

## Pig6 DNA probe를 기반으로 하는 *Prevotella intermedia* ATCC 49046 균주-특이 PCR primer 개발

정승우<sup>1†</sup> · 유소영<sup>2†</sup> · 강숙진<sup>2</sup> · 김미광<sup>2</sup> · 장현선<sup>1</sup> · 이광용<sup>3</sup> · 김병욱<sup>1</sup> · 국중기<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>조선대학교 치과대학 치주과학교실, <sup>2</sup>조선대학교 치과대학 구강생화학교실,

<sup>3</sup>조선대학교 치과대학 치의학과

본 연구는 치주질환 병인론 연구에 빈번히 사용되는 *Prevotella intermedia* ATCC 49046 균주를 특이적으로 검출 및 동정할 수 있는 PCR primer를 개발하기 위하여 시행하였다. *P. intermedia* ATCC 49046 유전체 DNA를 추출하고, HindIII 제한효소를 이용하여 무작위 클로닝법으로 유전체 DNA 절편을 얻었다. Southern blot 분석법을 이용하여 DNA 절편의 특이성을 조사하였고, chain termination 법을 이용하여 핵산염기서열을 결정하였다. 이를 바탕으로 PCR primer를 설계하고, *P. intermedia* ATCC 49046에 대한 균주 특이성 및 검출 한계(민감도)를 조사하였다. Southern blot 분석 결과 Pig6 DNA probe는 서양인에서 분리 동정된 *P. intermedia* 균주와만 hybridization하였고, 한국인에서 분리 동정된 *P. intermedia* 균주들과는 반응이 없었다. Pig6 DNA probe는 813 bp의 핵산염기로 구성되어 있었으며, 이를 바탕으로 설계된 Pig6-F3와 Pig6-R3 primer 쌍에 의해서는 서양 균주에 특이적인 PCR 산물이 증폭되었다. Pig6-60F와 Pig6-770R primer 쌍에 의해서는 *P. intermedia* ATCC 49046 유전체 DNA에서만 특이적인 PCR 산물이 증폭되었다. 두 가지 primer 쌍들 각각에 대한 *P. intermedia* 유전체 DNA량의 검출 한계를 알아보기 위한 민감도 실험 결과 두 가지 primer 쌍들 모두 4 pg (약 2000마리) 까지 검출 가능하였다. 이상의 연구결과를 종합하면, Pig6-60F와 Pig6-770R primer 쌍은 *P. intermedia* ATCC 49046을 균주 특이적으로 동정할 수 있어, 이 균주의 보존적 측면에서 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

**Key words** □ detection, DNA probe Pig6, PCR primer, *Prevotella intermedia* ATCC 49046

치주낭에는 약 400여 종의 세균이 서식하고 있으며(11), 이들은 세균 종들 간의 독특한 형태의 복합체를 형성하여 일종의 biofilm을 이루고 있다(16). 하지만, 여러 역학조사에 의하면, 치주질환과 관련된 세균 종의 수는 제한적임이 보고 되었다(2, 15). 특히, 미생물학적 진단에 있어서 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* (*Bacteroides forsythus*), *Treponema denticola* 등의 세균 종의 검출에 초점이 맞춰지고 있다(5, 15).

*Prevotella intermedia*는 그람 음성 혐기성 간균(rod)으로 치주질환의 원인균 중 하나로 잘 알려져 있다. 실제로 *P. intermedia*는 성인성 치주염, 임신성 치은염, 급성괴사성궤양성 치은염(acute necrotizing ulcerative gingivitis) 및 HIV 연관성 치은염 등에 이환된 환자의 치은연하부위에서 빈번하게 검출되고 있으며(9, 10), 구강 농양 병소(8)에서도 검출됨이 보고 되었다. 최근 한국인의 치은염 환자를 대상으로 연구 결과에 의하면, *Prevotella intermedia*가 치은연하 치면세균막에 존재할 경우 비외과적 치료 후 예후가 좋지 않다는 보고가 있다(5).

