

Multiplex Real-Time PCR을 이용하여 6종의 주요 잇몸질환 유발 미생물을 동시에 검출하는 기법

조홍범

서경대학교 화학생명공학과

Multiplex Real-Time PCR for Simultaneous Detection of 6 Periodontopathic Bacteria

Hong-Bum Cho

Department of Chemical and Biological Engineering, Seokyeong University, Seoul 136-704, Republic of Korea

(Received September 9, 2013 / Accepted September 26, 2013)

This study utilized an analysis method for detecting six microorganisms, such as *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythus*, *Treponema denticola*, and *Prevotella intermedia*, triggering periodontal disease, using multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR). The analysis including internal control was made by dividing the six species into two groups using four fluorescence dyes, and it was verified that there was no interference or cross-reaction between the target species and different kinds of oral microbial species. Qualitative and quantitative analyses were conducted on each microorganism in various samples, such as saliva and the plaque, using the multiplex real-time PCR and comparative analysis between periodontitis patients and healthy people, revealing obvious differences between them.

Keywords: multiplex real-time PCR, periodontopathic bacteria, plaque, saliva

치주염은 치아를 지탱하는 치아주위 조직과 치조골 등의 부위에 염증이 발생하여 치아 연결 조직과 치조골이 손실되고 종국에는 치아가 상실되는 감염성 질환이다(Zambon, 1996). 치주염은 구강 내에 서식하는 다양한 구강질환 유발 미생물들이 복합적으로 군집을 형성함으로써 이루어지는 것으로 추정되고 있다(Wolff *et al.*, 1993; Haffajee and Socransky, 1994; Takamatsu *et al.*, 1999). 이러한 박테리아들은 구강질환 환부에서 동시에 서식하는 것이 확인되었으며 다양한 균종들이 동시에 서식하는 상황이 치주염 등의 질환을 더욱 증대시키는 것으로 추정되고 있다(Flemig *et al.*, 1995; Takamatsu *et al.*, 1999). 이와 같은 이유로 구강에 서식하고 있는 미생물의 다양성과 농도의 증가를 확인하는 것은 치주 질환의 진단과 치료에 매우 중요한 의미를 지닌다. 따라서 구강 질환 유발 미생물의 신속한 동정을 위한 기술 개발이 지속적으로 이루어져 왔으나 낮은 민감도 및 분석과정의 복잡성으로 인하여 아직 일반화되지는 못하였다. 이와 같은 문제를 극복하기 위하여 다종의 미생물을 동시에 분석하기 위한 다양한 기법 연구가 있어 왔으며, 주로 multiplex PCR 방법이 시도되었다(Wahlfors *et al.*, 1995; Tran and Rudney, 1996;

Garcia *et al.*, 1998; Takamatsu *et al.*, 1999).

본 연구에서는 구강 질환을 유발하는 것으로 추정되는 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythus*, *Treponema denticola* 그리고 *Prevotella intermedia* 등 6종의 미생물(Flemig *et al.*, 1995; Asai *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2005)을 정성적, 정량적으로 동시에 분석하고자 하였으며, 이를 위하여 각 미생물에 대한 특이 primer와 probe를 함께 사용하는 multiplex real-time PCR 기법을 기반으로 하였다.

본 연구의 분석 대상 치주염 유발 병원성 균주로는 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (KCCM 41632), *Campylobacter rectus* (KCTC 5636), *Porphyromonas gingivalis* (KCTC 5500), *Tannerella forsythia* (KCTC 5666), *Treponema denticola* (KCTC 15104), *Prevotella intermedia* (KCTC 3692) 등 6종을 선정하였다. 또한 제작되어진 primer의 특이성을 확인하기 위하여 구강 내에 존재하는 미생물인 *Fusobacterium nucleatum* (KCTC 2640), *Eikenella corrodens* (KCTC 15198), *Actinomyces viscosus* (KCCM 41596), *Veillonella parvula* (KCTC 5019), *Capnocytophaga ochracea* (KCTC 3693)를 선정하였고 이 외에도 *Streptococcus sanguinis* (KCTC 3284), *Streptococcus mitis* (KCTC 3284), *Streptococcus gordonii* (KCTC 3286), *Campylobacter concisus*

