

## *Streptococcus sanguis*의 구형 Hydroxyapatite 비드에의 부착 Assay 방법의 개량

최선진·이시영·송요한

서울대학교 치과대학 미생물학교실

## Improvement of an hydroxyapatite bead adherence assay for *Streptococcus sanguis*

Choe, Son-Jin, Si-Young Lee and Yo-Han Song

Department of Microbiology, College of Dentistry, Seoul National University

**ABSTRACT:** The purpose of the present investigation was to improve several procedures being used in the adherence assay of *Streptococcus sanguis* cells to hydroxyapatite (HA) beads and to study the effect of the beads on the counting of radioactivity. The standard adherence assay involved the adherence of radiolabeled bacteria to 40 mg of HA beads. The beads were mixed with [<sup>3</sup>H]thymidine-labeled bacterial cells and incubated for 60 minutes at room temperature. Unadsorbed cells were removed, the beads with adsorbed cells were dried, and the radioactivity was monitored in a scintillation spectrometer.

The 30 seconds sonication of cells in a form of long chains appeared to be adequate for obtaining mostly singlet or doublet cells. Unlike the counting of *S. sanguis* cell suspension, bacterial cells adhered to HA or saliva-coated HA (SHA) required smaller volume (2.5 ml) of scintillation fluid for better counting. Eighteen percent quenching of counts could be attributed to the beads. Among 3 procedures commonly used to equilibrate the beads for adherence assay, no differences were found in their effectiveness. The HA beads on which the bacteria remained attached in scintillant during the counting were found to be the source of sample self-absorption representing 34.5% of the total radioactivity counts resulting from the beads dissolved in HCl solution.

**KEY WORDS** □ *Streptococcus sanguis*, adherence, hydroxyapatite bead, sample self-absorption

구강의 치아 법랑질은 획득피막(acquired pellicle)이라는 얇은 필름으로 항상 덮이고 있다(van Houte, 1983). 피막은 칼슘과 포스페이트 복합염인 hydroxyapatite(HA)로 구성된 법랑질 미네랄에 타액성분이 선택적으로 흡착하여 형성된다.

몇개의 *in vitro* 모델이 세균의 치면부착 연구에 사용되었다. 합성 분말형 HA는 그중의 하나인데 이 재료는 매우 큰 표면적을 소유하므로(Liljemark와 Schauer, 1975; McGaughey 등, 1971) 구강에서 자연적으로 얻어지는 세균농도에 적합한

부착 표면적을 얻을 수 있는 시스템을 얻기가 어렵다. 겹하여 HA 결정체는 작고 또 assay 할 때 부착치 않은 세균과 쉽게 분리되지 않는다. 입자규모가 큰 분말형의 인간의 법랑질도 사용되었지만(Hillman 등, 1970) 이것 역시 비교적 큰 표면적을 소유하고 있고 준비하기도 번거롭다. 한편 slab 형태의 소 법랑질(Ostavic 등, 1974)과 고래 상아질(Olsson과 Krasse, 1976), 그리고 HA로 만든 디스크(Clark와 Gibbons, 1977)는 큰 표면적의 문제와 부착치 않은 세균에서의 분리문제를 극복할 수 있으나 동질의 것을 다량 구하는데 제한이

이 연구는 한국과학재단 연구비(1986-1988)로 이루어졌음.

있으므로 정량적 연구의 사용에 실용적이 못된다 (Slade, 1976). 최근에는 구형의 HA 비드의 사용이 널리 보급되고 있으며 (Appelbaum 등, 1979; Clark 등, 1978; Morris와 McBride, 1984) 이 비드는 작은 표면적 ( $0.63 \text{ cm}^2/\text{mg}$ )를 소유하고 (Appelbaum 등, 1979) 또 빠르게 침강하므로 부착치 않은 세균에서 쉽게 분리된다. 이 비드의 직경은  $75\text{--}185 \mu\text{m}$ 이고 38.3%의 칼슘과 19.7%의 인을 함유하고 칼슘과 인의 분자비는 1.5이다. 실제로 이 HA 비드에의 실험적 세균부착은 에나멜 slab에의 부착과 근본적으로 유사하다는 것이 여러 연구자의 의견이다 (Appelbaum 등, 1979; Clark 등, 1981). 초기부착의 특이성과 kinetics에 대한 지식의 획득은 대부분이 이 assay 또는 그의 변형을 사용함으로써 이루어졌다. HA 비드를 사용한 구강세균의 초보적 부착실험은 송과 최 (1986)가 발표한 바 있다.

