

## *Prevotella nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup> 균주-특이 종합효소연쇄반응 프라이머 개발

송수근<sup>1†</sup> · 유소영<sup>1†</sup> · 김미광<sup>1</sup> · 김화숙<sup>5</sup> · 임선아<sup>5</sup> · 김도경<sup>2,3</sup> · 박재윤<sup>4</sup> · 국중기<sup>1\*</sup>

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

<sup>3</sup>2단계 BK21 첨단치과의료연구인력양성사업단, <sup>4</sup>조선대학교 의과대학 생화학·분자생물학교실

<sup>5</sup>전남과학대학 치위생과

본 연구는 *Prevotella nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>에 대한 균주 특이 DNA 프로브라고 보고된 Pn10 프로브의 균주 특이성을 한국인에서 분리된 *P. nigrescens*의 임상분리 균주를 이용하여 검증하고, *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup> 균주 특이 PCR 프라이머를 개발하고자 시행되었다. *P. nigrescens*와 유전학적으로 가장 가까운 *Prevotella intermedia*를 포함한 구강 내 치주질환 원인균종인 5균종의 표준균주 및 참고균주, 그리고 *P. nigrescens*와 *P. intermedia*의 임상분리 균주를 이용하여 Southern blot 분석법을 시행하였다. Southern blot 분석 결과 Pn10 DNA 프로브에 *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup> 및 ChDC KB6 두 균주 지능 DNA가 검출되었다. *P. nigrescens* KB6 균주에서 Pn10 DNA 프로브와 상동성이 있는 부위를 PCR법으로 증폭(KB6-Pn10)하여 클로닝한 다음 Pn10 DNA 프로브와 같이 핵산염기서열을 결정하여 상동성을 비교하였다. 그 결과 Pn10과 KB6-Pn10의 핵산염기서열간의 percent identity는 98.8%였으며, divergence는 0.6%였다. Pn10 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 두 종류 프라이머 쌍 (Pn10-F-AC/Pn10-R-AC 및 Pn10-F-A/Pn10-R-A)을 설계 및 제작하여 *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>에 대한 균주 특이성을 PCR법으로 검증하였다. 이들 프라이머 쌍들의 민감도(sensitivity) 조사 결과, 이들은 *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup> 지능 DNA 4 pg까지 검출할 수 있음을 알았다. 이상의 연구 결과를 종합하면, Pn10 DNA 핵산염기서열을 바탕으로 설계된 Pn10-F-AC/Pn10-R-AC 및 Pn10-F-A/Pn10-R-A 프라이머 쌍들은 *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>를 신속 정확하게 검출하는 수 있어, 균주의 보존적 측면에서 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

**Key words** □ detection, DNA probe Pn10, PCR primer, *Prevotella nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>

*Prevotella nigrescens*는 치수 및 치근단 질환, 치은염 및 구강낭종 등의 발생 및 진행에 관여하는 것으로 알려져 있다(1, 14). *P. nigrescens*는 숙주의 면역글로빈 G를 분해할 수 있는 단백가수분해효소를 생산하며(5), 숙주의 치주조직에 필요한 철의 운반체인 transferrin 결합 단백질을 분비하여 숙주 세포의 철 흡수를 방해하는 역할을 하는 것으로 보고되었다(3). 또한, *P. nigrescens*의 hemolysin은 용혈 활성을 갖지 않지만(10), *in vitro*에서 트립신 또는 proteinase K 처리를 할 경우 용혈 활성이 나타남이 보고되었다(13). 이는 치주질환 병소에 존재하는 트립신-유사 단백가수분해효소를 분비할 수 있는 *P. gingivalis* 등의 세균에 의해 *P. nigrescens*의 비활성 hemolysin도 용혈 활성을 가질 수 있다는 것을 시사한다. 최근 *P. nigrescens*의 LPS가 *in vitro*에서 파골세포 형성을 촉진시켜 치조골 파괴에 관여하여 치주질환의 진행에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다(2).

표준균주(type strain)는 해당 균종을 대표하는 균주로 그 균종에서 처음으로 연구되어 그 유전학적 및 표현형의 특성이 잘 밝

혀진 한 균주를 의미하며, 숙주-세균 상호작용을 연구하는 병인론 연구에서 균종의 표준균주를 우선적으로 이용하고 있다. 그러므로 실험실에서 표준균주들의 올바른 보존 및 신속 정확한 동정 기술이 확립되어 있으면, 병인론 연구 수행이 보다 수월하게 진행될 수 있다.

최근 무작위 클로닝법과 Southern blot 분석법에 의해 *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup> 균주에 대한 특이 DNA 프로브라 생각되는 Pn10 DNA 프로브가 보고되었다(4). 이들의 연구에서는 *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup> 및 *P. nigrescens* 종과 유전학적으로 가장 가까운 *P. intermedia* 표준균주(ATCC 25611<sup>T</sup>) 및 참고균주(ATCC 49046), 그리고 그 외 7종의 구강 내 서식하고 있는 그람 음성 세균의 표준균주만을 대상으로 Southern blot 분석을 시행하였다. 또한 DNA 프로브 방법보다는 종합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 법이 신속성, 정확성 및 경제성이 뛰어나기 때문에 Pn10 DNA 프로브가 *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>에 대한 균주 특이성이 증명된다면, Pn10 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup> 특이 PCR 프라이머 개발이 가능할 것이다. 그러므로 본 연구는 한국인의 구강 내에서 분리 동정된 *P. nigrescens* 균주들을 대상으로 Pn10 DNA 프로브의 *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>에 대한 균주-특이성

<sup>†</sup>These authors contributed equally to these work.

\*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 82-62-230-6877, Fax: 82-62-224-3706

E-mail: jkkook@chosun.ac.kr

여부를 Southern blot 분석법으로 평가하고, Pn10 프로브의 핵산 염기서열을 바탕으로 *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup> 균주-특이 PCR 프라이머를 개발하고자 시행되었다.

## 재료 및 방법

### 세균 및 배양 조건

본 연구에서 이용된 *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>, *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>, *P. intermedia* ATCC 49046, *P. gingivalis* ATCC 33277<sup>T</sup>, *P. gingivalis* ATCC 49417, *P. gingivalis* ATCC 53978, *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406<sup>T</sup>, *Tannerella forsythia* ATCC 43037<sup>T</sup>, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 33384<sup>T</sup>, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586<sup>T</sup>, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190<sup>T</sup>, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953<sup>T</sup> 등은 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) 에서 구입하여 사용하였다. 또한, 임상에서 분리 동정된 *P. nigrescens* 균주들(ChDC KB5, ChDC KB6, ChDC KB50, ChDC B270) 및 *P. intermedia* 균주들(ChDC KB2, ChDC KB3, ChDC KB14, ChDC KB18, ChDC KB19, ChDC KB29, ChDC KB53)은 한국인의 치은연하 치면세균막에서 분리하여 16S rDNA 염기서열결정비교법에 의해 종 수준으로 동정된 것을 사용하였다.

