International Journal of Oral Biology, Vol. 35, No. 1, March 31 2010, p. 21~25
Copyright ⓒ 2010, *The Korean Academy of Oral Biology*

International Journal of Oral Biology

Development of Species-Specific PCR Primers for the Detection of *Streptococcus sobrinus*

Sang-Gon Kim[1], So Young Yoo[2], and Joong-Ki Kook[2]*

[1]Department of Human Biology and [2]Oral Biochemistry, School of Dentistry, Chosun University 375 Seo-Suk Dong, Dong-ku, Gwangju 501-759, Korea

(received December 24, 2009 ; revised January 19, 2010 ; accepted January 29, 2010)

This study was undertaken to develop species-specific forward and universal reverse PCR primers for the detection of *Streptococcus sobrinus*. These primers target the variable regions of the 16S ribosomal RNA coding gene (rDNA) and their specificity was tested against 10 strains of *S. sobrinus* strains and 20 different species of oral bacteria using serial dilutions of the purified genomic DNA of *S. sobrinus* ATCC 33478^T. Our data show that species-specific amplicons were obtained from all the *S. sobrinus* strains tested but not from other species. Both direct and nested PCR could detect as little as 400 pg and 4 fg of genomic DNA from *S. sobrinus* ATCC 33478^T, respectively. This result suggests that these PCR primers are highly specific and sensitive and applicable to the detection of *S. sobrinus*.

Key words: detection, PCR primers, *S. sobrinus*

서 론

치아우식증은 숙주요인, 병원체요인, 식이요인 및 시간요인 등의 복합적인 원인에 의해 발병 및 진행되는 것으로 알려져 있고, 이들 중 병원체 요인에 속하는 치면세균막내 세균이 주요한 원인인 것으로 알려져 있다. 즉, 일종의 세균 감염성질환이라고 할 수 있다. 현재 구강 내에는 500여 종의 세균이 존재하는 것으로 알려져 있으며(Paster 등, 2001), 이들 중 치아우식증의 주요한 원인균들을 mutans streptococci(뮤탄스 연쇄상구균)라고 총칭한다(Whiley와 Beighton, 1998). 이러한 뮤탄스 연쇄상구균에는 *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus macacae* 및 *Streptococcus ferus*등이 속한다(Whiley and Beighton, 1998). Kawamura 등(1995)은 16S 라이보솜 RNA 유전자(rDNA)의 핵산염기서열을 바탕으로 구강 내 존재하는 연쇄상구균을 6 가지 그룹으로 분류하였으며, 전술한 뮤탄스 연쇄상구균들 중 *S. macacae*와 *S. ferus*를 제외한 5가지 균종이 유전학적으로도 가장 가까운 것으로 분류하였다. 이들 뮤탄스 연쇄상구균들은 치면세균막 내에 존재하는 당질을 에너지 대사의 원료로 이용하고, 이러한 대사 산물로 젖산(lactic acid)을 포함한 유기산들을 분비하여 치면세균막내 pH를 낮춰서 법랑질을 탈회시킨다. 또한 이들 뮤탄스 연쇄상구균들은 세포외 다당류를 생산하여 치면세균막의 형성 및 성장을 촉진시키고, 치면세균막 내 에너지원인 당질이 고갈될 경우, 에너지원으로도 이용된다(Loesche 1986).

특정 세균감염성질환의 병원성세균을 검출하는 방법으로는 병소 샘플에서 현미경을 이용하여 직접 관찰하는 방법, 세균배양법, 생화학 검사법, 간접면역형광법, DNA 프로브법, 중합효소연쇄반응법 등이 있다. 이러한 방법 들 중 뮤탄스 연쇄상구균은 선택배지인 mitis-salviarius bacitracin (MSB) agar(Gold 등, 1973)를 이용하여 분리 동정할 수 있다. 하지만, 이러한 전통적인 방법은 비교적 정확하지 않고, 시간과 노동력이 많이 든다는 단점이 있다. 또한 최근의 연구에 의하면 MSB 배지에서 뮤탄스 연쇄상구균이 아닌 *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus sanguinis*, *Pantoea agglomerans* 등의 균종들도 자란다는 것이 보고되었다(Yoo 등, 2005). 그러므로, 이러한 세균배양법의 단점을 보완할 수 있는 뮤탄스 연쇄상구균의 검출법이 필요로 되었다.

