

*Actionbacillus actinomycetemcomitans*의 임상분리 혈청형에 따른 유전자 지문 양상에 관한 연구

부산대학교 치과대학 치주과학교실

허경기 · 김성조 · 최점일

I. 서 론

Actinobacillus actinomycetemcomitans(*A. a.*)는 비운동성, 그람 음성, 호이산화탄소성 구강균으로서¹⁾, 다양한 형태의 치주질환이 있어 치주병인균의 하나로 간주된다^{2,3)}. 많은 연구에서 국소 유년형 치주염과 이 미생물과의 관계가 강조되어 왔으며⁴⁻⁷⁾, 급속 진행형 치주염과 성인형 치주염, 특히 난치성 치주염 환자의 일부에서도 관련하여 나타나는 것으로 보인다⁸⁻¹¹⁾. 반면, 치주적으로 건강한 개체에서도 발견된다고 보고되기도 하며¹²⁻¹⁵⁾, 정상적인 구강세균총에 속한다고 제안되기도 하였다⁶⁾.

여러해 동안 *A. a.* 균주는 세 가지 혈청형(serotypes)으로 분류되어 왔으며^{2, 17, 18)}, 일반적으로 혈청형 b인 균주가 국소 유년형 치주염 환자에서 가장 빈번히 나타났다^{2, 17-20)}.

Tsai & Taichman²¹⁾은 성인 환자에서 혈청형 c가 우세하다고 제시하였다. Zambon등²²⁾은 개체당 한 가지의 혈청형만을 발견하였는데, 동일한 방법을 사용하여 Chung등²³⁾은 유년형 치주염을 가진 환자 12명 중 3명에서 두 가지 다른 혈청형을 발견하였다. 한편 Asikainen등²⁴⁾은 부가적으로 d와 e의 두 가지 혈청형을 보고하였다. 91명의 핀란드인을 대상으로 한 Saarela등²⁴⁾의 연구에서, 혈청형 d 또는 e가 검출균주의 6%, 대상자의 10%에서 발견되었다. 또한, 이들은 대상자의 95%에서 한 가지의 혈청형만 발견되었으며, 다양한 *A. a.* 혈청형

의 동시적 발현은 드물다고 하였다. Zambon등²⁵⁾은 *A. a.*의 혈청형과 생형(biotypes)의 결정에 근거하여, 유년형 치주염으로 고생하는 구성원을 가진 가족내에서 이 미생물의 가족내 전파를 제안하였다. 국소 유년형 치주염이 아닌 가족내 구성원들 사이에서의 전파도 Alaluusua등²⁶⁾에 의해 제시되었다. 그러나, 이같은 분류 방법은 변수가 적으므로 분석에 한계점을 가진다.

이러한 혈청형 분류가 세균세포벽의 항원적 특성에 기초를 둔 것인 반면, 세균의 genome 분석은 동일한 세균종이나 혈청형을 가진 검출균주(isolate)들을 식별하기 위해 더 많은 정보를 제공해 주며²⁶⁾, DNA 지문형성법과 같은 현대적인 분자생물학적 기술을 이용한 약안면 구강 병원균의 유전학적 다양성에 대한 연구는, 병인론뿐만 아니라 병원성 구강세균총의 획득 및 구강내나 사람을 통한 전파를 이해하는 데 중요한 정보를 제공한다. 이러한 지식이 이 미생물과 관련된 질환을 예방하고 재발을 방지하는 데 상당히 유용할 것이다²⁷⁾.

Zambon등²⁸⁾은 제한효소 분석법(REA; Restriction Endonuclease Analysis)를 통해 얻은 DNA 절편의 양상을 세 가지 주요제한 형태군으로 나누었으며, 이를 *A. a.* 혈청형과 비교하였다. 제한형태 I은 혈청형 a와 모두 공통적이고, 제한형태 II는 혈청형 b의 58%와 관련이 있고, 나머지 혈청형 b와 혈청형 c 모두가 제한형태 III과 관계가 있다고 보고하였다. 그

러나, 이 방법은 분석할 절편(fragments)의 수가 많아서 육안으로 판별하기가 어렵고²⁶⁾ 유전적 다양성이 제한적으로 나타났다²⁶⁾.

한편, 적절한 표지자(probe)로 염색체 DNA(chromosomal DNA)를 hybridization하므로써, 인지되는 절편의 수를 줄이고 감도(sensitivity)와 재생능(reproducibility)을 향상시킬 수 있다²⁸⁻³¹⁾. DiRienzo 등²⁹⁾은 Southern blot 분석법과 4.7kb 표지자를 이용한 hybridization으로 동일한 혈청형이나 생형을 보이는 여러 *A. a* 표준균주에서 독특한 hybridization 형태를 얻었다. 임상 검출균주에서 적용하여 동일한 개체나 한 가족내 다른 구성원에서 유사한 형태를 얻었으며, 동일개체내 두 가지 다른 형태의 존재도 관찰하였다. 따라서, 이 방법이 가족내 *A. a*의 전파를 연구하는 데 적용 가능성을 제시하였다. 동일한 방법으로 DiRienzo & Slots³⁰⁾은 133개의 검출균주에서 여섯 가지의 제한절편장 다변화(RFLP: Restriction fragment length polymorphisms) 형태를 얻었으며, 건강한 상태에서 치주염으로 전환된 부위에서 균주 JP2와 유사한 RFLP B형을 관찰함으로써 *A. a* 균주들 중 독성의 차이를 알아내는 데 이 방법을 사용할 수 있음을 제안하였다. 그러나, RFLP 형태와 혈청형 a, b, c 사이의 상관관계는 발견할 수 없었다.