*For correspondence. E-mail: hbcho@skuniv.ac.kr; Tel.: +82-2-940-7614; Fax: +82-2-940-7616

Table 1. Oligonucleotide primers used for multiplex real-time PCR

Target microbes	Primer name	Sequence (5'→3')	Product size
<i>P. gingivalis</i>	PGF	catgatcttagcttgctaaggttgat	146 bp
	PGR	tatttcttgtaataatcatgcaataataca	
P set <i>T. forsythia</i>	TFF	actggactgagacacggacca	103 bp
	TFR	gcagtcaccttcacgcgact	
<i>T. denticola</i>	TDF	cctgaagatgggatagctagtaga	178 bp
	TDR	ttcacctctcaggccgga	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	AAF	atgggggtttagccctggtg	188 bp
	AAR	aaccatctctgagttcttctcg	
A set <i>C. rectus</i>	CRF	tgcaagtccaacggagattaagtag	197 bp
	CRR	accaactagctgatacagatagcct	
<i>P. intermedia</i>	PIF	agtcgaggggaaacggcat	160 bp
	PIR	ctttgtccacgtcagatgc	
Internal control	MADFa	ctcttctctttagagctaccact	132 bp
	ADHR4	ccaaatcaatccactccgaga	

(KCTC 5326), *Prevotella nigrescens* (KCTC 5407), *Actinomyces odontolyticus* (KCTC 5804), *Elizabethkingia meningoseptica* (KCTC 2906), *Sphingomonas paucimobilis* (KCTC 2346), *Pseudomonas aeruginosa* (KCTC 1636), *Escherichia coli* (KCTC 1041)를 음성 대조균으로 사용하였다. 상기의 균주들은 한국생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC) 및 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)로부터 동결건조 되어 있는 상태로 분양 받았으며, 멸균된 증류수로 현탁하여 DNA 추출에 사용하였다. Genomic DNA의 추출은 Genomic DNA Extraction Kit (Intron, Korea)을 사용하였다.

구강 내에 서식하는 치주질환 유발 미생물들은 대부분 혐기성 세균으로 시료 채취 이후 보관 및 운송 과정에서 사멸되어 소실되는 경우가 많아 정확한 분석이 어려운 문제점이 있었다. 본 연구 과정에서 이러한 문제점을 해결하기 위하여 기존의 보관 용액으로 주로 사용되던 PBS buffer 대신에 guanidine isothiocyanate를 주성분으로 하는 lysis buffer를 사용하였다. 본 lysis buffer의 경우 채취된 시료를 보관 용기에 넣는 즉시 세포막이 파괴되어 세포를 사멸시키고 동시에 시료내의 DNase 등의 효소를 불활성화하여 DNA를 안전하게 보관할 수 있도록 해준다.

본 연구에 사용된 primer와 probe들은 NCBI data base에 등

록된 각 균종들의 16S rRNA gene을 INRA multiple sequence alignment program으로 분석하여 상호 저해하지 않으면서 특이성과 민감도를 확보할 수 있도록 design하였다(Tables 1 and 2). 이와 함께 multiplex real-time PCR 반응의 적정성을 확인하기 위하여 옥수수의 Adh1 gene이 포함된 plasmid를 제작하여 internal control DNA로 사용하였고, internal control primer와 probe를 PCR 반응에 함께 첨가하였다. Internal control plasmid DNA와 primer는 Ct값이 22-24가 될 수 있을 정도의 농도로 넣어주었다. 각 multiplex real-time PCR에서 internal control이 적절한 Ct값을 산출시키지 못할 경우 반응액 제조과정 혹은 시료와 DNA 추출 과정에서의 오류를 확인 할 수 있다. Multiplex PCR의 반응 조건은 Chamberlain과 Chamberlain의 논문에서 술된 내용을 참조하여 6종의 구강 미생물을 동시 확인할 수 있는 조건으로 최적화 하였다(Chamberlain and Chamberlain, 1994; Henegariu *et al.*, 1997).

