

감염 근관에서 분리된 연쇄구균의 16S Ribosomal DNA 중합효소 연쇄반응과 제한효소 절단길이 다형성에 관한 연구

원광대학교 치과대학 치과보존학교실
정희일 · 임미경

Abstract

POLYMERASE CHAIN REACTION AND RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM OF 16S RIBOSOMAL DNA OF STREPTOCOCCI ISOLATED FROM INFECTED ROOT CANALS

Hee-Il Jung, Mi-Kyung Im

Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Wonkwang University

Bacteria have been regarded as one of the most important factors in pulpal and periapical diseases. Streptococci are frequently isolated facultative anaerobes in infected root canals. Recently molecular biological techniques have been rapidly progressed. This study was designed to apply the molecular biological tools to the identification and classification of streptococci in the endodontic microbiology.

Streptococci isolated from infected root canals were identified with both Vitek Systems and API 20 STREP. Identification results were somewhat different in several strains of streptococci. Eighteen streptococci and enterococcal was difficult so to digest plasmid DNA using *Hind*III and *Eco*RI to differentiate strains by restriction enzyme analysis of plasmid DNA.

16S rDNA of chromosome was amplified by polymerase chain reaction(PCR) and then restriction fragment length polymorphism(RFLP) using several restriction enzymes was observed. The molecular mass of 16S rDNA of chromosomal DNA was approximately 1.4kb. There were three to five RFLP patterns using eight restriction enzymes. RFLP patterns digested with *Cfo*I which recognizes four base sequences were identical in all stains. *Hind*III which recognizes six base sequences could not digest the 16S rDNA. Restriction enzymes which recognize five base sequences were suitable for RFLP pattern analysis. At least three different restriction enzymes were needed to compare each strains.

16S rDNA PCR-RFLP was simple and rapid to differentiate and classify strains and could be used in the epidemiological study of root canal infections.

I. 서 론

근관 감염의 원인 중 구강내 세균이 주요한 원인으로 인식되어 많은 연구자들이 근관과 치근단 병소에서 여러 종류의 세균을 분리하고 동정하였다¹⁻²⁾. 임상 증상에 따라 괴사된 치수 또는 급성 치근단 농양 등으로 분류하였으며 검체 채취, 배양과 동정 방법등은 연구자들간에 다양하였다³⁻⁷⁾. 급성 치성 농양에서 과거에는 주로 *S. viridans*가 분리되었으나 현재는 혐기성 세균의 분리와 배양 기술의 발달로 인하여 혐기성 세균이 우세하게 분리되고 있으며⁸⁻⁹⁾ 통성 혐기성 세균 중에서는 특히 *S. milleri*가 가장 빈번히 분리되는 통성 혐기성 세균이라고 하였다. Gomes등¹⁰⁾은 30증례의 감염된 근관에서 세균을 배양하여 총 57종의 세균을 분리한 결과 절대 혐기성 세균이 우세하였으며, 통성 혐기성 세균으로는 연쇄구균이 우세하게 나타났다고 하였다. 이와 같이 감염 근관에서는 혐기성 세균이 우세하게 분리되고 있지만 감염 근관에서 세균의 병인성은 세균간의 상호 작용에 의하여 영향을 받기 때문에¹³⁾ 다수로 발견되는 균주 뿐만 아니라 빈번히 발견되는 모든 균주에 대한 포괄적인 연구를 시행해야만 할 것이다.

근관 감염의 기전을 규명하기 위해서는 감염된 근관에서 세균의 분리와 동정이 선행되어야 하며 근관 감염에서 분리되는 통성 혐기성 세균 중 가장 자주 발견되는 연쇄구균은 성장속도가 느리고 생화학적인 반응을 미약하게 일으키므로 동정이 까다로운 것으로 알려져 있다¹⁴⁻¹⁸⁾. 대부분의 실험실에서 세균 균종의 동정은 생화학적 검사, 혈청형과 효소검사의 결과등에 근거한 표현형등의 특성에 의하여 결정되며 streptococcus와 enterococcus균종은 생화학과 효소검사 결과가 전형적으로 나타나지 않아서 동정이 되지 않는 균종도 1-10% 정도로 보고되고 있다¹⁹⁻²³⁾.

최근 분자생물학적인 방법이 발달하여 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 극소량의 DNA로 수십만배 증폭시킴으로써 여러 연구에 유용하게 활용되고 있다²⁴⁾. 16S rDNA는 모든 세균에 존재하고

이들의 염기 서열은 유사성이 비교적 높아서 거의 모든 세균에 적용되는 광범위 유전자로서 이 부위를 탐식자(probe)로 사용하여 ribotyping함으로써 균의 분류(taxonomy) 및 동정에 이용되고 있다²⁵⁻²⁷⁾. 또한 중합효소연쇄반응을 이용하여 세균의 16S rDNA를 증폭시키는 방법은 여러 종의 세균을 대상으로 시행되었다²⁸⁻²⁹⁾.

분자생물학적인 방법은 매우 빠른 속도로 개발, 연구되며 특히 질환의 원인 규명과 병인론을 연구시 점차 필수적인 방법이 되고 있다. 중합효소연쇄반응이 개발되면서 유전자의 증폭이 가능하게 되어 예민도를 현저하게 높일 수 있게 되었고 염색체 유전자와 플라스미드 유전자를 분리하는 방법도 점차 간편화되고 상품화된 kit를 이용하는 추세이다. 만약 이러한 방법들이 좀 더 간편하게 각 실험 단계가 줄어들고 기계를 사용하여 자동화된다면 그 활용되는 훨씬 증가될 것이다. 그러나 현재까지는 원심분리, 전기영동, blotting등 거의 모든 단계가 수기로만 가능하고 과정이 복잡하기 때문에 실험결과에 미치는 영향도 클 것으로 사료된다.

이에 본 연구는 근관 감염시 분리되는 통성 혐기성 세균 중 분리 비율이 높고 급성으로 악화된 병소나 치유되지 않은 근관에서 자주 배양되는 세균인 연쇄구균을 대상으로 하여 분자생물학적인 방법이 연쇄구균의 동정과 역학조사에 가치가 있는지를 관찰하였다. 연쇄구균은 감염 근관에서 분리된 세균 중 주로 alpha용혈과 gamma용혈을 보이는 *Streptococcus viridans* spp.와 *Enterococcus* spp.를 대상으로 하였으며 표준균주인 *S. mutans* (ATCC 10449)와 *E. faecalis* (ATCC 19433)를 포함하였다. 세균의 동정시에는 생화학적인 방법으로 Vitek System의 GPI 카드와 API 20 STREP을 이용하였다. 이들 세균의 염색체 DNA중에서 16S ribosomal DNA를 합성하는 부위 (16S rDNA)를 중합효소 연쇄반응을 이용하여 증폭한 후 16S rDNA를 제한 효소로 절단하며 그 길이의 다양성을 관찰하여 향후 분자생물학적인 방법을 이용한 근관질환 병인 연구의 기본적인 단서를

마련하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 감염 근관내의 세균 분리

원광대학교부속 치과병원 보존과에 내원하여 근관치료를 받는 초진환자에서 단일근관을 갖는 전치와 소구치를 대상으로 하였다. 환자의 성별과 연령을 조사하고 병력청취와 임상검사를 시행하고 내원 전 항생제 복용 여부를 조사하였다. 치아를 격리하고 멸균 소독된 bur로 근관와동을 형성하여 paper point를 근관내에 치근단 부위로 추정되는 부위까지 넣고 방치한 후 Ringer액 1ml이 든 시험관에 옮겼다. 시험관을 Vortex mixer로 약 1분간 진탕한 후 100 μ l를 면양혈액한천배지(녹십자, 한국)에 접종한 후 7자 유리병으로 고르게 도포하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기(VS-9108MS, 비전과학, 한국)에서 1-2일간 배양하였다. 배지에서 자란 집락형태를 관찰하고, 집락 수를 센 후 모양이 비슷한 집락을 순수배양하였다.

2. 세균의 동정

세균의 동정은 한천배지에서의 세균 집락의 용혈 양상과 생화학 반응검사로 시행하였다. 생화학 반응 검사는 자동 세균동정기기인 Vitek Systems(bioMerieux, MO, USA)의 gram positive identification(GPI) card를 이용하였다. Vitek Systems를 이용하여 Streptococci로 동정된 세균은 다시 부가적으로 API 20 STREP 키트를 이용하여 확인하였다.

API 20 STREP 키트를 사용하기 위하여 세균의 집락을 순수배양하여 증류수에 McFarland 4.0이 되도록 혼탁하게 세균 부유액을 만들었다. 파스퇴르 피펫을 이용하여 각 튜브에 균액을 넣고 당분해 실험은 키트의 API 20 STREP배지에 균액을 넣어 사용하였다. 광유(mineral oil)로 일부 튜브위를 덮은 후 30 $^{\circ}$ C 세균 배양기에 4시간 반응시켰다. VP1, VP2, ninhydrin, ZYM A 및 ZYB B시약을 떨어뜨린 후 발색 반응을 관찰하여 양성 여부를 판정한 후, 코드화하여 코드에 따른 세균을 색인하였다. 동

정된 세균을 brain heart infusion(BHI) 액체 배지에 풀어서 10% CO₂배양기에 1일간 배양한 후 30% glycerol과 혼합하여 초저온냉동고(Revco Scientific Inc, Model No. ULT 2186-5-D-A, USA)에 보관하였다.

본 실험에 사용한 균주는 Vitek Systems의 동정 결과에 따라 분류된 다음과 같은 균주를 대상으로 하였다. *S. mitis* 4균주, *S. sanguis* 3균주, *E. faecalis* 3균주, *S. uberis* 2균주, *S. intermedius* 2균주, *E. faecium* 2균주와 표준 균주인 *S. mutans* (ATCC 10449) 및 *E. faecalis* (ATCC 19433) 1 균주씩이었다.

2. 염색체 DNA 분리

면양혈액한천배지에서 배양한 집락을 BHI 액체배지 6ml에 혼탁해질 때까지 혼합하였다. 약 16시간동안 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 흔들면서 균을 증식시켜 균액 1.5ml을 Ependorf(E) 튜브에 옮기고 나머지는 4 $^{\circ}$ C 냉장고에 보관하였다. 미세원심분리기(Micro17R, 한일, 한국)를 사용하여 15,000rpm에서 3분간 원심분리하여 침전물을 만들었다. TE 완충용액(Tris 10 mM-EDTA 5mM, pH 7.8) 1 ml을 넣고 Vortex 혼합기에서 진탕시킨후, 다시 원심분리하였다. 상청액을 진공을 이용하여 제거하고, TE완충용액 325 μ l에 제 부유시킨 후, mutanolysin 25 μ l(5,000 U/mL, Sigma, USA)과 lysozyme 25 μ l(10mg/mL, Sigma, USA)를 순서대로 넣고 30 $^{\circ}$ C 수욕조에 30분간 방치하였다. Sodium dodecyl sulfate(SDS) 완충용액 40 μ l(20% wt/vol) SDS in Tris(50mM)-EDTA(20 mM), pH 7.8)와 proteinase K 6 μ l(20mg/ml, Sigma, USA)를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C 수조에 1시간 두었다. E-튜브를 꺼내어 상하로 기울이면서 균이 어느정도 분해되었는지 확인하였다. NaCl(5M) 200 μ l를 넣고 약 15초동안 혼합한 후, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상청액을 다른 E-튜브에 옮긴 후, 동량의 phenol-chloroform(1:1)을 넣고 혼합한 후 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 DNA를 추출하였다. 같은 방법으로 상청액을 chloroform-isoamyl alcohol (1:1)을 사용하여 DNA를 한번 더 추출하였

다. 상청액을 다른 E-튜브에 옮긴 후, 1배 부피의 에탄올 원액과 sodium acetate(1M) 30 μ l를 넣고 -70 $^{\circ}$ C에 30분간 두었다. 4 $^{\circ}$ C 상태에서 원심분리하여 DNA를 침전시키고, 70% 에탄올로 1회 세척하였다. 진공흡인기로 튜브에 묻은 에탄올을 제거하고, 공기중에 약 30분간 건조시켰다. 증류수 30 μ l를 넣어 DNA를 녹인 후, 전기영동하여 DNA의 분리 여부를 확인하고, 중합효소 연쇄반응 및 제한효소 처리를 하였다.