*Corresponding author: Dr. Joong-Ki Kook, Departments of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University, 375 Seo-Suk Dong, Dong-ku, Gwangju 501-759, South Korea. Tel: 82-62-230-6877, Fax: 82-62-224-3706;
E-mail: jkkook@chosun.ac.kr

현재까지 개발된 세균 동정법 중에서 가장 신속하고 정확한 방법이 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)법이며, 세균의 종 수준에서 동정을 위해 가장 많이 이용되는 표적유전자가 16S rDNA이다(Tanner 등, 1994). 16S rRNA는 구조 RNA로서 진화하는 동안 종 수준에서 잘 보존된 유전자이며, 1.5 kbp의 크기를 가지고 있으며, 모든 세균 종에서 잘 보존된 부위와 상이한 부위가 존재하기 때문에 모든 세균을 검출할 수 있는 PCR 프라이머와 특정 균종만을 동정할 수 있는 PCR 프라이머를 설계하기 용이하다(Tanner 등, 1994). 이러한 특징을 갖기 때문에 구강 내 세균 종을 검출 및 동정할 수 있는 프라이머들이 많이 개발되어 있다(Ashimoto 등, 1996; Rupf 등, 2001).

최근 Sato 등(2003a)에 의해 *S. sobrinus*를 검출하기 위한 PCR 프라이머(SobF와 SobR)가 16S rDNA 핵산염기서열을 바탕으로 개발되었다. Sato 등(2003b)은 민감도(Sensitivity, PCR 프라이머로 검출할 수 있는 세균 지놈 DNA의 최소한의 양)를 높이기 위해 *S. sobrinus* JCM 5176 균주 지놈 DNA 10 fg까지 검출할 수 있음을 보고하였다. 아직 *S. sobrinus* 균주의 지놈 DNA 핵산염기서열이 밝혀져 있지 않았지만, *S. mutans* 지놈 DNA가 약 2 Mbp인 점(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi)을 감안해서 볼 때, *S. sobrinus*도 이와 비슷하다면 5마리까지 검출이 가능하다는 것을 의미한다. 본 연구에서는 Sato 등(2003a, 2003b)의 것보다 민감도가 뛰어난 프라이머쌍을 개발하고자 시행하였다.