Multiplex real-time PCR에 사용된 probe들은 Taq man probe형으로 design 되었다. 각 probe에 부착된 형광염료들은 염료들간의 간섭 등을 고려하여 서로 파장이 겹치거나 간섭하지 않는 4종을 선정하였다. 이와 같은 형광염료의 제한으로 인하여 하나의 tube에서 동시에 분석 할 수 있는 형광 파장은 4개를 초과할 수 없으므로, 각 반응에 internal control과 6종의 분석 대상

Table 2. Oligonucleotide probes used for multiplex real-time PCR

Target strain	Probe	Sequence (5'→3')	5' Label	3' Label
<i>P. gingivalis</i>	PGP	tcgagatgaaaggacgatgtacttca	FAM	TAMRA
P Set <i>T. forsythia</i>	TFP	tgagatacgtgtatttattgcatgtacct	HEX	TAMRA
	TDP	tggtgagtaacgcgtgggtgacct	CY5	BHQ-3
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	AAP	tcgggagacgaaagtgcggga	FAM	TAMRA
A Set <i>C. rectus</i>	CRP	gcaaacaggattagataccctggtagtcca	HEX	TAMRA
	PIP	agacggcctaatacccgatgtgt	CY5	BHQ-3
<i>P. intermedia</i>	ICP	tcagggtcattttctgcctctca	ROX	BHQ-2
Internal control	ICP	tcagggtcattttctgcctctca	ROX	BHQ-2

균종들 중 3종씩을 묶어서 분석하는 두 종류의 set (P와 A set)으로 구성하였다. P set은 *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythius*, *Treponema denticola* 등 3종을 분석 대상으로 하며, A set은 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella intermedia* 등 3종을 분석 대상으로 하였다.

PCR 반응을 위한 혼합물의 총 부피를 30 μ l로 하였으며, 2 unit의 HS Prime Taq Premix (Genet Bio., Korea)를 사용하였다. Forward와 reverse primer는 각 0.5 μ M, probe는 0.06 μ M, 그리고 Tris-HCl, KCl, MgCl₂의 농도는 각각 10.3 mM, 51.3 mM, 2.9 mM이 되도록 첨가하였고, 오염을 방지하기 위하여 UDG (uracil-DNA glycosylase, ElpisBio, Korea)를 1 unit 첨가하였으며, dNTP 중 dATP, dCTP, dGTP는 200 mM, dUTP는 600 mM (Solgent, Korea)의 농도가 되도록 첨가하였다. Real-time PCR 반응을 수행하기 위한 장치로는 Mx3005P (Agilent Technologies, USA)를 사용하였으며, 오염방지 단계와 PCR 증폭 단계로 나누어 수행하였다. 오염방지 단계의 UDG 반응을 위해 50°C에서 10분간 유지하였으며, 이후 UDG의 불활성화를 위해 95°C에서 10분간 유지하였다. PCR 증폭 단계는 94°C에서 40초, 55°C에서 45초, 72°C에서 45초로 40회 반복하여 수행하였고, PCR 증폭 반응 이후 72°C에서 5분간 유지하여 post elongation 반응을 수행하였다. 실시간 핵산 증폭 결과인 Ct값에 따른 핵산의 농도를 결정하기 위하여 Nucleic acid spectrophotometer (ACTgene Inc., USA)를 사용하여 260 nm에서 측정된 흡광도를 plasmid copy 수로 환산하였다. 10⁹ copy의 plasmid를 10 fold serial dilution하여 Ct값에 따른 plasmid DNA copy number의 표준곡선을 확인한 후 시료들의 정량에 적용하였으며, 예시로 *Porphyromonas gingivalis*의 표준곡선을 Fig. 1에 나타내었다.