치태형성의 과정은 세균의 순차적 나열과 성숙 절차에 근거하여 몇개의 단계로 나누어 연구하는데 특히 세균의 초기부착에 많은 관심을 두었다. 그것은 초기단계에서 부착을 예방할 수 있으면 치태를 감소시키거나 치태형성을 예방할 수 있기 때문이다. 치아 표면에 군락하는 첫 세균의 하나는 *Streptococcus sanguis* 인데 (van Houte, 1976; Gibbons와 van Houte, 1973) 그 이유는 이 세균이 치아표면에 획득피막을 형성하는 타액 당단백과 상호작용하는 능력을 소유하기 때문으로 알려졌다.

상기하였듯이 부착실험에 여러 종류의 재료가 사용되었고 대체적인 assay 방법은 서로 유사하였으나 세부적인 면, 예로써 비드를 평형시키는 시간 그리고 방사능측정에 사용하는 카테일의 양에서 차이가 있었다. 근래에는 구형의 HA 비드가, 그간 사용되어 온 모든 HA를 대체함에 따라 연구 문헌에 보고된 여러 종류의 HA에 대한 세균부착 assay의 세부절차를 구형의 HA 비드를 사용하여 재검토할 필요성이 야기되었다. 그리하여, 이 연구에서는 세균의 초기부착 연구에서 대표적으로 사용되는 *S. sanguis*를 선택하여 구형의 HA 비드에 부착시킬 때 부수되는 배양세균의 사슬절단, 비드에 의한 캔칭 그리고 비드 준비에 소요되는 평형시간과 사용하는 카테일 용량을 조사하고 HA

비드에 의한 self-absorption의 가능성을 연구함으로써 최적의 부착 assay 방법을 수립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 세균과 배양

연구에 사용한 *Streptococcus sanguis* 균주 20은 사람의 치아 군대에서 분리하고 동정한 것이다 (송과 최, 1986). 이 세균은 통상 냉동건조하여 보존하고 working stock은 냉동 ( $-70^\circ\text{C}$ )하여 보관하였다. 세균의 배양은 냉동된 균주를 녹여 Todd-Hewitt (0.2% 포도당 함유) 액체배지에 1-2차 계대한 후 같은 배지에 식균하여  $\text{CO}_2$  배양기 또는 candle jar에서 보통 12시간 생육시켜 시행하였다.

### 부착에 사용한 세균의 방사능 표지와 준비

방사능 표지된 세균을 얻기 위해서는 상기한 배양배지 (통상  $50 \text{ ml}$ )  $1 \text{ ml}$  당  $2 \mu\text{Ci}$ 의 [methyl- $^3\text{H}$ ] thymidine (specific activity,  $20 \text{ Ci/mmol}$ : NEN Research Products)을 넣었다. 세균의 수집은  $4^\circ\text{C}$ ,  $10,000 \times g$ 에서 10분간 원심하고  $30 \text{ ml}$ 의 인산완충액 ( $5 \text{ mM KCl}$ 과  $1 \text{ mM CaCl}_2$ 를 함유하는 pH 6.0의  $2 \text{ mM potassium phosphate buffer}$ ) (Rosan과 Golub, 1984) 이하 K-완충액으로 약칭함)으로 세번 세정한 다음 K-완충액에 현탁하고 소량 ( $1 \text{ ml}$ )씩 나누어 냉동기 ( $-70^\circ\text{C}$ )에 보관하면서 필요시 사용하였다. 사용시에는 세균의 연쇄를 끊어 가급적 단일균으로 분산시키기 위하여  $3 \text{ ml}$  용량의 현탁액을 sonic dismembrator (Fisher, model 300)로 0.4의 상대 출력에서 처리하였다. 성적란 (Table 1)에서 기술하였듯이 12시간 배양한 세균시료를 30초간 파절하면 현미경으로 관찰하여 사슬당  $1.87 \pm 1.06$ 개의 세균을 얻을 수 있었다. [ $^3\text{H}$ ]thymidine으로 세균을 표지할 때의 표지능률 (세균수/count per minute)은 12,615-26,316 (4회의 실험)이었다. 이렇게 준비한 현탁액은 냉장고에 보관하면서 일주일까지 사용하였다.

