

Development of *Streptococcus sanguinis*-, *Streptococcus parasanguinis*-, and *Streptococcus gordonii*-PCR Primers Based on the Nucleotide Sequences of Species-specific DNA Probes Screened by Inverted Dot Blot Hybridization

Soon-Nang Park and Joong-Ki Kook*

Korean Collection for Oral Microbiology, Department of Oral Biochemistry, and Oral Biology Research Institute, School of Dentistry, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju 501-759, Korea

(received February 20, 2013; revised April 14, 2013; accepted April 18, 2013)

The objective of this study was to develop PCR primers that are specific for *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus parasanguinis*, and *Streptococcus gordonii*. We designed the *S. sanguinis*-, *S. parasanguinis*-, and *S. gordonii*-specific primers, Ssa21-F3/Ssa21-R2, Spa17-F/Spa17-R, and Sgo41-F1/Sgo41-R1 respectively, based on the nucleotide sequences of the Ssa21, Spa17, and Sgo41 DNA probes that were screened using inverted dot blot hybridization (IDBH). The species-specificity of these primers was assessed against 43 strains of mitis group streptococci, including clinical strains of *S. sanguinis*, *S. parasanguinis*, and *S. gordonii*. The resulting PCR data revealed that species-specific amplicons had been obtained from all strains of the target species tested, and that none of these amplicons occurred in any other strains from other species. These results suggest that the Ssa21-F3/Ssa21-R2, Spa17-F/Spa17-R, and Sgo41-F1/Sgo41-R1 primers may be useful in detecting *S. sanguinis*, *S. parasanguinis*, and *S. gordonii* at the species level, respectively.

*Correspondence to: Joong-Ki Kook, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju 501-759, Korea.
Tel.: +82-62-230-6877, Fax: +82-62-224-3706,
E-mail: jkook@chosun.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Key words: *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus parasanguinis*, species-specific PCR primer, IDBH.

서 론

현재 *Streptococcus* 속(Genus)에는 99개의 세균 종(bacterial species)이 있는 것으로 알려져 있다(<http://www.bacterio.cict.fr/s/streptococcus.html>). 각 세균 종 표준균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열 비교 분석법에 의해 mitis, mutans, anginosus, bovis, pyogenic 및 salivarius 그룹 등의 계통분류학적(phylogenetic) 군으로 분류되고 있다[1]. Mitis 그룹 연쇄구균들(mitis group streptococci, MGS)은 치아표면에 주된 집락을 이루며 구강 내 다른 세균 종들이 치아에 부착하는 것을 촉진하거나 저해하기도 하고, 세균성 심내막염 및 패혈증과 같은 전신질환의 원인 인자이기도 한다[2-10]. MGS 중 *Streptococcus gordonii*와 *S. parasanguinis*는 획득피막의 타액 단백질에 결합하여 치아표면에 초기에 부착되어 구강 미생물의 후속 집락 형성에 관여한다[2-4]. *Streptococcus gordonii*는 치주질환의 주요한 원인 균종 중 하나인 *Porphyromonas gingivalis*와 응집하여, *P. gingivalis*의 치면세균막의 집락화에 기여하는 것으로 보고되었다[5]. 또한 *S. sanguinis*는 9개월된 갓난아이의 충치에서 처음 발견되었고[6], 치아우식 원인균인 *Streptococcus mutans*와 경쟁적으로 치아표면에 부착한다[7]. 또한 생명을 위협하는 세균성 심내막염[8,9]과 패혈증[10]의 원

인균종으로 알려져 있다. 그러므로 *S. gordonii*, *S. sanguinis*와 *S. parasanguinis*를 정확히 검출할 수 있는 방법이 개발되어야 구강 및 전신질환의 올바른 진단 및 대단위 분자역학연구를 수행할 수 있을 것이다.