본 연구에 사용된 *P. nigrescens*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *A. actinomycetemcomitans* 및 *T. forsythia* 균종에 속하는 균주들은 TSB (trypticase soy broth, Difco Laboratories, Detroit, USA)에 0.5% yeast extract (Difco Laboratories), 0.05% cysteine HCl-H<sub>2</sub>O (Sigma, St. Louis, USA), 0.5 mg/ml hemin (Sigma) 및 2 µg/ml vitamin K<sub>1</sub> (Sigma)이 첨가된 배지에서 세균 배양을 하였다. 또한 *F. nucleatum*은 Schaedler broth (Difco Laboratories) 배지에서 각각의 세균 종을 배양하였다. 본 연구에 사용된 모든 균주들은 85% N<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>의 혼합가스가 공급되는 37°C 혐기성 세균배양기(Model Bactron I, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, USA)에서 1~3일 동안 배양하여 아래의 실험에 이용하였다.

### 세균 지놈 DNA 및 플라스미드 DNA의 추출

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

Southern blot 분석에 프로브로 사용할 Pn10 DNA 절편이 함유된 재조합 플라스미드는 AccuPrep<sup>TM</sup> Plasmid Extraction Kit (Bioneer Co., Daejeon, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시대로 추출하였다.

### DNA 프로브의 정제 및 표지

DNA 프로브의 정제는 QIAEX (QIAGEN Inc., USA)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 정제하였다.

DNA 프로브는 DIG-High Prime (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)을 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 지놈 DNA를 0.8% Agarose gel에 전기영동하고 Vacuum Blotter (Model 785, Bio-Rad Laboratories, St. Louis, USA)를 이용하여 통상의 vacuum transfer법으로 Nylon membrane (Roche Diagnostics)에 transfer하고, 120°C 진공오븐에서 30분 동안 baking하여 DNA를 membrane에 고정시켰다. Hybridization은 선행 연구(6)에서와 같은 방법으로 시행하였다.

### *P. nigrescens* ChDC KB6 균주 지놈 DNA에서 Pn10과 상동성을 보이는 부위의 클로닝

*P. nigrescens* ChDC KB6 균주에서 Pn10과 상동성이 있는 DNA 부위를 PCR법으로 증폭하여 클로닝하였다. PCR은 *P. nigrescens* ChDC KB6 균주의 지놈 DNA를 주형으로, PCR 프라이머는 KB6-Pn10-F; 5'-AAG CTT GGT GGT TAC GTA TGG AC-3'과 KB6-Pn10-R; 5'-AAG CTT TTT CAA TCA TAT TCT TAC C-3'으로 하여 AccuPower<sup>®</sup> Premix (Bioneer Co.)와 PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, USA) PCR machine을 이용하여 시행하였다. 이때 PCR의 조건은 다음과 같이 시행하였다. 20 µl의 PCR 혼합용액이 되도록 20 pmoles씩의 forward 및 reverse primers와 100 pg의 지놈 DNA를 넣고 94°C에서 2분간 초기 변성을 실시한 다음 94에서 1분간 변성, 55°C에서 1분간 결합, 72°C에서 1분간 증폭하는 과정을 30회 반복하여 증폭한 다음 마지막으로 72°C에서 10분간 증폭하였다.

PCR이 끝난 후 20 µl의 반응물 중 2 µl를 1.5% agarose gel 과 Tris-acetate buffer [(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.

앞에서 증폭한 PCR 산물(KB6-Pn10)을 pGEM-T easy vector (Pormega Co., Madison, USA)에 제조회사의 지시에 따라 직접 클로닝하였다. 이때 삽입 유전자가 들어간 흰색 군락을 3개씩 선택하여 플라스미드를 추출하여 클로닝 성공여부를 결정하였다.

### Pn10 및 KB6-Pn10 DNA fragments의 핵산염기서열 결정

핵산염기서열 결정은 솔젠트 사(Solgent Co., Daejeon, Korea)에 의뢰하여 결정하였다. 이때 사용되는 프라이머는 ChDC-GEM-F; 5'-TTC CCA GTC ACG ACG TTG TAA AA-3', ChDC-GEM-R; 5'-GTG TGG AAT TGT GAG CGG ATA AC-3', Pn10-F6; 5'-TTC CCA TCG CTC CCT ATT TTA T-3',

Pn10-R11; 5'-AAG CTT GGT GGT TAC GTA TG-3, Pn10-F10; 5'-AGC TTT TTC AAT CAT ATT CT-3', Pn10-R10'; 5'-AAG CCT ATC TCT ATT ATT AT-3' 등이었다. 핵산염기서열 결정 데이터는 SeqMan 프로그램(Version 7.0; DNASTAR, Inc., Madison, USA)을 이용하여 분석하였다. 핵산염기서열 결정 후 염기서열의 상동성 검색은 미국 국립보건원에서 제공하는 BLAST 프로그램을 이용하였다.

#### *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup> 균주 특이 PCR 프라이머 설계 및 제작

Pn10 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 PrimerSelect 프로그램(DNASTAR Inc.)을 이용하여 PCR 프라이머를 설계하였다. 이 때 설계된 프라이머 쌍은 바이오니아 사(Bioneer Co.)에 의뢰하여 제작하였다.

#### Gradient PCR

*P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>을 균주 특이적으로 검출하기 위해 설계 및 제작된 프라이머 쌍들의 최적의 결합 온도를 구하기 위하여 gradient PCR를 시행하였다. 이때 한국인의 치은연하치면세 균막에서 분리 동정된 *P. nigrescens* ChDC KB6을 gradient PCR에서 대조균으로 사용하였다.

PCR은 AccuPower<sup>®</sup> PCR PreMix (Bioneer Co.)와 Peltier thermal cycler (Model PTC-200 DNA engine<sup>™</sup>, MJ Research Inc.)를 이용하여 시행하였다. AccuPower<sup>®</sup> PCR PreMix에 4 ng의 균주 지놈 DNA와 20 pmoles의 프라이머 쌍을 넣고 PCR을 시행하였다. PCR 조건은 다음과 같았다. 초기 변성은 94°C에서 5분간 시행하였고, 변성(94°C, 3분), 결합(49.2, 51.4, 53.9, 55, 56.2, 57.5, 59.2, 61.4, 63.9 및 66.1°C, 30초) 및 중합(72°C, 30초)의 세 과정을 32회 반복하고, 추가적인 중합(72°C, 30초)을 10분간 시행하였다. 최종 반응물을 2 µl씩 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 그 증폭 여부를 확인하였다.

