

## AP-PCR을 이용한 다발성 우식아동의 구강내 *Streptococcus mutans*의 유전자형 분류

부산대학교 치과대학 소아치과학교실

장명조 · 김 신

### Abstract

#### GENOTYPING OF STREPTOCOCCUS MUTANS USING AP-PCR IN CHILDREN WITH RAMPANT CARIES

Myungjo Jang, Shin Kim

*Department of Pediatric Dentistry, College of Dentistry, Pusan National University*

For the purpose of evaluating the appropriateness of AP-PCR as a facile, rapid and reproducible method for genotyping *Streptococcus mutans*, and selecting the discriminant primer for it, a DNA fingerprinting was performed on the microorganisms isolated from caries-free children and children with rampant caries, respectively. In the course of selecting appropriate primer for *S. mutans* genotyping, we chose S2 primer from 6 different primers which shows highest resolution on the agarose gel as well. Nineteen kinds of fingerprint patterns were observed in caries-free children and children with rampant caries which were produced by combination of 7 different fragments. Interestingly, the number of types observed in caries-free children was greater than that in children with rampant caries. And we observed Type 2 was predominant in children with rampant caries (about 80 %) and relatively even distribution of each types in caries-free children. Furthermore, it was appeared that the major types in normal control were not or rarely found in children with rampant caries. In conclusion, we could establish simple, rapid and highly reproducible AP-PCR method for genotyping *S. mutans*. We also found differences in distribution of *S. mutans* between normal and patient, which suggested that cariogenicity is also dependent on qualitative aspects which is caused by the difference in genotypes of *S. mutans* in oral cavity.

## I. 서 론

치아우식증은 인류에 있어 가장 흔한 세균성 감염질환의 일종이며<sup>1)</sup>, 이 질환의 원인균으로는 *Streptococcus mutans* (이하 *S. mutans*)가 주된 역할을 하는 것으로 밝혀진 바 있다. 비록 선진국가들에서는 과거에 비하여 치아우식증의 발생률이 감소하였음에도 불구하고 개발도상국이나 후진국에서는 이러한 현상이 나타나지 않고 있어 아직도 전 세계 인구의 20 %가 우식병소로 고통을 받고 있는 것으로 보고되고 있다<sup>2)</sup>. 이와 함께, 과거에 비하여 더 많은 치아가 잔존하게 됨에 따라 성인에 있어서의 치근면우식이 주요한 문제로 부각되었음은 당연한 일로 보인다.

치아우식의 발생률이 지속적으로 감소하는 요즘 치아우식을 더욱 감소시키기 위한 좀더 합리적인 방법이라면, 전체인구를 대상으로 추가적인 예방법을 적용하기 보다는 우식에 취약한 개인들을 인지해 내는 것이라 할 수 있다. 우식감수성에는 여러가지의 요소들이 관여하나, 미생물적 요인중에서 지금까지는 타액내의 *S. mutans*의 양이 우식위험도가 높은 개인을 인지하는 기본으로 알려져 왔다<sup>3)</sup>. 그러나 *S. mutans*나 *Actinomyces* 등<sup>3)</sup>의 구강내 주요세균들은 각각 1 개의 조상으로부터 파생된 dynasty, 즉 수많은 clone의 clonal population structure를 이루며, 이러한 사실은 ribotyping 등의 typing method에 의해 밝혀진 바 있다<sup>4)</sup>. 동일 개체내에 상주하더라도 각각의 clonal line들은 유전적으로 약간씩 상이하므로, 생리적이거나 구조적으로 상이한 성질을 가지게 되며, 따라서 특정생태계에 대한 적응성이나 친화성, 그리고 독성도 약간씩 다르게 나타남이 밝혀졌다<sup>5-6)</sup>. 따라서, 우식병원균인 *S. mutans*의 경우에도 strain이나 clonal line에 따라 독성이나 친화력, 산 생성능, 부착능 등에 있어 상당한 차이를 보일 수 있기 때문에<sup>7-9)</sup> 종래의 세균의 양적 개념으로 우식위험도를 파악해 온 고정관념을 재검토해 볼 필요가 있을 것으로 생각되었다.

역학과 생태학의 분야에 있어서 세균의 spe-

cies와 strain을 정확히 동정하는 것은 매우 중요한 일이다. 세균의 신속한 동정과 분류작업은 그 형태학적 특성, 영양요구량, 항생제에 대한 저항성, isoenzyme comparison, phage sensitivity<sup>10-11)</sup>, 그리고 최근에 들어서는 DNA-based methods, 특히 DNA와 rRNA sequence<sup>12)</sup>, strain-specific fluorescent oligonucleotides<sup>13-14)</sup>, polymerase chain reaction 등이 있으며<sup>15-17)</sup>, 이 각각의 방법은 나름대로의 특이한 효용성과 장점을 가지고 있다.

*S. mutans*를 대상으로는 생물학적 특성<sup>18-19)</sup>, 혈청형<sup>20)</sup>, 면역학적 특성<sup>21-22)</sup>, bacteriocin typing<sup>23)</sup> 등의 방법들이 적용되었으나, 감염경로를 정밀하게 규명하기에는 감수성, 재현성 및 특이성에 문제가 있음이 지적되었다<sup>24)</sup>. 1970년대에 들어 유전자조작기법이 소개되고, 1980년대에는 *S. mutans*에 대한 분자유전학적 연구가 처음으로 보고된 이래<sup>25)</sup>, plasmid DNA<sup>26)</sup> 및 chromosomal DNA<sup>27-29)</sup>에 대한 제한효소분석법 (Restriction Endonuclease Analysis, REA), 그리고 DNA 표지자<sup>30-32)</sup>에 의한 유전자지문형감식법(DNA fingerprinting) 등의 기법들이 소개되어 기존의 문제점들을 극복하고 유전학적인 동일성을 규명할 가능성이 제시되었다.

그중 DNA 표지자(probe)에 의한 방법들은 *S. mutans*를 식별하여 임상시료내의 병원균을 신속히 정량 혹은 동정하는데 유용한 방법이 지만<sup>33-34)</sup>, 분석을 위해서 10 $\mu$ g 이상의 비교적 많은 양의 DNA 시료를 필요로 한다. 그러나 타액내에는 수많은 strain의 *Streptococci*<sup>35)</sup>가 존재하므로, 한 개체가 가진 모든 strain의 *S. mutans*를 전부 분리하여 대량으로 배양하고 DNA를 분리하는 것은 현실적으로 많은 문제가 있었다. 더구나 치아우식의 발생과 관계있는 유전자가 sucrose대사에 관여하는 효소인 glucosyltransferase와 fructosyltransferase를 coding하는 glucosyltransferase genes (*gtfB*, *gtfC*, *gtfD*) 와 fructosyltransferase gene (*ftf*) 외에는 알려진 바가 없어<sup>36)</sup> 어떤 유전자를 대상으로 하는지에 대한 문제점이 있다.

이러한 문제점들을 해결하기 위하여 본 연

구는 개체가 보유한 *S. mutans*의 유전자형을 가능한 한 다수 찾을 수 있되, 단순하면서도 신속하게 균주를 동정할 수 있는 방법을 개발하는 것을 목표로 하였다. 이를 위하여 Genomic DNA로부터 특정의 DNA 절편만을 시험관 내에서 선택적으로 복제하고 증폭함으로써, 단시간내에 특정유전자를 탐색하고 확보할 수 있는 Polymerase Chain Reaction (이하 PCR) 기법을 사용하기로 하였다<sup>37)</sup>. PCR은 열에 의한 DNA 이중나선의 변성(Denaturation), 변성된 DNA 단일나선과 Primer의 결합(Annealing), *Taq* DNA polymerase에 의한 새로운 DNA가닥의 합성(Extension)의 연속된 세 과정이 한 cycle을 이룬다. 한 cycle 후 DNA 절편은 배수가 되며, 이들은 시료 DNA와 함께 다음 PCR의 기질로 작용한다. 이때 PCR primer는 일반적으로 이미 알고 있는 DNA 염기서열을 토대로 적당한 부위를 선택하여 설계한다.

