

유전자형에 따른 *Streptococcus mutans*의 subtyping:
Southern blot RFLP와 AP-PCR을 이용한 비교

부산대학교 치과대학 소아치과학교실

정태성 · 김 신

Abstract

EVALUATING TWO METHODS FOR FINGERPRINTING GENOMES FOR
STREPTOCOCCUS MUTANS IN CHILDREN: A COMPARISON WITH
AP-PCR AND SOUTHERN BLOT RFLP

Tae-sung Jeong, D.D.S., M.S.D., Shin Kim, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

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

The arbitrary primer polymerase chain reaction (AP-PCR) and Southern blot restriction fragment length polymorphism (RFLP) were used to genotype the cariogenic pathogen *S. mutans* in children. Following the morphologic characteristics of colony on selective medium for *S. mutans*, total genomic DNA from 155 strains was extracted by conventional methods. Among 155 strains, 143 strains (92.3%) were confirmed *S. mutans* by PCR with *dexA* gene and 114 strains were used in this study.

Three random sequence 10-base oligonucleotide primers were chosen for AP-PCR. The amplified DNA products were separated electrophoretically in a 2% agarose gel containing ethidium bromide and the banding patterns were compared among different strains. For RFLP analysis, DNA was digested with *EcoRI* and *BamHI*, separated on a 0.7% agarose gel and transferred to a nylon membrane. The membrane was probed with a previously characterized 1.6 kilobases (kb) DNA fragment cloned from *gfb* gene of *S. mutans*. The probe was labeled with isotope [^{32}P - α CTP], and hybridized fragments were detected with intensifying screen. AP-PCR produced 4-8 DNA bands in the 0.25-10 kb regions and distinguished 9, 10 or 12 genotypes, depending on the specific primer used. Southern blot RFLP analysis revealed 2 hybridization patterns consisting of 1 DNA fragments 450, 500 bp. These results indicate that AP-PCR is more discriminative method for genotyping of *S. mutans*.

I. 서 론

치아우식증은 대표적인 다인성 감염질환으로서 이를 예방하려는 노력은 과거부터 지속되어 왔다. 치아우식증은 과거에 비하여 발생빈도는 다소 감소하는 추세를 보이거나 아직도 가장 많이 발생하는 질환의 하나로서, 특히 소아에서는 치아우식증이 가장 중요한 질환으로 간주되고 있다¹⁾. 이러한 치아우식증의 발생에 있어서 중요한 역할을 하는 구강내 세균으로는 Mutans Streptococci 및 *Lactobacillus* 등이 있다. 이 중 Mutans Streptococci가 주로 치아우식의 발생에 관련되어 있음이 밝혀진 바 있고, 이는 다시 5 종의 균주 및 8가지 혈청형으로 분류할 수 있다²⁾. 현재까지의 연구결과는 Mutans Streptococci 중에서, 특히 *S. mutans*가 초기 치아우식의 발생과 밀접하게 연관되어 있으며 치태내에서 가장 자주 발견될 뿐만 아니라^{3,4)} 세균성 심내막염을 일으키는 원인균의 하나로 지목되고 있다⁵⁾.

*S. mutans*는 *Actinomyces* 등⁶⁾의 구강내 주요세균들과 마찬가지로 동일한 조상으로부터 유래한 수많은 유전적 가계를 이루고 있음이 ribotyping method 등에 의해 밝혀진 바 있다⁷⁾. 나타난 각각의 유전적 특징에 따라 구조적 생리적 및 기능적 특징이 달라지고, 특정한 환경에 대한 적응성, 친화성 및 독성에 있어서도 차이가 있음이 밝혀진 바 있다^{8,9)}. 따라서, *S. mutans*도 균주나 유전적 계통에 따라 독성 및 친화력 뿐만 아니라 산 생성능, 부착능, 집락의 형성 등에서 차이를 보일 수 있다¹⁰⁻¹²⁾

역학과 생태학의 분야에 있어서 세균의 species와 strain을 정확히 동정하는 것은 매우 중요한 일이다. 이러한 방법들은 균주의 origin을 찾거나 균주간의 유전적 관련성을 규명하고 한편으로는 역학적인 문제를 풀어내는데 있어 지대한 역할을 해왔다¹³⁾. 세균의 신속한 동정과 분류작업은 그 형태학적 특성, 영양요구량, 항생제에 대한 저항성, isoenzyme comparison, phage sensitivity¹⁴⁻¹⁵⁾, 그리고 최근에 들어서는 DNA-based methods, 특히 DNA와 rRNA sequence¹⁶⁾, strain-specific fluorescent oligonucleotides^{17,18)}, polymerase chain reaction 등이 있으며¹⁹⁻²¹⁾, 각각의 방법은 나름대로의 효용성과 장점을 가지고 있다.

*S. mutans*를 대상으로는 생물학적 특성^{22,23)}, 혈청형²⁴⁾, 면역학적 특성^{25,26)}, bacteriocin typing²⁷⁾ 등의 방법들이 적용되었으나, 균주의 특성을 정밀하게 규명하기에는 감수성, 재현성, 및 특이성에 문제가 있음이 지적되었다²⁸⁾.

1970년대에 들어 유전자 조작기법이 소개되고, 1980년대에는 *S. mutans*에 대한 분자유전학적 연구가 처음으로 보고된 이래²⁹⁾, plasmid DNA³⁰⁾ 및 chromosomal DNA³¹⁾에 대한 제한효소 분석법 (Restriction Endonuclease Analysis, REA), 그리고 최근에 들어서는 DNA 표지자³²⁻³⁴⁾에 의한 유전자 지문형 감식법(DNA fingerprinting) 등의 기법들이 소개되어 기존의 문제점들을 극복하고 유전학적인 동일성을 규명할 가능성이 제시되었다.

