

무작위 클로닝법을 이용한 *Prevotella nigrescens* 9336 특이 DNA 프로브의 개발에 관한 연구

강순원 · 김세훈 · 김동기 · 성진효 · 김병욱 · 국중기¹⁾

조선대학교 치과대학 치주과학교실

조선대학교 치과대학 예방치과학교실

*조선대학교 치과대학 구강생화학교실

I. 서론

양대 구강병 중 하나인 치주질환은 30대 이후의 대부분의 국민에게서 보이는 대표적인 세균 감염성 질환으로써 국소적인 구강내의 여러 환경 조건과 숙주 요인이 깊이 관여하는 데, 가장 중요한 요인은 치면세균막 (치태)이다¹²⁾. 치태는 주로 세균으로 구성되어 있으며, 400가지 이상의 다른 종들이 치은연상과 치은연하의 잠재적인 증식자로 규명되어져 왔다^{7,13,18)}.

Prevotella 속은 여러 구강 및 비구강 감염부위에서 빈번하게 검출된다^{6,11)}. 최근 *Prevotella nigrescens* (*P. nigrescens*) 종은 *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) 종에서 다좌 효소 전기영동법 (multilocus enzyme electrophoresis)과 DNA-DNA homology grouping 등의 실험을 통해 새로운 종으로 독립 분류되었다¹⁷⁾. 이러한 분류학적인 변화를 바탕으로 치주질환 병소와 건강한 부위에서의 두 세균 종의 분포에 대한 역학조사들이 행하여졌다. 여러 연구 결과 *P. intermedia*는 치주질환 병소에서 증가하는 것으로 나타났지만 *P. nigrescens*는 근관질환에서 더 많이 검출되는 것으로 보고 되고 있으며, 치주질환관의 연관성에서는 여러 연구 결과에 따라 상이한 결과가 보고되고 있다^{3,4,11,17,19,20)}. 이러한 *P. nigrescens*와 치주질환간의 병인 관계의 결과가 다양한 이유는 다양한 연구 방법에 의한 차이 및 개체간의 차이에 의한 것으로 사료된다.

1 교신저자:국중기, 광주광역시 동구 서석동 421번지 조선대학교 치과대학 구강생화학교실, 우편번호:501-825

현재 치주질환과 종류와 세균간의 병인관계를 연구하기 위해 여러 가지 세균 동정법들이 개발되어 있다. 그러한 방법 중 가장 민감도와 특이성이 뛰어난 방법이 DNA로 DNA-DNA hybridization법, Dot hybridization법 및 중합효소연쇄반응법이다^{4,11,15,16}. DNA는 물리적 및 화학적으로 다른 생체 거대 분자들에 비해 안정하고, 그 염기서열을 비교적 쉽게 알아낼 수 있기 때문이다. 종간의 동정에는 16S 라이보솜 RNA 유전자를 이용한 방법이 가장 널리 이용되고 있다^{3,10}. 모든 세균의 16S rRNA 유전자 염기서열은 유사한 종간에 상동성이 높아 세균의 분류에 이용됨¹⁰에 착안하여 잘 보존된 염기서열 부위와 각 세균 종간에 상이한 염기서열을 찾아내어 중합효소연쇄반응 프라이머를 설계하여 중합효소연쇄반응법으로 세균을 동정하는 데 이용되고 있다^{1,2,21,22}. 하지만 그 염기서열이 거의 동일하기 때문에 아종 수준에서의 동정에는 사용할 수 없는 단점 있다. 아종 수준에서의 세균 동정에 있어 현재 많이 이용되고 있는 방법이 특정 유전자의 염기서열을 같은 세균 종의 strain에서 밝히고 이들을 비교하여 상동성이 떨어지는 부분의 염기서열을 이용하여 중합효소연쇄반응 프라이머를 제작하여 중합효소연쇄반응법으로 아종을 분류하기도 한다^{1,14}. 그 예가 *P. gingivalis*의 fimbria 유전자 염기서열을 이용한 방법으로 이를 이용하여 5가지 biotype을 식별하였다는 보고가 있었다^{1,14}. 하지만 *P. nigrescens*에 대한 특정 유전자에 대한 염기서열이 보고된 것이 현재 Gene Bank 데이터 베이스에는 존재하지 않고 한국인에 대한 표준균주조차 확립되어 있지 않는 실정이다.