세균수의 계산은 혈구측정기와 세균의 흡광도로 시행하였다. 혈구측정기로 행할 때는 세균현탁액에 메틸렌블루를 첨가 (최종 농도 10%)하여 세균

**Table 1.** Average number of *Streptococcus sanguis* cells per chain after sonication of cultures for different time periods. The bacterial cultures used were harvested at the designated time intervals

Sonication time period (sec)	Culture harvest time (hr)			
	12	16	20	24
10	3.61 ± 3.02 <sup>a</sup>	—	—	—
30	1.87 ± 1.06	2.21 ± 1.6	2.37 ± 1.48	2.36 ± 1.26
60	2.01 ± 1.34	1.58 ± 0.71	1.58 ± 0.83	1.78 ± 0.9
90	1.66 ± 1.04	1.79 ± 1.14	1.71 ± 1.0	1.70 ± 1.09

<sup>a</sup>Mean ± standard deviation of the mean.

을 염색하였다. 이렇게 계산한 일정한 세균수의 흡광도를 colorimeter (Spectronic 20, Baush & Lomb)로 측정하여 세균수 대 흡광도의 표준곡선을 그려 활용하였다.

#### 타액의 준비

타액은 20대의 남자 5인에서 파라핀으로 자극하여 분비된 것을 냉각된 용기에 채취하여 혼합하였다. 분해효소를 불활성화하기 위하여 60°C에서 30분간 가열하고 원심분리 (12,000×g, 15분)하여 상층액을 취하였다. 이것을 일정량씩 나누어 -20°C에 보관하며 사용하였다.

#### 부착실험

HA 비드의 준비와 세균부착 측정에 사용한 방법은 이미 기술된 것 (Clark와 Gibbons, 1977)에 기초하였다. 아래에 기술하는 반응은 모두 1.5ml 용량의 polypropylene microtube (Treff AG, Switzerland)를 사용하여 두개 한벌로 (duplicate) 시행하였다.

구상체 (spheroidal)의 HA 비드 (Gallard-Schlessinger, Carle Place, N.Y.)는 사용에 앞서, 미세한 입자를 제거기 위하여 다량을 200ml 정도의 증류수로 15회 세정하면서 물 위에 뜨는 미세한 비드입자를 제거하고 37°C에서 건조시켰다. 이렇게 준비한 비드 40mg을 1ml의 타액 또는 다른 용액 (상적란 참조)으로 실온에서 30분간 처리하였다. 그리고 이 비드를 K-완충액으로 세번 세정한 다음 이것에 1ml의 <sup>3</sup>H-표지한 세균을 넣고, 실온에서, 회전장치에 장착시켜 10RPM의 속도에서 전도되면서 세균이 계속 혼합되도록 하

였다.

일정한 시간의 세균부착 반응이 끝난 뒤, 비드가 침전되게 하고 부착치 않은 세균이 들어있는 상층액을 제거하고 비드를 K-완충액으로 세번 세정하였다. 그리고 여과지 위에 비드를 수집하고 이것을 건열기에 넣어 60°C에서 30분간 건조시킨 다음 scintillation vial (20ml 용량)에 옮기고 일정량의 scintillation fluid를 넣고 Scintillation Spectrometer (Beckman, LS 8800)로 방사능을 측정하였다. 그리고 일정수의 <sup>3</sup>H-표지된 세균 0.1ml을 다소 상이한 방법 (아래 참조)으로 측정하여 얻은 count per minute (CPM)에 기초하여 비드에 부착한 세균수를 계산하였다. 비드에 부착한 세균의 방사능 측정값은 통상 기준군의 HA와 SHA에서 각각 4,812-6,975 CPM과 2,209-1,1702 CPM이었다. 실험자료의 통계 처리는 Student *t*-test로 시행하였다.

#### 세균이 부착된 비드의 용해

표준 assay에서처럼 세균을 HA와 SHA에 부착시킨 다음 이 비드를 20ml 짜리의 유리바이알에 넣고 용해액인 0.33N HCl 2ml을 첨가하여 10분간 용해시켰다. 내용물을 여과하여 여과지에 수집된 세균을 건조시킨 후 2.5ml의 카테일로 측정하였다. 용해에 사용한 바이알의 내벽에 붙을 수 있는 방사능을 점검키 위하여 이 용기에는 15ml의 카테일을 넣고 측정하였다.

#### 부착된 세균의 비드에서의 탈락

방사능 표지된 세균을 HA와 SHA에 부착시키고 탈락용액인 0.5M인 인산완충액, pH7.0 (PB) 1ml을 비드가 들어있는 튜브에 넣고 이것을 60분간 부착 assay에서처럼 회전시켰다. 비드의 침강 후, 상층액과 비드를 K-완충액 1ml씩으로 2번 세정한 용액을 여과하여 세균을 여과지에 수집하였고 비드에 잔존할 수 있는 세균을 점검키 위하여 비드도 여과지에 수집하여 두가지를 모두 건조시킨 다음 2.5ml씩의 카테일을 넣고 측정하였다.

