

*Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 혈청형별 제한질편장 다변화에 관한 연구

최점일* · 고명연** · 윤일*

부산대학교 치과대학 치주과*, 구강내과**, 치과약리학교실*

I. 서론

치주질환은 구강내의 치주독성세균의 감염에 의해 발생하고 진행된다. 이러한 치주독성세균의 특이성감염가설은 몇 가지 대표적인 치주세균을 중심으로 발달해 왔다. 이 중의 하나인 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.)는 비운동성, 그람 음성, 호이산화탄소성 구강균으로서, 다양한 형태의 치주질환에 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 구강 세균총에 속한다고 제안되기도 하였다¹⁶⁾.

A.a.균주는 세 가지 혈청형(serotypes)을 가지고 있으며^{2, 17, 18)}, 일반적으로 혈청형 b인 균주가 국소 유년형 치주염 환자에서 가장 빈번히 나타났다.^{2, 17-20)} Tsai & Taichman은 성인 환자에서 혈청형 c가 우세하다고 제시하였다²¹⁾. Zambon 등은 개체당 한 가지의 혈청형만을 발견하였는데²⁾, 동일한 방법을 사용하여 Chung 등은 유년형 치주염을 가진 환자 12명

중 3명에서 두 가지 다른 혈청형을 발견하였다²²⁾. 한편, Asikainen 등은 부가적으로 d와 e의 두가지 혈청형을 보고하였다²³⁾. 91명의 핀란드인을 대상으로 한 Saarela 등의 연구에서, 혈청형 d 또는 e가 검출균주의 6%, 대상자의 10%에서 발견되었다. 또한, 이들은 대상자의 95%에서 한 가지의 혈청형만 발견되었으며, 다양한 A.a. 혈청형의 동시적 발현은 드물다고 하였다²⁴⁾. Zambon 등은 A.a.의 혈청형과 생형(biotypes)의 결정에 근거하여, 유년형 치주염으로 고생하는 구성원을 가진 가족내에서 이 미생물의 가족내 전파를 제안하였다²⁵⁾. 국소 유년형 치주염이 아닌 가족내 구성원들 사이의 전파도 Alaluusua에 의해 제시되었다²⁰⁾. 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 분리체(isolate)들을 식별하기 위해 더 많은 정보를 제공해 주며²⁶⁾, DNA fingerprinting과 같은 현대적인 분자생물학적 기술을 이용한 악안면구강 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 방지하는데 상당히 유용할 것이다²⁷⁾.

Zambon 등은 제한효소 분석법(REA : Restriction Endonuclease Analysis)를 통해 얻은 DNA 절편의 양상과 세 가지 주요 제한형태군으로 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 보고하였다²⁸⁾. 그러나 이 방법은 분석할 절편(fragments)의 수가 많아서 육안으로 판별하기가 어렵고²⁶⁾ 유전적 다양성이 제한적으로 나타났다²⁸⁾. 한편, 적절한 표지자(probe)로 염색체 DNA(chromosomal DNA)를 잡종형성하므로써, 인지되는 절편의 수를 줄이고 감도(sensitivity)와 재생능(reproducibility)을 향상시킬 수 있다²⁹⁻³¹⁾. DiRienzo 등은 Southern blot analysis와 4.7kb 표지자를 이용한 hybridization으로 동일한 혈청형이나 생형을 보이는 여러 A.a. 표준균주에서 독특한 hybridization 형태를 얻었다. 임상 검출균주에 적용하여 동일한 개체나 한 가족내 다른 구성원에서 유사한 형태를 얻었으며, 동일 개체내 두 가지 다른 형태의 존재도 관찰하였다. 따라서, 이 방법이 가족내 A.a.의 전파를 연구하는 데 적용 가능성을 제시하였다²⁹⁾.

동일한 방법으로 DiRienzo & Slots(1990)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 없었다³⁰⁾. 한편, Saarela 등은 rRNA gene probe를 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 못하였다²⁶⁾.

본 연구의 목적은 3가지의 *A.actinomycescomitans* ATCC 표준균주 혈청형 a, b, c와 기타 혈청형 d, e(University of Helsinki)에 대한 유전자형을 표지자를 이용한 DNA fingerprinting 법으로 판별할 수 있는지 여부를 규명하고자 시행하였다.