#### 특이성(specificity) 및 민감도(sensitivity) 측정

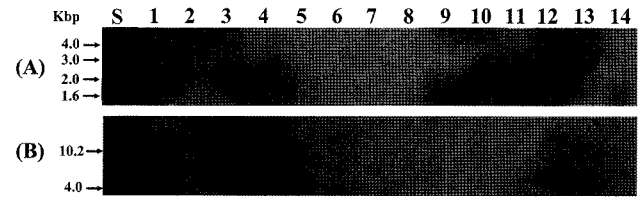
앞에서 설계된 프라이머 쌍들의 *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup> 균주 특이성을 알아보기 위하여, 15종 또는 아종에 대한 표준균주 및 참고균주, 9균주의 *P. intermedia* 임상분리 균주 및 5균주의 *P. nigrescens* 임상분리 균주 지놈 DNA 4 µg을 주형으로 하여 PCR을 시행하였다. 또한 각각의 PCR 쌍의 민감도를 측정하기 위하여 지놈 DNA 4 ng에서 4 fg까지 10배씩 희석하여 PCR 주형으로 사용하였다.

PCR은 앞의 실험 조건과 동일하게 시행하였다. 다만, 결합(60°C, 55°C, 또는 53°C, 30초) 조건만 달리 시행하였다.

## 결 과

#### Pn10 DNA 프로브에 대한 Southern blot 분석

Pn10 DNA probe의 *P. nigrescens*에 대한 종 특이성을 검증하기 위하여 *P. nigrescens*의 표준균주, 참고균주 및 한국인에서



**Fig. 1.** Southern blot analysis to confirm the specificity of the Pn10 DNA probe. The *Hind*III- or *Pst*I digested bacterial genomic DNAs were electrophoresed and transferred to a nylon membrane; hybridized with a DIG-labeled P130 DNA fragment. *Hind*III (A)- or *Pst*I (B)-digested genomic DNAs (lanes 1~14) were from: Lanes: S, 1 kb DNA marker; 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.

분리 동정된 임상균주와 *P. nigrescens*와 유전학적으로 가장 가까운 *P. intermedia*의 표준균주, 참고균주 및 한국인에서 분리 동정된 임상균주들의 지놈 DNA를 대상으로 Southern blot hybridization을 시행하였다. 그 결과 Pn10 DNA probe는 *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup> 지놈 DNA 뿐만 아니라 *P. nigrescens* ChDC KB6 지놈 DNA와도 반응을 하였다(Fig. 1). 이 때 Pn10 DNA 프로브와 반응한 두 균주(ATCC 33563<sup>T</sup>과 ChDC KB6)의 제한효소절편 길이는 *Hind*III를 사용하였을 때 각각 약 1.9 kb로 동일한 크기를 보였다(Fig. 1A). *Pst*I 제한효소를 사용한 경우 두 균주 모두에서 약 6.0 kb 크기의 밴드가 보였지만, *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>에서는 약 12 kb 크기와 이보다 훨씬 큰 반응밴드도 나타났다(Fig. 1B). 또한 *P. nigrescens* ChDC KB6 균주의 지놈 DNA도 *Pst*I 제한효소를 사용한 경우 약 14 kb 크기의 반응 밴드가 나타났다(Fig. 1B).

#### Pn10 DNA 프로브 및 KB6-Pn10 DNA fragment의 핵산염기서열 결정 및 상동성 검색

Pn10 DNA probe를 이용한 Southern blot 분석 결과 ChDC KB6 지놈 DNA에도 Pn10 DNA 프로브와 상동성이 매우 높은 부분이 있는 것으로 판단되었다. Pn10 프로브의 핵산염기서열을 결정하였고, 이를 5' 쪽과 3' 쪽의 핵산염기서열을 바탕으로 PCR 프라이머를 설계 및 제작하여 PCR을 시행하여 ChDC KB6 균주 지놈 DNA로부터 Pn10 유사부위(KB6-Pn10)를 증폭하고 핵산염기서열을 결정하였다.

Pn10 DNA probe와 KB6-Pn10 DNA fragment의 핵산염기서열 결과 각각 1,875 bp와 1,873 bp로 구성되어 있었다(Fig. 2). Pn10 DNA probe와 KB6-Pn10 DNA fragment의 핵산염기서열을 Megalign 프로그램(DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)으로 상동성을 조사한 결과 percent identity는 98.8%였으며, divergence는 0.6%였다. Pn10 DNA 프로브의 핵산염기서열을 기준으로 39

번제와 1351번째 핵산염기서열이 deletion되어 있었다(Fig. 2).

Pn10 DNA probe의 핵산염기서열을 미국 국립보건원에서 제공하는 Blastn 및 Blastx 프로그램으로 상동성 검색을 한 결과, 아직 그 기능이 밝혀지지 않은 단백질을 코딩하고 있음을 알 수 있었다(Table 1).

**PCR primer 설계 및 PCR primer 쌍의 적절한 결합온도 측정**

Pn10 DNA 프로브의 핵산염기서열을 기준으로 KB6-Pn10 핵

산염기서열은 39번째 'A' 염기서열이 소실 돌연변이가 되어 있고, 41번째 염기서열은 'A'가 'C'로 치환 돌연변이가 되어 있었다. 그래서 이러한 특성을 이용해서 *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup> 균주 특이 PCR 프라이머를 설계하였다(Table 2 and Fig. 2).

