

무작위로 클로닝한 *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406 지놈 DNA의 제한절편 hybridization법에 의한 세균동정

서울대학교 치과대학 치과보존학교실  
엄원석 · 윤수한

Abstract

BACTERIAL IDENTIFICATION  
WITH RANDOM-CLONED RESTRICTION FRAGMENT OF  
*Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406 GENOMIC DNA

Won-Seok Um, Yoon-Soo Han

Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Seoul National University

*Porphyromonas endodontalis* is a black-pigmented anaerobic Gram negative rod which is associated with endodontal infections. It has been isolated from infected dental root canals and submucous abscesses of endodontal origin. DNA probe is an available alternative, offering the direct detection of a specific microorganism. Nucleic-acid probes can be of different types : whole different : whole-genomic, cloned or oligonucleotide probes. Whole-genomic probes are the most sensitive because the entire genome is used for possible hybridization sites. However, as genetically similar species of bacteria are likely to be present in specimens, cross-reactions need to be considered. Cloned probes are isolated sequences of DNA that do not show cross-reactivity and are produced in quantity by cloning in a plasmid vector. Cloned probes can approach the sensitivity found with whole-genomic probes while avoiding known cross-reacting species. *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406 (serotype O<sub>1</sub>K<sub>1</sub>) was selected in this experiment to develop specific cloned DNA probes. *EcoR* I - digested genomic DNA fragments of *P. endodontalis* ATCC 35406 were cloned into pUC18 plasmid vector. From the *E. coli* transformed with the recombinant plasmid 4 clones were selected to be tested as specific DNA probes. Restriction-digested whole-genomic DNAs prepared from *P. gingivalis* 38 (serotype a), W50 (serotype b), A7A1-28 (serotype c), *P. inter-*

\* 본 연구는 1994년도 서울대학교병원 임상연구비에 의해서 이루어진 것임.

*media* 9336(serotype b), G8-9K-3(serotype c), *P. endodontalis* ATCC 35406(serotype O<sub>1</sub>K<sub>1</sub>), *A. a* Y4(serotype b), 75(serotype a), 67(serotype c), were each separated on agarose gel electrophoresis, blotted on nylon membranes, and were hybridized with digoxigenin-dUTP labeled probe. The results were as follows :

1. Three clones of 1.6kb(probe *e*), 1.6kb(probe *f*), and 0.9kb(probe *h*) in size, were obtained. These clones were identified to be a part of the genomic DNA of *P. endodontalis* ATCC 35406 judging from their specific hybridization to the genomic DNA fragments of their own size on Southern blot.
2. The clones of 4.9kb(probe *i*) was identified to be a part of the genomic DNA of *P. endodontalis* ATCC 35406, but not to specific for itself. It was hybridized to *P. gingivalis* A7A1-28, *P. intermedia* G89K-3.

key words : cloned DNA probe, hybridization, whole-genome DNA, restriction enzyme, *P. endodontalis* ATCC 35406

## I. 서 론

신속하고도 민감도가 높은 미생물 동정방법은 미생물학 연구나 실제 감염성 질환의 진단 양자에 모두 필수적이다. 특히, 치수 및 치근단 질환의 발병과 진행에 있어서 미생물의 역할은 점차 중요시 되어왔으며<sup>1,2,3,4)</sup>, 혐기성 세균의 배양기술이 발달함에 따라 혐기성 세균의 비중이 증대되고 있다<sup>5,6)</sup>.

혐기성 세균중 Black-pigmented anaerobic rods는 감염근관에서 많이 검출되었으며<sup>7,8,9)</sup>, 특히 타진반응, 동통, 부종, 삼출액등의 증상이 있는 경우에 더 많이 검출되었다<sup>10)</sup>. Black-pigmented anaerobic rods중에서 *Bacteroides melaninogenicus*의 2가지 strain인 *B. gingivalis*와 *B. asaccharolyticus*를 연구하던 중에 DNA homology와 enzyme test에서 다른 성질을 지닌 균을 발견하여 *Bacteroides endodontalis*라 명명하게 되었다<sup>11)</sup>. 최근에 이 3가지 asaccharolytic black pigmented anaerobic rod를 Porphyromonas로 명명하였으며<sup>12)</sup> 이들 중 구강내 감염에서 주로 나타나는 것은 *P. gingivalis*와 *P. endodontalis*로 감염근관과 치주낭에서 발견되었

다. 특히 *P. endodontalis*는 감염근관과<sup>13)</sup> 치근단 병소에서 검출되었으며<sup>14, 15, 16, 17)</sup> 타진반응이나 악취등의 임상증상과 연관되어 나타났나<sup>18)</sup>. 또한 다른 구강내 감염이나 구강외 감염에는 관여하지 않는다고 알려졌으나 감염근관이 없는 사람의 구강상피나 치주낭에서도 소량 검출되었다는 보고가 있다<sup>19)</sup>. *P. endodontalis*는 그람 음성의 절대 혐기성 간균으로<sup>20)</sup> 혈액 한천 배지상에서 Black-pigmented colony를 형성하며 다른 Black-pigmented anaerobic rods보다 대기중의 산소에 더 민감하다<sup>19)</sup>.

