested genomic DNAs were electrophoresed and transferred to nylon membranes. Hybridization was performed with the DIG-labeled inserted DNA fragment. *Hind*III-digested genomic DNAs were from type strains and isolates. Lane S, 1Kb DNA ladder. ↓ , indicate the same species strains.

Fig. 10. *Southern blot analysis confirmed the specificity of the cloned DNA fragment inserted into Smi21 plasmid.* The *Hind*III-digested genomic DNAs were electrophoresed and transferred to nylon membranes. Hybridization was performed with the DIG-labeled inserted DNA fragment. *Hind*III-digested genomic DNAs were from type strains and isolates. Lane S, 1Kb DNA ladder. ↓ , indicate the same species strains.

Fig. 11. *Southern blot analysis confirmed the specificity of the cloned DNA fragment inserted into Spn8 plasmid.* The *Hind*III-digested genomic DNAs were

electrophoresed and transferred to nylon membranes. Hybridization was performed with the DIG-labeled inserted DNA fragment. *Hind*III-digested genomic DNAs were from type strains and isolates. Lane S, 1Kb DNA ladder. ↓ , indicate the same species strains.

Fig. 12. **Specificity test of *Sgo41-F1/R1* primers with purified genomic DNA of type strains(A), clinical isolates(B), and reference strains(C) of mitis group.** Four ng of each bacterial genomic DNA were used as PCR templates. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. Lanes: S, size marker (100 bp ladder); i, *S. gordonii* CCUG 25608<sup>T</sup>; ii, *S. mitis* KCTC, 3556<sup>T</sup>; iii, *S. oralis* CCUG 24891<sup>T</sup>; iv, *S. pneumoniae* CCUG 28588<sup>T</sup>; v, *S. sanguinis* CCUG 17826<sup>T</sup>; vi, *S. parasanguinis* CCUG 30417<sup>T</sup>; (a), *S. oralis*, (b), *S. mitis*, (c), *S. pneumoniae*, (d), *S. infantis*, (e), *S. peroris*, (f), *S. parasanguinis*, (g), *S. australis*, (h), *S. sinensis*, (i), *S. sanguinis*, (j), *S. oligofermentans*, (k), *S. gordonii*, (l), *Streptococcus* sp.; (-), negative control; 1, *S. pneumoniae* KCTC 3932, 2, *S. oralis* KCTC 5605, 3, *Streptococcus* sp. KCTC 5606, 4, *Streptococcus* sp. KCTC 5607, 5, *S. pneumoniae* KCCM 40410, 6, *S. oralis* KCCM 41567, 7, *S. pneumoniae* KCCM 41569, 8, *S. pneumoniae* KCCM 41570.

Fig. 13. **Specificity test of *Ssa21-F3/R2* primers with purified genomic DNA of type strains(A), clinical isolates(B), and reference strains(C) of mitis group.** Four ng of each bacterial genomic DNA were used as PCR templates. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. Lanes: S, size marker (100 bp ladder); i, *S. gordonii* CCUG 25608<sup>T</sup>; ii, *S. mitis* KCTC, 3556<sup>T</sup>; iii, *S. oralis* CCUG 24891<sup>T</sup>; iv, *S. pneumoniae* CCUG 28588<sup>T</sup>; v, *S. sanguinis* CCUG 17826<sup>T</sup>; vi, *S. parasanguinis* CCUG 30417<sup>T</sup>; (a), *S. oralis*, (b), *S. mitis*, (c), *S. pneumoniae*, (d), *S. infantis*, (e), *S. peroris*, (f), *S. parasanguinis*, (g), *S. australis*, (h), *S. sinensis*, (i), *S. sanguinis*, (j), *S. oligofermentans*, (k), *S. gordonii*, (l), *Streptococcus* sp.; (-), negative control; 1, *S. pneumoniae* KCTC 3932, 2, *S. oralis* KCTC 5605, 3, *Streptococcus* sp. KCTC 5606, 4, *Streptococcus* sp. KCTC 5607, 5,

*S. pneumoniae* KCCM 40410, 6, *S. oralis* KCCM 41567, 7, *S. pneumoniae* KCCM 41569, 8, *S. pneumoniae* KCCM 41570.

Fig. 14. **Specificity test of *Smi21-f-F2/R2* primers with purified genomic DNA of type strains(A), clinical isolates(B), and reference strains(C) of *mitis* group.** Four ng of each bacterial genomic DNA were used as PCR templates. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. Lanes: S, size marker (100 bp ladder); i, *S. gordonii* CCUG 25608<sup>T</sup>; ii, *S. mitis* KCTC, 3556<sup>T</sup>; iii, *S. oralis* CCUG 24891<sup>T</sup>; iv, *S. pneumoniae* CCUG 28588<sup>T</sup>; v, *S. sanguinis* CCUG 17826<sup>T</sup>; vi, *S. parasanguinis* CCUG 30417<sup>T</sup>; (a), *S. oralis*, (b), *S. mitis*, (c), *S. pneumoniae*, (d), *S. infantis*, (e), *S. peroris*, (f), *S. parasanguinis*, (g), *S. australis*, (h), *S. sinensis*, (i), *S. sanguinis*, (j), *S. oligofermentans*, (k), *S. gordonii*, (l), *Streptococcus* sp.; (-), negative control; 1, *S. pneumoniae* KCTC 3932, 2, *S. oralis* KCTC 5605, 3, *Streptococcus* sp. KCTC 5606, 4, *Streptococcus* sp. KCTC 5607, 5, *S. pneumoniae* KCCM 40410, 6, *S. oralis* KCCM 41567, 7, *S. pneumoniae* KCCM 41569, 8, *S. pneumoniae* KCCM 41570.

Fig. 15. **Specificity test of *Smi21-b-F/R* primers with purified genomic DNA of type strains(A), clinical isolates(B), and reference strains(C) of *mitis* group.** Four ng of each bacterial genomic DNA were used as PCR templates. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. Lanes: S, size marker (100 bp ladder); i, *S. gordonii* CCUG 25608<sup>T</sup>; ii, *S. mitis* KCTC, 3556<sup>T</sup>; iii, *S. oralis* CCUG 24891<sup>T</sup>; iv, *S. pneumoniae* CCUG 28588<sup>T</sup>; v, *S. sanguinis* CCUG 17826<sup>T</sup>; vi, *S. parasanguinis* CCUG 30417<sup>T</sup>; (a), *S. oralis*, (b), *S. mitis*, (c), *S. pneumoniae*, (d), *S. infantis*, (e), *S. peroris*, (f), *S. parasanguinis*, (g), *S. australis*, (h), *S. sinensis*, (i), *S. sanguinis*, (j), *S. oligofermentans*, (k), *S. gordonii*, (l), *Streptococcus* sp.; (-), negative control; 1, *S. pneumoniae* KCTC 3932, 2, *S. oralis* KCTC 5605, 3, *Streptococcus* sp. KCTC 5606, 4, *Streptococcus* sp. KCTC 5607, 5, *S. pneumoniae* KCCM 40410, 6, *S. oralis* KCCM 41567, 7, *S. pneumoniae* KCCM 41569, 8, *S. pneumoniae* KCCM 41570.

Fig. 16. *Specificity test of Spn8-F1/R1 primers with purified genomic DNA of type strains(A), clinical isolates(B), and reference strains(C) of mitis group.* Four ng of each bacterial genomic DNA were used as PCR templates. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. Lanes: S, size marker (100 bp ladder); i, *S. gordonii* CCUG 25608<sup>T</sup>; ii, *S. mitis* KCTC, 3556<sup>T</sup>; iii, *S. oralis* CCUG 24891<sup>T</sup>; iv, *S. pneumoniae* CCUG 28588<sup>T</sup>; v, *S. sanguinis* CCUG 17826<sup>T</sup>; vi, *S. parasanguinis* CCUG 30417<sup>T</sup>; (a), *S. oralis*, (b), *S. mitis*, (c), *S. pneumoniae*, (d), *S. infantis*, (e), *S. peroris*, (f), *S. parasanguinis*, (g), *S. australis*, (h), *S. sinensis*, (i), *S. sanguinis*, (j), *S. oligofermentans*, (k), *S. gordonii*, (l), *Streptococcus* sp.; (-), negative control; 1, *S. pneumoniae* KCTC 3932, 2, *S. oralis* KCTC 5605, 3, *Streptococcus* sp. KCTC 5606, 4, *Streptococcus* sp. KCTC 5607, 5, *S. pneumoniae* KCCM 40410, 6, *S. oralis* KCCM 41567, 7, *S. pneumoniae* KCCM 41569, 8, *S. pneumoniae* KCCM 41570.

Fig. 17. *Specificity test of Spa17-F/R primers with purified genomic DNA of type strains(A), clinical isolates(B), and reference strains(C) of mitis group.* Four ng of each bacterial genomic DNA were used as PCR templates. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. Lanes: S, size marker (100 bp ladder); i, *S. gordonii* CCUG 25608<sup>T</sup>; ii, *S. mitis* KCTC, 3556<sup>T</sup>; iii, *S. oralis* CCUG 24891<sup>T</sup>; iv, *S. pneumoniae* CCUG 28588<sup>T</sup>; v, *S. sanguinis* CCUG 17826<sup>T</sup>; vi, *S. parasanguinis* CCUG 30417<sup>T</sup>; (a), *S. oralis*, (b), *S. mitis*, (c), *S. pneumoniae*, (d), *S. infantis*, (e), *S. peroris*, (f), *S. parasanguinis*, (g), *S. australis*, (h), *S. sinensis*, (i), *S. sanguinis*, (j), *S. oligofermentans*, (k), *S. gordonii*, (l), *Streptococcus* sp.; (-), negative control; 1, *S. pneumoniae* KCTC 3932, 2, *S. oralis* KCTC 5605, 3, *Streptococcus* sp. KCTC 5606, 4, *Streptococcus* sp. KCTC 5607, 5, *S. pneumoniae* KCCM 40410, 6, *S. oralis* KCCM 41567, 7, *S. pneumoniae* KCCM 41569, 8, *S. pneumoniae* KCCM 41570.