세균을 중 수준으로 검출하는 분자생물학적 방법 중 하나가 PCR법이다. PCR 법을 이용하여 세균을 중-수준으로 검출하기 위해서는 표적 유전자의 핵산염기서열을 바탕으로 중-특이 PCR 프라이머를 설계하여야 한다. 현재까지 PCR을 수행하기 위해 가장 널리 사용되는 표적 유전자는 16S rRNA 유전자(16S rDNA) [11-13]이다. 하지만 -MGS에 속하는 세균 종들의 16S rDNA 상동성이 99% 이상이 되기 때문에 중-특이 PCR 프라이머를 설계하기 어렵다. 최근 세균의 종 및 아종 특이 DNA 프로브를 신속하고 간편하게 개발하는 inverted dot blot hybridization (IDBH) 검색법이 개발되었다[14]. 이러한 방법으로 여러 세균 종-특이 DNA 프로브 및 균주-특이 DNA 프로브까지 개발할 수 있었다[14-18]. 또한 이들 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 중-특이 및 균주-특이 PCR 프라이머들도 개발되었다[14-18] 본 연구는 IDBH 검색법을 이용하여 MGS에 속하는 *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus parasanguinis* 및 *Streptococcus gordonii* 균종들에 대한 중-특이 DNA를 클로닝하고, 이들 핵산염기서열을 바탕으로 중-특이 PCR 프라이머를 개발하기 위하여 시행되었다.

재료 및 방법

세균 및 배양 조건

본 연구에서 이용된 균주들은 Korean Collection for Type Culture (KCTC, Daejeon, Korea), Korean Culture Center of Microorganism (KCCM, Seoul, Korea), Korean Collection for Oral Microbiology (KCOM, Gwangju, Korea) 및 Culture

Collection, University of Göteborg, (CCUG, Göteborg, Sweden)에서 분양받아 사용하였다(Table 1).

본 연구에 사용된 모든 균주들은 BHI broth (Brain Heart Infusion broth, Difco Laboratory, Detroit, MI, USA)에 접종하여 37°C 세균배양기에서 1-2일간 배양하여 다음 실험에 사용하였다.

세균 지놈 DNA의 추출

세균의 지놈 DNA는 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit (iNtRON Co., Seoul, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 세균 지놈 DNA를 추출하였다.

무작위 클로닝 법에 의한 세균 DNA 절편 클로닝 및 플라스미드 추출

세균 DNA 프로브를 클로닝하기 위하여 *S. sanguinis* CCUG 17826^T, *S. parasanguinis* CCUG 30417^T, *S. gordonii* CCUG 25608^T, *S. mitis* KCTC 3556^T, *S. oralis* CCUG 24891^T 및 *S. pneumoniae* CCUG 28588^T 지놈 DNA를 HindIII 제한효소(TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japan) 로 절단하였다. 이들 지놈 DNA 절편과 HindIII 제한효소로 절단하고 bacterial alkaline phosphatase (TaKaRa)로 5'의 인산기를 제거한 pBluescript II KS (+) vector (Stratagene, La Jolla, CA, USA)를 DNA ligase (TaKaRa)로 ligation한 후, 이들 ligation 혼합물을 *E. coli* DH5α에 형질전환시켰다. 세균 지놈 DNA 절편이 함유된 재조합 플라스미드는 AccuPrep™ Plasmid Extraction Kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시대로 추출하였다.

세균 지놈 DNA의 표지 및 정제

지놈 DNA는 DIG-High Prime kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 이용하여 표지하였다. 표지 과정은 1 µg의 DNA에 최종 부피가 16 µl가 되도록 증류수를 넣고 끓는 물에서 10분간 가열하여 지놈 DNA를 변성시

Table 1. The bacterial strains used in this study

Species	Strains
<i>S. sanguinis</i>	CCUG 30417 ^T , KCOM 1419, KCOM 1434, KCOM 1070, KCOM 1171, KCOM 1192, KCOM 2688, KCOM 1855, KCOM 1372, KCOM 1576, KCOM 1567, KCOM 1014
<i>S. parasanguinis</i>	CCUG 30417 ^T , KCOM 1294, KCOM 1352, KCOM 1359, KCOM 1366, KCOM 1370, KCOM 1415, KCOM 1497, KCOM 1585
<i>S. gordonii</i>	CCUG 25608 ^T , KCOM 1347, KCOM 1506, KCOM 1882, KCOM 1851
<i>S. mitis</i>	KCTC 3556 ^T , KCOM 1350, KCOM 1295, KCOM 1285
<i>S. oralis</i>	CCUG 24891 ^T , KCOM 1493, KCOM 1505, KCOM 1507, KCOM 1518, KCOM 1577, KCOM 1625, KCOM 1848, KCCM 41567
<i>S. pneumoniae</i>	CCUG 28588 ^T , KCCM 404101, KCCM 41569, KCCM 41570

킨 후 재빨리 얼음에 넣어 식혔다. 여기에 4 µl DIG-High Prime을 첨가하여 잘 섞고 37°C에서 12시간 반응시킨 후 0.2 M EDTA를 넣어 반응을 정지시켰다. DIG (digoxigenin-dUTP)으로 표지된 세균 지놈 DNA 프로브는 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., Valencia, USA)를 이용하여 정제하였다

