International Journal of Oral Bioiogy, Vol. 38, No. 1 Match 31 2013, p. 21-27
Copyright ⓒ 2013, *The Korean Academy of Oral Bioiogy*
http://dx.doi.org/10.11620/IJOB.2013.38.1.021

International Journal of Oral Biology

Molecular Identification of Anginosus Group Streptococci Isolated from Korean Oral Cavities

Soon-Nang Park, Mi-Hwa Choi, 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 Feburary 6, 2013 ; revised March 7, 2013 ; accepted March 8, 2013)

Anginosus group streptococci (AGS) were classified based on the nucleotide sequences of the 16S rRNA gene (16S rDNA) and comprised *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus intermedius*, and *Streptococcus constellatus*. It is known that AGS is a causative factor of oral and systematic diseases. The purpose of this study was to discriminate the 56 clinical strains of AGS isolated from Korean oral cavities using phylogenetic analysis of 16S rDNA and species-specific PCR at the species-level. The 16S rDNA of clinical strains of AGS was sequenced using the dideoxy chain termination method and analyzed using MEGA version 5 software. PCR was performed to identify the clinical strains using species-specific primers described in previous studies and *S. intermedius*-specific PCR primers developed in our laboratory. The resulting phylogenetic data showed that the 16S rDNA sequences can delineate the *S. anginosus*, *S. intermedius*, and *S. constellatus* strains even though the 16S rDNA sequence similarity between *S. intermedius* and S. *constellatus* is above 98%. The PCR data showed that each species-specific PCR primer pair could discriminate between clinical strains at the species-level through phylogenetic analysis of 16S rDNA nucleotide sequences. These results suggest that phylogenetic analysis of 16S rDNA and PCR are useful tools for discriminating between AGS strains at the species-level.

Key words: anginosus group streptococci, identification, clinical strains, oral cavity, 16S rDNA, PCR

*Correspondence to: Joong-Ki Kook, Department of Oral Biochemistry, School 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: jkkook@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-commercialuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

Streptococci(연쇄구균)는 16S rRNA 유전자(16S rDNA) 핵산염기서열비교분석법에 의해 여섯 개 계통발생학적(phylogenetic) 군(mitis, mutans, anginosus, bovis, pyogenic 및 salivarius) 으로 나누어진다[1]. 구강 내 서식하는 anginosus 그룹 연쇄구균(anginosus group streptococci, AGS)에는 *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus* 및 *Streptococcus anginosus* 등이 있다[1]. 이들 AGS들은 구강 및 전신의 여러 기회감염성 질환에 관여하는 것으로 알려져 있다[2,3]. 특히 *S. anginosus*는 구강암 및 식도암과 관련이 있다고 보고되었다[4].

세균을 종 수준으로 동정하는 데 있어 황금 기준은 DNA-DNA hybridization법과 16S rDNA 핵산염기서열비교분석법이다[5]. 하지만 임상에서 이러한 방법으로는 검체에서 AGS를 동정하는 데에는 경제적 및 시간적 제약이 있다. 이들 중 16S rDNA 핵산염기열비교분석법은 DNA-DNA hybridization법에 비해 유전자 클로닝법과 핵산염기서열 결정법의 발달로 비교적 쉽게 실행할 수 있다. 하지만 *S.*

*intermedius*와 *S. constellatus* 표준균주들간의 16S rDNA 핵산염기서열 상동성이 98.5% 이기 때문에 이러한 방법으로는 두 세균 종을 동정하는 데 어려움이 있다. 현재까지 알려진 세균 동정 및 검출법 중에서 polymerase chain reaction (PCR) 법은 정확하고 신속하며 민감도가 높기 때문에 치면세균막과 같은 임상 검체에서 특정 세균의 검출에 널리 이용되고 있다[6,7].

숙주-세균간의 상호작용 및 병인론 연구에 일반적으로 해당 세균 종의 표준균주를 이용하지만, 경우에 따라서는 독성이 강한 세균을 가지고 연구되고 있다. 그 한 예로 치주질환의 중요한 원인 균종인 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*의 경우 표준균주로 ATCC 33384가 있지만, 이보다 독력인 강한 ATCC 33384 (Y4) 또는 강력한 독력인자인 leukotoxin을 가지고 있는 JP2 균주를 가지고 병인론 연구가 진행되기도 한다[8,9]. 이러한 결과들은 인종과 지역에 따라 구강 내 세균 분포가 다르며, 이들 균주에 따른 사람 구강조직세포에 대한 병원성의 차이가 있다는 것을 의미한다. 그러므로 임상에서 분리한 여러 균주들 특히, 한국인의 구강에서 분리된 임상균주를 가지고 병인론 연구가 진행되어야 할 것이다.

