

Development of Quantitative Real-Time PCR Primers for Detection of *Streptococcus sobrinus*

Soon-Nang Park^{1,2,3} and Joong-Ki Kook^{1,2,3*}

¹Korean Collection for Oral Microbiology, ²Department of Oral Biochemistry, and ³Oral Biology Research Institute, School of Dentistry, Chosun University, 375 Seosuk-Dong, Dong-Gu, Gwangju 501-759, Republic of Korea

(received August 13, 2016; revised September 16, 2016; accepted September 17, 2016)

The purpose of this study was to develop *Streptococcus sobrinus*-specific qPCR primers based on the nucleotide sequence of the RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*). The specificity of the primers was determined by conventional polymerase chain reaction (PCR) with 12 strains of *S. sobrinus* and 50 strains (50 species) of non-*S. sobrinus* bacteria. The sensitivity of the primers was determined by quantitative real-time PCR (qPCR) with serial dilutions of the purified genomic DNAs (40 ng to 4 fg) of *S. sobrinus* ATCC 33478^T. The specificity data showed that the *S. sobrinus*-specific qPCR primers (RTSsob-F4/RTSsob-R4) detected only the genomic DNAs of *S. sobrinus* strains with a detection limit of up to 4 fg of *S. sobrinus* genomic DNA. Our results suggest that the RTSsob-F4/RTSsob-R4 primers are useful in detecting *S. sobrinus* with high sensitivity and specificity for epidemiological studies of dental caries..

Key words: *Streptococcus sobrinus*, *rpoB*, qPCR primers

*Correspondence to: Joong-Ki Kook, Korean Collection for Oral Microbiology, Department of Oral biochemistry, and Oral Biology Research Institute, College 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
ORCID: 0000-0003-2628-2870

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-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

치아우식증은 치면세균막에 존재하는 세균들의 당질 대사에 의해 생성되는 젖산 등의 유기산에 의해 치아 표면 무기질 탈회에 의해 발생하는 일종의 세균 감염성 질환으로 알려져 있다[1]. 즉, 치아우식증의 여러 원인 인자들 중에서 세균이 가장 중요한 원인 인자로 알려져 있다. 현재 구강 내에는 700 여종의 세균이 존재하는 것으로 알려져 있으며[2], 이들 중 *Streptococcus sobrinus*와 *Streptococcus mutans* 등이 사람의 치아우식증의 주요한 원인균인 것으로 알려져 있다[3].

현재까지 개발된 세균 검출법들 중 신속하면서 민감도와 종-특이성이 뛰어난 방법이 실시간정량중합효소연쇄반응(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR) 법이다. qPCR을 실시하기 위해서는 종-특이 프라이머 개발이 필수적이다. 최근 본 연구자 팀은 DNA-dependent RNA polymerase beta-subunit 유전자 (*rpoB*)를 표적으로 하여 *S. sobrinus*를 포함한 42 종 구강 세균에 대한 종-특이 qPCR 프라이머 쌍들을 소개하였다[4]. 그 연구에서 *S. sobrinus* ATCC 33478^T를 포함한 75종 구강세균의 표준균주들만을 이용하여 종-특이성을 검증하였다. 하지만, 후속 연구를 진행하는 과정에서 *S. sobrinus* 종-특이 qPCR 프라이머 쌍(Ssob-F2/Ssob-R1)으로는 한국인에서 분리 동정된 *S. sobrinus* 두 균주들(KCOM 1157 및 KCOM 1196)의 지놈 DNA를 검출할 수 없음을 알게 되었다. 그러므로 본 연구는 *rpoB*를 표적으로 하는 새로운 *S. sobrinus* 종-특이 qPCR 프라이머 쌍을 개발하고자 시행 되었다.