1. 세균의 배양

본 실험에 사용된 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, 임상 검출균주와 같은 조건에서 배양하였다. *Escherichia coli* strain DH5a의 배양을 위해 완전배지는 Luria-Bertani(LB)를 사용하였고, 특별한 경우가 아닐 때는 모든 세균의 배양은 37°C에서 행하였다. 항생제는 선별배지에 따라 ampicillin(50µg/ml), tetracyclin(25µg/ml)등을 첨가하여 사용하였다. plasmid는 4.7 kb randomly clone probe를 포함하고 있는 pAA2097(Dr. DiRienzo, University of Pennsylvania : 그림 1)를 사용하였다.

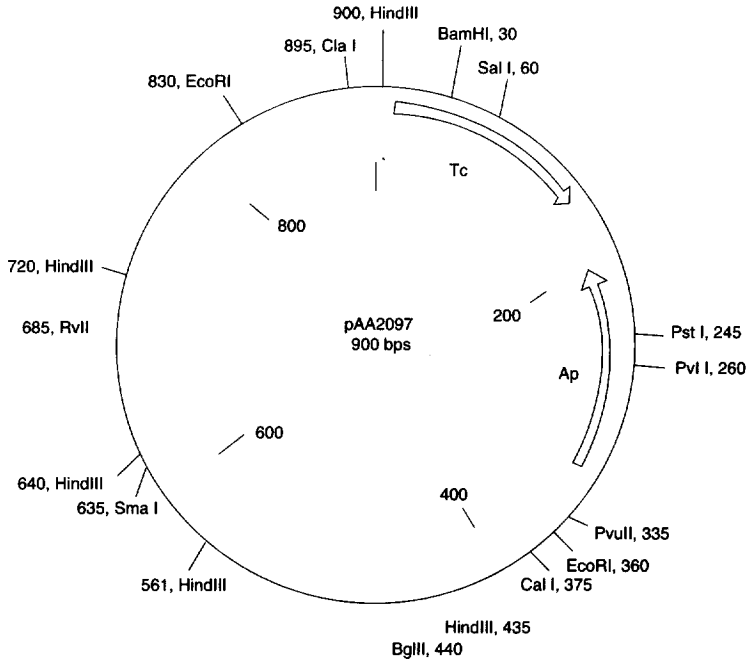


그림 1. DNA restriction map of plasmid pAA2097 containing 1.6kd-sized probe used in the present study.

2. Genotyping(유전자형의 결정)

① Transformation

표지자로 사용할 plasmid pAA2097은 Dr.DiRienzo (Univ. of Pennsylvania)가 기준한 것으로 host E. coli DH5 α 에 도입해 증폭하여 사용하였다. Competent cell과 DNA의 도입은 Hanahan(1983)의 방법에 따라 수행하였다³⁵⁾.

Host strain을 37°C에서 $5 \times 10^7 - 2 \times 10^8$ cells/ml되게 진탕 배양한 후, 배양액을 얼음속에서 10분간 냉각하고 냉동원심분리기에서 4°C에서 5,000rpm으로 10분간 원심분리하여 집균하였다. 세포침전물에 미리 차게 해둔 멸균된 CaCl₂용액(50mM CaCl₂, 10mM Tris-Cl pH 8.0)을 원래 배양액 부피 1/5정도로 첨가한 다음, 세포를 현탁시켜 얼음속에 15분 동안 두었다가 5,000rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고 미리 차게 해둔 CaCl₂용액으로 원래 부피의 1/5되게 현탁시킨 후,

차게 해둔 effendorf tube에 competent cell 0.2ml씩 분주하여 사용하였다.

Competent cell 0.2ml과 plasmid DNA solution 0.1ml를 혼합하여 0°C에서 60분간 방치한 후, 2분간 42°C에서 열충격을 가하고 LB 배지를 0.8ml씩 각 반응물에 첨가하여 37°C에서 1시간동안 흔들지 않고 배양하였다. 이 배양액을 선택배지 tetracyclin과 ampicillin이 첨가된 LB agar plate에 적당히 희석시켜 도말하고 37°C에서 하룻 밤 배양하여 집락을 확인하였다.