한편, Saarela 등³⁰⁾은 rRNA 유전자 표지자를 사용하여 혈청형 a-e의 hybridization 형태를 살펴 보고자 하였다. 혈청형 a, b, c를 나타내는 ATCC 표준균주는 각각 명확히 구분된 RFLP 형태를 보였으나, 혈청형 d와 e에 해당하는 IDH 781과 IDH 1705는 서로 아주 유사하게 나타났다. 임상 검출균주에서 동일한 개체내 동일한 혈청형은 같은 유전자형을 보였으며, 두 가지 혈청형이 있는 경우는 서로 다른 유전자형을 나타냈다. 그러나, 서로 다른 개체의 경우 다르거나 같은 혈청형에 대해 구분되는 유전자형을 보였으며, 인지되는 절편의 수가 많아 유사한 유전자군으로 분류하기가 곤란하였다. 따라서, 치주질환의 상태와 이들 유전자형과의 관계를 밝히지 못하였다.

이에 본 연구는 (1) *A. a*. ATCC 표준균주

혈청형 a, b, c와 별도로 보고된 혈청형 d, e의 상이한 유전자형을 DNA-DNA hybridization 방법으로 판별할 수 있는지 여부와 (2) 서로 다른 개체에서 얻은 임상 검출균주의 혈청형과 이들 유전자형의 상관관계를 살펴 보고자 한다. (3) 더불어, 동일한 개체에서 얻은 임상 검출균주의 혈청형과 유전자형의 다양성을 알아보려고 한다.

II. 연구방법

1. 사용 균주 및 배양조건

임상 검출균주는 치주치료를 받은 병력이 없으며, 치은연하 치태의 채취 전 6개월 동안 항생제 사용 병력이 없는, 급속진행형, 국소 유년형 및 성인형 치주염 환자나 건강한 개체를 대상으로 다음과 같은 순서를 기준으로 4 치주낭을 선택하여 채취하였다.

1. 부착소실의 양이 가장 많고 탐침시 출혈이 있는 가장 깊은 치주낭
2. 부착소실이 없다면 탐침시 출혈을 보이는 가장 깊은 치주낭
3. 출혈이 없다면 가장 깊은 치주낭
4. 알고 건강한 치주낭만 존재한다면, 제1대구치의 근심

선택된 4 부위의 치은연상 치태를 제거한 후, 각 치주낭에 대해 2개의 소독된 paper points를 삽입하여 30초간 유지시켜 치은연하 치태를 채취한다. 채취한 표본을 즉시 1ml의 RTF(reduced transport fluid)³⁰⁾가 든 vials에 넣어 Vortex mixer 상에서 30초간 혼합(dispersion)하고 10⁸ 배율로 희석하였다. 희석된 vial에서 0.1 ml을 취해 *A. a*.를 위한 선택배지인 TSBV(Tryptic soy - 10%serum - 75µg/ml Bacitracin - 5 µg/ml Vancomycin)³⁰⁾ 한천배지에 도말하여 CO₂ generator, BBL microbiology system)에서 배양하였다. 3~5일 후 배지 상의 집락형태를 검사하였다. *A. a*.는 한천에 부착된 작고 둥글며 볼록하고 별모양의 내부구조를 가진 집락형태와 catalase 반응에 양성인 그람 음성균으로 확인하여, 순수배양을 위해 subculture 하였다. 순수분리배양이 이루어지면, 배지의

Table 1. Type strains and plasmid used

Strains	Relevant properties	Source
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC29523	serotype a	ATCC
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC29522	serotype b	ATCC
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC43719	serotype c	ATCC
<i>A. actinomycetemcomitans</i> IDH781	serotype d*	
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC1705	serotype e*	
<i>E. coli</i> DH5 α and plasmid, pAA2097 were used.		

* * Inst. of Dent., Univ. of Helsingki, Finland

질반에 형성된 집락은 일차적인 DNA 조작에 이용하고 나머지는 0.15% dimethyl sulfoxide (DMSO)에 넣어 -70°C에 냉동저장하였다.

표준균주로 *A. a.* 혈청형 a(ATCC 29523), b(ATCC 29522), c(ATCC 43719) 등을 선택했고, 추가로 혈청형 d(IDH 781, Institute of Dentistry, Univ. of Helsinki, Finland) 및 e (IDH 1705)를 사용하였고(표 1-1), 임상 검출균주와 같은 조건에서 배양하였다.

Escherichia coli strain DH5 α 의 배양을 위해 완전배지는 Luria - Bertani(LB)를 사용하였고, 특별한 경우가 아닐 때는 모든 세균의 배양은 37°C에서 행하였다. 항생제는 선별배지에 따라 ampicillin(50 μ g/ml), tetracyclin(25 μ g/ml) 등을 첨가하여 사용하였다.

이 실험에 사용한 표준균주와 plasmid를 표 1에 정리하였다.

2. Serotyping(혈청형의 결정)

1) 항혈청(Antisera)의 준비

A. a. 균주 ATCC 29523(serotype a), ATCC 29522(serotype b)와 ATCC 43719(serotype c)에 대한 항혈청은 Zambone등²⁾의 방법에 의해 준비하였다.

배양된 각 균주들을 약 500 μ g 농도되게 0.05% formaline - saline solution에 현탁하여 세균 현탁액 0.2ml과 동량의 완전한 Freund a djuvant 혼합물들을 토끼 발바닥에 처음 주사하였다. 일주일 후 adjuvant없이 세균현탁액만 토끼 귀 정맥에 주사하였고 이 과정을 2주 더 계속하였다. 5주째 토끼의 심장에서 채혈하여 3000

rpm으로 10분간 원심 분리한 후 혈구를 제거한 상등액을 취해 -20°C에서 보관하여 다음 실험에 사용하였다.

2) 면역흡착(Immunoabsorption)

위에서 얻은 항혈청을 특히 항원에만 반응할 때까지 다른 *A. a.* 혈청형 균주들의 세포로 흡착을 하였다. 한 종류의 토끼 항혈청 1ml에 다른 혈청형 균주들(약 100mg)을 첨가하여 37°C에서 진탕하면서 1시간동안 반응시킨 후 4°C에서 12시간 유지하였다. 이 혼합물을 13,000 rpm으로 60분간 원심분리하여 상등액을 취하여 사용할 때까지 -70°C에서 보관하였다.

