

Dot blot hybridization법을 이용한 *Fusobacterium nucleatum* 아종-특이 DNA 프로브의 특이성 평가

김화숙 · 국중기¹

전남과학대학 치위생과, ¹조선대학교 치과대학 구강생화학교실

색인 : *Fusobacterium nucleatum*, 16S rDNA, 핵산염기서열, dot blot hybridization

I. 서 론

치주질환 병원균 중 하나인 *Fusobacterium nucleatum*은 구강 내에서 빈도 높게 검출되는 세균으로 그람음성의 비아포형성 및 비운동성을 지닌 편성 혐기성 간균이다^{14,15}. *F. nucleatum*은 glucose와 peptone 발효의 대사산물로서 butyric acid를 분비하여 구강 내 치주조직에 해로운 자극을 주고, 치주질환의 발생 및 진행에 있어서 중요한 역할을 하는 미생물중의 하나이다¹. 성숙된 치면세균막과 초기 치은염 부위, 그리고, 파괴적인 치주질환 부위인 활성부위에서 세균수가 상대적으로 증가하고, 건강한 치은열구나 성공적으로 치료된 비활성부위에서도 많은 수가 검출된다^{3,4,14}. 따라서 *F. nucleatum*은 활성부위와 비활성부위의 치주병소와 관련하여 아종에 따라 각각 다른 병원성을 갖는 것으로 생각하게 되었다⁵. 이러한 *F. nucleatum*을 아종 수준에서 분류하기

위한 세균동정법으로는 세균배양법, DNA homology, 전체 세포단백질 분석, DNA fingerprinting, 21 alloenzyme법, DNA 프로브법, 중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction), 16S 또는 23S ribosomal RNA 유전자 핵산염기서열 결정법 그리고 DNA-DNA hybridization 등이 이용되고 있다^{2,4,5,7,8,10,11,16,17,18}.

*F. nucleatum*의 아종 수준에서의 분류는 Gharbia & Shah⁶⁻⁸ 의해 2-oxoglutarate reductase(OGR)와 glutamate dehydrogenase(GDH) 전기영동패턴이 이용되어 *F. nucleatum* subspecies *nucleatum*, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* 및 *F. nucleatum* subsp. *fusiforme*의 세 그룹으로 분류되었다. 또한, Dzink 등²도 DNA homology와 sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE) 방법을 이용하여 *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*과 *F. nucleatum*

subsp. *polymorphum* 및 *F. nucleatum* subsp. *vincentii*로 분류하였다. 그러나, *F. nucleatum*을 아종 수준에서 분류하기 위해 이용되었던 기존의 방법들은 많은 시간과 경제력을 필요로 하고, 여러 가지 기술적인 어려움을 가지고 있다. 최근 Kook 등¹²⁾은 inverted dot blot hybridization screening과 southern blot hybridization법을 이용하여 *F. nucleatum* 4가지 아종에 대한 아종-특이 DNA 프로브를 개발하였다. *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*에 대한 프로브는 Fu4(1.3 kb)라 명명되었고, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum*, *F. nucleatum* subsp. *vincentii* 및 *F. nucleatum* subsp. *fusiforme*에 대한 프로브들은 각각 Fp4(0.8 kb)와 Fv35(1.9 kb), Fs17(8.2 kb)이라고 명명되었다.

그러나 Kook 등¹²⁾이 개발한 *F. nucleatum* 아종-특이 DNA 프로브는 서양인에서 확립된 균주의 genome DNA에서 클로닝하여 얻은 것으로 한국인의 치주질환 환자에서 분리 배양하여 얻은 *F. nucleatum*을 아종 수준에서 동정하는데 이용 가능한 지에 대한 연구는 이루어지지 않았다. 그러므로, 본 연구에서는 한국인의 치주질환 부위에서 분리된 *F. nucleatum*을 16S rRNA 유전자 클로닝 및 핵산염기서열결정법으로 동정하고, Kook 등¹²⁾이 개발한 *F. nucleatum* 아종-특이 DNA 프로브를 이용하여 dot blot hybridization을 실시한 다음, 두 결과를 비교 분석하여 이들 DNA 프로브가 *F. nucleatum*의 아종 수준에서의 동정에 이용 가능한지를 알아보려고 시행하였다.

2. 연구재료 및 방법

2.1. 치면세균막 채취 및 *F. nucleatum*

선택배지에서 배양

조선대학교 치과병원에 내원한 29명의 치주질환

환 환자로부터 탐침깊이가 4 mm 이상인 상하악 구치부 협면 또는 설면에서 멸균된 paper point를 이용하여 치은 연하 치면세균막을 채취하여 reduced transfer fluid 1 ml에 담고, 이를 즉시 실험실로 옮겼다.

채취한 샘플은 10,000배 희석하여, *F. nucleatum* 선택배지(1% tryptic soy broth, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.2% glucose, 0.02% L-tryptophan, 1.5% Bacto agar, 5% defibrinized sheep blood, 4 μ l/ml erythromycin, 5 μ l/ml crystal violet)에 도말한 후, 37°C 혐기성배양기(85% N₂, 5% CO₂, 10% H₂, Model Bactron I, Cornelius, OR, USA)에서 2~3일 동안 배양하였다. Crystal violet에 의해 보라색을 띠는 균락을 선택하여 erythromycin이 함유된 Schaedler 배지에서 2~3일 동안 배양하여 다음의 실험에 사용하였다.