본 연구에서 고안된 6종의 치주 질환 원인 미생물 동시 분석용 multiplex real-time PCR의 유효성 분석을 위하여 PCR 반응의 특이도(specificity) 분석을 시행하였다. 6종의 목표 미생물의 DNA를 각각 단독으로 PCR template로 사용하여 비특이 반응 결과물의 생성을 확인한 후, 이와 함께 다른 종의 구강 미생물 5

종 그리고 일반 미생물 10종의 DNA를 섞어서 DNA template로 사용했을 때의 비특이 PCR 반응 발생 여부를 확인하고, 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 6종의 치주 질환 원인 미생물들에 대해서는 매우 특이적인 PCR 결과를 나타내었으며 비특이적 반응이 없음을 확인할 수 있었다. 아울러 다른 5종의 대조균 구강 미생물들과 일반 미생물들의 DNA들에 대해서도 비특이 반응을 나타내지 않음을 확인할 수 있었다(Table 3).

본 연구의 기법을 활용하여 일반인과 환자의 시료를 분석하여 실제 임상에서의 활용 가능성을 확인하는 실험을 시행하였다. 환자 시료의 경우 아산병원 치과에 내원한 치주염 환자 10명을 대상으로 시료를 채취하였으며 일반인 시료는 건강한 20세 이상 성인(정상 대조균) 20명의 시료를 채취하여 분석을 시행하였다. 구강 플라그는 치간솔과 paper point를 사용하여 채취하였으며 타액의 경우 가글액을 사용하여 10초간 입을 행군 뒤 용기에 받아서 시료로 사용하였다.

치과 병원에 내원한 환자군과 정상 대조균 샘플들에 대한 분석 결과, 치주염 환자들의 경우 모든 환자가 6종의 치주질환 유발 균종 모두를 보균하고 있었으며, Ct값도 30 이하로 매우 높은 농도로 존재하고 있음을 확인할 수 있었다(Table 4). 이에 반하여 정상 대조균 샘플들의 분석 결과는 전체 20명 중 14명(70%)에서 6종의 치주질환 유발 균종 중 최소 1-3종이 결여된 특징을 보이는 것으로 나타났으며(자료 미제시), 균종별로는 *P. gingivalis*와 *P. intermedia*가 각각 출현율(prevalence) 70%, 65%로 상대적으로 낮게 나타났고, *T. forsythia*와 *C. rectus*에서 100%, 95%로 상대적으로 높게 나타났다. 아울러 정상 대조균이 보유하고 있는 치주질환 유발 균종들의 균집 규모 역시 대부분 30 이상의 Ct값을 나타내어 그 농도가 낮게 유지되고 있음이 확인되었다(Table 4). 이와 같은 연구 결과는 치주 질환이 진행됨에 따라 치주 질환 유발 미생물들의 농도와 균종의 다양성이 증가한다는 기존의 다른 논문들과 높은 유사성을 보이고 있다(Simonson *et al.*, 1992; Wolff *et al.*, 1993; Simon and Rudney, 1999). 이는 건강한 구강 미생물 환경이 다양한 요인으로 인하여 치주염 유발 미생물들이 우점하고 농도가 증가하여 치주 질환 상태로 변