그러나 이미 언급한 바와 같이 치아우식의 발생과 관계있는 유전자가 알려진 바가 없으므로 인해 어떤 유전자를 대상으로 하는지에 대한 문제점이 있어, 적당한 PCR primer를 설계할 수가 없었다. 이를 해결하기 위하여 비교적 최근에 소개된 Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (이하 AP-PCR) 기법을 사용하기로 하였다<sup>38)</sup>. 이 방법은 약 5 년전 처음으로 소개되었으며, polymorphic DNA를 random amplification에 의하여 genome을 scanning할 수 있는 PCR-mediated procedure로서 연구대상의 유전자 염기서열에 대한 사전의 지식과 정보가 없이도 연구가 가능한 장점이 보고된 바 있다<sup>39-40)</sup>. 그러므로 AP-PCR은 유전자의 characterization, 그리고 밀접한 관련이 있는 bacterial species 간의 비교에 유용하게 사용될 수 있다<sup>41-47)</sup>. 그러나 이 기법이 널리 적용될 수 있고 신속한 장점이 있어 그 사용 빈도가 급증하고 있음에도 불구하고, 지금까지 AP-PCR 기법의 효율성을 검토한 연구는 소수에 불과하였으며<sup>48-56)</sup>, *S. mutans* 유전자형의 차이를 비교 분석한 보고는 없었다.

따라서 본 연구는 *S. mutans*의 유전자형 분석을 위한 손쉽고, 신속하며, 재현성이 우

수한 방법으로서의 AP-PCR의 적합성을 검토하고, 이 방법으로 유전자형을 분류하는 과정에서 민감도와 재현성이 우수한 primer를 선택할 목적으로 시행되었다. 아울러, 위의 결과 선정된 primer를 이용한 PCR과 DNA fingerprinting으로 다발성 우식을 가진 아동과 정상 아동이 보유한 *S. mutans* 유전자형의 차이를 비교분석하고자 하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 대상아동의 선정 및 타액채취

본 연구는 2-4 세 어린이의 타액에 포함된 *S. mutans*를 대상으로 실험을 진행하였다. 다발성 우식을 보이면서 구강위생상태가 불량하다고 판단된 아동 2 명, 그리고 현존의 우식와동이 없으면서 위생상태가 양호한 것으로 판단된 아동 2 명을 선정하였다. 오전의 시간중 피검자에게 1 g 정도의 파라핀왁스를 5분간 저작하도록 하여 분비된 자극성 타액을 채취하고, 타액 0.5 ml에 1:9의 비율로 멸균 생리식염수와 혼합하였다. 이 과정을 2회 반복하여 10<sup>-3</sup>의 희석액을 제작하여 시험균액으로 사용하였다.

### 2. *S. mutans*의 선택배양

*S. mutans*의 선택배양을 위해서는, MS (Mitis salivarius) agar (Difco B 298) 에 0.2 unit의 bacitracin과 1 ml/l tellulite를 혼합한 MSB (Mitis Salivarius Bacitracin) agar를 사용하였다. 피검자의 시험균액을 Vortex test-tube mixer에서 균질화한 후, candle jar 내부에 평판배지를 넣고 촛불을 점화하여 오염을 방지한 상태에서 멸균된 면봉으로 평판배지상에 시료를 균일하게 도말하였다. anaerobic jar에 시료와 함께 CO<sub>2</sub> envelope를 넣고 뚜껑을 덮어 밀폐한 후 37°C 에서 48 시간 동안 이산화탄소 배양하였다.

배양된 *S. mutans*의 집락을 촛불을 점화한 Candle jar내에서 백금침으로 채취하여 다른 MSB 평판배지상에 도말하고 동일한 방법으로 다시 배양하였다. 생성된 개개 집락을 혈액한

천배지에 streaking하여 용혈이 일어난 균주만을 DNA의 분리에 사용하였다.

### 3. *S. mutans*의 genomic DNA의 분리

개개의 집락을 백금선으로 채취한 후 25 $\mu$ l의 TE buffer에 현탁하여 이를 100 $^{\circ}$ C에서 10 분간 끓인다. 그후 4 $^{\circ}$ C에서 10 분간 원심분리한 후 상등액을 모아 다음 실험에 사용하였다. 그 보관은 -20 $^{\circ}$ C에서 사용할 때까지 두었다.

### 4. Primer 선정 및 PCR

분석가능한 유전자지문을 얻기 위하여 S1 (10 mer : 5'-CCT CTG ACT G-3'), S2 (10 mer : 5'-GAG GTC CAC A-3'), T3 (20 mer : 5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA-3'), T7 (20 mer : 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'), PBS (20 mer : 5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT GA 3'), Kpn R (34 mer : 5' CCA AGT CGA CAT GGC ACR TGT ATA CAT AYG TAA C 3') 모두 6 종 primer를 사용하였으며, 한 가지만을 사용하거나 두 개를 pairwise로 사용하였다.

AP-PCR 혼합액은 10 mM Tris · HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% gelatin, 0.1 mM의 arbitrary primer, 125 mM의 DNTP 및 1 unit의 *Taq* polymerase를 혼합한 후, 여기에 분리된 DNA 3 $\mu$ l 를 가하여 총 용적이 25 $\mu$ l되게 하였다.

PCR 은 T3, T7, PBS, KpnR 의 경우 low stringency로 5 cycles (95 $^{\circ}$ C에서 60초, 50 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 2분), high stringency로 30 cycles (95 $^{\circ}$ C에서 15 혹은 30초, 60 $^{\circ}$ C에서 15 혹은 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분)을 시행하여 반응시켰고, S1 및 S2 primer 의 경우에는 low stringency로 40 cycles (95 $^{\circ}$ C에서 1분, 35 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 2분)로 반응시켰다. 중합효소 연쇄반응은 Thermal Cycler (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT)를 사용하였다.

### 5. Agarose gel system

PCR의 산물을 분리하기 위하여 3 %의 agarose gel을 TBE buffer (90 mM Tris-borate,

2 mM EDTA, pH 8.0)와 함께 사용하였다. 6 mm 두께와 14 cm 길이의 Gel에 대하여 80 volt, 실온하의 submarine system에서 영동을 시행하였다. 2-3 시간동안의 분리후 gel을 staining하였는데 이것은 300 ml 의 0.5 $\times$ TBE 에 10 $\mu$ l의 ethidium bromide (10 mg/ml)을 첨가하였다. gel의 사진은 Polaroid camera와 Polaroid film을 이용하여 0.125-0.25 초의 노출과 조리개 F 5.6 의 조건하에서 촬영하였다.

### 6. Acrylamide gel system

350-450 $\mu$ 의 두께이면서 뒷면이 Gel-bond Pag<sup>TM</sup> (FMC, Rockland, ME)로 받쳐졌거나 silanized glass에 공유결합된 large-pore size를 가진 ultrathin layer의 rehydratable polyacrylamide gel 여러 장을 준비하였다. Crosslinker로는 DATD, Acrylamide<sup>TM</sup>와 bis-Acrylamide<sup>TM</sup>를 사용하였다. Polyester backing (Gel-Bond Pag)은 gel을 rehydration전에 원하는 크기로 자를 수 있는 편리함이 있어 backing의 용도로 유리보다는 이것을 선택하였다.

### 7. Acrylamide gel buffer system

Trailing ion으로 pH 9.0의 sulfate-borate를 사용한 discontinuous buffer system을 채용하였다. 0.0175-0.035 M의 범위에 있는 다양한 농도의 Tris-sulfate (sulfate에 대한 molarity)를 leading sulfate ion으로 사용하였다. 다수의 base pair (>2000 혹은 <150) 뿐 아니라 72-5,000 bp에 이르는 DNA의 전체적인 해상도를 최대화하기 위하여 설정된 range 이상으로 leading ion의 ionic strength를 다양하게 하였다. Tris borate를 pH 9.0에서의 trailing ion (0.141 M borate)으로 사용하였다. borate와 Tris counterion, 그리고 tracking dye를 1 $\times$ 1 cm의 8 % acrylamide plug에 주입함으로써, trailing ion을 flat gel slab에 가하였다. electrode wire가 plug를 절단하는 일이 없도록 하기 위해 Watman #1 filter paper 1 장을 electrode와 plug사이의 plug 상단에 위치시켰다. 그 경계부를 marking하기 위한 tracking dye로는 bro-

mophenol blue 를 사용하였다. 일정한 pH에서 discontinuous voltage gradient를 사용하여 initial zone concentration과 stacking을 얻었기 때문에 pH가 일정하였다.