2.2. *F. nucleatum*의 genomic DNA 추출

Genome DNA는 Lippke 등¹³⁾의 방법을 변형하여 추출하였다. 각각의 세균은 35 ml의 액체배지에서 배양하였고, 10분간 원심분리(7,000×g)하여 세균의 압착 결정을 얻었다. 압착 결정에 lysis buffer[5 M guanidine isothiocyanate, 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), 2% S-lauryl sarcosinate, 140 mM 2-mercapto ethanol]를 가하여 잘 현탁하고, phenol/chloroform 추출법¹⁹⁾으로 genome DNA를 정제하였다. DNA 농도는 UV spectrophotometry(Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Cambridge, UK)로 260~280 nm에서 파장을 이용하여 측정하였다.

2.3. 중합효소연쇄반응

*F. nucleatum*의 16S rDNA 종-특이 중합효소

표 1. Bacterial strains used in this study

Species	Strains	Remarks
<i>Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum</i>	ATCC* 25586	type strain
<i>F. nucleatum subsp. nucleatum</i>	ATCC 23726	-
<i>F. nucleatum subsp. polymorphum</i>	ATCC 10953	type strain
<i>F. nucleatum subsp. vincentii</i>	ATCC 49256	type strain
<i>F. nucleatum subsp. fusiforme</i>	ATCC 51190	type strain
<i>F. periodonticum</i>	ATCC 33693	type strain
<i>F. necrophorum subsp. necrophorum</i>	ATCC 25286	type strain
<i>F. nucleatum subsp. animalis</i>	ATCC 51191	type strain
<i>F. nucleatum</i>	ChDC** F37 ⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC PV-F37 ⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC PV-F45 ⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC PV-F48 ⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC PV-F49 ⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC PV-F53 ⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC PV-F55 ⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC PV-F58 ⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC PV-F61 ⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC PV-F63 ⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC PV-F65 ⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC PV-F67 ⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F113 ⁺⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F119 ⁺⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F134 ⁺⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F145 ⁺⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F165 ⁺⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F174 ⁺⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F186 ⁺⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F218 ⁺⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F219 ⁺⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F251 ⁺⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F260 ⁺⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F267 ⁺⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F286 ⁺⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F288 ⁺⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F289 ⁺⁺	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F290 ⁺⁺	clinical isolate

* American Type Culture Collection(University Boulevard, Manassas, VA, USA)

** Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

+ Jang et al., 20039)

++ Identified in this study

연쇄반응 프라이머(ALL-F6; 5'-CGG GAG GCA
GCA GTG GGG AAT-3', Fn-R6; 5'-TTG CTT

GGG CGC TGA GGT TC-3')를 이용하여 선택배
지에 자라난 균주가 *F. nucleatum*인지를 일차 동

정하였다. AccuPower® Premix(Bioneer Co., Seoul, Korea)에 20 μ l의 PCR 혼합용액이 되도록 20 pmoles씩의 ALL-F6 및 Fn-R6 프라이머와 100 pg의 세균 genome DNA를 넣고, PTC-200 PCR machine(MJ Research Inc., Watertown, MA, USA)을 사용하여 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 중합효소연쇄반응의 조건은 94℃에서 2분간 predenaturation 시행한 후, 94℃에서 1분간 denaturation, 65℃에서 30초간 annealing, 72℃에서 45초간 extension 단계를 30회 반복한 후, final extension을 위해 72℃에서 10분간 시행하였다. 최종 반응물 중 2 μ l를 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 그 증폭 산물을 확인하였다.

*F. nucleatum*으로 확인된 세균은 16S rDNA를 증폭할 수 있는 universal PCR 프라이머(27F; 5'-AGA GTT TGA TC[A/C] TGG CTC AG-3', 1492R; 5'-TAC GG[C/T] TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 이용하여 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 중합효소연쇄반응의 조건은 94℃에서 2분간 predenaturation을 실시한 다음 94℃에서 1분간 denaturation, 55℃에서 30초간 annealing, 72℃에서 1분간 extension 과정을 30회 반복하여 시행하고, 마지막 extension을 72℃에서 10분간 시행하여 16S rDNA를 증폭하였다.

2.4. 증폭된 16S rDNA의 클로닝, 플라스미드 추출 및 핵산염기서열 결정

증폭한 16S rDNA를 pGEM-T easy vector(Promega Corp., Madison, WI, USA)에 제조회사의 지시에 따라 클로닝하고, *E. coli* DH5 α 에 형질 전환하였다. 제조된 플라스미드 DNA는 통상의 alkaline lysis법으로 AccuPrep™ Plasmid Extraction Kit(Bioneer Corp., Seoul, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 추출한 후 -20℃에 보관하여 핵산염기서열 결정

(Bioneer Co., Seoul, Korea)에 사용하였다.