현재까지 근관감염이나 치근단 병소의 병원성 미생물에 대한 연구는 주로 배양(culture)에 의해 세균을 검출하여 왔지만, 근관내에서 다수로 나타나는 혐기성 세균을 배양 하는 것은 시간 소모와 노력이 많이 들며 배양 방법에 따라 다른 결과를 초래하기도 한다. 특히, 혐기성, 호탄산가스성의 전형적으로 매우 취약한 세균은 짧은 시간동안 만이라도 공기(산소)에 노출되면 곧 죽게 된다. 역사적으로 이러한 세균들은 철저한 혐기적 배양법에 의하여 동정·분류되어 왔고, 많은 부분이 세균배양에 의존되지만 이러한 방법들을 통상의 환자 진단에 이용하기

에는 많은 제약이 있다. 환자의 진단을 위하여는 시료를 치료실에서 채취한 후 실험실까지 수송해야 하며 그 동안 세균이 수초 이상 산소에 노출되지 않도록 주의해야 한다. 또한, 비록 이러한 혐기성 세균을 무산소 상태로 수송하는데 필요한 배지가 고안되어 있지만, 수송도중의 온도변화나 그 외 여러 요인에 의해 세균이 죽을 수 있다. 이 세균들 중 많은 것들은 아주 까다로운 영양 요구조건을 갖고 있어서 복잡한 조성의 배지가 필요하다. 또한 여러 세균을 동정하기 위하여 이용하는 선택 배지 및 생화학적 검사에는 비용과 시간이 많이 든다. 현재 DNA 프로브 기술은 여러 방면에서 응용되고 있으며, 배양이 까다로운 세균들을 배양 과정을 거치지 않고 민감하고 특이하며 또한 용이하게 동정할 수 있게 함으로써 배양에 따르는 여러 가지 문제, 즉 샘플의 이송과 혐기성 배양과정 등의 어려운 점을 완화시킬 수 있을 것으로 생각된다.

이에, 현재 감염근관과 치근단 병소의 주요 원인균으로 보고되고 있는 *Porphyromonas endodontalis*의 지놈(genome) DNA의 제한효소 절편을 부작위로 클로닝하여 이 세균을 식별하는데 이용될 특이 프로브(specific probe)로

이용해 보고자 한다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. 세균 및 배양

실험에 사용한 세균은 표 1과 같다.

혐기성 세균은 BHI(Brain Heart Infusion) broth(DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, U. S. A.)에 5 $\mu$ l/ml hemin과 0.5 $\mu$ l/ml Vit. K를 첨가하여 37°C, anaerobic chamber (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>)에서 2~3일 동안 배양하였다.

### 2. Whole-genome DNA의 추출

Whole-genome DNA는 배양액 1.5ml를 소형원심분리기에서 2분간 원심분리하여 세균 pellet을 얻고 이를 Tris-EDTA(TE) 완충액(10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5) 567 $\mu$ l, 10% SDS 30 $\mu$ l, protease K (20mg/ml) 3 $\mu$ l에 다시 잘 현탁하였다. 이를 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 5M NaCl 100 $\mu$ l를 첨가하여 잘 섞고 hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)/NaCl 용액(10% CTAB을 포함한 0.7

Table 1. Bacterial strains used in this study.

Strain	Source/Reference	Serotype
<i>Porphyromonas gingivalis</i>		
381	Forsytu	a
W 50	ND*	b
A7A1-28	SUNYab	c
<i>Prevotella intermedia</i>		
9336	NCTC	b
G8-9K-3	SUNYab	c
<i>Porphyromonas endodontalis</i>		
35406	ATCC	O <sub>1</sub> K <sub>1</sub>
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitance</i>		
Y4	Forsytu	b
75	SUNYab	a
67	SUNYab	c

\*ND : not determined

M NaCl) 80 $\mu$ l를 첨가하고 다시 잘 섞고 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 배양하였다. 이를 동량의 chloroform/isoamylalcohol (24 : 1)과 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25 : 24 : 1)로 순서대로 추출하였다. 상층의 DNA 수용액을 취하여 새 시험관에 옮기고 0.6배 용량의 isopropanol을 첨가하여 추출된 세균의 whole-genomic DNA를 침전시킨 후 70% 에탄올로 침전 DNA를 씻고 내동건조 하였다. 건조된 DNA를 TE 완충액 100 $\mu$ l에 용해하여 4 $^{\circ}$ C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 3. DNA 농도의 측정

추출한 DNA는 UV-Spectrophotometer(BE-CKMAN, U. S. A.)를 사용하여 260nm에서 그 농도를 측정하였다.