그 중 DNA 표지자(probe)에 의한 방법들은 *S. mutans*를 식별하여 임상시료내의 병원균을 신속히 정량 혹은 동정하는데 유용한 방법이지만^{35,36)}, 분석을 위해서는 10 μ g 이상의 비교적 많은 양의 DNA 시료를 필요로 한다. 그러나 구강내에는 수많은 strain의 *Streptococci*가 존재하므로, 한 개체가 가진 모든 strain의 *S. mutans*를 전부 분리하여 대량으로 배양하고 각각의 DNA를 분리하는 것은 현실적으로 많은 문제가 있다. 이러한 문제점들을 극복하고 *S. mutans*가 어린이에서 치아우식증의 유발에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Genomic DNA로부터 특정의 DNA절편만을 시험관내에서 선택적으로 복제하고 증폭함으로써, 단시간내에 특정 유전자를 탐색하고 확보할 수 있는 Polymerase Chain Reaction(이하 PCR) 기법이 사용되고 있다. 이러한 방법들은 생물학적 검체로부터 감염원을 규명하는데 사용되고 있다^{37,38)}. 이 방법은 매우 높은 감수성 및 특이성을 나타내므로 10⁶개의 미생물 가운데 10개의 대상 미생물 까지도 찾아낼 수 있다³⁹⁾.

최근에는 arbitrarily primed PCR(이하 AP-PCR) 혹은 randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)가 생물세포의 유전적 polymorphism을 찾아내는데 사용되고 있다⁴⁰⁻⁴²⁾. AP-PCR 결과 증폭된 산물은 다양한 DNA 절편들로 구성되어 있으며 polymorphic marker들로 작용할 수 있으므로 AP-PCR은 DNA 염기서열에 대한 사전지식과 정보가 없이도 연구가 가능한 장점이 보고된바 있다⁴³⁻⁴⁵⁾. 그러므로 AP-PCR은 유전자의 Characterization,

그리고 밀접한 관련이 있는 bacterial species 간의 비교연구에 유용하게 사용될 수 있다⁴⁶⁻⁵⁰⁾. 이 기법은 보편화가 쉽고, 과정이 신속한 장점이 있어 그 사용빈도가 급증하는 추세에 있다. 그러나 지금까지 AP-PCR기법의 효용성을 다른 미생물학적인 분류방법들과 비교 분석한 연구는 소수에 불과 했다⁵¹⁾.

따라서 본 연구에서는 단순하면서도 신속하게 균주를 동정할 수 있는 방법으로 확인된 arbitrarily primed PCR(AP-PCR) 과 통상적인 유전학적 기법인 probe를 이용한 Southern blot Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP) 방법을 이용하여 아동의 구강내에 상주하는 *S. mutans*의 DNA fingerprinting pattern을 비교 관찰하여, 두 방법간의 상호 관련성을 모색 하고, 아울러 치아우식의 원인균에 대한 유전적 분류에 응용하고자 본 연구를 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 대상아동의 선정 및 치태채취

본 연구는 영구치가 맹출되지 않은 유치열만을 가진 3-6세 어린이의 치태내에 포함된 *S. mutans*를 대상으로 실험을 진행하였다. 구강검진 결과 우식 경험 유치지수(dmft index)가 10 이상인 아동 4명과 현존의 우식와동이 없으면서 위생상태가 양호한 것으로 판단된 아동 4명을 본 연구의 대상으로 선택하였다. 멸균소독된 wooden wedge를 이용하여 구강내 전치부 순면 및 구치부 인접면에서 치태를 채취한 후, 멸균 생리 식염수가 들어있는 tube에 희석한 후 시험균액으로 사용하였다.

2. 선택배양

*S. mutans*의 선택배양을 위해서는, MS(Mitis salivarius) agar 에 20% sucrose와 0.2 unit/ml의 bacitracin을 첨가한 mitis-salivarius-bacitracin(MSB) 배지를 이용하였다. 피검자의 시험균액을 Vortex test-tube mixer에서 균질화한 후, 멸균된 면봉으로 평판배지상에 시료를 균일하게 도말하였다. 37°C CO₂ incubator 내에서 48시간 동안 배양한 후 실온에서 24시간 동안 배양하였다.

배양결과 나타난 각각의 집락을 순수분리하기 위

하여 1% yeast extract가 포함된 Brain Heart Infusion(BHI) agar plate 에 각각의 single colony를 도말한 후 37°C CO₂ incubator 내에서 48시간 동안 배양하였다. 순수 배양된 각각의 균주는 5% sucrose가 함유된 BHI broth에 37°C CO₂ incubator 내에서 24시간 동안 배양한 후 DNA분리에 사용하였다.

3. Genomic DNA의 분리

BHI broth에서 배양된 균체를 모으기 위해 5분간 microcentrifuge(FISHER Scientific사 Model 235)에서 원심분리하고 상등액은 버린다. lysozyme (6 x crystallised, Seikagaku Kogyo Co., Tokyo) 0.5 mg/ml 및 N-acetylmuramidase(Seikagaku Kogyo Co.) 0.1mg/ml를 함유한 STE(10mM Tris-HCl, pH 8.0; 100mM NaCl; 1mM EDTA, pH 8.0) buffer 100ml에 현탁한 검체를 37°C에서 60분간 배양한 후 원심분리하여 100ml의 lysis buffer(50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.3, gelatin 0.1mg/ml Nonidet P-40, 0.45% 및 80mg of proteinase K가 첨가된 Tween 20, 0.45%)에 재차 현탁하여 60°C에서 60분간 반응시킨 후 현탁액 내의 proteinase K 및 잔존하는 세포단백 분해효소 와 핵분해효소를 in-activate시키고, 100°C에서 5분동안 가열하였다. 위 반응액과 동량의 Phenol Chloroform Isoamylalcohol (PCIA)액을 넣어 잘 혼합하여 5분간 원심분리하여 상등액을 취하고 Ethanol로 침전시킨다. 70% ethanol로 한 번 세척한 후 상온에서 ethanol이 완전제거될 때까지 건조시켜 TE(10mM Tris HCl(pH 8.0), 1mM EDTA) 50µl에 DNA를 녹여 -20°C에서 보관하여 실험에 사용하였다.

