

Propidium monoazide와 real-time PCR을  
이용한 살아있는 *Enterococcus faecalis*의  
선택적인 검출

연세대학교 대학원

치 의 학 과

김 신 영

Propidium monoazide와 real-time PCR을  
이용한 살아있는 *Enterococcus faecalis*의  
선택적인 검출

지도 정 일 영 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2008년 6월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

김 신 영

# 김신영의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2008년 6월 일

## 감사의 글

이번 논문을 준비하며 실험실에서 보낸 지난 몇 달 동안이 저의 인생에 있어서 가장 힘들었지만 값진 시간이 아니었나 생각합니다.

먼저 논문의 처음 시작부터 끝까지 부족한 저에게 도움과 조언을 아끼지 않으셨던 정일영 선생님께 진심으로 감사드립니다. 또한 수련기간 동안 정신적으로 크게 의지가 되어 주신 이찬영 선생님과, 저에게 생소했던 미생물 분야의 실험을 꼼꼼히 살펴 완성도 높은 논문을 작성하도록 도와 주신 정한성 선생님께도 깊은 감사를 드립니다. 뿐만 아니라 저의 수련생활에 버팀목이 되어주신 이승중 선생님, 노병덕 선생님, 박성호 선생님, 김의성 선생님, 박정원 선생님, 공형규 선생님, 신수정 선생님께 감사드립니다.

그동안 같이 생활하면서 정들었던 2년차 선생님들과, 앞으로 든든하게 보존과를 꾸려나갈 1년차 선생님들에게도 고마운 마음을 전합니다. 특히, 3년 동안 같이 수련을 받으며 기쁘고 힘든 일들을 함께 한 수련동기들이 있었기에 이 논문이 있을 수 있었다고 생각합니다.

마지막으로, 옆에서 한결같이 저를 응원해 준 남편과 오늘의 제가 있게 한 부모님, 시부모님과 함께 이 기쁨을 나누고 싶습니다.

2008년 6월  
저자 씀

# 차 례

그림 및 표 차례.....	ii
국문 요약.....	iii
<b>I. 서론</b> .....	1
<b>II. 재료 및 방법</b> .....	5
1. PMA의 효과 검증.....	5
2. Real-time PCR의 적용 가능성.....	8
3. 2% CHX의 <i>E. faecalis</i> 에 대한 살균 효과.....	8
<b>III. 결 과</b> .....	11
1. PMA의 효과 검증.....	11
2. Real-time PCR의 적용 가능성.....	13
3. 2% CHX의 <i>E. faecalis</i> 에 대한 살균 효과.....	14
<b>IV. 고 찰</b> .....	16
<b>V. 결 론</b> .....	22
참고 문헌.....	23
Abstract.....	27

## 그림 차례

<b>Figure 1.</b> Ct value measured by real-time PCR after serial dilutions of <i>E.faecalis</i> .....	11
<b>Figure 2.</b> Effect of PMA on the amplification of different ratios of viable and dead <i>E. faecalis</i> .....	13
<b>Figure 3.</b> Correlation of relative difference measured by real-time PCR and log CFU by plate counting .....	14
<b>Figure 4.</b> Monitoring exposure of <i>E. faecalis</i> to increasing time periods of 2% Chlorhexidine .....	15

## 표 차례

<b>Table 1.</b> Primers used for quantification of genomic DNA from <i>E. faecalis</i> .....	7
--	---

## 국문 요약

# Propidium monoazide와 real-time PCR을 이용한 살아있는 *Enterococcus faecalis*의 선택적인 검출

세균의 검출에 있어서 polymerized chain reaction (PCR) 방법은 기존의 plate counting과 달리 빠르게 세균을 검출할 수 있다. 하지만 세균이 죽은 후에도 DNA는 장기간 존재할 수 있기 때문에, DNA에 기초한 분석은 살아있는 세균과 죽은 세균을 구분할 수 없다. 최근에 DNA extraction전에 propidium monoazide (PMA)를 처리하여 살아있는 세균만 선택적으로 검출하는 방법이 제시되었다. PMA는 손상된 세포막만 통과하여 죽은 세포의 DNA와 빛 노출 하에서 결합하여 PCR이 증폭되는 것을 막는다.

*Enterococcus faecalis*는 근관치료의 실패에 있어서 중요한 원인이 되는 세균으로 제시되어 왔다. 그리고 chlorhexidine (CHX)은 *E. faecalis*의 제거에 있어서 효과적인 약제임이 밝혀졌다.

이번 실험의 목적은 세균 수의 측정에 있어서, PMA 처리와 real-time PCR 방법의 적용 가능성을 기존의 plate counting과 비교하여 알아보는 것이다. 또한 *E. faecalis*에 대한 2% CHX의 살균 효과를 PMA 처리 후 real-time PCR

방법을 사용하여 알아보는 것이다.

실험 방법으로 먼저 살아있는 세균과 죽은 세균을 다른 비율로 섞어서 PMA를 처리한 후 real-time PCR을 시행하여 PMA가 빛 노출 하에서 죽은 세균의 DNA와 결합하는 효과를 나타내는지 알아보았다. 다음으로 PMA 처리 후 real-time PCR 방법을 이용하여 살아있는 세균의 양을 측정하는 것을 plate counting으로 얻은 CFU와 비교하였다. 마지막으로 2% CHX의 처리시간을 다르게 하였을 때 *E. faecalis*에 대한 살균 효과를 PMA 처리 후 real-time PCR 방법을 사용하여 알아보았다.

실험 결과로 살아있는 *E. faecalis*의 비율이 감소할수록 Ct value는 증가하였다. 그리고 PMA 처리 후 real-time PCR 방법을 이용하여 세균의 양을 측정하는 것과 plate counting으로 얻은 CFU 사이에는 Optical density (OD) 값이 1.0일 때까지는 상관관계가 있었다. 하지만 OD 값이 1.5일 때는, PMA를 처리한 후 real-time PCR을 시행했을 때 측정된 살아있는 세균의 양이 감소하였음에 반해서 plate counting에 의한 CFU는 계속 증가하였다. 마지막으로 2% CHX을 오래 적용할수록 살아있는 *E. faecalis*의 상대적인 양이 감소하는 것을 PMA 처리와 real-time PCR 방법을 이용해 확인하였다.

