

Prevotella intermedia G8-9K-3을 동정할 수 있는 DNA 프로브의 개발에 관한 연구

백종성 · 김세훈 · 김동기 · 성진효 · 김병옥 · 국중기¹⁾

조선대학교 치과대학 치주과학교실

조선대학교 치과대학 예방치과학교실

*조선대학교 치과대학 구강생화학교실

I. 서 론

Prevotella intermedia (*P. intermedia*) 종은 그람 음성 혐기성 간균으로서 치주질환과 밀접한 관련이 있는 병원균으로 분류되고 있으며, 치주질환 병소^{1,12,25,26)}, 여러 종류의 치은염, 예를 들어, 임신성 치은염²⁰⁾, 급성 괴사성 궤양성 치은염¹²⁾ 그리고, human immunodeficiency virus²⁹⁾와 연관된 치은염에서 빈번하게 검출되고 있다. Johnson과 Holdman⁹⁾의 연구 결과에 의해 *P. intermedia* 종에 2개의 DNA 상동성 그룹이 존재함이 관찰되었고, Shad와 Gharbia²⁴⁾에 의해 2개의 그룹이 존재함이 확인되었으며, 그 중 한 그룹이 *Prevotella nigrescens* (*P. nigrescens*) 종으로 분리 독립되었다.

지난 몇 년 전부터 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*을 구별하기 위해 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), lipase activity test²⁴⁾, gas-liquid chromatography, biochemical test, 중합효소연쇄반응법 등 여러 가지 방법들이 시도되었다^{4,5,6,8)}. 그 중에서도 중합효소연쇄반응법이 가장 민감도 있게 두 종을 구별할 수 있는 것으로 판명되었고, Premaraj등¹⁹⁾에 의한 연구에 의하면, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하는 경우 몇몇 환자 분류 균주에서 교차반응이 나타났으며, 그 이외의 방법들은 효용성이 없는 것

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

으로 판명되었다. 세균을 종 수준에서 동정 및 검출을 하기 위한 중합효소연쇄반응 프라이머는 일반적으로 16S ribosomal RNA (rRNA) 유전자의 염기서열을 주형으로 해서 설계 제작되었다^{2,13)}. 세균의 16S rRNA 염기서열에는 모든 세균 종에 모두 잘 보존된 염기서열 부위와 종간에 상이한 염기서열이 존재하기 때문에 상이한 염기서열을 이용하면 비교적 수월하게 종-특이 중합효소연쇄반응 프라이머를 설계할 수 있기 때문이다. 하지만 16S rRNA 유전자 염기서열은 같은 종에서는 그 상동성이 매우 높기 때문에 아종-특이 프라이머 제작에는 주형으로 사용할 수 없다.

현재 *P. intermedia* 종 내의 아종이 존재하는 지는 알려져 있지 않다. *P. intermedia* 종도 치주질환 병소에만 검출되는 것이 아니라 건강한 치주부위에서도 검출된다¹¹⁾. 이러한 이유에 대한 연구 결과는 아직까지 보고된 바는 없지만 종 내에 병원성 및 비병원성의 특성을 갖는 아종이 존재할 가능성이 있다. 그러므로, 본 연구에서는 *P. intermedia* G8-9K-3을 *P. nirgrescens* 종 뿐만 아니라 *P. intermedia* ATCC 25611로부터 구별할 수 있는 DNA 프로브를 클로닝하고, 이를 *P. intermedia* G8-9K-3의 아종 또는 균주 수준에서의 동정에 사용하고자 한다.