*P. intermedia*가 치주질환을 유발시키는 데 있어서 중요한 독성

인자(virulence factor)로는 구강 상피세포에 침입(invasion)(1), 내독소(4), succinate, isobutyrate, isovlerate 및 ammonia 등과 같은 독성 대사산물(12), 용혈소 및 적혈구 응집소(9) 등이 있다. 이들의 연구 결과를 살펴보면, 표준균주(ATCC 25611<sup>T</sup>)와 임상분리 균주들 간의 독성인자의 존재 유무나 활성 정도 등의 차이가 존재하였다. 한 예로 구강 상피세포에 대한 침입 실험 결과, 치주낭에서 분리된 *P. intermedia* 17 균주는 구강 상피세포를 침입할 수 있는 능력을 가졌지만, 치근단 병소에서 분리된 *P. intermedia* 27 균주와 표준균주인 ATCC 25611<sup>T</sup>는 구강 상피세포에 대한 침입능이 없었다(1). 또한, 적혈구 용혈 작용 및 응집능력에 대한 연구 결과에서도, 임상 분리 균주들 간의 활성 정도가 차이가 존재하였다(9). 이는 같은 종에 속하지만, 균주들 간의 특성이 다양하기 때문에 치주질환 병인론 연구에 있어서, 치주질환 환자 개인의 병원체에 대한 반응뿐만 아니라 균주 수준에서의 연구도 필요하다는 것을 시사한다.

최근 Kim 등(3)은 치주질환의 원인 균종 중 하나인 *Fusobacterium nucleatum*의 표준균주(ATCC 25586<sup>T</sup>)에 대한 균주 특이 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) primer를 개발하였다. 이들의 연구는 inverted dot blot hybridization (IDBH) 검색법을 이용한 *F. nucleatum* 아종-특이 DNA probe를 개발하는 과정에서 *F. nucleatum* ATCC 25586<sup>T</sup> 유전체 DNA와만 결합하는 probe (Fu12)가 있음을 발견하고, 이의 핵산염기서

<sup>†</sup>Contributed equally

\*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 062-230-6877, Fax: 062-224-3706

E-mail: jkkook@chosun.ac.kr

열을 결정하여 PCR primer를 개발한 것이다.

최근 본 연구팀은 IDBH 검색법을 이용하여 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>과 *P. intermedia* ATCC 49046 유전체 DNA와만 반응하는 Pig6라고 명명된 DNA probe를 클로닝 하였다(미발표 자료). 본 연구는 한국인에서 분리 동정된 *P. intermedia* 균주들과 서양인에서 분리 동정된 균주들(*P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>과 *P. intermedia* ATCC 49046)의 유전체 DNA를 이용하여 Pig6 DNA probe의 *P. intermedia*에 대한 종-특이성 여부를 검증하고, 종특이 PCR primer 쌍을 개발하고자 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 세균 및 배양 조건

본 연구에서 이용된 *Prevotella* spp.의 표준균주 및 참고균주들은 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>, *P. intermedia* ATCC 49046, *P. loeschei* ATCC 15930<sup>T</sup>, *P. melaninogenica* ATCC 25845<sup>T</sup>, *P. bivia* ATCC 29303<sup>T</sup>, *P. oralis* ATCC 33269<sup>T</sup>, *P. corporis* ATCC 33547<sup>T</sup>, *P. buccae* ATCC 33574<sup>T</sup>, *P. veroralis* ATCC 33779<sup>T</sup>, *P. oulorum* ATCC 43324<sup>T</sup>, *P. brevis* ATCC 19188<sup>T</sup>, *P. ruminicola* ATCC 19189<sup>T</sup>, *P. heparinolytica* ATCC 35895<sup>T</sup>, *P. dentalis* ATCC 49559<sup>T</sup>, *P. pallens* ATCC 700821<sup>T</sup> 및 *P. enoeca* ATCC 51261<sup>T</sup> 등이다. 이들 균주들은 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한, 임상에서 분리 동정된 *Prevotella* spp. 균주들인 *P. intermedia* ChDC KB2, *P. intermedia* ChDC KB3, *P. intermedia* ChDC KB14, *P. intermedia* ChDC KB18, *P. intermedia* ChDC KB19, *P. intermedia* ChDC KB29, *P. intermedia* ChDC KB53, *P. nigrescens* ChDC KB5, *P. nigrescens* ChDC KB6, *P. nigrescens* ChDC KB50 및 *P. nigrescens* ChDC B270 등은 한국인의 치은 연하 치면세균막에서 분리 및 동정하였다. 본 연구에 사용된 모든 균주들은 TSB (trypticase soy broth)에 0.5% yeast extract, 0.05% cysteine HCl-H<sub>2</sub>O, 0.5 mg/ml hemin 및 2 µg/ml vitamin K<sub>1</sub>이 첨가된 배지에 접종하여 85% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 혐기성 세균배양기에서 1-2일간 배양하여 다음 실험에 사용하였다.

### 세균 유전체 DNA의 추출

세균의 유전체 DNA는 G-spin<sup>TM</sup> Genomic DNA Extraction Kit (iNtRON, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 세균 유전체 DNA를 추출하였다.