3) ELISA에 의한 혈청형의 결정

검출된 *A. a.* 균주들을 0.02% NaCO₃를 포함하는 0.1M NaCO₃ 완충액(pH 9.6)에 580 nm에서 Optical Density(OD) 0.25-0.3 되게 현탁하였다. 이 항원 현탁액을 ELISA용 미세적정판의 각 소정(well)에 50 μ l씩 첨가하여 2시간 동안 상온에 방치하고 3번 증류수로 세척하여 차단완충액(0.05% Tween 20에 녹인 0.25% BSA)을 전 소정에 가득 첨가한 후 4°C에서 12시간 보관하였다. 이 표본을 3번 증류수로 세척한 후 PBS에 희석된 면역흡착된 특이 혈청형 항체 50 μ l를 각 소정에 첨가하여 상온에서 2시간 반응시키고, 3번 증류수로 세척한 후 goat antirabbit Ig G - conjugated alkaline phosphatase를 50 μ l씩 각 소정에 첨가하였다. 2시간 후 증류수로 3번 세척하여 기질 p - nitrophenyl p - hosphate액(1mg/10ml : 0.05mM NaCO₃, pH 9.8 with 1mM MgCl₂) 50 ml를 각 소정에 첨가하여 반응시켰고, 1N

NaOH를 사용하여 반응 정지를 시켰다. 발색도를 미세 ELISA 판독기로 분광 광도계의 파장 405nm에서 측정하였다.

3. Genotyping(유전자형의 결정)

1) 변형(Transformation)

표지자로 사용할 plasmid pAA 2097은 DiRienzo(Univ. of Pennsylvania)가 기준한 것으로 숙주 *E. coli* DH5 α 에 도입해 증폭하여 사용하였다. 유효세포와 DNA의 도입은 Hanahan³⁵⁾의 방법에 따라 수행하였다.

숙주 균주를 37°C에서 $5 \times 10^7 - 2 \times 10^8$ cells/ml 되게 진탕 배양한 후, 배양액을 얼음 속에서 10분간 냉각하고 냉동원심분리기에서 4°C에서 5,000rpm으로 10분간 원심분리하여 집균하였다. 세포 침전물에 미리 차게 해둔 멸균된 CaCl₂ 용액(50mM CaCl₂, 10mN Tris - Cl pH 8.0)을 원래 배양액 부피 1/5 정도로 첨가한 다음, 세포를 현탁시켜 얼음 속에 15분 동안 두었다가 5,000rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고 미리 차게 해둔 CaCl₂ 용액으로 원래 부피의 1/50 되게 현탁시킨 후, 차게 해둔 eppendorf 시험관에 유효세포 0.2 ml씩 분주하여 사용하였다.

유효세포 0.2ml과 plasmid DNA 용액 0.1 ml를 혼합하여 0°C에서 60분간 방치한 후, 2분간 42°C에서 열충격을 가하고 LB 배지를 0.8 ml씩 각 반응물에 첨가하여 37°C에서 1시간동안 흔들지 않고 배양하였다. 이 배양액을 선택배지 tetracycline과 ampicillin이 첨가된 LB 한천배지에 적당히 희석시켜 도말하고 37°C에서 하룻밤 배양하여 집락을 확인하였다.

2) Plasmid DNA의 분리 및 정제

Plasmid DNA의 분리와 정제를 위해, 소규모 DNA 분리와 대규모 DNA 분리방법은 Maniatis³⁶⁾의 방법을 사용하였다. 즉, 항생제를 포함하는 LB medium 5ml에 균을 접종하여 37°C에 하룻밤 배양한 후, 이 배양액을 LB medium 500ml에 1:100으로 접종하여 하룻밤 동안 배양하였다. 이 배양액을 4°C, 5,000rpm (한일 H50A - 6, Rotor 10 BN6)에서 10분동안 원심분리하여 균체를 회수하고, STE 완충액

(pH 8.0)으로 1회 세척하였다. 세척된 균체에 lysozyme(50mg/ml)을 포함하는 용액I 10ml에 균체를 현탁시키고 상온에 5분간 방치하였다. 이 혼합액에 용액II 20ml를 첨가하고 시험관의 입구를 밀봉한 후 부드럽게 여러번 뒤집고 10분간 얼음 속에 방치하였다. 용액II를 처리한 혼합액에 얼음 속에 냉각된 용액III 15ml를 첨가하여 여러번 빨리 뒤집고 10분동안 얼음 속에 담가둔 후 4°C, 15,000rpm(한일 H50A - 6, Rotor A10H - 24)으로 30분 동안 원심분리하여 세포잔사와 염색체 DNA가 제거된 상등액을 상등액 부피의 0.6배 양의 isopropanol을 첨가하여 잘 섞은 후 15분 동안 상온에 방치하였다. Isopropanol이 첨가된 용액을 꺼내어 상온에서 10,000rpm에 30분 동안 원심분리하여 상등액을 조심스럽게 버리고 침전물을 얻었다. 70% ethanol로 상온에서 1회 세척하고 원심분리하여 상등액을 버리고 DNA 침전물을 얻었다. TE (pH 8.0) 완충액 8ml에 침전물을 녹이고 CsCl 8g을 넣어 완전히 녹인 후, ethidium bromide 용액(EtBr, 10mg/ml in H₂O) 0.8ml을 첨가하였다. CsCl과 EtBr이 첨가된 DNA 용액을 20°C, 55,000rpm으로 20시간동안 초원심분리(Kontron T - 2000)하여 plasmid DNA를 분리하였다. Isoamyl alcohol로 포화된 TE 완충액을 사용하여 붉은색이 없어질 때까지 ethidium bromide를 제거하였다. Plasmid DNA 용액을 투석 시험관에 넣고 TE(pH 8.0) 완충액 1L에 투석(4°C, 3시간씩 3회 완충액 교환)을 하여 CsCl을 제거한 다음 DNA 농도를 측정하여 -20°C에 보관하였다.