II. 연구 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 ×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. intermedia* G8-9K-3 지놈 DNA의 *Hind* III 제한절편의 무작위적 클로닝

위에서 추출한 *P. intermedia* G8-9K-3의 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

E. coli DH5α에 transformation시킨 각각의 재조합된 플라스미드 DNA는 통상의 alkaline lysis법²¹⁾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, 제조회사의 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 intermedia</i> G8-9K-3					
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611					
<i>Prevotella nigrescens</i> ATCC 33563					
<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

1. *P. intermedia* G8-9K-3 지놈 DNA의 *Hind* III 제한절편의 무작위적 클로닝

P. intermedia G8-9K-3 지놈 DNA의 *Hind* III 제한절편의 무작위적 클로닝의 결과 약 200여 개의 세균 집락이 나타났으며 그 중 흰색을 띄는 30개의 집락에서 플라스미드를 추출하여 이를 *Hind* III 제한효소로 소화하여 0.8% agarose 겔 상에서 전기영동하여 본 결과 28개의 집락이 지놈 DNA 제한효소 절편을 함유하고 있었고 (Fig. 1), 이들 *P. intermedia* G8-9K-3 지놈 DNA를 함유한 재조합 플라스미드들을 각각 pBL-Pig* (*는 배양한 세균의 순서를 의미함)라고 명명하였으며, 재조합 플라스미드에 삽입된 *P. intermedia* G8-9K-3 지놈 DNA는 Pig*라고 명명하였다. ■

2. Reverse Dot hybridization 및 Southern blot analysis에 의한 *P. intermedia* G8-9K-3 특이 DNA 프로브들의 검색

P. intermedia G8-9K-3 특이 DNA 프로브를 검색하기 위해 Reverse Dot hybridization 및 Southern blot analysis를 실시한 결과 28개의 DNA 프로브들 중 Pig3만이 *P. intermedia* G8-9K-3에 특이적으로 반응하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 2).

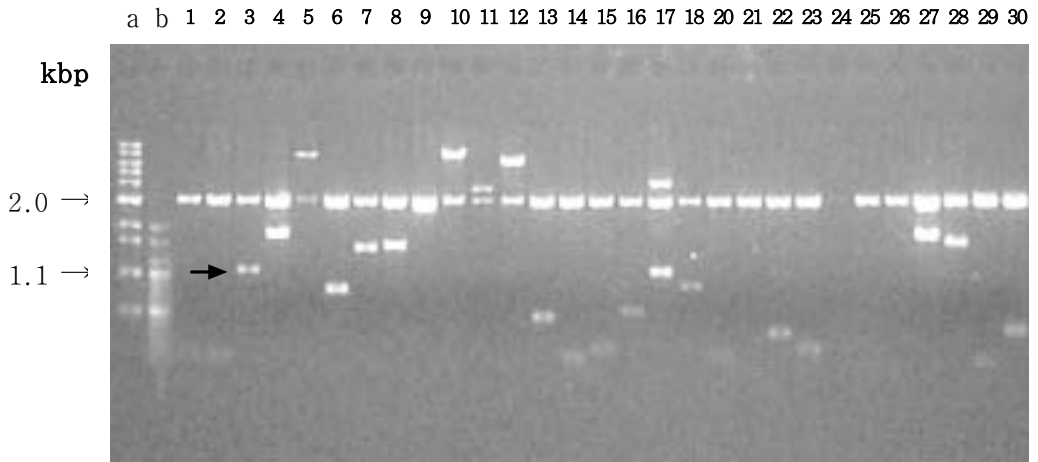


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of *Hind* III-digested recombinant plasmids containing genomic DNA fragments of *P. intermedia* G8-9K-3. Lane **a**, 1 kilobase pair DNA ladder (Bioneer, Corp., Seoul, Korea); **b**, 100 base pair DNA ladder (Bioneer, Corp., Seoul, Korea); 1 to 30, *Hind* III-digested pBL-Pig1 to pBL-Pig30, respectively. The arrow indicates 1.1-kbp Pig3 probe. kbp, kilobase pairs.