그러므로 본 연구에서는 한국인에서 분리되어 AGS로 분류되었지만, 종-수준으로 분류가 되지 않은 임상균주들을 분자생물학적 방법인 16S rDNA 핵산염기서열비교분석법과 PCR법을 이용하여 종 수준으로 분류하여 향후 이들 세균 종을 이용한 병인론 연구를 위한 균주 제공을 위해 시행하였다.

재료 및 방법

세균 및 세균 배양

본 연구에서 사용된 균주들은 Table 1에 표기하였다. 이들 균주들은 ATCC (Type Culture Collection, USA) 및 KCTC (Korean Collection for Type Cultures, Biological Resource Center, Daejeon, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 그리고, 한국인에서 분리된 AGS 균주들은 한국구강미생물자원은행(Korean Collection for Oral Microbiology, Gwangju, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. 한국인에서 분리된 균주들은 조선대학교 치과대학 병원에서 종 수준으로 동정이 되지 않은 상태로 KCOM으로 기탁되었고 본 연구에서 16S rDNA 핵산염기서열을 결정하여 AGS에 속하는 것들만을 이용하였다.

16S rDNA 클로닝 및 핵산염기서열 결정

세균의 게놈 DNA들은 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit (iNtRON Co., Seoul, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 추출하였다.

16S rDNA 유전자는 Lane 등[10]이 보고한 27F 및 1492R 프라이머들을 이용하여 PCR법으로 증폭하였으며, 이들 프라이머들은 Bioneer사(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 제작하였다.

PCR 증폭물은 pGEN-T easy vector(Promega Crop., Madison, WI, USA)에 제조회사의 지시에 따라 클로닝하고, *E. coli* DH5α에 형질전환 하였다. 재조합 플라스미드는 *Accu-Prep*™ Plasmid Extraction Kit (Bioneer)를 이용하여 제조회사의 지시대로 추출하였다.

16S rDNA 핵산염기서열은 Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)를 이용하여 결정하였다. 이때 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')과 Seq-F1 (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') 프라이머들을 핵산염기서열 결정에 사용하였다[11].

계통발생학적 분석(Phylogenetic analysis)

16S rDNA 핵산염기서열의 상동성은 MegAlign 프로그램(DNAStar Lasergene™ 8.0, DNAStar, Inc., Madison, WI, USA)을 이용하여 측정하였다. 또한, 이들 16S rDNA 핵산염기서열은 MEGA version 5[12] 프로그램을 이용하여 Clustal W 법으로 정렬하고 neighbor-joining methods 법으로 계통도(phylogenetic tree)를 작성하였다. 이때 계통도의 신뢰도를 확인할 수 있는 bootstrap 값은 1,000회의 resampled data로부터 계산하였다.

PCR

AGS 임상균주를 종 수준에서 동정을 위해 종-특이 PCR 프라이머들을 이용하여 PCR을 시행하였다. *S. anginosus* 특이 PCR 프라이머는 Cho 등[13]이 개발한 ChDC-Ang-F7/ChDC-Ang-R7 프라이머들을 사용하였다. 이때 PCR은 98℃에서 전변성(predenaturation)을 2분간 1회 시행하고, 98℃에서 변성(denaturation)을 10초, 70℃에서 결합(annealing) 및 증폭(extension)을 30초간 30회 반복 수행하고, 72℃에서 최종 증폭을 5분간 시행하였다.

*S. intermedius*와 *S. constellatus*를 동정하기 위해서는 Takao 등[14]이 개발한 multiplex PCR 프라이머들(HYL-MIX-U/HYL-INT-D/HYL-CC-D)을 사용하였다. PCR은 전변성을 95℃에서 2분을 1회 시행하고, 변성(98℃에서 10초), 결합(58℃에서 15초), 증폭(70℃에서 30초)을 30회 반복 수행하고 70℃에서 최종 증폭을 5분간 시행하였다.