실험재료 및 방법

세균 및 배양 조건

본 연구에 *S. mutans* ATCC 25175^T, *S. mutans* KCOM 1053, *S. mutans* KCOM 2759, *S. mutans* KCOM 1076, *S. mutans* KCOM 1055, *S. mutans* KCOM 1089, *S. mutans* KCOM 1082, *S. mutans* KCOM 1085, *S. mutans* KCOM 1086, *S. mutans* KCOM 1087, *S. mutans* KCOM 1089, *S. sobrinus* ATCC 33478^T, *S. sobrinus* KCOM 1061, *S. sobrinus* KCOM 1148, *S. sobrinus* KCOM 1149, *S. sobrinus* KCOM 1150, *S. sobrinus* KCOM 1151, *S. sobrinus* KCOM 1152, *S. sobrinus* KCOM 1153, *S. sobrinus* KCOM 1154, *S. sobrinus* KCOM 1155, *S. downei* KCTC 3634^T, *S. rattus* KCTC 3655^T, *S. cricetus* KCTC 3640^T, *S. anginosus* ATCC 33397^T, *Streptococcus thermophins* KCTC 3658^T, *Streptococcus mitis* KCTC 3556^T, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621^T, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586^T 및 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 33384^T 등의 세균을 이용하였다. 이들 균주들은 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA), Korean Collection for Type Cultures(KTCC, Daejeon, Korea) 또는 한국구강미생물자원은행(Korean Collection for Oral Microbiology, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 이들 세균들 중 연쇄상구균들과 포도상구균은 Todd Hewitt broth(TH broth, Difco Diagnostics, Detroit, MI, USA) 또는 TH broth에 1.5%가 되도록 Bacto agar(Difco Diagnostics)를 넣어 만든 TH agar에 접종하여 37°C세균배양기에서 24시간 세균 배양하여 사용하였다. *F. nucleatum* 균주는 Schaedler broth(Difco Diagnostics)에, *A. actinomycetemcomitans* 균주는 Trypticase Soy Broth(TSB, Difco Diagnostics)에 0.6% yeast extract, (Difco Diagnostics) 5% horse serum (Difco Diagnostics), 0.2 units(2.8 μg)/ml bacitracin(Sigma, St. Louis, MO., USA) 및 5 μg/ml vancomycin(Sigma)이 첨가된 배지에 접종하여 85% N_2, 10% CO_2, 5% H_2가 공급되는37°C 혐기성세균배양기에서 1-2일간 배양하여 다음 실험에 사용하였다.

세균 지놈 DNA의 추출

세균 배양액 1.5 ml를 10,000×*g*의 원심력을 이용하여 수확하고, 이를 인트론사(iNtRON Co., Seoul, Korea)의 G-spin^{TM} Genomic DNA Extraction Kit를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 지놈 DNA를 추출하였다. 즉, 수확한 세균에 50 μl의 Pre-incubation solution과 3 μl의 lysozyme solution을 넣고 잘 혼합한 다음 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 여기에 250 μl의 G-buffer solution을 넣고 잘 혼합한 다음 65°C에서 15분간 반응시키고, 250 μl의 Binding solution을 넣고 잘 혼합한 다음 vortexing하였다. 이러한 cell lysates를 G-spin^{TM} column에 넣고 10,000×*g*에서 1 분간 원심분리하였다. Column에 500 μl의 washing buffer A를 넣고 다시 1분간 원심분리하였다. 여기에 500 μl의 washing buffer B를 넣고 다시 1분간 원심분리하고, G-spin^{TM} column을 새로운 eppendorf tube에 넣고 100 μl의 elution buffer를 넣고 1분간 실온에 방치한 다음 10,000×*g*에서 1 분간 원심분리하여 세균 지놈 DNA를 추출하였다. 이들의 농도는 UV Spectrophotometer(Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech., UK)를 이용하여 측정하였으며, 이를 4°C에 보관하여 다음 실험에 사용하였다.

데이터 베이스를 통한 중합효소연쇄반응 프라이머의 설계 및 제작

GenBank의 데이터 베이스에서 기존에 이미 알려진 *S. sobrinus*, *S. mutans, S. downei, S. rattus* 및 *S. cricetus*의 16S rDNA 핵산염기서열을 얻었다. 이를 MegAlign 컴퓨터 프로그램(Lasergene, DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)을 이용하여 상동성을 분석하였고, *S. sobrinus* 16S rDNA 핵산염기서열을 바탕으로 하고, PrimerSelect 프로그램(DNASTAR Inc.)을 이용하여 프라이머 한 쌍

(Ss-F2, 5'-CAT TGG TAA CAC CGG ACT TGC-3' 및 Ss-R2, 5'-CGC CTG CGC TCC CTT TAC-3')을 설계하였다. 이 때 설계된 프라이머는 미국 미시간 주립대학에서 제공하는 Probe Match 프로그램(http://rdp8.cme.msu.edu/html/analyses.html)을 이용하여 종-특이성을 분석하였고, Bioneer사(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 프라이머를 제작하였다. 예상되는 PCR 증폭물의 크기는 550 bp이다.