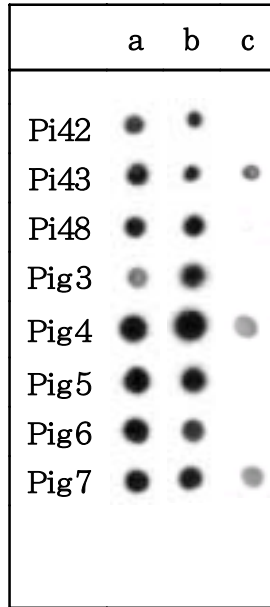


Figure 2. Reverse dot hybridization with DIG-labeled genomic DNAs (**a**, *P. intermedia* ATCC 25611; **b**, *P. intermedia* G8-9K-3; **c**, *P. nigrescens* 9336) to DNA probes from *P. intermedia* ATCC 25611 (Pi42, Pi43, and Pi48) and *P. intermedia* G8-9K-3 (Pig 3 to Pig7).

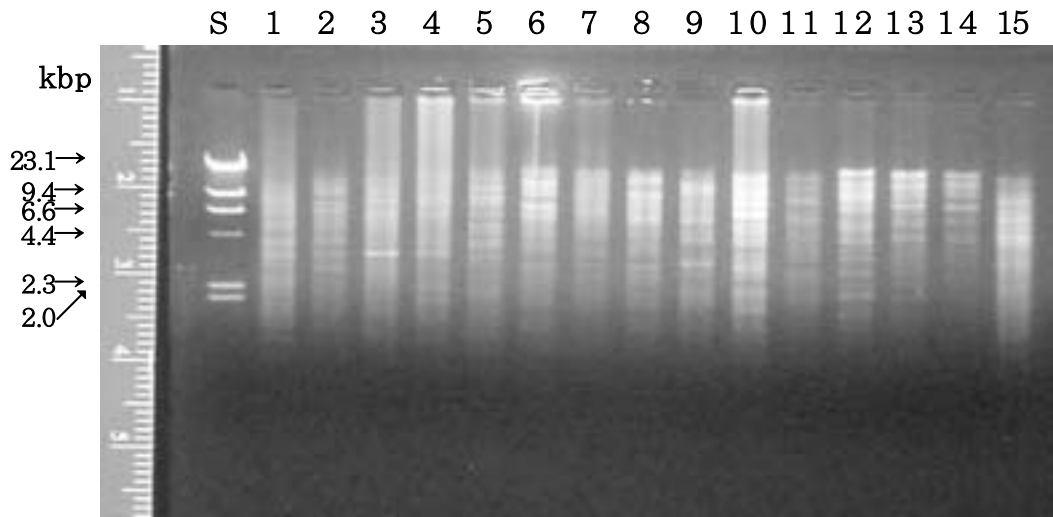


Figure 3. Agarose gel electrophoresis of *Hind* III-digested genomic DNA of bacteria used in this study. Lane S, *Hind* III-digested DNA size marker; lane 1-5, *Hind* III-digested genomic DNA of *F. nucleatum* ATCC 25586, 23726, 10953, 49256, and 51190, respectively; lane 6-8, *P. gingivalis* ATCC 53978, 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, killobase pairs.

