

Detection of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* using Pn17 and Pn34 DNA Probes

Chan-Ho Park^{1†}, Pan Soon Kim^{2†}, Hwa-Sook Kim⁴, Jeong-Bum Min¹, Ho-Keel Hwang¹, Hyun-Sun Jang², Ki Woon Cho³, Dong-Heon Baek⁵, and Joong-Ki Kook^{3*}

¹Department of Conservative Dentistry, ²Periodontology, and ³Oral Biochemistry, School of Dentistry, Chosun University 375 Seo-Suk Dong, Dong-ku, Gwang-ju 501-759, Korea

⁴Department of Dental Hygiene, Chunnam Techno College, Gokseong County, Jeonnam 511-911, Korea

⁵Department of Oral Microbiology & Immunology, College of Dentistry, Dankook University, Anseo-Dong, Cheonam, Chongnam, 330-714, Korea

(received December 23, 2009 ; revised January 14, 2010 ; accepted January 22, 2010)

The DNA probes Pn17 and Pn34 were evaluated for their ability to specifically detect clinical strains of *P. intermedia* and *P. nigrescens* from a Korean population by dot blot hybridization. These probes were sequenced by extension termination and their specificity was determined by Southern blot analysis. The results revealed that the Pn17 sequence (2,517 bp) partially encodes an RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) and that Pn34 (1,918 bp) partially encodes both *rpoB* (1-169 nts) and the RNA polymerase beta subunit (*rpoB'*; 695-1918 nts). These probes hybridized with both *Hind*III- and *Pst*I-digested genomic DNAs from the strains of *P. intermedia* and *P. nigrescens* used in this study. Interestingly, each of the hybrid bands generated from the *Hind*III-digested genomic DNAs of the two bacterial species could be used to distinguish between them via restriction fragment length polymorphism. These results thus indicate that Pn17 and Pn34 can simultaneously detect *P. intermedia* and *P. nigrescens*.

Key words: DNA probes Pn17 and Pn34, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*

*Corresponding author: Dr. Joong-Ki Kook, Departments of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University, 375 Seo-Suk Dong, Dong-ku, Gwang-ju 501-759, South Korea. Tel: 82-62-230-6877, Fax: 82-62-224-3706

E-mail: jkkook@chosun.ac.kr

†Contributed equally

서론

치수 및 치근단 질환은 치아우식증, 치주 질환과 더불어 구강 내에서 가장 빈번히 발생하는 감염성 질환이다. 치수 및 치근단 병변에서 세균의 중요성은 동물 실험과 임상실험을 통해 잘 밝혀졌다(Kakehashi 등, 1965). 여러 원인 세균 중 중 *Prevotella* 속(genus)의 세균 종들의 치수 및 치근단 질환과의 역학관계에 대한 연구가 진행 중이다(Kim 등, 2003; Yoo 등, 2004). 최근 *P. nigrescens* 종은 *P. intermedia* 종에서 DNA 상동성 연구(Fukushima 등, 1992; van Steenberg 등, 1982), 혈청학적 실험(Gmur와 Wyss, 1985; Nakazawa 등, 1988), 동위호소 검색(Frandsen 등, 1995) 및 세균전체 단백질 분석법(Shah와 Gharbia, 1992) 등의 실험으로 새로운 종으로 독립 분류되었다.

여러 연구 결과 *P. intermedia*는 치주질환 병소에서 *P. nigrescens*보다 검출 빈도가 높고, *P. nigrescens*는 치수 및 치근단 질환, 성인성 치은염, 그리고 건강한 치은 부위에서 검출 빈도가 더 높다는 보고들이 있다(Conrads 등, 1996; Gharbia 등, 1994; Kim 등, 2004). 하지만, 이와는 상반된 연구 결과들도 보고되고 있다(Ali 등, 1997; Kim 등, 2003; Teanpaisan 등, 1996).