재료 및 방법

세균 및 세균 배양

본 연구에서 사용된 표준 균주들은 CCUG (Culture Collection, University of Göteborg, Sweden), KCTC (Korean Collection for Type Cultures, Daejeon, Korea), 및 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 분양받아 사용하였다(Table 1). 또한 한국인 구강에서 유래된 *S. sobrinus* 임상균주들은 한국구강미생물자원은행 (Korean Collection for Oral Microbiology, Gwangju, Korea)에서 분양받아 사용하였다.

Streptococcus spp., *Enterococcus* spp. 및 *Neisseria* spp. 균주들은 brain heart infusion (BHI, BD diagnostics, Sparks, MD, USA) 배지를 이용하여 37°C 호기성 세균배양기 (Thermo Forma, Waltham, MA, USA)에서 배양하였다. A.

actinomycetemcomitans 균주들은 tryptic soy broth (TSB, Difco Laboratories)에 0.6% yeast extract, 5% horse serum, 75 µg/ml bacitracin 및 5 µg/ml vancomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA)이 첨가된 배지에서 배양하였다. 그 외 균주들은 TSB에 0.05% cysteine HCl-H₂O, 0.5% yeast extract, 0.5 mg/ml hemin 및 2 µg/ml vitamin K₁가 첨가된 배지를 이용하여 혐기성 조건(85% N₂, 10% CO₂, 5% H₂) 하에 37°C 혐기성 세균배양기(Bactron I, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA)에서 배양하였다.

qPCR 프라이머 설계

*S. sobrinus*의 *rpoB* 핵산염기서열(GenBank accession no. AOCE01000060; 7,300..10,885 nts)을 바탕으로 PrimerSelect 프로그램(DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)을 이용하여 qPCR 프라이머를 설계하였으며, 이들의 핵산염기서열은 다음과 같다. RTsob-F4, 5'-CTA GTC CGG GCT CTT

Table 1. The bacterial strains used in this study

Species	Strains	Species	Strains	
<i>Streptococcus sobrinus</i>	ATCC 33478 ^T , KCOM 1061, KCOM 1150, KCOM 1151, KCOM 1152, KCOM 1157, KCOM 1158, KCOM 1191, KCOM 1193, KCOM 1196, KCOM 1210, KCOM 1228	<i>Actinomyces naeslundii</i>	CCUG 20536 ^T	
	<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175 ^T	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	CCUG 35333 ^T
		ATCC 700231 ^T	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277 ^T
	<i>Streptococcus anginosus</i>	KCTC 3268 ^T	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ATCC 25586 ^T
	<i>Streptococcus intermedius</i>	KCTC 3268 ^T	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	ATCC 25286 ^T
	<i>Streptococcus constellatus</i>	ATCC 27823 ^T	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	ATCC 33693 ^T
	<i>Streptococcus gordonii</i>	CCUG 33482 ^T	<i>Enterococcus faecalis</i>	KCTC 3206 ^T
<i>Streptococcus mitis</i>	KCTC 3556 ^T	<i>Neisseria subflava</i>	ATCC 49275 ^T	
<i>Streptococcus oralis</i>	CCUG 13229 ^T	<i>Neisseria meningitidis</i>	ATCC 13077 ^T	
<i>Streptococcus parasanguis</i>	CCUG 30417 ^T	<i>Neisseria mucosa</i>	ATCC 19696 ^T	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CCUG 28588 ^T	<i>Campylobacter rectus</i>	ATCC 33238 ^T	
<i>Streptococcus sanguinis</i>	CCUG 17826 ^T	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	ATCC 33624 ^T	
<i>Streptococcus australis</i>	CCUG 45919 ^T	<i>Capnocytophaga ochracea</i>	KCTC 5787 ^T	
<i>Streptococcus cristatus</i>	CCUG 33481 ^T	<i>Prevotella buccae</i>	ATCC 33574 ^T	
<i>Streptococcus infantis</i>	CCUG 39817 ^T	<i>Prevotella dentalis</i>	ATCC 49559 ^T	
<i>Streptococcus oligofermentans</i>	CCUG 58097 ^T	<i>Prevotella denticola</i>	CCUG 29542 ^T	
<i>Streptococcus peroris</i>	CCUG 39814 ^T	<i>Prevotella melaninogenica</i>	ATCC 25845 ^T	
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	CCUG 49455 ^T	<i>Prevotella buccalis</i>	CCUG 15557 ^T	
<i>Streptococcus sinensis</i>	CCUG 48363 ^T	<i>Prevotella intermedia</i>	ATCC 25611 ^T	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	KCTC 3658 ^T	<i>Prevotella nigrescens</i>	NCTC 9336 ^T	
<i>Streptococcus salivarius</i>	CCUG 50207 ^T	<i>Prevotella oris</i>	CCUG 15405 ^T	
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	ATCC 33384 ^T	<i>Rothia dentocariosa</i>	KCTC 3204 ^T	
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	ATCC 33389 ^T	<i>Tannerella forsythia</i>	ATCC 43037 ^T	
<i>Atopobium parvulum</i>	KCTC 3663 ^T	<i>Treponema denticola</i>	ATCC 35405 ^T	
		<i>Veillonella parvula</i>	KCTC 5019 ^T	
		<i>Veillonella dispar</i>	KCOM 1301	
		<i>Eikenella. corrodens</i>	KCOM 1378	
		<i>Gemella haemolysans</i>	KCOM 1381	