Neuraminidase 효소활성이 *S. intermedius*에만 있다는 보

Table 1. The strains used in this study

Species	Strains	Sources	GenBank accession no. 16S rDNA
S. anginosus	ATCC 700231T	Mesial subgingival plaque	NR_041722
S. constellatus	ATCC 27823T	Purulent pleurisy	NR_041721
S. intermedius	KCTC 3268T	Purulent infections	NR_028736
S. anginosus	KCOM 1348 (ChDC B181)	Maxillary sinusitis	KC569574
S. anginosus	KCOM 1380 (ChDC B232)	Maxillary sinusitis	KC569575
S. anginosus	KCOM 1396 (ChDC B248)	Maxillary Sinusitis	KC569576
S. anginosus	KCOM 1400 (ChDC B252)	Maxillary Sinusitis	KC569577
S. anginosus	KCOM 1409 (ChDC B261)	Maxillary Sinusitis	KC569578
S. anginosus	KCOM 1411(ChDC B263)	Maxillary Sinusitis	KC569579
S. anginosus	KCOM 1417 (ChDC B287)	Maxillary Sinusitis	KC569580
S. anginosus	KCOM 1022 (ChDC B311)	Maxillary sinusitis	KC569581
S. anginosus	KCOM 1026 (ChDC B319)	Maxillary sinusitis	KC569582
S. anginosus	KCOM 1453 (ChDC B407-I)	Maxillary sinusitis	KC569583
S. anginosus	KCOM 1827 (ChDC B543)	Cheek & submandibular space abscess	KC569584
S. anginosus	KCOM 1828 (ChDC B544)	Cheek & submandibular space abscess	KC569585
S. anginosus	KCOM 1830 (ChDC B557)	Cheek & submandibular space abscess	KC569586
S. anginosus	KCOM 1833 (ChDC B560)	Cheek & submandibular space abscess	KC569587
S. anginosus	KCOM 1834 (ChDC B561)	Cheek & submandibular space abscess	KC569588
S. anginosus	KCOM 1836 (ChDC B563)	Cheek & submandibular space abscess	KC569589
S. anginosus	KCOM 1467 (ChDC B640)	Acute pulpitis	KC569590
S. anginosus	KCOM 1511 (ChDC B684)	Acute pulpitis	KC569591
S. anginosus	KCOM 1515 (ChDC B688)	Acute pulpitis	KC569592
S. anginosus	KCOM 1522 (ChDC B695)	Periapical abscess	KC569593
S. anginosus	KCOM 1537 (ChDC B710)	Acute pulpitis	KC569594
S. anginosus	KCOM 1062 (ChDC YA1)	Dental plaque	AY691534
S. anginosus	KCOM 1069 (ChDC YA11)	Dental plaque	AY691541
S. anginosus	KCOM 1172 (ChDC YA2)	Dental plaque	AY986761
S. anginosus	KCOM 1063 (ChDC YA3)	Dental plaque	AY691535
S. anginosus	KCOM 1173 (ChDC YA5)	Dental plaque	AY986762
S. anginosus	KCOM 1065 (ChDC YA6)	Dental plaque	AY691537
S. anginosus	KCOM 1174 (ChDC YA8)	Dental plaque	AY986763
S. constellatus	KCOM 1629 (ChDC B135)	Periapical cyst	KC569553
S. constellatus	KCOM 1631 (ChDC B137)	Periapical cyst	KC569554
S. constellatus	KCOM 1632 (ChDC B138)	Periapical cyst	KC569555
S. constellatus	KCOM 1650 (ChDC B144)	Periapical abscess	KC569556
S. constellatus	KCOM 1385 (ChDC B237)	Maxillary sinusitis	KC569557
S. constellatus	KCOM 1662 (ChDC B264)	Periapical cyst	KC569558
S. constellatus	KCOM 1663 (ChDC B265)	Periapical cyst	KC569559
S. constellatus	KCOM 1664 (ChDC B266)	Periapical cyst	KC569560
S. constellatus	KCOM 1667 (ChDC B269)	Periapical cyst	KC569573
S. constellatus	KCOM 1039 (ChDC B280)	Maxillary Sinusitis	KC569561
S. constellatus	KCOM 1043 (ChDC B284)	Maxillary Sinusitis	KC569562
S. constellatus	KCOM 1046 (ChDC B290)	Maxillary Sinusitis	KC569563
S. constellatus	KCOM 1669 (ChDC B292)	Periapical cyst	KC569564
S. constellatus	KCOM 1670 (ChDC B293)	Periapical cyst	KC569565
S. constellatus	KCOM 1807 (ChDC B484)	Dentigerous cyst	KC569566
S. constellatus	KCOM 1831 (ChDC B558)	Cheek & submandibular space abscess	KC569567
S. constellatus	KCOM 1895 (ChDC B611)	Submandibular space abscess	KC569568
S. constellatus	KCOM 1896 (ChDC B612)	Submandibular space abscess	KC569569
S. constellatus	KCOM 1897 (ChDC B613)	Submandibular space abscess	KC569570
S. constellatus	KCOM 1534 (ChDC B707)	Periapical abscess	KC569572
S. constellatus	KCOM 1314 (ChDC KB80)	Parotiditis	KC569571
S. intermedius	KCOM 1879 (ChDC B589)	Gingival sulcus	KC569596
S. intermedius	KCOM 1880 (ChDC B600)	Gingival sulcus	KC569598
S. intermedius	KCOM 1881 (ChDC B601)	Gingival sulcus	KC569599
S. intermedius	KCOM 1873 (ChDC B583)	Gingival sulcus	KC569595
S. intermedius	KCOM 1874 (ChDC B584)	Gingival sulcus	KC569597
S. intermedius	KCOM 1545 (ChDC B718)	Endodontic infection	KC569601
S. intermedius	KCOM 1544 (ChDC B717)	Endodontic infection	KC569600