그러므로, 본 연구에서는 *P. nigrescens* 9336의 지놈 DNA를 추출하여 이들을 제한 효소로 절단하여 DNA 절편을 얻고, 이를 DNA-DNA hybridization법으로 확인하여 *P. nigrescens* 9336을 특이하게 검출할 수 있는 DNA 프로브들을 클로닝하고, 향후 한국인의 구강 내에서 *P. nigrescens* 종을 배양하여 이들의 아종 수준에서의 분류에 사용할 있는 지를 검증하여, *P. nigrescens* 아종 수준에서 치주질환 및 다른 구강내 감염 질환에서의 병인 연구에 사용하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 세균 및 배양

본 연구에서 사용한 각 세균 종의 표준균주는 Table 1과 같고 이들은 American Type Culture Collection (University Boulevard, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *P. nigrescens* 등은 3% Tryptic soy broth, 0.5% Yeast extract, 0.05% Cysteine HCl, 0.5 mg/ml hemin, 2 µg/ml vitamin K₁으로 배합된 배지에서, *F. nucleatum*은 Schaedler broth (DIFCO Laboratories, Detroit, Mich) 배지에서, *A. actinomycetemcomitans*는 3% Tryptic soy broth (DIFCO Laboratories, Detroit, Mich), 0.1% Yeast extract (DIFCO Laboratories, Detroit, Mich), 5 µg/ml vancomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA), 75 µg/ml bacitracin 및 10% horse serum (GibcoBRL, Gaithersberg, MD, USA)으로 배합된 배지에서, *C. rectus*는 3.7% Brain Heart Infusion broth (BHI, DIFCO Laboratories, Detroit, Mich), 0.5% Yeast extract, 2.0% sodium formate (Sigma, St. Louis, MO), 3.0% sodium fumarate (Sigma, St. Louis, MO), 0.5 mg/ml hemin, 2 µg/ml vitamin K₁으로 배합된 배지에서 각각의 세균종을 배양하고자 한다. 이 때 *A. actinomycetemcomitans*는 10% CO₂가 유지되는 배양기에서 배양하며, 그 이외의 모든 세균 종들은 85% N₂, 5% H₂, 10% CO₂의 혼합가스가 공급되는 37°C anaerobic chamber (Model Bactron I, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, Or, USA)에서 2~7일 동안 배양하여 아래의 실험에 이용하고자 한다.

2. 세균의 지놈 DNA의 추출

각각의 세균을 100 ml의 액체 배지에서 배양하고, 원심분리기에서 원심분리(7,000 ×g, 10분)하여 세균 pellet을 얻고, 이를 Tris-EDTA (TE) 완충액 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) 1 ml에 다시 잘 현탁한 다음, DNAzol 용액 (Molecular Research center, USA) 9 ml를 천천히 넣은 다음 원심분리 (10,000 x g, 10분)하여 상청액을 50 ml conical tube에 넣은 다음 100% 에탄올 20 ml를 첨가하여 세균의 지놈 DNA를 침전시킨 후 80% 에탄올로 침전 DNA를 씻고 냉동하였다. 건조된 DNA를

TE 완충액 1 ml에 용해하여 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

3. *P. nigrescens* 9336 지놈 DNA의 *Hind* III 제한절편의 무작위적 클로닝

위에서 추출한 *P. nigrescens* 9336의 지놈 DNA 10 µg를 *Hind* III 제한효소로 소화한 후 *Hind* III 제한효소로 소화시키고 bacterial alkaline phosphatase로 dephosphorylation시킨 pBluscriptII KS(+) vector (Stratagen Inc., Woodinville, WA, USA)와 함께 T4 DNA ligase (Bioneer Corp., Seoul, Korea)로 처리한 후 CaCl₂로 처리한 *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5α에 transformation시키고 ampicillin (100 µg/ml)-LB 한천평판배지에 도발하여 37°C에서 16시간 배양하였다. 세균 균락 각각을 3 ml의 ampicillin-LB broth에 접종하여 37°C에서 16시간 배양하여 플라스미드를 추출하였다.

4. 플라스미드 DNA 추출

Bacterial cell (*E. coli* DH5α)에 transformation시킨 각각의 재조합된 플라스미드 DNA는 통상의 alkaline lysis법¹⁵⁾으로 AccuPrep™ Plasmid Extraction Kit (Bioneer Corp., Korea)를 이용하여 제조회사의 지시대로 추출하였다. 이를 간략히 설명하면, 세균배양액 1 ml을 30초간 원심 (12,000 x g)하고, 얻어진 세균 덩어리를 250 µl의 Resuspension buffer를 가하여 잘 현탁한 후, 250 µl Lysis buffer를 첨가하여 천천히 잘 혼합한 다음, 350 µl의 Neutralization buffer를 첨가한 즉시 잘 섞은 후에 얼음에 5분간 방치하였다. 이것을 100분간 원심분리 (12,000 x g)하여 상청액을 binding column tube에 옮기고, 1 분간 원심분리 (12,000 x g)하였다. 여과액은 버리고, binding column tube에 80% 에탄올을 700 µl 넣은 후 1분간 1 분간 원심분리 (12,000 x g)하였다. binding column tube에 남아있을 여분의 에탄올을 제거하기 위해 여과액을 버리고, 다시 30초간 원심분리 (12,000 x g)하였다. Binding column을 새로운 eppendorf tube로 옮기고, 여기에 100 µl의 Elution buffer를 넣고 1분간 기다린 다음 다시 1분간 원심분리 (12,000 x g)하여 여과액을 -70°C에서 보관하여 다음 실험에 사용하였다.