3) Agarose gel 전기영동

Plasmid DNA를 확인하는 모든 실험은 0.7% agarose gel에서 대개 5V/cm에서 3시간 동안 전기영동을 행하였다.

4) DNA의 절단과 DNA 절편의 흡수

여러 가지 제한효소를 사용한 plasmid의 절단은 적당한 절단용 완충액에서 37°C, 1시간 동안 수행되었다. 제한효소 처리에 의해 발생되는 DNA 절편은 TAE 완충액을 사용한 0.7% agarose gel 전기영동을 행하여 분석하였다. 제한효소를 절단한 절편은 agarose gel상에서

전기영동한 후 원하는 DNA 절편들을 GENE CLEAN II Kit(BIO 101, U.S.A.)로 정제하였으며, 여기에 사용된 모든 시약들은 GENE CLEAN II Kit에 포함되어 있거나 제조회사의 지시대로 만들어 사용하였다. 그 방법은 다음과 같았다.

TAE 완충액을 사용한 gel 전기영동을 통해 전개된 DNA bands 중에서 원하는 DNA 절편이 위치한 band를 UV 루사기 상에서 찾아 수술용 칼로 정확하게 자른 뒤 eppendorf 시험관에 담았다. 여기에 gel 조각의 3배량의 6M sodium iodide가 포함된 NaI 저장 용액을 첨가하여 용액내의 sodium iodide의 최종농도가 3M이 되도록 하였다. 이것을 45~55°C 항온수조에 옮겨 DNA 절편이 들어있는 gel을 녹였다. 사용 전에 잘 현탁된 GLASSMILK를 5 μ l 첨가하여 5~10분간 얼음에 냉각시켰다. 이 때 DNA는 GLASSMILK 입자에 결합하게 되는데, 이것을 12,000g에서 5초간 원심분리시켜 DNA가 결합되어 있는 GLASSMILK 입자를 침전시켰다. 상층액을 버리고 난 후, 얼음에 냉각된 NEW WASH 용액 700 μ l 정도로 3회 세척하였다. NEW WASH 용액에 들어있던 ethanol성분이 모두 기화하고 난 후, TE 완충액이나 멸균수를 10 μ l정도 첨가하여 45~55°C 항온수조에서 5~10분간 방치하여 GLASSMILK 입자로부터 DNA를 분리하였다. 12,000g에서 30초간 원심분리한 후, DNA가 용출되어 있는 상층액만을 새로운 eppendorf 시험관에 옮겨 -20°C에 보관하여 다음 실험에 사용하였다.

5) *A. a.* genomic DNA의 분리

세포의 genomic DNA 분리는 Zamboni²⁶⁾의 방법을 변형하여 사용하였다.

고체배지에서 자란 세균의 집락을 면봉을 사용하여 집균한 후 STE 완충액 1ml에 현탁하고 2분 동안 미세원심분리기(FISHER Scientific사, MODEL 235C)에서 원심분리하여 상층액을 버리고 TE 475 μ l에 현탁한 후 lysozyme (10mg/ml) 25 μ l를 첨가하여 얼음 속에 30분 동안 방치하였다. 이 현탁액에 STEP 완충액 90ml와 RNase(10mg/ml) 5ml를 첨가하여, 37°C에서 15분간 반응시킨 후, Proteinase K(20

mg/ml) 5 μ l를 첨가하고 55°C에서 60분간 반응시켰다. 위 반응액과 동량의 Phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25:24:1, pH 8.0)액 600 μ l를 넣어 잘 혼합하여 5분 동안 미세원심분리기에 원심분리하여 상층액을 취하고 동량의 chloroform - isoamyl alcohol 600 μ l를 첨가하여 혼합한 후 5분 동안 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이 상층액에 3M sodium acetate 60 μ l와 isopropanol 600 μ l를 첨가하여 상온에서 10분간 방치한 후 10분 동안 원심분리하여 DNA를 침전시키고, 70% ethanol로 한번 세척한 후 상온에서 잔존하는 ethanol이 완전히 제거될 때까지 건조하여 TE 50 μ l에 DNA를 녹였다. 이 DNA 용액을 분광 광도계로 양을 측정한 후, -20°C에서 보관하여 다음 실험에 사용하였다.

6) Southern Blotting과 hybridization

(1) Hybridization 표지자의 준비

A. *a.* 균주들의 genomic DNA상에서 균주간 DNA 지문형성을 위하여 사용된 hybridization 표지자는 plasmid pAA 2097에서 제한효소 *EcoR* I과 *Sal* I으로 절단된 약 4.7kb DNA 단편을 agarose 전기영동상에서 분리하여 GENE CLEAN II Kit로 회수하여 사용하였다.

(2) *A. a.* genomic DNA의 전사(transfer)

각 제한효소에 절단된 *A. a.* genomic DNA는 0.8% agarose gel로 3시간 동안 전기영동하였다. Agarose gel에 분리된 DNA 절편을 변성시켜 Nylon 흡수지(Bio-Rad사)에 흡착, 고정된 방법은 Maniatis²⁶⁾의 방법을 변형하여 행하였다. 흡수지에 흡착시키는 방법은 모세관 전사를 하였다. Gel은 500ml의 변성용액에 넣어 1시간 정도 실온에서 천천히 진탕한 후, 증류수로 2회 정도 gel을 세척하여 500ml의 중화용액을 넣고 실온에서 30분 정도 천천히 진탕하였다. Gel은 10X SSC가 담긴 그릇 위의 3MM 흡수지 위에 거꾸로 놓은 후 미리 10X SSC에 포화된 Nylon 흡수지를 gel 위에 놓고 그 위에 3MM 흡수지 두 장과 종이 수건(Kim towel type 50)을 15cm 정도 되게 하여 약 0.5-1kg 정도의 물체를 올려 놓고 밤새 유지시켰다. Nylon 흡수지가 gel로부터 분리되어 2X

SSC에서 간단히 세척한 후 종이 수건에서 습기를 제거하고 80°C의 진공건조 오븐에서 2시간 동안 구워 고정하였다.