이번 연구를 통해 첫째로 PMA 처리 방법은 죽은 세균을 제외하고 살아있는 세균만 선택적으로 검출한다는 것을 알 수 있었다. 둘째로 기존의 plate counting의 대체 방법으로써 PMA 처리와 real-time PCR 방법을 적용하는



것이 가능하지만, OD 값이 1.5 이상일 때는 한계가 있다. 셋째로 *E. faecalis*에 대한 CHX의 살균 능력에 있어서, starvation phase 때의 *E. faecalis*의 제거를 위해서 2% CHX의 장시간 적용이 필요하다.

---

핵심되는 말 : *E. faecalis*, real-time PCR, propidium monoazide, chlorhexidine

Propidium monoazide와 real-time PCR을  
이용한 살아있는 *Enterococcus faecalis*의  
선택적인 검출

<지도교수 : 정 일 영>

연세대학교 대학원 치의학과

김 신 영

## I. 서 론

살아있는 세균의 양을 정확하게 측정하는 것은 매우 어려운 일이다. 전통적으로 세균의 검출은 plate counting을 비롯한 다른 cultivation-based approach를 통해서 이루어졌다. 그러나 이런 방법은 시간 소모적이고 배지의 선택이나 대사 활성도, 술자의 경험에 따라 편차가 생길 수 있다. 대조적으로 polymerized chain reaction (PCR) 방법에 따른 검출은 배양 가능한 세균과 배양 불가능한 세균을 모두 빠르게 검출할 수 있다 (Williams et al., 2006).

하지만 PCR 방법은 살아있는 세균과 죽은 세균을 구분하지 못하기 때문에, 검출된 세균이 현재 살아있는 세균인지 아니면 살아있다가 후에 죽은 세균인지 구분하는 것이 불가능하다. 세포가 죽은 후에도 세균의 DNA는 장기간 동안 존재할 수 있기 때문에 (Young et al., 2007; Josephon et al., 1993) 죽은 세균의 DNA가 일부분이 남아서 PCR에 의해 검출되고 증폭될 수 있다. 따라서 DNA에 기초한 세균 수의 측정은 과측정되거나 허위 양성반응의 결과가 나타날 수 있다.

최근에 Nocker 등 (2007)은 DNA 추출 전에 propidium monoazide (PMA)를 세균 표본에 처리하면 살아있는 세균만 선택적으로 검출할 수 있다고 주장하였다. 이 방법의 원리는 세균 세포막의 완전함에 있는데 PMA는 손상된 세포막만 통과하여 들어갈 수 있는 염료이기 때문이다. 그 후 PMA의 azide group은 빛 노출 하에서 죽은 세포의 DNA와 공유 결합을 하게 된다. 따라서 PMA 방법은 빠르고 간단하게 완전한 세포막을 가진 세균의 DNA만 한정적으로 분석할 수 있다.

성공적인 근관치료를 위해서는 근관내의 세균을 완전히 제거하는 것이 필요하다. 근관내의 세균을 제거하기 위해서는 file을 이용한 기계적인 제거 뿐만 아니라 약제를 이용한 화학적인 제거도 필요하다. 여러 임상연구들에 의하여 수산화칼슘 등이 효과적인 약제로써 추천되었고 널리 사용되어 왔다. 그러나 최근에는 *Enterococcus faecalis*와 같이 약제에 저항성이 있는 세균이

밝혀졌고, 이런 세균이 피사된 치수에서 근관치료의 실패에 중요한 원인 인자로 생각되고 있다. Molander 등 (1998)은 치근단 병소가 있는 근관치료된 치아의 32%에서 *E. faecalis*를 발견하였으며, Möller (1966)는 29%, Sundqvist 등 (1998)도 38%의 *E. faecalis*를 치근단 병소가 있는 근관치료된 치아에서 배양할 수 있었다. 또한 재발한 치근단 질환을 가진 한국인의 치아에서 배양한 세균을 살펴본 연구에서, 가장 많이 발견된 세균이 *E. faecalis*이며 전체의 64%를 차지하고 있었다 (Rôças et al., 2004). *E. faecalis*에 대한 관심은 이들이 통상적인 근관내 약제인 수산화칼슘에 저항성을 가지기 때문에 더욱 높아졌는데, 이러한 사실은 여러 연구가에 의해서 실험적으로 밝혀졌다 (Haapasalo and Orstavik, 1987). *E. faecalis*의 제거를 위해 chlorhexidine (CHX)이 사용된 것은 실험을 통해 효과가 밝혀진 이후부터인데, CHX은 넓은 범위의 항균성을 가지며, 상아질 상에 결합하여 장기간 효과를 가져온다고 알려졌기 때문이다.

약제의 효과와 연관하여 또 다른 고려해야 할 사항은 근관내에서 세균은 biofilm을 형성하며 존재하여 약제에 대한 저항성을 가진다는 사실이다 (Wilson et al., 1996). Mah 등 (2002)은 이러한 저항성은 다당류 기질이 물리적, 화학적으로 항생제의 확산을 막고 세균자체도 제한된 영양분에 의해 천천히 자라기 때문에 대사활동이 저하되어 항생제에 저항성을 가진다는 가설을 제시하였다. 이러한 biofilm의 약제에 대한 저항성에 대한 연구들 중에

Lima 등 (2001)은 *E. faecalis* biofilm의 CHX에 대한 저항성이 통상의 planktonic 상태의 세균보다 높다는 실험 결과를 제시했다. *E. faecalis*의 약제에 대한 저항성 및 biofilm 상태의 세균이 가지는 저항성을 생각한다면, 이러한 세균들에 의해 발생하는 근관치료의 실패 가능성에 대하여 인지하고 이를 제거하기 위한 전략적 접근이 필요하다.