② Plasmid DNA의 분리 및 정제

Plasmid DNA의 분리와 정제를 위해, small scale DNA 분리와 large scale DNA 분리방법은 Maniatis 등(1989)의 방법을 사용하였다³⁶⁾. 즉 항생제를 포함하는 LB medium 5ml에 균을 접종하여 37°C에 하룻밤 배양한 후, 이 배양액을 LB medium 500ml에 1:100으로 접종하

여 하룻밤 동안 배양하였다. 이 배양액을 4°C, 5,000rpm(한일 H50A-6, Rotor 10BN6)에서 10분동안 원심분리하여 균체를 회수하고, STE buffer(pH 8.0)로 1회 세척하였다. 세척된 균체에 lysozyme(50mg/ml)을 포함하는 solution I 10ml에 균체를 현탁시키고 상온에 5분간 방치하였다. 이 혼합액에 solution II 20ml를 첨가하고 tube의 입구를 밀봉한 후 부드럽게 여러번 뒤집고 10분간 얼음속에 방치하였다. Solution II를 처리한 혼합액에 얼음속에 냉각된 solution III 15ml를 첨가하여 여러번 빨리 뒤집고 10분동안 얼음속에 담가둔 후 4°C, 15,000rpm(한일 H50A-6, Rotor A10H-24)으로 30분 동안 원심분리하여 cell debris와 염색체 DNA가 제거된 상등액을 상등액 부피의 0.6배량의 isopropanol을 첨가하여 잘 섞은 후 15분동안 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) buffer 8ml에 침전물을 녹이고 CsCl 8g을 넣어 완전히 녹인 후, ethidium bromide solution(EtBr, 10mg/ml in H₂O) 0.8ml을 첨가하였다. CsCl과 EtBr이 첨가된 DNA 용액을 20°C, 55,000rpm으로 20시간 동안 초원심분리(Kontron T-2000)하여 plasmid DNA를 분리하였다. TE-buffer saturated isoamyl alcohol을 사용하여 붉은색이 없어질 때까지 ethidium bromide를 제거하였다. plasmid DNA solution을 dialysis tube에 넣고 TE(pH 8.0) buffer 1L에 dialysis(4°C, 3시간씩 3회 완충액교환)를 하여 CsCl를 제거한 다음 DNA 농도를 측정하여 -20°C에 보관하였다.

③ Agarose gel electrophoresis

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

동안 전기영동을 행하였다.

④ DNA의 절단과 DNA fragment의 회수

여러 가지 제한효소를 사용한 plasmid의 절단은 적당한 digestion buffer에서 37°C, 1시간 동안 수행되었다. 제한효소 처리에 의해 발생하는 DNA 절편은 TAE buffer를 사용한 0.7% agarose gel electrophoresis를 행하여 분석하였다. 제한효소로 절단된 절편은 agarose gel상에서 전기영동한 후 원하는 DNA 절편들을 Gene Clean II KIT로 정제하였으며, 여기에 사용된 모든 시약들은 Gene Clean II kit에 포함되어 있거나 제조회사의 지시대로 만들어 사용하였다. 그 방법은 다음과 같았다.

TAE buffer를 사용한 gel electrophoresis를 통해 전개된 DNA bands중에서 원하는 DNA fragment가 위치한 band를 UV transilluminater상에서 찾아 수술용 칼로 정확하게 자른 뒤 eppendorf tube에 담았다. 여기에 gel 조각의 3배량의 6M sodium iodide가 포함된 NaI stock solution을 첨가하여 solution내의 sodium iodide의 최종농도가 3M이 되도록 하였다. 이것을 45~55°C water bath에 옮겨 DNA 절편이 들어있는 gel을 녹였다. 사용 전에 잘 현탁된 Glassmilk를 5μl 첨가하여 5~10분간 ice-cold 시켰다. 이때 DNA는 Glassmilk 입자에 결합하게 되는데, 이것을 12,000g에서 5초간 원심분리시켜 DNA가 결합되어 있는 Glassmilk 입자를 침전시켰다. 상층액을 버리고 난 후, ice-cold된 NEW WASH solution 700μl정도로 3회 세척하였다. NEW WASH solution에 들어있던 ethanol성분이 모두 기화하고 난 후, TE buffer나 멸균수를 10μl정도 첨가하여 45~55°C water bath에서 5~10분간 방치하여 Glassmilk 입자로부터 DNA를 분리하였다. 12,000g에서 30초간 원심분리한 후, DNA가 용출되어 있는 상층액을 새로운 eppendorf tube에 옮겨 -20°C에 보관하여 다음 실험에 사용하였다.