### 4. Southern blot의 시행

균주의 지놈 DNA 10 $\mu$ g을 반응용량이 30 $\mu$ l가 되도록 각 제한효소에 적합한 10X 완충액 3 $\mu$ l, spermidine(0.1 M) 3 $\mu$ l와 15 unit의 EcoR I 과 Pst I 제한효소를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 후 다시 제한효소 15 unit를 가하고 1시간 더 반응 시켰다. 반응이 끝난 후 그 중 30 $\mu$ l(10 $\mu$ g)를 6 $\mu$ l 6X gel-loading buffer (0.5 M EDTA, 0.25% BPB, 0.25% cyclone cyanol, 30% glycerol)와 섞고 수평 전기영동장치를 이용하여 0.7% agarose gel(1X TAE 완충액)에 전기영동(27mA, 25V, overnight)하였다. 전기영동이 끝나고 제한절편 패턴을 사진촬영한 후 gel을 증류수로 행구고 실온에서 0.25N HCl에 5분 동안 담그어 DNA를 depurination 하였다. 다음 gel을 증류수로 행구고 실온에서 30분 동안 1.5M NaCl, 0.5M NaOH 용액에 담그어 DNA를 denaturation한 후 증류수로 행구고 실온에서 3M NaCl, 0.5M Tris-HCl, pH7.5 용액에 30분 동안 담그어 중화한 후, 10X standard saline citrate (SSC : 1X SSC, 0.15M NaCl, 0.015M sodium citrate)에 잠시 담그어 놓았다가 통상의 capillary transfer technic으로 nylon membrane(BOEHRINGER MANHEIM)에 DNA를 blot하였다. DNA가

blot된 membrane은 5분간 10X SSC에 씻고 공기중에서 말린 후 120 $^{\circ}$ C 진공오븐에 30분 동안 넣었다가 플라스틱 백에 넣어 봉하고 실험에 사용하기 까지 -4 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

### 5. *Porphyromonas endodontalis* 35406 지놈 DNA의 EcoR I 제한절편의 무작위적 클로닝

EcoR I 으로 완전히 소화한 150ng의 *Porphyromonas endodontalis* 35406 지놈 DNA와 EcoR I 소화후 세균성 alkaline phosphatase (BAP)로 처리한 pUC18 plasmid 105ng을 혼합하고 반응용량이 20 $\mu$ l가 되도록 한 후 1 unit의 T4 DNA ligase를 가하였다. 그 다음 16 $^{\circ}$ C에서 12시간 ligation한 후 그 일부를 CaCl<sub>2</sub>로 처리한 *Escherichia coli* MC1061rec- 현탁액 200 $\mu$ l와 섞고 30분간 얼음에 놓아둔 후 42 $^{\circ}$ C 수조내에서 1분간 열처리하고 즉시 얼음위에서 냉각함으로써 *E. coli*에 형질전환이 일어나게 하였다. 이렇게 처리된 *E. coli* 현탁액에 1ml의 LB broth를 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양함으로써 ampicillin 저항성 선택을 하였다. 나타난 집락을 각각 5ml의 Ampicillin LB broth에 접종하고 37 $^{\circ}$ C에서 배양하여 plasmid를 추출하였다.

### 6. Plasmid 추출

Plasmid는 alkaline lysate법으로 추출하였다. 세균배양액 1.5ml을 30초 동안 원심(12,000xg)하고, 얻어진 세균 덩어리에 100 $\mu$ l의 용액 I (50mM glucose, 25mM Tris/HCl[pH 8.0], 10mM EDTA[pH 8.0])을 가하여 현탁한 후 200 $\mu$ l의 용액 II (0.2N NaOH, 1% SDS)을 첨가하고 잘 혼합한 다음 잠시 얼음위에 놓았다. 이것에 150 $\mu$ l의 ice-cold 용액 III (3M potassium acetate, 23% glacial acetic acid)를 첨가하고 즉시 잘 섞은 후 얼음에 5분 동안 방치하였다. 이것을 원심분리(12,000xg)하여 상청액을 새시험관에 옮기고 실온에서 동량의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25 : 24 : 1)로 추출한 후 2배 용량의 100% 에탄올로 DNA를 침전 시켰다. DNA 침전을 70%

에탄올로 씻고 공기중에서 건조시킨 후 30 $\mu$ l의 RNAase TE[pH 8.0, DNAase-free pancreatic RNAase(20 $\mu$ l/ml)를 포함]에 녹이고 *EcoR* I 으로 소화한 후 전기영동으로 지놈 DNA 제한절편의 존재를 확인하였다.