(A)번제 프라이머 쌍(Pn10-F-AC/ Pn10-R-AC)을 이용한 PCR 결과 ATCC 33563<sup>T</sup> 균주의 지놈 DNA를 주형으로 한 경우 결합온도가 63.9°C에서까지 PCR 증폭물이 생성되었고, ChDC KB6 균주의 경우에는 57.5에서까지 증폭물이 생성되었다. (B), (C) 및 (D)번제 PCR 프라이머 쌍에서는 각각 63.9°C, 59.2°C 및

1	AAGCTTGGTG GTTACGTATG GACCGAAAAT CGGAACAGAC ACCCCCCATT TTAATAAAGA	Pn10
1	AAGCTTGGTG GTTACGTATG GACCGAAAAT CGGAACAG-C CCCCCCAT TTAATAAAGA	KB6-Pn10
	(A) Pn10-F-AC: CGAAAAT CGGAACAGAC AC →	
	(B) Pn10-F-A: CGAAAAT CGGAACAGAC A →	
	(C) Pn10-F-ACm: CGAAAAT CGGAACAGAA AC →	
	(D) Pn10-F-Am: CGAAAAT CGGAACAGAA A →	
61	TGTTCTTTTT AATACTATCT TTCCTGAGAG ATATCCAGCA GATTTGTCAC CTATTGAAAT	Pn10
61	TGTTCTTTTT AATACTATCT TTCCTGAGAG ATATCCAGCA GATTTGTCAC CTATTGAAAT	KB6-Pn10
121	ACAGATGAAG AACTCTGTTA TGAAGATGG TGAGACTTTT TTCTGGGAAG TAGAATTACG	Pn10
121	ACAGATGAAG AACTCTGTTA TGAAGATGG TGAGACTTTT TTCTGGGAAG TGAATTACG	KB6-Pn10
181	TCAGATTGAA GATATTGCA CAAATAAGGT ATTAGGTCCA TTGGAGCGAG GTGAATTATC	Pn10
181	TCAGATTGAA GATATTGCA CAAATAAGGT ATTAGGTCCA TTGGAGCGAG GTGAATTATC	KB6-Pn10
241	CCATGTTTCG CTATTTGCGC TTGGACCTCA ACCCTTGCTT GTGAAGTTGG GTACAATGTT	Pn10
241	CCATGTTTCT CTATTTGCGC TTGGACCTCA ACCCTTGCTT GTGAAGTTGG GTACAATGTT	KB6-Pn10
301	GAATGATAAA TATCCAATAA CGGTCTTTCA AAAACACCGC ATTCCTGATA GTTGGTGTGG	Pn10
301	GAATGATAAA TATCCAATAA CGGTCTTTCA AAAACACCGC ATTCCTGATA <u>GTTGGTGTGG</u>	KB6-Pn10
		← Pn10-R-AC
361	GCTTGAAGAA GATTCACAAA ATGACATTCA GCTAATTGAG CCTCATGATA AAACAAAAGA	Pn10
361	<u>GCTTGAAGAA</u> GATTCACAAA ATGACATTCA GCTAATTGAG CCTCATAATA AAACAAAAGA	KB6-Pn10
421	GCCTGTCTTA GTGATTGCAT TAAGTACAAA AGCTATCTTG <u>GAGCGAATCG</u> CTGATAGATT	Pn10
421	GCCTGTCTTA GTGATTGCAT TAAGTACAAA AGCTATCTTG <u>GAGCGAATCG</u> CTGATAGATT	KB6-Pn10
		← Pn10-R-A
481	TGGAACACA GTAAGTCTAT GGTCTATCAC TTGCAGTGAA CCTGGAAATG ATATGATGCG	Pn10
481	TGGAACACA GTAAGTCTAT GGTCTATCAC TTGCAGTGAA CCTGGAAATG ATATGATGCG	KB6-Pn10
541	TTGCCATAGT CAGTAAAAC AATTTAATCG AGTGGCCAGA ATGGCAATGG ATGCCATTAA	Pn10
541	TTGCCATAGT CAGTAAAAC AATTTAATCG AGTGGCCAGA ATGGCAATGG ATGCCATTAA	KB6-Pn10
601	GACGGCACAC TCGAAGGCTG ATTGCTTAAA AATATTCATG GCAGTTCCTG CTTCTTGTGC	Pn10
601	GACGGCACAC TCGAAGGCTG ATTGCTTAAA AATATTCATG GCAGTTCCTG CTTCTTGTGC	ChDC KB6
661	GGTAGAACTT GGTCTGATTA GAATGCCAAA AGCTGATTTA CCTTGGATGC TGTATGACTA	Pn10
661	GGTAGAACTT GGTCTGATTA GAATGCCAAA AGCTGATTTA CCTTGGATGC TGTATGACTA	KB6-Pn10
721	TTGGGGTGAT AAAAATAAAG ATATAGAAAC GATAACAATA AAATAGGGAG CGATGGGAAG	Pn10
721	TTGGGGTGAT AAAATGAAG ATATAGAAAC GATAACAATA AAATAGGGAG CGATGGGAAG	KB6-Pn10
781	AATTTTTAGT AAAGAACAAA AAGAAGAATT CAAGGATATT CTTGAAACAT TAGGCGGATC	Pn10
781	AATTTTTAGT AAAGAACAAA AAGAAGAATT CAAGGATATT CTTGAAACAT TAGGCGGATC	KB6-Pn10
841	ATTAGACATC ACGCAAACAC AGTATGATAA CCTGACGAGG <u>AGTTATAAGG</u> CCGTGGGTGA	Pn10
841	ATTAGACATC ACGCAAACAC AGTATGATAA CCTGACGAGG <u>AGTTATAAGG</u> CCGTGGGTGA	KB6-Pn10
		← Pn10-Rm
901	GTTCTTGCAG AACGATCCTG TTTTTGAGCC CTATAAGCCG ATAGTATCAC CCCAAGGATC	Pn10
901	GTTCTTGCAG AACGATCCTG TTTTTGAGCC CTATAAGCCG ATAGTATCAC CCCAAGGATC	KB6-Pn10
961	TCTAAGGTTG GGTACAATTA TCCAACCTAT TAATCCTAAT GATGATTTGG ACGTGGACTT	Pn10
961	TCTAAGGTTG GGTACAATTA TCCAACCTAT TAATCCTAAT GATGATTTGG ACGGACTT	KB6-Pn10

**Fig. 2.** Nucleotide sequence of Pn10 and KB6-Pn10. The template sequences for the PCR primers were underlined and the PCR primer name was written below the underlines. →, forward primer; ←, reverse primer.