3. 중합효소 연쇄반응

중합효소 연쇄반응에 사용한 primer는 Operon사(USA)에서 합성된 것으로서 *S. uberis*의 16S ribosomal RNA 유전자에 있는 염기서열에 해당하였다. 5' primer의 염기서열은 5'-CCAA-GCTTGCTCAGGACGAACGDT-3'로서 20-35개의 염기서열로 구성되어 있으며, *Hind*III 제한효소 절단부위(밑줄친 부분)는 5'쪽에 있었다. 3' primer는 5'-CGGGATCCCGCCCGG-GAACGTATTAC-3'는 광범위 primer 13B와 유사하였으며 16S rRNA의 1374-1392염기서열에 해당하였으며 *Bam*HI 제한효소 절단부위(밑줄친 부분)가 5'끝에 위치하였다. 두 primer의 이론적인 용융점(melting point)은 58 $^{\circ}$ C였다. 중합효소 연쇄반응은 총 부피 50 μ l에서 수행하여, 세균 DNA 5 μ l, 각 primer 0.5 μ M, 각 deoxynucleoside triphosphate 200 μ M, 10 \times Taq buffer 5 μ l, Taq DNA polymerase(ID Labs Biotechnology, USA) 2.5unit를 포함하였다. 각 반응 혼합물에 mineral oil 50 μ l를 도포하고 OmniGene thermocycler(Haibaid, USA)에서 30주기를 반응시켰다. 중합효소 연쇄반응 조건은 처음에 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 두어 이중체의 DNA를 단일체로 변성시킨 후, 94 $^{\circ}$ C에서 60초, 56 $^{\circ}$ C에서 60초, 72 $^{\circ}$ C에서 60초를 30회 반복하였다. 30주기가 끝나면, 70 $^{\circ}$ C에서 5분간 최종 연장시켜 중합효소 연쇄반응을 종결시켰다. 증폭된 16S rDNA는 전기영동하여 확인하였고, 제한효소처리 전까지는 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

실험에 사용한 18균주중 16S rDNA 부위가

증폭이 관찰되지 않은 6균주에 대하여 세균배양부터 다시 시작하여 염색체 DNA의 분리 및 중합효소 연쇄반응을 반복하여 실험하였다.

4. 전기영동

중합효소연쇄반응으로 증폭한 16S rDNA 절편은 Tris-borate-EDTA buffer(0.09M Tris base, 0.09M sodium borate, 2.5mM EDTA, pH 8.3)를 사용하여 2% agarose 젤(20 \times 20cm)에서 100V에서 4시간동안 전기영동하였다. 전기영동된 젤은 ethidium bromide(1.0 μ l/ml)로 30분간 염색하였으며 DNA는 자외선 투사기(UV transilluminator)로 관찰하고 type 667 Polaroid 필름(Polaroid Co., USA)으로 사진을 촬영하였다.

*Bst*NI-digested pBR322 DNA는 1,857bp, 1,058bp, 929bp, 383bp, 121bp 및 13bp의 6개 밴드가 있어서 처음 두 개 밴드 사이에 약 1.4 kb의 증폭된 DNA가 위치하는지 확인하였다(Table 1).

5. 증폭된 16S rDNA의 제한효소 처리

중합효소 연쇄반응으로 증폭시킨 DNA(5 μ l)를 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 20 μ l 부피에서 *Ava*II, *Bst*NI, *Cfo*I, *Dde*II, *Msp*I, *Scr*FI과 *Hind*III등 8가지 제한효소로 처리하였다. 제한효소 절단 길이다형성(restriction fragment length polymorphism, RFLP)을 분석하여 16S rDNA 염기서열에 대한 제한효소 작용부위수를 관찰하였다. 또한 분자량 표지의 각 분자량의 상용대수 값을 X축으로 하고 전기영동된 거리를 Y축으로 하여 회귀직선을 구한 다음 각각의 제한효소 절편의 이동된 거리를 측정한 후 이 회귀직선에 의하여 각 절편의 크기(bp)를 계산하였다.

증폭된 16S rDNA의 제한효소 절단은 재현성을 확립하기 위하여 두 번 반복하였다. *Bst*NI-digested pBR322 DNA(BioLabs, MA, USA) 및 *Hae*III-digested ϕ -X174DNA(BioLabs, MA, USA)를 분자량표지(marker)로 사용하였다. *Hae*III-digested ϕ -X174 DNA는 1,353bp, 1,078bp, 872bp, 603bp, 310bp, 281bp, 234bp, 194bp, 118bp 및 72bp의 10개의 밴드가 있다(Table 1).

6. 염색체 DNA 및 플라스미드의 제한효소 처리

염색체 DNA를 분리하여 전기영동한 결과 대부분의 균주가 염색체 DNA이외의 작은 밴드가 한 두 개 혹은 그 이상의 플라스미드를 가지고 있어서 *lambda-HindIII*를 분자량 표지로 하여 그 크기를 분석하였다. 또한 염색체 DNA 제한효소패턴 혹은 플라스미드가 제한효소에

의해 절단되는지를 알아보기 위하여 제한효소 (*HindIII*, *EcoRI*)를 처리하였다. 방법은 증폭된 16S rDNA의 제한효소 처리와 같이 시행하였으며 2% 젤에서 전기영동을 시행하여 제한효소로 처리 후 상태를 확인하였다.

Table 1. Molecular markers used in this study

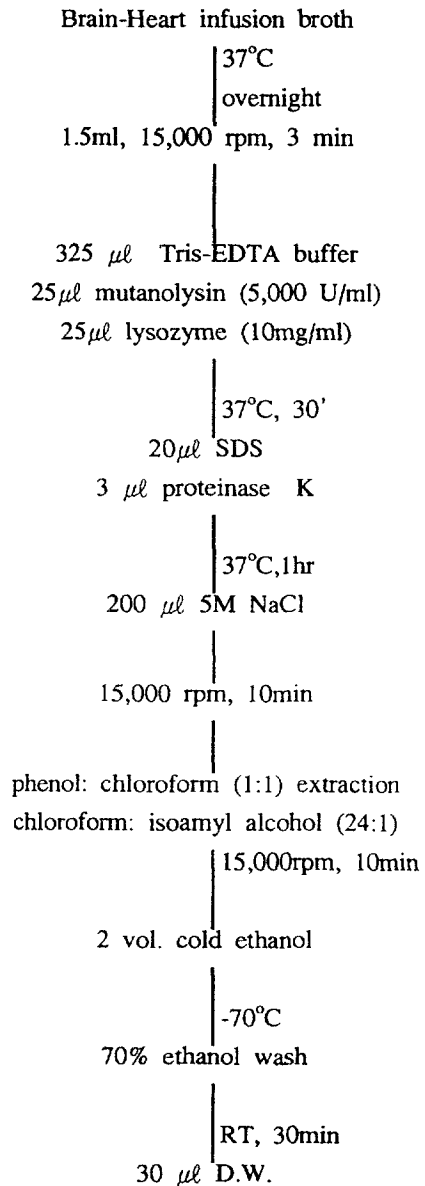
lamda- <i>HindIII</i>	pBR322- <i>BstNI</i>	Ø-X174- <i>HaeIII</i>
23130*	1857	1353
9416	1058	1078
6557	929	872
4361	383	603
2322	121	310
2027	13	281
564		271
		234
		194
		118
		72

* : bp

Table 2. Restriction enzymes and their target sites

Restriction enzymes	Target
<i>AvaII</i>	GGA(T)C
<i>BstNI</i>	CCA(T)G
<i>CfoI</i>	GCGC
<i>DdeI</i>	CTNTG
<i>MspI</i>	CCGG
<i>RsaI</i>	GTAC
<i>ScrFI</i>	CCNGG
<i>HindIII</i>	AAGCTT

Fig 1. Procedure for chromosomal DNA preparation.



III. 실험 성적

감염근관에서 분리한 18종의 연쇄구균에 대하여 Vitek과 GPI card를 이용한 경우와 API 20 STREP을 이용한 경우의 동정 결과는 Table 3과 같다. Vitek과 GPI card를 이용한 경우와 API 20 STREP을 이용한 경우 두 동정 결과가 일치한 균주는 8가지 균주였으며, 10가지 균주에서는 동정 결과가 다르게 나타났다. 본 실험에서는 Vitek과 GPI card의 동정 결과를 균을 분류하는데 사용하였다.

8종의 연쇄구균에 대하여 염색체 DNA를 분리한 결과 대부분의 연쇄구균의 염색체 DNA 이외에 2-3개의 플라스미드 DNA를 포함하고 있었다(Fig. 2). 염색체 DNA밴드는 오히려 플라스미드 DNA밴드보다 명확하지 않아서 연쇄구균의 세포벽 파괴가 완전하지 않은 것으로 사료되었다. 그러나 본 실험에서는 염색체 DNA의 16S rDNA 부분을 PCR을 통하여 증폭시키기 때문에 낮은 동도라도 실험에 영향을 미치지 않는 것으로 사료되었다. 분리된 염색체 DNA 및 플라스미드 DNA를 *EcoRI*과 *HindIII*으로 절단하여 염색체 제한효소패턴(fingerprint) 혹은 플라스미드 제한효소패턴(restriction enzyme analysis of plasmid, RFLP)을 관찰하고자 하였다, 그 결과 염색체 DNA는 처음부터 양이 적었기 때문에 제한효소 패턴이 나타나지 않았고, 플라스미드 DNA는 몇 개의 밴드로 구분되었다(Fig. 3). 그러나 전반적으로 일부만 제한되어 플라스미드 제한효소패턴으로 균종을 감별에 사용하기는 적절하지 못하였다.

16S rDNA를 증폭하기 위해 5' primer와 3' primer를 이용하여 PCR을 시행하였다. 그 결과 11개의 균주(61%)는 16S rDNA 부위가 증폭되어 밴드가 보였지만 나머지 7균주는 증폭되지 않았다(Fig. 4). 거의 같은 조건에서 PCR을 시행한 점으로 보아 PCR 조건 자체는 문제가 없을 것으로 보고, 염색체 DNA 분리부터 다시 시행하였다. 16S rDNA 밴드가 보이지 않았던 6균주를 대상으로 염색체 DNA분리 및 16S rDNA 증폭을 재시도하였다. 그 결과 1균주에만 16S rDNA 증폭이 관찰되었고, 나머지 5균주는

밴드가 관찰되지 않았다(Fig. 12).

서로 다른 환자에서 분리된 연쇄구균 중 같은 종으로 동정된 균주를 2개씩 대상으로 16S rDNA 증폭산물을 *DdeI*으로 처리하였다(Fig. 5, Table 4). *S. uberis*(1), *S. intermedius*(2)와 *S. intermedius*(12)는 RFLP가 동일하였으며 491, 317과 144 bp에서 밴드가 나타났다. 이들 6가지 균주는 491, 317과 144bp에서 일치된 밴드를 보였다. 이들 5균주 중 *S. sanguis*는 작업 번호 7번과 9번 균주에서 491, 317과 144bp에서 동일한 밴드를 보여서 이들의 RFLP는 동일하였다.

서로 다른 종인 *S. mitis*(11), *S. intermedius*(12)와 *S. uberis*(13)를 대상으로 *AvaII*와 *BstNI*으로 제한하여 16S rDNA-RFLP양상을 비교하였다(Fig. 6, Table 5). *AvaII*는 GGACC 혹은 GGTCC를 인식하여 제한하는 효소로서 3가지의 다른 균종이 모두 다른 패턴을 보여 앞의 *DdeI*이나 *CfoI*에 비하여 우수한 감별력을 보였다. *BstNI*은 CCAGG 혹은 CCTGG를 인식하는 효소로서 *AvaII*와 상보적인 작용위치를 갖는다. *BstNI*역시 3종의 다른 균종을 잘 감별할 수 있었다. 이들 세 균주는 *AvaII*로 처리시는 342, 263bp에서 두 밴드가 일치하였으며, *BstNI*로 처리시는 263과 225bp에서 일치된 밴드를 보였다.

S. mitis(11), *S. mutans*(5) 및 *S. uberis*(13)를 대상으로 16S rDNA를 *CfoI*와 *DdeI*으로 제한하여 그 패턴을 관찰하면 Fig. 7 및 Table 6과 같다. 표준균주인 *S. mutans*(5)는 환자에서 분리된 다른 균종과는 다른 패턴을 보였다. *CfoI*으로 처리시는 *S. mitis*(11)과 *S. uberis*(13)는 RFLP가 동일하였고 *DdeI*으로 처리시는 430과 310bp에서 밴드가 일치하였다. 이들 3균주는 300bp에서 밴드가 일치하였다. 앞의 *S. mitis*(11)와 *S. uberis*(13)의 16 rDNA를 대상으로 제한 효소인 *MspI*과 *RdaI*, *ScrFI*으로 제한하여 그 패턴을 비교하였다(Fig. 8, Table 7). 3가지 제한 효소로 처리시 이들 균주의 RFLP는 다르게 나타났다. *MspI*에서는 577, 369, 236과 210 bp에서 밴드가 일치하였고 *RasI*에서는 380, 318과 224bp에서 밴드가 일치하였다. *ScrFI*으로

처리시는 300, 251과 222bp에서 밴드가 일치되었다. 앞의 세가지 효소로 *S. ubeirs*(1), *S. mitis*(3), *E. faecalis*(8) (Fig. 9, Table 8)와 *S. intermedius*, *S. sanguis*와 *E. faecalis*(Fig. 10, Table 9)을 대상으로 16S rDNA제한 효소 패턴을 비교하였다. Fig. 6과 Table 8에서 *MspI*으로 처리시 *S. uberis*(1), *S. mitis*(3)과 *E. faecalis*(8)은 624, 384, 237과 218bp에서 모두 4개의 밴드가 일치하였다. 그러나 *RsaI*으로 처리시에는 510과 384bp에서, *ScrFI*으로 처리시는 278과 237bp에서 2개의 밴드만이 각각 일치하고 나머지 밴드는 균주마다 달랐다. Fig. 10과 Table 9에서는 *S. intermedius*(2), *S. sanguis*(7)과 *E. faecalis*(8)을 *MspI*, *RsaI*과 *ScrFI*으로 처리시 나타나는 RFLP는 각각 달랐다. *MspI*으로 처리시는 671과 405bp에서 일치된 밴드를 보였으나 *RsaI*과 *ScrFI*으로 16S rDNA-RFLP를 비교한 결과 세 균종간에 매우 다른 양상을 보였다.