PCR의 특이도 및 민감도 측정

앞에서 설계된 *S. sobrinus* 검출 및 동정을 위한 프라이머의 종-특이성을 알아보기 위하여, *S. sobrinus* 표준균주(ATCC 33478^T) 및 한국인에서 분리 동정된 9균주를 포함하여 이와 유전학적으로 가장 가까운 4종의 뮤탄스 연쇄상구균의 표준균주들과 3종의 구강 내 연쇄상구균의 표준균주 및 2종의 혐기성 세균의 표준균주 지놈 DNA을 주형으로 하여 PCR을 시행하였다. PCR은 *AccuPower*® PCR PreMix(Bioneer Corp.)를 이용하여 시행하였다. *AccuPower*® PCR PreMix에는 5 nmole씩의 4가지 deoxynucleoside triphosphate, 0.8 mole의 KCl, 0.2 mole 의 Tris-HCl(pH 9.0), 0.03 mole의 $MgCl_2$ 그리고, 1 unit의 *Taq* DNA polymerase가 들어있다. 여기에 4 μg의 세균 지놈 DNA와 20 pmoles의 Ss-F2 및 Ss-R2 프리이머를 넣고 PCR을 시행하였다. 이때 PCR은 Peltier thermal cycler(Model PTC-200 DNA engine^{TM}, MJ Research Inc., Watertown, MA, USA)로 시행하였다. 이 때 PCR 조건은 다음과 같았다. 초기 변성은 94°C에서 5분간 시행하였고, 변성(94°C, 30초), 결합(58°C, 30초) 및 중합(72°C, 30초)의 세 과정을 32회 반복하고, 추가적인 중합(72°C, 30초)을 10분간 시행하였다.

Ss-F2/Ss-R2 프라이머만의 *S. sobrinus* 표준균주(ATCC 33478^T)의 지놈 DNA에 대한 민감도와 27F와 1492R (Lane, 1991) 프라이머로 *S. sobrinus* 표준균주(ATCC 33478^T)의 16S rDNA를 증폭한 PCR한 반응물을 10배 희석한 것을 주형으로 Ss-F2/Ss-R2 프라이머의 민감도를 측정하였다. 이때 *S. sobrinus* 표준균주(ATCC 33478^T) 지놈 DNA는 4 ng에서 4 fg까지 10배씩 희석하여 사용하였다. PCR은 전술한 바와 같이 *AccuPower*® PCR PreMix와 PTC-200 DNA engine^{TM}을 이용하여 시행하였다.

PCR이 끝난 후 20 μl의 반응물 중 2 μl를 1.5% agarose gel과 Tris-acetate buffer(0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA, [pH8.0])를 이용해서 100 V에서 30분간 전기영동하였다. 증폭물은 ethidium bromide로 염색하여 UV transillumination로 발색시켜 크기를 확인하였다.

실험 결과

본 연구에서 설계된 프라이머 중 Ss-R2는 Probe Match 프로그램으로 *S. sobrinus* 균주의 16S rDNA 핵산염기 서열에서만 존재하는 것으로 조사되었다.

Ss-F2/Ss-R2 프라이머로 *S. sobrinus*의 표준균주 및 임상분리균주들과 더불어 구강 내 존재하는 연쇄상구균, 포도상구균 및 혐기성 그람음성 세균들의 표준균주 지놈 DNA를 대상으로 PCR을 시행한 결과 *S. sobrinus* 균주들에서만 예상한 것과 같은 550 bp의 증폭물이 증폭되었다(Fig. 1).

Ss-F2/Ss-R2 프라이머로 *S. sobrinus* 표준균주(ATCC 33478^T) 지놈 DNA를 증폭할 수 있는 최소 양은 40 pg이었다(Fig. 2).