1021	AGTATACCGA CTCTCGGAGA AGAATCCGAT GTGGACACAG AAAGATATTA AAGACAAGGT	Pn10
1021	AGTATACCGA CTCTCGGAGA AGAATCCGAT GTGGACACAG AAAGATATTA AAGACAAGGT	KB6-Pn10
1081	GGGGTCTAGA CTTAAGGGAA GCGATCGCTA TGCTCCAATG GTTAACAAGA AAGAGGGCAG	Pn10
1081	GGGGTCTAGA CTTAAGGGAA GCGATCGCTA TGCTCCAATG GTTAACAAGA AAGAGGGCAG	KB6-Pn10
1141	ACGTTGTTGG ACGCTGTTAT ACAGAGACAA TTCTGACAAC CCTAAAGAGA AATATCATAT	Pn10
1141	ACGTTGTTGG ACGCTGTTAT ACAGAGACAA TTCTGACAAC CCTAAAGAGA AATATCATAT	KB6-Pn10
1201	GGATATTCTT CCTTCGGTGG CTGATAGCAA ATATGTAGAA AGAATGACAC GTTTGTCTCT	Pn10
1201	GGATATTCTT CCTTCGGTGA CTGATAGCAA ATATGTAGAA AGAATGACAC GTTTGTCTCT	KB6-Pn10
1261	GGAGAACITTT TCGGATCAAA CCGTGGATCA GATTTCATT AGAATCACAG ACAAGGAGGC	Pn10
1261	GGAGAACITTT TCGGATCAAA CCGTGGATCA GATTTCATT AGAATCACAG ACAAGGAGGC	KB6-Pn10
1321	GAAAGACTAT GCAACATCTA CGTATAAAGA AGGATTGGCT AAAAAGCAAC CCTGATGGAT	Pn10
1321	GAAAGACTAT GCAACATCTA CGTATAAAGA -GGATTGGCT AAAAAGCAAC CCTGATGGAT	KB6-Pn10
1381	ATGCATTGTG GTTTGCCAC AGATGCAAAG CAGATGAAAC AGTAAACTT AGGGCAGAGG	Pn10
1381	ATGCATTGTG GTTTGCCAC AGATGCAAAG CAGATGAAAC AGTAAACTT AGGGCAGAGG	KB6-Pn10
1441	CTATTGTGCC TGTTGAGAAA TACAACAAGA AAAAGACTGT GTTGACGCGC ATAGTACAGA	Pn10
1441	CTATTGTGCC TGTTGAGAAA TACAACAAGA AAAAGACTGT GTTGACGCGC ATAGTACAGA	KB6-Pn10
1501	TAAGTAAACG TCATAGGGAT ATGATGTTCT ATAACGATAC TGAAGATAAG CCTATCTCTA	Pn10
1501	TAAGTAAACG TCATAGGGAT ATGATGTTCT ATAACGATAC TGAAGATAAG CCTATCTCTA	KB6-Pn10
1561	TTATTATTAC TACCTTGGCG GCTCGTGCCT ATAATGGTGA ACAAACCTTG CTTGAGGGTT	Pn10
1561	TTATTATTAC TACCTTGGCG GCTCGTGCCT ATAATGGTGA ACAAACCTTG CTTGAGGGTT	KB6-Pn10
1621	TGCTTAATGT AGTAGATAAT CTTGAAAAA GCATTACCAA GAATGAGATA GGCGAGGATG	Pn10
1621	TGCTTAATGT AGTAGATAAT CTTGAAAAA GCATTACCAA GAATGAGATA GGCGAGGATG	KB6-Pn10
1681	TGGTGTGCGA TCCGGTAAAC CCTGAAGAAA ACTTGTGCTGA TAAATGGCCA ACACACCCCA	Pn10
1681	TGGTGTGCGA TCCGGTAAAC CCTGAAGAAA ACTTGTGCTGA TAAATGGCCA ACACACCCCA	KB6-Pn10
1741	AAAGACGCAA GAATTTCTAT AAATGGCTCG CTACCGTGAA GAAAGATATG CATGAGATCC	Pn10
1741	AAAGACGCAA GAATTTCTAT AAATGGCTCG CTACCGTGAA GAAAGATATG CATGAAATCC	KB6-Pn10
1801	TTGATGGAGC AACACAGAATC CAGATACAGA TTATTATGGG GCGTGTATTT GGTAAGAATA	Pn10
1801	TTGATGGAGC AACACAGAATC CAGATACAGA TTATTATGGG GCGTGTATTT GGTAAGAATA	KB6-Pn10
1861	TGATTGAAAA AGCTT	Pn10
1861	TGATTGAAAA AGCTT	KB6-Pn10

Fig. 2. Continued

Table 1. The results of homologous search (BLASTX) of Pn10 DNA probe

Protein name (species of protein origin)	Accession no. of GenBank	Identities	Positives	Gaps
Hypothetical protein ( <i>Alkaliphilus metalliredigenes</i> QYMF)	ZP_00799659	71/156 (45%)	90/156 (57%)	12/156 (7%)
Hypothetical protein ( <i>Shewanella</i> sp. W3-18-1)	YP_962499	95/242 (39%)	131/242 (54%)	5/242 (2%)
Hypothetical protein ( <i>Shewanella</i> sp. MR-7)	YP_737842	95/242 (39%)	130/242 (53%)	5/242 (2%)
Conserved hypothetical protein ( <i>Candidatus Desulfococcus oleovorans</i> Hxd3)	ZP_01674525	92/254 (36%)	137/254 (53%)	2/254 (0%)

57.5°C에서까지 PCR 증폭물이 생성되었지만, 본 연구에서 사용한 결합온도에서는 ChDC KB6 균주로부터의 PCR 증폭물은 생성되지 않았다. 이상의 결과로 4가지 PCR 프라이머 쌍들의 결합온도를 정하였다(Table 2).