16S rDNA 핵산염기서열 결정을 위해 ChDC-GEM-F(5'-TTC CCA GTC ACG ACG TTG TAA AA-3'), ChDC-GEM-R(5'-GTG TGG AAT TGT GAG CGG ATA AC-3'), Seq-F1(5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') 및 Seq-R2(5'-GAC TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3') 프라이머를 이용하였다. 4가지 프라이머에 의해 결정된 핵산염기서열을 하나의 contig로 assemble하기 위해 SeqMan 프로그램(Version 5.0; DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA)을 이용하여 분석하였다.

이와 같이 치주질환 환자의 치면세균막으로부터 분리한 *F. nucleatum* 세균 종과 Jang 등⁹⁾이 연구하여 얻은 *F. nucleatum* 균주를 본 연구에 사용하였다(표 1).

2.5. DNA 프로브의 정제 및 표지

DNA 프로브의 정제는 QIAEX II®(QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 정제하였다.

정제된 DNA 프로브는 DIG-High Prime(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)을 이용하여 표지하였다. 표지 과정은 1 μ g의 DNA에 최종 부피가 16 μ l가 되도록 증류수를 넣고 95℃에서 10분간 가열하여 DNA를 변성시킨 후 곧바로 얼음에 넣어 냉각하였다. 여기에 4 μ l DIG-High Prime을 첨가하여 잘 섞어 spin-down한 후 37℃에서 12시간 배양하였다. 배양 후 0.2 M EDTA를 넣어 반응을 정지시켰다. 표지된 DNA는 AccuPrep™ PCR Purification kit(Bioneer Co., Seoul, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 실시하였고, 여과액은 다음 실험에 사용하였다.

2.6. Dot blot hybridization 및 Chemiluminescence detection

표 1에서 제시한 36개의 균주를 dot blot

hybridization에 이용하였다. 95℃에서 10분간 가열하여 DNA를 변성시킨 후 재빨리 얼음에 넣어 5분 동안 식혔다. 변성된 DNA 20 ng을 2.5 μ l씩 nylon membrane(Schleicher & Schuell, Inc., Keene, NH, USA)에 spot하였고, 120℃에서 30분 동안 baking하였다. Nylon membrane은 hybridization solution (50% deionized formamide, 5×SSC(0.75 M sodium chloride, 0.075 M sodium citrate), 2% blocking reagent)에서 42℃, 2시간 동안 prehybridization하였다. 그 다음 solution은 버리고, DIG-labeled probe가 담긴 hybridization solution을 넣고 42℃에서 overnight시켰다. 그 다음 nylon membrane은 2×wash buffer(2×SSC, 0.1% SDS)로 2회 세척하고, 이를 다시 0.5×wash buffer(0.5×SSC, 0.1% SDS)로 68℃에서 15분간 2회 세척하였다. Nylon membrane을 100 ml의 blocking solution에 넣고 30분간 배양한 다음 blocking solution에 anti-DIG-AP conjugate를 75 mU/ml(1:10,000)를 첨가하여 희석한 20 ml antibody solution에 membrane를 담아 30분간 반응시킨 후, 15분간 100 ml washing buffer로 2회 세척하였다. Nylon membrane을 20 ml의 detection buffer에 넣어 2~5분간 담고, DNA 쪽이 위로 향하게 하여 polyethylene film 상에 놓고 CSPD[®][25 mM disodium 3-<-4-methoxysporo[1,2-dioxetane-3,2-(5-chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,3}], 7]decan]-4-yl>phenyl phosphate]를 detection buffer에 약 1:100으로 희석하여 적용한 후 즉시 반대측 sheet로 덮어 기질이 membrane 상부에 골고루 퍼질 수 있게 한 다음 과량의 용액을 제거하고, 5분간 실온에서 반응 후 형광반응이 일어나도록 37℃ 배양기에서 15분간 반응시킨 후, 실온에서 X-ray film(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)에 두 시간 동안 노출시켰다.

3. 연구성적

3.1. 16S rDNA 핵산염기서열 결정법을 통한 *F. nucleatum*의 동정

F. nucleatum 선택배지에서 보라색을 띠는 세균 균락을 선택하여 *F. nucleatum* 종-특이 프라이머로 중합효소연쇄반응을 실시한 결과 23개 균주에서 양성반응을 보였다. 23 균주를 16S rDNA 클로닝과 핵산염기서열 결정법을 시행하여 이미 알려진 *F. nucleatum* 표준균주의 16S rDNA 핵산염기서열과의 상동성을 알아보고자 GenBank의 데이터 베이스를 이용하여 검색한 결과, 98% 이상의 상동성을 갖는 23 균주의 *F. nucleatum*을 얻었다. 12 균주의 *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, 9 균주의 *F. nucleatum* subsp. *nucleatum/polymorphum*, 1 균주의 *F. nucleatum* subsp. *canifelim*, 2 균주의 *Fusobacterium* sp.이 검출되었다(표 2).