(3) Southern hybridization

Genomic DNA 지문 분석을 하기 위해 사용한 Southern hybridization은 비방사능 표식방식인 Enhanced Chemiluminescence(ECL) Kit (Amersham Co., U.S.A.)를 사용하였다.

표지자로 쓸 DNA 증류수로 100ng/10μl되게 희석하였다. 이 DNA 용액을 끓는 물에 5분간 담가둔 후 얼음 속에서 5분 동안 방치하고 5초간 원심분리하였다. DNA 용액과 동량의 DNA 표식제를 첨가하여 잘 혼합한 후 동량의 glutaraldehyde 용액을 가하여 1초간 vortexing하여 37°C에서 10분간 반응시켜 즉시 사용하였다.

Hybridization에 DNA blot된 Nylon 흡수지를 넣고 흡수지의 면적(0.25ml/cm)에 따라 pre-hybridization 용액 양을 첨가한 후 42°C의 항온수조에서 약하게 진탕하면서 1시간 동안 pre-

hybridization을 하였다. Hybridization bag에 표식된 표지자를 첨가하여 12~14시간 동안 42°C에서 진탕하면서 hybridization을 수행하였다. 반응이 끝난 흡수지를 깨끗한 용기에 옮겨 일차 세척완충액(2ml/cm)으로 20분간 2회 반복하여 세척하고, 상온에서 이차 세척완충액(2ml/cm)으로 5분간 두 번 세척하였다. 이 흡수지를 3MM 종이 위에서 1분간 건조한 후 흡수지 면적(0.125ml/cm)에 따라 최종 부피에 맞게 동량의 detection 1과 2를 혼합하여 흡수지 위에 붓고 1분간 반응시켰다. 반응액을 제거한 다음 흡수지를 wrap으로 싸 뒤, 암실에서 증강판이 있는 cassette에서 hyper film - ECL (PRN 2013)에 장착하여 1~15분 동안 방치한 후 현상하였다.

여기에서 사용한 반응계 용액은 구입회사의 지시에 따라 흡수지의 면적에 비례하여 사용하였다.

Table 2-1. Composition of Buffers used in purification of A. a genomic DNA

Buffer Solution	Composition
STE buffer	0.1M NaCl 10mM Tris - HCl(pH 8.0) 1mM EDTA
TE buffer	50mM Tris - HCl(pH 8.0) 50mM EDTA
STEP buffer	0.5% SDS 50mM Tris - HCl(pH 8.0) 0.4M EDTA proteinase K(사용직전)
RNase	Pancreatic RNase A(10mg/ml) in TE buffer preheated to 80°C for 10 minutes to inactivate DNase
Phenol/Chloroform	1 : 1 mixture equilibrated with 0.5M Tris - HCl (pH 8.0) The chloroform is a mixture of the chloroform and isoamyl alcohol(24 : 1)
DNA solution TE	10mM Tris - HCl(pH 8.0) 1mM EDTA

Table 2-2. Composition of Southern hybridization solution

Solutions	Composition
DNA denaturation solution	1.5M NaCl 0.5M NaOH
DNA neutralization solution	1.0M NaCl 0.5M Tris - HCl(pH 7.6)
20X SSC	3M NaCl 0.3M Trisodium citrate(pH 7.6)
Primary wash buffer	0.4% SDS 0.5X SSC
Secondary wash buffer	2X SSC
Prehybridization solution	ECL - hybridization solution 5% bloking agent 0.5M NaCl
Hybridization solution	prehybridization with labelled DNA probe

III. 결 과

1. A. a. 표준균주 혈청형 a, b, c 및 혈청형 d, c의 유전자 지문형태

Hybridization에 표지자로 사용된 4.7kb 유전자 절편에 의해 인지된 유전자 지문양태는 실험된 5가지의 혈청형 별로 서로 다르게 인지되어 나타났다. 표준균주 혈청형 a(ATCC 29523)는 제한절편의 각각 23.1Kb와 2.5Kb에서 각각 hybridization이 되었고, 혈청형 b의 경우 6.6Kb에서, 혈청형 c는 9.5Kb에서, 혈청형 d는 23.1Kb와 2.1Kb에서 각각 hybridization 되었다(그림 1). 유전자형의 명칭은 표준 혈청형 a, b, c가 나타내는 지문양상을 기준으로 하여 각각 A, B, C형으로 분류하고 혈청형 d, e가 나타내는 지문양상을 역시 D, E라고 지칭하였다.

2. 임상 검출균주의 혈청형과 유전자형의 양상

사용된 방법으로 판별된 임상 검출균주의

혈청형은 총 54개 균주에서 a형 6개, b형이 4개, c형이 28개였고 a, b, c 어느 것에도 해당되지 않는 미결정형(not determinant : nd)은 총 16개에 해당되었다(표 3). 유전자형은 A형이 5개, B형이 4개, C형이 24개, D형이 11개, E형이 3개였고, 어느 유형에도 속하지 않는 기타형(NT : Non - Type)은 7개였다(표 4).

3. 혈청형 분포와 유전자형 분류의 상관관계

혈청형 a로 판별된 총 6개의 균주중 유전자형 A가 5개, 유전자형 C가 1개였고, 혈청형 b의 경우 모두 유전자형 B로서 4개였고, 혈청형 c는 총 28개 중 유전자형 C가 23개, 유전자형 NT가 5개였으며, 혈청형 nd(a, b, c형이 아닌 것)는 총 16개로서 유전자형 D가 9개, E형이 3개, 그리고 NT형이 2개, 그리고 B형과 C형이 각각 1개씩으로 나타났다(표 5).