모든 세균 종의 16S rDNA 대부분을 증폭할 수 있는 27F와 1492R 프라이머로 일차 PCR을 시행한 후, 그 PCR 산물을 10배 희석하여 Ss-F2/Ss-R2 프라이머로 2번째 PCR(nested PCR)을 시행한 결과 *S. sobrinus* ATCC 33478^T 지놈 DNA 4 fg까지 검출 할 수 있었다(Fig. 3). 또한, Fig. 1에서 사용된 *S. sobrinus*이외의 대조군 세균 지놈 DNA를 이용하여 27F와 1492R 프라이머로 일차 PCR을 시행한 후, Ss-F2/Ss-R2 프라이머를 이용하여 nest-PCR을 한 결과 아무런 증폭물이 생성되지 않았다(자료는 제시 안함).

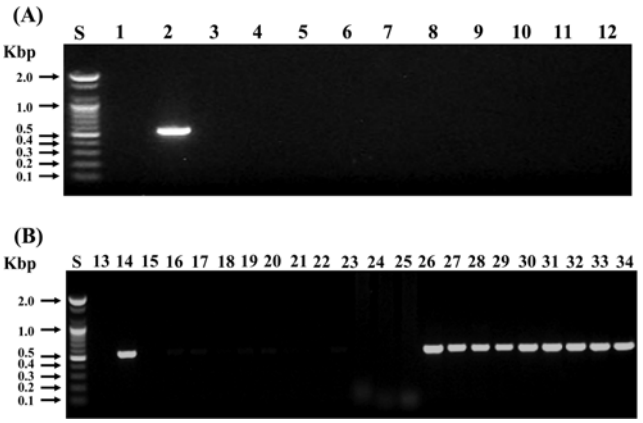

Fig. 1. Specificity of PCR using Ss-F2/Ss-R2 primers and genomic DNA of type strains (A) or clinical isolates (B) The PCR reactions were electrophoresed in 1.5% agarose gel. A 4 ng of each of bacterial genomic DNA was used as PCR template. Lanes: S, 100 base pair DNA ladder; 1, DDW; 2, *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478^T; 3, *Streptococcus mutans* ATCC 25175^T; 4, *Streptococcus downei* KCTC 3634; 5, *Streptococcus rattus* KCTC 3655; 6, *Streptococcus cricetus* KCTC 3640; 7, *Streptococcus anginosus* ATCC 700231; 8, *Streptococcus thermophilus* KCTC 3658; 9, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621; 10, *Streptococcus mitis* KCTC 3556; 11, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 23726; 12, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 33384; 13, DDW; 14, *S. sobrinus* ATCC 33478^T; 15, *S. mutans* ATCC 25175^T; 16, *S. mutans* KCOM 1053; 17, *S. mutans* KCOM 2759; 18, *S. mutans* KCOM 1076; 19, *S. mutans* KCOM 1055; 20, *S. mutans* KCOM 1089; 21, *S. mutans* KCOM 1082; 22, *S. mutans* KCOM 1085; 23, *S. mutans* KCOM 1086; 24, *S. mutans* KCOM 1087; 25, KCOM 1089; 26, *S. sobrinus* KCOM 1061; 27, *S. sobrinus* KCOM 1148; 28, *S. sobrinus* KCOM 1149; 29, *S. sobrinus* KCOM 1150; 30, *S. sobrinus* KCOM 1151; 31, *S. sobrinus* KCOM 1152; 32, *S. sobrinus* KCOM 1153; 33, *S. sobrinus* KCOM 1154; 34, *S. sobrinus* KCOM 1155.

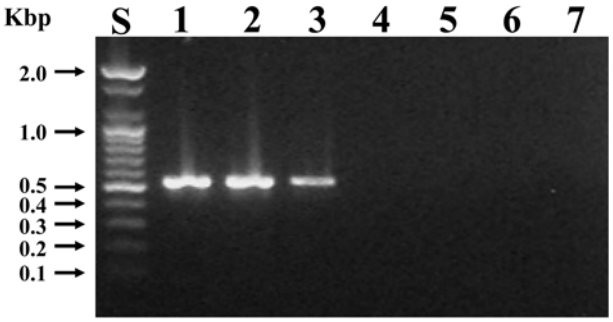

Fig. 2. The detection limits of direct PCR amplication with Ss-F2/Ss-R2 primers and genomic DNA of *S. sobrinus* ATCC 33478^T. The PCR reactions were electrophoresed in 1.5% agarose gel. Lanes: S, 100 base pair DNA ladder (Bioneer Corp.); 1-7, purified genomic DNA serially diluted 10 fold from 4 ng to 4 fg.