4. Detection of *S. mutans*

특별히 1272-bp fragment 부위를 증폭시킬 수 있는 *dexA* DNA sequence⁵²⁾(GenBank accession no. D49430)에 근거한 primer로 SD1 및 SD2를 제작하여 사용하였으며 각각의 염기배열은 5'-TAT GCT GCT ATT GGA GGT TC-3' (positions 973 to 992) 와 5'-AAG GTT GAG CAA TTG AAT CG-3' (positions 2225 to 2244)였다. PCR 혼합액(20µl)은 10mM Tris-HCl(pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 200µM dNTP, 10pmol oligonucleotide primer 및 2.5U *Taq* DNA polymerases(Takara

Shuzo Co., Kyoto, Japan) 으로 구성된 것을 사용하였다. PCR 과정(Eppendorf 5330)은 먼저 94°C에서 3분동안 initial denaturation을 시행한 후 95°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C로 1분간 extension을 1cycle로 26 cycle을 반복 시행한 다음 마지막 1 cycle은 94°C 1분, 55°C 1분, 72°C 5분으로 시행하였다. PCR 결과로 생긴 산물은 1.0% agarose gel 상에서 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 DNA finger printing pattern을 관찰하였다.

5. AP-PCR

분석 가능한 유전자 지문을 얻기 위하여 10개의 염기로 구성된 30종의 random sequence primer (Operon Technologies, Inc., Alameda, CA, USA) 중 예비실험을 거쳐 OPA-05, 5'-AGG GGT CTT G-3', OPA-06, 5'-GGT CCC TGA C-3', OPA-18, 5'-AGG TGA CCG T-3' 등 3종의 primer를 사용하기로 하였다. AP-PCR 혼합액(20 μ l)은 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTP, 10 pmol oligonucleotide primer 및 2.5 U Taq DNA polymerases(Takara Shuzo Co., Kyoto, Japan) 으로 구성된 것을 사용하였다. PCR 과정(Eppendorf 5330)은 먼저 94°C에서 5분동안 initial denaturation을 시행한 후 94°C에서 1분간 denaturation, 36°C에서 2분간 annealing, 72°C로 2분간 extension을 1 cycle로 2 cycle을 시행한 다음 94°C 1분, 42°C 2분, 72°C 2분으로 30 cycle을 추가로 시행한다음 72°C에서 10분간 반응시켰다. PCR 결과로 생긴 산물은 2.0% agarose gel 상에서 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 DNA finger printing pattern을 관찰하였다.

6. Southern Blot Analysis⁵³⁾

표지자는 Kuramitsu 교수(State University of New York, Buffalo)로부터 제공받은 pTSU5 플라스미드에 클론된 *gfb* 유전자를 사용 하였다. 제한효소 *EcoRI*과 *BamHI*으로 절단한 1.6kb 크기의 유전자 조각을 nick translation으로 [³²P- α CTP]에 의해 표지시켜 사용 하였다. Southern blot의 경우, 배양된 *S. mutans*의 DNA를 추출하여 제한효소 *EcoRI*과 *BamHI*으로 절단한 다음 1% agarose gel

에서 전기영동하여, charged nylon membrane에 20xSSC에 의한 capillary transfer를 시행 하였다. Transfer후 UV-crosslink 한 후 probe와 hybridize 하였고, X-ray film에 -70°C에서 16 시간 동안 감광시켜 관찰 하였다.

7. 관련성 분석 및 통계처리

개인별로 이들 3가지 primer로 나타난 결과물 band의 유무에 따라 1과 0으로 표시하고 NTSYS-p(numerical taxonomy system and multivariate analysis system)에서 변환후 unweighted pair-group arithmetic average analysis(UPGMA)로 cluster analysis를 시행하였다. cluster analysis는 *S. mutans* 114 검체에 대한 유전적 관련성을 조사하여 Phenogram을 제작하는데 이용하였으며, cophenetic correlation은 수치가 높을수록 일치율이 높음을 의미한다.

III. 연구 성적

1. 세균의 동정

8명의 피검 아동 중 2명에서는 MSB배지에서 세균의 집락이 관찰되지 않았다. 피검아동으로부터 채취한 치태의 희석액을 MSB배지에서 배양하여 세균의 집락이 형성되었다. 6명의 피검 아동으로부터 MSB 배지상에서 배양된 집락의 외형과 색조 및 기타 육안적인 특징을 기준으로 *S. mutans*로 판단되는, 각각의 균주로부터 PCIA법으로 DNA를 추출하였다. *S. mutans*가 분비하는 세포외효소 중 dextranase와 관련된 *dexA* gene을 이용한 PCR을 통하여 agarose gel 상에서 전기영동하여 1272 bp 부위에 DNA band 가 나타난 시료 만을 *S. mutans*로 판정하였다(그림 1). PCR결과 전체 155검체 중 143 검체 (92.3%)에서 DNA band가 관찰되어 최종적으로 *S. mutans* 로 결정하였다(표 1).