이번 연구의 목적은 세균 수의 측정에 있어서, PMA 처리와 real-time PCR 방법의 적용 가능성을 기존의 plate counting 방법과 비교하여 알아보는 것이다. 또한 *E. faecalis*에 대한 2% CHX의 살균 효과를 PMA 처리 후 real-time PCR 방법을 사용하여 알아보는 것이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. PMA의 효과 검증

#### 1.1 세균 표본의 준비

*E. faecalis*를 표본으로 사용하였다. Blood Heart Infusion (BHI) agar plate에서 한 개의 colony를 채취하여 10 ml BHI broth에 접종한 후, 섭씨 37도에서 12시간 동안 배양하였다. 배양된 suspension에서 100 µl를 덜어내어 20 ml BHI broth에서 재배양하였다. 이후 optical density (OD at 600nm) 값이 1.0에 도달할 때의 suspension을 덜어내어 살아있는 세균으로 준비하였다. 또한 *E. faecalis*를 2% CHX을 이용하여 40분간 처리하여 완전히 죽은 세균으로 준비하였다. 이는 예비 실험에서 plate counting을 통해 세균이 모두 죽을 때의 시간을 측정 한 후 시행한 것이다. 2% CHX은 20% chlorhexidine gluconate (Sigma Co., St. Louis, U.S.A.)를 10배 희석하여 사용하였다. 이후 죽은 세균을 살아있는 세균과 적절한 비율로 섞어서 살아있는 세균의 양이 전체의 0%, 0.1%, 1%, 10%, 100%가 되도록 하였다.

#### 1.2 Propidium monoazide crosslinking

Propidium monoazide (PMA)(phenanthridium, 3-amino-8-azido-5-[3-(diethylmethyl ammonio)propyl]-6-phenyl dichloride; Biotium Inc., Hayward C.A., U.S.A.)는 20%의 dimethyl sulfoxide (DMSO) (Ducksan Pure Chemicals Co., Ansan, Korea)에 녹

여서 20 mM로 몰농도를 맞춘 후, 섭씨 -20도에서 보관하였다. 각 표본을 500 µl씩 1.5 ml eppendorf tube에 옮겼다. 1.25 µl의 PMA를 처리하여 최종 몰농도를 50 µM이 되도록 했다. 이후 은박지를 eppendorf tube에 싼 후 5분 동안 shaker위에서 incubation 하였다. 650W halogen light (sealed beam lamp, DWE 41667, 110V, 3200K, GE Lighting, General Electric Co., U.S.A.)를 이용하여 표본에 2분 동안 빛을 노출시켰다. 표본은 과도한 열을 피하기 위하여 얼음 위에 수평으로 눕히고, halogen light로부터 20 cm의 거리를 유지하도록 하였다. 빛에 의한 crosslinking이 일어난 후에, 표본은 8000 rpm으로 5분 동안 원심 분리하여 상부의 액을 제거한 후 PBS로 처리하였다.

### 1.3 DNA extraction

DNA는 *AccuPrep*<sup>®</sup> Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer Co., Daejeon, Korea)를 이용하여 추출하였다. Proteinase K를 1.5 ml eppendorf tube에 20 µl씩 넣고 여기에 준비한 표본을 200 µl씩 넣은 후, Binding buffer를 200 µl 넣고 즉시 vortexing을 하여 섞었다. 10분 동안 섭씨 60도에서 incubation한 후, 100 µl의 Isopropanol (Duksan Pure Chemicals Co., Ansan, jKorea)을 넣고 pipet을 이용하여 섞었다. 액을 Binding column tube로 옮긴 후, 8000 rpm으로 1분 동안 원심분리 하였다. Binding column tube를 새로운 2 ml tube로 옮긴 후, Washing buffer 1을 500 µl 처리한 후, 8000 rpm으로 1분 동안 원심분리 하였다. 하부의 액을 버린 후, Washing buffer 2를 500 µl 처리하고 다시 원심분리 하였다. Binding column

tube를 새로운 1.5 ml tube로 옮긴 후, Elusion buffer를 200  $\mu$ l 처리하고 상온에서 5분 동안 기다렸다. 8000 rpm으로 1분 동안 원심분리 하였다.

#### 1.4 Real-time PCR

Real-time PCR과 data분석은 MiniOpticon Real-Time PCR System (Bio-Rad Co., California, U.S.A.)을 이용하여 시행하였다. Cycle threshold (Ct) value는 MiniOpticon에 의해 자동적으로 계산되었다. 1  $\mu$ l의 추출된 genomic DNA에 19  $\mu$ l의 PCR mixture를 넣은 후 pipet을 이용하여 잘 섞었다. PCR mixture는 SYBR Green (iQ<sup>TM</sup>SYBR<sup>®</sup> Green Supermix, Bio-Rad, California, U.S.A.)과 10 pmol의 두 개의 primer (Bioneer Co., Daejeon, Korea), 그리고 멸균증류수를 포함한다. Quantification을 위해 사용된 primer는 Table 1과 같다. *E. faecalis*를 quantification 하기 위한 cycling 순서는 다음과 같이 진행하였다. 먼저 섭씨 95도에서 10분간 유지하였다. 이후 섭씨 95도에서 30초, 섭씨 57도에서 30초, 섭씨 72도에서 30초를 45 cycles를 반복하였다. 마지막으로 72도에서 5분간 유지하였다. Melting curve의 분석은 섭씨 0.2도 간격으로 섭씨 65도에서부터 95도까지 상승시켰다. 이후 섭씨 30도에서 5분간 유지하였다.

**Table 1** Primers used for quantification of genomic DNA from *E. faecalis*

Strain	Primer name	Primer sequence
<i>E. faecalis</i>	EF-Forward	TCG GTG ATT AAC CCT CGT CA
	EF-Reverse	ACG GAG ATA ACA CCG GAA CC



## 2. Real-time PCR의 적용 가능성

### 2.1 Real-time PCR

BHI agar plate에서 한 개의 colony를 채취하여 10 ml BHI broth에 접종한 후, 섭씨 37도에서 12시간 동안 배양하였다. 배양된 suspension에서 100  $\mu$ l를 덜어내어 20 ml BHI broth에서 재배양하였다. 이후 주기적으로 OD 값을 측정하여 각 OD 값에 해당하는 suspension을 500  $\mu$ l씩 두 개 준비하여 1.5 ml eppendorf tube에 옮겼다. 준비된 500  $\mu$ l의 표본 중에 하나에만 1.25  $\mu$ l의 PMA를 처리한 후, 위에 제시한 방법대로 PMA crosslinking을 시행하고 DNA extraction을 한 후에 real-time PCR을 시행하였다.

### 2.2 Plate counting

각 OD 값에 해당하는 suspension을 덜어내어 이들을 각각 10배의 연속희석을 시행하고, 희석된 sample들을 BHI agar plate에 20  $\mu$ l씩 세 부위에 나누어 접종한 후 섭씨 37도에서 배양하였다. 24시간 후에 colony의 수를 세어 정리한 후, 1 ml 안에 있는 colony의 수로 환산하였고 log CFU로 표시하였다.