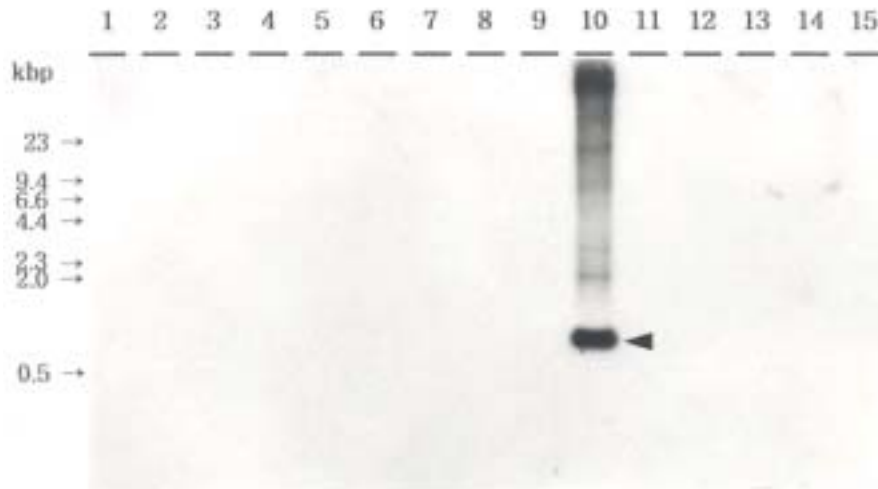


Figure 4. Southern blot hybridization of genomic DNAs from in this study to DIG-oxigenin-labeled probe Fig3. Lane S, *Hind* III-digested DNA size marker; lane 1-5, *Hind* III-digested genomic DNA of *F. nucleatum* ATCC 25586, 23726, 10953, 49256, and 51190, respectively; lane 6-8, *P. gingivalis* ATCC 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. The arrow head indicates the band hybridized to DIG-oxigenin-labeled probe Fig3. kbp, kilobase pairs.

IV. 총괄 및 고안

분자생물학의 발달로 약 20여년 전부터 구강내 치주질환 병인균의 동정에 대한 연구가 기존의 세균배양법¹⁶⁾에서 세균 지놈 DNA를 이용한 DNA 프로브법이나 중합효소연쇄반응법 등을 이용한 방법으로 바뀌어가고 있다^{2,3,7,8,17,18,22,23,24,27,30)}. 세균배양법은 많은 시간, 노동력 및 경제력이 필요하기 때문에 치주질환과 특정 세균 종간의 병인론 연구에 있어서 많은 제약이 있었다. 이러한 기술적인 어려움이 있기 때문에 신속하고 정확한 세균의 동정법이 필요하게 되었고, 이러한 조건을 만족시킬 만한 방법으로 고안된 것이 세균의 지놈 DNA를 이용한 hybridization 법^{8,17,22,23)}과 세균의 세포막 항원에 대한 특이 항원을 이용한 방법이 등장하였다. 세균 전체 지놈 DNA를 이용하는 방법은 유사한 종간의 DNA 염기 서열간의 상동성이 높기 때문에 민감도가 떨어진다¹⁴⁾. 이러한 이유로 제한효소로 지놈 DNA를 절단하여 무작위로 그 절편을 클로닝하여 Southern blot hybridization법을 이용하여 그 민감도를 높일 수가 있었다^{17,20)}. 이러한 종-특이 DNA 프로브를 이용하는 방법은 전통적인 세균배양법이나 항원-항체 반응을 이용하는 방법보다도 특이도와 민감도에 있어서 뛰어난 것으로 보고되었다³¹⁾. 그러나, 이러한 종-특이 DNA 프로브를 찾는 일은 프로브 한 개에 대해 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. 본 연구의 Southern blot analysis의 결과에 의하면 프로브 Pig3은 *P. intermedia* G8-9K-3에 특이적으로 반응함을 알 수 있고, 이는 *P. intermedia* G8-9K-3 특이 DNA 프로브로의 이용 가능성이 높음을 시사한다. Reverse dot hybridization 결과에서는 dot blotting한 프로브 Pig3에 DIG-oxygenin을 표지한 *P. intermedia* ATCC 25611 지놈 DNA가 미약하나마 반응함을 보였다. 이러한 비특이적 반응이 어떤 원인에 의한 것인지는 현재로서는 알 수는 없다. *P. intermedia* 종은 최근 *P. intermedia*종과 *P. nigrescens*종으로 분리가 되었다. 생화학적 검사로는 이들을 구별할 수 없으며, 가장 효과적인 방법이 16S rRNA 유전자의 핵산염기서열을 바탕으로 제작된 종-특이 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응법이다. 하지만 이러한