2. AP-PCR 및 Cluster Analysis

10-base oligonucleotide로 구성된 30종의 primer 중 에서 3종류의 primer를 사용하여 6명의 아동에서 분리된 114 검체에 대하여 AP-PCR을 시행한 후 얻은 DNA fingerprinting profile에서는 사용한 primer에 따라 250 - 10,000 bp 사이에서 4-8개의

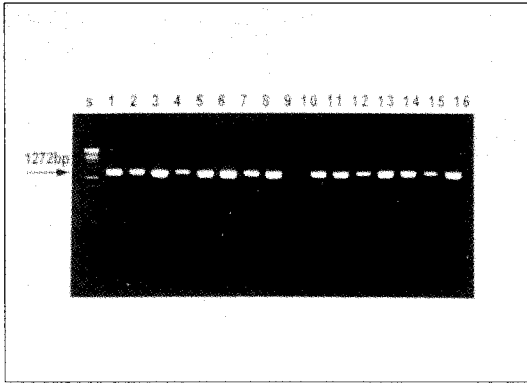


Fig. 1. Polymerase chain reaction amplification of the *dexA* DNA sequence in oral isolates of *S. mutans*.

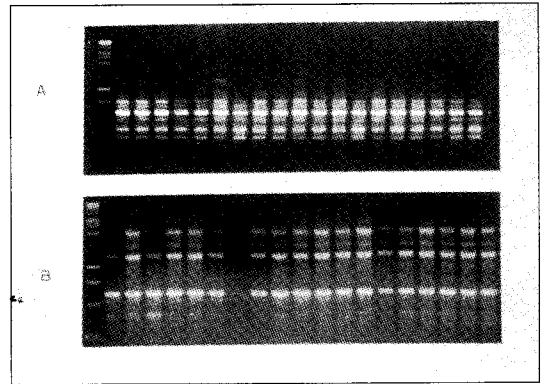


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of AP-PCR fingerprints in *S. mutans* isolates from children. A: Normal children B: Caries children

Table 1. Identification of *S. mutans* among colony on MSB agar plates

child No.	isolated strain	<i>S. mutans</i> (%)
1	23	21 (91.3)
2	21	20 (95.2)
3	34	33 (97.1)
4	22	20 (90.9)
5	23	21 (91.3)
6	32	28 (87.5)
Total	155	143 (92.3)

DNA band 가 나타났다(그림 2).

또한 개인별로 나타난 결과를 NTSYS-pc(numerical taxonomy system and multivariate analysis system)에서 cluster analysis를 시행하고 *S. mutans*에 대한 유전적 관련성 조사를 위한 phenogram을 제작한 결과 type 1-14로 형을 분류할 수 있었으며(그림 3), 그 중 type 1, 2, 11이 각각 19예로 가장 많았으며, 다음이 type 12, 8, 3 순으로 각각 16, 15, 9예로 나타났으며 나머지 type 들은 1-5예들을 차지 하였다(표 2).

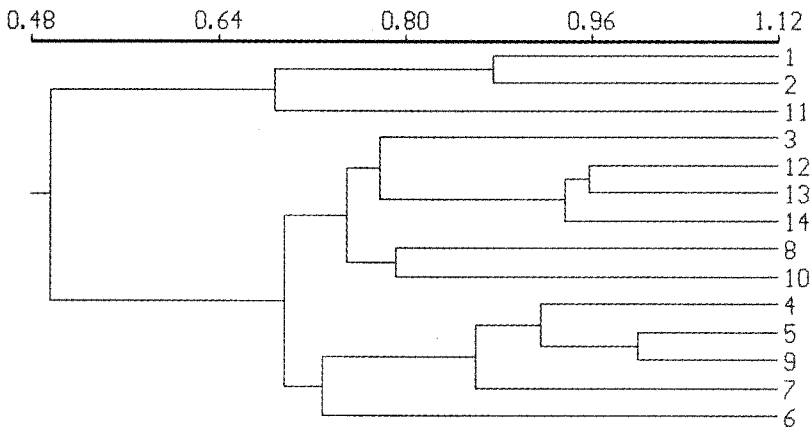


Fig. 3. Phenogram showing estimates of the cophenetic correlation values using the result of AP-PCR with 3 primers among 114 *S. mutans* samples.

Table 2. Distribution of *S. mutans* subtypes by AP-PCR in normal children and children with rampant caries (%)

Type	Normal children		Rampant caries children			
	Sample 1	Sample 2	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
1	19(100)					
2		19(100)				
3			9(47.4)			
4			5(26.3)			
5			1(5.3)			
6			4(21.0)			
7				2(10.5)		
8				15(78.9)		
9				1(5.3)		
10				1(5.3)		
11					19(100)	
12						16(84.2)
13						1(5.3)
14						2(10.5)

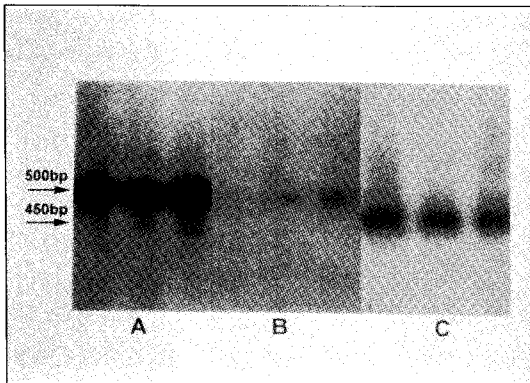


Fig. 4. Southern blot analysis of chromosomal DNA of *S. mutans*, hybridized with 1.6 kb *Bam*HI fragment of the pTSU5 *gfb* gene. A: Normal children B,C: Caries children

이 중 치아우식이 없는 건강한 아동에서는 type 1과 2 두 종류만 발견되었으며, 다발성 치아우식을 가진 아동에서는 type 11을 제외하면 3-14의 12 가지 유전자형이 각각 1-16예로 다양한 분포로 나타났다.