⑤ A.a. genomic DNA의 분리

세포의 genomic DNA분리는 Zambon 등(1990)의 방법²⁸⁾을 변형하여 사용하였다.

고체배지에서 자란 세균의 colony를 면봉을 사용하여 집균한 후 STE buffer 1ml에 현탁하고 2분 동안 microcentrifuge(Fisher Scientific사, MODEL 235C USA)에서 원심분리하여 상등액을 버리고 TE 475 μ 에 현탁한 후 lysozyme(10mg/ml) 25 μ 를 첨가하여 얼음속에 30분 동안 방치하였다. 이 현탁액에 STEP buffer 90ml와 RNase(10mg/ml) 5ml를 첨가하여, 37°C에서 15분간 반응시킨 후, Proteinase K(20mg/ml) 5 μ 를 첨가하고 55°C에서 60분간 반응시켰다. 위 반응액과 동량의 Phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25 : 24 : 1, pH 8.0)액 600 μ 를 넣어 잘 혼합하여 5분동안 microcentrifuge에서 원심분리하여 상등액을 취하고 동량의 chloroform-isoamyl alcohol 600 μ 를 첨가하여 혼합한 후 5분동안 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이 상등액에 3M sodium acetate 60 μ 와 isopropanol 600 μ 를 첨가하여 상온에서 10분간 방치한 후 10분동안 원심분리하여 DNA를 침전시키고, 70% ethanol로 한번 세척한 후 상온에서 잔존하는 ethanol이 완전히 제거될 때까지 건조하여 TE 50 μ 에 DNA를 녹였다. 이 DNA용액을 spectrophotometer로 양을 측정하고 후, -20°C에서 보관하여 다음 실험에 사용하였다.

⑥ Southern Blotting와 hybridization

a. Hybridization probe의 준비

A.a. 균주들의 genomic DNA상에서 균주간 DNA fingerprinting을 위하여 사용된 hybridization probe는 plasmid pAA2097에서 제한효소 EcoR I 과 Sal I 으로 절단된 약 4.7kb DNA 단편을 agarose 전기영동상에서 분리하여 Gene Clean II kit로 회수하여 사용하였다.

b. A.a. genomic DNA의 transfer

각 제한효소에 절단된 A.a. genomic DNA는 0.8% agarose gel로 3시간 동안 전기영동하였다. Agarose gel에 분리된 DNA 절편을 변성시켜 Nyron filter(Bio-Rad사 USA)에 흡착, 고정하는 방법은 Maniatis 등(1989)의 방법³⁰⁾을 변형하여 행하였다. Filter에 흡착시키는 방법은 capillary transfer를 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 그릇위의 3MM filter paper위에 거꾸로 놓은 후 미리 10X SSC에 포화된 Nylon filter를 gel 위에 놓고 그 위에 3MM filter paper 두장과 paper towel(Kim towel type 50)을 15cm 정도 되게 하여 약 0.5~1Kg 정도의 물체를 올려 놓고 overnight시켰다. Nylon filter가 gel로부터 분리되어 2X SSC에서 간단히 세척한 후 paper towel에서 습기를 제거하고 80°C의 vacuum-dry oven에서 2시간 동안 구워 고정하였다.

c. Southern hybridization

Genomic DNA fingerprint 분석을 하기 위해 사용한 Southern hybridization은 nonradioactive labeling system인 Enhanced Chemiluminescence(ECL) Kit(Amersham Co. USA)를 사용하였다.