5. DNA 프로브의 정제 및 표지

DNA 프로브의 정제는 PCR DNA Purification kit (BioAtoZ Inc., Seoul, Korea)를 이용하여 정제하였다. 이를 간략히 설명하자면, 전기영동 후 Agarose gel상에서 정제하고자 하는 DNA 절편이 있는 부분을 깨끗하게 절제하여 1.5 ml eppendorf tube에 넣고 PCR prep buffer를 Agarose gel 250 mg당 500 μ l를 넣은 후 50°C에서 5분 동안 중탕하여 젤이 완전히 녹인 다음 Spin Column에 옮겨 실온에서 14,000 x g에서 10초간 원심분리하고, Spin Column에 800 μ l의 Wash Solution을 넣고 실온에서 14,000 x g에서 10초간 원심분리하여 column을 통과한 용액을 버리고 다시 300 μ l의 Wash Solution을 넣고 실온에서 14,000 x g에서 2분간 원심분리하여 Spin Column을 새로운 1.5 ml eppendorf tube에 옮기고 여기에 30 μ l의 Elution Buffer를 넣고 실온에서 14,000 x g에서 1분간 원심분리하여 그 여과액을 보관하여 실험에 사용하였다.

DNA 프로브는 DIG-High Prime (Boehringer Mannheim Inc.)을 이용하여 표지하였다. 표지 과정은 1 μ g의 DNA에 최종 부피가 16 μ l가 되도록 증류수를 넣고 끓는 물에서 10분간 가열하여 DNA를 변성시킨 후 재빨리 얼음에 넣어 식혔다. 여기에 4 μ l DIG-High Prime을 첨가하여 잘 섞고 잠깐 원침한 후 37°C에서 12시간 배양하였다. 배양 후 0.2 M EDTA를 넣어 반응을 정지시켰다.

6. Reverse dot hybridization 및 Southern blot hybridization법

Reverse dot을 시행하기 위해 20 ng의 지놈 DNA 제한효소절편을 95°C에서 10분간 끓인 다음 바로 얼음에 5분간 방치한 다음 Nylon membrane (Boehringer Mannheim Inc.)에 blotting하고, 120°C 진공오븐에서 30분 동안 baking하여 DNA를 membrane에 고정시켰다.

Southern blot을 시행하기 위해 각 세균에서 추출한 5 μ g의 genomic DNA를 0.8% Agarose gel에 전기영동하고 Vacuum Blotter (Model 785, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 통상의 vacuum transfer법으로 Nylon membrane (Boehringer Mannheim Inc.)에 transfer하고, 120°C 진공오븐에서 30분 동안 baking하여 DNA를 membrane에 고정시켰다.

Hybridization은 통법으로 시행하였다. 이를 간략히 설명하자면, membrane을 hybridization 용액 (5× SSC, 50% formamide, 0.1% sodium-lauroylsarcosine, 0.02% SDS, 2% Blocking Reagent)으로 2시간 동안 prehybridization시킨 다음 이를 버리고, 새로운 hybridization 용액에 DIG-High Prime (Boehringer Mannheim Inc.)을 이용하여 labeling시킨 각 세균의 전체 지놈 또는 DNA 프로브를 첨가하여 12시간 hybridization시켰다. Membrane을 실온에서 5분간 2× wash 용액 (2× SSC, 0.1% SDS)으로 2회 세척하고 다시 0.5× wash 용액 (0.5× SSC, 0.1% SDS)으로 68°C에서 15분간 2번 세척하였다.

표지된 DNA 프로브가 membrane 상의 표적 DNA 가닥과 hybridization됨을 알아보기 위한 detection 과정은 BM사의 chemiluminescent detection kit를 사용하였으며, 제조사의 지시대로 시행하였다. 이를 설명하자면, membrane을 100 ml의 Blocking solution (buffer 2)에 넣고 30분간 배양한 후 buffer 2에 anti-DIG-AP conjugate를 75 mU/ml (1:10000) 첨가하여 희석한 20 ml antibody solution에 membrane을 넣고 30분간 반응시켜서 15분간 100 ml의 washing buffer로 2회 세척하였다. Membrane을 20 ml의 Detection buffer (buffer 3)에서 2~5분간 안정되게 하였다. DNA쪽이 위로가게 하여 membrane을 polyethylene film상에 놓고 약 1 ml의 기질 (CSPD[®])용액을 적용한 후, 즉시 반대측 sheet로 덮어 기질이 membrane상에 고루 퍼질 수 있게 하였다. 5분간 상온에서 반응후 과량의 액을 제거하고 film의 가장자리를 봉하여, luminescent reaction이 일어나도록 37°C 배양기에서 15분간 반응시킨 후, 상온에서 X-ray film (Lumi-film chemiluminescen[®], Boehringer Mannheim Inc.)에 1~3 시간 노출시켰다.