3. Southern blot RFLP

분리된 genomic DNA에 labelled DNA 표지자를 hybridization한 결과는 그림 4에 제시된 바와 같다. 전체적으로 2가지 위치에서 band가 관찰되었으며 건강한 아동과 우식아동간의 일반적인 차이는 인정되지 않았다. 우식아동 내에서는 450 bp 부위에서 band pattern을 보인 경우와 500 bp 부위에서 band가 나타나는 2가지로 대별할 수 있었다.

IV. 총괄 및 고안

치아우식의 병인에 대한 탐구는 역사적으로 매우 오래되지만 1955년 Orland 등은 무균동물을 이용하여 치아우식발생에 있어서 미생물의 존재가 필수적임을 밝힌 이래 1950년대 말까지만 하여도 우식원성 세균으로 *Lactobacillus*가 지목되어 왔으나 1960년 Fitzgerald 등⁵⁴⁾은 무균동물을 *Streptococcus*의 단일 균종으로 감염시켜 치아우식이 발생하였음을 보고한 후 우식 발생에 있어서 *S. mutans*의 병인론적 연구가 활발하게 진행되어 왔다. *Mutans streptococci*는 치아우식을 유발하는 주된 원인균의 집단으로 5종류 및 8가지 혈청형으로 분류할 수 있

다.²⁾ 이는 *S. cricetus*(serotype a), *S. ratus*(serotype b) *S. mutans*(serotype c,e and f), *S. sobrinus*(serotype d and g) 및 *S. downei*(serotype h)로 세분된다. *S. mutans*는 교합면 와, 교합면 열구 및 평활면 우식 등 모든 형태의 치아우식을 일으킬 수 있음이 보고되어 있고⁵⁵⁾, 아동의 치아우식경험과 우식활성 간에는 매우 높은 상관관계가 있음을 보고하고 있다^{56,57)}. 따라서 본 연구에서는 유치의 우식경험율을 바탕으로 우식활성이 높은 아동과 건강한 아동을 선정하였다. 우식이 없는 건강한 아동으로 선정된 4명 중 2명에서 균주가 분리되지 않은 것은 치태내의 세균 수가 배지상에서 자랄 수 있는 수준(minimum concentration)에 도달하지 못한 경우 및 배양조건상 까다로운 혐기성 상태가 유지되지 못한 데 기인할 수 있다. 그러나 구강내에 상주하는 Streptococcus의 경우에는 통성혐기성조건에서도 정상적인 배양이 가능하므로 전자에 기인할 가능성이 더 높다 할 수 있다²⁾.

구강내에 존재하는 세균중에서 *S. mutans*의 동정을 위한 여러 방법들이 시도되어 왔지만 과정이 복잡할 뿐 아니라 감수성이 낮은 단점이 있었다. 이러한 한계를 극복하기 위하여 PCR기법이 유용하다. 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 cycle후 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.⁵⁸⁾ *S. mutans* 균주는 구강내에서 세포의 단백질질로 dextranase를 생산하는데 이는 *S. mutans*가 유발하는 치아우식의 유발인자 중 하나로 생각된다⁵⁹⁾. 본 연구에서 균주의 동정과정에서 사용된 primer로는 *S. mutans*의 특정균주로부터 분리된 dextranase gene(*dexA*)을 이용하여 설계하였다. 이를 이용한 PCR결과로 전기영동하여 얻은 상에서는 1272 bp 부위에 특정한 DNA band가 나타나 *S. mutans*임을 용이하게 판별할 수 있다. 본 연구에서도 균주를 배양한 MSB 배지 상에서 집락의 형태, 색깔, 성장등의 특징을 기준으로 한 동정법을 PCR기법으로 확인한 결과,

검사 대상 155 균주 중 143 균주(92.3%)에서 *S. mutans*임이 확인되었다. 그러나 여타의 생화학 및 혈청형 검사등을 시행한다 하더라도 여전히 실험과정 및 판단기준에 따른 오차가 개재될 가능성은 유전자를 이용한 PCR방법보다는 클 것으로 생각된다. 따라서 본 실험에 이용한 PCR기법을 이용한 *S. mutans*의 동정기법은 임상시료로부터 *S. mutans*를 동정하는데 감수성을 증가시키면서 간편하고 신뢰성있는 방법임을 다시 한번 확인할 수 있었다.(표 1.)

사람에 있어서 특정한 세균이 치아우식 발생과 관련되어 있음을 직접 임상적인 실험을 통하여 증명하는 일은 방법적 및 윤리적인 면에서 지극히 어렵고, 따라서 역학적인 연구를 통한 간접적인 연구방법이 많이 이용되어 왔다. 역학적 연구조사 방법에는 구강내 치태혼합물 혹은 타액으로부터 분리된 미생물과 구강전체의 우식활성과의 연관성 조사^{56,57)}, 치아우식이 진행된 부위와 건전한 부위에서 채취한 치태간의 특정 미생물의 존재에 관한 연관성 조사^{59,60)} 등을 들 수 있다. 그러나 이러한 조사 방법 또한 균주의 정확한 동정을 확인하는 과정이 복잡하고 중도에 오차가 생길 확률이 높아 민감도나 특이성에 있어 많은 문제점을 노출시켜온 것이 사실이다. 최근에는 지금까지 알려진 전통적인 probe를 이용한 유전자 기법보다 신속하고 간편하면서도 민감도나 특이성이 뛰어난 새로운 실험기법들이 구강미생물에 대한 subtyping에 도입되었다. 이러한 측면에서 *S. mutans*를 특이성, 민감도를 높이는 방향으로 세분할 필요성이 부각된다. 따라서 본 연구에서는 재현성이나 민감성, 간편성 등이 확인된⁶¹⁾ AP-PCR기법을 이용하여 기존의 분류방법인 probe를 이용한 Southern blot RFLP와 비교분석함으로써 AP-PCR 기법의 *S. mutans* 유전적 분류에 있어서 유용성과 적합성을 확인하고자 하였다.