Figure 1. Hybridization patterns of 5 *A. a.* serotype strains

Table 3. Serotype distribution

Serotype	Number of isolates(%)
a	6(11.11)
b	4(7.41)
c	28(51.85)
nd	16(29.63)
Total number	54

Table 4. Genotype distribution

Genotype	Number of isolates(%)
A	5(9.26)
B	4(7.41)
C	24(44.44)
D	11(20.37)
E	3(5.56)
Non - Type	7(12.96)
Total number	54

Table 5. Subject distribution of genotypes according to serotype patterns

Serotype	Number	Genotype	Number
a	6	A	5
		C	1
b	4	B	4
c	28	C	23
		NT	5
nd	16	B	1
		C	1
		D	9
		E	3
		NT	2

4. 동일 개체내 혈청형과 유전자형의 분포 양상

동일 개체내에 2개 이상의 *A. a.* 임상 검출 균주가 나타난 경우 중 각 *A. a.* 균주의 혈청형의 종류나 유전자형의 종류가 2개 이상인 경우는 다음과 같다. 피검자 1명에서 b와 c 두 가지 혈청형과 유전자형 B와 C가 검출되었고, 다른 2명의 피검자에서 혈청형 a와 c의 두 가지가 검출되었는데, 이 중 유전자형 A와 C인 사람이 1명이고 나머지 1명은 C와 NT였다. 또 다른 피검자 1명에서는 혈청형이 c형 한 가지가 검출되었는데 유전자형의 경우 C와 NT의 두 가지가 검출되었다(표 6).

IV. 총괄 및 고안

서로 다른 형태의 치주질환의 병인이 있어 치태내 특이 미생물이 중요한 원인으로 여겨지고 있다. *A. a.*는 국소 유년형 치주염이나 급속 진행형 및 난치성 치주염의 원인으로 간주되고 있는 것 중의 하나이다³³. *A. a.*의 중요성이 인식됨에 따라 치주질환에 있어 이들의 역할이나 구강내 전파경로 등에 대한 관심이 증가되었으며, 미생물의 역학적 연구에 개별균주의 식별이 필요하게 되었다. 이러한 연구의 일환으로 세균 세포벽의 항원적 특성에

Table 6. different individuals distribution between serotypes and genotypes

Subject	Serotype	Genotype
S1	a	A
	c	C
S2	a	A
	c	NT
S3	b	B
	c	C
S4	c	C
	c	NT

기초를 둔 혈청형의 분류나, 유전자의 표현과는 독립적으로 동일한 세균 종류나 동일한 혈청형의 검출균주들을 식별하는데 필요한 정보를 더 제공해 줄 수 있는 세균의 genome 분석 등이 도입되었다³⁶.

본 연구에서는 4.7kb 유전자 표지자에 의한 DNA-DNA hybridization법을 사용하여 관련하여 분류함으로써 세균의 감염경로와 역학에 기준자료로 사용하고자 시도되었다. DiRienzo 등³⁹의 연구에 따르면 plasmid pAA 2097은 삽입 DNA 절편의 크기와, *A. a.* DNA와는 hybridization이 가능하나 다양한 형태의 치주질환과 관계가 있다고 여겨지는 다른 구강내 그람 음성 세균과 잡종형성 되지 않는 점에 근거하여 선택되었다. 이 plasmid에 포함된 4.7kb *EcoRI* 삽입 절편을 표지자로 사용하였다.

실험한 결과, 사용된 표지자에 의해 인지된 지문형태는 혈청형 a, b, c(각각 ATCC 29523, 29522, 43719)와 d, e(각각 IDH 781, 1705)인 *A. a.* 표준균주 다섯 가지에 대해 서로 상이하게 판별되었다. 이는 혈청형 a, b, c를 나타내는 표준균주의 유전자형(ribotypes)은 각각 명확히 구분된 반면, 혈청형 d, e인 표준균주는 서로 유사한 양상을 보인 *Alaluuusua* 등³⁷과 *Saarella* 등³⁸의 보고와 비교된다.

한편 DiRienzo 등³⁹과 DiRienzo & Slots³⁰의

보고에서는 혈청형 a와 c 뿐만 아니라 동일한 혈청형 b인 표준균주 Y4, JP2와 ATCC 29524 모두 각각 특징적인 hybridization 양상을 보였으나, 본 연구에서는 혈청형 a, b, c에 해당하는 표준균주를 각각 한 가지씩 사용하였으므로 동일 혈청형의 여러 표준균주에 대한 지문양상을 관찰하지는 못하였다.

그러나, 이들 다섯 가지 유전자형을 기초로 하여 임상 검출균주 총 54개에 대해 혈청형 분포와의 상호 연관성을 살펴 보았을 때, 각각 혈청형 a, b, c가 유전자형 A, B, C에 상응하는 빈도가 높게 나타났다. 이러한 결과는 133개 검출균주의 혈청형과 유전자형의 연관성을 찾을 수 없었다는 DiRienzo & Slots³⁰⁾의 의견과 비교된다. 혈청형이 a, b, c 어느 것에도 속하지 않는 미결정형이 54개의 균주 중 16개였으며, 이들 중 9개가 유전자형 D를 보였고 3개가 E형으로 나타났다. 미결정형을 혈청형 d, e와 분류되지 않는(untypable) 형으로 본다면, 유전자형 D, E의 빈도가 높은 것과의 상호 연관성을 추정해 볼 수 있을 것이다. 그러나, 이들 미결정형 중 두 균주가 각각 유전자형 B와 C로 나타났으며, 혈청형 a의 경우 중 한 균주에서 C형의 지문양상이 나타나기도 하였다. 유전자형 A-E에 속하지 않는 기타형도 일곱 균주에서 인지되었다. 그러므로, 혈청형이 결정되지 않은 균주에 대한 유전자 지문형태의 판별이 추가되어야 할 것이다.