본 연구에서 분리한 23 균주의 *F. nucleatum* 및 Jang 등⁹⁾이 분리한 *F. nucleatum* 균주를 이미 알려진 *F. nucleatum* 표준균주의 16S rDNA 핵산염기서열과 MegAlign(Version 5.0; DNASTAR)으로 비교한 결과 88.7~99.7%의 상동성을 보였다. 그리고 이들의 핵산염기서열간의 관계를 phylogram을 이용하여 비교한 결과 30개 이내의 염기가 서로 다른 경우를 한 군으로 분류하면 10개의 그룹으로 나눌 수 있었다(그림 1). 그룹 I은 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953과 ChDC PV-F42, ChDC PV-F45, ChDC PV-F46, ChDC PV-F48, ChDC PV-F49, ChDC PV-F53, ChDC PV-F55, ChDC PV-F61, ChDC PV-F63, ChDC PV-F65, ChDC PV-F67, ChDC F113, ChDC F119, ChDC F145, ChDC F175, ChDC F219, ChDC F286, ChDC F288, ChDC F289, ChDC F290간에 96.5~99.7%의 상동성을

표 2. Homology search of 16S rDNA nucleotide of *F. nucleatum* isolated from subgingival plaque of Korean periodontitis patients

Strains	Genus or species match (Gene Bank access number)	Identity(%)
ChDC F113	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>canifelium</i> RMA 12708 (AY162219)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 (AF287812)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (AE010523)	98
	<i>F. naviforme</i> NCTC 11464 (AJ006965)	98
ChDC F119	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 (AF287812)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>canifelium</i> RMA 12708 (AY162219)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (AE010523)	98
	<i>F. naviforme</i> NCTC 11464 (AJ006965)	98
ChDC F128	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>canifelium</i> RMA 12708 (AY162219)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (AE010523)	98
	<i>F. naviforme</i> NCTC 11464 (AJ006965)	98
ChDC F130	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (AE010523)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>canifelium</i> RMA 12708 (AY162220)	98
ChDC F134	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (AE010523)	98
	<i>F. naviforme</i> NCTC 11464 (AJ006965)	98
ChDC F136	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>canifelium</i> RMA 12708 (AY162220)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (AE010523)	98
	<i>F. naviforme</i> NCTC 11464 (AJ006965)	98
ChDC F145	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>canifelium</i> RMA 12708 (AY162220)	99
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 (AF287812)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (AE010523)	98
	<i>F. naviforme</i> NCTC 11464 (AJ006965)	98
ChDC F165	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>canifelium</i> RMA 12701 (AY162219)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (AE010523)	98
	<i>F. naviforme</i> NCTC 11464 (AJ006965)	98
ChDC F171	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>canifelium</i> RMA 12701 (AY162219)	98
ChDC F174	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>canifelium</i> RMA 12701 (AY162219)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (AE010523)	98
ChDC F175	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>canifelium</i> RMA 12701 (AY162219)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (AE010523)	98
ChDC F186	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 (AF287812)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>canifelium</i> RMA 12701 (AY162219)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (AE010523)	98

보였다. 그룹 II는 ChDC F165, 그룹 III는 ChDC F47, 그룹 IV는 *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586, ChDC F37, ChDC F38, ChDC F130으로 98.4~99.7%의 상동성을 보였고, 그룹 V는 *F. nucleatum* subsp. *animalis* NCTC 12276, ChDC PV-F58(97.3%), 그룹 VI는 *F.*

(계속)

Strains	Genus or species match (Gene Bank access number)	Identity(%)
ChDC F206	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>canifelium</i> RMA 12701 (AY162219)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (AE010523)	98
	<i>F. naviforme</i> NCTC 11464 (AJ006965)	98
ChDC F213	<i>Fusobacterium</i> sp. oral clone BS011 (AF432130)	98
	<i>Fusobacterium</i> sp. oral clone EX162 (AY134900)	98
	<i>F. nucleatum</i> E9_12 (AF481217)	98
ChDC F218	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>canifelium</i> RMA 11693 (AY162222)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (AE010523)	98
ChDC F219	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 (AF287812)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (AE010523)	98
ChDC F251	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (AE010523)	98
ChDC F260	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (AE010523)	98
ChDC F267	<i>Fusobacterium</i> sp. oral clone BS011 (AF432130)	98
	<i>Fusobacterium</i> sp. oral clone EX162 (AY134900)	98
	<i>F. nucleatum</i> E9_12 (AF481217)	98
ChDC F286	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 (AF287812)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>canifelium</i> RMA 12701 (AY162219)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (AE010523)	98
	<i>F. naviforme</i> NCTC 11464 (AJ006965)	98
ChDC F288	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 (AF287812)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>canifelium</i> RMA 12701 (AY162219)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (AE010523)	98
	<i>F. naviforme</i> NCTC 11464 (AJ006965)	98
ChDC F289	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 (AF287812)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>canifelium</i> RMA 12701 (AY162219)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (AE010523)	98
	<i>F. naviforme</i> NCTC 11464 (AJ006965)	98
ChDC F290	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 (AF287812)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>canifelium</i> RMA 12701 (AY162219)	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (AE010523)	98
	<i>F. naviforme</i> NCTC 11464 (AJ006965)	98

nucleatum subsp. *vincentii* ATCC 49256, ChDC F8, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* NCTC 11326, ChDC PV-F37, 그룹 VII은 ChDC F171, ChDC F213, ChDC F251, ChDC F260, ChDC F267, 그룹 VIII은 ChDC F128, ChDC F134, ChDC F136, ChDC F174, 그룹 IX은 ChDC

F206, 그룹 X은 ChDC F218이 속하였다.