### 플라스미드 DNA 추출

Southern blot analysis에 probe로 사용할 Pig6 DNA 절편이 함유된 재조합 플라스미드는 AccuPrep<sup>TM</sup> Plasmid Extraction Kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시대로 추출하였다.

### DNA probe의 정제 및 표지

DNA probe의 정제는 QIAEX II<sup>®</sup>(QIAGEN, USA)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 정제하였다.

DNA probe는 DIG-High Prime (Roche Diagnostics, Germany)를 이용하여 표지하였다. 표지 과정은 1 µg의 DNA에 최종 부피가 16 µl가 되도록 증류수를 넣고 끓는 물에서 10분간 가열하여 DNA를 변성시킨 후 재빨리 얼음에 넣어 식혔다. 여기에 4 µl DIG-High Prime을 첨가하여 잘 섞고 잠깐 원심분리한 후 37°C에서 12시간 배양하였다. 배양 후 0.2 M EDTA를 넣어 반응을 정지시켰다.

### Southern blot hybridization

Southern blot을 시행하기 위해 각 세균에서 추출한 5 µg의 genomic DNA를 0.8% agarose gel에 전기영동하고 Vacuum Blotter (Model 785, Bio-Rad Laboratories, USA)를 이용하여 통상의 vacuum transfer법으로 Nylon membrane (Roche Diagnostics)에 옮기고, 120°C 진공오븐에서 30분 동안 가열하여 DNA를 membrane에 고정시켰다. Hybridization은 통법으로 시행하였다.

표지된 DNA probe가 membrane 상의 표적 DNA 가닥과 hybridization됨을 알아보기 위한 검출 과정은 Roche Diagnostics사의 chemiluminescent detection kit를 사용하였으며, 제조회사의 지시대로 시행하였다.

### 핵산염기서열 결정

핵산염기서열 결정은 Bioneer (Korea)에 의뢰하여 결정하였다. 이때 사용되는 primer는 ChDC-GEM-F (5'-TTC CCA GTC ACG ACG TTG TAA AA-3')와 ChDC-GEM-R (5'-GTG TGG AAT TGT GAG CGG ATA AC-3')을 이용하였으며, 그 결과는 SeqMan 프로그램 (Version 5.00; DNASTAR, USA)을 이용하여 분석하였다. 핵산염기서열 결정 후 염기서열의 상동성 검색은 미국 국립보건원에서 제공하는 BLAST 프로그램을 이용하였다.

### PCR primer 쌍의 설계 및 제작

Pig6 DNA probe의 핵산염기서열을 바탕으로 PrimerSelect 프로그램(DNASTAR)을 이용하여 PCR primer를 설계하였다(Table 1). 이 때 설계된 primer 쌍은 Bioneer (Korea)에 의뢰하여 제작하였다.

**Table 1.** PCR primers designed in this study

Primer pairs	Sequence of oligonucleotides (5' → 3')	Size of amplicons (bp)	Annealing temperature (°C)
Pig6-F3	5'-TGT CCG ATT ATG ATA GGT GGT TTT-3'	454	50
Pig6-R3	5'-AAT CCC CCT TTC AGC GTA ATG-3'		
Pig6-60F	5'-ATC AAC AAC TTA CCG AAA CTA CAT-3'	711	55
Pig6-770R	5'-ATA AAT AAC AAC ACT GGC ATA AT-3'		

### PCR primer 쌍의 특이도 및 민감도 측정

앞에서 설계된 *P. intermedia* ATCC 49046 동정을 위한 primer 쌍의 종 특이성을 알아보기 위하여, 15종의 *Prevotella* spp.에 대한 표준균주와 9 균주의 *P. intermedia* 임상분리 균주 및 5 균주의 *P. nigrescens* 임상분리 균주 유전체 DNA 4 µl를 주형으로 하여 PCR을 시행하였다. 또한 각각의 PCR 쌍의 민감도 (sensitivity)를 측정하기 위하여 유전체 DNA 4 ng에서 4 fg까지 10배씩 희석하여 PCR 주형으로 사용하였다.

PCR은 AccuPower® PCR PreMix (Bioneer, Korea)와 Peltier thermal cycler (Model PTC-200 DNA engine™, MJ Research, USA)를 이용하여 시행하였다. AccuPower® PCR PreMix에는 5 nmole씩의 4가지 deoxynucleoside triphosphate, 0.8 M의 KCl, 0.2 M의 Tris-HCl (pH 9.0), 0.03 M의 MgCl<sub>2</sub> 그리고, 1 unit의 Taq DNA polymerase가 들어있다. 여기에 2 ng의 세균 유전체 DNA와 20 pM의 각각의 프라이머 쌍을 넣고 PCR을 시행하였다. 이 때 PCR 조건은 다음과 같았다. 초기 변성은 94°C에서 5 분간 시행하였고, 변성(94°C, 3분), 결합(50°C 또는 55°C, 30초) 및 중합(72°C, 30초)의 세 과정을 32회 반복하고, 추가적인 중합(72°C, 30초)을 10분간 시행하였다.