S. mitis, *S. mutans*(ATCC 10449) 및 *S. uberis*를 대상으로 16S rDNA를 *CfoI*과 *DdeI*으로 제한하여 그 패턴을 살펴보면(Fig. 7), *S. mitis*와 *S. uberis*는 Fig. 5의 16S rDNA-RFLP 패턴과 같아 감별능력이 없었다. 이들 균주에서 PCR로 16S rDNA를 증폭하면 대략 1.4kb의 증폭산물을 얻을 수 있었다. 표준균주인 *S. mutans*는 환자에서 분리된 다른 균종과는 다른 패턴을 보였다. *DdeI*으로 제한한 패턴역시 표준균주인 *S. mutans*와 나머지 두 균주와는 차이를 보였다. 앞의 *S. mitis*와 *S. uberis*의 16S rDNA를 대상으로 제한효소인 *MspI*과 *RsaI*, *ScrFI*으로 제한하여 그 패턴을 비교하였다(Fig. 8). *RsaI*은 GTAC 4개의 염기서열을 인식하고, *ScrFI*은 CCNGG 5개의 염기서열을 인식하여 두 균주간에 서로 다른 제한효소 패턴을 보였다. 앞의 세 가지 효소로 *S. uberis*, *S. mitis*, *E. faecalis*(Fig. 9) 및 *S. intermedius*, *S. sanguis*와 *E. faecalis*(Fig. 10)을 대상으로 16 rDNA 제한효소 패턴을 비교하였다. Fig. 9에서는 DNA의 양이 적어서 각 밴드가 희미하지만, 각기 다른 균종간에 전기영동 패턴은 비슷하였다. 특히 *S. uberis*와 *E. faecalis*가 세 가지 효소에서 모두

같은 패턴으로 나와 생화학 반응에 의한 동정 결과와는 차이가 있었다. 그러나 Fig. 10에서는 3종의 연쇄균에 대해 16S rDNA-RFLP를 비교한 결과 세 균종간에 매우 다른 양상을 보여 Fig. 9의 결과와는 차이가 있었다.

Fig. 11과 Table 10에서는 *S. sanguis*균주를 대상으로 본 실험에서 사용된 제한효소 7가지에 대해 16S rDNA-RFLP를 비교한 것으로 large gel에서 전기영동하였다. Mini-gel에 비하여 뚜렷한 장점을 발견할 수는 없었지만, 각 제한효소마다 다른 위치에서 절단하여 3개 내지 4개의 밴드를 보였다. *S. intermedius*(2), *S. mitis*(3), *S. sanguis*(7), *E. faecalis*(8)의 증폭된 밴드를 제한효소인 *HindIII*와 *MspI*으로 처리하였다(Fig. 13, Table 11). 본 실험에서 증폭한 크기가 약 1.4kb로서 *HindIII*는 AAGCTT 여섯 개의 염기 부위를 인식하여 절단하는 효소로서 이들 균주에서 사용하는 전혀 절단이 되지 않았다. 반면 *MspI*은 CCGG를 인식하는 효소로 4개의 균주에서 동일한 제한효소 패턴(RFLP)을 나타나 611, 416, 284, 234와 159bp에서 같은 밴드를 나타냈다.

16S rDNA 증폭산물을 주조(template) DNA로 하여 2번째(second round) PCR을 한 경우에 DNA 밴드는 비교적 잘 증폭되었고, 13번 균주(*S. uberis*)는 16S rDNA밴드 이외에 작은 밴드가 한 개 더 생겼다. 그러나 이 밴드에 의해 RFLP 패턴이 영향을 받지 않는 것으로 사료되었다(Fig. 14). 11번 균주(*S. mitis*)와 12번 균주(*S. intermedius*), 13번 균주(*S. uberis*)에 대해 *DdeI*, *CfoI*, *AvaII* 제한효소로 처리한 결과 *AvaII*에 의한 제한 효소 패턴이 비교적 세 가지 균종간에 차이를 보였다(Fig. 14, Table 12). *DdeI*에서는 453과 307bp에서 세 균주간에 동일한 밴드가 관찰되었다. *CfoI*으로 처리한 경우에는 이들 세 균주 모두 586, 532와 307bp에서 일치된 RFLP를 보인 반면, *AvaII*로 처리한 경우는 367과 315bp에서만 밴드가 일치하여 RFLP가 달랐다. 이들 균주와 9번 균주(*S. sanguis*)를 *AvaII* 및 *BatNI*으로 제한한 전기영동 패턴을 비교한 결과 약간씩 다른 양상을 보였다(Fig. 16, Table 13).

*AvaII*로 처리하면 이들 3 균주는 342와 261 bp에서 밴드가 일치하였고 *BstNI*으로 처리하면 261과 218bp에서 일치된 밴드를 보였으나 기타 다른 밴드도 나타난 PFLP는 세균마다 각각 달랐다. 서로 다른 균주인 1번 (*S. sanguis*), 2번 (*S. intermedius*), 4번 (*S. mitis*), 5번 (*S. mutans*) 및 7번 (*S. sanguis*) 균주에 대해 PCR-RFLP를 시행하였고, 제한효소로는 *AvaII*, *CfoI*, *DdeI*을 사용한 결과는 Fig. 15와 같다. 그 결과 5번 균주의 *CfoI* 제한효소 패턴이 다른 균주와는 큰 차이를 보였다. *DdeI* 제한효소 패턴은 1번 균주(*S. uberis*)가 다른 종의 연쇄 균주와는 큰 차이를 보였다. 여기서도 제한된 밴드는 약 3개내지 5개가 관찰되어, 균종간 감별하는데 16S rDNA PCR-RFLP가 유용하였다.

8번(*E. faecalis*), 9번(*S. sanguis*), 11번(*S. mitis*), 12번(*S. intermedius*) 및 13번(*S. uberis*) 균주에 대해 *BstNI*과 *ScrFI* 제한효소 패턴을 비교 분석하였다(Fig. 17, Table 14). 이들 제한효소의 작용 부위는 *BstNI*이 CCAGG 혹은 CCTGG이고, *ScrFI*의 작용부위가 CCNGG로서 *ScrFI*의 작용부위가 약간 넓다. 비교적 전기영동 상태가 양호한 *S. mitis*(11), *S. intermedius*(12)와 *S. uberis*(13)을 비교하면 *BstNI*과 *ScrFI*으로 처리했을 때 RFLP는 각각 달랐다. *BstNI*으로 처리하는 174bp에서, *ScrFI*으로 처리하는 232와 216bp에서 일치된 밴드를 보였다.

Table 3. Comparison of identification of Streptococci using Vitek-GPI and API 20 STREP

Work No.	Vitek-GPI	API 20 STREP
1	<i>S. uberis</i>	<i>S. intermedius</i>
2	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
3	<i>S. mitis</i>	<i>S. oralis</i>
5 ^a	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
6	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
7	<i>S. sanguis</i>	<i>S. sanguis</i>
8 ^b	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
9	<i>S. sanguis</i>	<i>S. mitis</i>
10	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
11	<i>S. mitis</i>	<i>S. mitis</i>
12	<i>S. intermedius</i>	Unidentified
13	<i>S. uberis</i>	<i>Gamella mobillorum</i>
14	<i>E. faecalis</i>	<i>E. casseliflavus</i>
15	<i>S. sanguis</i>	<i>S. oralis</i>
16	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
17	<i>S. mitis</i>	<i>S. oralis</i>
18	<i>S. mitis</i>	Unidentified
19	<i>E. faecium</i>	<i>E. casseliflavus</i>

a : ATCC 10449

b : ATCC 19433

Table 4. Restriction enzyme(*DdeI*) patterns of 16S rDNA fragment obtained by PCR

Restriction enzyme	Sizes ^a (bp) of fragments obtained with strain					
	<i>S. uberis</i> (1 ^b)	<i>S. uberis</i> (13)	<i>S. intermedius</i> (2)	<i>S. intermedius</i> (12)	<i>S. sanguis</i> (7)	<i>S. sanguis</i> (9)
	— ^c	—	—		638	638
	491	491	491	491	491	491
<i>DdeI</i>	317	317	317	317	317	317
	—	266	—	—	—	—
	144	144	144	144	144	144

^a The size of each fragment was estimated by using molecular weight markers as described in Materials and Methods.

^b Work No. in Table 1

^c Absence of the corresponding DNA fragment

Table 5. Restriction enzyme patterns of 16S rDNA fragment obtained by PCR

Restriction enzyme	Sizes ^a (bp) of fragments obtained with strain		
	<i>S. mitis</i> (11)	<i>S. intermedius</i> (12)	<i>S. uberis</i> (13)
<i>Ava</i> II	—	—	1084
	976	—	—
	—	642	—
	578	—	—
	342	342	342
	263	263	263
<i>Bst</i> NI	—	976	—
	—	—	834
	751	—	—
	—	—	520
	263	263	263
	225	225	225
	182	182	—

Table 6. Restriction enzyme patterns of 16S rDNA fragment obtained by PCR

Restriction enzyme	Sizes ^a (bp) of fragments obtained with strain		
	<i>S. mitis</i> (11)	<i>S. mutans</i> (12)	<i>S. uberis</i> (13)
<i>Cfo</i> I	599	—	599
	524	—	524
	—	377	—
	300	300	300
	—	239	—
<i>Dde</i> I	524	—	—
	430	430	430
	310	310	310
	255	—	255
	—	196	—
	—	161	—

*Bst*NI과 *Bst*NI과 *Scr*FI으로 처리했을 때 *S. uberis*(1), *S. uberis*(13), *S. intermedius*(2), *S. intermedius*(12), *S. sanguis*(7)과 *S. sanguis*(9)를 *Cfo*I으로 처리하면 작업 번호 2번의 *S. intermedius*를 제외하면 579, 520, 289bp에서 밴드가 나타나 모두 동일한 RFLP를 보였고 *S.*

intermedius(2)는 111bp에서 밴드가 한 개 더 관찰되었다(Fig. 18, Table 15).

Table 7. Restriction enzyme patterns of 16S rDNA fragment obtained by PCR

Restriction enzyme	Sizes ^a (bp) of fragments obtained with strain	
	<i>S. mitis</i> (11)	<i>S. uberis</i> (13)
<i>MspI</i>	577	577
	369	369
	266	—
	236	236
	210	210
<i>RsaI</i>	—	824
	612	—
	—	577
	380	380
	318	318
<i>ScrFI</i>	224	224
	649	649
	—	454
	300	300
	251	251
	222	222

Table 8. Restriction enzyme patterns of 16S rDNA fragment obtained by PCR

Restriction enzyme	Sizes ^a (bp) of fragments obtained with strain		
	<i>S. uberis</i> (1)	<i>S. mitis</i> (3)	<i>E. faecalis</i> (8)
<i>MspI</i>	624	624	624
	384	384	384
	237	237	237
	218	218	218
<i>RsaI</i>	510	—	510
	434	—	434
	—	417	—
	384	384	384
	—	301	—
<i>ScrFI</i>	—	—	236
	—	218	—
	796	—	796
	—	677	—
	—	301	—
	278	278	278
	237	237	237

Table 9. Restriction enzyme patterns of 16S rDNA fragment obtained by PCR

Restriction enzyme	Sizes ^a (bp) of fragments obtained with strain		
	<i>S. intermedius</i> (2)	<i>S. saguis</i> (7)	<i>E. faecalis</i> (8)
<i>Msp</i> I	671	671	671
	—	417	417
	405	405	405
	—	—	296
	—	—	261
<i>Rsa</i> I	245	—	—
	—	1042	—
	—	—	714
	591	—	—
	521	—	—
	459	—	459
	—	—	380
	—	325	—
	277	—	—
	—	269	—
<i>Scr</i> FI	919	919	—
	—	—	737
	357	—	—
	—	—	335
	—	315	—
	—	277	277
	260	—	—

Table 10. Restriction enzyme patterns of 16S rDNA (*S. sanguis*) fragment obtained by PCR

	Restriction enzyme						
	<i>Ava</i> I	<i>Bst</i> NI	<i>Cfo</i> I	<i>Dde</i> I	<i>Msp</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Scr</i> FI
Sizes(bp)	926	—	—	—	—	—	—
of fragments	—	705	—	—	—	—	705
obtained	—	—	—	—	—	667	—
with	—	—	614	—	—	—	—
<i>S. sanguis</i>	—	—	—	—	598	—	—
(9)	—	—	—	582	—	—	—
—	—	—	551	—	—	—	—
—	—	—	—	467	—	—	—
—	346	—	—	—	—	—	—
—	—	—	310	310	—	—	—
—	—	—	—	—	—	293	—

-	278	-	-	-	-	278
263	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	249
-	223	-	-	223	-	-
-	-	-	-	-	200	-
-	-	-	-	190	-	-
-	-	-	129	-	-	-
-	-	-	-	122	-	-

Table 11. Restriction enzyme patterns of 16S rDNA fragment obtained by PCR

Restriction enzyme	Sizes(bp) of fragments obtained with strain			
	<i>S. intermedius</i> (2)	<i>S. mitis</i> (3)	<i>S. sanguis</i> (7)	<i>E. faecalis</i> (8)
	1381	1381	1381	1381
<i>HindIII</i>				
	611	611	611	611
<i>MspI</i>	416	416	416	416
	284	284	284	284
	234	234	234	234
	159	159	159	159