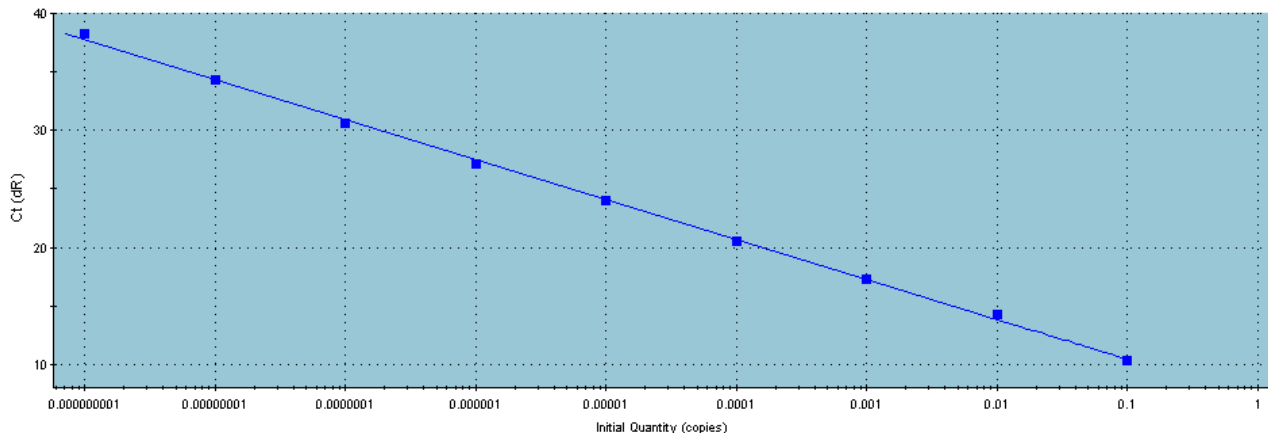


Fig. 1. A standard curve was generated from the amplification plot of *P. gingivalis*. A suspension of *P. gingivalis* cells was serially diluted and subjected to multiplex real-time PCR.

Table 3. Specificity and cross-reaction between the target species and different kinds of oral microbial species

	Microbes	Pg	Tf	Td	Aa	Pi	Cr	IC
Target species	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	+	-	-	-	-	-	+
	<i>Tannerella forsythia</i>	-	+	-	-	-	-	+
	<i>Treponema denticola</i>	-	-	+	-	-	-	+
	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	-	-	-	+	-	-	+
	<i>Prevotella intermedia</i>	-	-	-	-	+	-	+
	<i>Campylobacter rectus</i>	-	-	-	-	-	+	+
Negative control species	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Eikenella corrodens</i>	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Actinomyces viscosus</i>	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Veillonella parvula</i>	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Capnocytophaga ochracea</i>	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Streptococcus mitis</i>	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Streptococcus gordonii</i>	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Campylobacter concisus</i>	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Prevotella nigrescens</i>	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	-	-	-	-	-	-	+	

Abbreviations: Pg, *P. gingivalis*; Tf, *T. forsythia*; Td, *T. denticola*; Aa, *A. actinomycetemcomitans*; Pi, *P. intermedia*; Cr, *C. rectus*; IC, internal control

화하는 것을 나타내고 있다.

본 연구의 결과에서 제시하고 있는 주요 치주질환 유발 미생물들의 출현율과 농도의 확인은 치주 질환 및 구강 미생물 연구 등에 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 기대된다. 아울러 본 연구에서 개발한 분석기법을 이용하여 얻는 정보를 통해 건강한 사람의 치주 질환 발병 가능성의 예측과 관리, 환자의 경우 치료 계획 수립의 지침 및 치료 이후 예후 관찰의 지표로도 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

적 요

본 연구는 multiplex real-time PCR을 이용하여 *Actinobacillus*

actinomycetemcomitans, *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythus*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* 등과 같은 6종의 주요 치주 질환 원인 미생물들을 동시에 검출할 수 있는 분석 방법에 관한 것이다. 4개의 형광 염료를 사용하여 internal control과 함께 3개의 균종씩 나누어 분석하였으며, 분석 대상 균종 간 그리고 다른 종류의 구강 미생물 균종과의 간섭과 교차 반응이 없음을 확인하였다. 본 연구의 multiplex real-time PCR은 타액과 플라그 등의 다양한 샘플에 포함되어 있는 각 미생물들을 정성, 정량적으로 분석할 수 있었으며, 치주염 환자와 건강한 사람들에 대한 비교 분석 결과 분명한 차이를 발견 할 수 있었다.