Inverted dot blot hybridization (IDBH)

앞에서 클로닝한 *S. gordonii* CCUG 25608^T, *S. mitis* KCTC 3556^T, *S. oralis* CCUG 24891^T, *S. parasanguinis* CCUG 30417^T, *S. pneumoniae* CCUG 28588^T 및 *S. sanguinis* CCUG 17826^T 지놈 DNA들의 *Hind*III 제한 효소절편들이 클로닝된 재조합 플라스미드 20 ng을 95°C에서 10 분간 끓이고 즉시 얼음에 5분간 방치하였다. 이들 재조합 플라스미드를 6 장의 nylon membranes에 동일하게 blotting 하였다. 앞에서 준비한 세균 지놈 DNA 절편이 blotting된 membrane을 hybridization 용액(5× SSC, 50% formamide, 0.1% sodium-lauroylsarcosine, 0.02% SDS, 2% Blocking Reagent)으로 2시간 동안 prehybridization시켰다. 그 후 새로운 hybridization 용액에 DIG으로 표지된 각 세균의 지놈 DNA를 첨가하여 12시간 hybridization시켰다. Membrane을 실온에서 5분간 2× wash 용액(2× SSC, 0.1% SDS)으로 2회 세척하고 다시 0.5× wash 용액(0.5× SSC, 0.1% SDS)으로 68°C에서 15분간 2번 세척하였다. 표지된 지놈 DNA 프로브가 membrane 상의 표적 지놈 DNA 절편과 hybridization됨을 알아보기 위한 detection 과정은 Roche Diagnostics사의 chemiluminescent detection kit를 이용하여 시행하였다. 즉, membrane을 100 ml의 Blocking solution (buffer 2)에 넣고 30분 반응한 후 buffer 2에 anti-DIG-AP conjugate를 75 mU/ml (1:10000) 첨가하여 희석한 20 ml antibody solution에 membrane을 넣고 30분간 반응시켜서 15분간 100 ml의 washing buffer로 2회 세척하였다. Membrane을 20 ml의 Detection buffer (buffer 3)에서 2~5분간 안정화 시키고, 약 1 ml의 기질 (CSPD[®])용액을 뿌려 5분간 상온에서 반응 후 과량의 액을 제거하고 luminescent reaction이 일어나도록 37°C 배양기에서 15분간 반응시

켰다. 이것을 상온에서 X-ray film (Lumi-film chemiluminescent[®], Roche Diagnostics)에 1~3 시간 노출시켜 결과를 확인하였다.

세균 지놈 DNA 절편의 핵산염기서열결정

세균 DNA 절편(Ssa21, Spa17 및 Sgo41) 핵산염기서열은 Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)를 이용하여 결정하였다. 이들의 핵산염기서열 결정을 위해 ChDC-F (5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG AA-3')와 ChDC-R (5'-CCT CAC TAA AGG GAA CAA AAG C-3') 프라이머[22]를 사용하였다.

이들 세균 지놈 DNA 절편 핵산염기서열을 바탕으로 중-특이 또는 균주-특이 PCR 프라이머는 PRIMERSECT 프로그램(Version 8.0, DNASTAR Inc., Madison, WI)을 이용하여 설계하였으며, 이들의 핵산염기서열 및 예상되는 PCR 산물의 크기는 Table 2에 정리하였다.

PCR

앞에서 설계된 PCR 프라이머들의 중-특이성을 알아보기 위하여, 6종 MGS 표준균주(*S. sanguinis* CCUG 17826^T, *S. parasanguinis* CCUG 30417^T, *S. gordonii* CCUG 25608^T, *S. mitis* KCTC 3556^T, *S. oralis* CCUG 24891^T 및 *S. pneumoniae* CCUG 28588^T) 및 각각의 종에 해당하는 37개 임상균주(4개 참고균주 포함) 지놈 DNA를 주형으로 하여 PCR을 시행하였다. PCR은 AccuPower[®] PCR PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 시행하였다. AccuPower[®] PCR PreMix에는 5 nmole씩의 4가지 deoxynucleoside triphosphate, 0.8 mole KCl, 0.2 mole Tris-HCl (pH 9.0), 0.03 mole MgCl₂ 그리고, 1 unit *Taq* DNA polymerase가 들어있다. 여기에 4 ng의 세균 지놈 DNA와 20 pmoles씩의 forward 및 reverse 프라이머들을 넣고 PCR을 시행하였다. 이때 PCR은 My-Genie[™] 96 Gradient Thermal Block (Bioneer, Daejeon, Korea)을 이용하여 시행하였다. 이 때 PCR 조건은 다음과 같았다. 초기 변성은 94°C에서 5분간 시행하였고, 변성(94°C,

