

분리된 sod gene 절편을 이용하여 혈청형이 서로 다른 세 가지의 P. gingivalis strain의 sod gene에 대한 균주 chromosomal DNA 상호간의 Southern hybridization을 시도해 보고저 함이다.

● P. gingivalis ATCC 53977의 sod gene으로 변형된 변이 E. coli에서의 superoxide dismutase 활성도

최점일 · Howard Kuramitsu

부산대학교 치과대학 치주과학교실

Sod gene의 직전 upstream의 nucleotide sequence는 E. coli의 ribosome-binding site consensus sequence와는 강한 유사성을 보이지 않았다. 그러나 101번 위치의 sequence인 AGA는 Bacteroides fragilis의 16S rRNA의 3' terminus와 유사하였고, -10번과 -35번 부위(76번과 53번 위치)는 E. coli의 consensus promoter sequence와 유사하였다. 그러나, transcription이 시작되는 부위가 결정되어 치후에 이 gene의 promoter 부위가 밝혀져야 할 것이다. sod gene의 downstream 부위에 강한 transcription 종료 부위를 시사할만한 어떤 sequence도 볼 수 없었다. sod gene G+C 비율은 48%로서 이미 밝혀진 P. gingivalis의 G+C 비율인 46-48% 범위내였다.

HindIII-PstI 절편을 plasmid인 pUC18에 subcloning한 경우에는 sod activity를 볼 수 없었으므로 미루어 보아(표1), pUC19에서의 sod transcription은 P. gingivalis DNA insert에 있을 가능성이 있는 promoter sequence에도 불구하고, lacZ promoter에 기시한다고 추정된다. 또한 sod 유도에 대한 중등도의 IPTG(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) 영향은 효율적인 translation이 sod gene의 E. coli에서의 발현을 제한하고 있다는 점을 시사하였다. 다른 연구에서도 P. gingivalis gene의 E. coli에서의 발현이 어렵다는 것을 보여주고 있다. 그러나, plasmid pS1내에서 sod gene의 transcription이 lambda Lvector promoter에서 유래하는지 또한 P. gingivalis insert에서 유래하는지 아직 알 수 없다.

E. coli HB101 strain에서 pS1에 의한 sod 활성 발현이 QC779 strain보다 높았다는 점은 host strain 요소도 sod gene 발현에 중요한 한 요소임을 말해주고 있다. 더군다나, E. coli QC779 strain의 경우 pS1보다 pCC19에서 sod 활성이 컸다는 점은 HindIII site에 의해 잘려나가는 부위는 sod 발현에 필수적이지는 않다는 점을 시사한다. 오히려 sod gene upstream 부위에 sod repressor gene이 있을 가능성이 있다. 이 점은 더 많은 연구를 필요로 한다.

P. gingivalis 381로 부터 정제한 SOD는 Mn^{++} 나 또는 Fe^{++} 에 의해 증가되는 단일 효소임이 밝혀졌다.

이러한 점에서 본 연구의 결과는 0.2mM의 Fe^{++} 나 0.12mM의 Mn^{++} 에 의해 SOD효소의 활성이 각각 89.6%, 412.6% 증가되었음을 입증하고 있다. 향후 이 연구는 gene을 이용하여 산소내성이나, neutrophil의 세균 파괴에의 저항/민감도를 연구하려고 한다.

and there was statistically significant decrease after subgingival curettage.

5. There was not statistically significant difference in pocket depth and loss of attachment related to tooth type (anterior, bicuspids, molars).

Southern hybridization of bacterial DNA of porphyromonas gingivalis 381 and W50 with a sod gene fragment from porphyromonas gingivalis ATCC 53977

Jeom Il Choi, Sung Jo Kim, Howard Kuramitsu

Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Pusan Nat'l University

Dept. of Pediatric Dentistry, University of Texas Health Science Center, USA

Southern hybridization of bacterial DNA of *P. gingivalis* 381 and W50 was done with a 0.45-kb Bgl II Ecor I fragment of *P. gingivalis* ATCC 53977. The 0.45-kb fragment was prepared from either sod gene or recombinant DNA subcloned into plasmid pUC19. Bacterial DNA of *P. gingivalis* 381 and W50 was prepared and digested with Pst. I. 1.0% agarose gel electrophoresis was done and the DNA was transferred into nitrocellulose membrane. The 0.45-kb DNA fragment was used as a DNA probe for southern hybridization. Random primer labelling and non-radioactive detection system were used to detect the hybridized DNA fragment.

(This investigation supported in part by grant DE08293 from the NIDR/NIH)

Superoxide dismutase activity in mutant E. coli transformed with sod gene from porphyromonas gingivalis ATCC 53977

Jeom Il Choi, Howard Kuramitsu

Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Pusan Nat'l University

Dept. of Pediatric Dentistry, University of Texas Health Science Center, USA

The sod gene coding for Mn/Fe-dependent superoxide dismutase (sod) enzyme has been isolated on a 5.9-kb DNA fragment from *Porphyromonas gingivalis* ATCC 53977. Superoxide dismutase activity can be expressed from *P. gingivalis* DNA fragment and from subcloned fragment in *E. coli*. The expression of sod activity was evident when a Pst I-Hind III fragment was subcloned into plasmid vector pUC19 indicating that the expression was through the lac Z' promoter which is in the same orientation with the direction of the fragment encoding sod enzyme.

The sod activity was determined as an unit calculated by the reciprocal of the amount of protein/mg bacteria required for 50% inhibition of superoxide synthesis in xanthine/xanthine oxidase assay method. The activity was inhibited by the addition of 1mM H₂O₂ and significantly enhanced by the addition of 0.2mM Fe⁺⁺ and 0.12mM Mn⁺⁺ showing that the superoxide dismutase is Mn/Fe-dependent.

(This investigation was supported in part by grant DE08293 from the NIDR/NIH)