#### Scintillation fluid

PPO (2,5-diphenyl oxazole) (5.5g), POPOP [1,4-bis-2-(5-phenyloxazolyl)-benzene] (0.1g), toluene (667ml), 그리고 Triton X-100 (333ml)을 혼합하여 만들었다 (Cooper, 1977).

## 결 과

### 시간에 따른 배양시료의 초소리와 파절과 파절 시간의 비교

*S. sanguis* 균주 20은 배지에서 진사슬을 형성하며 성장하였다. 세균의 사슬을 초소리와 파절기로 끊기 위하여, 여러 상이한 배양시간에서 얻은 시료의 사슬전달 용이도를 조사하기 위하여 배양 12 시간, 16 시간, 20 시간 그리고 24 시간에 얻은 시료를 파절기로 각각 10 초, 30 초, 60 초 그리고 90 초씩 처리하였고 그 성적은 Table 1에 기록하였다. 파절시간이 길어짐에 따라 사슬당 세균수가 모든 시료에서 감소하였고 파절되는 정도는 시료 간에서 차이가 없었다. 그러나 12 시간 배양시료가 다른 시료에 비하여 파절이 다소 잘 되는 경향을 보였으므로 이 시료의 배양시간인 12 시간을 통상 배양시간으로 정하였다. 파절시간으로는 60 초와 90 초에서 30 초에 비하여 보다 짧은 사슬이 얻어졌으나 긴 시간의 파절처리가 균체에 미칠 영향을 고려하여 30 초 시간을 택하였다.

### Scintillation fluid 용량과 Count Per Minute와의 관계

방사능 표지된 세균의 현탁액을 일정량(0.1 ml) 측정할 때는 유리제품의 표준 바이알(20 ml 용량)에 15 ml의 카테일을 사용함이 가장 좋았다(Table 2). 따라서 본 실험에서 현탁액의 측정에는 15 ml의 카테일을 일관하여 사용하였다. 한편 40 mg의 비드에 부착한 세균을 건조시켜(재료와 방법항 참조) 측정할 때는 2.5 ml 용량의 카테일 사용에서 가장 높은 CPM을 얻을 수 있었다. 용

**Table 3.** Effect of HA bead on radioactivity counting of labeled *Streptococcus sanguis* suspended in K-buffer

	Relative CMP	% Reduction
Cells (0.1 ml)	100	0
Cells with 40 mg HA	81.8 ± 2.5 <sup>a</sup>	18.2

<sup>a</sup>Mean ± standard deviation of the mean; n = 10.

량 2.5 ml의 사용이 5 ml 보다 통계학적으로 유의하게 높은 CPM을 얻게함은 본 실험의 말기에 얻은 정보이고 대부분의 실험은 이 정보를 얻기 전에 수행되었으므로 그 때에는 5 ml을 최적 용량으로 사용하였다.

### 방사능 표지된 세균 현탁액의 측정에 대한 비드의 영향

세균 현탁액의 방사능 측정에 미치는 비드의 영향을 조사키 위하여 40 mg의 비드와 0.1 ml의 세균 현탁액을 혼합하여 측정하였다. Table 3에서 보듯이 비드의 존재에서는 CPM이 18% 정도(14-22% 범위) 감소하였다. 이것은 비드에 의한 켈칭 때문이라고 생각된다.

### Hydroxyapatite 비드의 준비조건과 세균의 부착

실험에 사용하는 비드는 연구자에 따라 여러 방법(Clark와 Gibbons, 1977; Rosan 등, 1982; Staat 등, 1980; Tellefson 등, 1986)으로 준비되고 있으므로 그들이 사용한 3가지의 상이한 비드 준비조건이 세균부착에 주는 영향을 조사하였다. 그 조건들은 1) 비드(40 mg)를 K-완충액으로 1 회 세정할 뿐 평형시킴이 없이 곧 사용, 2) 비드에 K-완충액을 가하고 회전장치에서 1.5 시간 동

**Table 2.** Effect of scintillation fluid volume on counting radiolabeled *Streptococcus sanguis* either suspended in K-buffer or adsorbed onto SHA, as expressed in counts per minute

Bacterial cells	Scintillation fluid volume (ml)					
	20	15	10	5	2.5	1.25
Suspended, 0.1 ml (n = 12)	100 <sup>a</sup>	103.1 ± 4.3 <sup>b</sup>	81.4 ± 7.7	73.7 ± 5.3	—	—
SHA-adsorbed (40 mg HA) (n = 20)	—	100 <sup>a</sup>	114.5 ± 7.3	120.2 ± 7.5	127.7 ± 8.8 <sup>c</sup>	111.9 ± 3.5

<sup>a</sup>For suspension counting, the CPM from 20 ml fluid was adjusted to 100; for counting SHA-adsorbed cells, the CPM from 15 ml fluid adjusted to 100.