실험에 사용된 *S. mutans* 검체는 치아우식이 광범위하게 진행된(dmft index 10 이상) 아동 4명과 육안적으로 치아우식증이 없는 아동 4명의 구강내에서 분리한 균주를 대상으로 하였다. 그 결과 임상적으로 치아우식증이 없는 아동에서는 동일개체내의 대부분의 *S. mutans* 검체로부터 다수의 동일한 형태의 AP-PCR DNA fingerprints pattern을 나타

냄을 알 수 있었다(표 2). 이러한 사실은 건강한 아동의 구강내에 존재하는 *S. mutans*의 유전적 성질을 암시하는 것으로 사료된다. 즉, 건강한 아동에서 많이 발견되는 유전형은 산생성능이나 치아우식에 미치는 영향이 미미할 것이라는 추정이 가능하다. 또한 미생물의 독성과 관련하여 다발성 우식을 지닌 아동에서 분리된 검체에서 특정한 DNA fingerprints pattern이 나타나지 않은 사실은 장 등의 연구에서 주장한 다발성 우식아동에서 주된 type의 유전형이 나타난다는 보고와는 차이를 보인다. 이는 장 등의 연구에서는 *S. mutans*를 배지상에서 집락의 형태나, 단순한 생화학 검사법으로 동정하는 과정에서 오차가 있을 가능성이 있다고 사료된다. 그러나 본 연구에서는 이러한 *S. mutans*에 대한 동정은 *dexA* gene을 이용한 PCR기법으로 확인하였으므로 비교적 신뢰할 수 있다고 사료된다.

Southern blot 결과(그림4)에서 각각 450 및 500 bp에서 band pattern이 나타나 서로 다른 군주로 확인된 B군과 C군에서는 AP-PCR결과를 분석한 phenogram에서도 type 11과 3, 4, 5, 6 등으로 분명한 차이가 나타났으며(그림 3), A와 B는

500 bp 부위에서 동일한 band pattern을 보여 Southern blot analysis에서는 동일한 유전형으로 분류된 경우에도 AP-PCR결과를 phenogram으로 분석하면 두 가지 군주는 서로 다른 유전자형을 보이는 것으로 나타났다. 따라서 AP-PCR 기법에 의한 유전자형 분류법은 기존의 Southern blot기법에 비하여 변별력이 매우 향상된 사실을 확인하였다.

본 연구에서 도입한 NTSYS-pc program은 DNA band의 유무에 따라 0과 1의 조합으로 data matrix를 작성하고, 이를 다시 표현형이 유사한 집단으로 재배치 하여 분류하는 다변수형 분석체계를 이용한다²⁰⁾. 이러한 분석법을 이용하여 AP-PCR결과에 대한 분석결과, OPA 5 primer를 사용한 경우 9종의 서로 다른 표현형에 대한 상호 유사성 및 일치율의 정도를 알 수 있었다(그림 5). 즉 일치율이 1.0 인 경우에는 DNA band pattern이 정확히 일치함을 나타내고, 일치율이 0에 가까울수록 전혀 다른 표현형을 나타냄을 의미한다. 여타의 2가지 primer에 대하여도 같은 방법을 적용한 결과 각각 10, 12가지 유전자형을 확인 할 수 있었다. 본 연구에서는 3가지 primer로 처리하여 얻은 114개의 대상검체에 대한 자료를 토대로

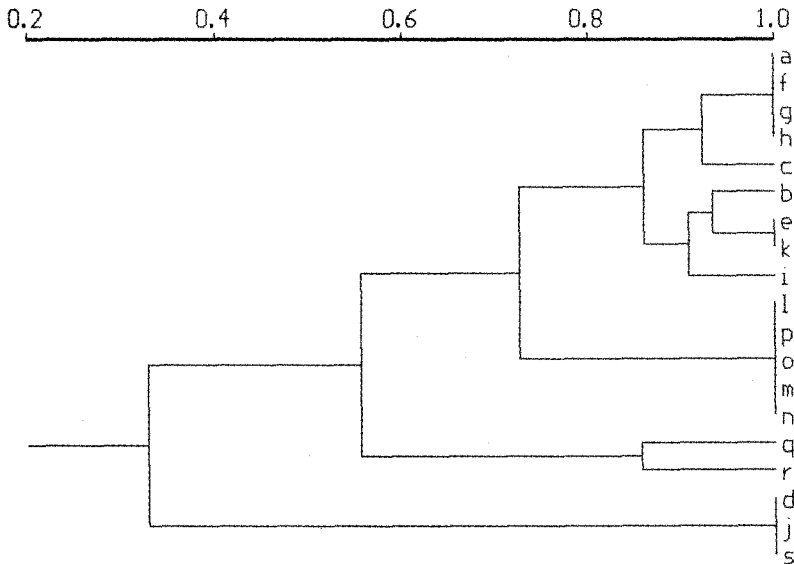


Fig. 5. Phenogram showing estimates of the cophenetic correlation values using the result of AP-PCR with OPA-5 primer.
a-s: experimental samples

개인별로 종합한 결과 phenogram상에서 일치율을 0.9 이상으로 높게 선정하여 분류할 경우, agarose gel 상의 artifact나 minor band 등의 영향에 의한 오차를 전부 수용하는 것이 불가능하며, 30종 이상의 유전형으로 세분하는 것은 임상적인 의미가 적을 것으로 판단하고, 0.8 수준에서 유사성을 비교하여 표현형을 분류하기로 하였다. 이러한 개념에 입각하여 파악한 AP-PCR결과는 *S. mutans*를 최종적으로 14가지 유전형별 type으로 분류하였다(그림 3).