ATCC, American Type Culture Collection; KCTC, Korean Collection for Type Cultures; KCOM, Korean Collection for Oral Microbiology; ChDC, Dental College of Chosun University.

고[15,16]를 근거로 하여, *S. intermedius* JTH08 균주의 neuraminidase A 유전자 핵산염기서열(GenBank Accession no. AP010969)를 바탕으로 *S. intermedius* 종-특이 PCR 프라이머들(Sin-Sial-F1, 5'-TTG CCC AGA GTA AGA AAA ATC CA-3'; Sin-Sial-R1, 5'-ATC AAG CCG CGC ATA AAG AGT-3')을 PrimerSelect 프로그램(DNAStar Lasergene™ 8.0, DNAStar, Inc., Madison, WI, USA)을 이용하여 설계하였다. 이때 PCR 조건은 1회 전변성 (98℃, 2분) 1회를 시행하고, 변성(98℃, 10초), 결합(56℃, 10초) 및 증폭(72℃, 20초) 과정을 30 cycle 반복하였고, 최종 증폭(72℃, 5분)을 1회 시행하였다. PCR 증폭물 중 5 ㎕를 취하여 1.5% agarose gel에 100 V, 15분간 전기영동 하여 증폭물의 크기를 확인하였다. 이때 예상되는 PCR 산물의 크기는 439 bp였다.

결 과

16S rDNA 핵산염기서열의 비교 분석

본 연구에서 사용한 56개 AGS 임상균주들의 16S rDNA 핵산염기서열을 결정하여 GenBank에 기탁하여 accession numbers를 받았다(Table 1). 이들 16S rDNA 핵산염기서열을 바탕으로 만들어진 계통도를 분석한 결과 *S. constellatus* 및 *S. intermedius*의 표준균주가 각각 포함된 그룹(C1)과 *S. anginosus* 표준균주를 포함한 그룹(C2)이 형성되었다(Fig. 1). C1 그룹은 각각 *S. constellatus* 및 *S. intermedius*의 표준균주가 포함되는 C1-1과 C1-2의 2개의 그룹으로 분류되었다. *S. anginosus* 균주들(C2)의 16S rDNA 핵산염기서열은 AGS 종에 속하는 다른 균주들과 95-96.5%의 상동성을 보였다(Fig. 1). *S. constellatus* 및 *S. intermedius* 균주들간의 16S rDNA 핵산염기서열 상동성은 97.9-99.4%로 비교적 높은 상동성을 가졌다(Fig. 1).