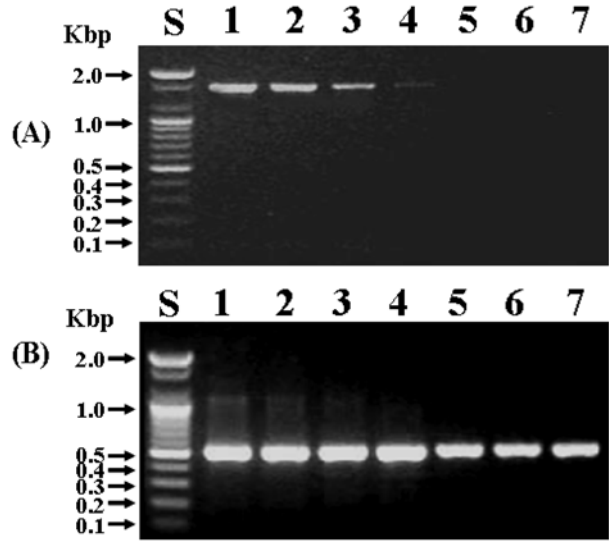

Fig. 3. The detection limits of nested PCR using Ss-F2/Ss-R2 primers. The 16S rDNA was amplified by 27F/1492R primers from purified genomic DNA of *S. sobrinus* ATCC 33478^T (A) and the nested PCR was performed with Ss-F2/Ss-R2 primers and 16S rDNA amplicon (B). The PCR reactions were electrophoresed in 1.5% agarose gel. Lanes: S, 100 base pair DNA ladder; 1-7, (A) purified genomic DNA serially diluted 10 fold from 4 ng to 4 fg or (B) 2 ul of 10-fold diluted PCR reactions of lane 1-7 in (A), respectively.