**PCR primer 쌍들의 특이성 및 민감도 조사**

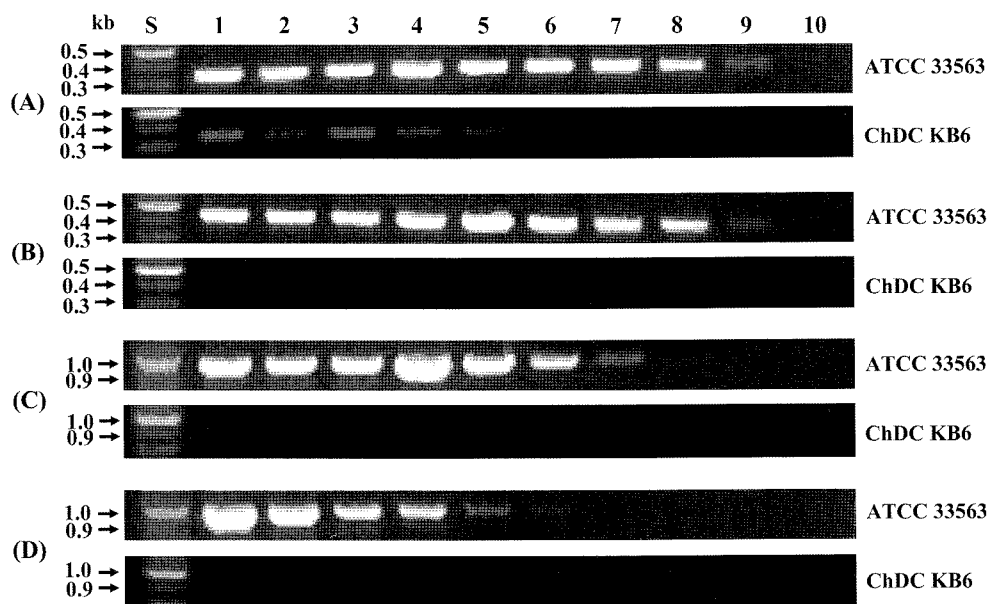
Gradient PCR 결과 결정된 4가지 PCR 프라이머 쌍들의 결합

온도에서 4개의 *P. nigrescens* 임상분리 균주, *P. intermedia*의 표준균주(ATCC 25611<sup>T</sup>), 참고균주(ATCC 49046) 및 7개의 임상분리 균주 및 구강 내에 존재하는 그람음성 세균 중 5종 8균주 지놈 DNA를 주형으로 PCR을 실시하여 특이성을 조사한 결과, 4가지 프라이머 쌍 모두 *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>에 대한 균주 특이성이 있음을 알 수 있었다(Fig. 4).

4가지 프라이머 쌍 중 forward 프라이머를 임의로 돌연변이 시

**Table 2.** PCR primers designed for the detection of *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>

	Primer names (position)	Oligonucleotide sequences (5' → 3')	Annealing temp. (°C)	Amplicon size (bp)
(A)	Pn10-F-AC (24~42 nts) Pn10-R-AC (370~349 nts)	CGAAAATCGGAACAGACAC TTCTTCAAGCCAACACCAACTA	60	347
(B)	Pn10-F-A (24~42 nts) Pn10-R-A (470~453 nts)	CGAAAATCGGAACAGACA CGATTCTGCTCCAAGATA	55	447
(C)	Pn10-F-ACm (24~43 nts) Pn10-Rm (893~874 nts)	CGAAAATCGGAACAGAAAC CGGCCTTATAACTCCTCGTC	55	870
(D)	Pn10-F-Am (24~42 nts) Pn10-Rm (893~874 nts)	CGAAAATCGGAACAGAAA CGGCCTTATAACTCCTCGTC	53	870



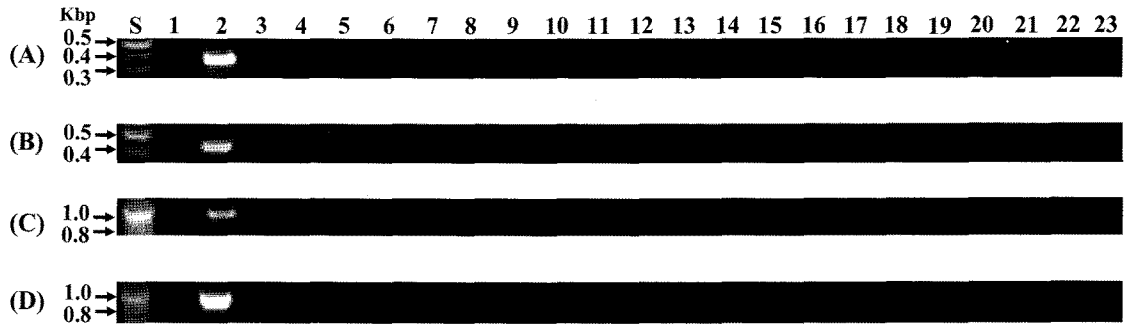
**Fig. 3.** Gradient PCR. In order to determine the optimal annealing temperature, PCR was performed with primers (A) Pn10-F-AC/ Pn10-R-AC, (B) Pn10-F-A/ Pn10-R-A, (C) Pn10-F-ACm/ Pn10-Rm primers, and (D) Pn10-F-Am/ Pn10-Rm and the genomic DNA of *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup> at the annealing temperature of 1, 49.2°C; 2, 51.4°C; 3, 53.9°C; 4, 55°C; 5, 56.2°C; 6, 57.5°C; 7, 59.2°C; 8, 61.4°C; 9, 63.9°C; 10, 66.1°C; S, size marker (100 bp ladder).

키지 않은 두 가지 프라이머 쌍(Pn10-F-AC/ Pn10-R-AC 및 Pn10-F-A/ Pn10-R-A)의 *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup> 지놈량의 검출 한계를 알아보기 위하여 PCR을 실시하여 민감도를 조사하였다. 그 결과 두 가지 프라이머 쌍 모두 4 pg (약 2,000마리)까지 검출 가능하였다(Fig. 5).

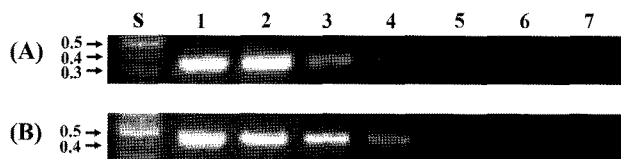
## 고 찰

유전공학 및 분자생물학의 발전과 더불어 세균 분류학 분야의 발전이 급속히 이루어졌고, 세균을 종 수준으로 분류하는 데에도 16S rDNA의 핵산염기서열 비교법 및 DNA-DNA pairing법 등이 주요한 방법으로 사용되고 있다(9). 또한, 분자생물학적 방법 중, 세균을 속 수준 이상에서 균주 수준까지 동정할 수 있는 방법으로 DNA 프로브법과 세균 지놈 전체 핵산염기서열결정법이

있는 것으로 알려져 있다. 이중, 지놈 전체 핵산염기서열을 결정하여 균주 수준으로 동정하는 방법은 현재의 과학수준으로는 현실적으로 적용하기 거의 불가능하고, 균주 특이 DNA 프로브도 실제적으로 거의 실용성이 없다. 하지만, 최근 inverted dot blot hybridization 검색법(8)이 소개되면서, 세균 종 수준 또는 아종 수준 특이 DNA 프로브뿐만 아니라 균주 특이 DNA 프로브의 개발이 좀 더 쉬워졌다(6, 7, 12). 최근 Gang 등(4)이 *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>에 대한 균주 특이 DNA 프로브일 것이라고 생각되는 Pn10 DNA 프로브를 소개하였다. 하지만, 본 연구에서 한국인에서 분리 동정된 4개의 *P. nigrescens* 균주 지놈 DNA를 이용하여 Southern blot 분석을 시행한 결과, Pn10 DNA 프로브는 *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup> 뿐만 아니라 *P. nigrescens* ChDC KB6 균주의 지놈 DNA와도 hybridization하여 *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>에 대한 균주 특이성이 없음을 알 수