PCR이 끝난 후 20 µl의 반응물 중 2 µl를 1.5% agarose gel과 Tris-acetate 완충용액 (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA, [pH 8.0])를 이용해서 100 V에서 30분간 전기영동하였다. 증폭물은 ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator로 발색시켜 크기를 확인하였다.

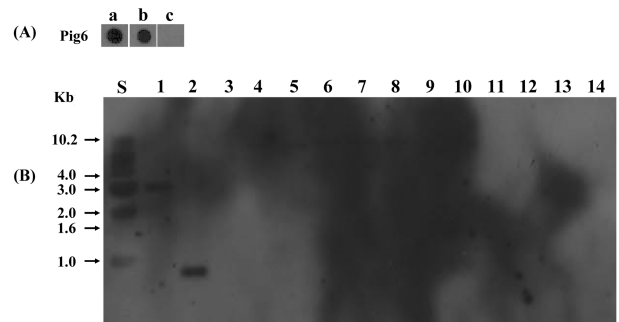
## 결 과

### Pig6 DNA probe를 이용한 Southern blot hybridization

Pig6 DNA probe의 Inverted dot blot hybridization의 결과(Fig. 1A)와 같이 Southern blot hybridization에서도 Pig6 DNA probe는 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>과 *P. intermedia* ATCC 49046 균주들의 유전체 DNA들과 반응을 보였다(Fig. 1B). 이 때 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>과는 약 3.1 kb 크기의 반응 띠가 생성되었고, *P. intermedia* ATCC 49046와는 813 bp 크기의 반응 띠가 나타났다. 하지만, 한국인에서 분리 동정된 *P. intermedia* 균주들의 유전체 DNA와는 약 8-9 kb 크기의 반응 띠가 희미하게 보이지만, 그 강도는 매우 미미하였다(Fig. 1, lanes 5-10). 또한 *P. intermedia*와 유전학적으로 가장 가까운 *P. nigrescens* 균주들의 표준균주(ATCC 33563<sup>T</sup>) 및 한국인 분리 균주들과도 반응을 하지 않았다(Fig. 1).

### Pig6 DNA probe의 핵산염기서열 결정 및 상동성 검색

Pig6 DNA probe의 핵산염기서열 결과 813 bp로 구성되어 있었다(Fig. 2). *P. intermedia* 17 균주의 전체 유전체 DNA의 핵산염기서열이 The Institute of Genomic Research (TIGR)에 의해 밝혀져 있고, 이 연구소에서 제공하는 BLASTN 프로그램으로 상동성 검색을 한 결과, 2개의 아직 기능이 밝혀지지 않은 hypothetical 단백질과 핵산염기서열 수준에서 하나는 72%, 다른



**Fig. 1.** Inverted dot blot hybridization (A) and Southern blot analysis (B) to determine the specificity of the Pig6 DNA probe. The *Hind*III-digested bacterial genomic DNAs were electrophoresed and transferred to a nylon membrane; the nylon membrane was hybridized with a DIG-labeled Pig6 DNA fragment. Lanes: S, 1 kb DNA ladder (Bioneer); 1, *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>; 2, *P. intermedia* ATCC 49046; 3, *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>; 4, *P. intermedia* ChDC KB2; 5, *P. intermedia* ChDC KB3; 6, *P. intermedia* ChDC KB14; 7, *P. intermedia* ChDC KB18; 8, *P. intermedia* ChDC KB19; 9, *P. intermedia* ChDC KB29; 10, *P. intermedia* ChDC KB53; 11, *P. nigrescens* ChDC KB5; 12, *P. nigrescens* ChDC KB6; 13, *P. nigrescens* ChDC KB50; 14, *P. nigrescens* ChDC B270.