## VIII. FIGURES

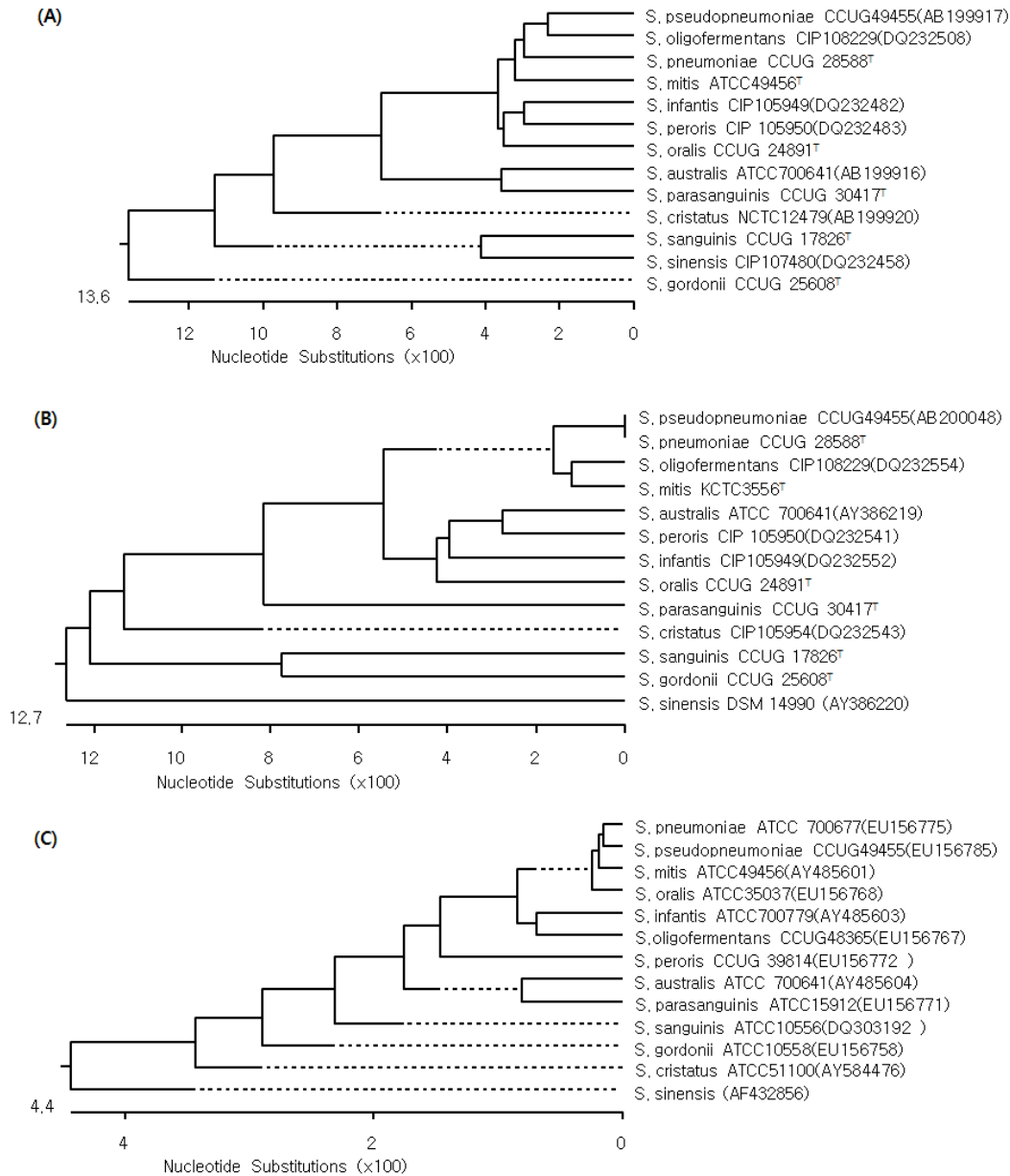
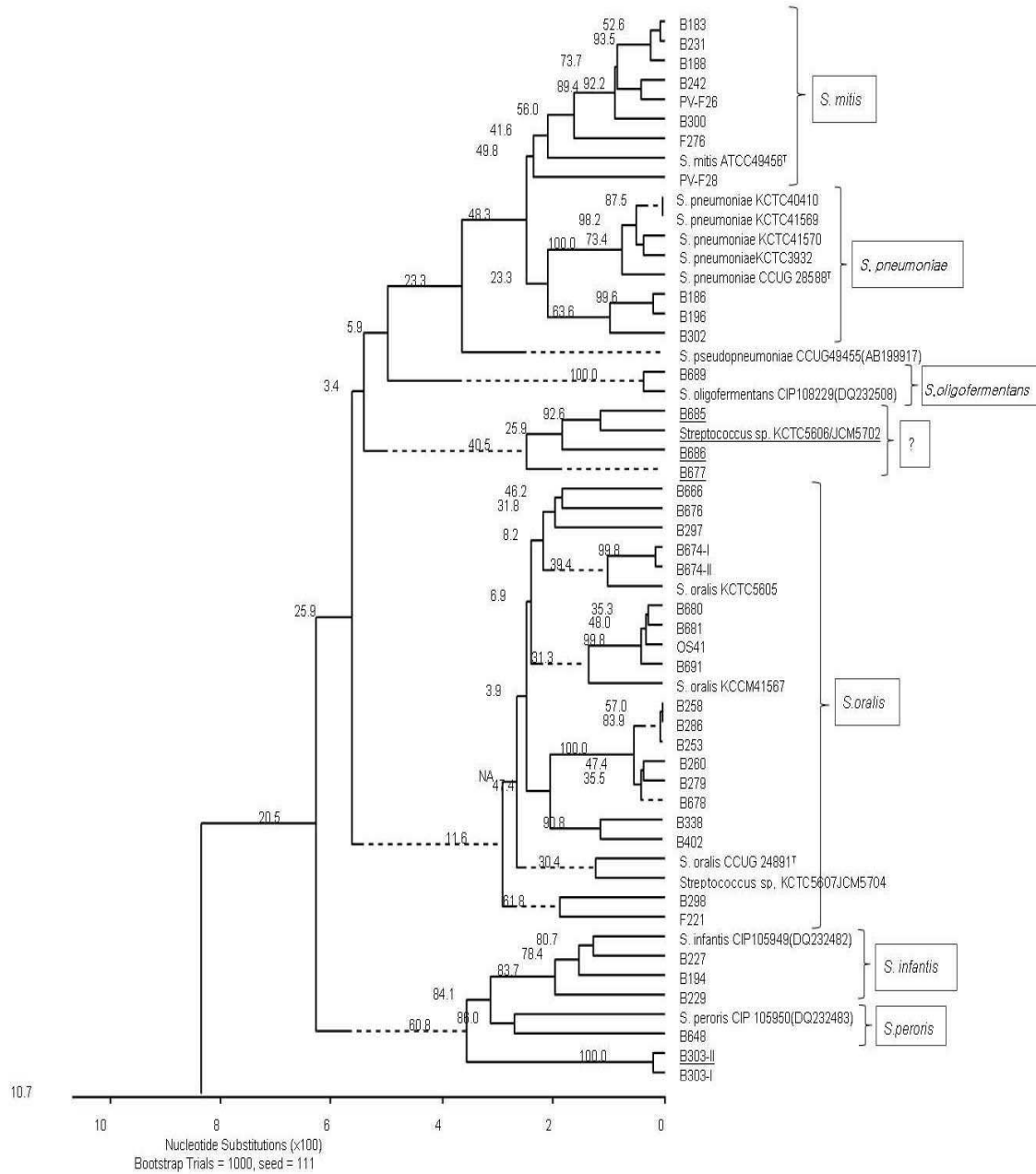


Fig 1. Comparative phylogenetic trees of *rpoB* and *sodA* partial gene sequences and 16S rRNA gene using the type strains of all mitis group streptococci.



(continued on next) page)

Fig 2. Phylogenetic trees of *rpoB* partial gene sequences using the type strains, reference strains and isolates.

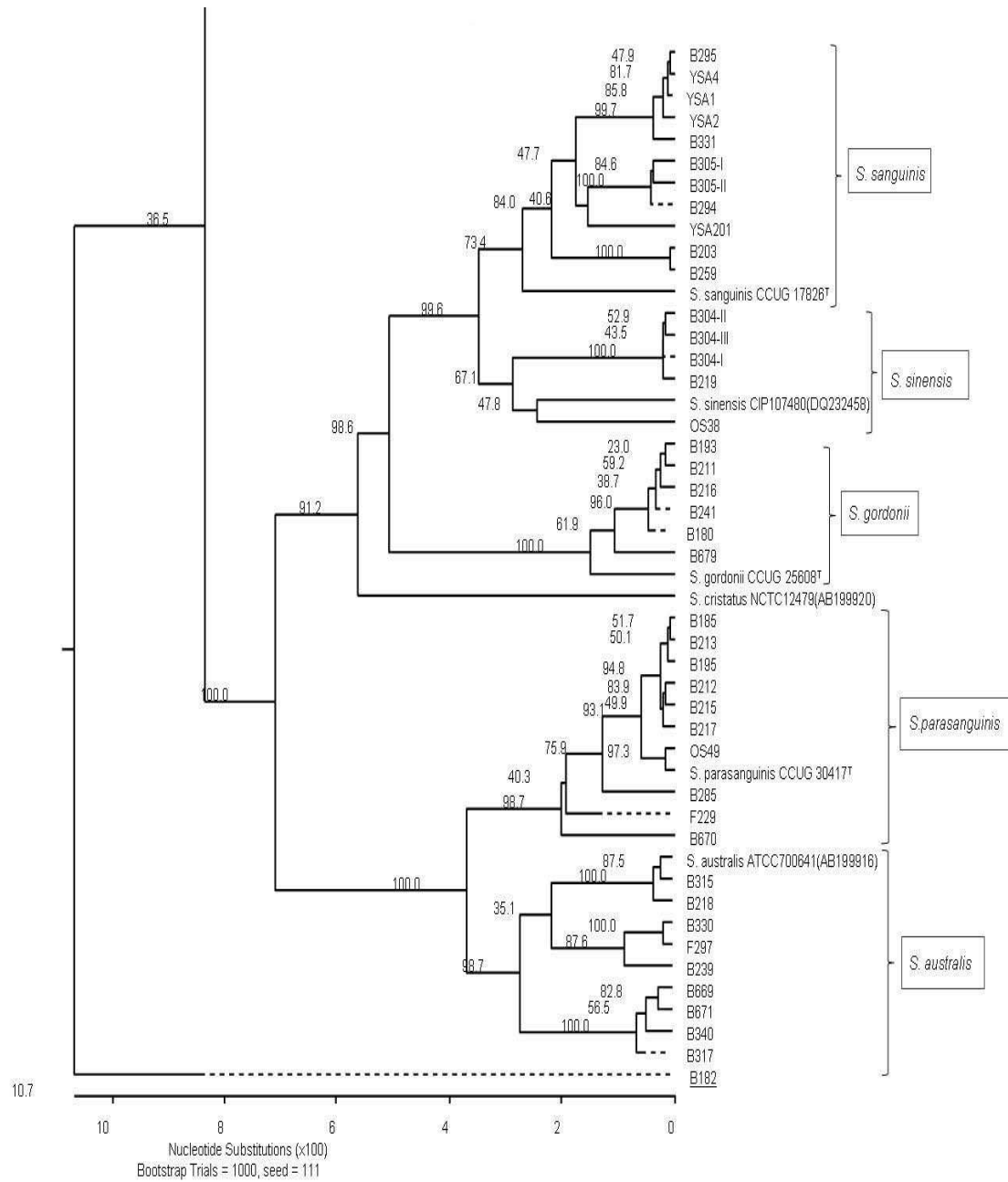
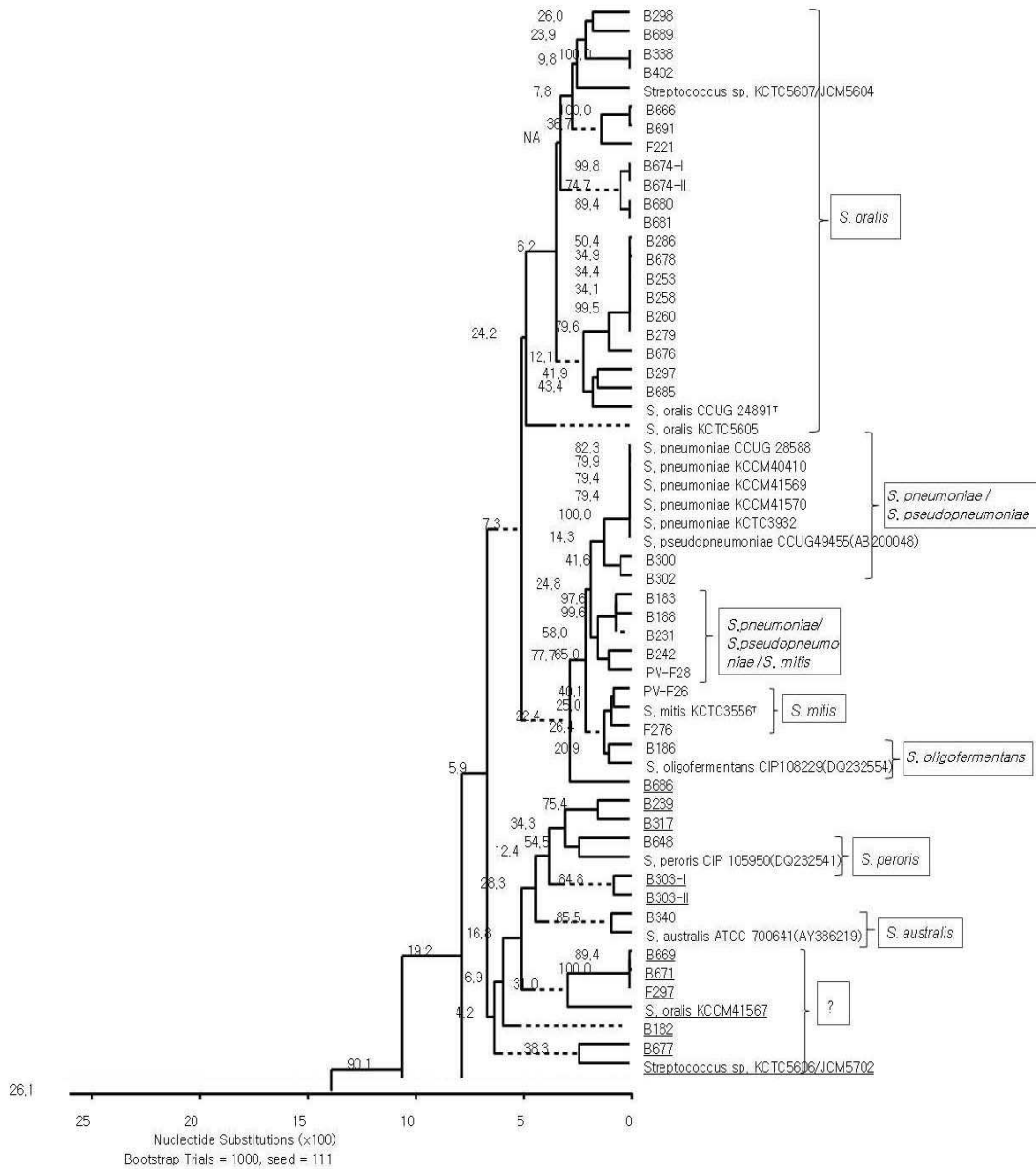