### 8. Gel의 재수화(Rehydration)와 전기영동(electrophoresis)

19 %의 glycol 용액에 포함되어 다양한 molarity를 가진 pH 9.0의 leading sulfate ion이 포함된 buffer내에서 gel을 재수화(rehydration)하였다. glycol용액은 surface loading characteristics를 향상시킬 의도로 사용되었다. 30-45 분간 재수화한 후, 표면의 과다한 수분을 제거하기 위하여 filter paper를 이용하여 표면을 조심스럽게 닦아내었다. Gel을 Isoelectric focusing apparatus의 cooling plate 위에 올려놓고 trailing ion과 counterion gel plug를 가하며, side strip이 open gel edge에 마주하도록 위치시켜 sample을 surface-loading하였다. 그리고 15°C 에서 horizontal electrophoresis를 시행하였다.

### 9. Sample loading 과 분리

1/10 ionic strength의 leading ion buffer로 희석된 0.5-1.0 $\mu$ l 의 시료를 loading하였다. 전기영동은 5 W에서 10분, 그리고 18 W에서 45분간 일정한 전력하에서 분리를 시행하였다.

### 10. Staining

분리된 DNA band들을 가시화하기 위하여 modified Merril silver stain을 사용하였다. Gel을 10 % alcohol로 5 분간 세척한후, 0.0034 M의 potassium dichromate와 0.0032 M의 질산으로 구성된 산화용액속에 담그었다. 첫 수분이 경과하여 gel이 적색으로 변한 후, gel을 꺼내어 1.0 M의 질산용액 속에 넣었다. Gel이 다시 무색으로 변하게 되는 즉시 이것을 fresh silver nitrate에 담그었다. 0.28 M의 Sodium carbonate에 liter당 0.5 ml의 37 % formalin이 첨가된 환원액속에서 은이온이 현상되었다. 이를 silver staining용 film에 현상하여 결과를 분석하였다.

## III. 연구성적

### 1. 세균의 동정

피검아동으로부터 채취한 타액의 희석액을 MS배지에서 배양하여 세균의 집락이 형성되었다. DNA의 분리 전단계로 *S. mutans*임을 확인할 목적으로 집락으로부터 세균을 혈액천배지에 streaking한 결과, 모든 집락의 세균들이  $\beta$ -hemolysis를 보였기 때문에 이들 모두를 *S. mutans*인 것으로 결정하였다.

### 2. Primer의 선택

T3, T7, Kpn R, PBS 등 4 종의 primer를 사용하여 각각 PCR을 시행하였고, T3 와 T7, Kpn R 과 PBS를 동시에 사용하여 pairwise AP-PCR을 시행하였다. 반응산물들을 2% agarose gel에서 확인한 결과, primer의 길이가 길수록 smearing이 심하였고 T7 primer의 경우 가장 해상도가 우수하였다. 그러나 이 경우에도 분석가능한 뚜렷한 fragment pattern을 관찰할 수는 없었다(그림 1).

이들의 해상도를 높이기 위하여 polyacrylamide gel을 사용하기로 하였고, 영동후 staining도 silver staining을 시행하여 민감도를 증가시켰다. 그 결과 T7 primer의 경우 7 가지, T3 primer의 경우 46 가지의 type으로 분류되었다(그림 2). 그러나 각각의 fingerprint에서 생성된 절편의 수가 너무 많았고 특히 minor fragment들이 많이 존재하여 정확한 fingerprint pattern의 비교가 어려웠다.

따라서 분석가능한 정도로 절편의 숫자를 줄일 필요가 있었고, minor fragment들도 나타나지 않게 하기 위하여 primer의 길이를 짧게 하여 AP-PCR을 재시행하였다. 길이를 10 mer로 줄인 S1과 S2 primer를 사용하여 다시 AP-PCR을 시행하여 2 % agarose gel에서 그 결과를 분석하였다. S1 및 S1/S2 pairwise PCR의 경우 PCR증폭이 일어나지 않았고, S2 primer를 사용한 경우에만 fragment들을 관찰할 수 있었다(그림 3). S2 primer를 사용한 경우 먼저 시행되었던 긴 길이의 primer 사용 때보다 생성된 절편의 수가 적었고, 그에 따라

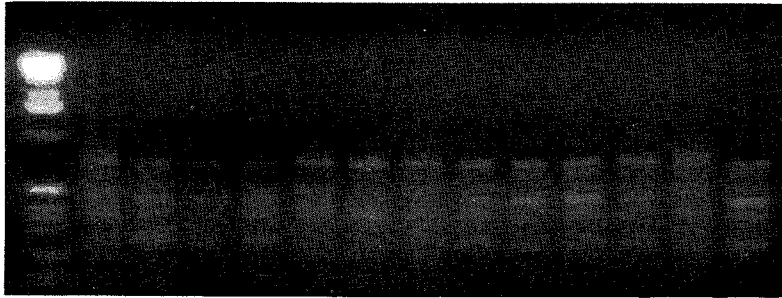


Fig. 1 DNA fingerprint patterns produced by AP-PCR using T7 primer in *S. mutans* isolates from Sample 1. PCR products were analyzed on 2% agarose gel.

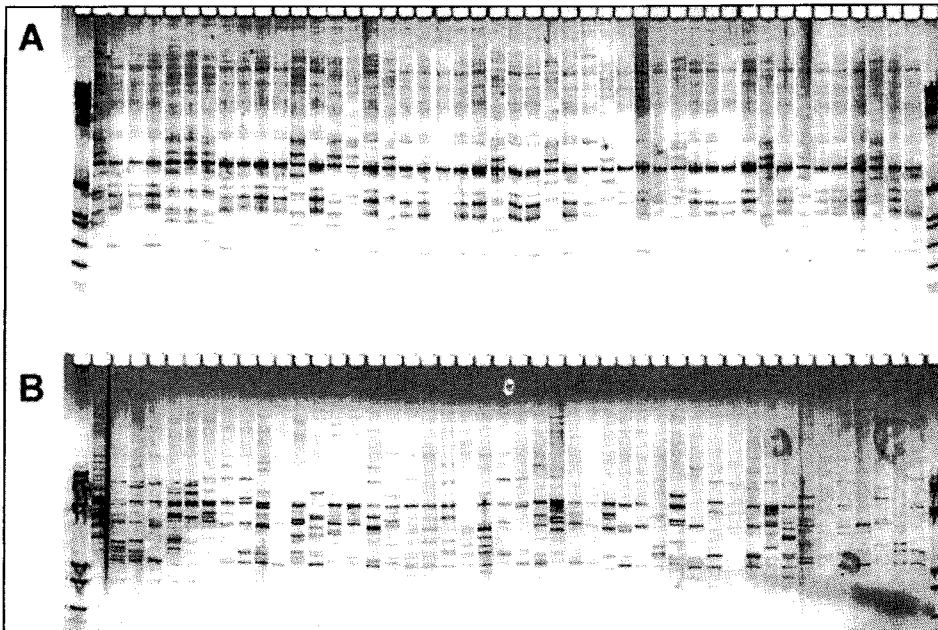


Fig. 2 Polyacrylamide gel electrophoresis of AP-PCR fingerprints in *S. mutans* isolates from Sample 1. AP-PCR was performed using T7 (Pannel A) or T3 (Pannel B) primers. Each lanes in *pannel A* is same colonies with lanes in *pannel B*.

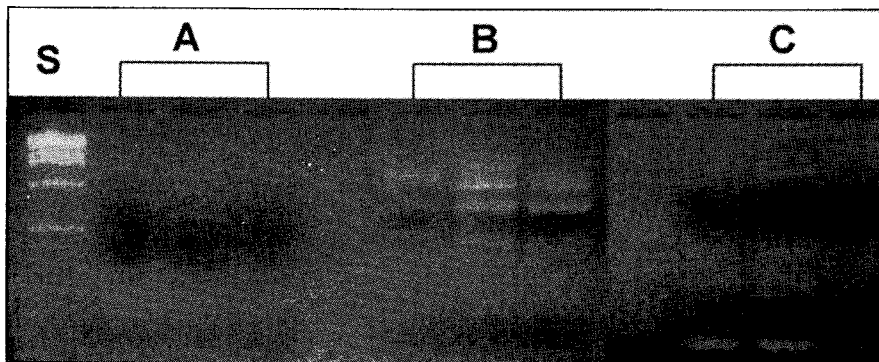


Fig. 3. Analysis of AP-PCR products in 3 different *S. mutans* isolates from sample 1. Amplified products by primer S1(Lanes A), S2(Lanes B) and S1/S2 pairwise(Lanes C) were analyzed on 2% agarose gel against molecular weight marker (Lane S).