Table 12. Restriction enzyme patterns of 16S rDNA fragment obtained by PCR

Restriction enzyme	Sizes(bp) of fragments obtained with strain		
	<i>S. mitis</i> (11)	<i>S. intermedius</i> (12)	<i>S. uberis</i> (13)
<i>DdeI</i>	550	-	-
	453	453	453
	307	307	307
	253	-	253
<i>CfoI</i>	586	586	586
	532	532	532
	307	307	307
<i>AvaII</i>	-	-	966
	922	-	-
	-	628	-
	582	-	-
	367	367	367
	315	315	315

Table 13. Restriction enzyme patterns of 16S rDNA fragment obtained by PCR

Restriction enzyme	Sizes(bp) of fragments obtained with strain		
	<i>S. sanguis</i> (9)	<i>S. mitis</i> (11)	<i>S. intermedius</i> (12)
<i>Ava</i> II	875	875	—
	—	—	585
	—	559	—
	342	342	342
	261	261	261
	—	—	837
<i>Bst</i> NI	669	669	—
	261	261	261
	218	218	218

Table 14. Restriction enzyme patterns of 16S rDNA fragment obtained by PCR

Restriction enzyme	Sizes(bp) of fragments obtained with strain		
	<i>S. mitis</i> (11)	<i>S. intermedius</i> (12)	<i>S. uberis</i> (13)
<i>Bst</i> NI	—	779	—
	—	—	629
	586	—	—
	—	—	440
	—	—	232
	216	216	—
	174	174	174
	—	—	151
<i>Scr</i> FI	—	779	—
	629	—	629
	—	—	440
	232	232	232
	216	216	216
	—	—	174

Table 15. Restriction enzyme patterns of 16S rDNA fragment obtained by PCR

Restriction enzyme	Sizes(bp) of fragments obtained with strain					
	<i>S. uberis</i> (1)	<i>S. uberis</i> (13)	<i>S. intermedius</i> (2)	<i>S. intermedius</i> (12)	<i>S. sanguis</i> (7)	<i>S. sanguis</i> (9)
<i>Cfo</i> I	579	579	579	579	579	579
	520	520	520	520	520	520
	289	289	289	289	289	289
			111			

IV. 총괄 및 고찰

급성 치성 농양에서 과거에는 *Streptococcus viridans*가 가장 많이 분리되는 균주였으나 최근에는 혐기성 세균만이 순배양되거나 혐기성 세균이 우세하게 분리되고 있다⁸⁻¹⁰. Gomes등¹²은 30개의 근관에서 세균을 배양하여 57종의 세균을 분리한 결과 절대 혐기성 세균이 총 분리 균주의 60%로 나타났으며 연쇄구균이 23%를 차지하였고 그 중 *S. milleri*균이 가장 우세하게 분리되었다. Lewis등¹⁰은 50증례의 급성치근단 농양에서 나타난 세균을 정량적으로 연구하여 전체 세균 중 75%가 절대 혐기성 세균이었다고 하였다. 그 중 40%의 증례에서는 혐기성 세균만이 분리되었고, 6%의 증례에서는 통성 혐기성 세균만이 분리되었으며 54%의 증례에서는 혐기성 세균과 혼합감염으로 나타났다. 통성 혐기성 세균 중에서는 *Streptococcus milleri*가 가장 자주 분리된 균주였다. *S. milleri*는 전체 증례 중 40%의 증례에서 검출되었으며 두 증례에서는 *S. milleri*가 순수배양되었으며 이때에는 임상증상이 나타나는 첫날에 검체를 채취한 경우에 해당하였다. 또한 임상증상이 나타나기 시작하여 2-3일이 경과된 환자에서는 혐기성 세균이 우세하거나 순수한 혐기성 세균만이 배양되었다.

또한 von Konow등¹¹도 *S. milleri*가 구강악 안면 감염에서 가장 자주 분리되는 균주라고 보고하였다. Matusow등³⁰은 무수치인 34개의 치아가 근관 치료 도중 급성으로 악화된 증례에서 세균을 분리하여 절대 혐기성 세균은 분리되지 않았다고 보고하였다. 통성 혐기성 세균과 호기성 세균만이 분리되었으며 분리된 균주의 80%가 통성 혐기성 세균이었다. Baumgartner¹³에 의하면 절환 과정은 세균의 수와 병인성 및 숙주의 저항성과 연관되며 세균의 병인성은 복합감염에서는 세균간의 상승작용에 영향을 받을 수도 있다. 예를 들면 절대 혐기성 세균인 *Prevotella*는 감염근관에서 다른 세균과 자주 함께 발견된다. 그러나 이 세균을 근관에서 분리하여 배양하면 잘 자라지 못한다. 따라서 *Prevotella*의 성장에 필요한 낮은 산화환원 전

위차를 제공하는 다른 세균의 종이 필요하며 이러한 다른 세균의 도움 없이는 근관내의 환경에서 살 수 없다고 하였다. 이러한 그의 가설은 *Prevotella*가 순배양으로 나타나는 증례가 없다는 것으로도 입증된다. 감염된 근관에서 발견되는 세균은 항상 혼합감염의 형태로 나타나며 그 중 혐기성 세균이 우세하게 나타나며 세균은 세균이 침입한 경로에 따라 다른 분포로 나타난다. Aderhold등⁸은 농양이 형성되는 초기 단계에서 연쇄구균은 그 이후에 혐기성 세균이 침입할 수 있는 환경을 조성하는 역할을 담당한다고 하였다.

세균의 subtyping방법은 세균의 균종을 분류하는 방법으로 사용되며 그 방법 중 하나인 molecular typing은 역학 연구에서 큰 진보를 가져왔다³¹⁻³². 비록 이러한 방법들이 분별력이 높고 재현성도 우수하지만 이 방법을 적용할 때에는 그 방법을 표준화하고, 신중하게 평가해야 한다. 다른 통상적인 typing 방법과 마찬가지로 이 방법은 역학적인 면 뿐만 아니라 세균학적인 기준에서 볼 때 동질적인 균주 뿐 아니라 이질적인 균주에 대해서도 사용할 수 있다. Molecular typing방법에는 lipopolysaccharide에 근거한 방법과 단백질에 근거한 방법 및 핵산에 근거한 방법이 있다. 이 중 핵산에 근거한 방법은 *Klebsiella pneumonia* 병원 감염의 집단발생의 역학연구에 처음으로 이용되었다³³. 1975년 이후 핵산의 분리와 증폭에 관한 기술이 진보함에 따라서 핵산에 근거한 subtyping방법은 다양한 특정 역학적인 연구에 적용할 수 있게 되었다³⁴. 이러한 방법 중에 플라스미드나 genomic DNA의 restriction endonuclease 분석방법과 증합효소 연쇄반응에 근거한 fingerprinting이 여기에 속한다.

Chromosomal DNA restriction analysis는 4-6개의 염기를 인식하는 제한 효소로 DNA를 처리했을 때 형성되는 절편의 다형성을 비교하는 방법이다. 이때 제한 효소를 선택할 때에는 형성된 절편이 크기와 빈도의 면에서 분석에 적절해야 하는데 1,000-15,000bp에서 최상의 결과를 얻을 수 있으며 적절한 제한 효소의 선택 방법에 관해서는 Forbes등³⁵이 제한한 바 있다.

Chromosomal DNA restriction analysis는 적용 범위가 넓고 전체 genome에 대하여 분석할 수 있으며, 적용하기 쉬운 장점이 있으나 절편의 수가 너무 많고 절편들이 서로 가깝게 위치하여 분석하기 어려운 점이 있어서 소수의 균주를 비교하는데에는 유용하지만 대단위의 비교에는 적절한 방법이 아닌 것으로 알려져 있다³¹⁻³³).

플라스미드 분석 방법은 세균의 outbreak strain을 동정하는 간단하고 강력한 방법으로서 플라스미드 DNA를 추출하고 크기에 근거하여 agarose gel에 전기영동함으로써 역학 연구에 널리 사용하게 되었다³⁶. 플라스미드 profile이 역학 연구에 있어서 유용하며 일부 세균을 subtyping하는 데 있어서 가장 분별력이 우수한 방법일수도 있으나 적용 범위가 광범위하지 않다. 많은 세균의 균종이 plasmid를 갖고 있지 않은 경우도 많을 뿐 아니라 플라스미드가 있는 경우에도 이질성이 거의 없는 경우가 종종 있어서 subtyping에 이용할 수 없는 경우가 있다. 또한 진화 과정 중에서 플라스미드를 얻거나 손실되므로 장기간의 추적 연구에 사용시는 유용하지 않은 경우도 있다. 이러한 plasmid profiling은 다른 subtyping방법과 병용하면 유용한 방법이며 특히 병원 감염의 연구에 유용하게 사용되었다³⁷⁻³⁹.

중합효소 연쇄반응은 다른 핵산에 근거한 subtyping방법에 비하여 속도가 빠르고 소량의 세균만이 필요하며 실험 단계가 줄어드는 장점이 있다²⁴. 이 방법과 다른 분자 생물학적인 subtyping방법에 대한 광범위한 비교는 아직 완전히 이루어지지 않았으므로 역학 연구에 사용하기에 적절한가의 여부는 아직 입증되지 않은 상태이다. 중합효소 연쇄반응에 근거한 방법중에서 알려진 서열을 증폭하고 제한 효소로 절단한 후 절편을 비교하는 방법은 통상적인 DNA restriction analysis에 비하여 유익한 장점이 있다. 1-2kb에 해당하는 하나의 target locus를 중합효소로 증폭시킨 후 4개 정도의 염기서열을 인식하는 제한 효소로 절단한 후 분석하므로 Southern blotting이나 probing이 필요 없다⁴⁰⁻⁴¹. Ribosome의 유전자 중에서 16S rDNA를 coding하는 유전자는 균종 수준까지

동정하는데 유용하지만 subtyping에는 유용하지 않을 수도 있다⁴²⁻⁴³.

연쇄구균을 통상적으로 동정하고 구별하는 방법은 복잡하고 시간 소모가 많은데 베타용혈을 나타내는 연쇄구균이 아닌 연쇄구균을 구별하기 위하여 다양한 생리화적인 검사방법이 사용되었으나 이 방법은 일부 연쇄구균에만 적용되며 3-7일간의 배양기간이 필요한 단점이 있었다¹⁶. Facklam등²¹은 연쇄구균 247균주에 대하여 Rapid Strep ID System으로 동정한 결과 동정 속도와 동정 수준이 연쇄구균 균종마다 차이를 보고하였다. 또한 Appelbaum등¹⁹도 Rapid Strep ID system으로 연쇄구균 209균주를 동정한 결과 이 system을 이용하여 group D와 viridans균주에 대해서는 연쇄구균 동정에 있어서 유익한 진보를 보였다 하였고 하였다. 또한 Facklam등²¹은 비베타용혈을 보이는 연쇄구균과 aerococci를 동정하는데 API 20S와 Vitek Systems의 GPI를 이용한 경우를 비교하였다. 한편 Nachamkin등²³은 alpha용혈을 나타내는 연쇄구균의 동정에 API 20S를 이용한 결과 균종 수준까지 동정하는 경우 API 20S system은 enterococci를 제외하면 이의 동정에 거의 가치가 없다고 보고하였다.

Gordillo등⁴⁴은 *E. faecalis* 41분리 균주를 대상으로 *EcoRI*과 *HindIII*로 처리한 chromosomal DNA를 rRNA gene에 대한 probe로 ribotyping하였다. Murray등³⁸은 27분리균주의 enterococci에 대하여 큰 염색체 fragment에 대하여 pulsed-field 전기영동을 시행하여 chromosomal restriction endonuclease digestion pattern을 비교하여 이 방법이 유용하다고 하였다. Hall등⁴⁵은 *E. faecalis*와 *E. faecium*을 다음과 같은 2가지 방법의 DNA-based typing방법을 적용하였다. 통상적인 전기영동 방법 및 제한 효소 처리한 절편을 rRNA gene probe와 hybridization하여 ribotyping한 방법을 비교한 결과 ribotyping이 종의 감별 수준에서는 더 작용하기 좋은 방법이라고 하였다. Wilson²⁹은 Staphylococcus, Coxiella, Rickettsia, Clostridium, Neisseria, Mycobacterium, Bilophila, Eubacterium, Fusobacterium, Lactobacillus와 Enterobacte-

riaceae의 16S ribosomal DNA를 primer를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 이 방법이 sequencing과 probing에 유용한 방법이며 배양하기 어려운 세균을 검출하고 동정시 적용 가능하며 과거에는 배양이 불가능하여 찾아내지 못하였던 새로운 병원균의 동정이 가능하다고 하였다. Jayarao등²⁸⁾은 bovine origin의 *Streptococcus*와 *Enterococcus* spp.의 16S ribosomal DNA의 RFLP(restriction fragment length polymorphism)를 비교하였다. 16S rRNA에 상보적인 oligonucleotide primer를 사용하여 PCR을 한 결과 세균 species의 동정과 구별에 16S rDNA fingerprinting이 적용 가능함을 보였다. 또한 Jayarao등²⁹⁾은 *Streptococcus uberis*와 *S. parauberis*의 감별에 16S ribosomal DNA의 PCR과 RFLP를 적용가능하다고 하였다.