## 3. 2% CHX의 *E. faecalis*에 대한 살균 효과

### 3.1 세균 표본의 준비

BHI agar plate에서 한 개의 colony를 채취하여 10 ml BHI broth에 접종한 후,

접씨 37도에서 12시간 동안 배양하였다. 배양된 suspension에서 100  $\mu$ l를 덜어내어 20 ml BHI broth에서 재배양하였다. 이후 OD 값을 1.0이 되도록 조정하여, 이 때의 suspension을 표본으로 사용하였다.

### 3.2 *E. faecalis* biofilm의 재현

*E. faecalis*의 biofilm은 멸균된 membrane filters (0.2  $\mu$ l pore size, 13mm diameter; Whatman International Ltd., Maidstone, U.K.)를 사용하여 형성하였다 (Abdullah et al., 2005). BHI agar plate 상에 membrane filters를 올려놓고 OD 값이 1.0으로 조정된 suspension을 90  $\mu$ l 접종하였다. 접종 후에 10분 정도 건조시킨 후, 접씨 37도에서 3일 동안 배양하였다. 이는 starvation phase의 *E. faecalis*를 만들기 위해서 시행한 것이다 (Portenier et al., 2005).

### 3.3 CHX의 처리

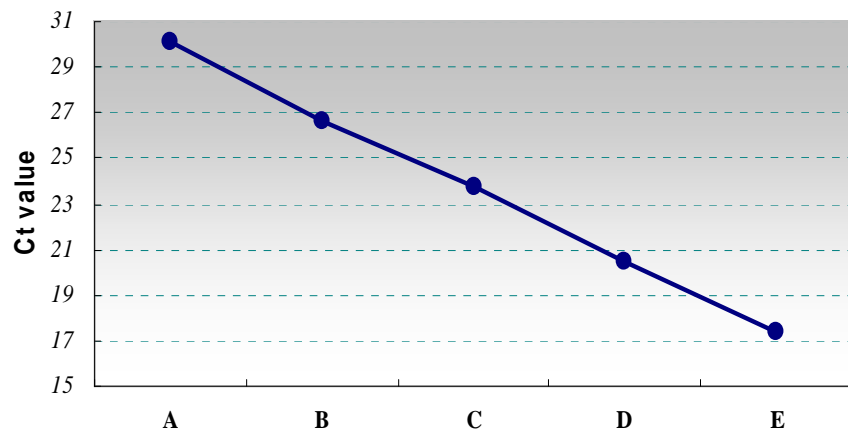
Membrane filter를 3 ml PBS가 담긴 tube로 옮긴 후, membrane filter상의 세균을 떨어지게 하기 위해서 1분간 vortexing을 시행하였다. 이중에서 500  $\mu$ l씩 따로 덜어내어 1.5 ml eppendorf tube에 옮긴 후, 8000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 상부의 액을 제거하였다. 각각 2% CHX을 1 ml씩 5분, 15분, 30분, 40분 동안 처리하고, 대조군으로 PBS를 1 ml 처리한 것을 사용하였다. 이후 원심분리하여 상부의 액을 제거한 후에 CHX inactivating agent를 1 ml씩 10분간 처리하였다. CHX inactivating agent는 TWEEN<sup>®</sup> 80 (Sigma Co., St. Louis., U.S.A.) 3

ml을 0.43%의 멸균된 식염수 97 ml에 용해하여 사용하였다 (Zamany et al., 2002). 이후 위에 제시한 방법대로 PMA crosslinking을 시행하고 DNA extraction을 한 후에 real-time PCR을 시행하였다.

### III. 결 과

#### 1. PMA의 효과 검증

먼저 섭씨 37도에서 12시간 동안 배양한 *E. faecalis*를 단계적으로 10배의 연속희석을 시행하였다. 각 표본을 DNA extraction 시행한 후에 real-time PCR을 시행하였다. 연속적으로 Ct value를 계산한 결과 (Fig. 1), 가장 높은 Ct value는 10<sup>5</sup>배 연속희석을 시행한 표본 A 에서 관찰되었고, 가장 낮은 Ct value는 10배 희석을 시행한 표본 E 에서 관찰되었다. 즉 *E. faecalis*의 양이 단계적으로 증가할수록 Ct value는 단계적으로 감소하였다. 이를 통해서 *E. faecalis*에 대한 primer도 잘 만들어졌고, real-time PCR의 시행 조건도 적절하다는 것을 확인할 수 있었다.



**Fig. 1** Ct value measured by real-time PCR after serial dilutions of *E. faecalis*

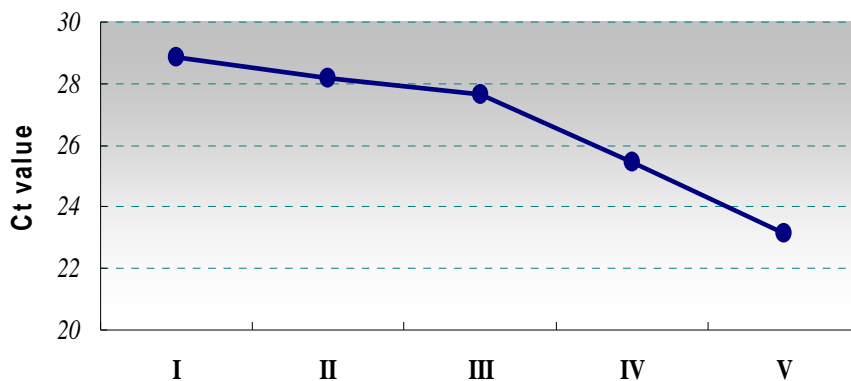
(A : 10<sup>5</sup> dilution, B : 10<sup>4</sup> dilution, C : 10<sup>3</sup> dilution, D : 10<sup>2</sup> dilution, E : 10 dilution)