Fig 2. Phylogenetic trees of *rpoB* partial gene sequences using the type strains, reference strains and isolates.



(continued on next page)

Fig 3. Phylogenetic trees of *sodA* partial gene sequences using the type strains, reference strains and isolates.



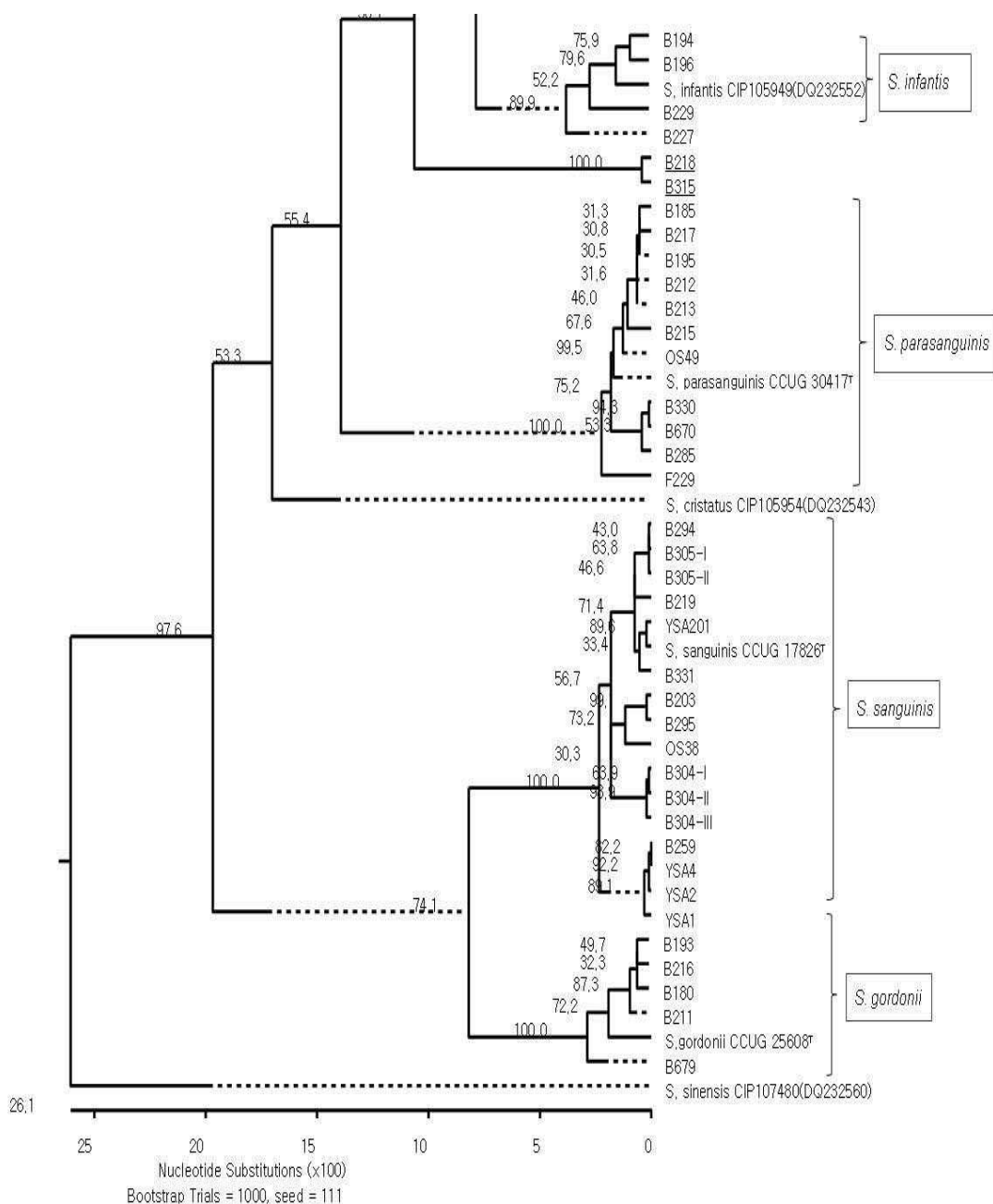
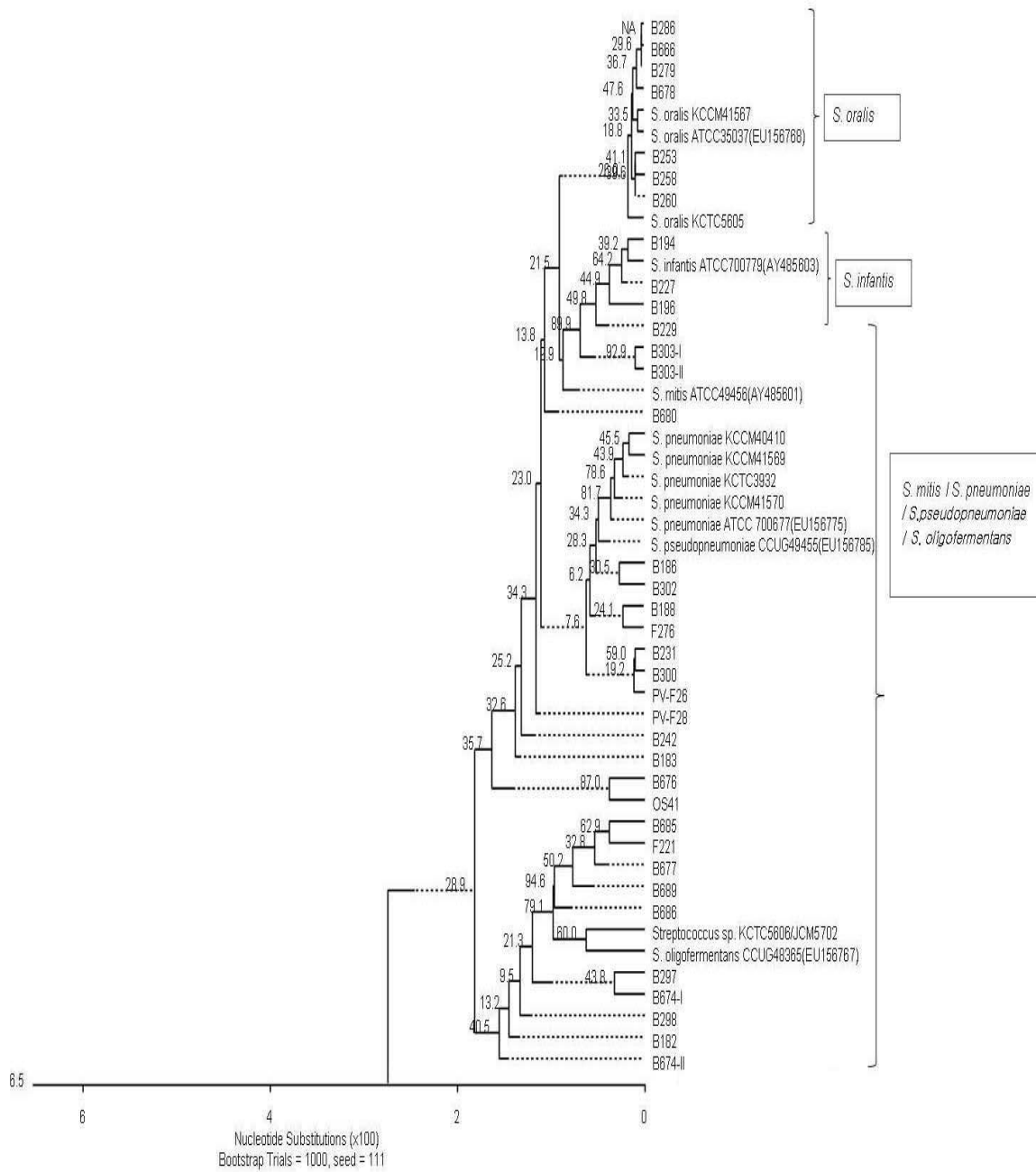


Fig 3. Phylogenetic trees of *sodA* partial gene sequences using the type strains, reference strains and isolates.