3.2. Dot blot hybridization

F. nucleatum subsp. *nucleatum*의 아종-특이 DNA 프로브 Fu4(1.3 kb)는 8개의 *F. nucleatum* 표준균주와 22개의 한국인에서 분리한 *F.*

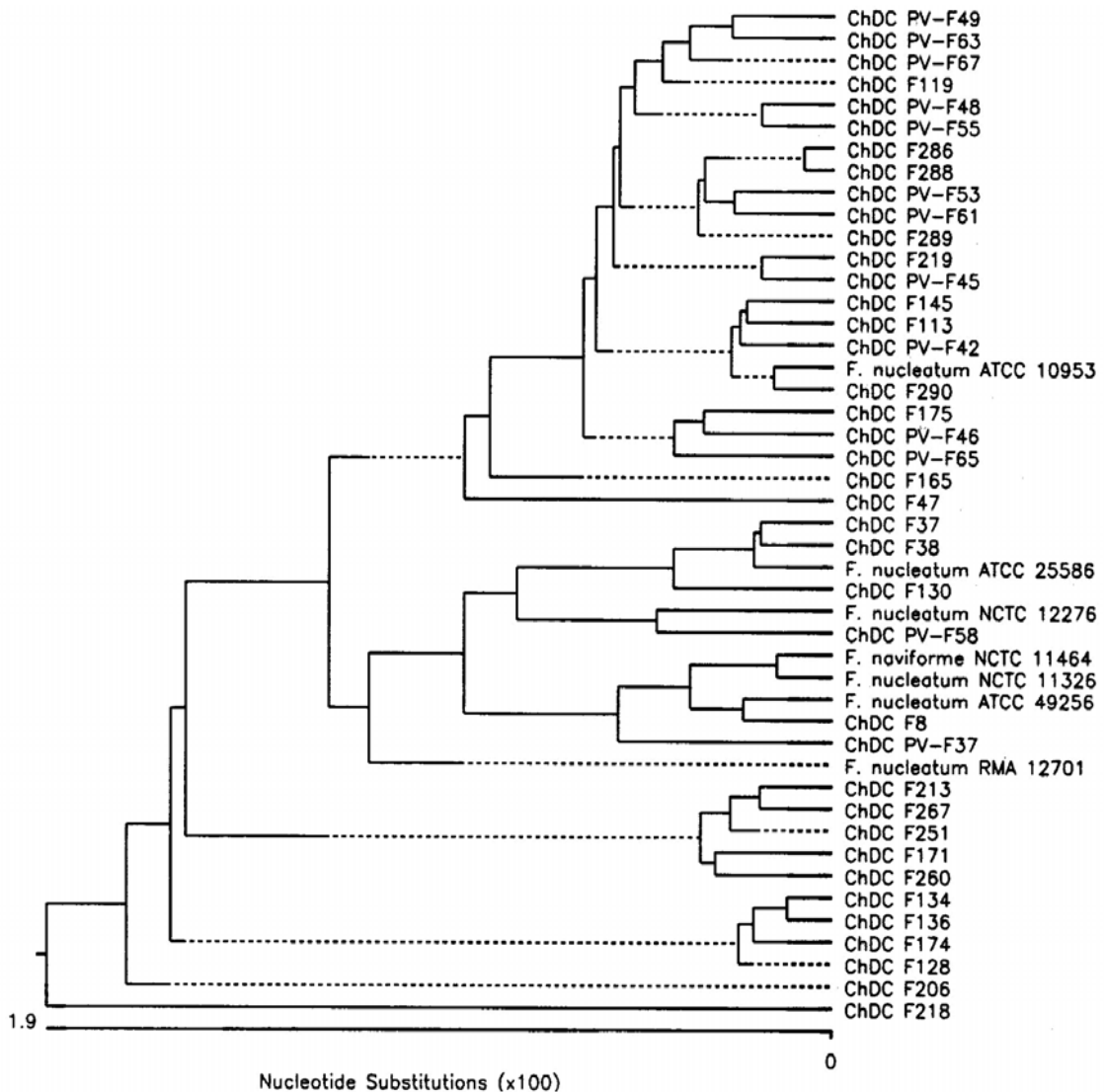


그림 1. Phylogram derived from homology analysis from 16S rDNA sequence of *F. nucleatum* isolated from subgingival plaque of Korean periodontitis patients.