방법으로는 아종 또는 strain 수준에서의 구별은 불가능하다. 왜냐하면, 같은 종 내 strain의 16S rRNA 유전자 염기서열은 99.9% 같기 때문이다. 아직 *P. intermedia*에 대한 한국인의 표준 균주가 확립되어 있지 않고, 아종 수준에서의 분류도 되어 있지 않기 때문에 본 연구에서 얻은 Pig3 DNA 프로브가 얼마나 효용성이 있게 이용될 수 있을 지는 현재로서는 알 수 없다. 하지만 그 특성 및 아종 수준에서의 분류가 비교적 잘되어 있고, 아종간에 그 병원성이 차이가 있음이 보고된 *F. nucleatum*과 *A. actinomycetemcomitans* 종의 예가 있고, 대부분 병소 부위에서 *P. intermedia* 종이 검출되지만 정상 부위에서도 검출된다¹¹⁾는 보고를 고려할 때, 본 연구의 결과가 효과적으로 이용될 수 있는 가능성도 배재할 수 없다. 그러나, 현재 임상에서 분류한 *P. intermedia* 균주들에 대한 실험적 결과물이 없기 때문에 Pig3이 strain 수준에서 *P. intermedia*을 구별할 수 있는 프로브인지 아니지는 현재로서는 알 수는 없다. 앞으로 환자의 구강 내에서 *P. intermedia*을 분류 배양하여 실험을 해보아야 할 것으로 사료된다. 또한 Pig3 프로브의 핵산염기서열을 결정하여 중합효소연쇄반응 프라이머를 설계 및 제작하여 중합효소연쇄반응법을 실시한다며, 좀더 신속하고 민감도가 뛰어나게 *P. intermedia* G8-9K-3을 동정할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

현재 치주질환과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있는 치주병원성 세균 중의 하나인 *P. intermedia*을 아종 수준에서의 신속한 검출 및 동정을 위한 strains-특이 DNA 특이 프로브를 개발하고자 *P. intermedia* G8-9K-3 지놈 DNA를 추출하여 *Hind* III 제한효소로 소화하여 genomic DNA library를 제작하고, reverse dot hybridization 법 및 Southern blot hybridization법을 시행한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *P. intermedia* G8-9K-3 지놈 DNA에서 30개의 *Hind* III 제한효소절편을 reverse dot hybridization법으로 screening하고, Southern blot analysis법으로 다시 한 번 확인한 결과 Pig3 프로브는 *P. intermedia* G8-9K-3을 stain 수준에서 동정할 수 있는 것으로 파악되었다.

이상과 같은 결과로, 성인성 치주염의 한 원인균으로 알려져 있는 *P. intermedia*의 아종 또는 균주 수준에서의 검출 및 동정을 위해 개발된 *P. intermedia* G8-9K-3에 대한 균주-특이 DNA 프로브를 기초로 한 *P. intermedia* G8-9K-3과 치주질환간의 광범위한 역학조사시 기초 도구로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Albandar JM, Brown LJ, Loe H. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. *J. Periodontol.* **68**:973-981, 1997.
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. 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.
4. Cookson AL, Wray A, Handley PS, Jacob AE. An investigation into the use of SDS-PAGE of cell surface extracts and proteolytic activity to differentiate *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia*. *FEMS Microbiol. Lett.* **136**:109-115, 1996.
5. Dahlen GG, Johnson JR, Gmur R. *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* serotypes, ribotypes, and binding characteristics. *FEMS Microbiol. Lett.* **138**:89-95, 1996.
6. Frandsen EVG, Poulsen K, Kilian M. Confirmation of the species *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:429-435, 1995.
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. Guillot E, C Mouton. PCR-DNA probe assays for identification and detection of *Prevotella intermedia* sensu stricto and *Prevotella nigrescens*. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1876-1882, 1997.
9. Johnson JL, Holdeman LV. *Bacteroides intermedius* comb. nov. and descriptions of *Bacteroides corporis* sp. nov. and *Bacteroides levii* sp. nov. *Int. J. Syst.*