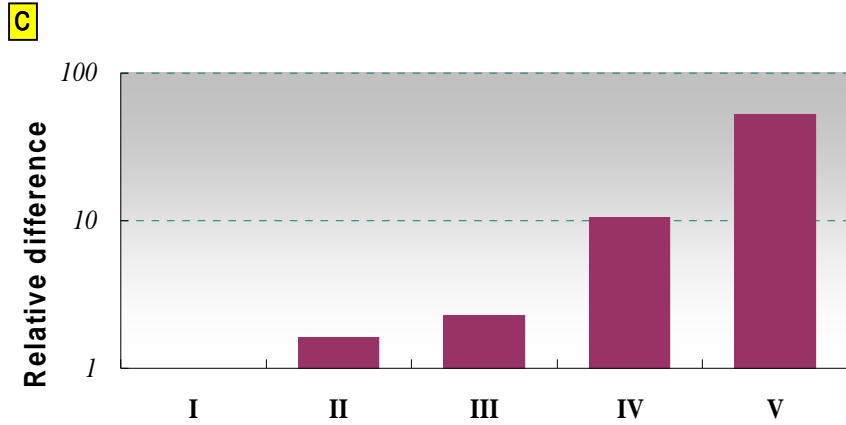
다음으로 살아있는 세균과 죽은 세균을 적절하게 다른 비율로 섞어서 (Fig. 2A) PMA를 처리한 후에 각 비율에 대한 real-time PCR을 시행하였다. 그 결과 살아있는 세균의 비율이 증가할수록, 즉 표본 I 에서 V 로 갈수록 Ct value는 단계적으로 감소하였고 (Fig. 2B), PCR 기계에서 나타난 세균의 relative difference는 단계적으로 증가하였다 (Fig. 2C). 표본 I 의 경우에는 죽은 세균만 존재하기 때문에 relative difference가 거의 없는 것으로 나타났고, 표본 V 에서는 살아있는 세균만 존재하기 때문에 relative difference가 가장 많이 나타났다. 이를 통해 PMA가 죽은 세균과 crosslinking이 일어나서, 살아있는 세균만 선택적으로 검출되는 것을 확인할 수 있었다.

**A**

	I	II	III	IV	V
Viable <i>E. faecalis</i> (μl)	0	0.5	5	50	500
Dead <i>E. faecalis</i> (μl)	500	499.5	495	450	0
Viable bacteria (%)	0	0.1	1	10	100

**B**





**Fig. 2** Effect of PMA on the amplification of different ratios of viable and dead *E. faecalis* (A : Table showing mixing ratios of viable and dead *E. faecalis*, B : Ct value of amplified genomic DNA shown as a function of the percentage of viable *E. faecalis*, C : Relative difference of viable *E. faecalis* measured by real-time PCR)

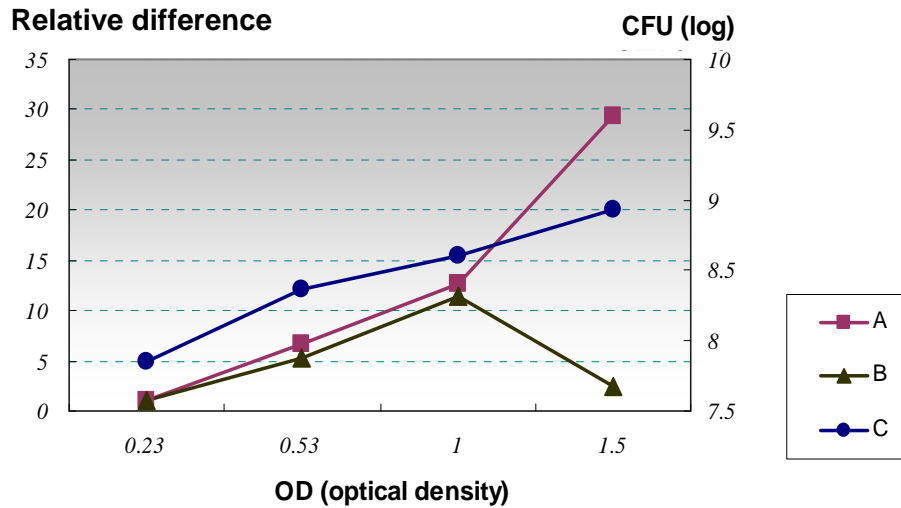
## 2. Real-time PCR의 적용 가능성

시간에 따라 OD 값을 측정한 결과 OD 값이 0.5일 때부터 1.0일 때까지 세균이 급속하게 성장하는 것을 알 수 있었다. 그리고 OD 값이 1.0부터 1.5에 도달할 때까지는 세균의 성장 속도가 저하되었다.

각 OD 값을 시간에 따라 측정하여 OD 값이 0.23, 0.53, 1.0, 1.5일 때의 표본을 구하여 real-time PCR을 시행한 결과, OD 값이 1.0일 때까지는 PMA를 처리한 것 (Fig. 3A)과 처리하지 않은 것 (Fig. 3B) 사이에 살아있는 세균의 relative difference가 거의 비슷하게 나타났다. OD 값이 1.5일 때의 표본에서는

PMA를 처리한 것과 처리하지 않은 것 사이에 유의할 만한 차이가 나타났다.

각 OD 값에서의 log CFU를 비교해 볼 때는, OD 값이 커질수록 세균의 수가 점차적으로 증가함을 알 수 있었다.