Table 1. Bacterial type strains used in this study

Species and strains					
<i>Prevotella nigrescens</i> ATCC 33563					
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611					
<i>Prevotella intermedia</i> G8-9K-3					
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586					
<i>Fusobacterium</i>	<i>nucleatum</i>	subsp.	<i>nucleatum</i>	ATCC	23726
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>fusiforme</i> ATCC 51190					
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953					
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>vincentii</i> ATCC 49256					
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> ATCC 43717					
<i>Actinobacillus</i>	<i>actinomycetemcomitans</i>			ATCC	43718
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> ATCC 33384					
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 53978					
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277					
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 49417					
<i>Campylobacter rectus</i> ATCC 33238					

III. 연구결과

III-1. *P. nigrescens* 9336 지놈 DNA의 *Hind* III 제한절편의 무작위적 클로닝

P. nigrescens 9336 지놈 DNA의 *Hind* III 제한절편의 무작위적 클로닝의 결과 약 200여 개의 세균 집락이 나타났으며 그 중 흰색을 띄는 35개의 집락에서 플라스미드를 추출하여 이를 *Hind* III 제한효소로 소화하여 0.8% agarose 젤 상에서 전기영동하여 본 결과 35개 모두의 집락이 지놈 DNA 제한효소 절편을 함유하고 있었고, 이들 *P. nigrescens* 9336 지놈 DNA를 함유한 재조합 플라스미드들을 각각 pBL-Pn* (*는 배양한 세균의 순서를 의미함)라고 명명하였으며, 재조합 플라스미드에 삽입된 *P. nigrescens* 9336 지놈 DNA는 Pn*라고 명명하였다 (Fig. 1). ■

III-2. Reverse Dot hybridization 및 Southern blot analysis에 의한 *P. nigrescens* 9336 특이 DNA 프로브들의 검색

P. nigrescens 9336 특이 DNA 프로브를 검색하기 위해 Reverse dot hybridization의 결과 Pn 10 프로브는 *P. nigrescens* 9336 지놈 DNA만 반응하였고, Pn 23 및 Pn 35 프로브들은 *P. intermedia*와도 미약한 반응을 보였다 (Fig. 2). Southern blot analysis를 시행하기 위해 본 연구에 이용된 각 세균 종의 지놈 DNA를 *Hind* III 제한효소로 절단하여 0.8% 아가로스 젤 상에 전기영동한 결과 대체적으로 잘 절단된 양상을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3). Southern blot analysis 결과에서는 Pn 10, Pn 23 및 Pn 35 프로브들 모두 *P. nigrescens* 9336에 특이적으로 반응하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 4-6).

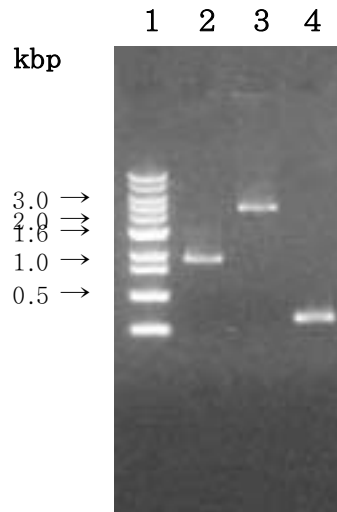


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of purified genomic DNA fragments of *P. nigrescens* 9336 digested with *Hind* III restriction enzyme. Lane 1, 1 kilobase pair DNA ladder (Bioneer, Corp., Seoul, Korea); 2 to 4, Purified 1.9-kbp Pn10, 4.5-kbp Pn23, and 0.6-kbp Pn35 DNA fragment, respectively. kbp, kilobase pairs.

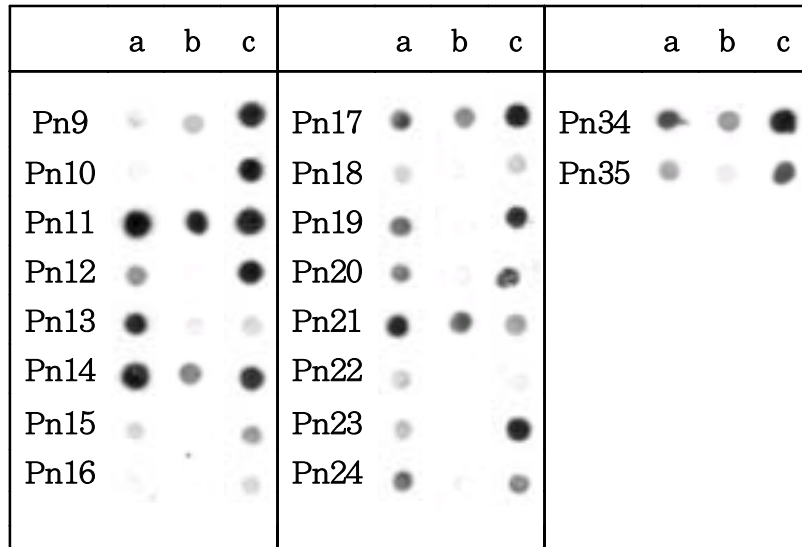


Figure 2. Reverse dot hybridization with DIG-labeled genomic DNA fragments (**a**, *P. intermedia* ATCC 25611; **b**, *P. intermedia* G8-9K-3; **c**, *P. nigrescens* 9336) to DNA probes cloned from *P. nigrescens* 9336 (Pi9 to 35).