*nucleatum*에서 양성반응을 보였다. 특히, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*(ATCC 25586, ATCC 23726)과 *F. nucleatum* subsp. *animalis* ATCC 51191에서 강하게 양성반응을 보였다. 그리고, ChDC F37, ChDC PV-F53, ChDC PV-F61, ChDC PV-F63, ChDC F165, ChDC F219, ChDC F286, ChDC F288 등에서 강하게 양성반응을 보

였다. 프로브 Fp4(0.8 kb)는 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953에서 양성반응을 보였고, ChDC PV-F61에서 강하게 양성반응을 보였다. 프로브 Fv35(1.9 kb)는 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256에서 양성반응, 프로브 Fs17(8.2 kb)은 *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190과 ChDC PV-F55에서 양

표 3. Location of the genomic DNAs from *F. nucleatum* blotted onto a nylon membrane

	1	2	3	4	5
A	Fnn, ATCC 25586	ChDC F37	ChDC PV-61	ChDC F165	ChDC F286
B	Fnn, ATCC 23726	ChDC PV-37	ChDC PV-63	ChDC F174	ChDC F288
C	Fnp, ATCC 10953	ChDC PV-45	ChDC PV-65	ChDC F186	ChDC F289
D	Fnv, ATCC 49256	ChDC PV-48	ChDC PV-67	ChDC F218	ChDC F290
E	Fnf, ATCC 51190	ChDC PV-49	ChDC F113	ChDC F219	
F	Fp, ATCC 33693	ChDC PV-53	ChDC F119	ChDC F251	
G	Fne, ATCC 25286	ChDC PV-55	ChDC F134	ChDC F260	
H	Fna, ATCC 51191	ChDC PV-58	ChDC F145	ChDC F267	



그림 2. Dot blot hybridization. Hybridization was performed with DIG-labeled insert DNA probes Fu4 (A), Fp4 (B), Fv35 (C), Fs17 (D).

성반응을 보였다(표 3, 그림 2).

4. 총괄 및 고안

한국인의 치주질환 부위에서 분리한 *F. nucleatum*을 아종 수준에서 동정하기 위한 본 연구에서 16S rDNA 종-특이 중합효소연쇄반응 프라이머를 이용하여 23개의 *F. nucleatum*으로 여겨지는 균주를 분리할 수 있었다. 이 균주의 16S rDNA 핵산염기서열을 분석한 결과 *F. nucleatum* 표준균주와 98% 이상의 상동성을 갖는 23 균주를 얻었다. 그리고, Kook 등¹²⁾이 개발한 *F. nucleatum* 아종-특이 DNA 프로브 Fu4(1.3 kb), Fp4(0.8 kb), Fv35(1.9 kb) 및 Fs17(8.2 kb) 등을 이용하여 dot blot hybridization을 실시한 결과, Fu4의 경우 *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 23726, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953, *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190 이외에 *F. periodonticum* ATCC 33693, *F. necrophorum* subsp. *necrophorum* ATCC 25286 및 *F. nucleatum* subsp. *animalis* ATCC 51191에서도 양성반응을 확인할 수 있었다. Fp4의 경우에서도 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953 이외에 *F. nucleatum* subsp. *animalis* ATCC 51191에서 양성반응을 확인할 수 있었다. 이와 같은 반응은 *F. nucleatum*의 4가지 아종 이외에 *F. periodonticum* ATCC 33693, *F. necrophorum* subsp. *necrophorum* ATCC 25286 및 *F. nucleatum* subsp. *animalis* ATCC 51191 균주들 간의 DNA 상동성에 의한 결과로 생각되어진다.

한국인에서 분리한 *F. nucleatum* 균주와 *F.*

nucleatum 표준균주의 16S rDNA 유전자 핵산염기서열간의 상동성을 보기 위해서 MegAlign으로 분석하여 Phylogram을 만들어 본 결과 10 그룹으로 나눌 수 있었다(그림 1). 20 균주의 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum*, 3 균주의 *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, 2 균주의 *F. nucleatum* subsp. *vincentii*, 1 균주의 *F. nucleatum* subsp. *animalis* 그리고 어떠한 아종으로도 분류되지 않은 13 균주가 검출되었다. 따라서 분류되지 않은 13 균주는 *F. nucleatum* 16S rRNA 유전자 핵산염기서열간에 있어서 상동성이 떨어지는 것을 알 수 있었고, *F. nucleatum* 4가지 아종 이외에 새로운 아종이 존재할 수 있다는 가능성을 암시하고 있다. 아직 *F. nucleatum* 4가지 아종의 표준균주를 포함하여, 여러 임상균주들의 16S rRNA 유전자 핵산염기서열 자료가 부족하기 때문에 새로운 아종의 존재 유무를 결정하기는 어려움이 있다고 할 수 있고, 또한 한국인에서 분리한 *F. nucleatum*을 아종 수준에서 동정하기 위해서는 한계점이 존재한다고 할 수 있다. 따라서, Gharbia & Shah⁶⁻⁸⁾가 *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum*, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* 및 동물에서 분리한 *F. nucleatum* subsp. *animalis*을 분류하는데 이용하였던 OGR과 GDH 전기영동패턴법과 Dzink 등²⁾이 *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* 및 *F. nucleatum* subsp. *vincentii*를 분류하는데 이용하였던 SDS-PAGE 방법 그리고, 전통적인 표준 세균배양법과 생화학검사등을 부가적으로 실시하여 한국인에서 분리한 *F. nucleatum* 균주를 아종 수준에서 동정하고, 재분류하는 작업이 필요할 것으로 생각된다.