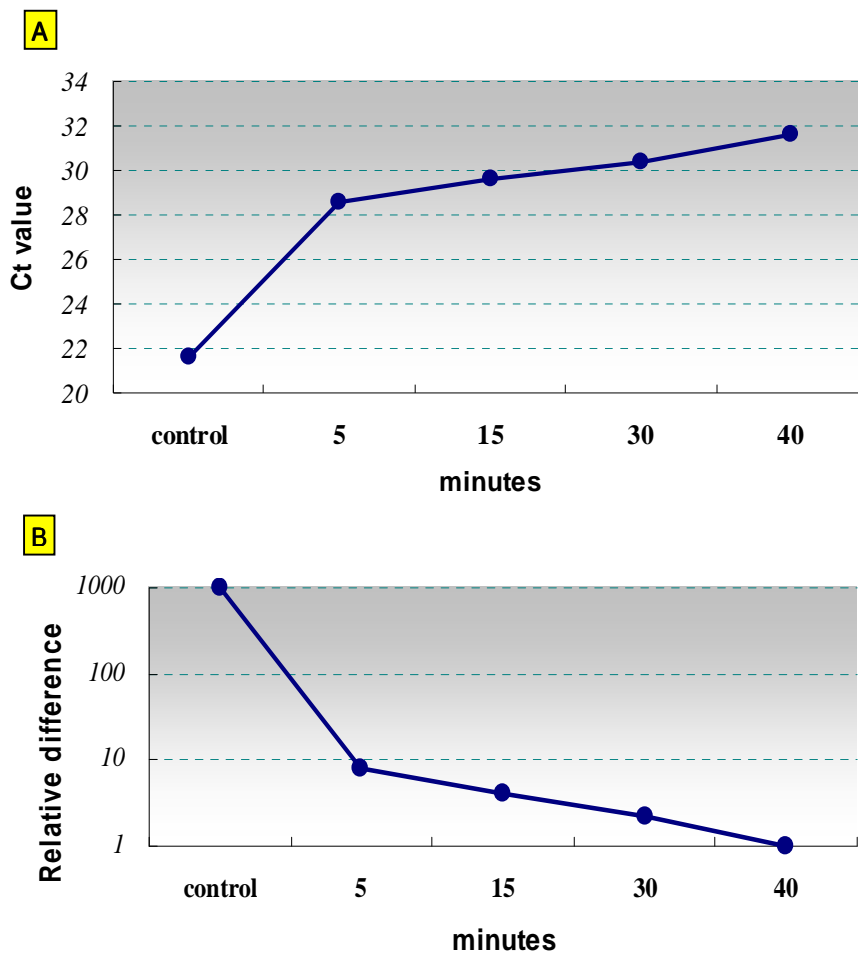


**Fig. 3** Correlation between relative difference measured by real-time PCR and log CFU by plate counting (A : Relative difference of non-PMA treated *E. faecalis* at each optical density, B : Relative difference of PMA treated *E. faecalis* at each optical density, C : Log CFU by plate counting at each optical density)

### 3. 2% CHX의 *E. faecalis*에 대한 살균 효과

2% CHX을 5분, 15분, 30분, 40분 동안 처리한 결과 Ct value가 점차 증가함을 알 수 있었고 (Fig. 4A), 살아있는 세균의 양은 감소하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 4B). 이는 CHX의 처리 시간이 증가할수록 죽은 세균이 많아져서 상대적으로 살아있는 세균의 양이 감소하는 것을 나타내는 것이다. 대조군과 비교하여 살아

있는 *E. faecalis*의 relative difference를 볼 때, CHX을 5분 동안 처리하였을 때에도 상당한 양의 세균이 죽는다는 것을 알 수 있었다. 그러나 완전한 세균의 사멸은 2% CHX을 40분 동안 처리한 경우에 나타났고, 이는 추가적으로 plate counting을 통해 CFU를 측정한 결과에서 확인할 수 있었다 (data not shown).



**Fig. 4** Monitoring exposure of *E. faecalis* to increasing time periods of 2% chlorhexidine (A : Increase of Ct values as increasing exposure time of 2% CHX, B : Decrease of relative difference of viable cells as increasing exposure time of 2% CHX)



## IV. 고찰

*E. faecalis*는 광범위한 항균, 항생제에 저항성을 가지는 동시에 재발하는 만성 치근단 치주염의 원인이 되는 세균이기 때문에 이번 연구에서 사용하였다.

먼저 *E. faecalis*에 대한 real-time PCR의 효과 검증을 시행하였다. OD 값이 1.0으로 조정된 *E. faecalis*를 단계적으로 희석하여 real-time PCR을 시행하였다. Fig. 1에 나타난 결과를 보면 세균이 약 10배 정도로 단계적인 양이 증가할수록 Ct value도 단계적인 차이를 나타냈다. MiniOpticon에 나타난 증폭곡선 그래프에서도 DNA 양이 많은 순서에서 적은 순서로 같은 간격으로 늘어선 증폭곡선이 얻어졌고, DNA 양이 많아질수록 같은 간격으로 감소하는 Ct value를 보였다. 이 결과로 보아서 *E. faecalis*에 대한 primer도 잘 만들어졌고 real-time PCR의 시행 조건도 적절하다는 것을 확인하였다.

따라서 다음단계로 PMA의 효과 검증을 시행하였다. Nocker 등 (2007)의 연구에 따르면 PMA와 quantitative PCR을 같이 사용하였을 때, 살아있는 세균만 선택적으로 검출되는 데 성공적인 결과를 보였다. 하지만 그의 연구에서는 *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* 0157:H7, *Mycobacterium avium* 등의 세균이 사용되었고, 어떤 연구에서도 *E. faecalis*를 이용하여 실험한 적은 없었다. 따라서 *E. faecalis*에서도 PMA와 죽은 세균이 반응하여, 살아있는 세균만 선택적으로 검출되는지를 확인하는 과정이 필요했다.

살아있는 세균의 비율이 단계적으로 10배의 차이가 나도록 Fig. 2A와 같이 살아있는 세균과 죽은 세균을 섞어서 실험하였다. 살아있는 세균의 비율을 10배 차이가 나도록 한 이유는 작은 양의 차이에서는 Ct value의 큰 차이가 없었기 때문이다. 살아있는 세균이 양이 10배 정도의 차이가 나도록 하였을 때 Ct value는 약 3 정도의 차이를 보였다 (Fig. 1). 위의 결과에서도 살아있는 세균의 양이 증가할수록 Ct value는 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2B). 물론 Ct value의 차이가 Fig. 1에서 나타난 차이만큼 크게 나타나지는 않았지만, 유의할만한 차이를 보이는 것을 알 수 있었다. 이를 통해 PMA가 빛 노출 하에서 죽은 세균과 crosslinking이 일어난 것이라고 추정할 수 있었고, PMA를 처리한 후 real-time PCR을 시행하는 것이 살아있는 *E. faecalis*만 선택적으로 검출할 수 있는 효과적인 방법이라는 것을 알 수 있었다.