Table 2. The information of the PCR primers designed in this study

Target species or strain	Primer name: oligonucleotide sequences (5' → 3')	Annealing temperature (°C)	Amplicon size (bp)
<i>S. gordonii</i>	Sgo41-F1: ATCCCTTAGTGTCTGATTGTT	54	527
	Sgo41-R1: GACCCTCCGTTTCTTTATGA		
<i>S. parasanguinis</i>	Spa17-F: ATGGCCCAAATCACTCCTT	59	509
	Spa17-R: CAAAATAAAAGATAATGCGGATAA		
<i>S. sanguinis</i>	Ssa21- F3: TGGAGCAGCCTGTCGTATCAT	70	635
	Ssa21- R2: AGGCAGACCAGCGAGTTTTCATTT		

30초), 결합(54, 59 혹은 70°C, 30초) 및 중합(72°C, 30초)의 세 과정을 30회 반복하고, 추가적인 중합(72°C, 30초)을 10분간 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 전기영동한 후, ethidium bromide로 염색하여 UV로 발색시켜 PCR 산물의 크기를 확인하였다.

결 과

S. gordonii CCUG 25608^T (Sgo1-Sgo41), *S. mitis* KCTC 3556^T (Smi1-Smi59), *S. parasanguinis* CCUG 30417^T (Spa12-Spa47), *S. pneumoniae* CCUG 28588^T (Spn2-Spn32), *S. sanguinis* CCUG 17826^T (Ssa1-Ssa39) 및 *S. oralis* CCUG 24891^T (Sor1-Spa35) 유래 지놈 *Hind*III 제한효소 DNA 절편이 들어있는 재조합 플라스미드들 각 균주당 16개씩을 선정하였다(Fig. 1). 선정 기준은 DNA 절편 크기가 0.5-2 kbp 이내인 것으로 하였다(data not shown). IDBH 법에 의해 Ssa21, Spa17 및 Sgo41 DNA 절편이 각각 *S. sanguinis*, *S. parasanguinis* 및 *S. gordonii*에 대하여 종-특이성이 있는 것으로 검색되었다(Fig. 1). 종-특이 PCR 프라이머를 설계하기 위하여 이들 3가지 DNA 절편 핵산염기서열을 결정된 결과, 각각 944 bp, 673 bp 및 708 bp로 구성되었다(data not shown).

앞에서 결정된 3가지 DNA 절편의 핵산염기서열을 바탕으로 *S. sanguinis*, *S. parasanguinis* 및 *S. gordonii* 종-특이 PCR 프라이머들(각각 Ssa21-F3/Ssa21-R2, Spa17-F/Spa17-R 및 Sgo41-F1/Sgo41-R1)을 설계하여 본 연구에서 사용된 6 종 MGS 43 균주들(6개 표준균주 포함)을 대상으로 PCR를 실시하여 종-특이성을 조사하였다. 그 결과 모든 PCR 프라이머들은 종-특이적으로 표적 세균 종의 지놈 DNA에서만 예상했던 크기의 PCR 산물을 증폭시켰다(Fig. 2).

고 찰

본 연구 결과 6종 MGS 표준균주들의 *Hind*III 제한효소 지놈 DNA 절편을 IDBH 법으로 각각의 세균 종-특이 DNA 프로브로 사용할 수 있는지를 검색한 결과 *S. sanguinis*, *S. parasanguinis* 및 *S. gordonii*에 대하여 종-특이성이 있을 것으로 생각되는 Ssa21, Spa17 및 Sgo41 DNA 절편을 얻었다(Fig. 1). IDBH 결과 각각의 표적 세균 종을 특이적으로 검출할 수 있는 것으로 생각되는 이들 3가지 DNA 절편의 종-특이성은 6종 MGS 표준균주 지놈 DNA들을 이용하여 Southern blot hybridization 법으로 검증하였다(data not shown). 본 연구에서 선택된 Ssa21 및 Sgo41 DNA 절편들의 핵산염기서열이 암호화하고 있는 단백질을 blastn 프로그램(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)을 이용하여 검색하였다. 그 결과 Ssa21 핵산염기서열은 *S.*