<sup>b</sup>Mean ± standard deviation of the mean.

<sup>c</sup>P < 0.01.

알 회전(10RPM) 시키며 평형시킴, 그리고 3) 위의 (2)와 같은 조건에서 12 시간 평형시킴이다. 이 상이한 조건들의 영향은 Table 4에 기록하였다. Table 4의 데이터가 보여 주듯이 비드의 준비조건은 틀려도 부착하는 세균수에서는 차이가 나타나지 아니하였다. 본 실험에서는 따라서 (1)의 준비조건을 채용하였다.

#### 카테일 속에서 세균의 행동

SHA에 부착한 세균이 카테일 속에서 여하히 행동하는가를 조사키 위하여 시행한 실험의 성적은 Table 5에 기록하였다. 세균은 카테일 속에서도 비드로부터 탈락되지 않고 계속하여 부착되어 있음을 보여주었으며 미소한 방사능이 카테일 용액에 유리되었음을 보여주었는데, 이 미량의 방사능은 미립자의 HA 비드에 부착한 세균에 기인하는 것 같다. 미립자의 비드는 카테일 용액을 따라낼 때 함께 제거될 수 있기 때문이다.

**Table 4.** Comparison of three methods of equilibrating HA beads for adherence assay

Equilibration time (hr)	Cells adhered to 40 mg SHA <sup>a</sup>	Relative adherence (%)
0	$1.36 \times 10^8$	100
1.5	$1.32 \times 10^8$	97
12	$1.39 \times 10^8$	102

<sup>a</sup>Input *Streptococcus sanguis* cell titer:  $2 \times 10^8$  cells/ml.

**Table 5.** Comparison of the CPM from the initial counting of bacterial cells adhered to 40 mg of saliva-coated HA beads and that from recouping of the beads with fresh cocktail after decanting the initial cocktail whose CPM was also determined and included

Source of radioactivity	Count rate (CPM)	Total CPM from beads with fresh cocktail and decanted one	Relative CPM(%)
Beads with initial cocktail	11,120 $\pm$ 987 <sup>a</sup>	—	100
Beads with fresh cocktail	11,138 $\pm$ 1,373		
Cocktail decanted	28 $\pm$ 13	11,166	100.4

<sup>a</sup>Mean  $\pm$  standard deviation of the mean; n = 10.

#### 시료의 Self-Absorption

HA 비드는 고형의 큰 입자이므로 여기에 부착한 세균의 방사능 측정에서는 시료의 self-absorption이 일어날 수 있다. 이것을 조사하기 위하여 부착한 세균을 탈락시켜서 방사능을 측정하거나 또는 부착면을 제공한 HA 비드를 용해시킨 후 측정하기도 하였다. Table 6에서 보듯이 상기와 같이 처리하여 측정하면, 처리없이 측정한 기준값에 비하여 유의하게 측정값이 증가하였다. 비드의 용해에서는 52-53%, 그리고 탈락 실험에서는 45-118% 증가하였다.

#### 고찰

현재 세균의 모든 부착 assay에서는 부착한 세균수를 계산키 위하여 방사능을 측정할 때, HA 비드 표면에 부착한 상태로의 세균을 바이알에 넣고 측정하고 있다. 그러나, 본 연구의 성적이 보여주듯이 카테일 속에서 세균이 HA 비드에 부착한 상태로 존재하기 때문에, 세균에서 방출되는 photon이 비드에 흡수되어 self-absorption이 일어날 수 있음을 보였다(Freifelder, 1976). 비드에 부착한 세균을 탈락시켜 측정하거나 또는 부착면인 HA 비드를 용해시킨 후 측정함으로써 측정

**Table 6.** Relative CPM obtained from counting *Streptococcus sanguis* cells adhered to 40 mg of intact beads, of the beads dissolved in 0.33 N HCl, and the cells desorbed from the beads with 0.5 M phosphate buffer

	Intact beads (A)	Beads dissolved in 0.33 N HCl (B)	Beads desorbed with 0.5 M PB (C)
HA	100 <sup>a</sup>	$152.4 \pm 40.8^b$	$218.8 \pm 39.5^c$
SHA	100	$153.2 \pm 33.8^d$	$145.5 \pm 27.4^e$

<sup>a</sup> Each values are the average of 4 experiments done with duplicates or triplicate samples  $\pm$  standard deviation.