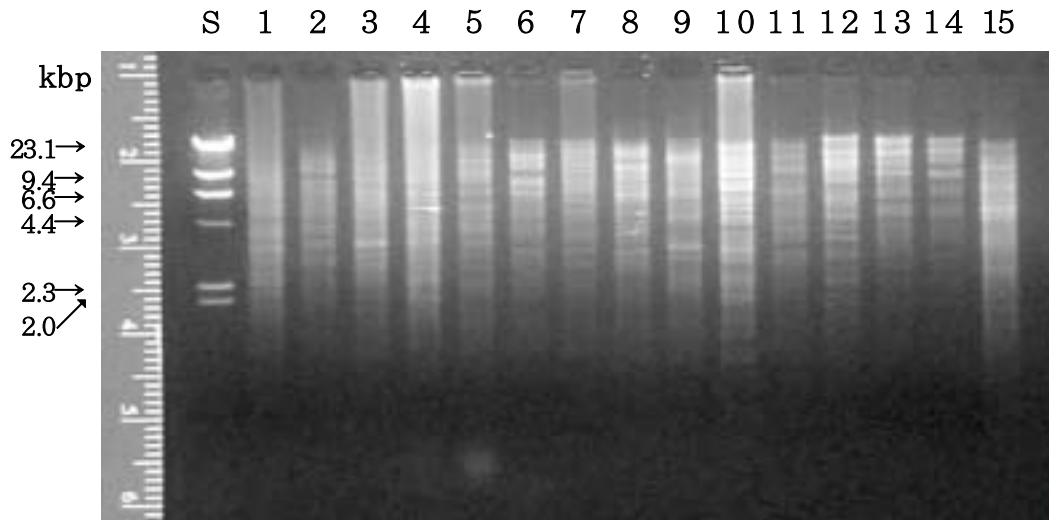
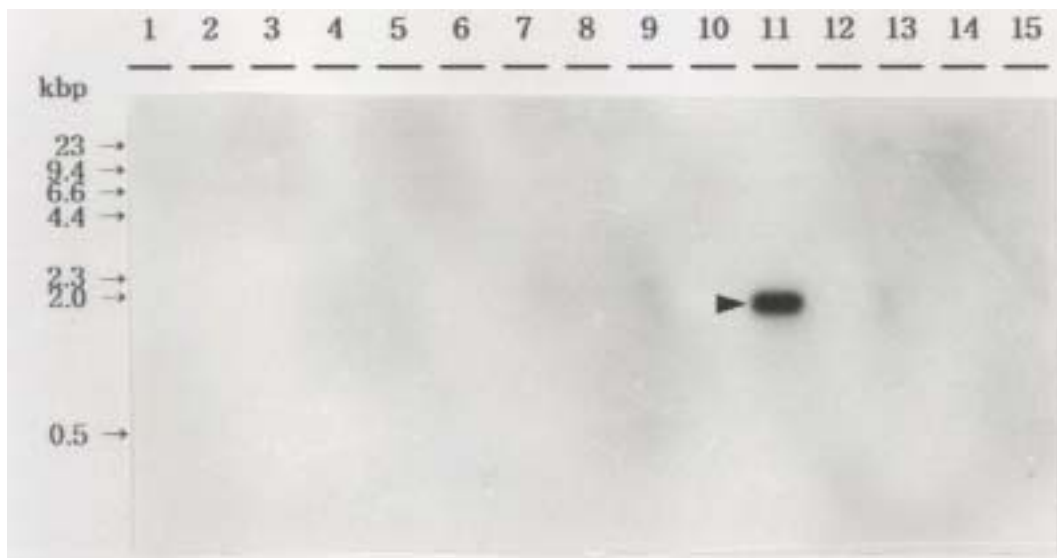
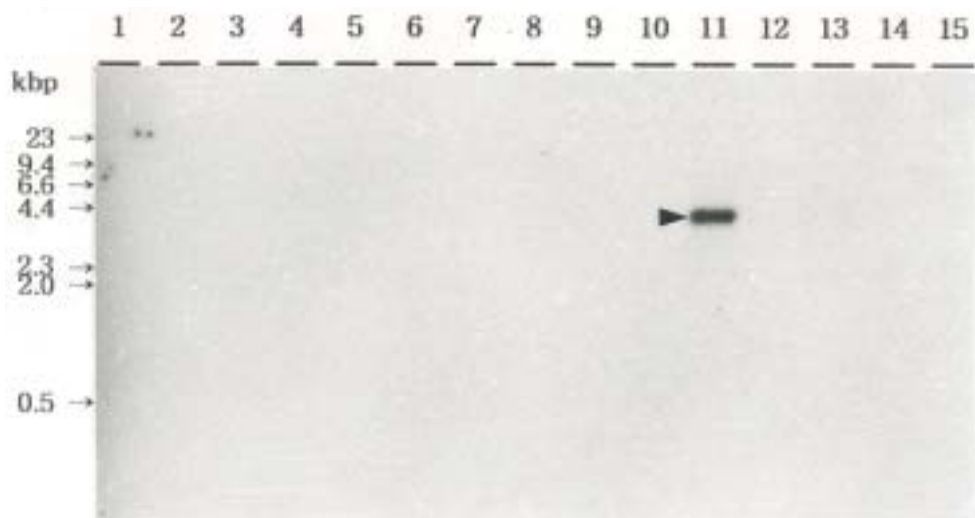
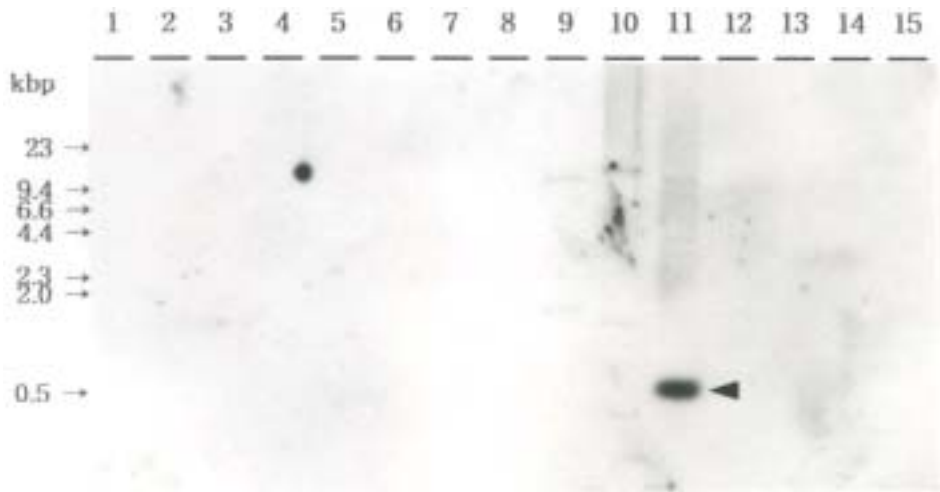