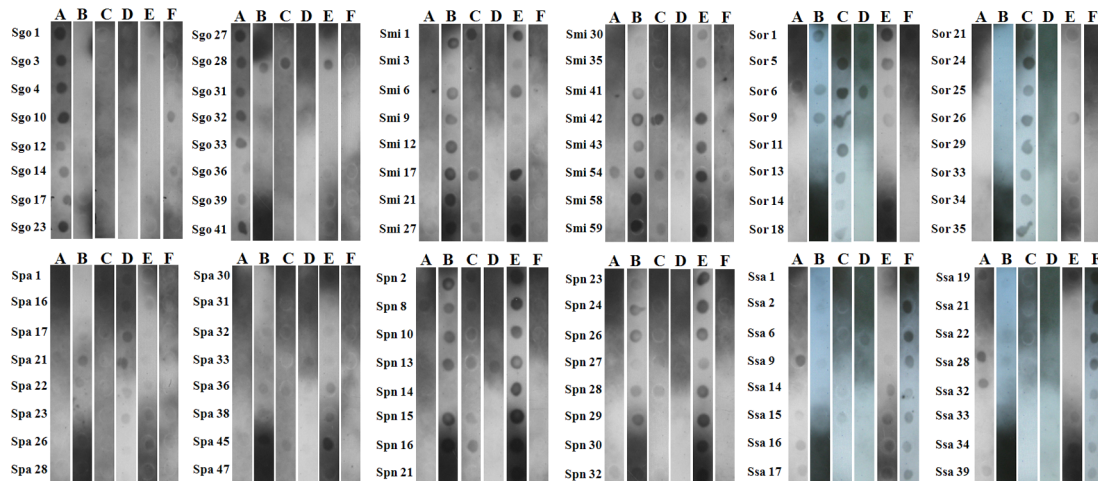


Fig. 1. Composite summary of inverted dot blot hybridization screening. The 96 recombinant plasmid DNAs containing genomic DNA fragments derived from type strains of 6 *Streptococcus* species were hybridized with DIG-labeled genomic DNAs. The genomic DNAs were from: (A) *S. gordonii* CCUG 25608^T, (B) *S. mitis* KCTC 3556^T, (C) *S. oralis* CCUG 24891^T, (D) *S. parasanguinis* CCUG 30417^T, (E) *S. pneumoniae* CCUG 28588^T, (F) *S. sanguinis* CCUG 17826^T. Sgo (Sgo1-Sgo41), Smi (Smi1-Smi59), Sor (Sor1-Sor35), Spa (Spa1-Spa47), Spn (Spn2-Spn32), and Ssa (Ssa1-Ssa39) represent, respectively, recombinant plasmids containing genomic DNA fragments corresponding, in order, to the type strains of 6 *Streptococcus* species described above.