Zambon²⁹⁾은 미국의 국소 유년형 치주염 환자에서 A. a. 혈청형 a와 c보다 혈청형 b가 더 빈번히 나타났다고 하였다. Asikainen³⁰⁾은 핀란드의 치주염 환자에서 혈청형 b가 우세하고, 건강한 개체에서는 혈청형 c가 우세함을 보고하였다. 반면, Chung²²⁾의 보고에 따르면, 한국의 국소 유년형 치주염 환자에서는 혈청형 a, b, c가 거의 동일한 분포를 보여 A. a. 혈청형에 대한 특이성이 낮게 나타났다. 본 연구에서는 임상 검출균주의 혈청형은 c형이 가장 높은 빈도를 보였으며, 미결정형, a형, 그리고 b형의 순으로 나타났다. 여기서는 치주질환의 양상이나 심도와의 관련성은 살펴보지 않았으며, 이후 이러한 관점에서의 고찰이 필

요할 것이다.

개체별 혈청형의 분포를 살펴보았을 때, 21명의 개체 중 2명에서 혈청형 a와 c, 1명에서 b와 c가 나타났다. 이는 동일 개체내 두 가지 혈청형이 존재할 수 있음을 보고한 Chung²²⁾의 연구를 뒷받침해 준다. 핀란드인 91명을 대상으로 한 Saarela²⁴⁾의 연구에서 한 가지의 혈청형을 가진 경우가 86명으로 95%에 달했고, 이 중 혈청형 a, b, c에 해당하는 경우가 80명으로 91%였다. 본 실험은 혈청형의 분류를 a, b, c형에 대해서만 시행하였음에도 불구하고 두 가지 혈청형을 가진 빈도가 상대적으로 높으며, 혈청형 a, b, c에 해당하는 균주의 비율은 약 70%로 비교적 낮게 나타났다.

동일 개체내 두 가지 혈청형을 보인 대상자들은 유전자형도 각각 두 가지가 인지되었다. 이러한 결과는, 혈청형을 밝히지는 않았으나 연구대상 12명 중 3명에서 동일개체내 두 가지 유전자형을 보고한 DiRienzo & Slots³⁰⁾의 연구와 상응한다. 그러나, 동일 개체내 두 가지 유전자형(ribotypes)이 발견되었을 때 이들이 항상 서로 다른 혈청형을 보였다고 한 Saarela²⁴⁾의 결과와는 달리, c형의 혈청형을 가지는 한 개체에서 C와 NT형의 지문형태가 인지되었다.

이것은 또한, 혈청형보다 유전자형이 더 다양할 수 있음을 보여준다 하겠다.

Saarela²⁴⁾은 rRNA 유전자 표지자를 사용한 hybridization법에 근거하여, 혈청형에 상관없이 서로 다른 개체에서는 상이한 유전자형을 얻었으며, 이러한 유전자형에 근거하여서는 유사한 유전자군으로 분류하여 치주질환의 상태와 유전자형의 관계를 알아보는 곤란하였다. 반면, DiRienzo & Slots³⁰⁾은 133개의 임상 검출균주를 6개의 4.7kb DNA 표지자를 사용한 제한절편장 다변화 형태로 분류하였으며, 치주적으로 건강한 상태에서 치주염으로 이행된 부위에 근거하여 A. a. 균주 JP2에 해당하는 B형이 특히 독성을 지닌다고 제안하였다. 본 연구에서도 DNA-DNA hybridization법으로 얻은, 혈청형에 따라 상이한 유전자 지문형태를 분류함으로써 치주질환의 심도 및 활성도에 관한 연구의 근간자료를 활용할 수 있을 것으로

사료된다.

V. 결 론

본 연구에 사용된 4.7kb의 유전자 표지자를 이용하여 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 표준 혈청형 a, b, c(ATCC)와 d, e (Univ. of Helsinki)의 유전자형이 서로 상이하게 판별되었고, 이를 기초로 하여 임상 검출균주 총 54개의 유전자형별 및 혈청형별 분류와 상호연관성을 파악하였다. 혈청형의 분포는 c, nd, a, b의 순으로 빈도가 높게 나타났다. 유전자형별로는 C, D, NT, A, B, E의 순으로 빈도가 높게 나타났다. 동일 혈청형이 상이한 유전자형을 가진 경우가 혈청형 b를 제외한 a, c, nd의 경우에서 나타나 동일 혈청형도 이종의 유전자형을 보임이 입증되었고, 동일 개체내에 두 가지 이상의 유전자형을 가진 세균이 출현하는 경우가 피검자 총 21명 중 4명에서 나타남으로써 동일 개체내에 상이한 유전자형을 가진 세균이 나타남을 입증할 수 있다.

참고문헌

1. Zambon, J. J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. J. Clin. Periodontol., 12 : 1-20, 1985.
2. Zambon, J. J., Slots, J. and Genco, R. J. : Serology of Oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal diseases. Infect. Immun., 41 : 19-27, 1983.
3. Mandell, R. L. : A longitudinal microbiological investigation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Eikenella corrodens* in juvenile periodontitis. Infect. Immun., 45 : 778-780, 1984.
4. Genco, R. J., Zambon, J. J. and Christerson, L. A. : The role of specific bacteria in periodontal diseases ; the origin of periodontal infections. Adv. Dent. Res., 2 :

- 245-259, 1988.
5. Kornman, K. S., and Robertson, P. B. : Clinical and microbiological evaluation of therapy for juvenile periodontitis. J. Periodontol., 56 : 443-446, 1985.
6. Mandell, R. L., Ebersole, J. L. and Socransky, S. S. : Clinical immunologic and microbiologic features of active disease sites in juvenile periodontitis. J. Clin. Periodontol., 14 : 534-540, 1987.
7. Slots, J., Reynolds, H. S. and Genco, R. J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease ; a cross-sectional microbiological investigation. Infect. Immun., 29 : 1013-1020, 1980.
8. Bragd, L., Dahlen, G., Wikstrom, M. and Slots, J. : The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedia* to indicate progressive periodontitis ; a retrospective study. J. Clin. Periodontol., 14 : 95-99, 1987.
9. Slots, J. and Listgarten, M. A. : *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedia*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 15 : 85-93, 1988.
10. Slots J. : Bacterial specificity in adult periodontitis ; a summary of recent work. J. Clin. Periodontol., 13 : 912-920, 1986.
11. Ebersole, J. L., Cappelli, D. and Sandovl, M. N. : Subgingival distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis. J. Clin. Periodontol., 21 : 65-75, 1994.
12. Eisenmann, A. A. C., Eisenmann, R., Sousa, O. and Slots, J. : Microbiological study of localized juvenile periodontitis in Panama. J. Periodontol., 54 : 712-713, 1983.
13. Asikainen, S., Alaluusua, S., Kari, K. and Kleenmola - Kujala, E. : Subgingival mic-