**Fig. 4.** Specificity test of the PCR primers. (A) Pn10-F-AC/ Pn10-R-AC, (B) Pn10-F-A/ Pn10-R-A, (C) Pn10-F-ACm/ Pn10-Rm primers, and (D) Pn10-F-Am/ Pn10-Rm. The PCR was performed with each of PCR primer pairs and the genomic DNA of the bacteria listed in the table 1. Lanes: S, size marker (100 bp ladder); 1, negative control (DDW); 2, *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>; 3, *P. nigrescens* ChDC KB5; 4, *P. nigrescens* ChDC KB6; 5, *P. nigrescens* ChDC KB50; 6, *P. nigrescens* ChDC B270; *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>; 8, *P. intermedia* ATCC 49046; 9, *P. intermedia* KB2; 10, *P. intermedia* ChDC KB3; 11, *P. intermedia* ChDC KB14; 12, *P. intermedia* ChDC KB18; 13, *P. intermedia* ChDC KB19; 14, *P. intermedia* ChDC KB29; 15, *P. intermedia* ChDC KB53; 16, *P. gingivalis* ATCC 33277<sup>T</sup>; 17, *P. gingivalis* ATCC 49417; 18, *P. gingivalis* ATCC 53978; 19, *P. endodontalis* ATCC 35406<sup>T</sup>; 20, *T. forsythia* ATCC 43037<sup>T</sup>; 21, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384<sup>T</sup>; 22, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586<sup>T</sup>; 23, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953<sup>T</sup>.



**Fig. 5.** Sensitivity test of the PCR primers. (A) Pn10-F-AC/ Pn10-R-AC and (B) Pn10-F-A/ Pn10-R-A. The PCR was performed with each PCR primer pairs and the purified genomic DNA of *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>. The PCR products were electrophoresed in 1.5% agarose gel. Lanes: S, size marker (100 bp ladder); 1 through 7, purified genomic DNA serially diluted 10-fold from 4 ng to 4 fg.

있었다(Fig. 1). 흥미로운 점은, *Hind*III 제한효소와 *Pst*I 제한효소를 이용하여 Southern blot 분석법의 결과 Pn10 DNA 프로브는 두 균주(ATCC 33563<sup>T</sup>과 ChDC KB6)에서 같은 크기의 반응 밴드를 보였다. *Pst*I 제한효소를 이용한 경우 6 kb보다 큰 1~2개의 밴드가 더 보였지만, 이는 세균 지놈 DNA가 부분 절단되어 나타난 현상으로 보인다. 왜냐하면, Pn10 및 Pn10-KB6의 핵산 염기서열을 결정된 결과 두 DNA fragment 내에는 *Pst*I 제한효소자리가 존재하지 않았기 때문이다. ChDC KB6에서 Pn10 DNA 프로브와 유사한 부위(Pn10-KB6)를 클로닝하여 핵산 염기서열을 결정된 후, 상동성을 분석한 결과 98.8%의 percent identity를 보였다. 이러한 결과는 ATCC 33563<sup>T</sup> 균주와 ChDC KB6 균주간의 Pn10 DNA 프로브가 코딩하고 있는 유전자를 함께 가지고 있음을 말해주는 것으로 두 균주간의 유전학적 상동성이 다른 균주들에 비해 높다는 것을 간접적으로 시사한다고 할 수 있다. 세균을 검출하는 방법들 중 PCR 법은 DNA 법보다 신속성, 정확성 및 경제성 측면에서 우수하기 때문에 선호되는 방법이다. 본 연구에서도 *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>를 균주 특이적으로 검출할 수 있는 PCR 프라이머 쌍들을 Pn10 DNA 프로브의 핵산 염기서열을 바탕으로 개발할 수 있었다(Fig. 2-5). 숙

주-세균 상호작용을 연구하는 병원 연구에 있어서 대부분 세균 종의 표준균주를 비롯한 참고균주들을 우선적으로 사용한다. 그러므로 실험실에서 병원성 세균종의 표준균주를 신속 정확하게 동정할 수 있다면, 병원 연구보다 수월하게 수행할 수 있다는 장점이 있다. 이러한 이유로 최근 치주질환의 주요 원인균으로 알려진 *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586<sup>T</sup> 균주에 대한 균주 특이 PCR 프라이머 쌍들도 개발되었다(6). 그러므로 본 연구에서 개발된 *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup> 균주 특이 PCR 프라이머 쌍은 *P. nigrescens*와 여러 구강감염성질환간의 병원 연구 수행 과정 중 ATCC 33563<sup>T</sup>의 신속한 동정에 유용하게 사용될 수 있을 것이라 생각된다.

PCR 프라이머를 설계하는 여러 원칙들 중에서 5' 쪽 보다는 3' 쪽의 일치성이 더욱 중요하다는 것은 잘 알려져 있다(11). 본 연구에서 이러한 원칙을 확인하기 위하여 Pn10 및 KB6-Pn10 핵산 염기서열을 비교하여 상동성이 떨어지는 부분(39번째와 41번째 염기서열)을 3' 쪽으로 하여 4가지 프라이머 쌍을 설계하였다(Fig. 2). 즉, (A)번째 프라이머 쌍의 forward 프라이머는 3'의 마지막이 42번째 핵산 염기인 'C'가 되게, (B)번째 프라이머 쌍의 forward 프라이머는 3'의 마지막이 41번째 핵산 염기인 'A'가 되게 설계하여, 3'의 마지막 번째 핵산 염기의 결합 유무에 따른 적절한 PCR 결합 온도의 차이 및 PCR 증폭물 생성 유무를 확인하였다. 또한 (C)번째와 (D)번째 PCR 프라이머 쌍의 forward 프라이머는 각각 (A)번째와 (B)번째와 길이는 같지만, 39번째의 'C' 핵산 염기를 'A'로 치환 시켜서 적절한 PCR 결합 온도의 차이를 관찰하였다. 이러한 결과를 살펴보면, (A)와 (B)번째 프라이머 쌍들과 핵산 염기서열이 100% 일치하는 *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup> 지놈 DNA를 주형으로 PCR을 한 경우에는 PCR 증폭물이 생성되는 최고 결합 온도가 서로 같았다. 하지만 ChDC KB6 균주의 지놈 DNA를 주형으로 한 경우 3'의 가장 마지막 핵산 염기서열의 상보성 유무에 따라 PCR 증폭물이 생성되는 최고 결합 온도의 차이는 매우 컸다. (A)번째와 (C)번째 프라이머