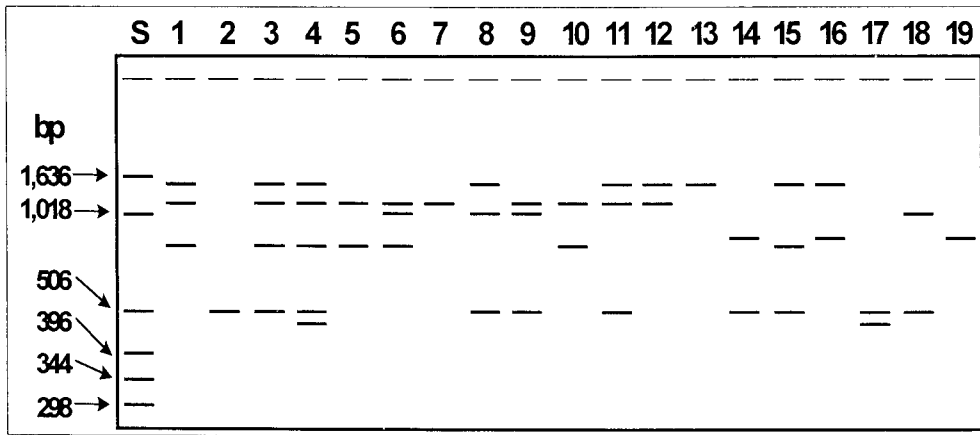


Fig. 4 Schematic diagram representing 3 % agarose gel electrophoresis patterns of *S. mutans* DNA fingerprints by AP-PCR. Numbers on each lane denote type number. Molecular weight of fragments were calculated against DNA standard marker (Lane S).

agarose gel에서도 분별가능한 해상도를 보여 최종적으로 S2 primer를 사용하기로 결정하였다.

### 3. S2 primer에 의한 AP-PCR

S2 primer에 의한 AP-PCR의 결과는 agarose gel에서도 충분히 그 pattern의 식별이 가능하였으므로 polyacrylamide gel을 사용할 필요는 없었다. 다만 해상도를 높이기 위하여 3% agarose gel을 사용하였다. 생성된 fragment는 모두 7 가지였으며, 그 크기에 따라 각각 I(1,306 bp), II(1,059 bp), III(989 bp), IV(810 bp), V(778 bp), VI(493 bp), VII(407 bp)로 명명하였다. 이 7 가지 fragment가 서로 달리 조합되어 정상 및 치아우식증 환자에서 모두 19 가지의 pattern을 관찰할 수 있었다. 이들의 3% agarose gel에서의 양상을 도식화하면 그림 4에 제시된 바와 같으며, 그 결과를 분석하여 fragment의 조성에 따른 type들을 보면 : Type 1 (I, II, V), Type 2 (VI), Type 3 (I, II, V, VI), Type 4 (I, II, V, VI, VII), Type 5 (II, V), Type 6 (II, III, V), Type 7 (I, II, V, VII), Type 8 (I, III, VI), Type 9 (II, VI), Type 10 (I, II, III, V), Type 11 (I, II, VI), Type 12 (I, II), Type 13 (I),

Type 14 (IV, VI), Type 15 (I, V, VI), Type 16 (I, IV), Type 17 (VI, VII), Type 18 (III, VI), Type 19 (IV)와 같이 나타났다. 가장 많은 fragment를 가지고 있는 type은 Type 4로 5 개의 fragment를 가지고 있으며, 7 개의 fragment가 모두 발현된 경우는 없었다. 주로 나타나는 type들은 2개 혹은 3개의 fragment로 구성된 경우가 각각 7가지, 6가지로 대부분을 차지하였다.

### 4. 치아우식증 환아와 정상아동의 *S. mutans* 유전자형의 차이 분석

두 명의 다발성 치아우식증 환아와 동수의 정상아동의 타액으로부터 순수분리한 균을 각각 30-40 여개씩 DNA를 분리하여 AP-PCR을 시행하였다. PCR 산물은 3% agarose에서 전기영동을 시행한 후 ethidium bromide 염색후 자외선에서 관찰하였다. 그 결과 그림 5에서 그 대표적인 것을 보여 주는 것처럼, 환아에서는 type의 수가 적고 한 가지 type이 우세하게 나타난 반면, 정상아에서는 많은 type들이 비교적 고른 분포를 보이는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과들을 정리하여 보면, 환아에서는 Type 2가 80% 가까이 차지하면서 type의 수가 5-6가지로 적고 거의 10% 미만을 차지하는 반면,

정상아에서는 14-15 개의 많은 type들이 관찰되거나 비교적 고른 분포를 보였다 (표 1). 또한 정상아에서 많이 관찰되는 type들이 환아에서는 전혀 나타나지 않거나 매우 적은 빈도로 관찰되었으며 환아의 대부분을 차지하는 Type 2는 정상아에서 30 % 미만으로 관찰되었다.

S2 primer를 사용한 AP-PCR에 의해 생성되는 7개 fragment의 구성비를 정상아 및 환아에서 조사해 보았다. 환아의 경우 493 bp의 fragment VI가 80 % 가까운 높은 비율로 대

부분을 차지하고 있었고 다른 fragment들이 거의 나타나지 않은 반면, 정상아의 경우 fragment VI이 47 %로 비교적 많이 관찰된 경우가 있기는 하였으나 그외의 fragment들도 비교적 고른 분포를 보이며 관찰되었다(표 2). 즉 환아에서 대부분을 차지하는 fragment VI은 정상아에서 비교적 낮은 빈도를 차지하였고, 정상아에서 비교적 높은 빈도를 보인 fragment I, II, V는 환아에서 0-7%의 빈도를 보였다.

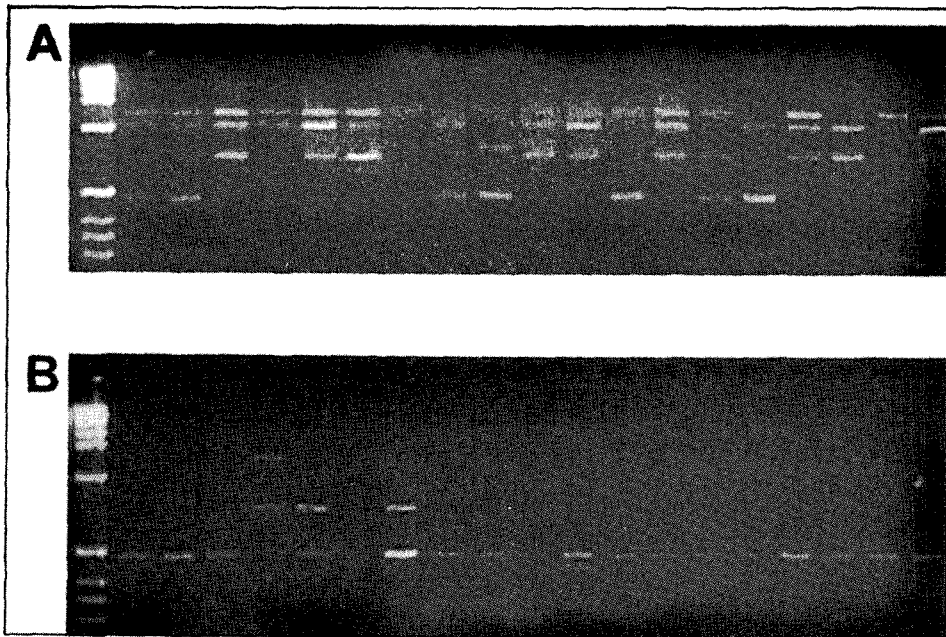


Fig. 5 Comparison of DNA fingerprint patterns between *S. mutans* isolates from normal child (Sample 3, *panel A*) and patient (Sample 1, *panel B*). Those DNA fingerprints were produced by AP-PCR using S2 primer and analyzed on 3% agarose gel.