본 실험에서는 연쇄구균의 동정에 Vitek의 GPI card 및 API 20 STREP을 이용하였는데 이들간의 동정결과는 Table 3에 나타난 바와 같이 18가지 균주 중 8가지 균주에서만 일치하였다. 인체의 다른 부위에서 분리된 연쇄구균과 같이 감염 근관에서 분리된 연쇄구균의 동정결과도 이와 같이 동정 방법에 따라 다르게 나타나므로 추후 감염근관에서 분리한 연쇄구균을 대상으로 광범위한 연구가 계속되어야 할 것으로 사료되었다.

16S rDNA는 모든 세균이 가지고 있는 공통 염기서열로서, 크기는 균종마다 약간씩 차이는 있지만 5'과 3' 말단 부위를 본 실험에서와 같이 구성하면 약 1.4kb 크기의 밴드를 얻을 수 있다. 통상 어떤 세균을 검출 혹은 동정하고자 할 때는 같은 속(genus) 혹은 종(species)에 특이한 염기서열을 확인하거나 탐식자(probe)로 사용할 수 있다. 그러나 16S rDNA는 세균이 살아가는데 필수적인 ribosomal RNA를 만드는 유전자로서 세균마다 일정하게 보존된 염기서열 (highly conserved sequence)을 갖는 특징이 있다. 따라서 16S rDNA는 비슷한 균종을 감별하는 분류(taxonomy)에 사용하거나 역학조사(epidemiology)에 이용할 수 있으며, 생화학 반응이 약하거나 성장속도가 느린 세균의 감별에 이용될 수 있다. 본 연구에서는 이러한

특성을 이용하여 16S rDNA를 PCR로 증폭하였다. 18개의 연쇄구균을 대상으로 PCR을 시행한 결과 11개(61%)의 연쇄구균이 16S rDNA가 증폭되었다. 16S rDNA가 증폭되지 않은 7개의 균주에 대해 염색체 DNA 분리부터 새로 시도하여 PCR을 시행하여 그 중 1개만이 증폭된 밴드(amplicon)를 보였다. 이는 PCR 조건에 따라 증폭산물이 생성될 수 있음이 보여주는 동시에 균종에 따라서는 본 실험에 사용한 5' primer, 3' primer로 증폭되지 않은 것임을 시사한다. 증폭된 산물은 PCR조건에 따라 다소 차이가 있었으나 대략 1.4kb에 해당하였다. 증폭산물이 생성된 11개의 균종에 대해서는 *AvaII*, *BstNI*, *CfoI*, *DdeI*, *HindIII*, *MspI*, *RsaI*과 *ScrFI*등 8가지 제한효소로 제한하여 RFLP를 관찰하였다. 이들 효소중 4개의 염기서열을 인식하는 것은 *CfoI*(GCGC)과 *MspI*(CCGG)이고, 나머지는 모두 5개 염기서열을 인식하는 것이다. 이중 *BstNI* (*MvaI*)은 CCAGG와 CCTGG를 인식하는 것으로, CC-NGG를 인식하는 *ScrFI*과 거의 비슷한 작용 부위를 갖고 있다. 여섯개의 염기를 인식하는 *HindIII*로 제한했을 때는 전혀 절단이 되지 않았다. 이는 DNA 크기에 따라 제한효소가 작용할 수 있는 염기가 나올 가능성에 따라 다르기 때문인데, 본 실험에서는 4개나 5개의 염기서열을 인식하는 효소가 적합하였다. 이들 제한효소로 절단했을 때 3개내지 5개의 밴드가 관찰되었다. 이때 PCR에 사용되었던 완충용액과 제한효소가 작용하는 완충용액의 조성이 달라 제한(restriction)이 잘 될지 우려되었지만, PCR 산물을 5배 내지 10배 희석하여 제한한 결과 모두 잘 절단이 되었다. 한천배지에 있는 균을 액체배지에 접종하여 하룻밤 배양하여 그 다음날 오전에 염색체 DNA 분리, 오후에 PCR 증폭 및 제한효소처리가 가능해 익숙해지면 24시간 이내에 전 과정을 시행할 수 있어 본 연구의 PCR-RFLP법이 신속하고 효과적인 방법이라고 할 수 있다.

본 연구에서는 표준 분자량 표지자를 이용하여 회귀직선을 구한 후 각 밴드의 크기를 계산하였다. 16S rDNA를 제한효소로 처리하지

않은 경우에서 증폭산물은 약 1.4kb 정도로 나타났으나, 각 균주에 따라 또는 실험조건에 따라 다양성이 있었다. *S. uberis*(13)를 *DdeI*으로 처리한 경우에서 Table 4와 6을 비교하면 밴드의 수는 3개였고 밴드가 나타나는 위치는 일치하였는데 이들의 bp값은 일치하지 않았다. *E. faecalis*(8)균주를 *MspI*, *RsaI*과 *ScrFI*으로 처리한 경우(Table 8과 9)에서는 *ScrFI*으로 처리한 경우에서만 3개의 밴드로 일치하였다. 또한 *S. mitis*(11)와 *S. uberis*(13)를 *ScrFI*으로 처리한 경우에는 *S. mitis*의 밴드가 Table 7에서는 4개인 반면 Table 14에서는 3개로 나타나서 일치하지 않았으며 *S. uberis*의 밴드 수와 위치만이 일치하였다. *E. faecalis* 균주를 *MspI*으로 처리한 경우는 Table 11에서는 5개의 밴드가 나타났고, Table 8에서는 4개의 밴드가 위치도 일치되었다. *S. mitis*(11)와 *S. intermedius*(12)를 *BstNI*으로 처리한 경우(Table 13, 14)에서는 *S. uberis*(13)의 밴드 수는 일치하지 않아서 전기영동의 상태와 비교하면 Table 14에서 나타난 바와 같이 부가적인 밴드가 Table 13에는 나타나지 않은 것으로 사료되었다. Table 5와 6을 비교해 보면 *S. mitis*(11), *S. intermedius*(12)와 *S. uberis*(13)를 *AvaII*로 처리했을 때 밴드가 각각 4개와 3개로 나타났으며 위치도 일치하였다. 또한 이들 균주 중 *S. mitis*(11)와 *S. intermedius*(12)를 Table 13의 결과와 다시 비교하면 밴드의 수와 위치는 역시 일치하였다. 그러나 Table 5와 14에서 *BstNI*로 처리시 *S. mitis*(11), *S. intermedius*(12)와 *S. uberis*(13)을 비교하면 밴드의 수는 일치하지 않았다. Table 13과 14에서 *S. mitis*(11)과 *S. intermedius*(12)를 비교하면 밴드의 수는 각각 3개였고 그 위치도 일치하였다. 본 연구의 결과에서 나타난 바와 같이 전기영동하는 젤과 조건 등에 따라 나타나는 밴드의 수가 다르게 나타난 경우도 있으며 이러한 경우에서도 각 균주별로 비교하면 밴드가 나타난 위치는 비교적 일정한 형태로 관찰되었다. 또한 이들의 bp를 계산한 후 비교시 bp의 크기 차이가 수 개로부터 수십개에 이르기까지 차이가 나는 등 다양하였지만 단순히 균주를 분리하여 동정하

는데 RFLP만을 사용한다면 허용될 수 있는 범위로 사료되었다. 그러나 추후 반복실험하여 각 밴드마다 bp를 비교적 정확히 계산해 두면 한 젤상에서 관찰하고자 하는 모든 균주를 동정할 수 없는 경우에 여러 젤에서 각기 전기영동한 각 균주를 상호비교할 수 있는 장점이 있을 것이다.

제한효소를 약 2-3가지 사용하면 균주 감별을 더욱 용이하게 할 수 있고, 4개의 염기를 인식하는 효소보다는 5개의 염기를 인식하는 효소가 적합할 것으로 사료되었다. 향후 생화학 동정검사에서는 연쇄구균으로 동정되었지만, 16S rDNA 증폭산물이 보이지 않았던 균종에 대하여 증폭이 되지 않은 원인을 규명해야 할 것으로 사료된다. PCR 조건에 따라 원하는 밴드 이외에도 다른 밴드가 생겨, 이들이 제한효소패턴에 영향을 줄 수 있어 주의할 필요가 있다. 본 연구에서는 Fig. 2에서 나타난 바와 같이 관찰한 연쇄구균은 대부분 플라스미드 DNA를 2-3개씩 포함하였으며 이들은 오히려 염색체 DNA보다 진하게 나와 세균의 세포벽 파괴가 불완전하게 일어났음을 시사하였다. 플라스미드 DNA 분리는 세균의 항균제 감수성 검사와 더불어 역학조사에 유용하게 이용될 수 있으며, 플라스미드 DNA가 균종은 다르지만 같은 크기로 일정하게 보인 것에 대해서도 연구를 추가해야 할 것이다. 또 이들 플라스미드 DNA는 농도가 매우 높기 때문에, 염색체 DNA를 증폭했을 때 증폭산물과 함께 관찰되기도 하였으며 제한효소 처리시에도 RFLP에 영향을 미치기 때문에 주의를 요한다.

세균의 분류나 역학조사에 많이 이용되는 Southern blot을 이용한 ribotyping도 본 연구와 비슷한 원리로서 이때는 탐식자로서 rDNA를 사용하게 된다. 원리는 염색체 DNA를 분리, 제한효소 처리하여 전기영동한 후 nylon membrane에 blotting시킨다. rDNA를 탐식자로 교잡반응(hybridization)을 일으키면 rDNA 서열을 포함하고 있는 부위는 약 10여개의 밴드가 형성된다. 이에 반하여 본 연구의 PCR-RFLP 방법은 blotting과 hybridization을 하지 않아도 되고, 탐식자를 준비하지 않아도 되기 때문에

훨씬 신속하고 간편한 방법이라고 할 수 있다. 다만 PCR에 필요한 thermal cycler가 필수적이고, 증폭산물 (amplicon)이 오염되지 않게 세심한 주의가 필요하다. 제한된 밴드의 숫자는 3-5개로 균종 감별에 용이하지만, 때로는 균종이 다름에도 제한효소패턴은 같게 나와 적어도 3가지의 제한효소는 사용해야 할 것으로 사료되었다. 또한 PCR 조건, 이를테면 primer, *Taq* polymerase, Mg^{++} , dNTP 농도나 염색체 DNA 분리기술에 따라서도 PCR 증폭산물이 생기지 않을 수 있어 많은 시행착오가 필요하다.

혼합감염인 근관감염에서 각 세균의 상대적인 중요성과 질환의 과정에서 차지하는 역할에 관한 연구가 필요하며 연쇄구균이 근관 감염에서 차지하는 역할에 관한 지속적이고 포괄적인 연구도 계속되어야 할 것이다. 이의 한 방법으로서 임상적인 증상과 연쇄구균의 상관관계를 연구시 분자생물학적인 방법을 이용한다면 유용하리라 사료된다.

V. 결 론

근관감염에서 통성 혐기성 세균 중 가장 분리율이 높은 연쇄구균 중 환자의 감염 근관에서 분리된 균주로서 주로 alpha 용혈과 gamma 용혈을 보이는 *Streptococcus viridans* group과 *Enterococcus* spp. 및 표준 균주 *S. mutans* (ATCC 10449)와 *E. faecalis* (ATCC 19433)를 대상으로 분자생물학적인 접근을 시도하여 세균의 동정과 역학조사에 이를 이용할 수 있는지 연구하고자 하였다. 세균의 염색체 DNA중에서 16S ribosomal DNA를 합성하는 부위(16S rDNA)를 증합효소 연쇄반응(PCR)을 이용하여 증폭한 후 증폭된 16S rDNA를 8가지 제한 효소로 절단하여 길이의 다양성(restriction fragment length polymorphism, RFLP)을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

Streptococci 및 *enterococci* 18균주를 대상으로 염색체 DNA를 분리한 결과, 대부분의 균주에서 염색체 DNA의 농도는 낮은 반면 플라스미드 DNA는 농도가 높고 약 2-3개씩 관찰되었다. 염색체 DNA는 농도가 낮기 때문에

제한효소 (*Hind*III, *Eco*RI)로 처리했을 때 fingerprint가 관찰되지 않았고, 플라스미드 DNA는 잘 절단이 되지 않아 플라스미드 제한 효소 분석 (restriction enzyme analysis of plasmid)만으로 균주 감별은 어려웠다.

16S rDNA 부위를 목표로 PCR을 시행한 결과 11균주 (61%)에서 증폭된 산물을 관찰할 수 있었고, 나머지 7균주중 1균주만이 반복 실험하여 16S rDNA가 증폭되었다. 증폭된 16S rDNA는 크기가 약 1.4kb이었고, 8종의 제한 효소로 처리했을 때 3-5개의 제한효소패턴을 보였다. 4개의 염기서열을 인식하는 *Cfo*I은 제한 효소 패턴이 균주에 관계없이 일정하였고, 6개의 염기서열을 인식하는 *Hind*III는 16S rDNA를 절단하지 못하였다. 따라서 5개의 염기서열을 인식하는 제한 효소가 RFLP 패턴을 보기에 적당하며, 최소한 3가지의 효소를 사용해야 균주 감별을 할 수 있었다.