쌍과 ChDC KB6 균주의 지놈 DNA를 이용하여 PCR을 시행할 결과를 살펴볼 때, (C)번째 프라이머 쌍의 3' 끝에서 2~4번째까지의 핵산염기가 상보성이 없었기 때문에 마지막 3' 핵산염기가 주형의 것과 상보성이 있었지만 PCR 증폭물이 생성되지 않았다. 또한 (C)번째와 (D)번째 프라이머 쌍과 ATCC 33563<sup>T</sup> 지놈 DNA를 주형으로 PCR을 시행한 결과를 살펴보면, 3' 끝에서 연속해서 2개의 핵산염기가 상보적인 경우가 1개의 핵산염기가 상보적인 경우보다 최고 결합온도가 더 높았다. 이러한 결과는 PCR 프라이머의 설계에 있어서 3' 끝 쪽의 핵산염기서열과 주형 DNA의 핵산염기서열의 상보성이 매우 중요함을 실험적으로 검증한 것이라 할 수 있다.

이상의 연구 결과를 종합하면, Pn10 DNA 핵산염기서열을 바탕으로 설계된 두 가지 PCR 프라이머 쌍(Pn10-F-AC/ Pn10-R-AC 및 Pn10-F-A/ Pn10-R-A)들은 *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>를 신속 정확하게 검출하는 수 있어, 균주의 보존적 측면에서 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

### 감사의 말

이 논문은 2006년도 조선대학교 학술연구비(교원연구년제혜의 파견지원)의 지원을 받아 연구되었음.

### 참고문헌

- Baumgartner, J.C., B.J. Watkins, K.S. Bae, and T. Xia. 1999. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J. Endod.* 25, 413-415.
- Chung, Y.H., E.J. Chang, S.J. Kim, H.H. Kim, H.M. Kim, S.B. Lee, and J.S. Ko. 2006. Lipopolysaccharide from *Prevotella nigrescens* stimulates osteoclastogenesis in cocultures of bone marrow mononuclear cells and primary osteoblasts. *J. Periodontol Res.* 41, 288-296.
- Duchesne, P., D. Grenier, and D. Mayrand. 1999. Binding and utilization of human transferrin by *Prevotella nigrescens*. *Infect. Immun.* 67, 576-580.
- Gang, S.W., D.K. Kim, J.H. Seong, B.O. Kim, J.J. Han, and J.K. Kook. 2002. Study on isolation of *Prevotella nigrescens* 9336-specific DNA probes using random cloning method. *J. Korean Acad. Periodontol.* 32, 269-280.
- Jansen, H.J., D. Grenier, and J.S. Van Der Hoeven. 1995. Characterization of immunoglobulin G-degrading proteases of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral. Microbiol. Immunol.* 10, 138-145.
- 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.
- 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.
- Kook, J.K., M.K. Kim, J.H. Seong, D.K. Kim, B.O. Kim, J.C. Park, K.K. Kim, S.J. Choe, and B.M. Min. 2003. A new method for rapid screening of bacterial species- or subspecies-specific DNA probes. *FEMS Microbiol. Lett.* 219, 121-127.
- Krieg, N.R. 2001. Identification of Prokaryotes, p. 33-38. In G. Garrity (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> ed., Springer Verlag, New York, N.Y., USA.
- 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.
- Rychlik, W. 1993. Selection of primers for polymerase chain reaction, pp. 31-40. In B.A. White (ed.), *PCR protocols*, 1<sup>st</sup> ed., Humana Press, Totowa, New Jersey, USA.
- Shin, Y.K., S.U. Jeong, S.Y. Yoo, M.K. Kim, H.S. Kim, B.O. Kim, and 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.
- Silva, T.A., F.S. Noronha, L. De Macedo Farias, and M.A. Carvalho. 2004. *In vitro* activation of the hemolysin in *Prevotella nigrescens* ATCC 33563 and *Prevotella intermedia* ATCC 25611. *Res. Microbiol.* 155, 31-38.
- Siqueira, J.F., Jr., I.N. Rocas, R. Souto, M. Uzeda, and A.P. Colombo. 2001. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 92, 451-457.

(Received July 3, 2008/Accepted September 2, 2008)

### ABSTRACT: Development of *Prevotella nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>-Specific PCR Primers

Soo Keun Song<sup>1†</sup>, So Young Yoo<sup>1†</sup>, Mi-Kwang Kim<sup>1</sup>, Hwa-Sook Kim<sup>5</sup>, Sun-A Lim<sup>5</sup>, Do Kyung Kim<sup>2,3</sup>, Jae-Yoon Park<sup>4</sup>, and Joong-Ki Kook<sup>1\*</sup> (<sup>1</sup>Department of Oral Biochemistry, <sup>2</sup>Department of Oral Physiology, <sup>3</sup>The Second Stage of BK21 High-tech Dental Care & Human Resource Training Center, and <sup>4</sup>Department of Biochemistry & Molecular Biology, Medical college, Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea, <sup>5</sup>Chunnam Techno College, Gokseong County, Jeonnam 516-911, Republic of Korea)

A Pn10 DNA probe was introduced as a *Prevotella nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>-specific DNA probe. In that study,



the specificity of the Pn10 was tested with only type or reference strains of 5 oral bacterial species. The purpose of this study is to evaluate the specificity of the Pn10 using the wild type strains of *P. nigrescens* and is to develop the *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>-specific PCR primers based on the nucleotide sequence of the Pn10. The specificity of the Pn10 DNA probe was determined by Southern blot analysis. The nucleotide sequence of Pn10 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 Pn10 DNA probe were hybridized with the genomic DNAs from *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup> and KB6. The Pn10 homologous region, KB6-Pn10, of *P. nigrescens* KB6 was cloned by PCR and sequenced. The Pn10 and KB6-Pn10 DNA fragments were consisted of 1,875 bp and 1,873 bp, respectively. The percent identity of the two was 98.8% and the divergence of them was 0.6%. The two primer sets (Pn10-F-AC/ Pn10-R-AC and Pn10-F-A/ Pn10-R-A), designed base on the nucleotide sequences of Pn10 DNA probe, were specific to the *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>. The two PCR primer sets could detect as little as 4 pg of genomic DNA of *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>. These results indicate that the two PCR primer sets have proven useful for the identification of *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>, especially with regard to the maintenance of the strain.