(continued on next page)

Fig 4. Phylogenetic trees of 16S rDNA partial gene sequences using the type strains, reference strains and isolates.

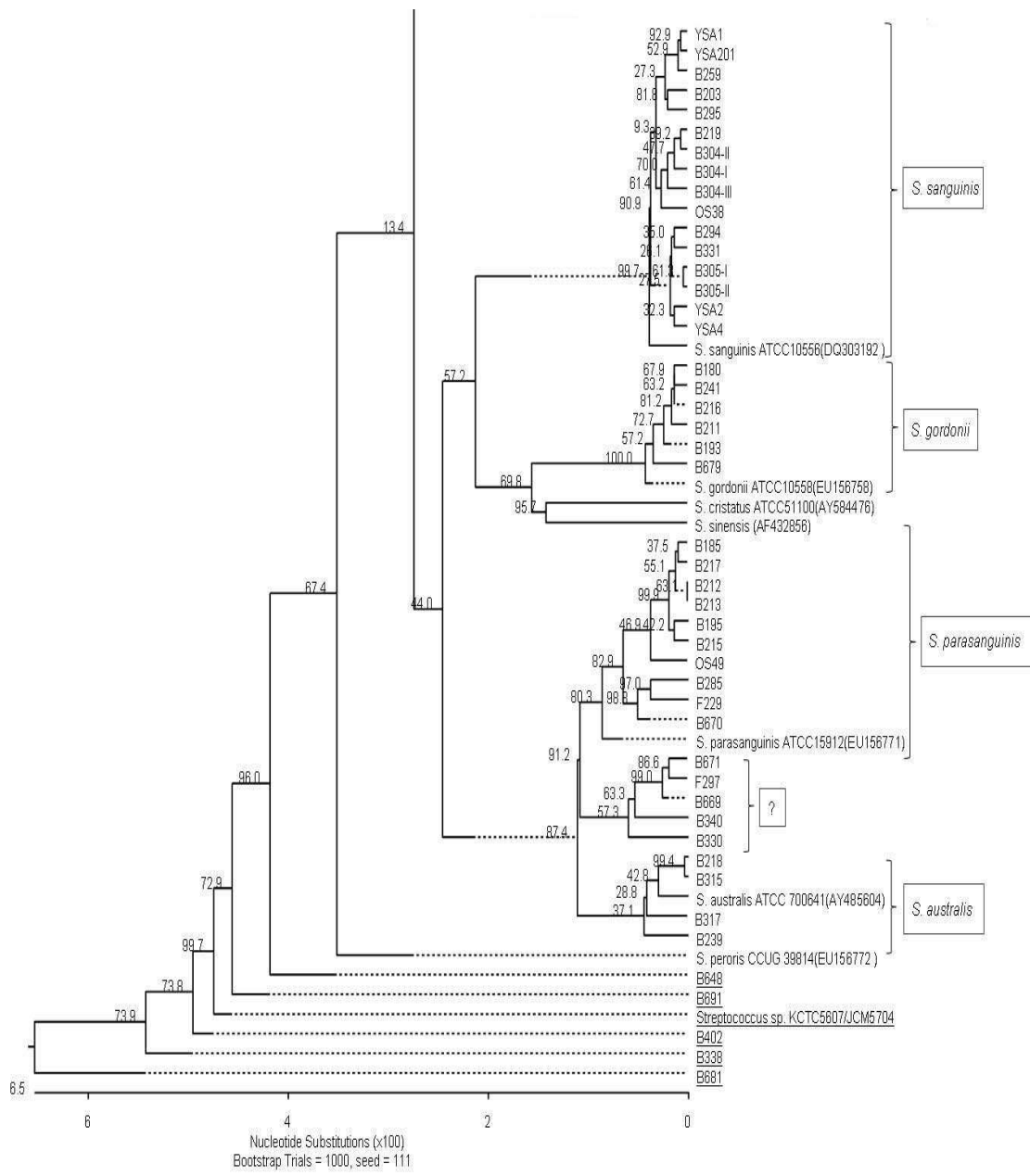


Fig. 4. Phylogenetic trees of 16S rDNA partial gene sequences using the type strains, reference strains and isolates.

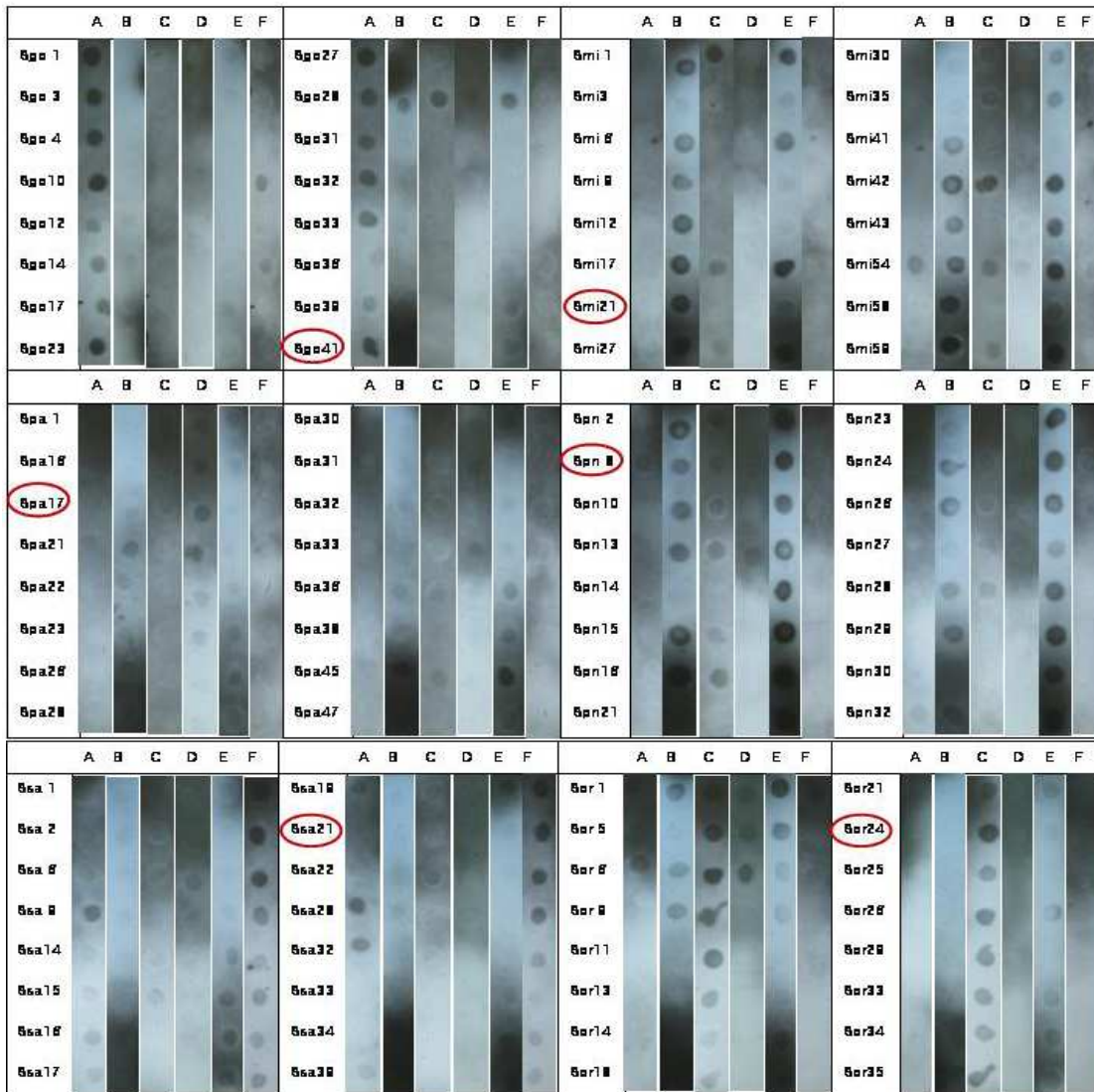


Fig. 5. Composite summary of inverted dot blot hybridization screening. The 96 recombinant plasmid DNAs containing genomic DNA fragments derived from six strains of mitis group streptococci were hybridized with DIG-labeled genomic DNAs.

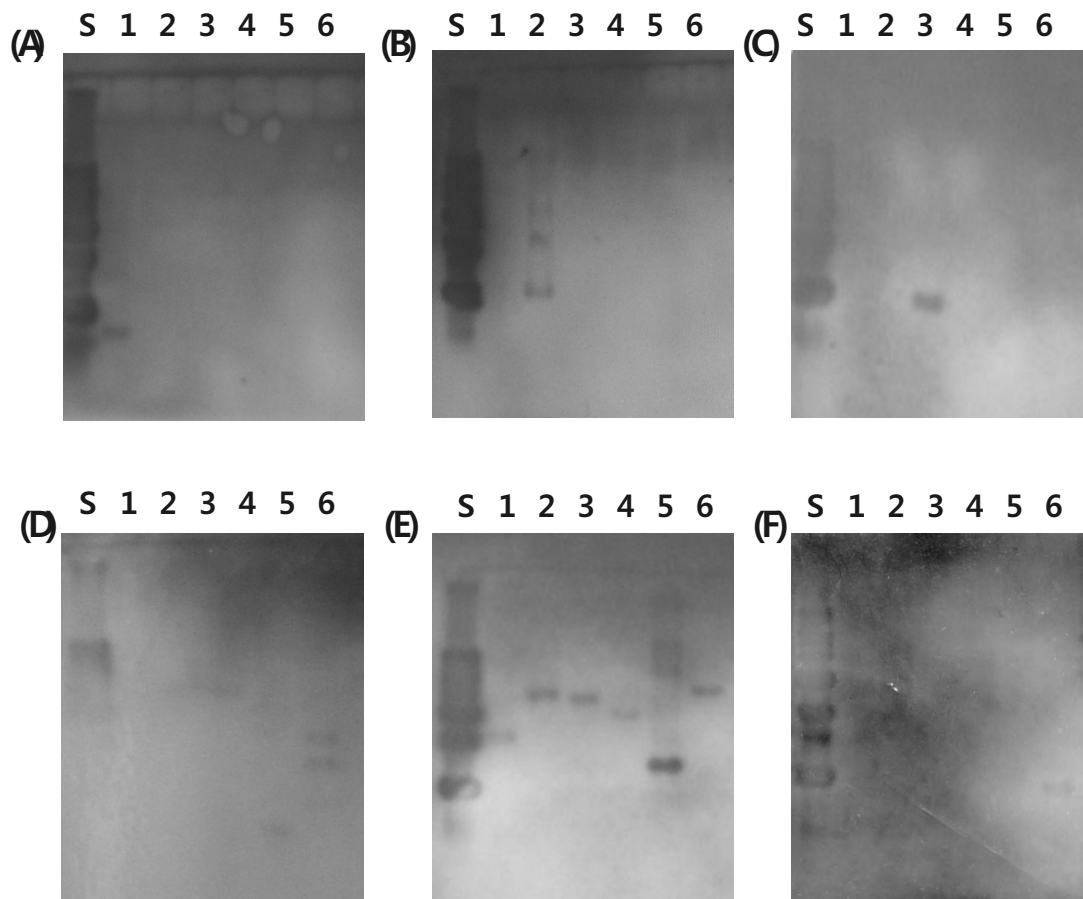


Fig. 6. Southern blot analysis confirmed the specificity of the DNA fragments using the type strains.