<sup>b</sup>The difference between B and A was significant at  $P < 0.025$ .

<sup>c</sup>The difference between C and A was significant at  $P < 0.005$ .

<sup>d</sup> The difference between B and A was significant at  $P < 0.005$ .

<sup>e</sup> The difference between C and A was significant at  $P < 0.01$ .



률이 증가한 것은 self-absorption 이 실제로 일어나고 있음을 보여준 것이다. 세균의 부착실험에서 self-absorption 이 측정값에 미치는 영향에 관한 연구는, 저자들이 아는 바로는, 이것이 최초의 보고이다. Self-absorption 이 일어나는 시료에서 측정되는 방사능값은 시료에 들어있는 방사능의 절대량을 나타내는 것이 아니고 방사능의 농도를 반영할 뿐이다. 그리하여, 세균의 부착정도만을 비교하는 실험에서는 self-absorption 에 기인하는 측정치의 수정이 필요치 않으나 부착 isotherm 의 여러 매개변수(parameter)를 구하기 위해서는 절대량의 측정이 필수적이다(Gibbons 등, 1976).

한편, 세균의 탈락 또는 비드용해 후의 방사능 측정에서는 비드에 의한 켄칭이 개입치 않을 것이다. 본 실험에서는 HA 비드에 의한 켄칭이 18% 이고, 비드에 부착한 상태로 있는 세균의 측정값은 켄칭을 고려치 않은 수치이다. 따라서 켄칭을 고려에 넣고 Table 6의 성적을 해석하면, 탈락 또는 용해 후의 측정값의 순수 증가는 비드의 용해시는 34-35% 그리고 세균 탈락시는 27-100% 가 되어 이 정도 만큼 self-absorption 이 일어난다고 할 수 있다. 탈락실험에서의 증가값이 HA (27%) 와 SHA (100%) 사이에서 왜 큰 차이가 났는지는 더 추구치 아니하였다. 탈락실험에서는 세균이 비드에서 100% 탈락되지 않고 전체 측정값의 12% 와 3% 가 각각 HA 와 SHA 에 잔존하였는데 Table 6의 (B)란에 기록한 값은 이 잔존값을 포함한 수치이다. 이처럼 탈락실험시는 잔존값이 있으므로, self-absorption 의 측정은 비드 용해방법으로 시행하는 것이 간편하다고 생각된다.

부착 assay 시, 튜브벽에 잔류하는 CPM 은, 부착반응 혼합액에 넣은 총 CPM 의 0.5% 이하(성적 미기재)로서 튜브벽에 부착하는 세균수는 매우 적은 것 같다.

*S. sanguis* 를 포함하여 사슬을 형성하는 세균을 시료로 사용하여 조직에의 부착을 연구하고자 할 때는 사슬을 짧게 끊어야 한다. 왜냐하면 긴 사슬을 이루고 있는 세포를 사용하면 부착의 정량적 분석이 어렵기 때문이다. 몇몇 연구자들(Appelbaum 등, 1979; Tellefson 과 Germaine, 1986)은 *S. sanguis* 를 log 기의 중간까지 또는 24 시간 배양하여, 단독세포로서 주로 구성된 시료를 얻어

사용하였으나 우리는 그런 세균 시료를 얻을 수 없었다. 본 실험에서는 파절 후에 현미경으로 관찰하여 파괴된 세균은 보이지 아니하였으므로 채택한 30 초의 시간은 충분히 안전한 것으로 생각된다. 문헌에 의하면 일반적으로 15 초(Liljemark 와 Schauer, 1975)에서 90 초(Cowan 등, 1987)까지의 파절시간이 채택되고 있다.

Scintillation 용액에서 나오는 광은 scintillation spectrometer 로 측정할 때 photomultiplier tube (PMT)에 수집되는데, 일반적으로, 카테일의 용량을 감소시키면 광이 PMT 의 감수성이 높은 면(area)에 도달하지 못한다(Packard, 1987). 따라서 동량의 에너지를 소유한 양자이지만 PMT 의 낮은 지점에서는, 이 양자가 PMT 의 중앙에 도달할 때에 비하여 낮은 측정값을 얻게 된다. 이리하여 에너지의 검출효과는 적은 용량의 카테일 사용에서 떨어지게 된다. 본 실험에서, 세균 현탁액의 측정에 15ml 의 용량이 최적한 것은 쉽게 이해할 수 있으나 비드에 부착한 세균의 방사능 측정에서 적은 양의 카테일 용액(2.5ml)의 사용에서 가장 높은 CPM 을 얻을 수 있는 이유는 알려지지 아니하였다. 다른 연구자들 모두가 어느 용량의 카테일을 비드 측정에 사용하였는지 알려지지 아니하였으나 용량을 기술한 두 연구에서는 각각 5ml 과 10ml 을 사용하였다(Gibbons 등, 1983; Kilian 등, 1981). 본 연구에서, 5ml 의 절반을 사용하여 통계적으로 유의하게 더 높은 측정치를 얻게 된 까닭은 부착표면을 제공한 HA 비드와 관련이 있는 것 같다. 비드에 부착된 세균은 카테일 속에서 비드에서 탈락되지 않고 계속 부착되어 있고 비드 자체는 큰 입자이므로 측정하는 바이알의 밑 부위에 가라앉게 되어 counting geometry(Hayes 등, 1956)가 변하기 때문이라고 생각된다.