하나는 61% 상동성을 보였다. Pig6 DNA probe의 핵산염기서열을 미국립보건원에서 제공하는 BLASTX 프로그램을 이용하여 아미노산 수준에서 상동성이 있는 단백질을 검색한 결과 아직 기능이 밝혀져 있지 않는 hypothetical protein, pyoverdine chromo-

1	AAGCTTGAAC ACTTTCGCTT GTTAAAAAGA TAAAAATAT CATTGTAAA ATATAATATA
61	TCAACAACCT ACCGAACTA CATGTCGGA TATGATAGT GTGAGGATT TAAAAAGTCC
	Pig6-60F
121	GATTATGATA GTTTTTTGTG CGATTATGAT AGGTGGTTTT ATGCTATTCG ACCTTAAATT
	Pig6-F3
181	TGCAACATAA ATCCAAAGT TTCAATAAA CTGATAATGA GGAAAAAGC AGATAACGAA
241	CCCTCTTTGG AGCAGATAAG GAACATGAAA TTTTCGGAAG AACGTTTCCA ACTGCTCGAT
301	ACCATTTCGG ATATGGTAA GCGACGATTC GACCGGCGTA AATTAATAGA AGAGGAAAGT
361	TGCTCATATC TAAAAATAC AATTCAATGAG CCGTAGAGC TCAAGCCAAC TGAGAATAAA
421	CCAGTGATC GCATATTGTG GCAGCGACTC GTAACATAT TTAATATTGA CAGTTATTCT
481	AATATTACA GCTCATTTCA CAACAAGGAC GAACAAGCCA CTTAATAACC TATATAATA
541	AAGCAACAAA CGTCAATTCT CTGACATAGC ATTACGCTGA AAGGGGGATT CATTATAGAA
	3'-TT GCAAGTTAAGA GACTGTATCG-5', Pig6-R3
601	CAAAATTTTG AAAGCAAATA GACAGAAAT ATTTAAAGA GAGTTCTACA TCTAATCGAG
661	AAGCATATTA AAACGTCAAG CCGCTCGGC AGAGATGCT GGGGCGGCTT TTTATATTAT
721	ATAGTTAGTG TAAGTTCAAT ATTAAGAATT ATGCCAGTGT TGTATTATAT AAGAAAAATA
	Pig6-770R, 3'-TAA TACGGTCACA ACAATAAATA-5'
781	TAATTTAATA TACTATAAT TAAAGTGAAG CTT

**Fig. 2.** The nucleotide sequences of Pig6 DNA probe. The 813 base pairs of nucleotides were obtained. The PCR primer sites are indicated by underline.

**Table 2.** The results of homologous search (BLASTX) of Pig6 DNA probe

Protein name (species of protein origin)	Accession No. of GenBank	Identities	Positives	Gaps
Hypothetical protein ( <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7)	NP_704261	30/152 (19%)	74/152 (48%)	19/152 (12%)
Hypothetical protein PF11_0213 ( <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7)	NP_701073	31/106 (29%)	55/106 (51%)	10/106 (9%)
Hypothetical protein TP04_0185 ( <i>Theileria parva</i> ).	EAN31537	29/130 (22%)	62/130 (47%)	14/130 (10%)
Pyoverdine chromophore precursor synthetase ( <i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola 1448A)	YP_274139	20/67 (29%)	34/67 (50%)	0/67 (0%)
Phospholipase D ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	NP_012956	35/148 (23%)	66/148 (44%)	18/148 (12%)

phore precursor synthetase, phospholipase D와 같은 단백질과 가장 유사성이 있는 것으로 조사되었다(Table 2).

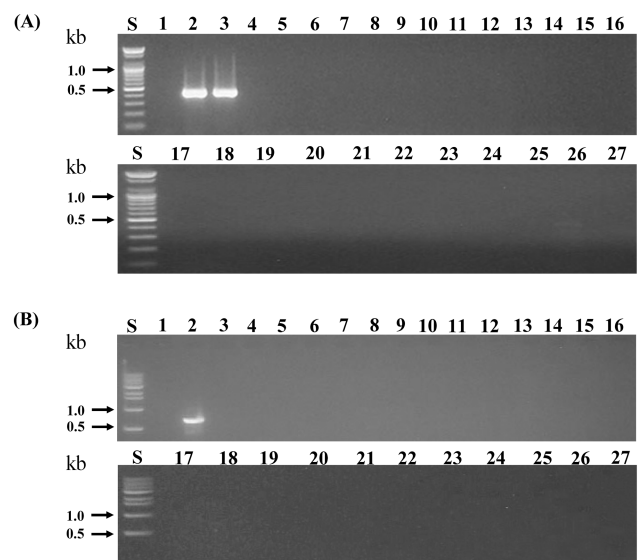
### PCR primer 설계 및 PCR primer 쌍의 특이성과 민감도