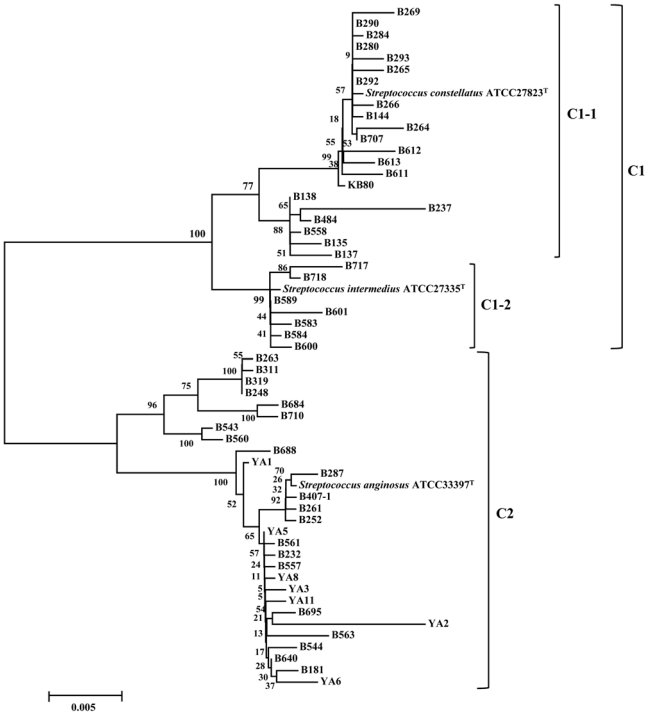

Fig. 1. Phylogenetic trees base on the partial nucleotide sequences of (A) 16S rDNA (about 1.4 kb) of type strains and clinical strains of AGS. The resulting tree topology was evaluated by bootstrap analysis of the neighbor-joining tree based on 1,000 resamplings. The scale bar (neighbor-joining distance) represents a 5% difference in nucleotide sequence.

종-특이 PCR primer를 이용한 PCR

Cho 등[13]이 개발한 *S. anginosus* 종-특이 PCR 프라이머들(ChDC-ANG-F7/ ChDC-ANG-R7)를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 16S rDNA 핵산염기서열을 바탕으로 얻은 계통도에 *S. anginosus* 그룹(C2)에 속하는 균주들에서만 461bp 크기의 PCR 산물이 증폭되었다(Fig. 2A).

Takao 등[14]이 개발한 *S. constellatus*와 *S. intermedius*를 동시에 검출할 수 있는 multiplex PCR 프라이머들을 이용하여 PCR을 수행한 결과 16S rDNA 핵산염기서열을 바탕으로 얻은 계통도에서 *S. constellatus* (C1-1)와 *S. intermedius* (C1-2)에 속한 균주들로부터 각각 752bp와 428bp 크기의 PCR 증폭물을 얻을 수 있었다(Fig. 2B). 또한 *S. anginosus* (C2) 균주에서는 PCR 산물이 증폭되지 않았다(Fig. 2B).

Neuraminidase 유전자 핵산염기서열을 바탕으로 설계된 *S. intermedius* 종-특이 PCR 프라이머들을 이용하여 PCR을 시행한 결과 계통도에서 *S. intermedius* 표준균주가 포함된 cluster (C1-2)에 해당하는 균주에서만 439bp의 PCR 산물이 증폭되었다(Fig. 2C).

고 찰

본 연구 결과 16S rDNA 핵산염기서열 결정법 및 PCR법에 의해 AGS에 속하는 56개 한국인 유래 임상균주들을 종 수준으로 동정할 수 있었다. 16S rDNA 핵산염기서열비교결정법에서 세균을 종 수준으로 동정할 때, 표준균주의 16S rDNA와 98%이상 상동성을 보일 때, 같은 종으로 판정을 한다[5]. AGS에 속하는 3가지 세균 종 중에서 *S. anginosus*는 *S. intermedius*와 *S. constellatus*와 98% 미만의 상동성을 보이기 때문에 16S rDNA 핵산염기서열의 상동성 분석으로도 쉽게 종 수준으로 동정할 수 있었다. 하지만 *S. intermedius*와 *S. constellatus*는 서로 98% 이상의 상동

성을 보여 단순한 상동성 분석만으로는 이들을 종 수준으로 동정하기 어려웠기 때문에, 계통도를 만들고 bootstrap 값을 1,000회로 하여 그 확률을 높였다. 그 결과 *S. intermedius*와 *S. constellatus*의 표준균주를 포함하는 각각의 cluster가 형성되어 이들을 종 수준으로 동정할 수 있었고, 이때 bootstrap 값은 각각 99과 77이었다(Fig. 1). 그러므로 본 연구에서 16S rDNA 핵산서열비교분석법에 의해 동정된 AGS 임상균주들은 향후 병인론 연구 및 이들을 종 수준으로 동정할 수 있는 real-time PCR 프라이머를 개발하는데 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