### 7. DNA probe의 정제와 표지

*Porphyromonas endodontalis* 35406 지놈 DNA *EcoR* I 제한절편을 함유한 재조합 플라스미드들로부터 제한절편을 분리, 정제하였다. 재조합 플라스미드 DNA를 *EcoR* I 으로 소화한 후 수직전기영동장치를 이용하여 1% agarose (1X TAE) slab gel에 전기영동(14mA, 250V, 3시간)한 후 ethidium bromide로 염색하고 UV-illuminator상에서, 지놈 DNA 제한절편 band가 들어있는 agarose gel 부분을 잘라낸 후 QIAEX agarose gel 추출법(QIAGEN)에 의해 DNA를 정제하였다. 정제된 지놈 DNA 제한절편은 random primed DNA labeling technique을 이용하여 digoxigenin-dUTP로 표지하였다. DNA는 끓는 물(100 $^{\circ}$ C)에서 10분동안 가열하여 denature시키고 즉시 ice/NaCl에서 냉각시켰다. microcentrifuge tube에 denature시킨 DNA 1 $\mu$ l, hexanucleotide 2 $\mu$ l, dNTP labeling mixture 2 $\mu$ l 그리고 Klenow enzyme 1 $\mu$ l을 잘 섞고 전체용량은 19 $\mu$ l가 되도록 소독된 증류수로 맞추었다. 37 $^{\circ}$ C에서 20시간 동안 배양한 후, 2 $\mu$ l의 EDTA(0.2M, pH 8.0)용액으로 반응을 중지시켰다. 표지된 DNA는 2.5 $\mu$ l의 LiCl와 미리 냉각시켜 놓은 75 $\mu$ l의 에탄올(-20 $^{\circ}$ C)로 침전시키고 -20 $^{\circ}$ C에서 50 $\mu$ l의 TE buffer에 저장하였다. labelling efficiency는 dot blot assay로 검사하였다.

### 8. 하이브리드 형성

Southern blot한 membrane을 standard pre-hybridization buffer(5x SSC, 1.0% (w/v) Blocking Reagent for nucleic acid hybridization, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02% sodium dodecyl sulfate (SDS)가 담긴 플라스틱 봉투에 넣어 밀봉하고 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 pre-hybridization하였다. DIG-labeled probe를 끓

는 물에서 10분간 변성시키고 즉시 얼음에서 냉각한 후 hybridization 용액과 membrane이 담긴 플라스틱 봉투에 넣고 다시 밀봉한 후 42 $^{\circ}$ C에서 overnight하여 하이브리드가 생기게 하였다.

### 9. Lumigen<sup>TM</sup> PPD를 이용한 화학발광의 검출

Hybridization 과 post-hybridization washing 후, buffer 1(100mM maleic acid, 150 mM NaCl, pH 7.5)에서 1분동안 흔들어 주고 100ml의 buffer 2(1% blocking reagent in buffer 1)에서 30~60분동안 가볍게 동요시켜 blocking하였다. buffer 2를 제거한 후 membrane을 항체용액 (anti-DIG-alkaline phosphatase 1 : 10,000 in buffer 2)에서 30분동안 배양하고 buffer 1(buffer 1 with 0.3% Tween 20)으로 2번 씻었다. membrane을 2장의 acetate (plastic page protector)사이에 넣고 대략 1.5ml의 희석된 Lumigen PPD (1 : 100 in buffer 3)를 첨가하고 15분동안 배양하였다. 화학발광의 검출은 standard X-ray film에 1시간동안 노출시켜 현상한 후, hybridization signal을 찾았다.

## III. 실험결과

1. Hybridization에 사용할 9가지 균주의 restriction endonuclease pattern은 그림 1과 같다.

2. *Porphyromonas endodontalis* 35406 지놈 DNA의 *EcoR* I 제한절편의 무작위적 클로닝의 결과 모두 9개의 세균 집락(a, b, c, d, e, f, g, h, i)이 나타났으며 각각의 집락에서 DNA를 추출하여 전기영동을 걸어 *P. endodontalis* 35406 지놈 DNA 제한절편의 클로닝 여부를 확인한 결과 5개의 집락(b, e, f, h, i)에서 *P. endodontalis*의 insert가 나타났다. 그 중 4개(e, f, h, i)를 선택하여 DNA probe로 이용하였다.