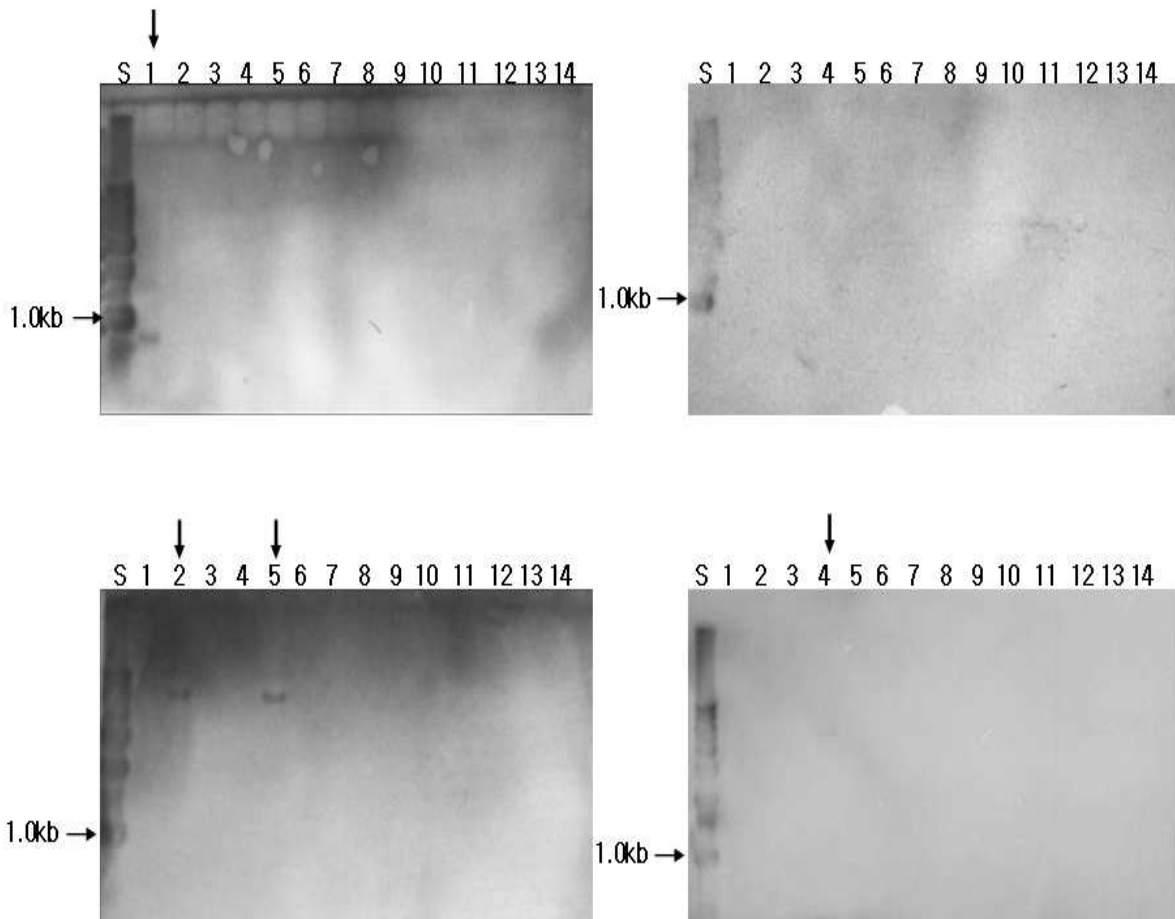


Fig. 7. Southern blot analysis confirmed the specificity of the cloned DNA fragment inserted into Sgo41 plasmid.

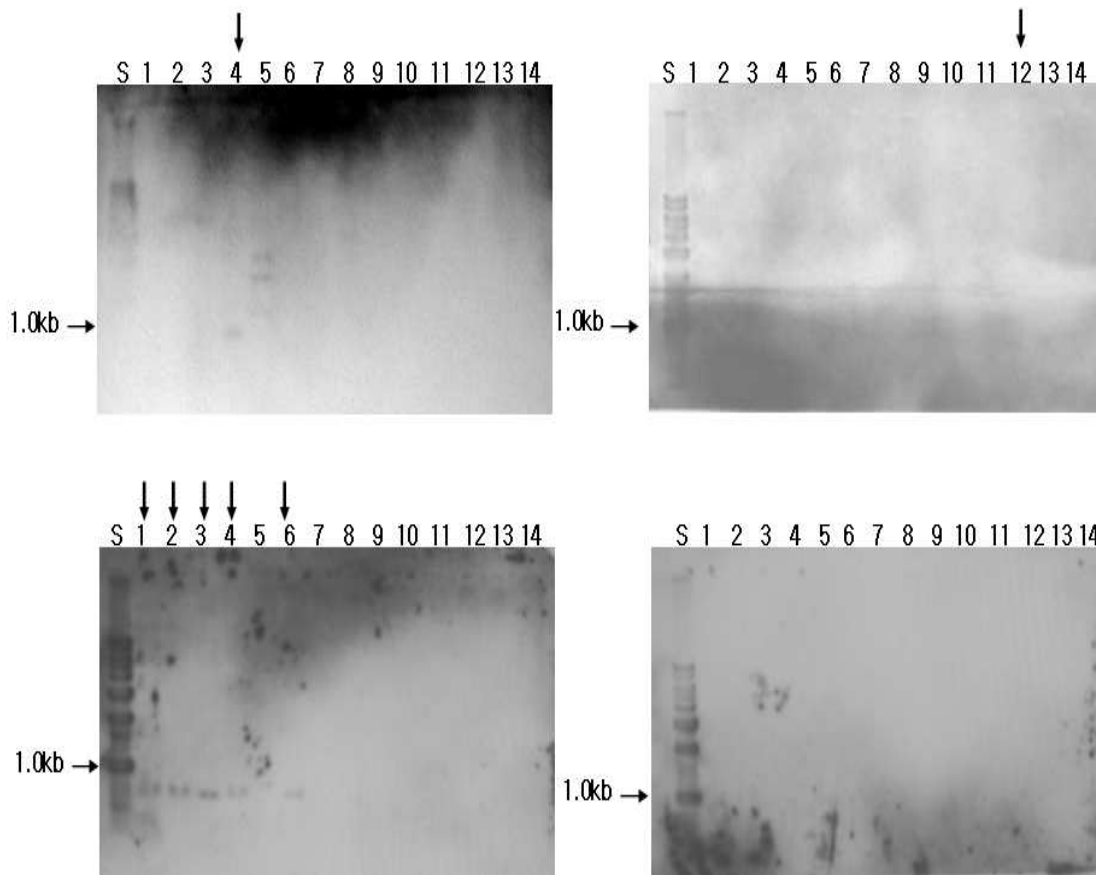


Fig. 8. Southern blot analysis confirmed the specificity of the cloned DNA fragment inserted into Spa17 plasmid.

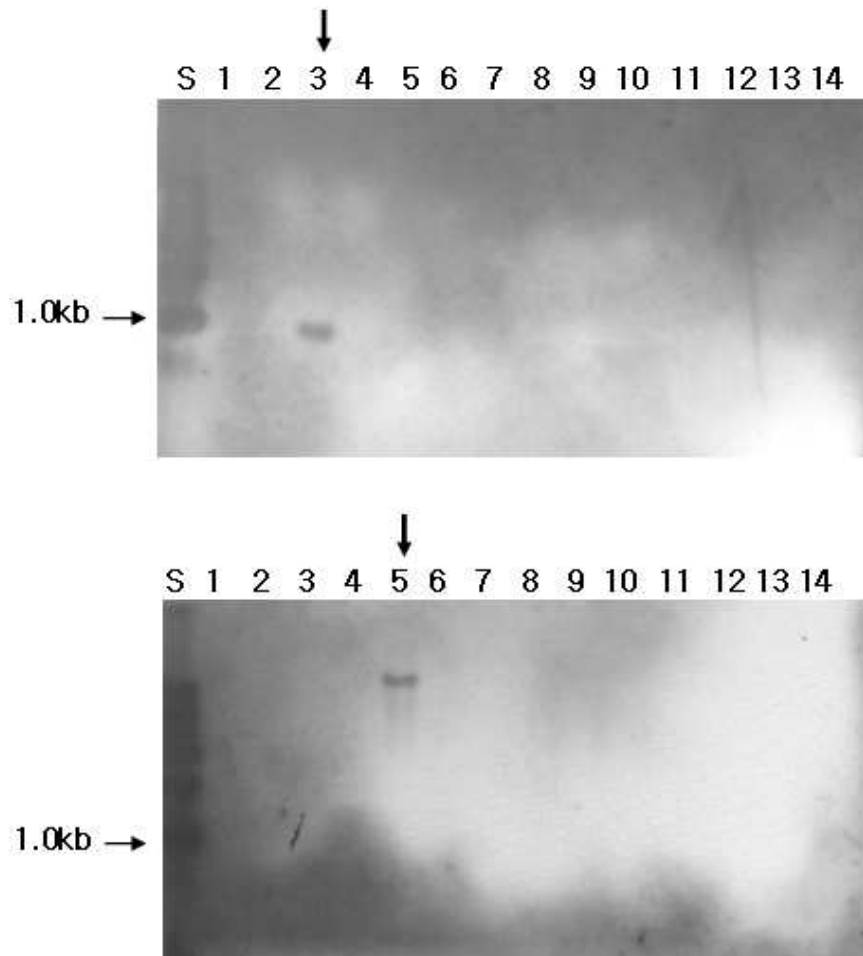


Fig. 9. Southern blot analysis confirmed the specificity of the cloned DNA fragment inserted into Sor24 plasmid.