이러한 16S rDNA 핵산서열결정비교분석법은 임상에서 얻은 균주를 동정하는 데에는 시간적 제약이 있다. 현재 개발된 여러 세균 동정 및 검출법에 있어서 가장 신속한 방법이 PCR법이다. 그러므로 본 연구에서는 종-특이 PCR 프라이머들을 이용해 AGS에 속하는 3가지 세균 종을 동정할 수 있는지를 검증하였다. 그 결과 Cho 등[13]이 개발한 *S. anginosus* 종-특이 PCR 프라이머들(ChDC-ANG-F7/hDC-ANG-R7)에 의해 본 연구에서 16S rDNA 핵산염기서열비교분석법으로 *S. anginosus*로 동정된 균주들에서만 PCR 산물이 증폭됨을 알 수 있었다(Fig. 2A). Cho 등[13]의 연구에서 Takao 등[14]이 개발한 *S. anginosus*-특이 PCR 프라이머들(16S ANG-U/16S ANG-D)을 ChDC-ANG-F7/hDC-ANG-R7 프라이머들과 비교하여 실험한 결과 동일한 민감도와 종-특이성을 보인다고 보고하였다. 그러므로 ChDC-ANG-F7/ChDC-ANG-R7와 16S ANG-U/16S ANG-D 프라이머들을 같이 사용할 경우 *S. anginosus*를 좀 더 정확하게 동정 및 검출할 수 있을 것으로 생각된다.

Takao 등[14]이 개발한 *S. constellatus*와 *S. intermedius*을 동시에 검출할 수 있는 multiplex PCR 프라이머들에 의해서 본 연구에서 사용된 AGS 균주들이 각각 종-특이적으로 검출됨을 확인하였다(Fig. 2B). Takao 등[14]은 *S. constellatus*를 검출할 수 있는 HYL-MIX-U/HYL-CC-D 프라이머들과 *S. intermedius*를 검출할 수 있는 HYL-MIX-U/YL-INT-D 및 ILY-4DFw/ILY-WholeC Bw 프라이머[17]를 동시에 이용하여 한 번의 PCR로 *S. constellatus*와 *S. intermedius*를 검출할 수 있다고 보고 하였다. 또한 HYL-MIX-/HYL-CC-D 프라이머들에 의해 *S. constellatus*의 두 개의 아종(subsp. *constellatus* 및 subsp. *pharyngis*)을 PCR 산물의 크기로 구별 할 수 있다고 하였다. 본 연구자들도 Takao 등[14]이 제시한 방법으로 multiplex PCR을 시행하였지만 동일한 결과를 얻을 수 없었다(data not shown). 이러한 이유는 현재로써는 알 수 없지만 multiplex PCR의 민감도가 단일 PCR 법보다 떨어지고, 여러 개의 PCR 프라이머들을 사용하기 때문에 이들 프라이머들 간의 상호 반응에