16S rDNA PCR-RFLP 방법은 비교적 신속하고 간편하여 균주 감별 뿐만 아니라, 균주 분류 및 역학조사에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Druker DB, Lilley JD, Tucker D and Gibbs AAC : The endodontic microflora revisited. *Microbios* 71 : 225-34, 1992.
2. Farber PA and Seltzer S : Endodontic microbiology. 1. Etiology, *J Endod* 14 : 363-71, 1988.
3. Bergenholtz G : Microorganisms from necrotic pulps of traumatized teeth. *Odontologisk Revy* 25 : 347-58, 1974.
4. Brook I, Frazier EH and Gher ME : Aerobic microbiology of periapical abscess. *Oral Microbiol Immunol* 6 : 123-5, 1991.
5. Griffe MB, patterson SS, Miller CH, Kafrawy AH and Newton CW : The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 50 : 457

- 61, 1980.
6. Hahm CL, Falkler WA and Mirah GE : Microbiological studies of carious dentin from human teeth with irreversible pulpitis. Arch Oral Biol 36 : 147–53, 1991.
 7. Lundy T and Stanley HL : Correlation of dental histopathology and clinical symptoms in human teeth subjected to experimental irritation. Oral Surg 27 : 187–201, 1969.
 8. Aderhold L, Knothe H and Frenkel G : The bacteriology of dentogenous pyogenic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 52 : 583–7, 1981.
 9. Oguntebi B, Slee AM, Tanzer JM and Langeland K : Predominant microflora associated with human dental periapical abscesses. J Clin Microbiol 15 : 964–6, 1982.
 10. Lewis MAO, MacFarlan TW and McGowan DA : Quantitative bacteriology of acute dento-alveolar abscesses. J Med Microbiol 21 : 101–4, 1986.
 11. von Konow L, Nord CE and Nordenram A : Anaerobic bacteria in dentoalveolar infections. Int J Oral Surg 10 : 313–22, 1981.
 12. Gomes BPFA, Druker DB and Lilley JD : Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. Int Endod J 27 : 291–8, 1995.
 13. Baumgartner JC : Microbiologic and pathologic aspects of endodontics. Current Opinion in Dentistry 1 : 737–43, 1991.
 14. Whitworth JM : Lancefield group F and related streptococci. J Med Microbiol 33 : 135–51, 1990.
 15. Mejare B and Edwardsson S : *Streptococcus milleri* (Guthof) : an indigenous organism of the human oral cavity. Arch Oral Biol 20 : 757–62, 1975.
 16. Faklam RR : Physiological differentiation of viridans streptococci. J Clin Microbiol 5 : 184–201, 1977.
 17. Knight RC and Shales DM : Physiological characteristics and deoxyribonucleic acid relatedness of *Streptococcus intermedius* strains. Int J Sytematic Bacteriol 38 : 19–24, 1988.
 18. Yakushiji T, Katsuki M, Yoshimitsu A, Mizuno J and Inous M : Isolation and physiological characterization of *Streptococcus milleri* strains from human dental plaque. Microbios 55 : 161–71, 1988.
 19. Appelbaum PC, chaurushiya PS, Jacobs MR and Duffet A : Evaluation of Rapid Strep System for species identification of streptococci. J Clin Microbiol 19 : 588–91, 1984.
 20. Applbaum PC, Jacobs MR, Heald JI, Palko HW, Duffet A, Crist R and Naugle PA : Comparative evaluation of the API 20S System and the AutoMicrobic system Gram-Positive Identification Card for species identification of streptococci. J Clin Microbiol 19 : 164–8, 1984.
 21. Facklam RR, Boosley GS, Roden D, Weaver N and Schulman R : Comparative evaluation of the API 20S and Auto Microbic Gram-Positive idntification Systems for nonbeta-hemolytic streptococci and aerococci. J Clin Microbiol 21 : 535–41, 1985.
 22. Facklam RR, Roden DL and Smith PB : Evaluation of Rapid Strep system for identification of clinical isolates of streptococcus species. J Clin Microbiol 20 : 894–8, 1984.
 23. Nachamikin I, Lynch JR and Dalton HP : Evaluation of a rapid system for species identification of alpha-hemolytic streptococci. J Clin Microbiol 16 : 521–4, 1982.
 24. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA : Primer directed enzymatic

- amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239 : 487–91, 1988.
25. Boddington BT, Rogall T, Flohr T, Blocker H and Bottger EC : Deletion and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 28 : 1751–9, 1990.
 26. Gobel UB, Geiser A and Stanbridge EJ : Oligonucleotide probes complementary to variable regions of ribosomal RNA discriminate between mycoplasma species. *J Gen Microbiol* 133 : 1969–74, 1987.
 27. Gimont F and Grimont PAD : Ribosomal nucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann Insts Pasteur(Paris)* 137B : 165–75, 1986.
 28. Jayarao BM, Dore JE, Baumbach GA, Matthews KR and Oliver SP : Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA. *J Clin Microbiol* 29 : 2774–8, 1991.
 29. Wilson KH, Blitchington RB and Greene RC : Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 28 : 1942–6, 1990.
 30. Matusow RJ : Acute pulpal-alveolar cellulitis syndrome IV. Exacerbations during endodontic treatment : A clinical study of specific microbial isolates and their etiologic role. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 61 : 90–5, 1986.
 31. Taylor DN, Wachsmuth IK, Shangkuan YH, Schmidt EV, Barrett TJ, Schrader JS, Scherach CS, McGee HB, Feldman RA and Brenner DJ : Salmonellosis associated with marijuana : a multisite outbreak traced by plasmid fingerprinting. *N Engl J Med* 306 : 1249–53, 1982.
 32. Cagnat DA, Froholm LO, Bover K, Holten E, Frasc CE, Mocca LF, Zollinger WD and Selander RK : Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic disease. *Proc Nat Acad Sci* 83 : 4927–31, 1986.
 33. Sadowski PL, Peterson BC, Gerding DN and Cleary PP : Physical characterization of ten R plasmids obtained from an outbreak of nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infections. *Antimicrob Agents Chemother* 15 : 616–24, 1979.
 34. Swaminathan S and Matar GM : Molecular typing methods. : Diagnostic molecular microbiology principles and applications. pp 26–27. American Society for Microbiology. Washington D. C. 1993.
 35. Forbes KJ, Bruce kD, Jordens JZ, Ball A and Pennington TH : Rapid methods in bacterial DNA fingerprinting. *J Gen Microbiol* 137 : 2051–7, 1991.
 36. Mayer LW : Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 1 : 228–43, 1988.
 37. Hanifah YA, Hiramatsu K and Yokota T : Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with nosocomial infections in the University Hospital, Kuala Lumpur. *J Hosp Infect* 21 : 15–28, 1992.
 38. Luginbuhl LM, Rotbart HA, Facklan RR, Roe MH and Elliot JA : Neonatal enterococcal sepsis : case-control study and description of an outbreak. *Pediatr Infect Dis J* 6 : 1022–30, 1987.
 39. Zervos MJ, Kauffman CA, Therasse PM, Bergman AG, Mikesell TS and Schaberg DR : Nosocomial infection by gentamicin-resistant *Streptococcus faecalis* : an epidemiologic study. *Ann Intern Med* 106 : 687

- 91, 1987.
40. Sayada C, Denamur E, Orfila J, Catalan F and Elion J : Rapid genotyping of the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein by the polymerase chain reaction. FEMS Microbiol Lett 83 : 73–8, 1991.
 41. Vines A, Reeves MW, Hunter S and Swaminathan B : Restriction fragment length polymorphism in four virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes*. Res Microbiol 143 : 281–94, 1992.
 42. Barry T, Colleran M, Glennon M, Dunican LK and Gannon F : The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. PCR Methods Applic 1 : 51–6, 1991.
 43. Gurtler V, Wilson VA and Mayall BC : Classification of medically important clostridia using restriction endonuclease site difference of PCR-amplified 16S rDNA. J Gen Microbiol 137 : 2673–9, 1991.
 44. Gordillo ME, Singh KV and Murray BE : Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for species differentiation of strains of *Enterococcus faecalis*. J Clin Microbiol 31 : 1570–4, 1993.
 45. Hall LMC, Buke B, Guiney M and Williams R : Typing of enterococcus species by DNA restriction fragment analysis. J Clin Microbiol 30 : 915–9, 1992.

Explanation of figures

- Fig. 2. Electrophoresis of chromosomal and plasmid DNA of streptococcus species. M, molecular marker, λ -HindIII. Lane 1 through 8, *S. uberis*(1*), *E. faecalis*(6), *E. faecalis*(10), *S. mitis*(11), *S. intermedius*(12), *E. faecalis*(14), *E. faecium*(16) and *E. faecium*(19) respectively.
* : Work No.
- Fig. 3. Restriction enzyme analysis of plasmid DNA of streptococcus spp. : M, Molecular markers, λ -HindIII, A to E 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027 and 564 bp, respectively. Lane 1 through 7, *S. uberis*(1), *E. faecalis*(6), *E. faecalis*(10), *S. mitis*(11), *S. intermedius*(12), *E. faecalis*(14) and *E. faecium*(16) respectively. Left lanes 1 through 7 were digested with *EcoRI* and right lanes 1 through 7 were digested with *HindIII*.
- Fig. 4. Polymerase chain reaction of 16S rDNA of streptococcus species. M, molecular marker, pBR322-*BstNI*. Lane 1 through 14, *S. uberis*(1), *S. mutans*(5), *S. sanguis*(9), *S. mitis*(11), *S. intermedius*(12), *S. uberis*(13), *S. sanguis*(15), *E. faecalis*(6), *E. faecalis*(10), *E. faecalis*(14), *E. faecalis*(16), *S. mitis*(17), *S. mitis*(18) and *E. faecium*(19), respectively.
- Fig. 5. Restriction fragment length polymorphism(RFLP) of 16S rDNA of streptococcus spp. digested with *DdeI*. M1, *BstNI*-digested pBR322 DNA : A to D, restriction fragment size markers of 1857, 1058, 929 and 383 bp, respectively. M2, *HaeIII*-digested ϕ -X174 DNA : A to I restriction fragment size markers of 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234 and 194bp, respectively. Lane 1 through 7, *S. uberis*(1), *S. uberis*(13), *S. intermedius*(2), *S. intermedius*(12), *S. sanguis*(7) and *S. sanguis*(9) respectively.
- Fig. 6. RFLP of 16S rDNA of Streptococcus spp. digested with *AvaII* and *BstNI*. M1, *BstNI*-digested pBR322 DNA M2, *HaeIII*-digested ϕ -X174 DNA Lane 1, *S. mitis*(11) with *AvaII* : lane 2, *S. mitis*(11) with *BstNI* : lane 3, *S. intermedius*(12) with *AvaII* : lane 4, *S. mitis*(12) with *BstNI* : lane 5, *S. uberis*(13) with *AvaII* : lane 6, *S. uberis*(13) with *BstNI*.
- Fig. 7. RFLP of 16S rDNA of *S. mitis*(11), *S. mutans*(5) and *S. uberis*(13) digested with *CfoI* and *DdeI*. M1, *BstNI*-digested pBR322 DNA M2, *HaeIII*-digested ϕ -X174 DNA Lane 1, *S. mitis*(11) digested with *CfoI* : lane 2, *S. mitis*(11) with *DdeI* : lane 3, *S. mutans*(5) with *CfoI* : lane 4, *S. mutans*(5) with *DdeI* : lane 5, *S. uberis*(13) with *CfoI* : lane 6, *S. uberis*(13) with *DdeI*.
- Fig. 8. RFLP of 16S rDNA of *S. mitis*(11) and *S. ubris*(13) digested with *MspI*, *RsaI* and *ScrFI*. M1, *BstNI*-digested pBR322 DNA M2, *HaeIII*-digested ϕ -X174 DNA Lane 1, *S. mitis*(11) digested with *MspI*, : lane 2, *S. mitis*(11) with *RsaI* : lane 3, *S. mitis*(11) with *ScrFI* : lane 4, *S. uberis*(13) with *MspI*, lane 5, *S. uberis*(13) with *RsaI* : lane 6, *S. uberis*(13) with *ScrFI*.