표지자로 쓸 DNA를 증류수로 100ng/10 μ 되게 희석하였다. 이 DNA 용액을 끓는 물에 5분간 담가둔 후 얼음속에서 5분 동안 방치하고 5초간 원심분리하였다. DNA solution과 동량의 DNA labeling agent를 첨가하여 잘 혼합한 후 동량의 glutaraldehyde solution를 가하여 1초간 vortexing하여 37°C에서 10분간 반응시켜 즉시 사용하였다.

Hybridization bag에 DNA blot된 Nyron filter를 넣고 filter의 면적(0.25ml/cm)에 따라

pre-hybridization solution 양을 첨가한 후 42°C의 water bath에서 약하게 진탕하면서 1시간 동안 prehybridization을 하였다.

Hybridization bag에 labeled probe를 첨가하여 12~14시간동안 42°C에서 진탕하면서 hybridization을 수행하였다. 반응이 끝난 filter를 깨끗한 용기에 옮겨 primary wash buffer(2ml/cm)로 20분간 2회 반복하여 세척하고, 상온에서 secondary wash buffer(2ml/cm)로 5분간 두번 세척하였다. 이 filter를 3MM paper 위에서 1분간 건조한 후 filter면적(0.125ml/cm)에 따라 최종 부피에 맞게 동량의 detection 1과 2를 혼합하여 filter위에 붓고 1분간 반응시켰다. 반응액을 제거한 다음 filter를 wrap으로 싸 뒤, 암실에서 intensifying screen이 있는 cassette에서 hyper film-ECL(PRN2103)에 장착하여 1~15분 동안 방치한 후 현상하였다. 여기에서 사용한 반응 system 용액은 구입회사의 지시에 따라 filter의 면적에 비례하여 사용하였다.

III. 결 과

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

Hybridization에 표지자로 사용된 4.7Kb 유전자 절편에 의해 인지된 유전자 지문양태는 실험된 5가지의 혈청형 별로 서로 다르게 인지되어 나타났다. 표준균주 혈청형 a(ATCC29523)는 제한절편의 각각 23.1Kb와 2.5Kb에서 각각 hybridization이 되었고, 혈청형 b의 경우 6.6Kb에서, 혈청형 c는 9.5Kb에서, 혈청형 d는 23.1Kb와 2.8Kb, 혈청형 e는 23.7Kb와 2.1Kb에서 각각 hybridization 되었다(그림 2). 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.

그림 2. DNA fingerprinting patterns of 5 serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* hybridized with the 4.7-kb probe

IV. 총괄 및 고안

치주질환의 병인에 있어 중요한 특이 미생물 중 A.a.는 국소 유년형 치주염이나 급속 진행형 및 난치성 치주염의 원인으로 간주되고 있다¹⁻³⁾. 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 세균세포벽의 항원적 특성에 기초를 둔 혈청형의 분류나, 유전자의 표현과는 독립적으로 동일한 세균 종류나 동일한 혈청형의 검출균주들을 식별하는 데 필요한 정보를 더 제공해 줄 수 있는 세균의 genome 분석 등이 도입되었다²⁶⁾.

본 연구에서는 4.7kb 유전자 표지자에 의한 DNA-DNA hybridization법을 사용하여 얻은 유전자 지문형태를 A.a.의 혈청형과 관련하여 분류함으로써 세균의 감염경로와 역학에 기준

자료로 사용하고자 시도되었다. DiRienzo 등(1990)의 연구에 따르면 plasmid, pAA2097은 삽입 DNA 절편의 크기와, A.a. DNA와는 hybridization 될 수 있으나 다양한 형태의 치주질환과 관계가 있다고 여겨지는 다른 구강내 그람-음성 세균과 hybridization 되지 않는 점에 근거하여 선택되었다²⁹⁾. 이 plasmid에 포함된 4.7kb EcoRI 삽입절편을 표지자로 사용하였다.

실험결과 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* 등(1993)³⁷⁾과 Saarela 등(1993)²⁶⁾의 보고와 비교된다.

한편 DiRienzo 등(1990)²⁹⁾과 DiRienzo & Slots(1990)³⁰⁾의 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.