GGC TTC TCT-3'; RTSsob-R4, 5'-GCT TCA TCA GTT CTG GCA TCC GCA-3'. 이들 프라이머 쌍을 이용한 qPCR PCR 증폭물의 크기는 128 bp이며, 이들 프라이머 쌍은 Bioneer 사(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 제작하였다.

qPCR 프라이머의 종-특이성 검증

본 연구에 사용된 세균들의 지놈 DNA들은 CTAB 방법에 따라 추출하였다[5].

본 연구에서 설계된 qPCR 프라이머 쌍(RTSsob-F4/RTSsob-R4)의 *S. sobrinus*에 대한 종-특이성은 일반적인 PCR법을 이용하여 검증하였다. PCR은 *AccuPower*[®] PCR PreMix (Bioneer) 및 *MyGenie*[™] 96 Gradient Thermal Block (Bioneer)을 이용하여 제조회사에서 제시해준 방법으로 실시하였다. RTSsob-F4/RTSsob-R4 프라이머들은 PCR 반응 용액에 각각 최종 1 pmole/μl 농도가 되도록 넣었으며, 종-특이성을 알아보기 위해 사용된 세균 지놈 DNA들은 각각 4 ng 씩을 넣어서 반응을 시켰다. PCR 반응 조건은 다음과 같았다: 95°C에서 10분간 전변성 처리, 95°C에서 10초간 변성 처리, 70°C에서 30초간 결합과 중합 과정을 30회 시행하고, 72°C에서 5분간 최종 중합과정을 시행하였다. PCR 시행 후, 5 μl PCR 반응물을 1.5% 아가로스 젤

을 매질로 하고, 1 X Tris-acetate buffer (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA, [pH8.0])를 전해질로 사용하여 100V에서 15분간 전기영동 하였다. PCR 증폭물들은 GoodView[™] Nucleic Acid Stain (SBS Greentech, Beijing, China)을 이용하여 염색한 후, UV transilluminator로 확인하였다.