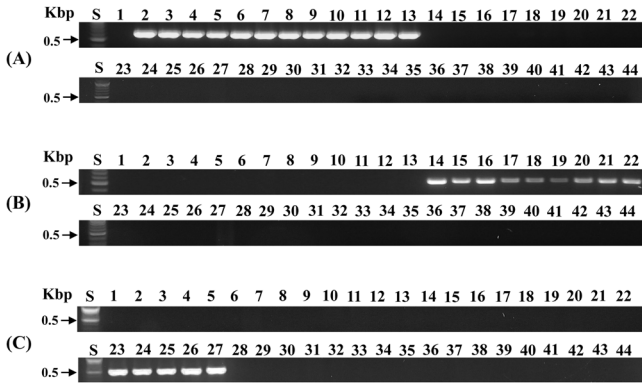


Fig. 2. Specificity test of the PCR primers, (A) Ssa21-F3/Ssa21-R2, (B) Spa17-F/Spa17-R, and (C) Sgo41-F1/Sgo41-R1/Sgo41-F1/Sgo41-R1, with 4 ng of each bacterial genomic DNA. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. Lanes: S, size marker (100 bp ladder); 1, (-) control (DDW); 2, *S. sanguinis* CCUG 17826^T; 3, *S. sanguinis* KCOM 1419; 4, *S. sanguinis* KCOM 1434; 5, *S. sanguinis* KCOM 1070; 6, *S. sanguinis* KCOM 1171; 7, *S. sanguinis* KCOM 1192; 8, *S. sanguinis* KCOM 2688; 9, *S. sanguinis* KCOM 1855; 10, *S. sanguinis* KCOM 1372; 11, *S. sanguinis* KCOM 1576; 12, *S. sanguinis* KCOM 1567; 13, *S. sanguinis* KCOM 1014; 14, *S. parasanguinis* CCUG 30417^T; 15, *S. parasanguinis* KCOM 1294; 16, *S. parasanguinis* KCOM 1352; 17, *S. parasanguinis* KCOM 1359; 18, *S. parasanguinis* KCOM 1366; 19, *S. parasanguinis* KCOM 1370; 20, *S. parasanguinis* KCOM 1415; 21, *S. parasanguinis* KCOM 1497; 22, *S. parasanguinis* KCOM 1585; 23, *S. gordonii* CCUG 33482^T; 24, *S. gordonii* KCOM 1347; 25, *S. gordonii* KCOM 1506; 26, *S. gordonii* KCOM 1882; 27, *S. gordonii* KCOM 1851; 28, *S. mitis* KCTC 3556^T; 29, *S. mitis* KCOM 1350; 30, *S. mitis* KCOM 1295; 31, *S. mitis* KCOM 1285; 32, *S. oralis* CCUG 13229^T; 33, *S. oralis* KCOM 1493; 34, *S. oralis* KCOM 1505; 35, *S. oralis* KCOM 1507; 36, *S. oralis* KCOM 1518; 37, *S. oralis* KCOM 1577; 38, *S. oralis* KCOM 1625; 39, *S. oralis* KCOM 1848; 40, *S. oralis* KCOM 41567; 41, *S. pneumoniae* CCUG 28588^T; 42, *S. pneumoniae* KCCM 40410; 43, *S. pneumoniae* KCCM 41569; 44, *S. pneumoniae* KCCM 41570

sanguinis SK36 지놈 핵산염기서열(GenBank accession number, CP000387)의 1,208,082-1,208,922 nt와 95%(896/944) 상동성을 보였으며, hydrolase (alpha/beta superfamily)의 일부분을 암호화하고 있었다(data not shown). Sgo41 DNA 절편 핵산염기서열은 *S. gordonii* str. Chalis substr. Ch1 균주 지놈 핵산염기서열(GenBank accession number, CP002843)의 1,131,650-1,132,341 nt (692 bp)와 95% 상동성이 있었으며, exfoliative toxin A 전사조절인자(*lysR* family) 단백질의 일부분을 암호화하고 있었다(data not shown). Spa17 DNA 절편 핵산염기서열의 경우 이미 *S. parasanguinis* CCUG 30417^T (= ATCC 15917^T) 지놈 핵산염기서열(GenBank accession number, CP002843)이 결정되어 보고 되었기 때문에 GenBank에서 해당 부위를 검색하여 암호화된 단백질을

찾았다. 그 결과 Spa17 DNA 절편은 *S. parasanguinis* CCUG 30417^T 지놈 핵산염기서열의 1,059,907-1,060,579 nt에 해당하였으며, lipid phosphate phosphohydrolase 2 family 단백질 일부분을 암호화하고 있었다(data not shown). 이러한 결과들은 본 연구에서 클로닝한 3가지 DNA 절편들(Ssa21, Spa17 및 Sgo41)이 해당 세균 종을 특이적으로 검출하는 DNA 프로브로 사용할 수 있다는 것을 의미한다.

Ssa21, Spa17 및 Sgo41 DNA 절편 핵산염기서열을 바탕으로 각각 설계된 Ssa21-F3/Ssa21-R2, Spa17-F/Spa17-R 및 Sgo41-F1/Sgo41-R1 프라이머들과 MGS 43 균주 지놈 DNA를 주형으로 하여 PCR을 시행한 결과 각각 *S. sanguinis*, *S. parasanguinis* 및 *S. gordonii*에 대하여 종-특이성이 있음을 알 수 있었다(Fig. 2). PCR 프라이머를 개발하기 위해서는 표적 유전자의 핵산염기서열이 필요하다. 본 연구에서와 같이 세균의 종-특이 PCR의 개발에 있어서 종-특이 DNA 프로브를 이용하면 세균 종-특이 PCR 프라이머를 용이하게 개발 할 수 있다. 일반적으로 종-특이 DNA 프로브를 개발하기 위해서는 후보가 되는 지놈 DNA 절편을 표지하여 Southern blot 분석을 시행하여 종-특이성을 검증한다. 즉, 96개의 후보 DNA 프로브를 검증하기 위해서는 96번의 Southern blot 분석이 필요하다. 하지만, 본 연구에서 이용된 IDBH 법으로는 6번의 dot blot hybridization과 3번의 Southern blot 분석으로 3개 세균 종에 대한 종-특이 DNA 프로브를 얻을 수 있었다(data not shown). 그러므로 IDBH 법은 종-특이 PCR 프라이머의 표적 유전자가 없을 경우 효과적으로 이용할 수 있는 방법이라 생각된다.