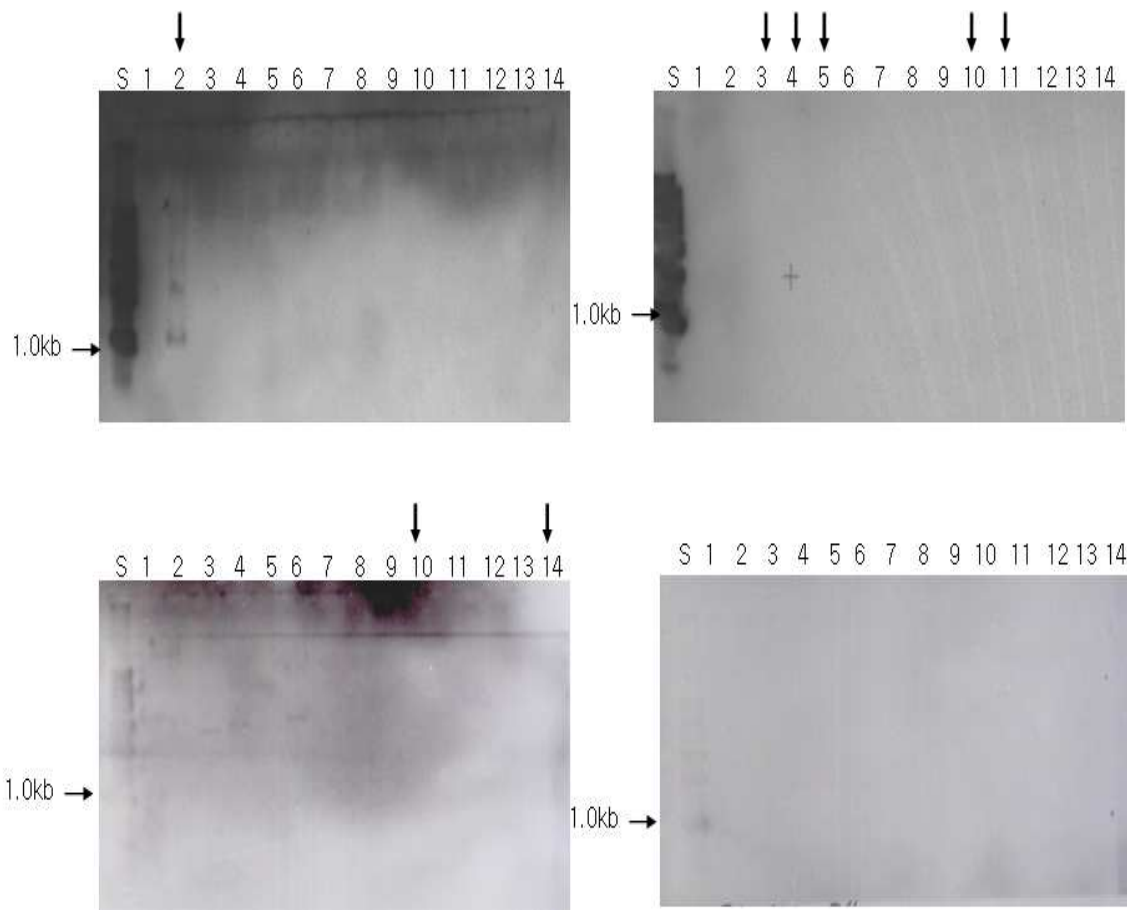


Fig. 10. Southern blot analysis confirmed the specificity of the cloned DNA fragment inserted into Smi21 plasmid.

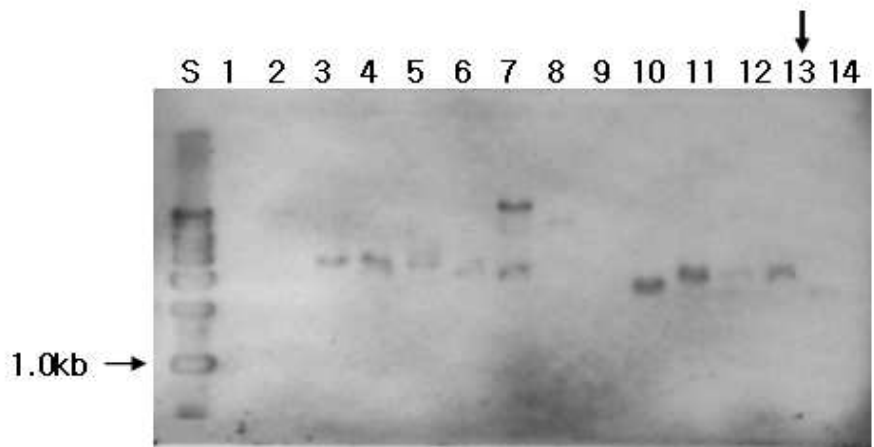
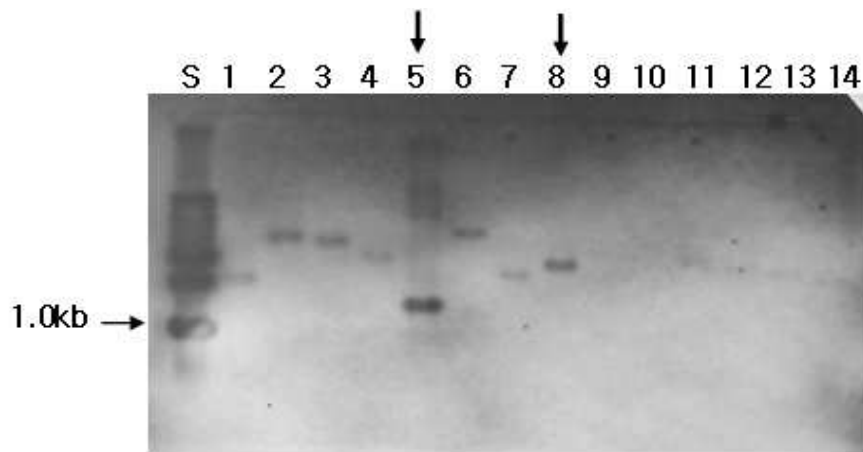


Fig. 11. Southern blot analysis confirmed the specificity of the cloned DNA fragment inserted into Spn8 plasmid.

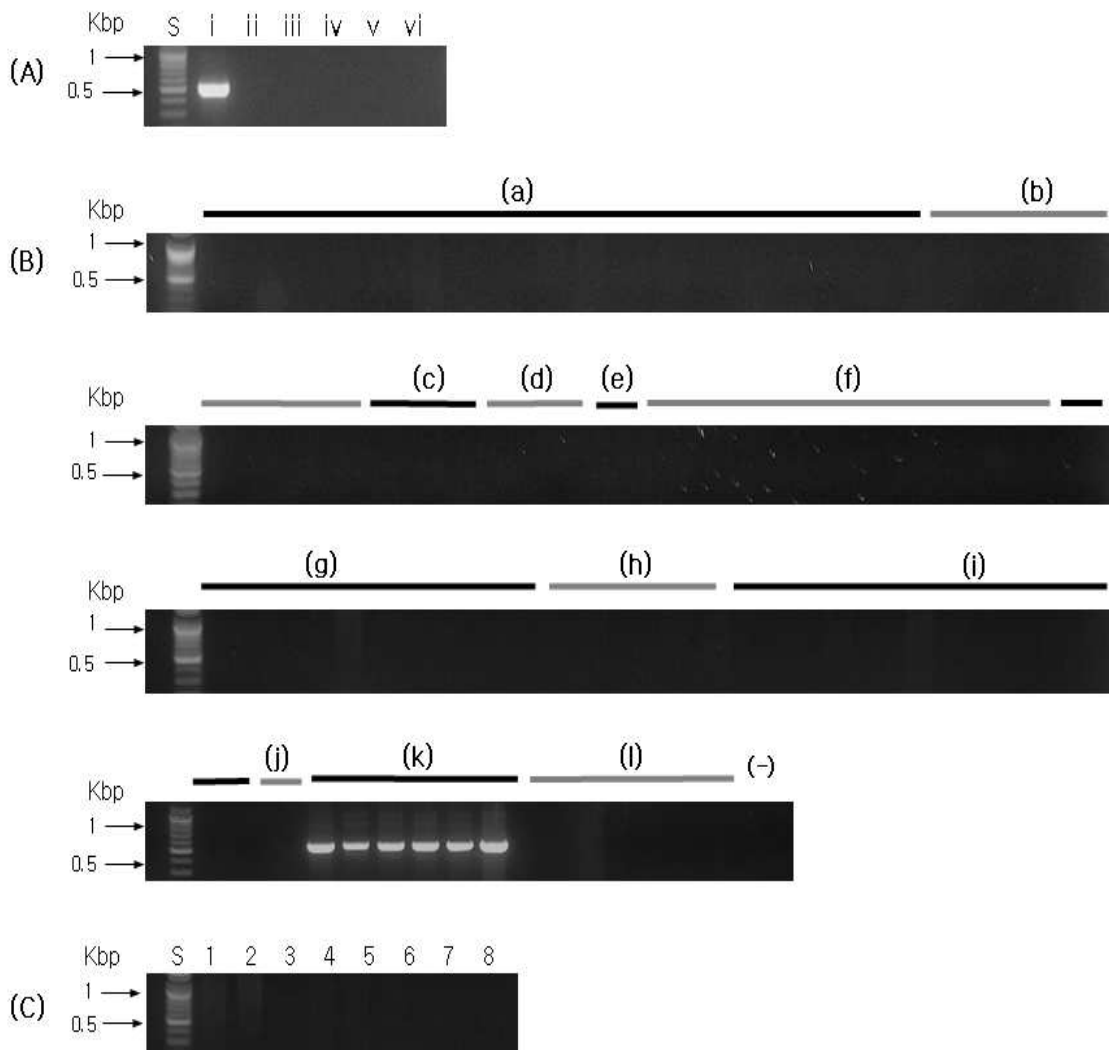


Fig. 12. Specificity test of Sgo41-F1/R1 primers with purified genomic DNA of type strains(A), clinical isolates(B), and reference strains(C) of mitis group.