- roflora and periodontal conditions in healthy teenagers. J. Periodontol., 57 : 505–509, 1986.
14. Alaluusua, S. and Asikainen, S. : Detection and distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the primary dentition. J. Periodontol., 59 : 504–507, 1988.
 15. Asikainen, S., Alaluusua, S. and Kleenmola - Kujala, E. : A 2 - year follow - up on the clinical and microbiological condition of periodontium in teenagers. J. Periodontol., 18 : 16–19, 1991.
 16. Kilian, M, and Schiott, C. R. : *Haemophili* and related bacteria in human oral cavity. Arch. Oral. Biol., 20 : 791–796, 1975.
 17. McArthur, W. P., Stroup, S. and Wilson, L. : Detection serotyping of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates on nitrocellulose paper blots with monoclonal antibodies. J. Clin. Periodontol., 13 : 684–691, 1986.
 18. Ebersole, J. L., Sandoval, M. N., Steffen, M. J. and Cappelli, D. : Serum antibodies in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infected patients with periodontal diseases. Infect. Immun., 59 : 1795–1802, 1991.
 19. Asikainen, S., Lai, C. - H., Alaluusua, S. and Slots, J. : Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. Oral. Microbiol. Immunol., 6 : 115–118, 1991.
 20. Alaluusua, S., Asikainen, S. and Lai, C. H. : Intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Periodontol., 62 : 207–210, 1991.
 21. Tsai, C. C. and Taichman, N. S. : Dynamics of infection by leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in juvenile periodontitis. J. Clin. Periodontol., 13 : 330–331, 1986.
 22. Chung, H. - J., Chung, C. - P., Son, S. - H. and Nisengard, R. J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and leukotoxicity in Korean localized juvenile periodontitis. J. Periodontol., 60 : 506–511, 1989.
 23. Asikainen, S., Saarela, M., Alaluusua, S., Pyhala, L., Lai, C. - H. and Jousimies - Somer, H. : Infection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, b, c, d, or e. J. Dent. Res. 71 : 884, 1992.
 24. Saarela, M., Asikainen, S., Alaluusua, S., Pyhala, L., Lai, C. - H and Jousimies - Somers, H. : Frequency and stability of memo - or polyinfection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, b, c, d or e. Oral Microbiol. Immunol., 7 : 277–279, 1992.
 25. Zambon, J. J., Christeresson, L. A. and Slots, J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases ; prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. J. Periodontol., 54 : 707–711, 1983.
 26. Saarela, M., Asikainen, S., Jousimies - Somer, H., Asikainen, T., von Troil - Linden, B. and Alaluusua, S. : Hybridization patterns of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a - e detected with an rRNA gene probe. Oral Microbiol. Immunol., 8 : 111–115, 1993.
 27. Genco, R. J. and Loos, B. G. : The use of genomic DNA fingerprinting in studies of the epidemiology of bacteria in periodontitis. J. Clin. Periodontol., 18 : 396–405, 1991.
 28. Zambon, J. J., Sunday, G. J. and Smutko, J. S. : Molecular genetic analysis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* epidemiology. J. Periodontol. 61 : 75–80, 1990.
 29. DiRienzo, J. M., Cornell, S., Kazoroski, L. and Slots, J. : Probe - specific DNA finge-

- rprinting applied to the epidemiology of localized juvenile periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.* 5 : 49–56, 1990.
30. DiRienzo, J. M. and Slots, J. : Genetic approach to the study of epidemiology and pathogenesis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis. *Arch. Oral. Biol.* 35 : 79S - 84S, 1990.
 31. Stull, T. L., LiPuma, J. J. and Edlind, T. D. : A broad - spectrum probe for epidemiology of bacteria ; ribosomal RNA. *J. Infect. Dis.* 157 : 280–286, 1988.
 32. Petit, M. D. A., Van Steenberg, T. J. M., De Graaff, J. and Van der Velden, U. : Transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families of adult periodontitis patients. *J. Periodont. Res.* 28 : 335–345, 1993.
 33. Syed, S. A. and Loesche, W. J. : Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl. Microbiol.* 24 : 638–644, 1972.
 34. Slots, S. : Selective medium for the isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Clin. Microbiol.*, 15 : 606–609, 1982.
 35. Hanahan, D. : Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166 : 557–580, 1983.
 36. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. : *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor, New York (1989).
 37. Alaluusua, S., Saarela, M., Jousimies - Sommer, H. and Asikainen, S. : Ribotyping shows intrafamilial similarity in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains. *Oral Microbiol. Immunol.* 8 : 225–229, 1993.

— Abstract —

**DNA FINGERPRINTING AND SEROTYPING OF
ACTINOBACILLUS ACTINOMYCETEMCOMITANS
ISOLATED FROM PERIODONTAL PATIENTS**

Kyung - Kee Heo, Sung-Jo Kim, Jeom-II Choi

Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Pusan National University.

54 clinical isolates of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* showed distinct hybridization pattern (DNA fingerprinting patterns) when the bacterial DNA were hybridized with randomly cloned 4.7 - kb DNA probe. The frequency of the genotypic distribution demonstrated that type C was the most prevalent genotype, the next being D, NT, A, B, and E in the descending order. The most prevalent serotype was serotype c, the next being a, nd, and b in the descending order.

It was noted that the one serotype can represent more than two different genotypes and that multiple genotypic variants can also exist in the periodontal pockets within the same subject.