Table 1. Distribution of *S. mutans* subtypes by AP-PCR in normal children and children with rampant caries (%)

	Children with rampant caries		Control	
	Sample 1 (38*)	Sample 2 (22*)	Sample 3 (38*)	Sample 4 (31*)
Type 1			37.0	
Type 2	76.4	82.0	8.0	32.3
Type 3			5.2	3.2
Type 4		4.5	2.6	



Type 5			10.5	
Type 6			2.6	
Type 7			2.6	
Type 8			2.6	
Type 9			8.0	
Type 10			2.6	
Type 11			8.0	
Type 12			2.6	3.2
Type 13		4.5	2.6	
Type 14	13.2		2.6	16.1
Type 15			2.6	16.1
Type 16	2.6			
Type 17	2.6	4.5		
Type 18	2.6	4.5		19.4
Type 19	2.6			9.7
Total	100.0	100.0	100.0	100.0

\* number of *S. mutans* isolates from each individual

Table 2. Distribution of amplified fragments in patients and normal children (%)

Sample Fragment	Caries children		Control	
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
I	2.2	7.4	25.0	12.3
II	0.0	3.7	29.9	3.5
III	2.2	3.7	2.9	10.5
IV	15.2	0.0	0.9	15.8
V	0.0	3.7	26.9	8.8
VI	78.2	77.8	14.4	47.3
VII	2.2	3.7	0.0	1.8

#### IV. 총괄 및 고안

치아우식증은 비록 일부지역에서는 감소추세에 있으나, 아직도 인류공통의 감염질환의 일종으로 보아야 마땅하다. 이의 발생을 감소시키거나 그 추세를 가속화하기 위해서는, 일반대중을 대상으로 한 기존의 예방적 접근과 함께 우식증에 취약한 개체에 선별적으로 접근하는 방법을 병행하는 것이 최근의 추세이다. 개체차원에서 치아우식증의 미생물적 요인의 영향력을 축소 또는 배제하기 위한 방향을 모색하는 연구가 많이 진행되고 있다. 치아우식

증은 *S. mutans* 로 알려진 세균총에 의해 유발되는 감염성 질환으로서 그 진행정도는 이 세균의 수에 의해 결정되는 것으로 알려져 있다.

그러나 치아우식의 활성이 세균의 양적인 문제에 의해 결정된다는 지금까지의 통념을 재검토해 볼 필요가 있다고 생각되었다. 만일, 한 개체내에서 구강위생의 획기적인 향상에 의해 인위적으로 세균에게 열악한 구강내 환경이 조성되었을 경우, 생존하는 균주와 사멸하는 균주의 판별이 가능하게 될 것이다. 그리하여 우식활성이 높은 균주와 낮은 균주가 구별된다면, 이 질환에 대항하기 위한 방법에

일대 전환이 요구될 것이며, 정성적인 차원에서 더욱 정밀한 우식활성도검사가 가능하게 될 것이다. 이를 위해서는 *S. mutans*의 strain 간 혹은 clonal line 간의 치태형성능 및 우식 발생능의 차이를 비교분석해야 한다. 그리고 특정 clonal line을 보유하고 있는 것이 우식위험도가 높은지에 해답이 가능하게 될 것이다. 나아가서 인위적으로 구강내 우식병원균의 수를 검출한계이하로 낮춘 상태에서, 우식활성이 높은 균주와 길항적인 성격을 가지면서 우식활성이 낮은 균주를 인공착상(pre-emptive colonization)시킬 수 있는 방법을 개발한다면<sup>27)</sup>, 우식활성이 높은 균주의 구강내 집락형성을 저지 또는 축소시킬 가능성을 생각할 수 있다.

이러한 측면에서, *S. mutans*를 특이성, 민감도 및 재현성이 높은 방법으로 세분할 필요성이 더욱 부각된다. 여타의 nosocomial bacteria에 비하여 *S. mutans*의 subtyping을 위한 노력은 비교적 늦은 편이었다. 약 20년전부터 구강미생물에 관한 연구가 심화됨에 따라, 이 분야의 연구에 유전공학적인 기법이 적용됨으로써 임상적으로나 생태학적으로 중요한 세균들에 대한 이해의 폭이 서서히 넓어지게 되었다. Cariogenic *Streptococci*의 mutant들을 분리하고 characterization하게 됨에 따라, colonization과 virulence에 중요한 특성들에 관심이 집중되었다<sup>5, 8-9, 35, 38)</sup>. 이러한 고전적인 유전학적 방법들은 1970년대에 들면서 Recombinant DNA methodology를 비롯한 분자유전학에 그 자리를 내어 주어야만 하였다<sup>57)</sup>. 집락의 형성과 독성에 중요한 역할을 할 것으로 생각되었던 많은 Streptococcal gene들을 대상으로 cloning을 시행하고 그들의 염기서열이 결정되었고, 세균의 유전자에 특정 genetic lesion을 만들어낼 목적으로 cloned gene의 defective copy를 이용하여 mutant strain들이 만들어졌다. 그리고 animal model에서 그러한 mutant들을 연구해 봄으로써 치아우식증의 세포학적, 분자유전학적 실체가 서서히 드러나기 시작하고 있다. 본 연구도 개체가 보유한 *S. mutans*의 유전자형이 다르며 이에 의해 치아우식의 정도가 다를 것이라는 가정하에, 이를 입증하기 위하여 *S. mutans*의

유전자형을 단순하면서도 신속하게 동정할 수 있는 방법을 개발하는 것을 목표로 하였다.

따라서 본 연구는 타액내에 존재하는 *Streptococci*의 종류를 DNA fingerprinting (유전자지문형분석법), 혹은 DNA profiling이라 부르는 연구기법을 사용하여 분류해 보기로 하였다. 이 분야에 관한 기술의 눈부신 발전은 법의학적인 검증을 위한 도구로서 뿐 아니라, 인간의 genome 연구나 특정질환에 대한 유전적인 소인, 친자확인을 비롯한 혈연관계확인을 위한 검사 등의 연구에도 매우 중요한 진전에 원동력이 되었다<sup>58)</sup>. 그러나 과거 상당기간동안 법의학적인 시료에 흔히 적용되어 왔던 제한절편 장다변화분석법(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP technique)을 위해서는 최소한 20-100 ng 이상의 undegraded DNA가 필요하였다. 그러나 더러는 이 정도 양의 DNA가 있지도 않을 뿐 더러 다른 연구기법을 위해서도 시료가 필요하다. 이러한 경우, DNA를 증폭하는 PCR (Polymerase Chain Reaction) technique 과 함께 증폭된 DNA에 대한 적절한 검출기법이 적용증이 된다<sup>59)</sup>.

PCR은 heat denaturation, primer annealing 그리고 primer extension의 3 단계로 구성되는 1 cycle을 반복시행함으로써 DNA를 증폭하는 기법이다. 이것은 법의학 분야 뿐 아니라 유전학적 연구에서도 그 활용성이 뛰어난 방법이다. Wrischnik 등<sup>60)</sup>은 deletion을 포함하는 pre-amplified mitochondrial DNA product를 분리한 후 형광염색제인 ethidium bromide의 존재하에서 agarose gel에서의 전기영동으로 typing될 수 있음을 보여주었다. 그는 Region V의 East Asian 9-bp deletion을 증폭하여 이 능력을 보여주었는데, 실험의 결과 120-bp의 fragment와 111-bp의 fragment (9-bp의 deletion에 의함)의 서로 다른 길이를 가진 2 개의 fragment가 산출되었다. Agarose electrophoresis에 의하여 이 두 fragment를 분리한 후, 상이한 크기의 DNA의 Band를 형광하에서 볼 수 있었다. PCR에 의해 DQ alpha 및 beta globulin gene<sup>61)</sup>과 같은 주요한 histocompatibility complex gene의 여러 부분들을 증폭함으

로써 유전학 분야, 그리고 유전과 질병간의 관계를 규명하기 위한 연구에서의 PCR의 활용성이 급증하게 되었다.