3. 4개의 클론중 e, f, h는 *P. endodontalis* 35406의 지놈 DNA와 hybridization signal을 나타내었고, i는 *P. endodontalis* 외에 *P. gingivalis* A7A1-28, *P. intermedia* 9336, *P. inter-*

media G8-9K-3와도 hybridization signal을 나타내었다. (그림 2 및 표 2)

Figure 1. The restriction endonuclease pattern. Lanes : 1.  $\lambda$  DNA m. w. marker : 2. *P. gingivalis* 381 : 3. *P. gingivalis* W50 : 4. *P. gingivalis* A7A1-28 : 5. *P. intermedia* 9336 : 6. *P. intermedia* G8-9K-3 : 7. *P. endodontalis* 35406 : 8. *A. a* Y : 9. *A. a* 75 : 10. *A. a* 67.

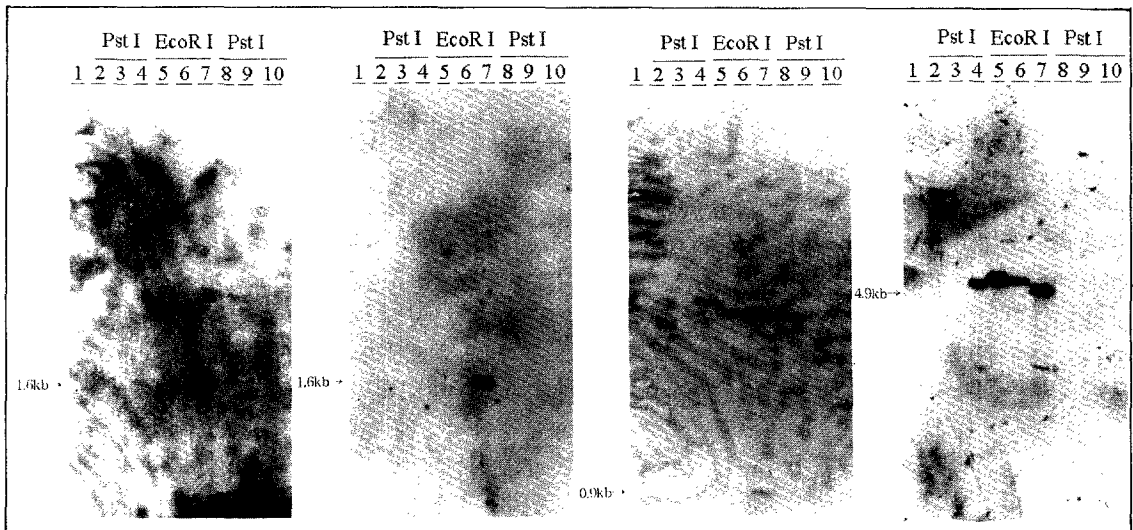
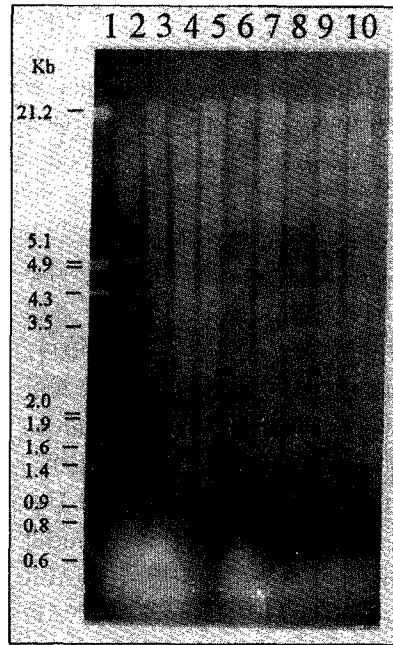


Figure 2. Southern hybridization of the probe *e*(1.6kb), probe *f*(1.6kb), probe *h*(0.9kb), and probe *i*(4.9kb) to EcoR I digests of DNAs from *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406. Lanes : 1. DNA m. w. marker : 2. *P. gingivalis* 381 : 3. *P. gingivalis* W50 : 4. *P. gingivalis* A7A1-28 : 5. *P. intermedia* 9336 : 6. *P. intermedia* G8-9K-3 : 7. *P. endodontalis* 35406 : 8. *A. a* Y4 : 9. *A. a* 75 : 10. *A. a* 67.

Table 2. Hybridization signal on Southern blot of restriction-digested genomic DNA

Bacterial strain(serotype)	R. E.*	Hybridization band (estimated molecular size)			
		Probe e (1.6kb)	Probe f (1.6kb)	Probe h (0.9kb)	Probe i (4.9kb)
<i>P. gingivalis</i> 381(a)	Pst I	—	—	—	—
<i>P. gingivalis</i> W 50(b)	Pst I	—	—	—	—
<i>P. gingivalis</i> A7A1-28(c)	Pst I	—	—	—	6.2kb
<i>P. intermedia</i> 9336(b)	EcoR I	—	—	—	7.1kb
<i>P. intermedia</i> G8-9K-3(c)	EcoR I	—	—	—	7.1, 4.4kb
<i>P. endodontalis</i> 35406(O,K <sub>1</sub> )	EcoR I	1.6kb	1.6kb	0.9kb	4.9kb
<i>A. a</i> Y4(b)	Pst I	—	—	—	—
<i>A. a</i> 75(a)	Pst I	—	—	—	—
<i>A. a</i> 67(c)	Pst I	—	—	—	—