qPCR 프라이머의 민감도 특정

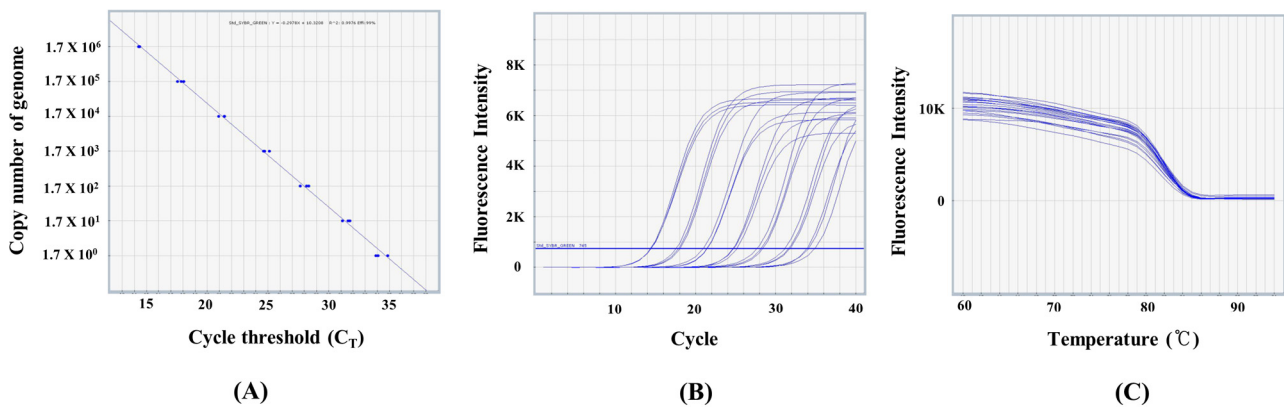
본 연구에서 설계된 RTSsob-F4/RTSsob-R4 프라이머 쌍의 민감도를 측정하기 위한 qPCR은 TOPreal[™] qPCR 2X PreMIX (SYBR Green) kit (Enzynommics, Daejeon, Korea)와 및 *Exicycler*[™] 96 Real-Time Quantitative Thermal Block (Bioneer)을 이용하여 실시하였다. 이를 간단히 설명하면 다음과 같다. 2X qPCR PreMix에 RTSsob-F4/RTSsob-R4 프라이머 쌍 각각 60 pmole, *S. sobrinus* ATCC 33478^T 지놈 DNA를 20 ng에서 2 fg까지 10배씩 희석하여, 각각의 qPCR tube에 넣고, 최종 반응물이 50 μl가 되도록 double deionized water (DDW)를 첨가한 후 가볍게 교반하고, 1,500 x g에서 10초간 원심분리 하였다. qPCR 조건은 95°C에서 10분간 전변성 과정을 거친 후 95°C에서 10초간 변성, 70°C에서 30초간 결합과 중합 과정을 40회 반복하였으며, 60-94°C에서 1°C씩 1초간 스캔하여 melting curve를 분석하였다.