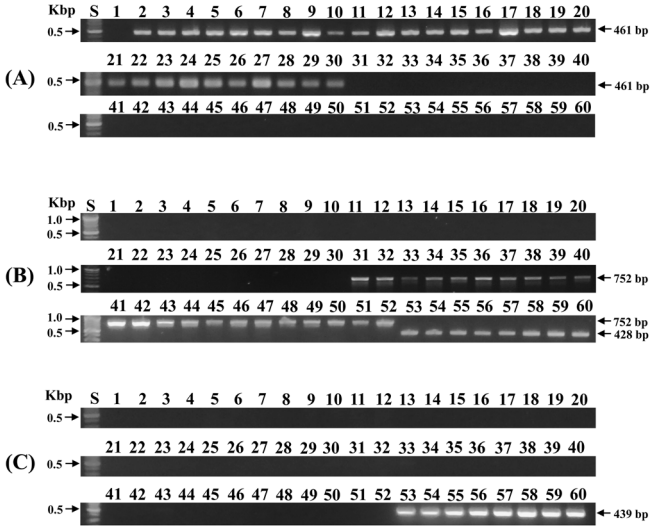

Fig. 2. Specificity test of the (A) *S. anginosus*-specific PCR primers (ChDC-ANG-F7/ChDC-ANG-R7), (B) multiplex PCR primers (HYL-MIX-U/HYL-CC-D/HYL-INT-D) for simultaneously detecting *S. constellatus* and *S. intermedius*, and (C) *S. intermedius*-specific PCR primers (Sin-Sial-F1/Sin-Sial-R1) with 4 ng of each bacterial genomic DNAs. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gels. Lanes: S, size marker (100 bp ladder); 1, (-), negative control (deionized distilled water); 2, *S. anginosus* ATCC 700231T; 3, *S. anginosus* KCOM 1348; 4, *S. anginosus* KCOM 1380; 5, *S. anginosus* KCOM 1396; 6, *S. anginosus* KCOM 1400; 7, *S. anginosus* KCOM 1409; 8, *S. anginosus* KCOM 1411; 9, *S. anginosus* KCOM 1417; 10, *S. anginosus* KCOM 1022; 11, *S. anginosus* KCOM 1026; 12, *S. anginosus* KCOM 1453; 13, *S. anginosus* KCOM 1827; 14, *S. anginosus* KCOM 1828; 15, *S. anginosus* KCOM 1830; 16, *S. anginosus* KCOM 1833; 17, *S. anginosus* KCOM 1834; 18, *S. anginosus* KCOM 1836; 19, *S. anginosus* KCOM 1467; 20, *S. anginosus* KCOM 1511; 21, *S. anginosus* KCOM 1515; 22, *S. anginosus* KCOM 1522; 23, *S. anginosus* KCOM 1537; 24, *S. anginosus* KCOM 1062; 25, *S. anginosus* KCOM 1069; 26, *S. anginosus* KCOM 1172; 27, *S. anginosus* KCOM 1063; 28, *S. anginosus* KCOM 1173; 29, *S. anginosus* KCOM 1065; 30, *S. anginosus* KCOM 1174; 31, *S. constellatus* ATCC 27823 ^{T}; 32, *S. constellatus* KCOM 1629; 33, *S. constellatus* KCOM 1631; 34, *S. constellatus* KCOM 1632; 35, *S. constellatus* KCOM 1650; 36, *S. constellatus* KCOM 1385; 37, *S. constellatus* KCOM 1662; 38, *S. constellatus* KCOM 1663; 39, *S. constellatus* KCOM 1664; 40, *S. constellatus* KCOM 1667; 41, *S. constellatus* KCOM 1039; 42, *S. constellatus* KCOM 1043; 43, *S. constellatus* KCOM 1046; 44, *S. constellatus* KCOM 1669; 45, *S. constellatus* KCOM 1670, 46, *S. constellatus* KCOM 1807; 47, *S. constellatus* KCOM 1831; 48, *S. constellatus* KCOM 1895; 49, *S. constellatus* KCOM 1896; 50, *S. constellatus* KCOM 1897; 51, *S. constellatus* KCOM 1534; 52, *S. constellatus* KCOM 1314; 53, *S. intermedius* KCTC 3268 ^{T}; 54, *S. intermedius* KCOM 1879; 55, *S. intermedius* KCOM 1880; 56, *S. intermedius* KCOM 1881; 57, *S. intermedius* KCOM 1873; 58, *S. intermedius* KCOM 1874; 59, *S. intermedius* KCOM 1545; 60, *S. intermedius* KCOM 1544.

의한 이유일 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 multiplex PCR의 단점을 보완하기 위해 HYL-MIX-U/HYL-C-D/HYL-INT-D 프라이머들만을 이용하여 실험한 결과 *S. constellatus*와 *S. intermedius*를 종-특이적으로 검출할 수 있었다(Fig. 2B). HYL-MIX-U/HYL-CC-D/HYL-INT-D 프라이머들을 이용한 PCR에서 430 bp의 증폭물이 보일 경우 *S. constellatus* subsp. *pharyngis*라고 보고 되었다[14]. 그러므로 본 연구에서 *S. intermedius*를 다른 AGS와 분류 시 시행하였던 생화학검사에서 *S. intermedius*에만 neuraminidase 활성이 있다는 보고[15,16]에 착안하여 neuraminidase를 표적으로 하는 *S. intermedius*-특이 PCR 프라이머(Sin-ial-F1/Sin-Sial-R1)를 개발하였다. 이들의 종-특이성은 *S. intermedius* 이외의 13 세균 종(*S. pneumoniae*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *S. parasanguinis*, *S. mitis*, *S. gordonii*, *S. sobrinus*, *Porphyromonas endodontalis*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Leptotrichia buccalis*, *Actinomyces naeslundii*, *A. actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*) 표준균주를 이용하여 검증하였다(data not shown). 본 연구에서 Sin-Sial-1/Sin-Sial-R1 프라이머를 이용하여 59개 AGS 균주를 대상으로 PCR을 시행한 결과 *S. intermedius* 균주에서만 PCR 산물이 증폭되었다(Fig. 2). Goto 등[14]의 연구에서 *ily* gene(intermedilysin)의 유전자 핵산염기서열을 바탕으로 개발된 *S. intermedius*-특이 PCR 프라이머를 이용하여 본 연구에서 사용된 모든 균주들을 대상으로 PCR을 시행하였다. 그 결과 본 연구에 사용된 *S. intermedius*-특이 PCR 프라이머들로 검증한 결과와 동일한 결과를 얻었다(data not shown). 이는 HYL-MIX-U/HYL-INT-D/HYL-CC-D 프라이머들을 이용한 PCR 결과 본 연구에서 사용된 모든 *S. constellatus* 균주들은 752 bp의 증폭산물을 보였기 때문에 *S. constellatus* subsp. *constellatus* 인 것으로 생각된다. 이러한 점들을 고려할 때 한 번의 PCR에 의해 여러 세균 종을 검출할 수 있는 multiplex PCR의 장점은 있으나, 민감도나 특이성이 떨어지기 때문에 단일 PCR법을 이용하여 *S. constellatus*와 *S. intermedius*를 검출하는 것이 나을 것이라 생각된다.