DNA 프로브법은 시간적, 경제적 그리고 노동력적인 측면에서 많은 장점을 가지고 있고, 전통적인 세균배양법, 항원-항체반응을 이용한 방법보다 특이도와 민감도에 있어서도 뛰어난 것으로

보고 되고 있다²¹⁾). 그림 1 & 2의 결과를 비교해보면 16S rDNA 핵산염기서열의 Phylogram 분석 결과와 dot blot hybridization 결과가 차이가 있음을 관찰할 수 있다. Phylogram에서 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* 그룹에 속했던 ChDC F290 균주의 경우 *F. nucleatum* 아종-특이 DNA 프로브 Fp4에서는 아무런 반응을 보이지 않았고, 이 그룹에 해당하지 않았던 ChDC PV-F37 균주에서는 양성반응을 보였다. 그리고, Fs17은 *F. nucleatum* subsp. *fusiforme*에 반응하는 아종-특이 DNA 프로브이지만, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* 그룹에 해당하는 ChDC PV-F55 균주에서도 양성 반응을 보였다. 따라서, 본 연구에서 얻어진 한국인의 치주질환 환자에서 분리한 *F. nucleatum* 16S rDNA 핵산염기서열을 아종 수준에서 분리하기 위해서는 먼저, *F. nucleatum* 표준균주의 16S rDNA 핵산염기서열 자료가 확실하게 갖추어져야 할 것으로 보인다. 그리고, Kook 등¹²⁾이 개발한 *F. nucleatum* 아종-특이 DNA 프로브 Fu4, Fp4, Fv35 및 Fs17의 아종 특이성을 Dot blot hybridization만으로 검증하기에는 부족하였다. 그러므로, *F. nucleatum* 4가지 아종-특이 DNA 프로브의 효용성을 검증하기 위해서는 추가로 Southern blot hybridization을 실시하여 정확한 반응을 확인하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

만약, *F. nucleatum* 아종-특이 DNA 프로브의 효용성이 검증된다면, 한국인에서 분리한 *F. nucleatum*을 신속 정확하게 검출 및 동정하고, 치주질환과의 병인론 연구에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

5. 결 론

한국인의 치주질환 부위에서 분리한 *F. nucleatum*을 16S rDNA 유전자 클로닝 및 핵산

염기서열결정법으로 동정하고, *F. nucleatum* 아종-특이 DNA 프로브를 이용하여 dot blot hybridization을 실시한 다음, 두 결과를 비교 분석하여 DNA 프로브가 *F. nucleatum*의 아종 수준에서의 동정에 이용 가능한 지를 알아보고자 본 연구를 시행하였고, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 한국인에서 분리한 23 균주의 *F. nucleatum*을 표준균주와 16S rDNA 핵산염기서열을 분석한 결과 98% 이상의 상동성을 갖는 23 균주를 얻을 수 있었다. *F. nucleatum* 표준균주와 한국인에서 분리한 균주 간의 상동성을 보기 위해 MegAlign으로 분석하여 phylogram을 만들어 본 결과 10 그룹으로 나눌 수 있었다.
2. *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*의 아종-특이 DNA 프로브 Fu4(1.3 kb)는 실험에 이용된 8개의 *F. nucleatum* 표준균주에서 양성반응을 보였다. 그리고 한국인에서 분리된 8 균주에서 강하게 양성반응을 보였다. 프로브 Fp4(0.8 kb)는 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953에서 양성반응, 한국인에서 분리된 ChDC PV-F61 균주에서 강하게 양성반응을 보였다. 그리고, 프로브 Fv35(1.9 kb)는 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256에서 양성반응, 프로브 Fs17(8.2 kb)은 *F. nucleatum* subsp. *fusiform* ATCC 51190 및 ChDC PV-F55에서 양성반응을 보였다.

이상의 결과를 종합할 때, 한국인의 치주질환 환자에서 분리한 *F. nucleatum* 16S rDNA 유전자 핵산염기서열을 아종 수준에서 분리하기 위해서는 먼저 *F. nucleatum* 표준균주의 16S rDNA 핵산염기서열 자료가 확실하게 갖추어져야 할 것으로 보인다. 그리고, *F. nucleatum* 아종-특이 DNA 프로브 Fu4, Fp4, Fv35 및 Fs17의 아종 특이성을 Dot blot hybridization만으로 검증하기에