고 찰

치아우식증의 주요한 원인균이라 알려진 뮤탄스 연쇄상구균의 치아우식증과의 역학관계의 연구 및 치아우식활성검사 등의 목적을 위해 많은 방법들이 고안되어 사용되고 있다. 가장 고전적인 방법은 타액이나 치면세균막 샘플을 뮤탄스 연쇄상구균의 선택배지인 MSB agar plate (Gold 등, 1973)에 도말하여 군락의 모양과 생화학적 검사를 시행하는 것이다(Beighton 등, 1991). 하지만, MSB 선택배지에서는 *S. sobrinus*의 성장이 억제된다는 보고가 있었으며(Jordan 1986; de Soet 등, 1990), 세균배양법을 기본으로 하는 이러한 방법은 많은 시간과 노동력이 필요로 하는 단점이 있다. 또한 최근 Yoo 등(2005)의 보고에 의하면, MSB 배지에서 뮤탄스 연쇄상구균뿐만 아니라 *S. anginosus*, *S. sanguinis*, *Pantoea agglomerans* 균종들도 자라남이 관찰되었다. 그러므로 이러한 방법들보다 간편하고, 정확성이 뛰어난 방법들이 필요하게 되었고, 이를 위해 DNA 프로브법(Ida 등, 1999)과 PCR법(Igarashi 등, 2001; Igarashi 등, 2000; Oho 등, 2000; Poyart 등, 1998)이 개발되었다. 이들 중 DNA 프로브법은 시간, 노동력 및 경제적 측면에서 PCR법에 비해 비효과적인 단점이 있다. 그러므로, 특이도와 민감도가 뛰어난 PCR법이 많이 개발되고 또한 역학연구에 많이 이용되고 있다. 현재 *S. sobrinus*를 검출 및 동정하기 위해 이용되는 표적 유전자로는 glucosyltransferase, dextranse, manganese 의존성 superoxide dismutase 및 16S rRNA 유전자들이 있다. 이들 중 16S rRNA 유전자만이 구조 유전자이고, 나머지는 특정 화학반응을 촉매하는 기능 유전자들이다. 특히 기능 유전자들은 모든 세균 종에 존재하는 것이 아니고, 경우에 따라서는 유전학적으로 매우 유사한 균종들간에 존재 유무가 달라 쉽게 균종들을 구별하는 데 이용할 수 있다는 장점이 있다. 그 대표적인 예가 *S. intermedius*와 *S. constellatus*를 구별하기 위한 프라이머이다(Takao 등, 2004). 즉, *S. intermedius*와 *S. constellatus* 두 세균 종은 연쇄상구균 속 중 anginosus 그룹에 속하고, 그들의 16S rDNA 핵산염기서열이 99% 동일하여, 이로는 두 균종을 구별할 수가 없다. 하지만, *S. intermedius*는 *S. constellatus*와는 달리 intermedilysin (*ily*) 유전자를 가지고 있어 이를 이용한 PCR법으로 두 균종을 쉽게 구별할 수 있다. 하지만, 이러한 기능 유전자를 이용하는 방법은 임상균주에 따라 DNA 수준에서 돌연변이가 잘 일어날 가능성이 많기 때문에 이럴 경우 표적을 삼았던 균종의 검출이 위음성으로 나타날 수 있다는 단점이 있다. 반면에 구조 유전자인 16S rRNA 유전자는 돌연변이가 잘 일어나지 않고, 진화론적 측면에서 종간에 잘 보존이 된다는 장점 있다.

Igarashi 등(2001)은 *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. downei*, *S. rattus* 및 *S. cricetus* 5종의 dextranase 유전자 핵산염기서열을 바탕으로 설계된 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응을 실시하고, 이들의 반응산물을 *Hae*III 제한효소로 절단한 다음 이들의 제한효소절편길이다양성을 전기영동으로 관찰하여 이들을 동시에 동정하는 방법을 개발하였다. 하지만, 이러한 방법은 중합효소연쇄반응을 시행한 다음, 그 증폭 산물을 다시 제한효소로 절단해야하는 번거로움이 있고, 사람의 구강 내에서는 주로 *S. mutans*와 *S. sobrinus* 두 종이 주로 존재하기 때문에 굳이 5종 모두를 개별적으로 구별해야할 필요성이 있는 경우가 아니면, 위에 소개한 종-특이 중합효소연쇄반응 프라이머를 이용하는 방법이 더욱 효과적이라 생각된다.

본 연구 결과에 의하면, Ss-F2/Ss-R2 프라이머는 nested PCR에 의해서는 *S. sobrinus* 표준균주(ATCC 33478^T) 지

놈 DNA를 4 fg까지 검출할 수 있을 만큼 민감도가 뛰어나고, *S. sobrinus*와 유전학적으로 민감도가 가장 가까운 *S. downei*를 포함한 다른 뮤탄스 연쇄상구균들의 지놈 DNA와 구별할 수 있는 뛰어난 특이도를 가지고 있었다. 이는 최근 Sato 등(2003b)에 의해 개발된 nested PCR보다 민감도가 2.5배 높은 것이다. Sato 등(2003b)의 연구에서는 16S rDNA를 증폭한 첫 번째 PCR의 증폭반응물을 희석하지 않고 1 μl을 nested PCR에 사용하였고, 35 cycles로 PCR을 시행한 점을 감안한다면, 본 연구에서 개발된 Ss-F2/Ss-R2 프라이머는 *S. sobrinus*의 검출 및 동정에 있어서 특이도가 뛰어나고 민감도가 높게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

또한 본 연구에서 이용한 nested PCR법은 첫 번째 PCR에서 모든 세균 종으로부터 16S rDNA를 증폭할 수 있는 프라이머로 증폭한 다음, *S. sobrinus* 종-특이 프라이머로 두 번째 PCR을 시행했고, 이 증폭물을 10배 희석해서 사용하였기 때문에 *S. sobrinus* 이외의 구강 내 많은 세균종의 검출에 다시 이용할 수 있어, 한 번의 샘플링으로 치아우식증뿐만 아니라 치주질환 원인균도 검출할 수 있는 장점이 있다.