Pig6 DNA 핵산염기서열을 바탕으로 두 가지의 PCR primer 쌍(Pig6-F3와 Pig6-R3 primer 쌍 및 Pig6-60F와 Pig6-770R primer 쌍)들을 설계하였다. 이들을 이용하여 PCR을 시행한 결과 Pig6-F3와 Pig6-R3 primer 쌍은 Southern blot hybridization과 같이 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>과 *P. intermedia* ATCC 49046 균주들의 유전체 DNA들로부터 PCR 산물을 증폭시켰다(Fig. 3A). 하지만, Pig6-60F와 Pig6-770R primer 쌍으로부터는 *P. intermedia* ATCC 49046 균주 유전체 DNA에서 PCR 증폭물을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 또한 이 둘 두 가지 PCR primer 쌍들은 모두 한국인에서 분리 동정된 *P. intermedia* 또는 *P. nigrescens* 균주의 유전체 DNA들을 주형으로 하는 PCR 결과에서 모두 음성 반응을 보였다.

PCR 법에 의한 두 가지 primer 쌍들 각각에 대한 *P. intermedia* ATCC 49046 유전체 DNA량의 검출 한계를 알아보기 위한 민감도 실험을 실시하였다. 그 결과 두 가지 primer 쌍들 모두 4 pg (약 2000마리) 까지 검출 가능하였다(Fig. 4).

## 고 찰

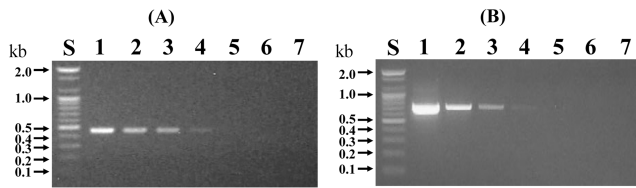
본 연구 결과 Pig6 DNA probe는 서양인에서 분리 동정된 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>와 *P. intermedia* ATCC 49046 균주들의 유전체 DNA들과 강한 hybridization 반응 때가 형성되었지만, 한국인에서 분리 동정된 *P. intermedia* 균주들과는 거의 반응을 하지 않았다(Fig. 1). 이러한 결과의 원인을 현재의 연구만으로는 알 수 없지만, Pig6 DNA probe의 핵산염기서열에 코딩된 단백질이 서양인과 한국인 또는 동양인 숙주에 따라 존재 여부가 틀리거나, 유전자가 있지만 핵산염기서열의 상동성에 차이가 많이 나기 때문에 생긴 결과라 생각된다. 이러한 가설들 중에서 Pig6 DNA probe의 핵산염기서열이 한국인에서 분리 동정된 *P. intermedia* 균주들의 상동성이 있는 유전자와 상동성이 차이가 있어서 미약한 반응 때가 생겼다는 것이 가장 타당하리라 생각된다. 이러한 가설을 검증하기 위해서, 다음 연구에서는 low



**Fig. 3.** Specificity test of PCR with Pig6-F3 or Pig6-R3 primers (A) and Pig6-60F and Pig6-770R primers (B) and the genomic DNA of type strains of *Prevotella* spp. and clinical isolates of *P. intermedia* and *P. nigrescens*. Lanes: S, 100 bp (A) or 1 kb (B) DNA ladders (Bioneer); 1, *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>; 2, *P. intermedia* ATCC 49046; 3, *P. loeschii* ATCC 15930<sup>T</sup>; 4, *P. melaninogenica* ATCC 25845<sup>T</sup>; 5, *P. bivia* ATCC 29303<sup>T</sup>; 6, *P. oralis* ATCC 33269<sup>T</sup>; 7, *P. corporis* ATCC 33547<sup>T</sup>; 8, *P. buccae* ATCC 33574<sup>T</sup>; 9, *P. veroralis* ATCC 33779<sup>T</sup>; 10, *P. oulorum* ATCC 43324<sup>T</sup>; 11, *P. brevis* ATCC 19188<sup>T</sup>; 12, *P. ruminicola* ATCC 19189<sup>T</sup>; 13, *P. heparinolytica* ATCC 35895<sup>T</sup>; 14, *P. dentalis* ATCC 49559<sup>T</sup>; 15, *P. pallens* ATCC 700821<sup>T</sup>; 16, *P. enoeca* ATCC 51261<sup>T</sup>; 17, *P. intermedia* ChDC KB2; 18, *P. intermedia* ChDC KB3; 19, *P. intermedia* ChDC KB14; 20, *P. intermedia* ChDC KB18; 21, *P. intermedia* ChDC KB19; 22, *P. intermedia* ChDC KB29; 23, *P. intermedia* ChDC KB53; 24, *P. nigrescens* ChDC KB5; 25, *P. nigrescens* ChDC KB6; 26, *P. nigrescens* ChDC KB50; 27, *P. nigrescens* ChDC B270.

stringency 조건과 hybridization 온도를 낮추어서 Southern blot hybridization을 시행하고자 한다.

