

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

김화숙·국중기<sup>1</sup>

전남과학대학 치위생과, <sup>1</sup>조선대학교 치과대학 구강생화학교실

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

## I. 서론

치주질환 병원균 중 하나인 *Fusobacterium nucleatum*은 구강 내에서 빈도 높게 검출되는 세균으로 그람음성의 비아포형성 및 비운동성을 지닌 편성 혐기성 간균이다<sup>14,15</sup>. *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 하나이다<sup>1</sup>. 성숙된 치면세균막과 초기 치은염 부위, 그리고, 파괴적인 치주질환 부위인 활성부위에서 세균수가 상대적으로 증가하고, 건강한 치은열구나 성공적으로 치료된 비활성부위에서도 많은 수가 검출된다<sup>3,4,14</sup>. 따라서 *F. nucleatum*은 활성부위와 비활성부위의 치주병소와 관련하여 아종에 따라 각기 다른 병원성을 갖는 것으로 생각하게 되었다<sup>5</sup>. 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<sup>2,4,5,7,8,10,11,16,17,18</sup>.

*F. nucleatum*의 아종 수준에서의 분류는 Gharbia & Shah<sup>6-8</sup> 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 등<sup>2</sup>도 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 등<sup>12)</sup>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 등<sup>12)</sup>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 등<sup>12)</sup>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 치주질

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  $\mu$ l/ml erythromycin, 5  $\mu$ l/ml crystal violet)에 도말한 후, 37°C 혐기성배양기(85% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 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 등<sup>13)</sup>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 추출법<sup>19)</sup>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 <sup>+</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC PV-F37 <sup>+</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC PV-F45 <sup>+</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC PV-F48 <sup>+</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC PV-F49 <sup>+</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC PV-F53 <sup>+</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC PV-F55 <sup>+</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC PV-F58 <sup>+</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC PV-F61 <sup>+</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC PV-F63 <sup>+</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC PV-F65 <sup>+</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC PV-F67 <sup>+</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F113 <sup>++</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F119 <sup>++</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F134 <sup>++</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F145 <sup>++</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F165 <sup>++</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F174 <sup>++</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F186 <sup>++</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F218 <sup>++</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F219 <sup>++</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F251 <sup>++</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F260 <sup>++</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F267 <sup>++</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F286 <sup>++</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F288 <sup>++</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F289 <sup>++</sup>	clinical isolate
<i>F. nucleatum</i>	ChDC F290 <sup>++</sup>	clinical isolate

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

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

<sup>+</sup> Jang et al., 20039)

<sup>++</sup> 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  $\mu$ 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°C에서 2분간 predenaturation 시행한 후, 94°C에서 1분간 denaturation, 65°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 45초간 extension 단계를 30회 반복한 후, final extension을 위해 72°C에서 10분간 시행하였다. 최종 반응물 중 2  $\mu$ l를 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 그 증폭 산물을 확인하였다.

*E. nucleatum*으로 확인된 세균은 16S rDNA를 증폭할 수 있는 universal PCR 프라이머(27F; 5'-AGA GTT TGA TCA/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°C에서 2분간 predenaturation을 실시한 다음 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 과정을 30회 반복하여 시행하고, 마지막 extension을 72°C에서 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  $\alpha$ 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°C에 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 등<sup>9)</sup>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  $\mu$ g의 DNA에 최종 부피가 16  $\mu$ l가 되도록 증류수를 넣고 95°C에서 10분간 가열하여 DNA를 변성시킨 후 곧바로 얼음에 넣어 냉각하였다. 여기에 4  $\mu$ l DIG-High Prime을 첨가하여 잘 섞어 spin-down한 후 37°C에서 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  $\mu$ 씩 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 membrane을 담아 30분간 반응시킨 후, 15분간 100 ml washing buffer로 2회 세척하였다. Nylon membrane을 20 ml의 detection buffer에 넣어 2~5분간 담그고, DNA 쪽이 위로 향하게 하여 polyethylene film 상에 놓고 CSPD<sup>®</sup>[25 mM disodium 3-<-4-methoxysporo[1,2-dioxetane-3,2-(5-chloro)tricyclo[3.3.1.1,3, 7]decane]-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. *canifelium*, 2 균주의 *Fusobacterium* sp.이 검출되었다(표 2).