PCR을 위한 primer를 제작하기 위해서는 연구대상인 유전자와 유사한 유전자의 sequence에 관한 정보가 필수적이고, 이 정보에 따라 유전자의 부위마다에 적합되도록 설계되어야 한다. 그러나 치아우식의 발생과 관계있는 유전자가 sucrose대사에 관여하는 효소인 glucosyltransferase와 fructosyltransferase를 coding하는 glucosyl-transferase genes (*gtfB*, *gtfC*, *gtfD*) 과 fructosyltransferase gene (*ftf*) 외에는 알려진 바가 없으므로<sup>36)</sup> 어떤 유전자를 대상으로 할 것인지에 대한 문제점이 있었다. 이러한 문제점들을 극복할 목적으로 다른 새로운 기법이 제안되었는데, 그것이 바로 AP-PCR이다. 이 방법에 의하면 특정 set의 primer가 불필요하며, 대신 연구대상인 genome과는 무관하게 임의로 선택된 primer를 사용하여 매우 신속하고 간단하게 PCR product의 유전자지문형을 얻을 수 있다. 따라서, AP-PCR기법을 사용할 경우에는 연구대상인 organism의 분자생물학적인 사전지식이 불필요하다. 개개의 primer가 상이한 pattern의 AP-PCR product를 만들어내며, strain간의 polymorphism을 검출해 낼 잠재성을 가지고 있다. 따라서 이 기법에 의하여 동일한 species내의 매우 가까운 strain조차도 판별이 가능하게 된 것이다<sup>62)</sup>.

따라서 본 연구는 PCR-based fingerprints의 해상력(resolution)을 증대시키기 위한 primer의 길이와 gel system의 선정에 중점을 두었다. 즉 기본적인 원리는 변하지 않았으나, 유전자지문형을 얻기 위한 실험설계상의 섬세한 부분에 있어서 다양한 수정이 이루어졌다. 이러한 실험을 설계할 경우 결정하여야 할 중요한 사항으로는 lane당 얼마나 많은 PCR product를 얻을 것인가와 전기영동을 위한 gel에 있어서 agarose gel, non-denaturing acrylamide gel, denaturing acrylamide gel 중 어느 것을 선택할 것인가를 결정해야 하였다. 가장 이상적인 선택으로는 비교적 적은 수의 PCR 산물을 얻으면서 agarose gel상에 이 산물들을 resolution

시키는 것이다. 이를 위해 다양한 길이의 primer를 사용하였는데, 34-mer 1종(Kpn R), 20-mer 3종(T3, T7, PBS), 10-mer 2종(S1, S2) 모두 6 종을 사용하였으며, 한 가지만을 사용하거나 두 개를 pairwise로 사용하였다. AP-PCR을 시행하여 반응산물들을 2% agarose gel에서 확인한 결과, Kpn R 및 PBS primer의 경우 관찰가능한 반응산물들을 얻을 수 없었고, T7 과 T3 primer의 경우 반응산물들을 관찰할 수 있었으나 smearing이 심하였고 분석가능한 뚜렷한 fragment pattern을 관찰할 수는 없었다(그림 1). 이는 증폭된 산물의 종류가 많음으로 인해 agarose gel에서는 충분히 분리되지 않기 때문에 smearing으로 나타나는 것으로, 이들을 분리하기 위해서는 해상도가 향상된 분리방법이 필요함을 의미하였다.

PCR에 의한 증폭산물을 agarose에서의 submarine gel electrophoresis에 의해 fractionation하는 방법은 ethidium bromide에 의해 직접 in-gel fluorescent staining하여 관찰하므로, 시행에 간편한 장점이 있으나, 이러한 방법들을 실제 적용함에 있어서 ethidium bromide가 적은 양의 핵산은 검출할 수 없고 agarose gel의 해상도가 낮은 것이 문제였다. 이들의 해상도를 높이기 위하여 polyacrylamide gel을 사용하기로 하였고, 영동후 staining도 silver staining을 시행하여 민감도를 증가시켰다. 그 결과 T7 primer의 경우 7 가지, T3 primer의 경우 46 가지의 type으로 분류되었다(그림 2). 그러나 각각의 fingerprint에서 생성된 fragment의 수가 너무 많았고 특히 minor fragment들이 많이 존재하였기 때문에 정확한 fingerprint pattern의 비교가 어려웠다. PCR fingerprint가 복잡할수록, 재현성은 증가하나 너무 많은 product가 존재하는 경우에는 그 판독이 어려워지는 문제가 있었다. 따라서 신뢰할 만한 fingerprint는 arbitrary primer로 screening하여 재현성은 우수하고 fingerprint는 복잡하지 않은 pattern을 얻은 후 이것을 연구대상인 population에 적용하는 것이 좋다<sup>63)</sup>.

따라서 분석가능한 정도로 fragment의 숫자를 줄일 필요가 있어, 길이를 10-mer로 줄인

S1과 S2 primer를 사용하여 다시 AP-PCR을 시행하여 2% agarose gel에서 그 결과를 분석하였다. S1 및 S1/S2 pairwise PCR의 경우 PCR증폭이 일어나지 않았고, S2 primer를 사용한 경우에만 fragment들을 관찰할 수 있었다(그림 3). S2 primer를 사용한 경우 긴 길이의 primer를 사용하였을 경우보다 생성된 fragment의 수가 7가지로 적었고, 그에 따라 agarose gel에서도 분별이 가능하였으므로 최종적으로 S2 primer를 사용하기로 결정하였다. S2 primer에 의한 AP-PCR의 결과 이 7가지의 fragment들이 서로 달리 조합되어 정상 및 치아우식증 환자에서 모두 19가지의 pattern을 관찰할 수 있었다. 그러나 이 경우 fragment의 수는 분석가능하므로 크게 문제가 되지 않았으나, 재현성이 우수함을 검증할 필요가 있었다.

PCR-based fingerprinting에 있어서 일부의 실패가 보고되고 이에 따라 이 방법을 사용하려는 사람들을 주저하게 되는 경우가 생기기 때문에, 그 재현성의 문제는 매우 중요한 사안이다. 그 pattern이 실험시점마다, 연구소마다 달리 나타나고 심지어 한 연구소에서 동일한 날에 시행한 결과도 다르게 나타난다<sup>64-65</sup>. 이러한 Intraexperiment variability의 문제는 대부분은 부적절하게 준비된 DNA에 기인한다<sup>63</sup>. 실험과정의 DNA quality와 quantity에 대한 통제가 완벽하지 않으면, 실험결과 나타난 genomic fingerprinting의 차이가 실제로 존재하는 것인지를 알 수가 없다. 본 연구에서는 순수 분리된 DNA를 사용한 것이 아니고 분리된 *Streptococci*를 끓인후 사용하였으므로, 이와 같은 방법으로 분리된 DNA의 적합성 여부가 관건이었다. 이에 분리된 균주 4종을 대량으로 배양한 후 phenol로 수차례 처리하여 DNA를 순수분리한 후 PCR에 사용하여 같은 pattern이 나오는지 확인하였고, 같은 균주에 대해 3-4회 반복실험을 시행한 결과 재현성이 우수하여, 본 연구 방법이 *S. mutans*의 genotyping에 적합하다는 결론을 얻을 수 있었다.

위의 확립된 방법으로 두 명의 치아우식증 환아와 역시 같은 수의 정상아동 타액에서 순

수분리한 균을 각각 30-40 여개씩 DNA를 분리하여 AP-PCR을 시행하였다. 그 결과 환아에서는 type의 수가 적고 Type 2가 80%로 우세하게 나오는 반면, 정상아에서는 많은 type들이 비교적 고른 분포를 보이는 것으로 관찰되었다(표 1). 또한 환아에서 대부분을 차지하는 Type 2는 정상아에서 30% 미만으로 관찰되었다. S2 primer를 사용한 AP-PCR에 의해 생성되는 7개 fragment의 구성비를 정상아 및 환아에서 조사해 볼 때, 환아의 경우 493 bp의 fragment VI이 80% 가까운 높은 비율로 대부분을 차지하고 있었고 다른 fragment들이 거의 나타나지 않은 반면, 정상아의 경우 fragment VI이 47%로 비교적 많이 관찰된 경우가 있기는 하였으나 그외의 fragment들도 비교적 고른 분포를 보이며 관찰되었다(표 2). 즉 환아에서 대부분을 차지하는 fragment VI은 정상아에서 비교적 낮은 빈도를 차지하였고, 정상아에서 비교적 높은 빈도를 보인 fragment I, II, V는 환아에서 0-7%의 빈도를 보여 정상아와 환아 사이에 균주의 분포가 다를 수 있었다. 이러한 결과들은 Type 2가 우식활성이 높은 균주이며 이들이 우식활성이 낮은 균주의 구강내 집락형성을 저지 또는 축소시킨 가능성을 생각할 수 있다. 또한 fragment VI과 같은 특정 clonal line을 보유하고 있는 것이 우식위험도가 높다는 가설을 세울 수 있다.