- Fig. 9. RFLP of 16S rDNA of *S. uberis*(1), *S. mitis*(3) and *E. faecalis*(8) digested with *MspI*, *RsaI* and *ScrFI*. M1, *BstNI*-digested pBR322 DNA M2, *HaeIII*-digested \emptyset -X174 DNA Lane 1, undigested 16S rDNA of *S. uberis*(1) : lane 2, *S. ubeirs* digested with *MspI* : lane 3, *S. uberis*(1) with *RsaI* : lane 4, *S. ubeirs*(1) with *ScrFI* : lane 5, undigested 16S rDNA of *S. mitis*(3) : lane 6, *S. mitis*(3) with *MspI* : lane 7, *S. mitis*(3) digested with *RsaI* : lane *S. mitis*(3) with *ScrFI* : lane 9. undigested 16S rDNA of *E. faecalis*(8) : lane 10, *E. faecalis*(8) with *MspI* : lane 11, *E. faecalis*(8) with *RsaI* : lane 12, *E. faecalis*(8) with *ScrFI*.
- Fig. 10. RFLP of 16S rDNA of *S. intermedius*(2) *S. sanguis*(7) and *E. faecalis*(8) digested with *MspI*, *RsaI* and *ScrFI*. M1, *BstNI*-digested pBR322 DNA M2, *HaeIII*-digested \emptyset -X174 DNA Lane 1 : undigested 16S rDNA of *S. intermedius* : lane 2, *S. intermedius* digested with *MspI* : lane 3, *S. intermedius* with *RsaI* : lane 4, *S. intermedius* with *ScrFI* : lane 5, undigested 16S rDNA of *S. sanguis* : lane 6, *S. sanguis* with *MspI* : lane 7, *S. sanguis* with *RsaI* : lane 8, *S. sanguis* with *ScrFI* : lane 9, undigested 16S rDNA of *E. faecalis* : lane 10, *E. faecalis* with *MspI* : lane 11, *E. faecalis* with *RsaI* : lane 12, *E. faecalis* with *ScrFI*.
- Fig. 11. RFLP of 16S rDNA of *S. sanguis*(9) treated with seven restriction enzymes. Lane M1, *BstNI*-digested pBR322 DNA Lane M2, *HaeIII*-digested \emptyset -X174 DNA Lane1 : undigested 16S rDNA. Lane 2 through 8 digested with *AvaII*, *BstNI*, *CfoI*, *DdeI*, *MspI*, *RsaI* and *ScrFI* respectively.
- Fig. 12. Polymerase chain reaction of 16S rDNA of Streptococcus spp. M, molecular marker, pBR22-*BstNI* Lane 1 ththrough 6, *E. faecalis*(6), *E. faecalis*(10), *E. faecalis*(14), *E. faecium*(16), *S. mitis*(17) and *E. faecium*(19) respectively.
- Fig. 13. RFLP of 16S rDNA of *S. intermedius*(2), *S. mitis*(3), *S. sanguis*(7) and *E. faecalis*(8) treated with *HindIII* and *MspI*. M1, *BstNI*-digested pBR322 DNA M2, *HaeIII*-digested \emptyset -X174 DNA Lane 2, undigested 16S rDNA of *S. intermedius* : lane 3, *S. intermedius* with *HindIII* : lane 4, *S. intermedius* with *MspI* : lane 5, undigested 16S rDNA of *S. mitis* : lane 6, *S. mitis* with *HindIII* : lane 7, *S. sanguis* with *MspI*, lane 8, undigested 16S rDNA of *E. faecalis* : lane 11, *E. faecalis* with *HindIII* : lane 12, *E. faecalis* with *MspI*.
- Fig. 14. RFLP of 16S rDNA of *S. mitis*(11), *S. intermedius*(12) and *S. uberis*(13) digested with *DdeI*, *CfoI* and *AvaII*. M1, *BstNI*-digested pBR322 DNA M2, *HaeIII*-digested \emptyset -X174 DNA Lane 1, undigested 16S rDNA of *S. mitis*, lane 2, *S. mitis* with *DdeI* : lane 3, *S. mitis* with *CfoI* : lane 4, *S. mitis* with *AvaII* : lane 5, undigested 16S rDNA of *S. intermedius* : lane 6, *S. intermedius* with *DdeI* : lane 7, *S. intermedius* with *CfoI* : lane 8, *S. intermedius* with *AvaII* : lane 9, undigested 16S rDNA of *S. uberis* : lane 10, *S. uberis* with *DdeI* : lane 11, *S. uberis* with *CfoI* : lane 12, *S. uberis* with *AvaII*.
- Fig. 15. RFLP of 16S rDNA of *S. uberis*(1), *S. intermedius*(2), *S. mitis*(4), *S. mutans*(5) and *S. sanguis*(7) by *AvaII*, *CfoI* and *DdeI*. M1, *BstNI*-digested pB322 DNA. M2, *HaeIII*-digested Phi-X174 DNA Lane 1, *S. uberis* digested with *AvaII* : lane 2, *S.*

uberis with *CfoI* : lane 3, *S. uberis* with *DdeI* : lane 4, *S. intermedius* with *AvaII* : lane 5, *S. intermedius* with *CfoI* : lane 6, *S. intermedius* with *DdeI*, lane 7, *S. mitis* with *AvaII* : lane 8, *S. mitis* with *CfoI* : lane 9, *S. mitis* with *DdeI* : lane 10, *S. mutans* with *AvaII* : lane 11, *S. mutans* with *CfoI* : lane 12, *S. mutans* with *DdeI* : lane 13, *S. sanguis* with *AvaII* : lane 14, *S. sanguis* with *CfoI* : lane 15, *S. sanguis* with *DdeI*.

Fig. 16. RFLP of 16S rDNA of *S. sanguis*(9), *S. mitis*(11), *S. intermedius*(12), *S. uberis*(13) by *AvaII* and *BstNI*. M1, *BstNI*-digested pBR322 DNA M2, *HaeIII* Φ -X174 DNA Lane 1, undigested 16S rDNA of *S. sanguis* : lane 2, *S. sanguis* digested with *AvaII* : lane 3, *S. sanguis* with *BstNI* : lane 4, undigested 16S rDNA of *S. mitis* : lane 5, *S. mitis* with *AvaII* : lane 6, *S. mitis* with *BstNI* : lane 7, undigested 16S rDNA of *S. intermedius*. lane 8, *S. intermedius* with *AvaII* : lane 9, *S. intermedius* with *BstNI* : lane 10, undigested 16S rDNA of *S. uberis* : lane 11, *S. uberis* with *vaII* : lane 12, *S. uberis* with *BstNI*.

Fig. 17. RFLP of 16S rDNA of *E. faecalis*(8), *S. sanguis*(9), *S. mitis*(11), *S. intermedius*(12) and *S. uberis*(13) digested with *BstNI* and *ScrFI*. M1, *BstNI*-digested pBR322 DNA M2, *HaeIII*-digested Φ -X174 DNA Lane 1, *E. faecalis* digested with *BstNI* lane 2, *E. faecalis* with *ScrFI*, lane 3, *S. sanguis* with *BstNI*, *S. sanguis* with *ScrFI* : lane 5, *S. mitis* with *BstNI* : lane 6, *S. mitis* with *ScrFI* : lane 7, *S. intermedius* with *BstNI* : lane 8, *S. intermedius* with *ScrFI* : lane 9, *S. uberis* with *BstNI* : lane 10, *S. uberis* with *ScrFI*.

Fig. 18. RFLP of 16S rDNA of *S. uberis*(1), *S. uberis*(13), *S. intermedius*(2), *S. intermedius*(12), *S. sanguis*(7), *S. sanguis*(9) digested with *CfoI*. Lane M1, *BstNI*-digested pBR322 DNA M2, *HaeIII*-digested Phi-X174 DNA.

FIG 2

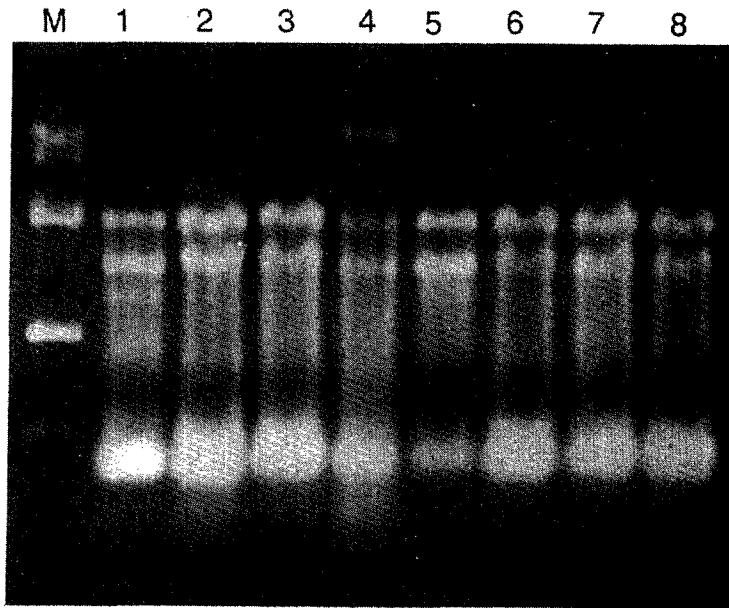


FIG 3

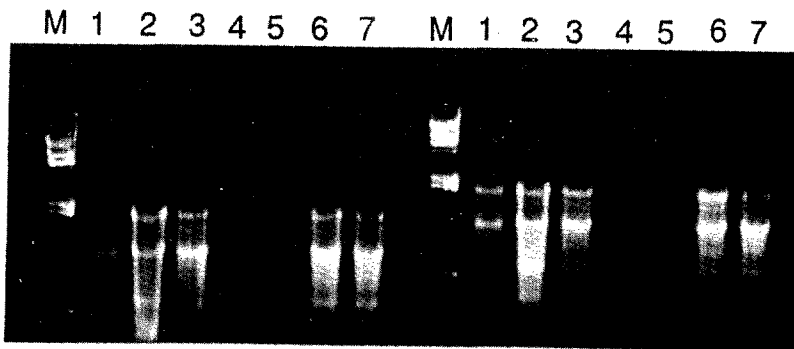


FIG 4

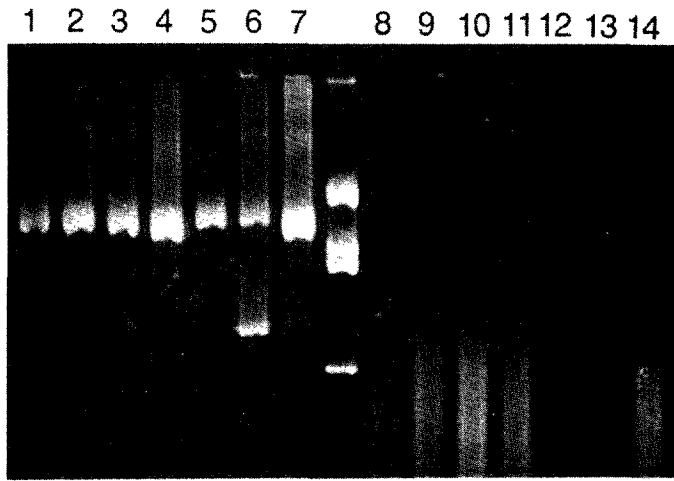


FIG 5

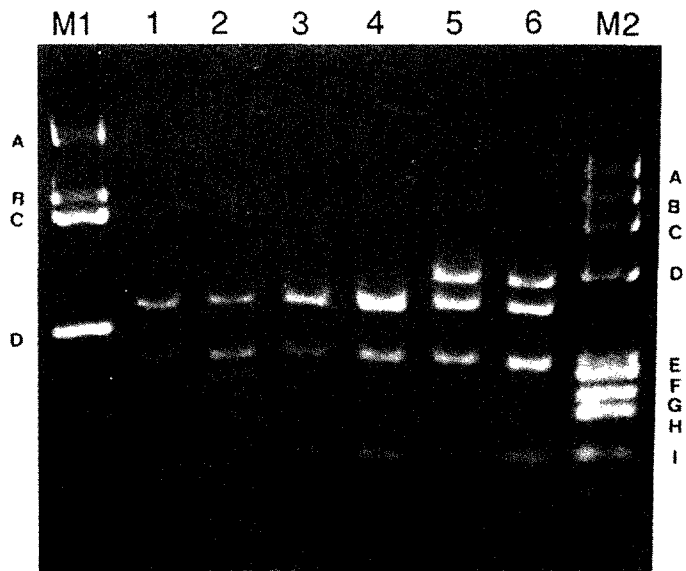
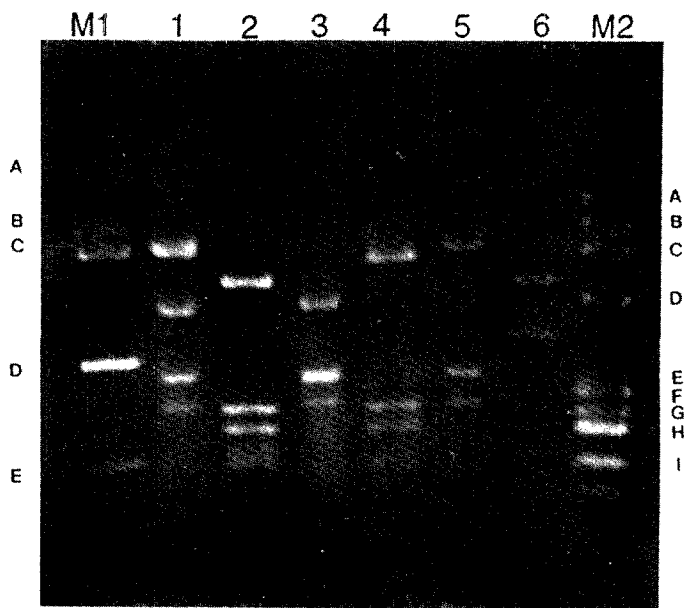