문헌을 조사하여 보면 HA 또는 SHA 에 의한 켄칭이 없다고 하는 보고(Appelbaum 등, 1979; Liljemark 와 Bloomquist, 1981)도 있고, 반대로 유의하게 있다는 연구자(Morris 와 McBride, 1984)도 발견되는데 켄칭이 관찰된 경우는 그 영향이 20% 에 달하였다. 우리의 실험조건에서는 HA 에 의한 켄칭이 18% 에 미쳐 유의하게 측정에 영향을 주었다.

HA 비드를 부착실험에 사용할 때, 연구자에 따

라는 장시간 동안 완충액속에서 평형시키기도 하지만 본 연구의 결과에 따르면 그러한 번거로운

절차가 필요치 않고 비드의 1회 세정만으로 충분함을 알 수 있었다.

## 적 요

HA 비드에 부착한 *S. sanguis* 세포는 방사능 측정시 카테일 속에서 비드에 여전히 부착되어 있으므로 비드에 의한 방사능의 self-absorption이 일어났으며 그 정도는 염산용액으로 비드를 용해시킬 때 측정된 방사능값의 34.5%이었다. 현탁액으로 준비한 세포의 방사능 측정과는 달리 HA 또는 SHA에 부착한 세포의 경우에는 소량의 scintillation 용액(2.5ml) 사용에서 더 좋은 측정값을 얻었다. HA 비드에 의한 퀀칭은 약 18%이었다. 부착 assay에 사용할 HA 비드 준비에 보통 이용되는 3가지의 방법의 비교에서는 차이가 없었다. 부착실험용의 세균세포는 초소리파로 세균사슬을 끊었는데 30초간의 파절로 세포 하나 또는 두개로 주로 구성된 현탁액을 얻을 수 있었다. 본 연구에서는 HA 비드에 부착한 *S. sanguis* 세포를 측정할 때 self-absorption이 일어남을 발견하였고 부착한 세균을 비드에서 탈락하거나 또는 비드를 용해시킨 후 측정함으로써 self-absorption을 제거할 수 있었다. 그리고 부착한 세균의 방사능 측정에서는, 적정의 카테일량을 발견하여 사용하므로 측정값을 유의하게 증가시킬 수 있었다.

## REFERENCES

1. Appelbaum, B., E. Golub, S.C. Holt, and B. Rosan, 1979. *In vitro* studies of dental plaque formation: adsorption of oral streptococci to hydroxyapatite. *Infect. Immun.* **25**, 717-728.
2. Clark, W.B., L.L. Bammann, and R.J. Gibbons, 1978. Comparative estimates of bacterial affinities and adsorption sites on hydroxyapatite surfaces. *Infect. Immun.* **19**, 846-853.
3. Clark, W.B., and R.J. Gibbons, 1977. Influence of salivary components and extracellular polysaccharide synthesis from sucrose on the attachment of *Streptococcus mutans* 6715 to hydroxyapatite surfaces. *Infect. Immun.* **18**, 514-523.
4. Clark, W.B., E.L. Webb, T.T. Wheeler, W. Fischlschweiger, D.C. Birdsell, and B.J. Mansheim, 1981. Role of surface fimbriae (fibrils) in the adsorption of Actinomyces species to saliva-treated hydroxyapatite surfaces. *Infect. Immun.* **33**, 908-917.
5. Cooper, T.G., 1977. The tools of biochemistry. pp. 100-101. John Wiley & Sons, Inc. New York.
6. Cowan, M.M., K.G. Taylor, and R.J. Doyle, 1987. Role of sialic acid in the kinetics of *Streptococcus sanguis* adhesion to artificial pellicle. *Infect. Immun.* **55**, 1552-1557.
7. Freifelder, D., 1976. Physical biochemistry: application to biochemistry and molecular biology, p. 105. Freeman and Company. San Francisco.
8. Gibbons, R.J., E.C. Moreno, and D.M. Spinell, 1976. Model delineating the effects of a salivary pellicle on the adsorption of *Streptococcus mitior* onto hydroxyapatite. *Infect. Immun.* **14**, 1109-1112.
9. Gibbons, R.J., I. Etherden, and Z. Skobe, 1983. Association of fimbriae with the hydrophobicity of *Streptococcus sanguis* FC-1 and adherence to salivary pellicles. *Infect. Immun.* **41**, 414-417.
10. Gibbons, R.J., and J. van Houte, 1973. On the formation of dental plaques. *J. Periodontol.* **44**, 347-360.
11. Hayes, F.N., B.S. Rogers, and W.H. Langham, 1956. Counting suspensions in liquid scintillators. *Nucleonics* **14**, 48-51.
12. Hillman, J.D., J. van Houte, and R.J. Gibbons, 1970. Sorption of bacteria to human enamel powder. *Arch. Oral Biol.* **15**, 899-903.
13. Kilian, M., K. Roland, and J. Mestecky, 1981. Interference of secretory immunoglobulin A with sorption of oral bacteria to hydroxyapatite. *Infect. Immun.* **31**, 942-951.
14. Liljemark, W.F., and C.G. Bloomquist, 1981. Isolation of a protein-containing cell surface