다음으로 plate counting으로 얻어진 CFU가 real-time PCR을 통해 측정된 살아있는 세균의 relative difference와 연관되어 비교되었다. 각 OD 값은 세균의 양에 있어서 어느 정도의 차이를 만들기 위하여 약 0.2, 0.5, 1.0, 1.5의 값으로 정하였다. *E. faecalis* suspension 100 µl를 20 ml BHI broth에 넣은 후 약 3시간 30분 경과시에 OD 값이 0.23에 도달했고, 이후 급속히 증가하면서 5시간 경과시에 OD 값이 1.0에 도달했다. OD 값이 1.0에서 1.5로 도달할 때는 세균의 성장속도가 늦어서 많은 시간이 소요되었다. 약 7시간 경과시에 OD 값이 1.5에 도달하였다. PMA를 처리한 표본과 처리하지 않은 표본에서 세균의

relative difference의 차이를 비교해 보면 OD 값이 1.0에 도달할 때 까지는 어느 정도 비슷한 것을 알 수 있다. 따라서 OD 값이 증가하여 1.0에 도달할 때는 표본에 살아있는 세균이 대부분인 것으로 해석된다. 또한 OD 값이 1.0에서 1.5로 올라갈 때는 PMA를 처리하지 않은 표본은 계속 살아있는 세균의 relative difference가 증가하는 데 비해, PMA를 처리한 표본에서는 살아있는 세균의 relative difference가 확연히 감소하는 것이 관찰되었다. 이를 통해서 OD 값이 1.5일 때는 살아있는 세균과 죽은 세균이 함께 존재하며, 죽은 세균의 DNA가 PMA와 crosslinking이 일어나서 검출되지 않았다고 생각할 수 있다.

실험 결과에서 의문이 생긴 점은 CFU (Fig. 3C)는 OD 값이 1.5일 때 계속 증가하였음에 비해서 PMA를 처리한 표본의 relative difference (Fig. 3B)는 OD 값이 1.5일 때 많이 감소하였다는 점이다. PMA를 처리한 표본에서 살아있는 세균만 검출된다는 점을 생각해 보면, CFU와 PMA를 처리한 표본의 relative difference 사이에는 상관관계가 있어야 한다. 하지만 실제로 둘 사이에 OD 값이 1.5일 때 큰 차이를 보였다. CFU는 OD 값이 1.0일 때보다 1.5일 때 계속 증가하였다. 하지만 PMA를 처리한 표본의 real-time PCR에서 측정된 relative difference는 OD 값이 1.0일 때보다 1.5일 때 훨씬 많이 감소하였다. 즉, PMA 처리시에는 죽은 세균으로 판단되었던 것이 실제 배양을 해보면 배양이 된다는 결론을 내릴 수 있다. 이는 세균 세포막에 미세한 손상만 받아도 PMA가 세포막을 통과하여 real-time PCR 시행시에 증폭되지 않는데 반해, 배

양시에는 세포막이 일부 손상을 받았더라도 BHI agar plate를 통해 영양분이 공급되면 세포막이 회복되어 세균이 성장할 수 있기 때문에 추측된다. 하지만 투과성이 있던 세포막이 성공적으로 재생되는 경우는 보고된 적이 없으므로 이에 대한 연구가 추후 더 필요하리라고 생각된다.

아직까지 살아있는 세균만을 정확하게 검출할 수 있는 방법은 없다. Cultivation-based approach에서도 살아있는 세균이 배양이 안되는 현상 (viable but non-culturable)이 나타난다고 한다 (De Vos and Nelis, 2006). 따라서 살아있는 세균과 죽은 세균을 구분하는 것이 100% 정확할 수는 없고, 세균이 살아 있다는 것의 정의도 생식 증식 (reproductive growth), 대사 활성도 (metabolic activity), 세포막의 완전함 (membrane integrity)에 따라 달라질 수 있다. PMA 처리 방법 역시 세포막의 완전함에 따라 세균이 살아있는지 유무를 평가하게 되므로, 완전히 살아있는 세균만 100% 확실히 검출된다고 말하기에는 무리가 있을 것 같다.

*E. faecalis*에 대하여 CHX이 가지는 항균성은 Heling 등 (1992)에 의하여 이미 밝혀진 바 있으며, Lima 등 (2001)은 1일과 3일 동안 배양된 *E. faecalis* biofilm에 2% CHX을 처리하였을 때만 완전한 세균의 사멸을 관찰할 수 있었다고 하였다. 이번 연구에서도 3일 동안 membrane filters에서 배양한 *E. faecalis* biofilm에 2% CHX을 처리하였을 때에 살아있는 세균이 시간에 따라 점차적으로 감소함을 알 수 있었다. 3일 동안 세균을 배양한 것은 세균의 성

장곡선을 통해 starvation phase때의 세균을 만들기 위해서였고, 이 시기의 세균이 가장 저항성이 높아서 disinfectant에 의해 쉽게 제거되지 않기 때문이다 (Portenier et al., 2005). 이번 실험의 결과 2% CHX을 5분 동안 처리하였을 때에도 많은 양의 세균이 사멸했지만, 배양 후 CFU로 확인해 본 결과 CHX을 40분 동안 처리하였을 때 완전히 세균이 사멸하는 것을 알 수 있었다 (data not shown). 따라서 PMA 처리 후 real-time PCR을 시행할 때도 CHX을 40분 까지 처리하였고, 처리시간이 길수록 Ct value가 커지고 살아있는 *E. faecalis*의 relative difference가 감소하는 것을 확인하였다. 이를 통해서 disinfectant로 2% CHX을 사용하여 *E. faecalis*에 대한 살균 효과를 평가하는 데 있어서도, PMA 처리와 real-time PCR 방법을 적용하는 것이 가능하다고 하겠다.

이번 연구의 결과 첫째로 살아있는 *E. faecalis*의 비율이 감소할수록 Ct value는 증가하였다. 둘째로 PMA 처리 후 real-time PCR 방법을 이용하여 세균의 양을 측정하는 것과 plate counting으로 얻은 CFU 사이에는 OD 값이 1.0일 때까지는 상관관계가 있었다. 하지만 OD 값이 1.5 이상일 때는 한계가 있었다. 셋째로 2% CHX을 오래 적용할수록 살아있는 *E. faecalis*의 상대적인 양이 감소하는 것을 PMA 처리와 real-time PCR 방법을 사용하여 확인하였다.

PMA 처리와 real-time PCR 방법은 빠르고 간단한 방법으로 앞으로 DNA-based assay를 더욱 활발하게 할 것이다. 특히 기존의 PCR 방법이 살아있는 세균과 죽은 세균을 구분하지 못하고 함께 증폭시키는 반면, 이번

PMA를 이용한 연구 방법은 완전한 세포막을 가진 세균만 선택적으로 검출하여 증폭시킨다는 점에서 더욱 의미가 있다. 또한 PMA 처리와 real-time PCR 방법이 이전의 연구 (Nocker at al., 2007)와 달리, *E. faecalis*를 표본으로 사용하고 disinfectant로 CHX을 사용한 경우에도 성공적으로 적용됨을 확인할 수 있었다.