Zambon 등(1990)은 미국의 국소 유년형 치주염 환자에서 A.a. 혈청형 a와 c보다 혈청형 b가 더 빈번히 나타났다고 하였다²⁾. Asikainen 등(1991)은 핀란드의 치주염 환자에서 혈청형 b가 우세하고, 건강한 개체에서는 혈청형 c가 우세함을 보고하였다¹⁹⁾. 반면, Chung 등(1989)의 보고에 따르면, 한국의 국소 유년형 치주염 환자에서는 혈청형 a, b, c가 거의 동일한 분포를 보여 A.a. 혈청형에 대한 특이성 낮게 나타났다²²⁾. 핀란드인 91명을 대상으로 한 Saarela 등(1992)의 연구에서 한 가지의 혈청

형을 가진 경우가 86명으로 95%에 달했고, 이중 혈청형 a, b, c에 해당하는 경우가 80명으로 91%였다²⁴⁾. 동일 개체내 두 가지 유전자형을 보고한 DiRienzo & Slots(1990)³⁰⁾의 연구는 두 가지 유전자형(ribotypes)이 발견되었을 때 이들이 항상 서로 다른 혈청형을 보였다고 한 Saarela 등(1993)²⁶⁾의 결과와는 다르다.

Saarela 등(1993)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 곤란하였다²⁶⁾. 반면, DiRienzo & Slots(1990)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 제안하였다³⁰⁾. 본 연구에서도 DNA-DNA hybridization법으로 얻은, 혈청형에 따라 상이한 유전자 지문형태를 분류함으로써 치주질환의 심도 및 활성도에 관한 연구의 근간자료로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구에 사용된 4.7 Kb의 유전자 표지자를 이용하여 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 표준 혈청형 a, b, c(ATCC)와 d, e(Univ.of Helsinki)에 대한 DNA fingerprinting에 의한 유전자형이 서로 상이하게 판별되었다. 이는 향후 임상검출균주의 유전자형별 및 혈청형별 분류와 상호연관성을 파악하고 치주질환 심도와 연관성을 연구하는 근간자료로 사용될 수 있음을 시사하였다. serotype a의 경우 제한절편장 23.1kb와 2.5kb에서, b는 6.6 kb에서 c는 9.5kb에서, d는 23.1 kb와 2.8 kb에서, 그리고 e는 23.7 kb와 2.1 kb에서 각각 hybridization 양

상을 나타냈다.(본 연구는 부산대학교 및 부산대학교 구강생물공학연구소의 지원에 의해 시행되었기에 감사드립니다.)

참고문헌

1. Zambon JJ : *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* in human periodontal diseases. J Clin Periodontol 12 : 1-20, 1985.
2. Zambon JJ, Slots J, Genco RJ : Serology of Oral *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal diseases. Infect Immun 41 : 19-27, 1983.
3. Mandell RL : A longitudinal microbiological investigation of *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* and *Eikenella corrodens* in juvenile periodontitis. Infect Immun 45 : 778-780, 1984.
4. Genco RJ, Zambon JJ, Christersson LA : The role of specific bacteria in periodontal diseases : the origin of periodontal infections. Adv Dent Res 2 : 245-259, 1988 .
5. Korman KS, Robertson PB : Clinical and microbiological evaluation of therapy for juvenile periodontitis. J Periodontol 56 : 443-446, 1985.
6. Mandell RL, Ebersole JL, Socransky SS : Clinical immunologic and microbiologic features of active disease sites in juvenile periodontitis. J Clin Periodontol 14 : 534-540, 1987.
7. Slots J, Reynolds HS, Genco RJ : *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* in human periodontal diseases : a cross-sectional microbiological investigation. Infect Immun 29 : 1013-1020, 1980.
8. Bragd L, Dahlen G, Wikstrom M, Slots J : The capability of *Actinobacillus actinomycesetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedia* to indicate progressive periodontitis : a retrospective study. J Clin Periodontol 14 : 95-99, 1987.
9. Slots J, Listgarten MA : *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedia*, and *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* in human periodontal diseases. 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 JL, Cappelli D, Sandoval MN : Subgingival distribution of *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* in periodontitis. J Clin Periodontol 21 : 65-75, 1994.
12. Eisenmann AAC, Eisenmann R, Sousa O, Slots J : Microbiological study of localized juvenile periodontitis in Panama. J Periodontol 54: 712-713, 1983.
13. Asikainen S, Alaluusua S, Kari K, Kleenmola-Kujala E : Subgingival microflora and periodontal conditions in healthy teenagers. J Periodontol 57 : 505-509, 1986.
14. Alaluusua S, Asikainen S : Detection and distribution of *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* in the primary dentition. J Periodontol 59: 504-507, 1988.
15. Asikainen S, Alaluusua S, 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, Schiott CR : Haemophili and related bacteria in human oral cavity. Arch Oral Biol 20 : 791-796, 1975.
17. McArthur WP, Stroup S, Wilson L :