- Bacteriol.* **33**:15-25, 1983.
10. Kook JK, 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.
 11. Konoönen E, Pigmented *Prevotella* species in the periodontally healthy oral cavity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **6**:201-206, 1993.
 12. Loesche WJ, Syed SA, Laughon BE, Stoll J. The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J. Periodontol.* **53**:223-230, 1982.
 13. Maidak BL, Olsen GJ, Larsen N, et.al. The ribosomal database project (RDP). **24**:82-85, 1996.
 14. Moncla BJ, Strockbine L, Braham P, Karlinsey J, Roberts MC. The use of whole-cell DNA probes for the identification of *Bacteroides intermedius* isolates in a Dot Blot Assay. *J. Dent. Res.* **67**:1267-1270, 1988.
 15. Moore WEC, Moore LH, Ranney RR, et.al. The microflora of periodontal sites showing active destructive progression. *J. Clin. Periodontol* **18**:729-739, 1991.
 16. Moore WE, Holdeman LV, Smibert RM, et.al. Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. *Infect. Immun.* **38**:1137-1148, 1982.
 17. Morita M, Yamamoto T, Watanabe T. Identification by Biotinylated DNA Probes of *Capnocytophaga* Species Isolated from Supragingival Calculus. *J. Dent. Res.* **70**:1048-1051. 1991,
 18. 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.
 19. Premaraj T, Kato N, Fukui K, Kato H, Watanabe K. Use of PCR and Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis Techniques for Differentiation of *Prevotella intermedia* Sensu Stricto and *Prevotella nigrescens*. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1057-1061, 1999.

20. Riggio MP, Lennon A, Roy KM. Detection of *Prevotella intermedia* in subgingival plaque of adult periodontitis patients by polymerase chain reaction. *J. Periodontal Res.* **33**:369-376, 1998.
21. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual" Ed, 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1988.
22. Savitt ED, Keville MW, Peros WJ. DNA probes in the diagnosis of periodontal microorganisms. *Arch. Oral Biol.* **35**:153s-159s, 1990.
23. Savitt ED, Strzempko MN, Vaccaro K, Peros WJ, French CK. Comparison of culture methods and DNA probe analyses for the detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in subgingival plaque samples. *J. Periodontol.* **59**:431-438, 1988.
24. Shah HN, S E 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.
25. Slots J. Subgingival microflora and periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* **6**:351-382, 1979.
26. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* **25**:134-144, 1998.
27. Söder P-O, Jin LJ, Söder B. DNA probe detection of periodontopathogens in advanced periodontitis. *Scand. J. Dent. Res.* **101**:363-70, 1993.
28. Strzempko MN, Simon SL, French CK, et al. A Cross-reactivity Study of Whole Genomic DNA Probes for *Haemophilus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides intermedius*, and *Bacteroides gingivalis*.: *J Dent Res.* 1987;66(10): 1543-1546.
29. Tenenbaum H, Elkaim R, Cuisinier F, et.al. Prevalence of six periodontal pathogens detected by DNA probe method in HIV vs non-HIV periodontitis. *Oral Dis.* **3**:S153-S155, 1997.
30. Walter JL. DNA probe and enzyme analysis in periodontal diagnostics. *J. Periodontol.* **63(12 Suppl)**:1102-1109, 1992.

ABSTRACT

Study on development of DNA probe for identification of *Prevotella intermedia* G8-9K-3

Jong-Sung Bak, 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 probe for detection and identification of *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) G8-9K-3. This study procedure includes (1) whole-genomic DNA extraction of *P. intermedia* G8-9K-3 (2) construction of the genomic DNA library, (3) screening of strain-specific DNA probe by reverse dot hybridization, (4) confirmation of strain-specific DNA probe by Southern blot hybridization, (5) determination of nucleotide sequences of strain-specific DNA probe. Twenty-eight recombinant plasmids containing *Hind* III-digested DNA fragments of *P. intermedia* G8-9K-3 were obtained. Reverse Dot Hybridization and Southern blot analysis data showed that one of them, Pig3, could be *P. intermedia* G8-9K-3-specific DNA probe. This datum indicates that this Pig3 DNA probe could be useful in detection and identification of the *P. intermedia* G8-9K-3 strain.