Figure 3. Agarose gel electrophoresis of *Hind* III-digested genomic DNA of bacteria used in this study. Lane S, *Hind* III-digested DNA size marker; lane 1-5, *Hind* III-digested genomic DNA of *F. nucleatum* ATCC 25586, 23726, 10953, 49256, and 51190, respectively; lane 6-8, *P. gingivalis* ATCC 53978, 33277, & 49417, respectively; lane 9-10, *P. intermedia* ATCC 25611, & *P. intermedia* G8-9K-3; lane 11, *P. nigrescens* 9336; lane 12-14, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43717, 43718, & 33384, respectively; and lane 15, *C. rectus* ATCC 33238. kbp, kilobase pairs.







IV. 총괄 및 고안

P. nigrescens 종은 최근 *P. intermedia* 종에서 독립 분리되었으며, 아직까지 아종 수준에서의 분류가 되어 있지 않다¹⁷⁾. 또한 재분류된 지가 얼마되지 않아 아직 치주질환과의 뚜렷한 연관성이 확립되어 있지는 않다. 그러므로, 이들 *P. nigrescens* 종의 치주질환 병소에서의 배양과 이들의 characterization이 이루어져야 할 것이다. 그 특성 및 아종 수준에서의 분류가 비교적 잘되어 있는 종에 있어서 아종간에 그 병원성이 차이가 있음이 보고되었다⁵⁾. 그러므로, *P. nigrescens* 종은 아직 아종 수준에서의 재분류가 되어있지 않지만 이들의 아종 수준에서의 분류에 사용할 도구를 개발하는 것이 중요하리라 사료된다.

기존의 세균의 종-특이 프로브를 찾는 방법은 먼저 세균 지놈 DNA의 제한효소절편을 얻은 다음 각각의 DNA 프로브당 한 번의 Southern blot hybridization을 해야하기 때문에 많은 시간과 노동력이 소모되었다. 이러한 단점을 보완하고자 본 연구에서는 Kook 등¹⁰⁾이 개발한 reverse dot hybridization 법을 이용하여 종-특이 DNA 프로브를 검색하였다. Reverse dot hybridization법은 기존의 Southern blot analysis와는 반대로 검색하고자 하는 DNA 프로브를 Nylon membrane에 blotting한 다음, 세균의 지놈 DNA를 표지하여 hybridization 및 detection을 하는 방법이다. 본 연구의 reverse dot hybridization 와 Southern blot analysis의 결과에서 Pn10, Pn 23 및 Pn35 프로브들은 다른 세균 종과는 hybridization되지 않고, *P. nigrescens* 9336 지놈 DNA와만 특이적 hybridization됨을 알 수 있었다 (Fig. 4~6). Pn 10 프로브의 reverse dot hybridization 결과와 Southern blot hybridization 결과는 일치하였지만 (Fig 40), Pn 23 및 Pn35 프로브에 대한 결과는 차이가 있었다 (Fig. 5 & 6). 현재로써는 이러한 결과를 해석하기는 어렵고, 이들 프로브들의 핵산염기서열을 결정하여, 어떤 유전자인지를 확인하고, 이들을 각각의 균주에서 클로닝한 다음 이들의 염기서열을 비교 분석해야 할 것으로 사료된다.