본 연구 결과 Pig6 DNA probe가 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>와 *P. intermedia* ATCC 49046 균주를 제한효소 절편길이다양성



**Fig. 4.** Sensitivity test of PCR with primers (A) Pig6-F3 and Pig6-R3, (B) Pig6-60F and Pig6-770R, and the purified genomic DNA of *P. intermedia* ATCC 49046. The PCR products were electrophoresed in 1.5% agarose gel. Lanes: S, 100 base pair DNA ladder (Bioneer); 1 through 7, purified genomic DNA serially diluted by 10-fold from 4 ng to 4 fg.

(restriction fragment length polymorphism; RFLP)에 의해 두 균주를 동정하는 데 이용될 수 있음을 알았다(Fig. 1). 최근 Shin 등(13)은 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup> 균주 유전체 DNA에서 유래된 Pi30 DNA probe를 이용한 Southern blot hybridization법에 의해 *P. intermedia* 종을 균주 수준에서 동정할 수 있음을 보고하였다. 또한, Kook 등(6)은 Pi34 DNA probe를 이용하여 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup> 균주를 Southern blot hybridization 법으로 동정할 수 있음을 보고하였다. 이러한 결과는 DNA probe법이 세균의 속에서 균주 수준까지 동정할 수 있어 세균 동정에 있어서 매우 유용하게 이용될 수 있다는 것을 증명한 것이라 생각된다(7).

Pig6 DNA probe의 핵산염기서열을 미국립보건원에서 제공하는 BLASTN 프로그램을 이용하여 핵산염기서열 수준에서의 상동성을 검색한 결과 현재의 GenBank 데이터베이스에서는 상동성을 갖는 유전자가 존재하지 않았다. 그래서 BLASTX 프로그램을 이용하여 단백질 수준에서의 상동성 검색을 실시한 결과, 아직 기능이 밝혀져 있지 않는 단백질, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica* 1448A 균주의 pyoverdine chromophore 전구체 합성효소, *Saccharomyces cerevisiae*의 phospholipase D 등과 19-29% 범주에서 상동성을 보였다.

본 연구결과를 종합하면 Pig6 DNA probe는 서양인에서 분리 동정된 균주들의 유전체 DNA와만 hybridization하였고, Pig6 DNA 염기서열을 결정하여 PCR primer 쌍을 설계한 결과, *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>과 *P. intermedia* ATCC 49046 두 균주에 특이한 PCR primer 쌍과 *P. intermedia* ATCC 49046 균주에 특이한 PCR primer 쌍이 개발되었다. 이러한 결과는 Pig6 DNA probe와 이를 바탕으로 개발된 PCR primer 쌍들이 인종간의 *P. intermedia*의 유전학적 차이에 대한 연구 및 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>과 *P. intermedia* ATCC 49046 균주들의 동정에 유용하게 사용될 수 있음을 간접적으로 시사하는 것으로 사료된다.