- component from *Streptococcus sanguis* which affects its adherence to saliva-coated hydroxyapatite. *Infect. Immun.* **34**, 428-434.
15. Liljemark, W.F., and S.V. Schauer, 1975. Studies on the bacterial components which bind *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans* to hydroxyapatite. *Arch. Oral Biol.* **20**, 609-615.
  16. McGaughey, C., B.D. Field, and E.C. Stowell, 1971. Effects of salivary proteins on the adsorption of cariogenic streptococci by hydroxyapatite. *J. Dent. Res.* **50**, 917-922.
  17. Morris, E.J., and B.C. McBride, 1984. Adherence of *Streptococcus sanguis* to saliva-coated hydroxyapatite: evidence for two binding sites. *Infect. Immun.* **43**, 655-663.
  18. Olsson, J., and B. Krasse, 1976. A method for studying adherence of oral streptococci to solid surfaces. *Scand. J. Dent. Res.* **84**, 20-28.
  19. Ostavik, D., F.W. Kraus, and L.C. Henshaw, 1974. *In vitro* attachment of streptococci to the tooth surface. *Infect. Immun.* **9**, 794-800.
  20. Packard, 1987. Liquid scintillation analysis: science and technology, pp. 2-35. Packard Instrument Co., Inc., U.S.A.
  21. Rosan, B., B. Appelbaum, E. Golub, D. Malamud, and I.D. Mandel, 1982. Enhanced saliva-mediated bacterial aggregation and decreased bacterial adhesion in caries-resistant versus caries-susceptible individuals. *Infect. Immun.* **38**, 1056-1059.
  22. Slade, H., 1976. *In vitro* models for the study of adherence of oral streptococci, pp. 21-38. In W.A. Bowen, R.J. Genco, and T.C. O'Brien (ed.), Proceedings: Immunologic Aspects of Dental Caries (a special supplement to Immunological Abstracts). Information Retrieval Inc., Arlington, Va.
  23. 송요한, 최선진, 1986. 구강 streptococci 의 적혈구와 타액 유도 응집 및 하이드록시아파타이트에의 부착에 관한 연구, 대한구강생물학회지, **10**, 107-114.
  24. Staat, R.H., S.D. Langley, and R.J. Doyle, 1980. *Streptococcus mutans* adherence: evidence for protein-mediated attachment followed by glucan-dependent cellular accumulation. *Infect. Immun.* **27**, 657-681.
  25. Tellefson, L.M., and G.R. Germaine, 1986. Adherence of *Streptococcus sanguis* to hydroxyapatite coated with lysozyme and lysozyme-supplemented saliva. *Infect. Immun.* **51**, 750-759.
  26. van Houte, J., 1983. Bacterial adherence in the mouth. *Rev. Infect. Dis.* **5**(Supplement 4), 659-669.
  27. van Houte, J., 1976. Oral bacterial colonization: mechanisms and implication, pp. 3-32. In H.M. Stiles, W.J. Loesche and T.C. O'Brien (ed.), Proceedings: Microbial Aspects of Dental Caries (a special supplement to Microbiology Abstracts), vol 1. Information Retrieval, Inc., Washington, D.C.

(Received Jan. 20, 1989)