Fig. 1. Specificity tests of the *S. sobrinus*-specific qPCR primers with 4 ng of each bacterial genomic DNA. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gels. Lanes: M, size marker (1 kbp ladder); 1, *S. sobrinus* ATCC 33478^T; 2, (-) control (double deionized water); 3, *S. sobrinus* KCOM 1061; 4, *S. sobrinus* KCOM 1150; 5, *S. sobrinus* KCOM 1151; 6, *S. sobrinus* KCOM 1152; 7, *S. sobrinus* KCOM 1157; 8, *S. sobrinus* KCOM 1158; 9, *S. sobrinus* KCOM 1191; 10, *S. sobrinus* KCOM 1193; 11, *S. sobrinus* KCOM 1196; 12, *S. sobrinus* KCOM 1210; 13, *S. sobrinus* KCOM 1228; 14, *S. mutans* ATCC 25175^T; 15, *S. anginosus* ATCC 700231^T; 16, *S. intermedius* KCTC 3268^T; 17, *S. constellatus* ATCC 27823^T; 18, *S. gordonii* CCUG 33482^T; 19, *S. mitis* KCTC 3556^T; 20, *S. oralis* CCUG 13229^T; 21, *S. parasanguis* CCUG 30417^T; 22, *S. pneumoniae* CCUG 28588^T; 23, *S. sanguinis* CCUG 17826^T; 24, *S. australis* CCUG 45919^T; 25, *S. cristatus* CCUG 33481^T; 26, *S. infantis* CCUG 39817^T; 27, *S. oligofermentans* CCUG 58097^T; 28, *S. peroris* CCUG 39814^T; 29, *S. pseudopneumoniae* CCUG 49455^T; 30, *S. sinensis* CCUG 48363^T; 31, *S. thermophilus* KCTC 3658^T; 32, *S. salivarius* CCUG 50207^T; 33, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384^T; 34, *H. aphrophilus* ATCC 33389^T; 35, *A. parvulum* KCTC 3663^T; 36, *A. naeslundii* CCUG 20536^T; 37, *A. odontolyticus* CCUG 35333^T; 38, *P. gingivalis* ATCC 33277^T; 39, *F. nucleatum* ATCC 25586^T; 40, *F. necrophorum* ATCC 25286^T; 41, *F. periodonticum* ATCC 33693^T; 42, *E. faecalis* KCTC 3206^T; 43, *N. subflava* ATCC 49275^T; 44, *N. meningitidis* ATCC 13077^T; 45, *N. mucosa* ATCC 19696^T; 46, *C. rectus* ATCC 33238^T; 47, *C. gingivalis* ATCC 33624^T; 48, *C. ochracea* KCTC 5787^T; 49, *P. buccae* ATCC 33574^T; 50, *P. dentalis* ATCC 49559^T; 51, *P. denticola* CCUG 29542^T; 52, *P. melaninogenica* ATCC 25845^T; 53, *P. buccalis* CCUG 15557^T; 54, *P. intermedia* ATCC 25611^T; 55, *P. nigrescens* NCTC 9336^T; 56, *P. oris* CCUG 15405^T; 57, *R. dentocariosa* KCTC 3204^T; 58, *T. forsythia* ATCC 43037^T; 59, *T. denticola* ATCC 35405^T; 60, *V. parvula* KCTC 5019^T; 61, *V. dispar* KCOM 1301; 62, *E. corrodens* KCOM 1378; 63, *G. haemolysans* KCOM 1381.

Table 2. Determination of C_T value for a dilution series of 20 ng of genomic DNA of *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478^T

Genomic DNA amount	Cell number corresponding to DNA amount	C_T
4 ng	1.7×10^6	14.39
400 pg	1.7×10^5	17.81
40 pg	1.7×10^4	21.25
4 pg	1.7×10^3	24.82
400 fg	1.7×10^2	28.06
40 fg	1.7×10^1	31.50
4 fg	1.7×10^0	34.26
0	0	-

**Fig. 2.** Standard curve (A), amplification plot (B), and melting curve (C) were obtained by qPCR using the RTsSob-F4/RTsSob-R4 primers from 10-fold serial dilutions of genomic DNA of *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478^T range from 2 ng to 2 fg. In the standard curve, the regression equation for the standard curve was: $Y = -0.2978X + 10.3208$. The R^2 value was 0.9976.

결과

본 연구에서 *S. sobrinus*를 검출하기 위해 설계된 qPCR 프라이머(RTSsob-F4/RTSsob-R4)의 종-특이성을 일반적인 PCR법으로 조사한 결과, *S. sobrinus* 표준균주 및 11주의 임상균주들의 지놈 DNA에서만 128 bp의 PCR 증폭물이 확인되었으며, *S. sobrinus* 이외의 구강 세균 52종(52 균주)에서는 PCR 증폭물이 확인되지 않았다(Fig. 1).

본 연구에서 설계된 RTSsob-F4/RTSsob-R4 프라이머 쌍들의 최소검출한도(민감도)를 측정하기 위해 *S. sobrinus* ATCC 33478^T 지놈 DNA를 40 ng부터 4 fg까지 10배씩 순차적으로 희석하여 qPCR을 수행하였다. 그 결과 RTSsob-F4/RTSsob-R4 프라이머 쌍은 *S. sobrinus* ATCC 33478^T 지놈 DNA 2 fg까지 검출할 수 있음을 확인하였다(Table 2 및 Fig. 2A와 2B).