Table 4. Amount and prevalence of periodontopathic bacteria in patient and normal healthy group by multiplex real-time PCR

	Target	Pg	Tf	Td	Aa	Pi	Cr
Patient group	Average Ct value	26.83	27.79	28.04	33.18	28.29	28.65
	(Standard deviation)	(±1.71)	(±1.72)	(±1.89)	(±4.12)	(±1.44)	(±1.73)
	Average copy number	1.5×10 ⁴	8.3×10 ³	7.0×10 ³	2.2×10 ²	5.9×10 ³	4.6×10 ³
	Prevalence (%)	100	100	100	100	100	100
Normal group	Average Ct value	32.55	31.67	35.69	35.03	33.53	32.59
	(Standard deviation)	(±2.95)	(±2.33)	(±2.60)	(±3.49)	(±1.86)	(±1.81)
	Average copy number	3.3×10 ²	3.1×10 ²	4.1×10	6.3×10	1.7×10 ²	3.2×10 ²
	Prevalence (%)	70	100	80	90	65	95

Abbreviations: Pg, *P. gingivalis*; Tf, *T. forsythia*; Td, *T. denticola*; Aa, *A. actinomycetemcomitans*; Pi, *P. intermedia*; Cr, *C. rectus*

참고문헌

- Asai, Y., Jinno, T., Igarashi, H., Ohyama, Y., and Ogawa, T. 2002. Detection and quantification of oral treponemes in subgingival plaque by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 3334–3340.
- Chamberlain, J.S. and Chamberlain, J.R. 1994. Optimization of multiplex PCRs, pp. 38–46. In Mullis, K.B., Ferre, F., and Gibbs, R.A. (eds.), *The polymerase chain reaction*. Birkhauser, Boston, Mass., USA.
- Flemmig, T.F., Rudiger, S., Hofmann, U., Schmidt, H., Plaschke, B., Stratz, A., Klaiber, B., and Karch, A. 1995. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 3102–3105.
- Garcia, L., Tercero, J.C., Legido, B., Ramos, J.A., Alemany, J., and Sanz, M. 1998. Rapid detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, and *Porphyromonas gingivalis* by multiplex PCR. *J. Periodont. Res.* **33**, 59–64.
- Haffajee, A.D. and Socransky, S.S. 1994. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology* **5**, 78–111.
- Han, X.Y., Tarrand, J.J., and Rice, D.C. 2005. Oral *Campylobacter* species involved in extraoral abscess: a report of three cases. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2513–2515.
- Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H., and Vogt, P.H. 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques* **23**, 504–511.
- Simon D.T. and Rudney, J.D. 1999. Improved multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, and *Porphyromonas gingivalis*. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3504–3508.
- Simonson, L.G., McMahon, K.T., Childers, D.W., and Morton, H.E. 1992. Bacterial synergy of *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* in a multinational population. *Oral. Microbiol. Immunol.* **7**, 111–112.
- Takamatsu, N., Yano, K., He, T., Umeda, M., and Ishikawa, I. 1999. Effect of initial periodontal therapy on the frequency of detecting *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontol.* **70**, 574–580.
- Tran, S.D. and Rudney, J.D. 1996. Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 2674–2678.
- Wahlfors, J., Meurman, J.H., Vaisanen, P., Alakuijala, P., Korhonen, A., Torkko, H., and Janne, J. 1995. Simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* by a rapid PCR method. *J. Dent. Res.* **74**, 1796–1801.
- Wolff, L.F., Aepli, D.M., Pihlstrom, B.L., Anderson, L., Stoltenberg, J.L., Osborn, J.B., Hardie, N.A., Shelburne, C.E., and Fisher, G.E. 1993. Natural distribution of 5 bacteria associated with periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* **20**, 699–706.
- Zambon, J.J. 1996. Periodontal diseases: microbial factors. *Ann. Periodontol.* **1**, 879–925.