AP-PCR은 DNA finger printing을 위한 primer에 대한 선택의 폭이 넓은 장점이 있고 Southern blot 분석법에 비하여 조작이 간편한 장점이 있다. 그러나 PCR 분석법도 온도변화에 따른 band pattern의 변화가 심하고, genomic DNA, primers, nucleotides 및 MgCl₂의 농도에 민감하므로 AP-PCR을 이용한 유전자 분석법은 관련된 여러 요소들의 세심한 조절이 필요하다⁵¹⁾. Southern blot 분석법의 장점은 생성된 hybridization pattern이 단순하므로 개인의 *S. mutans* 균주에 대한 유전자형 분류를 명확히 할 수 있다. AP-PCR은 여러 종의 세균 중에서 특정 세균을 감별할 수 있게 했다. 수종의 virulent H. somnus strain은 표현형이 동일할 경우에는 거의 일정한 AP-PCR fingerprint를 나타내는데 이러한 사실은 동종 균주내에서 독성을 지닌 균주는 동일한 유전적 기원을 지닐 가능성을 암시한다⁶²⁾.

본 연구에서 밝혀진 바를 응용하면 건강한 어린이와 다발성 치아우식을 보이는 아동에서 분리된 *S. mutans*의 유전자형 각각에 대한 산 생성능이나 치아에 대한 부착능, 독성, 친화도 등을 비교 분석함으로써 상대적으로 우식 유발능이 높거나 낮을 것으로 예상되는 유전자형을 신속하고 정확하게 찾아내고, 이들을 대상으로 인공우식 유발 실험을 거쳐 독성 및 우식에 대한 기여도를 평가하여야 할 것이다. 이러한 종합적인 결과를 바탕으로 궁극적으로는 어린이에서 치아우식의 위험성에 대한 조기예측 및 나아가 우식병소의 발생자체를 미리 예방할 수 있는 가능성을 열기 위한 토대를 마련했다는 점에 의의가 있다고 하겠다.

IV. 결 론

본 연구에서는 유치열기 아동의 치태내의 치아우식 원인균으로 알려진 *S. mutans*의 유전자형을 분류하기 위한 arbitrarily primed PCR(AP-PCR)과 통상적인 유전학적 기법인 probe를 이용한 Southern blot Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 방법을 이용하여 아동의 구강내에 상주하는 *S. mutans*의 DNA fingerprinting pattern을 비교 관찰하여 유전학적 분류의 적합성 및 두 방법간의 상호 관련성을 모색 하고자 본 연구를 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 3종의 primer를 이용한 AP-PCR에서는 primer에 따라 9, 10, 12 가지의 유전자형을 확인 할 수 있었다.
2. AP-PCR 결과 *S. mutans*의 유전자형을 개체별로 종합한 결과 최종적으로 14 가지 type으로 분류할 수 있었으며, Southern blot analysis에서는 2 가지 band pattern을 보여 AP-PCR에 의한 분류법이 변별력이 높았다.
3. AP-PCR은 단독 또는 Southern blot 기법과 함께 아동의 구강내 *S. mutans*에 대한 유전자형 분류에 유용한 방법임을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Bowen WH.:Dental caries:is it an extinct disease? JADA 122(9):49-52, 1991.
2. McGhee JR., Michalek SM., Cassell GH:Dental microbiology. pp 679-690. Harper & Row, Publishers.
3. Hamada S., Slade HD.:Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol. Rev. 44:331-384, 1980.
4. Loesche WJ.:Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol. Rev. 50:353-383, 1986.
5. Munro CL., Macrina FL.:Sucrose-derived exopolysaccharides of *Streptococcus mutans* V403 contribute to infectivity in endocarditis. Mol. Microbiol.,8:133-142, 1993.

6. Bowden G., Johnson J. and Schachtele, C.: Characterization of Actinomyces with ribosomal-RNA gene probes, J.Dent. Res. 72:1171-1179, 1993.
7. Lenski RE.: Assessing the genetic structure of microbial populations, Proc Natl Acad Sci USA, 90:4334-4336, 1993.
8. Barletta RG., Michalek SM. and Curtiss R.3rd: Analysis of the virulence of *Streptococcus mutans* serotype c *gffA* mutants in the rat model system, Infect Immun. 56(2):322-330, 1988.
9. Munro C., Michalek SM. and Macrina FL.: Cariogenicity of *Streptococcus mutans* V403 glucosyltransferase and fructosyltransferase mutants constructed by allelic exchange, Infect Immun 59(7):2316-2323, 1991
10. 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.
11. Kuramitsu HK. and Nakano YJ.: Mechanism of *Streptococcus mutans* glucosyl -transferases: hybrid-enzyme analysis, J.Bacteriol. 174(17):5639-5646, 1992.
12. Hanada N. and Kuramitsu HK.: Isolation and identification of the *Streptococcus mutans gffD* gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis, Infect. Immun. 57(7):2079-2085, 1989.
13. van Belkum A., et al.: Multicenter evaluation of Arbitrary Primed PCR for Typing of *Staphylococcus aureus* strains, J. Clin. Microbiol 33(6):1537-1547, 1995.
14. Eisenstein BI.: New Molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases, J. Infec. Dis., 161:595-602, 1990.
15. 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.
16. Woese CR.: In Evolution in Prokaryotes, Schleifer KH and Stackebrandt E.(ed) Academic Press, 1986.
17. DeLong EF., Wikham GS. and Pace NR.: Phylogenetic stains: ribosomal RNA- based probes for the identification of single cells, Science, 243:1360-1363, 1989.
18. 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.
19. Mullis KB. and Faloona FA.: Specific synthesis of DNA in vitro via PCR, Methods Enzymol. 155:335-350, 1987.
20. 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.
21. McCabe PC.: PCR Protocols: A guide to methods and applications, Academic Press, pp.76-83, 1990.
22. Caufield PW., et al.: Plasmids in *Streptococcus mutans*: usefulness as epidemiological markers and association with mutacins, In S. Hamada et al.(ed) Molecular microbiology and immunology of *Streptococcus mutans*, Elsevier Science Publishing Inc., New York, 1986. pp. 217-223.
23. 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.
24. Masuda N., et al.: Transmission of *Streptococcus mutans* in some selected families, Microbios, 44:223-232, 1985.
25. Rogers AH.: Evidence for the transmissibility of human dental caries, Aus. Dent.J., 22(1):53-56, 1977.
26. Kolstad RA.: Strain typing of Oral streptococci by the use of Bacterial antagonism, J. Dent. Res., 55:A154-A165, 1976.
27. Rogers AH.: Bacteriocinogeny and properties