Melting curve 분석을 실시하여 RTSsob-F4/RTSsob-R4 프라이머 쌍에 의한 비특이적 PCR 산물 유무를 검증한 결과, 단일한 패턴의 melting curve가 보여 비특이적 qPCR

산물이 보이지 않음을 확인하였다(Fig. 2C).

고찰

본 연구 결과 *S. sobrinus* 종-특이 qPCR 프라이머 쌍(RTSsob-F4/RTSsob-R4)은 표준균주인 *S. sobrinus* ATCC 33478^T 지놈 DNA를 4 fg까지 검출할 수 있었다(Fig. 2). 최근에 지놈 핵산염기서열이 결정된 *S. sobrinus* ATCC 33478^T 지놈 DNA가 약 2.14 Mb (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JMLC000000000.1>, GenBank accession no. NZ_JMLC01000000)인 점을 고려한다면, RTSsob-F4/RTSsob-R4 프라이머 쌍은 qPCR법에 의해 *S. sobrinus*를 최소 1.7 마리에 해당하는 지놈 DNA까지도 검출할 수 있는 높은 민감도를 보였다. 또한, RTSsob-F4/RTSsob-R4 프라이머 쌍은 한국인에서 분리 동정된 11 균주 *S. sobrinus*들을 종-특이적으로 검출할 수 있음을 알 수 있었다(Table 2 & Fig. 1).

본 연구자 팀의 경험에 의하면, PrimerSelect (DNASTAR Inc.)를 사용하여 설계된 프라이머 쌍들의 프로그램에서

제시하는 최적결합온도(optimal annealing temperature)는 실제와는 다른 경우가 많았다[6,7]. 본 연구에서도 Primer Select (DNASTAR Inc.)에서 제시한 RTSSob-F4/RTSSob-R4의 최적결합온도는 54.4°C이었지만, gradient PCR를 실시하여 얻은 실제 최적결합온도는 70°C이었다(데이터는 제시하지 않음). 즉, *S. sobrinus*와 유전자 수준에서 상동성이 가까운 *S. mutans* ATCC 25175^T 균주와 *S. sobrinus* ATCC 25611^T의 지놈 DNA를 이용하여 결합온도를 61-72°C 사이에서 1°C 간격으로 gradient PCR을 실시한 결과, *S. sobrinus* ATCC 25611^T의 지놈 DNA만 검출되고, *S. mutans* ATCC 25175^T의 지놈 DNA는 검출이 되지 않는 온도 중 PCR 증폭물 밴드의 진한 정도가 동일한 최고의 온도가 70°C이었다. 이러한 결과들을 고려하면, 세균 종-특이 qPCR 프라이머의 최적 결합온도를 정할 때에는 단순히 프라이머 설계용 프로그램에서 계산된 결합온도를 사용하기보다는 표적이 되는 세균종과 상동성이 높은 균종의 균주 지놈 DNA를 이용한 gradient PCR을 실시한 후에 결정하는 것이 최적의 결합온도를 정해야 한다는 것을 시사한다.

최 등[8]은 glycosyltransferase U gene (*gfiU*) 염기서열을 표적으로 하는 *S. sobrinus* 종-특이 qPCR 프라이머 쌍을 소개하였다. 그 연구에서 소개된 qPCR 프라이머 쌍도 SYBR Green 법을 이용하는 것이었다. 그들 qPCR 프라이머 쌍의 종-특이성은 10 종(10 균주)만을 대상으로 실시되었다. 또한, 40 cycles의 qPCR을 실행하여 민감도를 측정하였지만, 실제 결과는 1×10^4 CFU에 해당하는 *S. sobrinus* 세균에 해당하는 C_T 값(약 27)까지만 그래프로 보여주었다. 본 연구에서 개발된 RTSSob-F4/RTSSob-R4 프라이머 쌍은 28.06 cycle에서 *S. sobrinus* 세균 170마리를 검출할 수 있는 민감도를 가졌다는 점에서 최 등[8]이 개발한 *S. sobrinus* 종-특이 qPCR 프라이머 쌍보다는 민감도가 더 뛰어난 것을 알 수 있었다.