\*Restriction enzyme

#### IV. 총괄 및 고안

*Porphyromonas endodontalis*는 다른 어떤 black-pigmented anaerobic rods보다 감염근관과 치근단 병소와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다<sup>11,12)</sup>. 1984년 Steenbergen과 Winkelhoff<sup>11)</sup>는 *B. gingivalis*와 *B. asaccharolyticus*를 연구하던 중에 DNA homology와 enzyme test에서 다른 성질을 지닌 균을 발견하여 *B. endodontalis*라 명명하였으며 후에 Haapasalo도 균의 존재를 확인한 바 있다. 그후 1985년 Winkelhoff<sup>14)</sup>는 치근단 농양에서 *P. endodontalis*를 검출하였고 1986년 Haapasalo<sup>15)</sup>는 급성감염이 있는 환자에서 검출하였으며 1989년 Sundqvist<sup>16)</sup>는 치근단 병소가 있는 환자에서 *P. intermedia*와 *P. endodontalis*가 가장 흔히 발견된다고 보고하였다.

여러 연구에서 *P. endodontalis*의 존재를 입증했지만 *P. endodontalis*는 대기중의 산소에 민감하여 배양이 어려우므로 치근단 병소에서 검출하지 못한 경우도 있다<sup>17)</sup>. 따라서 다른 면역학적 방법으로 균을 검출하려는 시도가 이루어져 1988년 Pnater<sup>21)</sup>등은 간접면역형광법과 배양법으로 감염근관에서 *P. endodontalis*를 검출하는 방법을 비교 연구하였으며 그 결과

간접면역형광법으로 더 많은 균을 검출할 수 있었다고 보고한 바 있다.

면역학적 방법으로 균을 검출하려는 시도는 *P. endodontalis*와 다른 black-pigmented anaerobic rod사이의 공통항원 연구를 기초로 이루어졌다. Steenbergen<sup>11)</sup>등은 간접면역형광법으로 연구한 결과 *P. endodontalis*와 *P. gingivalis*, *P. asaccharolytica*사이의 공통항원이 존재하지 않는다고 하였으나, 후에 Winkelhoff<sup>22)</sup>는 *P. endodontalis*와 *P. gingivalis*사이에는 공통항원이 없으나 *P. endodontalis*와 13P. *asaccharolytica*사이에는 공통항원이 존재한다고 보고하였다.

현재 DNA 프로브 기술은 여러 방면에서 응용되고 있으며, 배양이 까다로운 병원성 세균들을 배양과정을 거치지 않고 민감하고 특이하며 또한 용이하게 동정할 수 있게 함으로써 감염근관과 치근단 병소와 관련된 병원성 미생물을 밝히는 데 큰 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다. DNA 프로브의 가장 커다란 장점은 고도로 정밀한 특이성을 가진 것이며, 수많은 다른 세균과 섞여 있는 경우 검출하고자 하는 세균이 극미량 존재하여도 검출이 가능하다<sup>23)</sup>. DNA 프로브의 검출한계는 P<sup>32</sup>-labeled randomly cloned probe의 경우 sample당 2×10<sup>5</sup> ce-

lls이며<sup>24)</sup>, P<sup>32</sup>-labeled oligonucleotide probe의 경우 sample당 2.9×10<sup>4</sup> cells이다<sup>25,26)</sup>. 초기 연구에서는 하이브리드 형성을 검출하기 위해 방사성 동위원소를 사용하였으나, 조작하기가 위험하고 오랜시간(7일)의 노출이 필요하며 영구보존할 수가 없는 단점이 있었다. 본 실험에서는 방사성 동위원소를 사용하지 않고, 화학발광검출(Lumigen™ PPD)을 이용하였다. 이러한 화학발광검출은 노출시간이 짧고(1시간) 방사능표지와 비슷한 정도의 특이성을 나타낸다.