그러나 연구대상의 수가 적음으로 인해 이러한 해석은 아직 가설의 수준이며, 좀더 많은 대상에 대한 연구를 수행하여 통계적으로 유의한 결과를 추후 얻어야 될 필요성이 절실하다. 또한 이 실험에서 얻어진 genotype들이 실제 균주의 serotype등과 같은 phenotype들과 어떤 연관성을 가지고 있는지에 대한 연구도 이루어져야 할 것이다. 이에 덧붙혀 Type 2가 우식활성이 높은 균주임을 입증하기 위하여, Sample 4와 같이 치아우식은 없으나 Type 2가 비교적 많은 비율을 차지하는 아동을 지속적으로 관찰하여 이 유전자형의 *S. mutans*가 변화하는 양상과 치아우식의 발현과의 관계를 추구해야 할 필요가 있다.

이 연구를 바탕으로 우식성이 높은 군주에서 우식과 관계되는 특정 유전자형의 소멸 여부 및 그 시기, 그리고 새로운 유전자형이 추가되고 정착하는 시기 및 그와 동반된 치열의 변화 등에 관한 지식을 구하게 된다면, 치아우식증의 치료에 기여하는 바들을 다음과 같이 열거할 수 있다.

첫째, 치아우식증은 *S. mutans*로 알려진 세균총에 의한 감염성 질환으로서 그 진행 정도는 이 세균의 수에 의해 결정되는 것으로 알려져 있다. 그러나 치아우식의 활성이 세균의 양적인 문제에 의해 결정된다는 지금까지의 통념을 재검토해 볼 필요가 있다고 생각되었다. 만일 우식활성이 높은 군주와 낮은 군주가 구별된다는 이번 연구의 결과가 확립된다면, 이 질환에 대항하기 위한 방법에 일대 전환이 요구될 것이다.

둘째, 인위적으로 세균에게 열악한 구강내 환경을 조성하였을 경우, 생존하는 군주와 사멸하는 군주가 생길 것이다. 본 연구는 양자간의 유전자적인 차이를 규명하기 위한 토대를 제공하게 될 것이다.

셋째, 본 연구에 의하여 제시된 우식활성이 낮은 군주와 높은 군주의 판별이 그 군주의 phenotype과 관련성이 있다는 것이 입증된다면, 정성적인 차원에서 더욱 정밀한 우식활성검사가 가능하게 될 것이다.

본 연구는 다발성 우식증을 가진 아동의 구강내 문제가 구강상주균인 *S. mutans*의 단순한 수적(數的)인 차이에 의한 것인가, 아니면 세균의 질적(質的)인 차이도 변수가 되는가를 규명함을 궁극적인 목적으로 하여 이러한 연구목표를 만족시키기 위해 각 집락의 유전자형을 쉽게 characterize할 수 있는 방법을 개발함을 목표로 하였다. 그결과 간편하고 재현성이 뛰어나며 미량의 집락으로도 유전자형을 분석할 수 있는 실험기법을 개발하였으며, 구강내 *S. mutans*의 유전자형의 변화양상이 질적인 차원에서 변화된다는 가능성을 제시하였다. 이에 따라 개체의 차원에서 치아우식활성이 높은 군주의 획득과정을 차단함으로써, 개인의 우식활성을 인위적으로 감소시킬 수 있는 방

안을 강구할 수 있는 가능성을 밝혔다는 것에 그 의의가 있다고 하겠다.

## V. 결 론

본 연구는 *S. mutans*의 유전자형 분석을 위한 손쉽고, 신속하며, 재현성이 우수한 방법으로서의 AP-PCR의 적합성을 검토하고, 이 방법으로 유전자형을 분류하는 과정에서 민감도와 재현성이 우수한 primer를 선택할 목적으로 시행되었다. 아울러, 위의 결과 선정된 primer를 이용한 PCR과 DNA fingerprinting으로, 다발성 우식을 가진 아동과 정상아동이 보유한 *S. mutans* 유전자형을 비교분석하고자 하였다. AP-PCR의 조건을 확립하기 위하여 6가지의 primer를 사용하여 AP-PCR을 시행하여 agarose gel 에서도 분별가능한 해상도를 보인 S2 primer를 사용하기로 결정하였다. 이러한 조건하에서 생성된 fragment는 모두 7가지였으며, 이 7가지 fragment들이 서로 달리 조합되어 정상 및 치아우식증 환자에서 모두 19 가지의 pattern들을 관찰할 수 있었다. 그 결과, 환자에서는 type의 수가 적고 type 2가 80%로 우세하게 나타난 반면, 정상아에서는 많은 type들이 비교적 고른 분포를 보이는 것으로 관찰되었다. 또한 정상아에서 많이 관찰되는 type들이 환자에서는 전혀 나타나지 않거나 매우 적은 빈도로 관찰되었다. 결론적으로 본 연구에서 *S. mutans* 유전자형을 간편하고 재현성이 뛰어나며 미량의 집락으로도 분석할 수 있는 실험기법을 마련하였으며, 이 방법을 이용하여 정상아와 환자 사이에 군주의 분포가 다르며 구강내 *S. mutans*의 유전자형의 차이에 따른 질적인 측면도 우식활성에 관여할 가능성을 제시하였다.

## 참 고 문 헌

1. Loesche W.J. : Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay, *Microbiol Rev.* 50 : 353-380, 1986.
2. Krasse B. : Caries risk, Chicago, Quintes-

- sence Publishing, 1985. pp. 3–37.
3. Bowden G., Johnson J. and Schachtele, C. : Characterization of *Actinomyces* with ribosomal-RNA gene probes, J.Dent. Res. 72 : 1171–1179, 1993.
  4. Lenski RE. : Assessing the genetic structure of microbial populations, Proc Natl Acad Sci USA, 90 : 4334–4336, 1993.
  5. Barletta RG., Michalek SM. and Curtiss R.3rd : Analysis of the virulence of *Streptococcus mutans* serotype c *gtfA* mutants in the rat model system, Infect Immun. 56(2) : 322–330, 1988.
  6. Munro C., Michalek SM. and Macrina FL. : Cariogenicity of *Streptococcus mutans* V 403 glucosyltransferase and fructosyltransferase mutants constructed by allelic exchange, Infect Immun 59(7) : 2316–2323, 1991.
  7. Yamashita Y., et al. : Immunological properties of the primer-independent glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* serotypes d and g, J. Gen Microbiol. 134(5) : 1223–1227, 1988.
  8. Kuramitsu HK. and Nakano YJ. : Mechanism of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases : hybrid-enzyme analysis, J.Bacteriol. 174(17) : 5639–5646, 1992.
  9. Hanada N. and Kuramitsu HK. : Isolation and identification of the *Streptococcus mutans gtfD* gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis, Infect. Immun. 57(7) : 2079–2085, 1989.
  10. Eisenstein BI : New Molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases, J. Infec. Dis., 161 : 595–602, 1990.
  11. Selander RK, Caugant DA. and Whittam TS. : In '*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*' Cellular and molecular biology. Neidhardt FC (Ed.) ASM., 1987. pp. 1625–1648.
  12. Woese CR. : In Evolution in Prokaryotes, Schleifer KH and Stackebrandt E.(ed) Academic Press, 1986.
  13. DeLong EF., Wikham GS. and Pace NR. : Phylogenetic stains : ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells, Science, 243 : 1360–1363, 1989.
  14. Amann RI., Krumholz L. and Stahl DA. : Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology, J. Bact. 172 : 762–770, 1990.
  15. Mullis KB. and Faloona FA. : Specific synthesis of DNA in vitro via PCR, Methods Enzymol. 155 : 335–350, 1987.
  16. Smith NH. and Selander RK. : Sequence invariance of the antigen-coding central region of the Phase 1 Flagellar filament gene (Fli C) among strains of *Salmonella typhimurium*, J. Bacteriol. 172 : 603–609, 1990.
  17. McCabe PC. : PCR Protocols : A guide to methods and applications, Academic Press, pp.76–83, 1990.
  18. Caufield PW., et al. : Plasmids in *Streptococcus mutans* : usefulness as epidemiological markers and association with mutagens, In S. Hamada et al.(ed) Molecular microbiology and immunology of *Streptococcus mutans*, Elsevier Science Publishing Inc., New York, 1986. pp. 217–223.
  19. Davey AL. and Rogers AH. : Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission, Archs. Oral Biol., 29(6) : 453–460, 1984.
  20. Masuda N., et al. : Transmission of *Streptococcus mutans* in some selected families, Microbios, 44 : 223–232, 1985.
  21. Rogers AH. : Evidence for the transmissibility of human dental caries, Aus. Dent.J.,