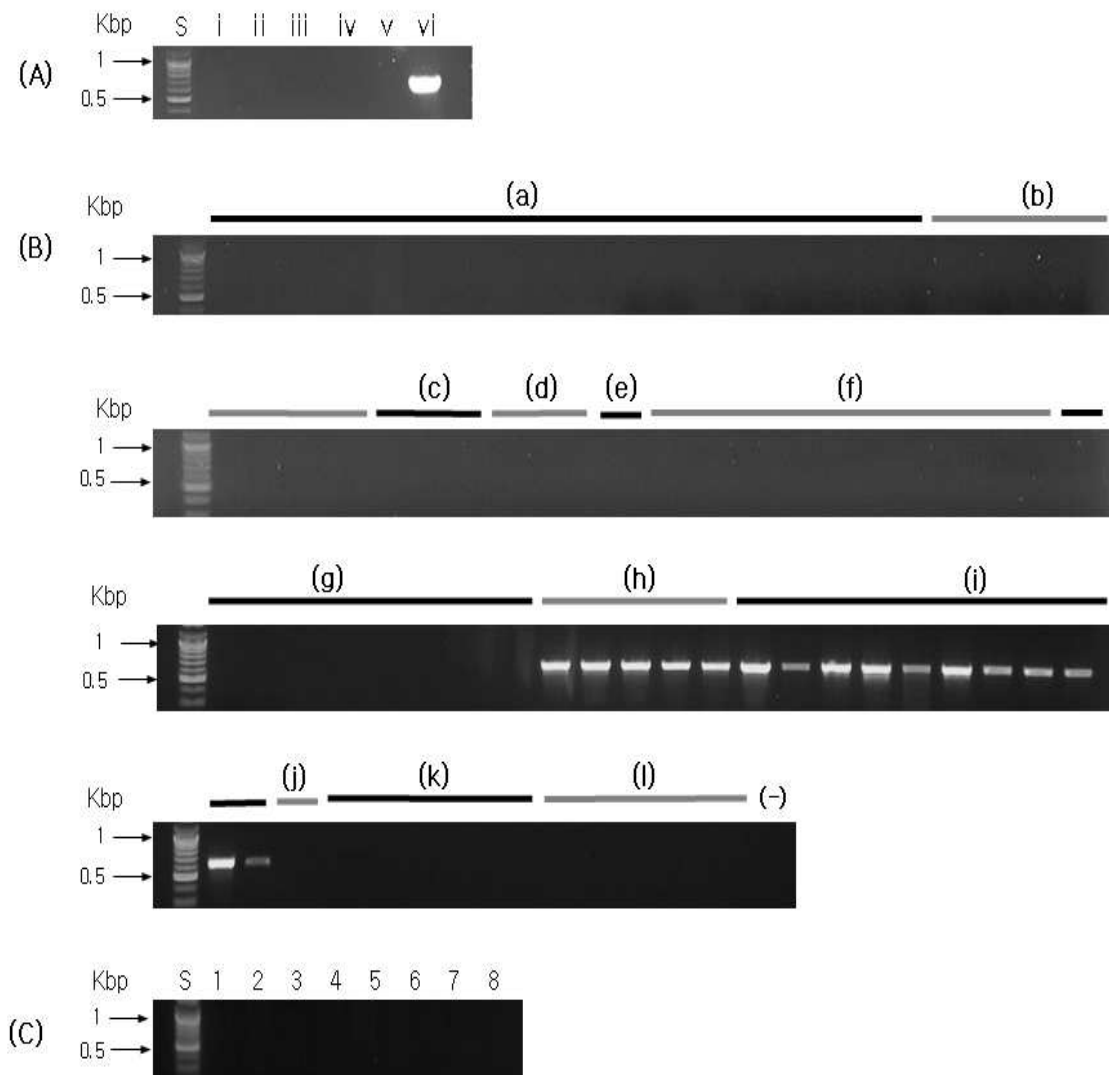


Fig. 13. Specificity test of Ssa21-F3/R2 primers with purified genomic DNA of type strains(A), clinical isolates(B), and reference strains(C) of mitis group.

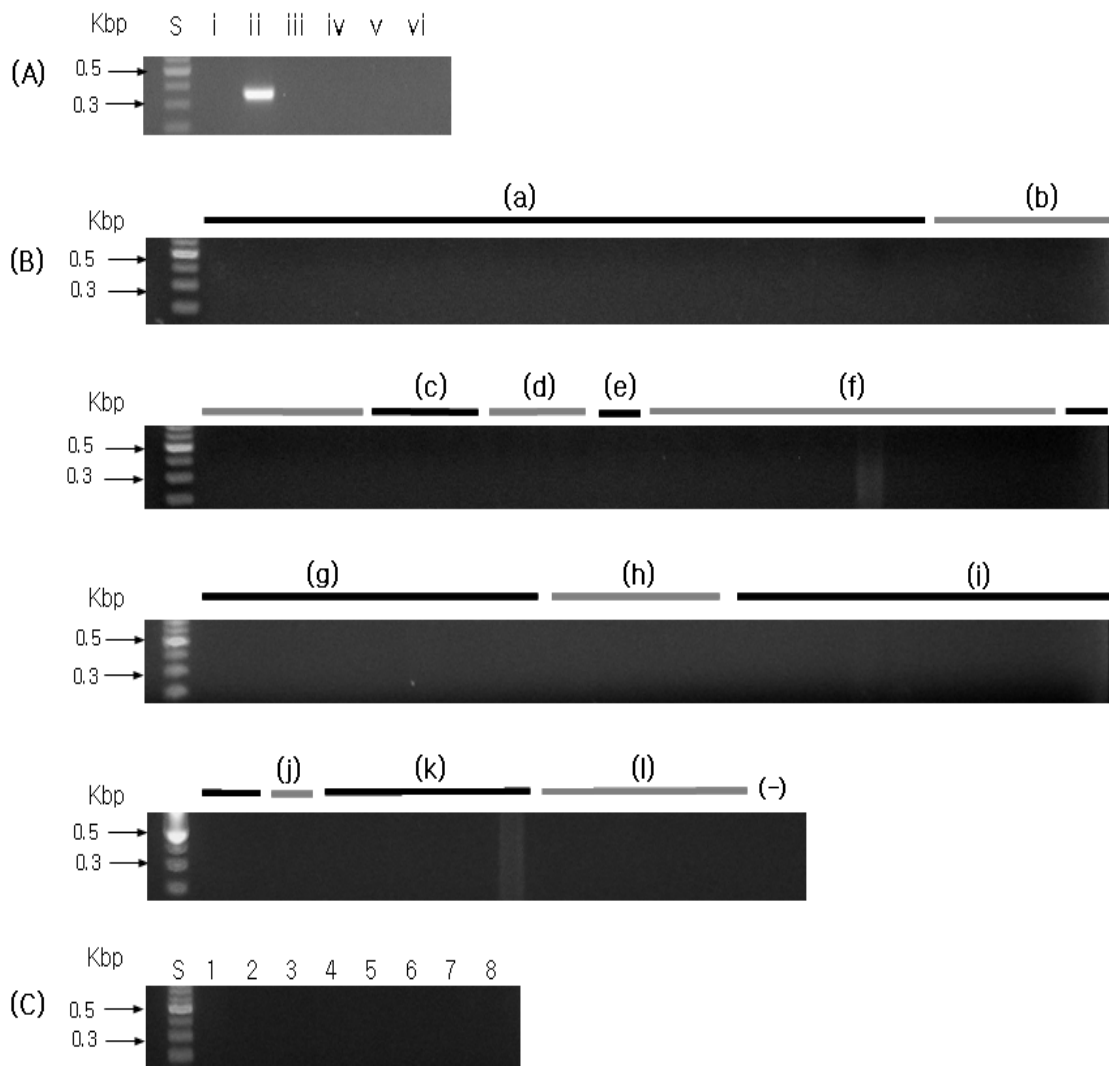


Fig. 14. Specificity test of Smi21-f-F2/R2 primers with purified genomic DNA of type strains(A), clinical isolates(B), and reference strains(C) of mitis group.

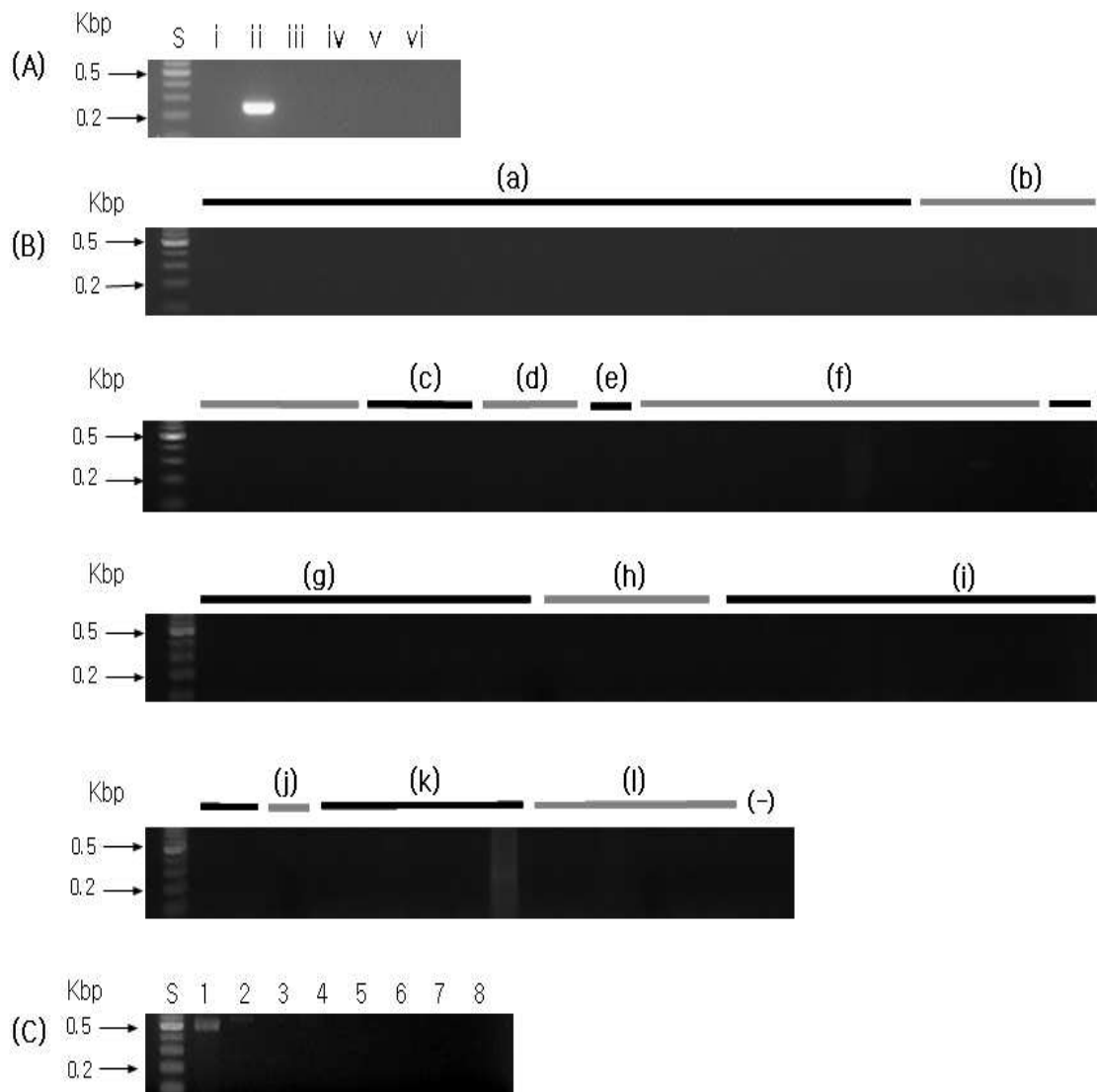


Fig. 15. Specificity test of Smitis-b-F/R primers with purified genomic DNA of type strains(A), clinical isolates(B), and reference strains(C) of mitis group.