qPCR 프라이머 쌍을 개발하기 위해서는 표적 유전자가 필요하다. 세균 분류학적 측면에서 기준이 되는 유전자는 16S rRNA 유전자(16S rDNA)로 이를 표적으로 하여 많은 세균 종-특이 qPCR 프라이머 쌍이 개발되고 있다 [9,10]. 하지만, 경우에 따라서 세균 종간에 16S rDNA 핵산염기서열 상동성이 너무 높아서 qPCR 개발이 어려운 경우가 있다[11]. 이러한 16S rDNA의 단점을 보완하기 위해 *rpoB* 핵산염기서열을 이용하여 세균 종-특이 qPCR 프라이머를 개발하고 있다[4,6]. 즉, *rpoB*는 16S rDNA처럼 핵산염기서열 내에 모든 세균 종에서 상동성이 잘 보존된 부분과 종간에 상이성이 큰 부분이 있어서 상이성을 보이는 부분에서 세균 종-특이 qPCR 프라이머 쌍을 설계하기에 용이하다[12].

이상의 연구 결과를 종합하면, 본 연구에서 *rpoB* 핵산염기서열을 바탕으로 설계된 qPCR 프라이머 쌍(RTSSob-F4/RTSSob-R4)은 *S. sobrinus*를 높은 종-특이성 및 균주 1.7 마리까지 검출이 가능한 뛰어난 민감도를 갖는다는 것이 확인되었으며, 향후 치아우식증 분자역학 연구에 있어서 *S. sobrinus*를 검출하는 데 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2016학년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interest.

References

- Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986;50:353-380.
- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5721-5732.
- Whiley RA, Beighton D. Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol.* 1998;13:195-216.
- Park SN, Lim YK, Kook JK. Development of quantitative real-time PCR primers for detecting 42 oral bacterial species. *Arch Microbiol.* 2013;195:473-482. doi: 10.1007/s00203-013-0896-4.
- Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel FM, Brent R, editors. *Current Protocols in Molecular Biology.* New York: Greene Publ. Assoc. and Wiley Interscience; 1990. p. 241-245.
- Park SN, Kook JK. Development of quantitative real-time PCR primers for detection of *Prevotella intermedia*. *Int J Oral Biol.* 2015;40:205-210. <http://dx.doi.org/10.11620/IJOB.2015.40.4.205>
- Shin HS, Kim MJ, Kim HS, Park SN, Kim do K, Baek DH, Kim C, Kook JK. Development of strain-specific PCR primers for the identification of *Fusobacterium nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T and subsp. *vincentii* ATCC 49256^T. *Anaerobe* 2010;16:43-46. doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.04.003.
- Choi EJ, Lee SH, Kim YJ. Quantitative real-time polymerase chain reaction for *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque samples and its association with early childhood caries. *Int J Paediatr Dent.* 2009;19:141-147. doi: 10.1111/j.1365-263X.2008.00942.x.

9. Krieg NR. Identification of Procaryotes. In Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM, editors. Bergeys manual of systematic bacteriology. 2nd ed. vol. 1. New York: Springer; 2001. p. 33-38.
10. Kozarov E, Sweier D, Shelburne C, Progulsk-Fox A, Lopatin D. Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. *Microbes Infect.* 2006;8: 687-693. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2005.09.004>.
11. Park SN, Park JY, Kook JK. Development of *Porphyromonas gingivalis*-specific quantitative real-time PCR primers based on the nucleotide sequence of *rpoB*. *J Microbiol.* 2011; 49:315-319. doi: 10.1007/s12275-011-1028-y.
12. Severinov K, Mustaev A, Kukarin A, Muzzin O, Bass I, Darst SA, Goldfarb A. Structural modules of the large subunits of RNA polymerase. Introducing archaeobacterial and chloroplast split sites in the beta and beta' subunits of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Biol Chem.* 1996;271: 27969-7974.