이상의 연구결과를 종합하면, 한국인 구강으로부터 분리된 56균주의 AGS에 속하는 연쇄구균들을 16S rDNA 핵산염기서열비교분석법과 종-특이 PCR법에 의해 종-수준으로 동정할 수 있었고, 향후 이들 세균 종을 이용한 병인론 연구에 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (No. 2010-0025411)

참고문헌

1. 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.
2. Allen BL, Katz B, Höök M. *Streptococcus anginosus* adheres to vascular endothelium basement membrane and purified extracellular matrix proteins. Microb Pathog. 2002; 32:191-204.
3. Wagner KW, Schön R, Schumacher M, Schmelzeisen R, Schulze D. Case report: brain and liver abscesses caused by oral infection with *Streptococcus intermedius*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006;102:21-23.
4. Morita E, Narikiyo M, Yano A, Nishimura E, Igaki H, Sasaki H, Terada M, Hanada N, Kawabe R. Different frequencies of *Streptococcus anginosus* infection in oral cancer and esophageal cancer. Cancer Sci. 2003;94:492-496.
5. Gillis M, Vandamme P, De Vos P, Swings J, Kersters K. Polyphasic taxonomy. 2nd ed. In G. Garrity (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Springer Verlag, New York, USA. 2001;43-48.
6. 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;11:266-273.
7. Lee SM, Yoo SY, Kim HS, Kim KW, Yoon YJ, Lim SH, Shin HY, Kook JK. Prevalence of putative periodontopathogens in subgingival dental plaques from gingivitis lesions in Korean orthodontic patients. J Microbiol. 2005;43: 260-265.
8. Arirachakaran P, Apinhasmit W, Paungmalit P, Jeramethakul P, Rerkyen P, Mahanonda R. Infection of human gingival fibroblasts with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: An in vitro study. Arch Oral Biol. 2012;57:964-972.
9. Umeda JE, Demuth DR, Ando ES, Faveri M, Mayer MP. Signaling transduction analysis in gingival epithelial cells after infection with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Mol Oral Microbiol. 2012;27:23-33.
10. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc Natl Acad Sci USA. 1985;82:6955-6959.
11. 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.
12. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance,

and maximum parsimony method. Mol Biol Evol. 2011; 28:2731-2739.
13. 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.
14. Takao A, Nagamune H, Maeda N. Identification of the anginosus group within the genus *Streptococcus* using polymerase chain reaction. FEMS Microbiol Lett. 2004; 233:83-89.
15. Whiley RA, Beighton D. Emended descriptions and recognition of *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius*, and *Streptococcus anginosus* as distinct species. Int J Syst Bacteriol. 1991;41:1-5.
16. Whiley RA, Hall LM, Hardie JM, Beighton D. A study of small-colony, beta-haemolytic, Lancefield group C streptococci within the anginosus group: description of *Streptococcus constellatus* subsp. *pharyngis* subsp. nov., associated with the human throat and pharyngitis. Int J Syst Bacteriol. 1999;49:1443-1449.
17. Goto T, Nagamune H, Miyazaki A, Kawamura Y, Ohnishi O, Hattori K, Ohkura K, Miyamoto K, Akimoto S, Ezaki T, Hirota K, Miyake Y, Maeda T, Kourai H. Rapid identification of *Streptococcus intermedius* by PCR with the ily gene as a species marker gene. J Med Microbiol. 2002; 51:178-186.