비교적 적은 종류의 세균이 존재할 경우, DNA 프로브를 이용하여 세균을 검출하는 것보다 배양을 통해 DNA 프로브로 검출되지 않는 다른 세균이 검출될 수도 있다. 이러한 배양의 장점을 이용하여 적은 종류의 sample의 경우, DNA 프로브의 민감도(sensitivity)에 문제가 있을 수 있지만, 배양을 한 후 DNA 프로브를 적용해 보는 colony lift방법이 있다<sup>27)</sup>. 본 실험을 하기전에 예비 실험을 통해 환자에게서 *Phorphromonas endodontalis*를 배양하려고 시도하였으나 성공하지 못하였다. 치수 및 치근단 질환의 주원인균이면서도 절대 혐기성세균으로 배양하기가 여간 어렵지 않았다. 균을 채취하기위해서 대상치아를 분리한 후 철저히 소독하여 다른 균의 오염을 피하고 근관치료를 위한 와동을 소독된 bur를 이용하여 형성한다음, 근관이 개방된 후 paper point를 삽입하여 준비된 transfer media가 담긴 시험관으로 옮기는 수초동안에도 균이 죽을 수 있는 가능성이 높다. 실험실까지 운반하기 위해서 GasPak Pouch™ (Becton Dickinson and Co.)와 같은 혐기적 상태를 유지할 수 있는 장치를 이용하기도 하지만 배지에 옮겨서 배양할 수 있는 확률은 극히 미약하다. IIF(Indirect Immunofluorescence)와 같은 방법으로 균의 존재여부를 확인할 수 있지만 strain type이나 혹은 같은 균주내의 serotype을 확신하기에는 부족함이 많았다. 이에 *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406을 이용하여 DNA probe를 만든 후 *P. endodontalis*를 검출하는데 이용해 보고자 하였다. 실험결과에서 나타난 것처럼 4가지 DNA probe중 probe

e와 probe f는 서로 다른 분리된 colony에서 분리하였지만 같은 m. w.의 probe로 나타났고, probe i의 경우 *P. gingivalis*와 *P. intermedia*와도 hybridization을 나타내어 *P. endodontalis*에 특이한 probe로 사용하기에는 부적절한 것으로 사료된다. 이러한 DNA probe를 이용할 경우 배지상에서 colony를 형성하기에는 적은 밀도로 세균이 존재하거나 세균이 죽은잔재로 남아있을 경우 배양의 결과만으로 검출할 수 없는 것도 colony lifts방법을 이용하여 세균의 존재를 확인할 수 있다. 특히, *P. endodontalis*의 경우 그 자체의 monoinfection만으로는 발병하지 않으며 다른 혐기성 세균과 함께 작용하여 결정적인 역할을 한다<sup>19)</sup>. 따라서 배양이나 생화학적 성질이 유사한 다른 Black-pigmented anaerobe와의 구별이 어렵다. 본 실험결과에서도 probe i의 경우 *P. gingivalis*와 *P. intermedia*와도 hybridization signal을 나타내는 것으로 보아 DNA의 염기배열상에도 어느정도 동종성이 있는 것으로 사료된다. 1992년 Herweijer등은 3가지 혈청형(O<sub>1</sub>K<sub>1</sub>, O<sub>1</sub>K<sup>-</sup>, O<sub>1</sub>K<sub>2</sub>)의 *P. endodontalis*를 분리하였는데, 본 실험에서는 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD)에서 상업적으로 판매하는 균주밖에 구하지 못하였다. 아직까지 clinical isolate를 배양하는데 성공하지 못하였기 때문에 Whole-genome DNA를 이용한 세균동정에 사용해 보고자 본 실험을 시행하였으나, 앞으로 O<sub>1</sub>K<sub>1</sub>이외의 다른 혈청형과도 hybridization을 해보는 것이 필요한 것 같다. 물론 환자에게서 *P. endodontalis*를 분리배양하는 것이 가장 바람직하겠지만 배양방법이나 기타 여러 문제점들에 대해서는 좀 더 연구가 필요한 것으로 사료된다.

## V. 결 론

본 실험에서는 *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406 지놈 DNA의 EcoR I 제한효소 절편을 무작위로 클로닝하여 probe e(1.6kb), probe f(1.6kb), probe h(0.9kb), probe i(4.9 kb)의 4개의 지놈 DNA 절편의 클론을 probe로



선택하였고, 표준균주에서 추출한 지놈 DNA와 hybridization assay를 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. probe e, f, h는 Southern blot상에서 각각의 크기에 해당하는 동종의 DNA 제한절편과 hybridization signal을 나타냄으로써 *P. endodontalis* ATCC 35406의 지놈 DNA임을 확인 할 수 있었다.
2. probe i는 *P. endodontalis* ATCC 35406의 *P. gingivalis* A7A1-28, *P. intermedia* 9336, *P. intermedia*G8-9K-3과도 hybridization signal을 나타내어 *P. endodontalis* 검출을 위한 probe로 사용하기에는 부적절한 것으로 나타났다.

(본 논문을 지도하여 주신 윤수한 교수님과 치주과 정종평 교수님, 또한 실험과정중 많은 도움을 주신 이상철, 김경아 선생님과 706호 여러분 그리고 보존과 의국원 여러분께 깊은 감사사를 드립니다.)