## 감사의 말

본 연구는 교육인적자원부 누리사업(치의공전전문인력양성사업,

04-바-C-03) 국고 보조금으로 수행한 과제입니다

## 참고문헌

1. Dorn, B.R., K.L. Leung, and A. Progluske-Fox. 1998. Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. *Infect. Immun.* 66, 6054-6057.
2. Dzink, J.L., S.S. Socransky, and A.D. Haffajee. 1988. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.* 15, 316-323.
3. Kim, H.S., S.K. Song, S.Y. Yoo, D.C. Jin, H.S. Shin, C.K. Lim, M.S. Kim, J.S. Kim, S.J. Choe, and J.K. Kook. 2005. Development of strain-specific PCR primers based on a DNA probe Fu12 for the identification of *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586<sup>T</sup>. *J. Microbiol.* 43, 331-336. Erratum in: *J. Microbiol.* 2005. 43, 473.
4. Kim, S.J., M.S. Ha, E.Y. Choi, J.I. Choi, and I.S. Choi. 2004. *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide stimulates release of nitric oxide by inducing expression of inducible nitric oxide synthase. *J. Periodontol. Res.* 39, 424-431.
5. Kook, J.K., T. akamoto, K. Nishi, M.K. Kim, J.H. Seong, Y.N. Son, and D.K. Kim. 2005. Detection of *Tannerella forsythia* and/or *Prevotella intermedia* might be useful for microbial predictive markers for the outcome of initial periodontal treatment in Koreans. *Microbiol. Immunol.* 49, 9-16. Erratum in: *Microbiol. Immunol.* 2005. 49, 295.
6. Kook, J.K., J.J. Han, H.S. Kim, J.H. Seong, D.K. Kim, D.H. Baek, and S.J. Choe. 2003. Cloning of a potentially strain-specific DNA probe of *Prevotella intermedia* ATCC 25611 by inverted dot blot hybridization screening method. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 282-286.
7. Krieg, N.R. 2001. Identification of Prokaryotes, p. 33-38. In G. Garrity (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2th ed. Springer Verlag, New York, U.S.A.
8. Milsom, S.E., S.V. Sprague, D. Dymock, A.J. Weightman, and W.G. Wade. 1996. Rapid differentiation of *Prevotella intermedia* and *P. nigrescens* by 16S rDNA PCR-RFLP. *J. Med. Microbiol.* 44, 41-43.
9. Okamoto, M., N. Maeda, K. Kondo, and K.P. Leung. 1999. Hemolytic and hemagglutinating activities of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 178, 299-304.
10. Papananou, P.N., A.M. Neiderud, A. Papadimitriou, J. Sandros, and G. Dahlen. 2000. "Checkerboard" assessments of periodontal microbiota and serum antibody responses: a case-control study. *J. Periodontol.* 71, 885-897.
11. Paster, B.J., S.K. Boches, J.L. Galvin, R.E. Ericson, C.N. Lau, V.A. Levanos, A. Sahasrabudhe, and F.E. Dewhirst. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.* 183, 3770-3783.
12. Saito, K., N. Takahashi, H. Horiuchi, and T. Yamada. 2001. Effects of glucose on formation of cytotoxic end-products and proteolytic activity of *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodontol. Res.* 36, 355-360.
13. Shin, Y.K., S.U. Jeong, S.Y. Yoo, M.K. Kim, H.S. Kim, B.O. Kim, D.K. Kim, H.K. Hwang, and J.K. Kook. 2004. Pi30 DNA probe may be useful for the identification of *Prevotella intermedia* at the

- species or strain level. *Microbiol. Immunol.* 48, 931-936.
14. Slots, J., L. Bragd, M. Wikstrom, and G. Dahlen. 1986. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J. Clin. Periodontol.* 13, 570-577.
  15. Slots, J. and M.A. Listgarten. 1988. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.* 15, 85-93.
  16. Socransky, S.S., A.D. Haffajee, J.L. Dzink, and J.D. Hillman. 1988. Associations between microbial species in subgingival plaque samples. *Oral Microbiol. Immunol.* 3, 1-7.

(Received March 8, 2006/Accepted March 23, 2006)

---

**ABSTRACT : Development of *Prevotella intermedia* ATCC 49046 Strain-Specific PCR Primer Based on a Pig6 DNA Probe**

**Seung-U Jeong<sup>1†</sup>, So Young Yoo<sup>2†</sup>, Sook-Jin Kang<sup>2</sup>, Mi-Kwang Kim<sup>2</sup>, Hyun-Seon Jang<sup>1</sup>, Kwang Yong Lee<sup>3</sup>, Byung-Ok Kim<sup>1</sup>, and Joong-Ki Kook<sup>2\*</sup>** (<sup>1</sup>Department of Periodontology, <sup>2</sup>Department of Oral Biochemistry and <sup>3</sup>Undergraduate student, College of Dentistry, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea)

The purpose of this study is to develop the strain-specific PCR primers for the identification of *Prevotella intermedia* ATCC 49046 which is frequently used in the pathogenesis studies of periodontitis. The *Hind*III-digested genomic DNA of *P. intermedia* ATCC 49046 were cloned by random cloning method. The specificity of cloned DNA fragments were determined by Southern blot analysis. The nucleotide sequence of cloned DNA probes was determined by chain termination method. The PCR primers were designed based on the nucleotide sequence of cloned DNA fragment. The data showed that Pig6 DNA probe were hybridized with the genomic DNA from *P. intermedia* strains (ATCC 25611<sup>T</sup> and 49046) isolated from the Westerns, not the strains isolated from Koreans. The Pig6 DNA probe were consisted of 813 bp. Pig6-F3 and Pig6-R3 primers, designed base on the nucleotide sequences of Pig6 DNA probe, were also specific to the only both *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup> and *P. intermedia* ATCC 49046. In the other hand, Pig6-60F and Pig6-770R primers were specific to the only *P. intermedia* ATCC 49046. The two PCR primer sets could detect as little as 4 pg of chromosomal DNA of *P. intermedia*. These results indicate that Pig6-60F and Pig6-770R primers have proven useful for the identification of *P. intermedia* ATCC 49046, especially with regard to the maintenance of the strain.