- 22(1) : 53–56, 1977.
22. Kolstad RA. : Strain typing of Oral streptococci by the use of Bacterial antagonism, *J. Dent. Res.*, 55 : A154–A165, 1976.
  23. Rogers AH. : Bacteriocinogeny and properties of some bacteriocins of *Streptococcus mutans*, *Arch. Oral Biol.*, 20 : 853–858, 1972.
  24. Caufield PW. and Walker TM. : Genetic diversity within *S. mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphisms, *J.Clin.Microbiol.*, 27(2) : 274–278, 1989.
  25. Russel, RRB. : The application of molecular genetics to the microbiology of dental caries, *Caries Res.*, 28 : 69–82, 1994.
  26. Genco RJ. and Loos BG. : The use of genomic DNA fingerprinting in studies of the epidemiology of bacteria in periodontitis, *J.Clin.Periodontol.*, 18 : 396–405, 1991.
  27. Kozai K., et al. : Changes of strains of mutants *Streptococci* induced by treatment with Chlorohexidine varnish, *J. Dent. Res.*, 70(9) : 1252–1257, 1991.
  28. Kulkarni GV., Chan KH. and Sandham HJ. : An investigation into the use of restriction endonuclease analysis for the study of transmission of *Mutans Streptococci*, *J. Dent. Res.*, 68 : 1155–1161, 1989.
  29. Moseley SL., et al. : Identification of enterotoxigenic *E.coli* by colony hybridization using 3 enterotoxin gene probes, *J. Infect. Dis.*, 145 : 863–869, 1982.
  30. Russel RRB. : Genetic analysis and genetic probes for oral bacteria, In : Perfuson DB. ed. *Frontiers of oral physiology-aspects of oral molecular biology*, Basel, Karger, 1991, pp.57–76.
  31. Smorawinska M. and Kuramitsu HK. : DNA probes for detection of cariogenic *Streptococcus mutans*, *Oral Microbiol. Immunol.*, 7 : 177–181, 1992.
  32. Lowe J.B. : Clinical application of gene probes in human genetic disease, malignancy and infectious diseases, *Clin Chim Acta*, 157 : 1–32, 1986.
  33. Hamada S. and Slade HD. : Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*, *Microbiol Rev.* 44 : 331–384, 1980.
  34. Welsh J. and McClelland, M. : Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, *Nucleic Acids Res.* 18(24) : 7213–7218, 1990.
  35. Yamashita Y., Hanada N. and Takehara T. : A novel glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* produces oligoisomaltosaccharides, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150(2) : 687–693, 1988.
  36. Munro C., Michalek SM. and Macrina FL. : Cariogenicity of *Streptococcus mutans* V 403 glucosyltransferase and fructosyltransferase mutants constructed by allelic exchange, *Infect. Immun.*, 59 : 2316–23, 1991.
  37. 김 상호, 김 상용 : Polymerase chain reaction, 분자유전학노트, KIST유전공학연구소, 1995, pp.100–124.
  38. Hamada S., et al. : Purification and characterization of cell-associated glucosyltransferase synthesizing water-insoluble glucan from serotype C *Streptococcus mutans*, *J. Gen. Microbiol.*, 135(2) : 335–344, 1989.
  39. Welsh J. and McClelland M. : Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, *Nucleic Acids Res.*, 18 : 7213–7218, 1990.
  40. Williams JGK. : DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Res.*, 18 : 6531–6535, 1990.
  41. Akopyanz N., et al. : DNA diversity among

- clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting, *Nucleic Acids Res.* 20 : 5137–5142, 1992.
42. Saulnier P., et al. : Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulse-field gel electrophoresis for typing strains of *Staphylococcus aureus*, *J. Clin. Microbiol.* 31 : 982–985, 1993.
  43. Struelens M., et al. : Concordant clonal delineation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis and polymerase chain reaction genome fingerprinting, *J. Clin. Microbiol.* 31 : 1964–1970, 1993.
  44. van Belkum A., et al. : Comparison of 4 genotyping assays for epidemiological study of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13 : 420–424, 1994.
  45. van Belkum A., et al. : Comparison of phage typing and DNA fingerprinting by PCR for discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates, *J. Clin. Microbiol.* 31 : 798–803, 1993.
  46. van Belkum A. and Meis J. : Polymerase chain reaction mediated DNA fingerprinting in bacterial epidemiology, *Clin Infect. Dis.* 18 : 1017–1018, 1994.
  47. Versalovic, J. : Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes, *Nucleic Acids Res.* 19 : 6823–6831, 1992.
  48. Welsh J., et al. : Genomic fingerprinting by arbitrarily primed PCR resolves *Borrelia burgdorferi* to 3 distinct phyletic groups, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42 : 370–377, 1992.
  49. Brousseau R., et al. : Arbitrary primer polymerase chain reaction, a powerful method to identify *Bacillus thuringiensis* serovars and strains, *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 114–119, 1993.
  50. Elaichouni, A., et al. : *Pseudomonas aeruginosa* serotype 012 outbreak studies with arbitrary primer PCR, *J. Clin. Microbiol.* 32 : 666–671, 1994.
  51. Mazurier, S., et al. : A comparative study of randomly amplified polymorphic DNA analysis and conventional phage typing for epidemiological studies of *Listeria monocytogenes* isolates, *Res. Microbiol.* 143 : 507–512, 1992.
  52. Ralph D., et al. : *Leptospira* species categorized by arbitrarily primed PCR and by mapped restriction polymorphism in PCR-amplified rRNA genes, *J. Bacteriol.* 175 : 973–981, 1993.
  53. Saulnier P., et al. : Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulse-field gel electrophoresis for typing strains of *Staphylococcus aureus*, *J. Clin. Microbiol.* 31 : 982–985, 1993.
  54. Struelens M., et al. : Concordant clonal delineation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis and polymerase chain reaction genome fingerprinting, *J. Clin. Microbiol.* 31 : 1964–1970, 1993.
  55. Van Belkum A., et al. : Comparison of 4 genotyping assays for epidemiological study of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13 : 420–424, 1994.
  56. van Belkum A., et al. : Comparison of phage typing and DNA fingerprinting by PCR for discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates, *J. Clin. Microbiol.* 31 : 798–803, 1993.
  57. Macrina FL. : Genetic approaches to the study of oral microflora : a review, *Crit. Rev. Oral Biol Med.* 1(3) : 207–227, 1990.
  58. Allen RC., Graves G. and Budowle, B. : Polymerase chain reaction amplification



- products separated on rehydratable polyacrylamide gels and stained with silver, *Bio Techniques*, 7(7) : 736–744, 1989.
59. Sakai, RK., et al. : Enzymatic amplification of beta-globulin genome sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 230 : 1350–1354, 1986.
  60. Wrischnik, LA., et al. : Length mutations in human mitochondrial DNA : Direct sequencing of amplified DNA, *Nucl Acids Res.*, 15 : 529–534, 1987.
  61. Sakai RK., et al. : Analysis of enzymatically amplified beta-globulin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes, *Nature*, 324 : 163–165, 1985.
  62. Selander RK., et al. : In 'Escherichia coli and Salmonella typhimurium', Cellular and molecular biology, Neidhardt FC. (Ed. in chief) ASM. pp.1625–1648, 1987.
  63. McClelland M. and Welsh J. : DNA fingerprinting using arbitrarily primed PCR, in PCR Primers-a laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, pp. 203–211, 1995.
  64. Williams JG., et al. : DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Res.* 18 : 6531–6535, 1990.
  65. Williams JG., et al. : Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers, *Methods Enzymol.* 218 : 704–740, 1993.