- of some bacteriocins of *Streptococcus mutans*, Arch. Oral Biol., 20:853-858, 1972.
28. 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.
 29. Russel, RRB.: The application of molecular genetics to the microbiology of dental caries, Caries Res., 28:69-82, 1994.
 30. 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.
 31. Kozai K., et al.: Changes of strains of mutans Streptococci induced by treatment with Chlorhexidine varnish, J. Dent. Res., 70(9):1252-1257, 1991.
 32. Russel RRB.: Genetic analysis and genetic probes for oral bacteria, In: Fersufson DB, ed. Frontiers of oral physiology - aspects of oral molecular biology, Basel, Karger, 1991, pp.57-76.
 33. Smorawinska M. and Kuramitsu HK.: DNA probes for detection of cariogenic *Streptococcus mutans*, Oral Microbiol. Immunol., 7:177-181, 1992.
 34. Lowe J.B.: Clinical application of gene probes in human genetic disease, malignancy and infectious diseases, Clin Chim Acta, 157:1-32, 1986
 35. Hamada S. and Slade HD.: Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*, Microbiol Rev. 44:331-384, 1980.
 36. Welsh J. and McClelland, M.: Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, Nucleic Acids Res. 18(24):7213-7218, 1990.
 37. Bej AK., Mahbubani MH., Atlas RM.: Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction(PCR) and other methods and their applications. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26:301-334, 1991.
 38. Pallen MJ., Butcher PD.: New strategies in microbiological diagnosis. J. Hosp. Infect. 18:147-158, 1991.
 39. Gumerlock PH., Tang YJ., Mayers FJ., Silver J.: Use of the polymerase chain reaction for the specific and direct detection of *Clostridium difficile* in human feces. Rev. Infect. Dis., 13:1053-1060, 1991.
 40. Welsh J. Peterson C, McClelland M.: Polymorphisms generated by arbitrary primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. Nucleic Acides Res., 19:303-306, 1991.
 41. Welsh J., McClelland M.: Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acides Res., 18:7213-7218, 1990.
 42. Williams JGK, et al.: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acides Res., 18:6531-6535, 1990.
 43. Welsh J. and McClelland M.: Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, Nucleic Acids Res, 18:7213-7218, 1990.
 44. 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
 45. 장명조, 김신: AP-PCR을 이용한 다발성 우식 아동의 구강내 *Streptococcus mutans*의 유전자형 분류, 대한소아치과학회지 24(1):65-80, 1997.
 46. 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.
 47. Saunier 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.
 48. 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.
 49. van Belkum A., et al.: Comparison of 4 genotyping assays for epidemiological study of me-

- thiicillin resistant *Staphylococcus aureus*, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis, 13:420-424, 1994.
50. 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.
 51. Slots J., et al.:Evaluating two methods for fingerprinting genomes of Actinobacillus actinomycescomitans. Oral Microbiol. Immunol, 8:337-343, 1993.
 52. Igarashi T., Yamamoto A., Goto N.:Sequence analysis of the *Streptococcus mutans* Ingbritt dex A gene encoding extracellular dextranase. Microbiol. Immunol., 39:853-860, 1995.
 53. 김구호, 김신:모자간의 구강내 *Streptococcus mutans* 유전자형의 상사성에 관한 연구, 대한소아치과학회지, 23(1):109-125, 1996.
 54. Fitzgerald RJ., Jordan HV. and Stanley HR.: Experimental caries and gingival pathologic changes in the gnotobiotic rat. J. Dent. Res., 39:923-935, 1960.
 55. Loesche WJ. et al.:Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay., Infect. and Immun., 11:1252-1260, 1975.
 56. 김각균 등:한국아동의 치아우식 경험과 치면상 *Streptococcus mutans* 분포에 대한 연구. 대한미생물학회지, 18(1):11-21, 1983.
 57. Alaluusua S. and Renkonen OV.:*Streptococcus mutans* establishment and dental caries experience in children from 2 to 4 years old. Scand. J. Dent. Res., 91:453-457, 1983.
 58. 김 상호, 김 상용:Polymerase chain reaction, 분자유전학노트, KIST유전공학연구소, 1995, pp.100-124.
 59. Keen HJ., Shklair IL. and Hoerman KC.:Partial elimination of *Streptococcus mutans* from selected tooth surfaces after restoration of carious lesions and SnF₂ prophylaxis. JADA, 93:328-333, 1976.
 60. Ikeda T. Sandham HJ. and Bradley EL.: Changes in *Streptococcus mutans* and lactobacilli in plaque relation to the initiation of dental caries in negro children. Arches. oral Biol., 18:555-566, 1973.
 61. Byun, DE, Shin JH, Ryang DW, et al.: Molecular Epidemiologic Analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from Clinical Specimens.
 62. Myers LE, Silva SVPS, Procnier JD, Little PB.:Genomic fingerprinting of "Haemophilus somnus" isolates by using a random-amplified polymorphic DNA assay. J. Clin. Microbiol. 31:512-517, 1993.