#### 참고문헌

1. Kakehashi, S., Stanley H. R., Fitzgerald R. J. : The effects of surgical exposure of dental pulp in germ-free and conventional laboratory lab. *Oral Surg.* 20 : 340-349, 1965.
2. Zavistoski, J. et al : Quantitative bacteriology of endodontic infection. *Oral Surg.* 49 : 171-174, 1980.
3. Griffe, M. B. et al : The relationship of *Bacteroides melanogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. *J. of Oral Surg.* 50 : 457-461, 1980.
4. Fukushima, H. et al : Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. *J. Endo.* 16 : 534-538, 1990.
5. Attebery, H. R. et al : An acute anaerobic infection following endodontic treatment. *J. Endo.* 6 : 793-795, 1980.
6. Kannagara, D. W. et al : Bacteriology and treatment of dental infections. *Oral Surg.* 50 : 103-109, 1980.
7. Matusow, R. J. et al : Anaerobic isolates in primary pulpal-alveolar cellulitis cases : endodontic resolutions and drug therapy consideration. *J. Endo.* 9 : 535-543, 1983.
8. Yoshida, M. et al : Correlation between clinical symptom and microorganisms from root canal of teeth with periapical pathosis. *J. Endo.* 13 : 24-28, 1987.
9. van Winkelhoff et al : The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infection. *J. Clin. Periodontol.* 15 : 145-155, 1988.
10. Sundqvist, G. et al : Bacterial study of necrotic pulps. Umea. Univ. Odontologic Dissertation No. 7 Umea Sweden, 1976.
11. van Steenberg, van Winkelhoff, D. Mayrand, D. Grenier, J. de Graaf : *Bacteroides endodontalis* sp. nov, and Asaccharolytic Black-pigmented *Bacteroides* species from infected dental root canals. *Int. J. of Systematic Bact.* 34 : 118-120, 1984.
12. H. N. Shah, M. D. Collins : Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new Genus *Porphyromonas*. *Int. J. of Systematic bact.* 38 : 128-131, 1988.
13. Baumgartner, C. et al : Bacteria in the apical 5mm of infected root canals. *J. Endo.* 17 : 380-383, 1991.
14. van Winkelhoff et al : *Bacteroides endodontalis* and other Black-pigmented *Bacteroides* Species in odontogenic abscesses. *Inf. & Immunity* 49 : 494-497, 1985.
15. Haapasalo, M. et al : Black-pigmented *Bacteroides* spp. in human apical periodontitis. *Inf. & Immunity* 53 : 149-153, 1986.
16. Sundqvist, G. : Prevalence of black-pig-

- mented *Bacteroides* species in root canal infections. *J. Endo.* 15 : 13–19, 1989.
17. Sundqvist G. : Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol. Immunol.* 7 : 257–262, 1992.
  18. Hashioka, K. et al : The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. *J. Endo.* 18 : 558–561, 1992.
  19. van Winkelhoff et al : *Porphyromonas endodontalis* : Its role in endodontal infection. *J. Endo.* 18 : 431–434, 1992.
  20. Balows, A. et al : Manual of clinical microbiology. 5th ed. American society of microbiology. Washington D. C.
  21. Pantera, E. A. et al : Indirect immunofluorescence for the detection of bacteroides species in human dental pulp. *J. Endo.* 14 : 218–223, 1988.
  22. van Winkelhoff et al. : Serological characterization of black-pigmented *Bacteroides endodontalis*. *Inf. & immunity* 51 : 972–974, 1986.
  23. DiRienzo JM, Cornell S, Boehringer H. Use of randomly cloned DNA fragments for the identification of oral spirochetes. *Oral Microbiol Immunol* 1991, 6 : 88.
  24. Dix K, Watanabe SM, McArdle S, Lee DI, Randolph C, Moncla B, Schwartz DE. Species-specific oligodeoxynucleotide probes for the identification of periodontal bacteria. *J Clin Microbiol* 1990, 28 : 319.
  25. Maiden MFJ, Tanner A, McArdle S, Najpauer K, Goodson JM. Tetracycline fiber therapy monitored by DNA probe and cultural methods. *J Periodont Res* 1991, 26 : 452.
  26. Goodson JM, Tanner A, McArdle S, Dix K, Watanabe SM. Multicenter evaluation of tetracycline fiber therapy. III. Microbiological response. *J Periodont Res* 1991, 26 : 440.
  27. Gunaratnam M, Smith GLF, Socransky SS, Smith CM, Haffajee AD. Enumeration of subgingival species on primary isolation plates using colony lifts. *Oral Microbiol Immunol* 1992, 7 : 14.
  28. Herweijer, J. A. et al : Characterization of total membrane proteins of *Porphyromonas endodontalis*. *J. Endo.* 18 : 620–624, 1992.