현재까지 *P. nigrescens* 9336에 대한 한국인의 표준 균주가 확립되어 있지 않고, 다른 *P. nigrescens* 균주들에 대한 실험적 결과물이 없기 때문에 본 연구 결과에서 얻은

Pn10, Pn 23 및 Pn35 프로브들이 균주 수준에서 *P. nigrescens*를 구별할 수 있는 프로브인지 아니지는 현재로서는 알 수는 없다. 그러므로, 앞으로 환자의 구강 내에서 *P. nigrescens*을 배양 분류하여 실험을 해보아야 할 것으로 사료된다. 또한 Southern blot hybridization법은 중합효소연쇄반응법에 비해 그 민감도, 정확도, 특이도, 신속성 및 경제성 등이 떨어지기 때문에 차후 DNA 염기서열을 밝혀, 어떤 단백질을 만들어내는지를 알아내고, 구강에서 분류한 세균들에서 같은 유전자를 클로닝하여 이들의 염기서열을 비교 분석하여 중합효소연쇄반응 프라이머를 제작하여 그 유사성이 비슷한 strain간의 구별에 이용할 수 있다면, 아종 수준에서 *P. nigrescens*를 구별할 수 있는 좋은 도구로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서 이용하였던 무작위 클로닝법과는 달리 특정 유전자의 염기서열을 이용하여 아종 수준에서의 세균 분류하는 방법도 있다. 그 대표적인 예가 *P. gingivalis*의 fimbria 유전자 염기서열을 이용한 방법으로 이를 이용하여 *P. gingivalis* 종을 5가지 biotype을 구별한 연구이다^{1,14}. 이러한 경우 5가지 모든 biotype의 fimbria 유전자 염기서열이 알려져 있었기 때문에 가능하였지만 세균 종의 특정 유전자에 대한 연구가 많이 진해되지 않은 경우에 있어서는 특정 유전자 염기서열을 주형으로 한 중합효소연쇄반응 프라이머를 설계할 수 없다는 단점이 있다. 본 연구에서 사용하였던 무작위 클로닝법은 상대적으로 많은 시간과 노동력이 필요한 실험이지만 본 실험의 결과와 같이 여러 개의 아종- 또는 균주-특이 DNA 프로브를 찾을 수 있다는 장점이 있다. 특이 확률적으로 아종 수준에서의 구별을 할 수 있는 유전자를 찾기가 어렵지만 동시에 여러 가지 DNA 절편을 얻어 종-특이도 여부를 확인할 수 있기 때문에 이를 바탕으로 중합효소연쇄반응 프라이머를 제작하여 중합효소연쇄반응법으로 아종 또는 균주 수준에서의 동정 및 검출에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서 얻어진 Pn10, Pn 23 및 Pn35 프로브들은 *P. nigrescens*을 동정하고, 분류하는 데 이용될 수 있어 *P. nigrescens*와 치주질환간의 광범위한 역학조사시 기초 도구로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

현재 치주질환과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있는 치주병원성 세균 중의 하나인 *P. nigrescens*를 아종 수준에서의 신속한 검출 및 동정을 위한 strain-특이 DNA 특이 프로브를 개발하고자 *P. nigrescens* 9336 지놈 DNA를 추출하여 *Hind* III 제한효소로 소화하여 genomic DNA library를 제작하고, Southern blot hybridization법 및 중합효소연쇄반응법을 시행한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *P. nigrescens* 9336 지놈 DNA에서 35개의 *Hind* III 제한효소절편을 얻어 screening한 결과 Pn10, Pn 23 및 Pn35 프로브들은 Reverse dot analysis법 및 Southern blot analysis법에 의해 *P. nigrescens* 9336을 strain 수준에서 동정할 수 있는 것으로 파악되었다.