FIG 6



SFIG 7

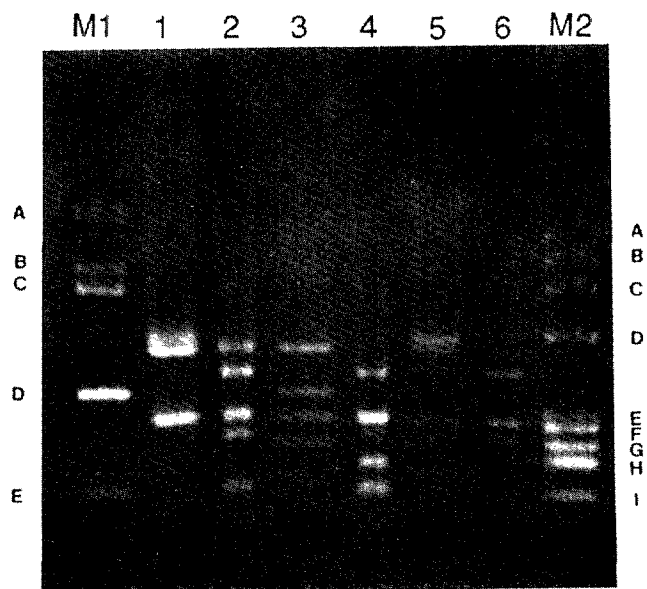


FIG 8

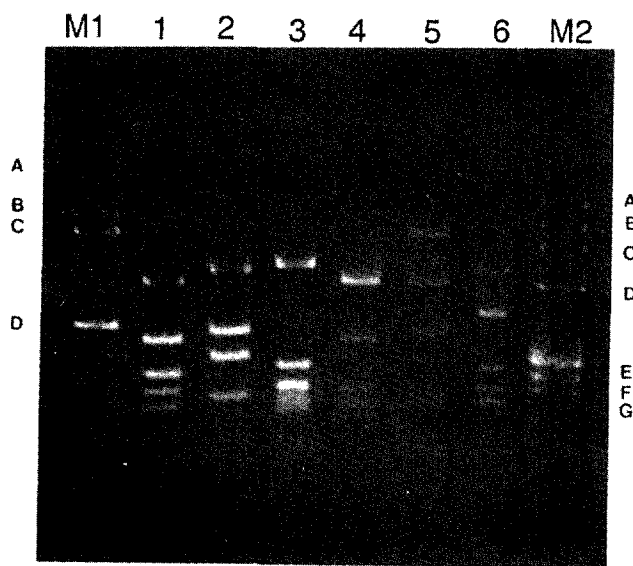


FIG 9

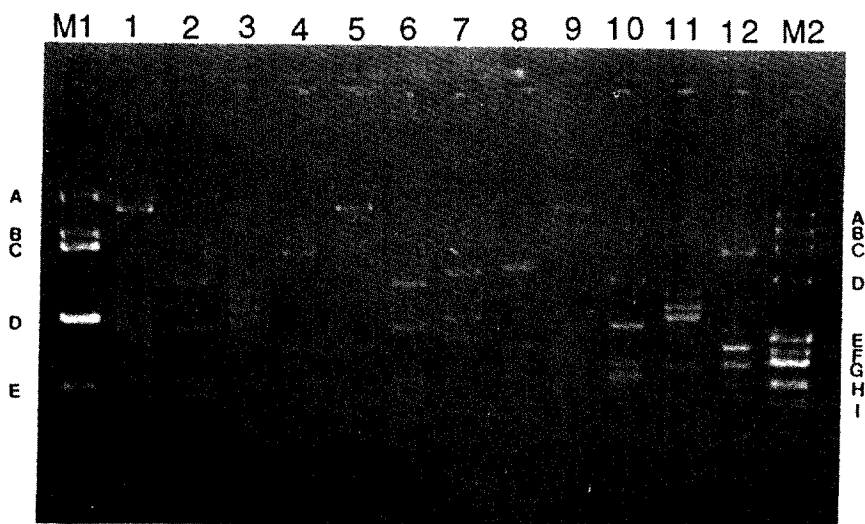


FIG 10

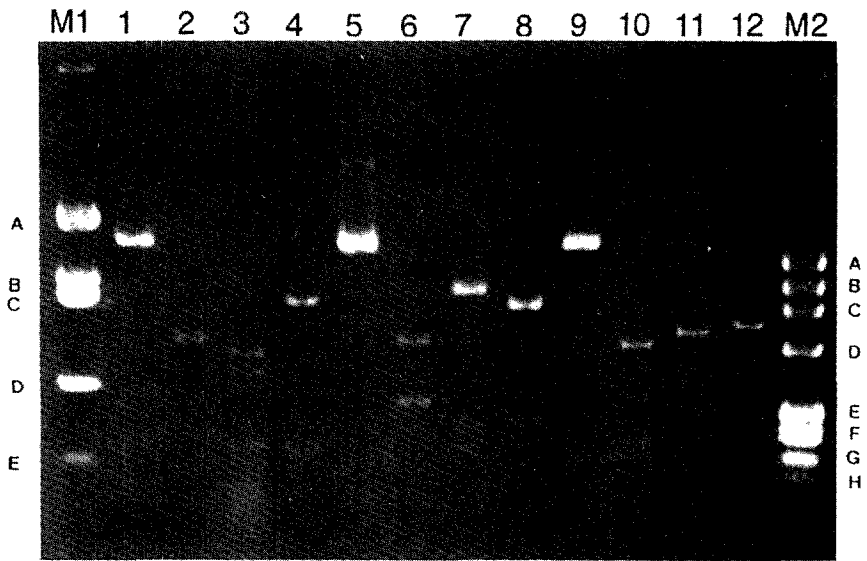


FIG 11

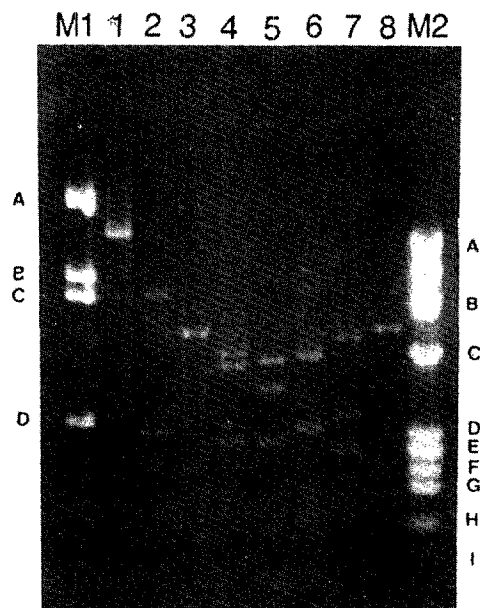


FIG 12

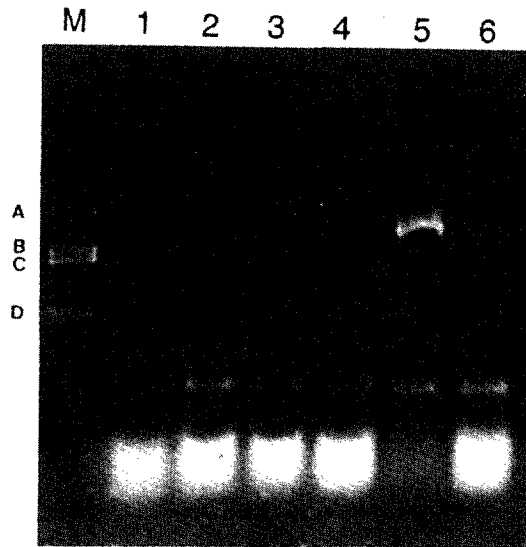


FIG 13

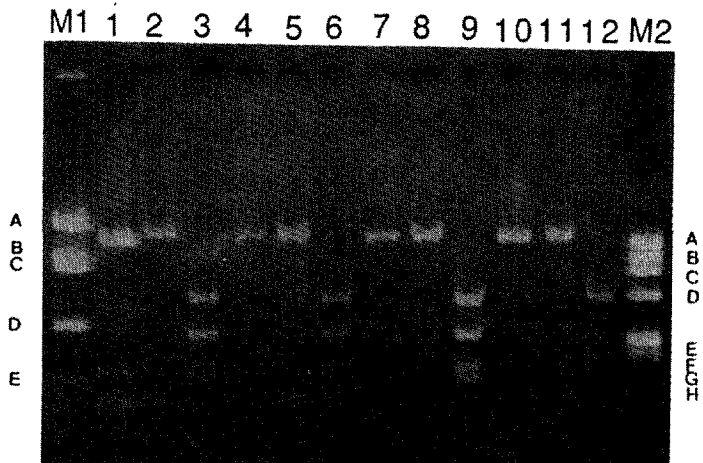


FIG 14

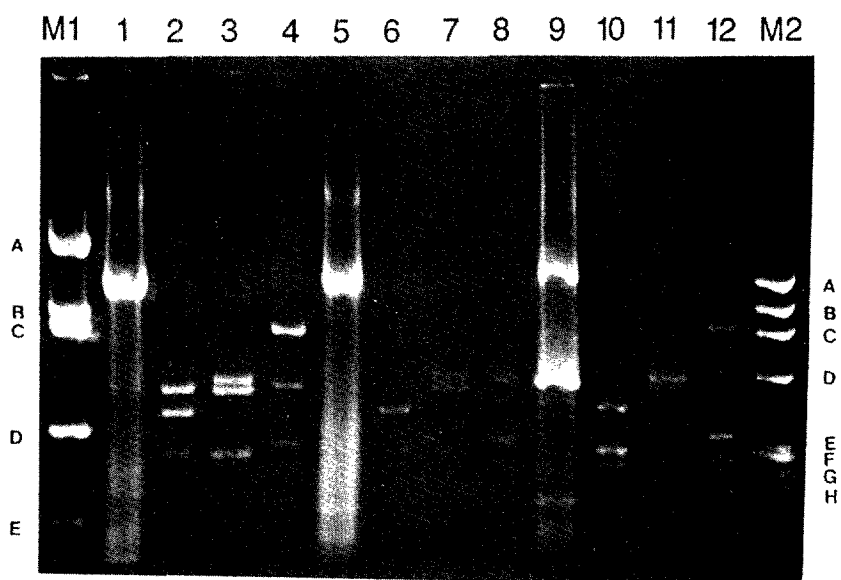


FIG 15

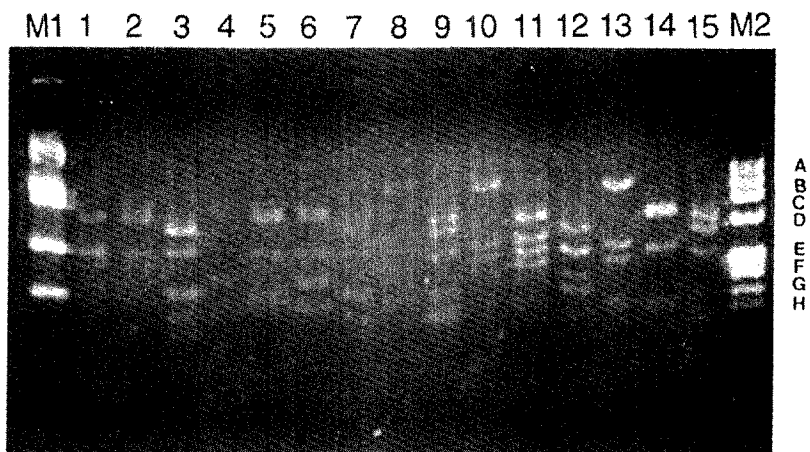


FIG 16

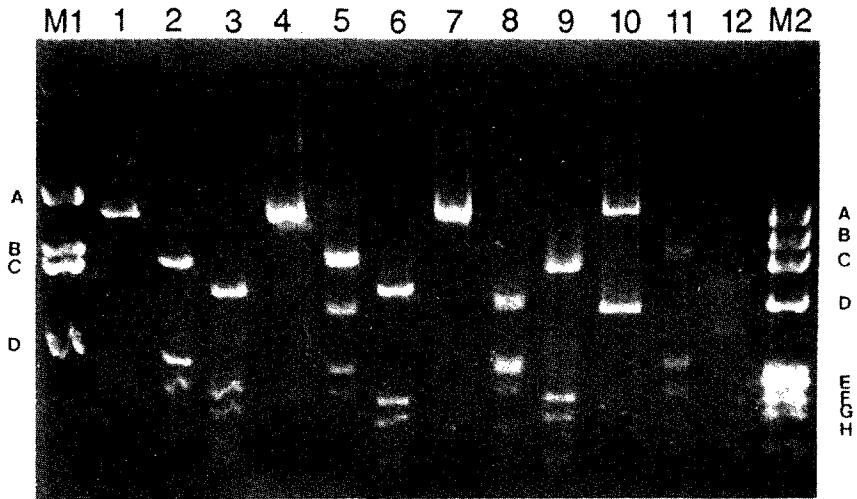


FIG 17

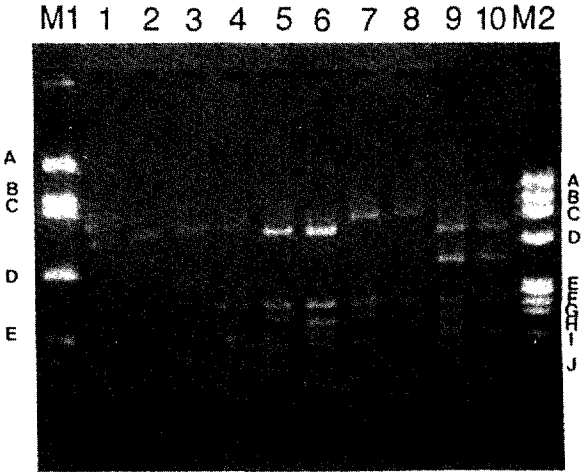


FIG 18