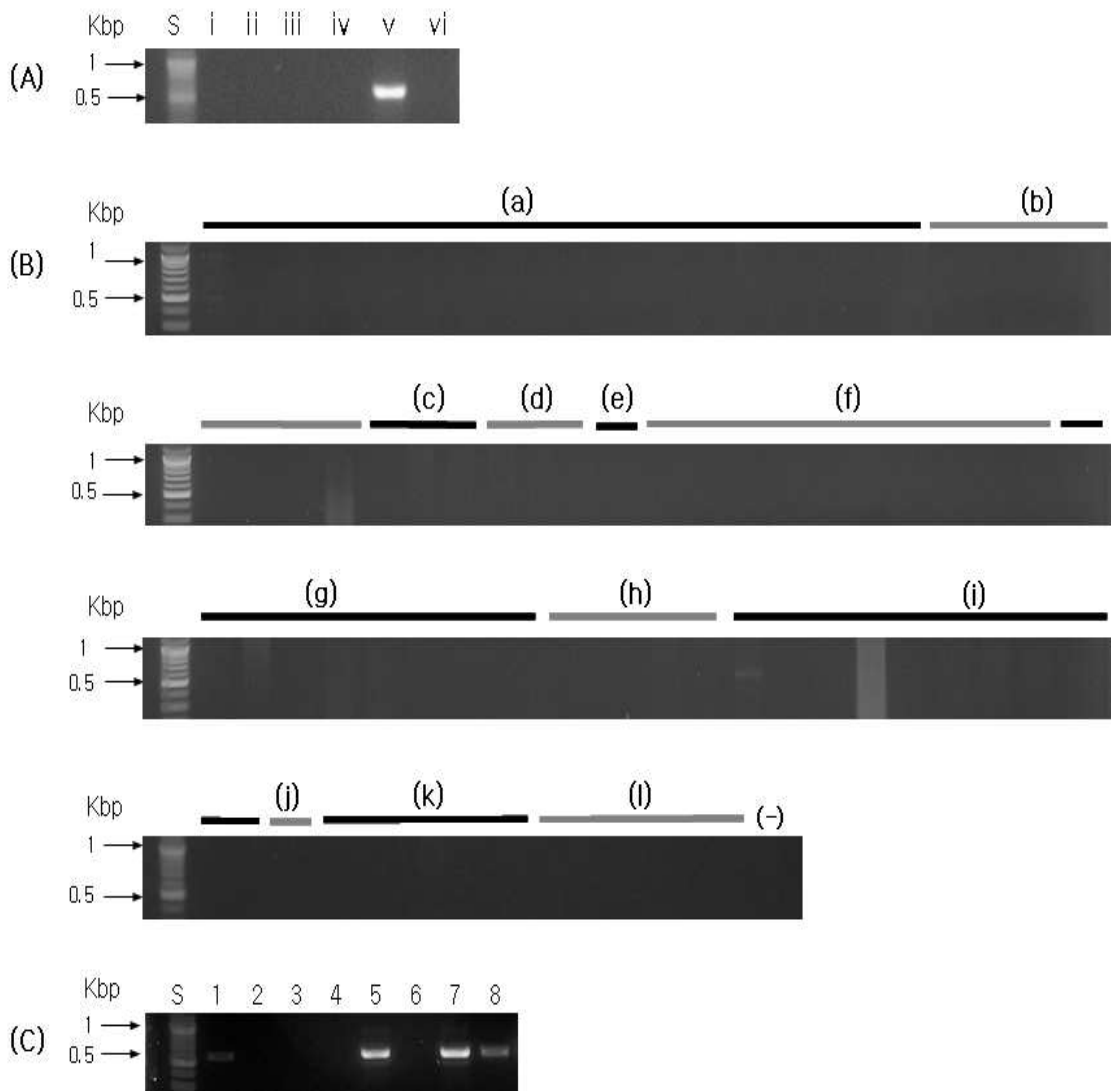


Fig. 16. Specificity test of Spn8-F1/R1 primers with purified genomic DNA of type strains(A), clinical isolates(B), and reference strains(C) of mitis group.

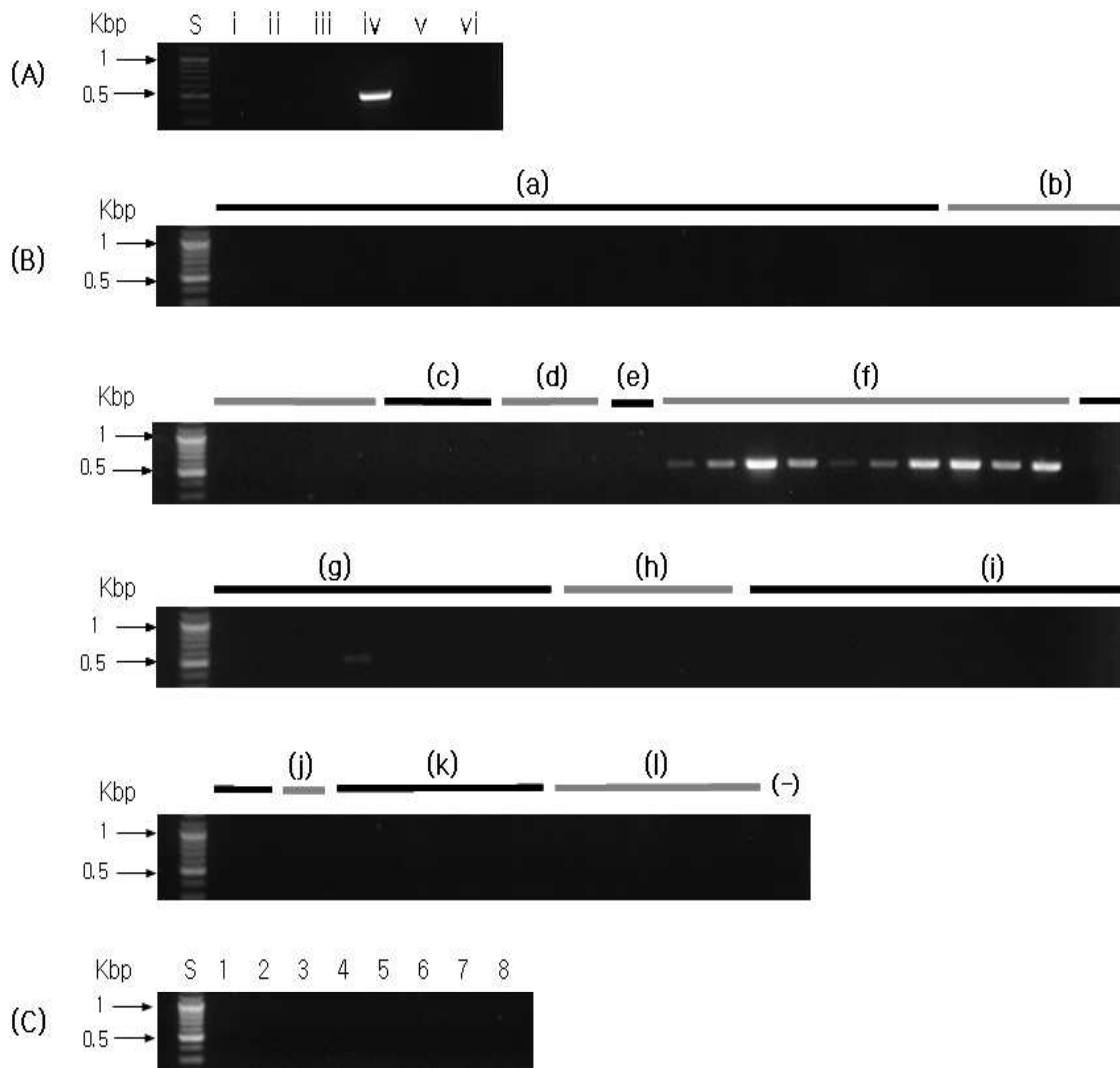


Fig. 17. Specificity test of Spa17-F/R primers with purified genomic DNA of type strains(A), clinical isolates(B), and reference strains(C) of mitis group.



(국문초록)

Inverted dot blot hybridization 검색법을 이용한 mitis 군  
연쇄상구균 종-특이 DNA 프로브 및 PCR 프라이머 개발

박 순 남

조선대학교 대학원 치의학과

(지도교수: 김 도 경)

본 연구는 mitis 군 연쇄상구균(MGS)의 종-특이 DNA 프로브를 개발하고 개발된 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 종-특이 PCR 프라이머를 개발하고자 시행하였다. 본 연구를 위하여 MGS의 6개의 표준균주, 8개의 참고균주 그리고 81개의 임상균주를 포함하여 95개의 균주를 사용하였다. 81개의 임상균주를 동정하기 위하여 세 개의 housekeeping 유전자인 16S rRNA 유전자 (16S rDNA), RNA polymerase beta-subunit encoding gene (*rpoB*) and manganese superoxide dismutase gene (*sodA*)를 이용한 multilocus sequence typing(MLST)법을 사용해 phylogenetic 분석을 시행하였다. *Hind*III로 처리한 표준균주의 지놈 DNA는 random 클로닝법으로 클로닝하였다. *Streptococcus mitis*, *S. pneumoniae*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. sanguinis* and *S. gordonii* 종-특이 DNA 프로브를 개발하기 위해 IDBH법을 이용하였고, southern blot analysis를 이용해 선택된 프로브의 특이도를 확인하였다. 종-특이 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 종-특이 PCR 프라이머를 디자인 하였다. MLST의 결과에서 *rpoB* 유전자에 의해 임상균주의 93%가 MGS의 11개의 균종으로 분류되었다. *SodA* 유전자에 의해서는 *S. mitis*와 *S. pneumoniae*의 동정이 불가능하였고, *rpoB* 유전자에 의해서 얻어진 결과와는 일치하지 않았다. Sgo41, Sor24, Spa17 그리고 Ssa21 DNA probes는 각각 *S. gordonii*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, 그리고 *S. sanguinis*dp 종-특이적인 프로브로 확인되었고 *Smi21*은 *Streptococcus mitis* KCTC 3556<sup>T</sup>에 strain-specific한 프로브로 개발되었다. PCR 결과에서 Sgo41-F1/R1 프라이머는 *S. gordonii*에 종-특이적인 프라이머로 확인되었고, *Smi21-f-F2/R2* 와 *Smi21-b-F/R*는 *Streptococcus mitis* KCTC 3556<sup>T</sup>에 균주-특이 프라이머로 확인되었다. 이상의 결과에서 Sgo41-F1/R1 프라이머는 *S. gordonii*를 동정하고 임상샘플에서 *S. gordonii*를 검출하는데 유용한 프라이머임을 알수 있었다. 게다가 *Smi21-f-F2/R2* 와 *Smi21-b-F/R*는 *Streptococcus mitis* KCTC 3556<sup>T</sup>를 동정하고 균주의 보존적 부분에서 유용하게 이용될 것이라 사료된다.

# 저작물 이용 허락서

학 과	치 의 학	학 번	20067592	과 정	박사
성 명	한글 박 순 낭    한문朴 諄 娘    영문 Park, Soon-Nang				
주 소	광주 광역시 서구 화정 4동 중흥 아파트 101동 609호				
연락처	E-mail : nang01@hanmail.net				
논문제 목	한글 Inverted dot blot hybridization 검색법을 이용한 mitis 군 연쇄상구균 종-특이 DNA 프로브 및 PCR 프라이머 개발				
	영문 Development of the species-specific DNA probes and PCR primers for the identification of mitis group streptococci using the inverted dot blot hybridization screening method				

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 편집과 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 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(  )    반대(  )

2009년 2월

저작자: 박 순 낭            (인)

**조선대학교 총장 귀하**