물론 PMA 처리시에 살아있는 세균의 상대적인 양과 배양에 의해 얻어진 CFU가 OD 값이 1.5일 때 여러 원인에 의해 직선적인 상관관계를 보이지는 않았다. 하지만 disinfectant에 노출된 후 세포막의 완전함을 평가하는 데에 있어서 PMA 처리방법이 빠르고 재현 가능한 방법임을 알 수 있었고, 그러므로 이는 plate counting의 대체 방법으로써 가치가 있을 것이다.

## V. 결 론

1. PMA 처리와 real-time PCR 방법을 이용하여 죽은 세균을 제외하고 살아있는 *E. faecalis*만 선택적으로 검출할 수 있다.
2. 기존의 plate counting 방법의 대체 방법으로써 PMA 처리와 real-time PCR 방법을 적용하는 것이 가능하지만, OD 값이 1.5 이상일 때는 한계가 있다.
3. Starvation phase의 *E. faecalis*를 제거하기 위해서 2% chlorhexidine의 장시간 적용이 필요하다.

## 참고 문헌

Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA : Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod* Jan 31(1): 30-6, 2005

De Vos MM, Nelis HJ : An improved method for the selective detection of fungi in hospital waters by solid phase cytometry. *J Microbiol Methods* 67: 557-565, 2006

Haapasalo M, Orstavik D : In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* Aug; 66(8): 1375-9, 1987

Heling I, Sommer M, Steinberg D, Friedman M, Sela MN : Microbiological evaluation of the efficacy of chlorhexidine in a sustained-release device for dentine sterilization. *Int Endod J* Jan; 25(1): 15-9, 1992

Josephson KL, Gerba CP, and Pepper IL : Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* Oct; 59(10): 3513-5, 1993

Lima KC, Fava LR, Siqueira JF Jr : Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. *J Endod* Oct; 27(10): 616-9, 2001



Luppens SB, Reij MW, van der Heijden RW, Rombouts FM, and Abee T : Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. *Appl Environ Microbiol Sep*; 68(9): 4194-200, 2002

Mah TF, O'Toole GA : Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol Jan*; 9(1): 34-9, Review, 2001

Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T : Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J Jan*; 31(1): 1-7, 1998

Möller AJ : Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr Dec*; 74(5): Suppl: 1-380, 1966

Nocker A, Cheung CY, Camper AK : Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods Nov*; 67(2): 310-20, 2006

Nocker A, Camper AK : Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Appl Environ Microbiol 72(3)*: 1997-2004, 2006

Nocker A, Sossa-Fernandez P, Burr MD, Camper AK : Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Appl Environ Microbiol Aug*; 73(16): 5111-7, 2007

Nocker A, Sossa KE, Camper AK : Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *J Microbiol Methods* Aug; 70(2): 252-60, 2007

Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M : The susceptibility of starved, stationary phase, and growing cells of *Enterococcus faecalis* to endodontic medicaments. *J Endod* May; 31(5): 380-6, 2005

Rôças IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira JF Jr : Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. *J Endod* Jul; 30(7): 504-8, 2004

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U : Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* Jan; 85(1): 86-93, 1998

Williams JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC : Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. *J Endod* Aug; 32(8): 715-21, 2006

Wilson M : Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agent. *J Med Microbiol* Feb; 44(2): 79-87, 1996

Young G, Turner S, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D : Bacterial DNA persists for extended periods after cell death. *J Endod* Dec; 33(12): 1417-20, 2007

Zamany A, Spångberg LS : An effective method of inactivating chlorhexidine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* May; 93(5): 617-20, 2002

## Abstract

### Selective detection of viable *Enterococcus faecalis* using propidium monoazide in combination with real-time PCR

Sinyoung Kim

Department of Dentistry

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Ilyoung Jung, D.D.S, M.S.D, Ph.D)

**I. Introduction :** Polymerized chain reaction (PCR) can detect bacteria more rapidly than conventional plate counting. However DNA-based assays cannot distinguish between viable and dead cells due to persistence of DNA after cells have lost their vitality. Recently, propidium monoazide (PMA) treatment has been introduced. It was used before DNA extraction, resulting in selective DNA detection of viable bacteria. PMA penetrates cells with compromised membranes and intercalates with dead cell DNA upon light exposure, then inhibits PCR amplification.

*Enterococcus faecalis* has been suggested to be an important etiologic bacteria in

endodontic failure. And chlorhexidine (CHX) is effective disinfectant for removal of *E. faecalis*.

The purpose of this study is to evaluate the applicability of the PMA treatment and real-time PCR method for cell counting in comparison with plate counting and to evaluate the antibacterial efficacy of 2% CHX on *E. faecalis* using PMA treatment in combination with real-time PCR

**II. Materials & Methods :** Firstly, to elucidate the relationship between the proportion of viable cells (DNA yield) and the real-time PCR signals after PMA treatment, mixtures with different ratios of viable and dead cells were used. Secondly, relative difference of viable cells using PMA treatment in combination with real-time PCR was compared with CFU by plate counting. Lastly, antibacterial efficacy of 2% CHX on *E. faecalis* was measured using PMA treatment in combination with real-time PCR.

**III. Results :** Firstly, Ct value increased with decreasing proportion of viable *E. faecalis*. Secondly, there was correlation between viable cells measured by real-time PCR after PMA treatment and CFU by plate counting until Optical density (OD) value remains under 1.0. However, viable cells measured by real-time PCR after PMA treatment have decreased at 1.5 of OD value while CFU kept increasing. Lastly, relative difference of viable *E. faecalis* decreased more after longer application of 2% CHX.

**IV. Conclusion :** Using PMA treatment, viable cells can be detected selectively from dead cells. Also PMA treatment in combination with real-time PCR can be applied for cell

counting. However, it can only be applicable under 1.5 of OD value. Lastly, for removal of *E. faecalis* in starvation phase, long term application of 2% CHX is needed.

---

**Key Words :** *E. faecalis*, real-time PCR, propidium monoazide, chlorhexidine