감사의 글

이 논문은 2009년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

참 고 문 헌

Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol. 1996;11:266-73.

Beighton D, Russell RRB, Whiley RA. A simple biochemical for the differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Caries Res. 1991;25:174-8.

de Soet JJ, van Dalen PJ, Pavicic MJ, de Graaff J. Enumeration of mutans streptococci in clinical samples by using monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 1990;28:2467-2472.

Gold OG, Jordan HV, Van Houte J. A selective medium for Streptococcus mutans. Arch Oral Biol. 1973;18:1357-64.

Ida H, Igarashi T, Yamamoto A, Goto N, Sasa R. A DNA probe specific to *Streptococcus sobrinus*. Oral Microbiol Immunol. 1999;14:233-7.

Igarashi T, Ichikawa K, Yamamoto A, Goto N. Identification of mutans streptococcal species by the PCR products of the *dex* genes. J Microbiol Methods. 2001;46:99-105.

Igarashi T, Yamamoto A, Goto N. PCR for detection and identification of *Streptococcus sobrinus*. J Med Microbiol. 2000;49:1069-74.

Jordan HV: Cultural methods for the identification and quantitation of *Streptococcus mutans* and lactobacilli in oral samples. Oral Microbiol Immunol 1986;1:23-30.

Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Liu S, Yamamoto H, Ezaki T: Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. Int J Syst Bacteriol 1995;45: 406-8. Erratum in: Int J Sys Bacteriol 1995;45: 882.

Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing, pp 115-75. *In* Stackebrandt E, Goodfellow M.(eds.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Wiley, New York, 1991.

Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev. 1986;50:353-80.

Oho T, Yamashita Y, Shimazaki Y, Kushiyama M, Koga T. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol. 2000;15:258-62.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J Bacteriol. 2001;183:3770-83.

Poyart C, Quesne G, Coulon S, Berche P, Trieu-Cuot P. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. J Clin Microbiol. 1998;36:41-7.

Rupf S, Merte K, Eschrich K, Stosser L, Kneist S. Peroxidase reaction as a parameter for discrimination of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Caries Res. 2001;35: 258-64.

Sato T, Hu JP, Ohki K, Yamaura M, Washio J, Matsuyama J, Takahashi N. Identification of mutans streptococci by restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction-amplified 16S ribosomal RNA genes. Oral Microbiol Immunol. 2003a;18:323-6.

Sato T, Matsuyama J, Kumagai T, Mayanagi G, Yamaura M, Washio J, Takahashi N. Nested PCR for detection of mutans streptococci in dental plaque. Lett Appl Microbiol. 2003b; 37:66-9.

Takao A, Nagamune H, Maeda N. Identification of the anginosus group within the genus *Streptococcus* using polymerase chain reaction. FEMS Microbiol Lett. 2004;1; 233:83-9.

Tanner A, Maiden MF, Paster BJ, Dewhirst FE. The impact of 16S ribosomal RNA-based phylogeny on the taxonomy of oral bacteria. Periodontol 2000. 1994;5:26-51.

Whiley RA, Beighton D. Current classification of the oral streptococci. Oral Microbiol Immunol 1998;13:195-216.

Yoo SY, Kim PS, Hwang HK, Lim SH, Kim KW, Choe SJ, Min BM, Kook JK. Identification of non-mutans streptococci organisms in dental plaques recovering on mitis-salivarius bacitracin agar medium. J Microbiol. 2005;43:204-8.