본 연구에서 분리한 23 균주의 *F. nucleatum* 및 Jang 등<sup>9)</sup>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
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (AE010523)	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.*

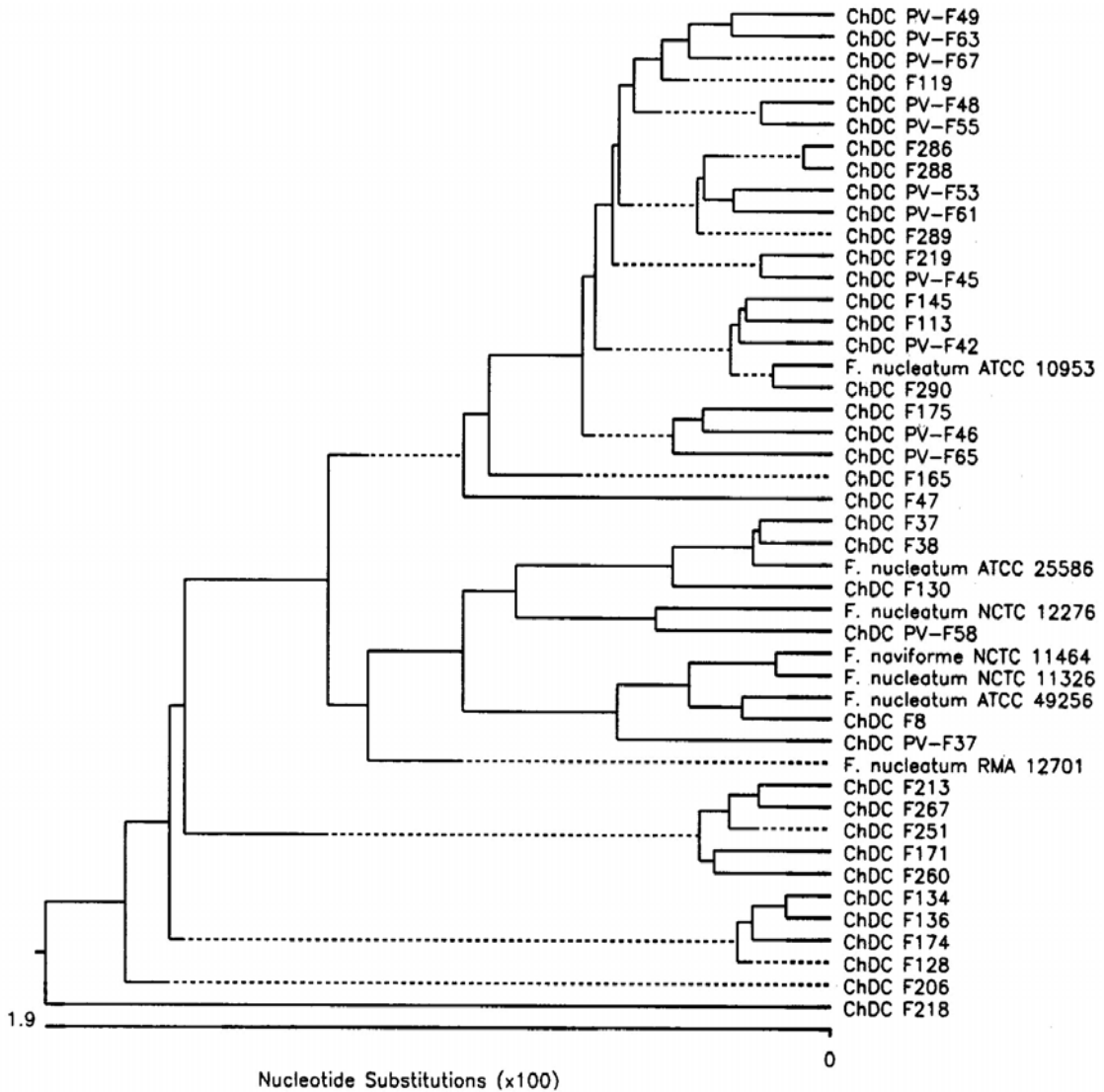


그림 1. Phylogram derived from homology analysis from 16S rDNA sequence of *F. nucleatum* isolated from subgingival plaque of Korean periodontitis patients.

*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 증합효소연쇄반응 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 등<sup>12)</sup>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 & Shah<sup>6-8)</sup>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 Dzik 등<sup>2)</sup>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 있다<sup>21)</sup>). 그림 1 & 2의 결과를 비교해 보면 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 등<sup>12)</sup>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. 결론

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 알아보하고자 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 subspeciati ed 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 Kook<sup>1</sup>

*Department of Dental Hygiene, Chunnam Techno College,*

<sup>1</sup>*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.