는 부족하였다. 그러므로, 4가지 *F. nucleatum* 아종-특이 DNA 프로브의 효용성을 검증하기 위해서는 추가로 Southern blot hybridization을 실시하여 정확한 반응을 확인하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. Clin Microbiol Rev 1996;9:55-71
2. Dzink JL, Sheenan MT, Socransky SS.. Proposal of three subspecies of *Fusobacterium nucleatum* Knorr 1922: *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* subsp. nov., comb. nov.; *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* subsp. nov., nom. nev., comb. nov.; and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii* subsp. nov., nom. rev., comb. nov. Int J Syst Bacteriol 1990;40:74-78
3. Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. J Clin Periodontol 1988;15:316-323
4. Dzink JL, Tanner AC, Haffajee AD, Socransky SS. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. J Clin Periodontol 1985;12:648-659
5. Gharbia SE, Shah HN, Lawson PA, Haapasalo M. Distribution and frequency of *Fusobacterium nucleatum* subspecies in the human oral cavity. Oral Microbiol Immunol 1990;5:324-327
6. Gharbia SE, Shah HN. Characteristics of glutamate dehydrogenase, a new diagnostic marker for the genus *Fusobacterium*. J Gen Microbiol 1988;134(Pt 2):327-332
7. Gharbia SE, Shah HN. Glutamate dehydrogenase and 2-oxoglutarate reductase electrophoretic patterns and deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization among human oral isolates of *Fusobacterium nucleatum*. Int J Syst Bacteriol 1989;39:467-470
8. Gharbia SE, Shah HN. Heterogeneity within *Fusobacterium nucleatum*, proposal of four subspecies. Lett Appl Microbiol 1990;10: 105-108
9. Jang HS, et al. Isolation of *Fusobacterium nucleatum* from subgingival plaque in Korean. J Korea Academy Periodontol 2003;33:149-158
10. Jantzen E, Hofstad T. Fatty acids of *Fusobacterium species*: taxonomic implications. J Gen Microbiol 1981;123(1): 163-171
11. Knorr M. Über die fusospirillare Symbiose, die Gattung *Fusobacterium* (K. B. Lehmann) und *Spirillum sputigenum*. (Zugleich ein Beitrag zur Bakteriologie der Mundhöhle). I. Mitteilung: die Gattung *Fusobacterium*. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 1 Orig 1923;89:4-22
12. Kook JK, Kim MK, Seong JH, et al. A new method for rapid screening of bacterial species- or subspecies-specific DNA probes. FEMS Microbiol Lett 2003;219: 121-127

13. Lippke JA, Strzempko MN, Raia FF, Simon SL, French CK. Isolation of intact high-molecular-weight DNA by using guanidine isothiocyanate. *Appl Environ Microbiol* 1987;53:2588-2589
14. Moore WE, Holdeman LV, Smibert RM, et al. Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. *Infect Immun* 1982;38:1137-1148
15. Moore WE. Microbiology of periodontal disease. *J Periodontol Res* 1987;22:335-341
16. Moore WE, Hash DE, Holdeman LV, Cato EP. Polyacrylamide slab gel electrophoresis of soluble proteins for studies of bacterial floras. *Appl Environ Microbiol* 1980;39:900-907
17. Morris ML, Andrews RH, Rogers AH. The use of allozyme electrophoresis to assess genetic heterogeneity among previously subspeciated isolates of *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11:15-21
18. Potts TV, Holdeman LV, Slots J. Relationships among the oral fusobacteria assessed by DNA-DNA hybridization. *J Dent Res* 1983;62:702-705
19. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Ed, 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989
20. Savitt ED, Keville MW, Peros WJ. DNA probes in the diagnosis of periodontal microorganisms. *Arch Oral Biol* 1990;35 (Suppl.):153S-159S
21. Walter JL. DNA probe and enzyme analysis in periodontal diagnostic. *J Periodontol* 1992;63:1102-1109

Abstract

Identification of *Fusobacterium nucleatum* isolated from Korean by *F. nucleatum* subspecies-specific DNA probes

Hwa-Sook Kim, Joong-Ki Kook¹

Department of Dental Hygiene, Chunnam Techno College,

¹*Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University*

Key words : *Fusobacterium nucleatum*, 16S rDNA, nucleotide, dot blot hybridization

The purpose of this investigation was to evaluate of the specificity of *Fusobacterium nucleatum* subspecies-specific DNA probes using dot blot hybridization. To confirm whether the clinical isolates were *F. nucleatum* or not, 16S rDNA of them were cloned and sequenced. The sequencing data were used in homology search with database of GenBank. When the homology was above 98% compared with the nucleotide sequence of a certain bacteria, it was judged as the same species with the bacteria. 23 strains of *F. nucleatum* were isolates from subgingival plaque of periodontitis patient. The clinical isolates of *F. nucleatum* were classified into 10 groups using phylogenetic analysis of 16S rDNA sequence. *F. nucleatum* subspecies nucleatum-specific DNA probe Fu4 (1.3 kb) reacted with genomic DNAs from 8 type strains of *F. nucleatum* and it reacted strongly with those from 8 clinical isolates. The Fp4 (0.8 kb) reacted with *F. nucleatum* subsp. polymorphum ATCC 10953 and one clinical isolates. Fv35 (1.9 kb) and Fs17 (8.2 kb) probes reacted with genomic DNAs from *F. nucleatum* subsp. vincentii ATCC 49256 and *F. nucleatum* subsp. fusiform ATCC 51190, respectively. Our results showed that it is not enough to evaluate the specificity of *F. nucleatum* subspecies-specific DNA probes with only dot blot hybridization. Therefore, Southern blot analysis will be necessary to confirm the specificity of *F. nucleatum* subspecies-specific DNA probes.