PCR 프라이머를 설계하는 여러 원칙들 중에서 5'쪽 보다는 3'쪽의 일치성이 더욱 중요하다는 것은 잘 알려져 있다[23]. 이러한 원칙은 Song 등[24]이 시행한 연구 결과에서도 증명되었다. 즉, PCR 프라이머의 3'-말단 마지막 염기서열이 주형과 상보적인 경우, 3'-말단에서 2번째 및 3번째 염기서열이 상보적이지 않아도 100% 상동성이 있는 것에 비해 결합온도가 각각 약 5°C 및 7°C씩 낮은 온도에서 PCR 산물이 증폭되었지만, 3'-말단 첫 번째 염기 하나만이라도 상보적이지 않을 경우 PCR 산물이 증폭되지 않았다[24]. 본 연구에서 설계된 Ssa21-R 프라이머 3'-말단에서 5번째 염기서열이 *S. sanguinis* SK36의 것과 상이 하였지만, 본 연구에서 사용된 임상균주들의 지놈 DNA 주형으로부터 예상되는 크기의 PCR 산물이 증폭되었다. 또한 Sgo41-F1과 Sgo41-R1 프라이머들의 경우 *S. gordonii* str. Chalis substr. Ch1 지놈 핵산염기서열의 3'-말단으로부터 3번째 및 9번째의 것과 상보적이지 않았지만, 본 연구에서 사용된 모든 *S. gordonii* 임상균주 지놈 DNA로부터 예상되는 크기의 PCR 산물이 증폭되었다. 이러한 결과

들은 본 연구에서 사용된 *S. sanguinis* 및 *S. sanguinis* 임상균주들 지능 핵산염기서열들이 Ssa21-R, Sgo41-F1 및 Sgo41-R1 프라이머 결합부위 중 3'-말단에서의 상동성이 높았기 때문인 것으로 생각된다.

세균 종-특이 PCR 프라이머를 수행하기 위해서는 표적 유전자 핵산염기서열의 결정이 필수적이다. 현재까지 종-특이 PCR 프라이머 개발에 가장 많이 사용되고 있는 표적 유전자는 16S rDNA이다[11-13]. 하지만 MGS 균종들처럼 16S rDNA의 상동성이 99% 이상일 경우엔 다른 표적 유전자를 이용하여야 한다. 본 연구에서 사용된 IDBH 법은 이럴 경우 유용하게 사용될 수 있다. 본 연구에서 사용된 일반적인 PCR법보다는 실시간 정량 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 법은 특정 세균 종의 정성적 검출뿐만 아니라 정량적 검출까지도 가능하다. 그러므로 향후 연구에서 Ssa21, Spn17 및 Sgo41 DNA 절편 핵산염기서열을 바탕으로 각각 *S. sanguinis*, *S. parasanguinis* 및 *S. gordonii*에 대한 종-특이적 qPCR 프라이머 개발이 가능할 것이다.

이상의 연구 결과를 종합하면, Ssa21, Spn17 및 Sgo41 DNA 절편 핵산염기서열을 바탕으로 설계된 Ssa21-F3/Ssa21-R2, Spa17-F/Spa17-R 및 Sgo41-F1/Sgo41-R1들은 각각 *S. sanguinis*, *S. parasanguinis* 및 *S. gordonii*을 종-특이적으로 검출할 수 있어, 향후 이들 3가지 세균 종과 관련된 구강 및 전신질환 역학 연구에 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

- Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Miura 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;45:406-408.
- Gibbons RJ, Hay DI, Schlesinger DH. Delineation of a segment of adsorbed salivary acidic proline-rich proteins which promotes adhesion of *Streptococcus gordonii* to apatitic surfaces. *Infect Immun*. 1991;59:2948-2954.
- Scannapieco FA, Torres GI, Levine MJ. Salivary amylase promotes adhesion of oral streptococci to hydroxyapatite. *J Dent Res*. 1995;74:1360-1366.
- Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, Boches SK, Dewhirst FE, Griffen AL. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol*. 2002;40:1001-1009.
- Lamont RJ, Bevan CA, Gil S, Persson RE, Rosan B. Involvement of Porphyromonas gingivalis fimbriae in adherence to *Streptococcus gordonii*. *Oral Microbiol Immunol*. 1993;8:272-276.
- Caufield PW, Dasanayake AP, Li Y, Pan Y, Hsu J, Hardin JM. Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infect Immun*. 2000;68:4018-4023.
- Nyvad B, Kilian M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res*. 1990;24:267-272.
- Baddour LM. Virulence factors among gram-positive bacteria in experimental endocarditis. *Infect Immun*. 1994;62:2143-2148.
- Douglas CW, Heath J, Hampton KK, Preston FE. Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. *J Med Microbiol*. 1993;39:179-182.
- Herzberg MC, Gong K, MacFarlane GD, Erickson PR, Soberay AH, Krebsbach PH, Manjula G, Schilling K, Bowen WH. Phenotypic characterization of *Streptococcus sanguis* virulence factors associated with bacterial endocarditis. *Infect Immun*. 1990;58:515-522.
- 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;11:266-2673.
- Conrads G, Flemmig TF, Seyfarth I, Lampert F, Luticken R. Simultaneous detection of *Bacteroides forsythus* and *Prevotella intermedia* by 16S rRNA gene-directed multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 1999;37:1621-1624.
- Cho JS, Yoo SY, Kim HS, Hwang HK, Min JB, Kim BH, Baek DH, Shin HS, Kook JK. Identification and detection of *Streptococcus anginosus* using species-specific 16S rDNA primers. *Int J Oral Biol*. 2006;31:11-14.
- Kook JK, Kim MK, Seong JH, Kim DK, Kim BO, Park JC, Kim KK, Choe SJ, Min BM. A new method for rapid screening of bacterial species- or subspecies-specific DNA probes. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;219:121-127.
- Shin YK, Jeong SU, Yoo SY, Kim MK, Kim HS, Kim BO, Kim DK, Hwang HK, Kook JK. Pi30 DNA probe may be useful for the identification of *Prevotella intermedia* at the species or strain level. *Microbiol Immunol*. 2006;48:931-936.
- Park CH, Kim PS, Kim HS, Min JB, Hwang HK, Jang HS, Cho KW, Baek DH, Kook JK. Detection of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* using Pn17 and Pn34 DNA Probes. *Int J Oral Biol*. 2010;35:13-19.
- Kim MJ, Hwang KH, Lee YS, Park JY, Kook JK. Development of *Prevotella intermedia*-specific PCR primers based on the nucleotide sequences of a DNA probe Pig27. *J Microbiol Methods*. 2011;84:394-397.
- Kim MJ, Lee YS, Park JY, Kook JK. Development of *Prevotella nigrescens*-specific PCR primers based on the nucleotide sequence of a Pn23 DNA probe. *Anaerobe*. 2011;17:32-35.
- Kim HS, Song SK, Yoo SY, Jin DC, Shin HS, Lim CK, Kim MS, Kim JS, Choe SJ, Kook JK. Development of strain-specific PCR primers based on a DNA probe Fu12 for the identification of *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T. *J Microbiol*. 2005;43:331-336. Erratum in: *J Microbiol*. 2005;43:473.
- Shin HS, Kim MJ, Kim HS, Park SN, Kim DK, Baek DH, Kim C, Kook JK. Development of strain-specific PCR pri-

- mers for the identification of *Fusobacterium nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T and subsp. *vincentii* ATCC 49256^T. *Anaerobe*. 2010;16:43-46.
21. Kim MJ, Min JB, Lim SA, Kook JK. Strain-specific PCR Primers for the Detection of *Prevotella intermedia* ATCC 49046. *Int J Oral Biol*. 2011;36:79-82.
 22. Yoo SY, Kim KJ, Lim SH, Kim KW, Hwang HK, Min BM, Choe SJ, Kook JK. First isolation of *Streptococcus downei* from human dental plaques. *FEMS Microbiol Lett*. 2005; 249:323-326.
 23. Rychlik W. Selection of primers for polymerase chain reaction. 1st ed. In B.A. White (ed.), *PCR protocols*, Humana Press, Totowa, New Jersey, USA. 1993;31-40.
 24. Song SK, Yoo SY, Kim MK, Kim HS, Lim SA, Kim DK, Park JY, Kook JK. Development of *Prevotella nigrescens* ATCC 33563^T-specific PCR primers. *Kor J Microbiol*. 2008;44: 221-227.