이상과 같은 결과로, 성인성 치주염의 한 원인균으로 알려져 있는 *P. nigrescens*의 아종 수준에서의 검출 및 동정을 위해 개발된 *P. nigrescens* 9336에 대한 strain 특이 DNA probe를 기초로 한 *P. nigrescens*과 치주질환간의 광범위한 역학조사시 기초 도구로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Amano A, Nakagawa I, Kataoka K, Morisaki I, Hamada S. Distribution and *Porphyromonas gingivalis* strains with *fimA* gene genotype in periodontitis patients. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1426-1430, 1993.
2. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol. Immunol.* **11**:266-273, 1996.
3. Bae KS, Baumgartner JC, Shearer TR, David LL. Occurrence of *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* in infections of endodontic origin. *J. Endodontics* **23**:620-623, 1997.
4. Conrads G, Mutters R, Fischer J, et.al. PCR reaction and dot-blot hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally health individuals. *J. Periodontol.* **67**:994-1003, 1996.
5. Dzink JL, Sheenan MT, Socransky SS, "reposal of three subspecies of *Fusobacterium nucleatum* Knorr 1922: *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* subsp. nov., comb. nov.; *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* subsp. nov., nom. nev., comb. nov.; and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii* subsp. nov., nom. rev., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**:74-78, 1990.
6. Finegold SM, Strong CA, McTeague M, Marina M. The importance of black-pigmented gram-negative anaerobes in human infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **6**:77-82, 1993.
7. Genco RJ, Loos BG. The use of genomic DNA fingerprinting in studies of the epidemiology of bacteria in periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **18**:396-405, 1991.
8. Gharbia SE, Haapasalo M, Shah HN, et.al. Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates from periodontic and endodontic

- infections. *J. Periodontology*, **65**:56-61, 1994.
9. Kook J-K, Han JJ, Kim MK, et.al. Reverse Dot Hybridization Method: A New Method for Rapid Screening of Bacterial Species-Specific DNA probe. *Exp. Mol. Med.* **33(3, Suppl)**:114, 2001.
 10. Maidak BL, Olsen GJ, Larsen N, et.al. The ribosomal database project (RDP). **24**:82-85, 1996.
 11. Mättö J, Asikainen S, Väisänen ML, et.al. Role of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in extraoral and some odontogenic infections. *Clin. Infect. Dis.* **25(Suppl. 2)**:S194-S198, 1997.
 12. Moore WEC, Moore LH, Ranney RR, et.al.. The microflora of periodontal sites showing active destructive progression. *J. Clin. Periodontol* **18**:729-739, 1991.
 13. Moore WE, Holdeman, LV, Smibert RM, et.al. Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. *Infect. Immun.* **38**:1137-1148, 1982.
 14. Nakagawa I, Amano A, Kimura RK, et.al. Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gingivalis* carrying a new type of fimA gene. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1909-1914, 2000.
 15. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Ed, 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1988.
 16. Savitt ED, Keville MW, Peros WJ. DNA probes in the diagnosis of periodontal microorganisms. *Arch. Oral Biol.* **35**:153s-159s, 1990.
 17. Shah HN, SE Gharbia. Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**:542-546, 1992.
 18. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* **25**:134-144, 1998.
 19. Teanpaisan R, Baxter AM, Douglas CW. Production and sensitivity of bacteriocin-like activity among *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*

- and *Pr. nigrescens* strains isolated from periodontal sites. *J. Med. Microbiol.* **47**:585-589, 1998.
20. Teanpaisan R, Douglas SWI, Walsh TF. Characterisation of black-pigmented anaerobes isolated from diseased and healthy periodontal sites. *J. Periodontal Res.* **30**:245-251, 1995.
21. Trans SD, Rudney JD. Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and *Porphyromonas gingivalis*. *J. Clin. Microbiol.* **34**:2674-2678, 1996.
22. Watanabe K, Frommel TO. *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and *Treponema denticola* detection in oral plaque samples using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Periodontol.* **23**:212-219, 1996.

ABSTRACT

Study on isolation of *Prevotella nigrescens* 9336-specific DNA probes using random cloning method

Soon-Won Gang, Se-Hoon Kim, Dong-ki kim, Jin-Hyo Seong,
Byung-Ock Kim, Jung-Ki Kim*

Dept. of Periodontology, Dept. of preventive Dentistry, Dept. of Oral Biochemistry*,
College of Dentistry, Chosun University

The purpose of this study is to develop species-specific DNA probes and polymerase chain reaction (PCR) primers for detection and identification of *Prevotella nigrescens* (*P. nigrescens*) 9336. This study procedure includes (1) whole-genomic DNA extraction of *P. nigrescens* 9336 (2) construction of the genomic DNA library, (3) screening of strain-specific DNA probe by reverse Dot Hybridization method, (4) confirmation of strain-specific DNA probe by Southern blot analysis, (5) determination of nucleotide sequences of strain-specific DNA probe. Thirty-five restriction fragments of *P. nigrescens* 9336 genomic DNA digested with the *Hind* III were obtained. Reverse dot hybridization and Southern blot analysis data showed that three of them, Pn10, Pn23, and Pn35, could be *P. nigrescens* 9336-specific DNA probes. These data indicated that these DNA probes could be useful in detection and identification of the *P. nigrescens* 9336.