- Detection serotyping of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates on nitrocellulose paper blots with monoclonal antibodies. *J Clin Periodontol* 13 : 684-691, 1986.
18. Ebersole JL, Sandoval MN, Steffen MJ, 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, Slots J : Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. *Oral Micro Immunol* 115-118, 1991.
 20. Alaluusua S, Asikainen S, Lai C-H : Intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol* 62 : 207-210, 1991.
 21. Tsai CC, Taichman NS : 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, Nisengard RJ : *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, 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, Jousimies-Somers H : Frequency and stability of mono- or polyinfection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, b, c, d or e. *Oral Micro Immunol* 7 : 277-279, 1992.
 25. Zambon JJ, Christersson LA, 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, Alaluusua S : Hybridization patterns of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a-e detected with an rRNA gene probe. *Oral Micro Immunol* 8 : 111-115, 1993.
 27. Genco RJ, Loos BG: The use of genomic DNA fingerprinting in studies of the epidemiology of bacteria in periodontitis. *J Clin Periodontol* 18 : 396-405, 1991.
 28. Zambon JJ, Sunday GJ, Smutko JS : Molecular genetic analysis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* epidemiology. *J Periodontol* 61 : 75-80, 1990.
 29. DiRienzo JM, Cornell S, Kazoroski L, Slots J : Probe-specific DNA fingerprinting applied to the epidemiology of localized juvenile periodontitis. *Oral Micro Immunol* 5 : 49-56, 1990.
 30. DiRienzo JM, 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 TL, LiPuma JJ, Edlind TD : A broad-spectrum probe for epidemiology of bacteria : ribosomal RNA. *J Infect Dis* 157: 280-286, 1988.
 32. Petit MDA, Van Steenberg TJM, De Graaff J, Van der Velden U : Transmission of *Actinobacillus actinomy-*

- actinomyces* in families of adult periodontitis patients. J Periodont Res 28 : 335-345, 1993.
33. Syed SA, Loesche WJ : 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 EF, Sambrook J : Molecular cloning. Cold Spring Harbor. New York.(1989)
37. Alaluusua S, Saarela M, Jousimies-Somer H, Asikainen S : Ribotyping shows intrafamilial similarity in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains. Oral Microbiol Immunol 8 : 225-229, 1993.

**DNA fingerprinting patterns of 5 serotypes of
*Actinobacillus actinomycetemcomitans***

Jeom-Il Choi*, Myung-Yun Koh**, Il Yun*
Departments of Periodontology*, Oral Medicine**,
Dental Pharmacology and Biophysics*
School of Dentistry Pusan National University

5 serotypes(a, b, c, d, e) of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* showed distinct hybridization patterns(DNA fingerprinting patterns) when the bacterial DNA were hybridized with randomly cloned 4.7-Kb sized DNA probe. The sizes of hybridized bands in each serotypes were different among serotypes and represented unique patterns of hybridization with the probe used. The serotype a showed two bands of fingerprinting patterns: 23.1 kb and 2.5 kb respectively. Serotype b and c showed single band: 6.6 kb and 9.5 kb, respectively. Serotype d and e showed two bands of hybridization: 23.1 kb and 2.8 kb, and 23.7 kb and 2.1 kb, respectively.

The results indicate that this standard fingerprinting patterns of DNA hybridization with 4.7 kb probe can be further used for genotyping clinical isolates of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and its relevance with periodontal disease activity.