*P. intermedia*와 *P. nigrescens* 두 균종들의 표현형적인 특징들이 매우 유사하기 때문에 생화학적 또는 혈청학적 방법으로 동정하기 어려울 뿐만 아니라 재현성도 떨어진 다(Baumgartner 등, 1999). 현재 널리 이용되고 있는 세균 동정 키트인 Rapid ID32 A(BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) 또는 Rapid ANA II system(Innovative Diagnostic Systems, Norcross, GA, USA)으로도 *P. intermedia*와 *P.*

*nigrescens*가 구별되지 않는다.

특정 세균 감염성 질환과 원인균 간의 상관관계의 연구에 있어서 먼저 세균의 검출법 및 동정법이 확립되어야 한다. 치주질환을 일으키는 혐기성 세균들의 검출 및 식별에는 전통적인 표준 세균배양법, 종 특이 항체 및 종 특이 핵산 프로브(DNA probe)를 이용하는 방법, 각 세균의 특이 유전자나 16S 라이보솜 RNA(16S rRNA)의 염기서열을 바탕으로 한 중합효소연쇄반응(PCR)법 등이 이용되고 있다(Krieg, 2001). 전통적인 표준 세균배양법은 모든 다양한 종들을 검사할 수 있는 장점이 있지만, 배양조건이 까다롭고, 배양시간이 길며, 이들을 식별하기 위해서는 여러 가지 생화학적 검사를 시행해야만 하는 여러 가지 기술적인 어려움을 가지고 있다. 이러한 기술적인 어려움들이 있기 때문에 신속하고 정확한 세균의 식별법이 필요하게 되었고, 이러한 조건을 만족시킬 만한 방법으로 고안된 방법들 중의 하나가 세균의 지놈 DNA를 이용한 hybridization 법이다. DNA 프로브법은 민감도와 특이도가 뛰어난 뿐만 아니라, 프로브로 사용하는 DNA의 핵산염기서열이 같은 종의 균주 간에 상동성이 크지 않기 때문에 세균의 과(family) 수준에서부터 균주 수준까지 동정할 수 있는 장점이 있다(DiRienzo 등, 1991; Kook 등, 2002). 최근 Gang 등(2002)은 shot gun 법을 이용하여 *P. nigrescens* 9336 지놈 DNA fragment를 클로닝하고, dot blot hybridization 및 Southern blot 분석법으로 검증한 *P. nigrescens* 특이 프로브를 소개하였다. 그들의 dot blot hybridization 데이터 중 Pn17 및 Pn34 DNA 프로브는 *P. intermedia* ATCC 25611^T, G8-9K-3(ATCC 49046) 및 *P. nigrescens* ATCC 33563^T 지놈 DNA 모두와 hybridization하였다. 이는 Pn17 및 Pn34 DNA 프로브가 *P. intermedia*와 *P. nigrescens* 를 동시에 검출할 수 있는 가능성이 있음을 의미한다. 그러므로, 본 연구는 Pn17 및 Pn34 DNA 프로브가 *P. intermedia*와 *P. nigrescens* 를 동시에 검출할 수 있는지를 Southern blot analysis를 통하여 검증하고자 시행되었다.

실험재료 및 방법

세균 및 배양

본 연구에 사용한 세균 종의 참고균주들은 *Prevotella intermedia* ATCC 25611^T, *Prevotella nigrescens* ATCC 33563^T, *P. intermedia* ATCC 49046, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 23726, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43717, ATCC 43718, ATCC 33384^T, *Porphyromonas*

gingivalis ATCC 33277^T, ATCC 53978, ATCC 49417, *Campylobacter rectus* ATCC 33238^T 등 이었으며, 이들은 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 임상에서 분리 동정된 *P. intermedia* 균주들(ChDC KB5, ChDC KB6, ChDC KB50 및 ChDC B270)과 *P. nigrescens* 균주들(ChDC KB2, ChDC KB3 ChDC KB14, ChDC KB18, ChDC KB19, ChDC KB29 및 ChDC KB53)은 한국인의 치은연하 치면세균막에서 분리하여 16S rDNA 염기서열결정 비교법에 의해 종 수준으로 동정된 것을 사용하였다.

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, MI, USA) 배지에서, *A. actinomycetemcomitans*는 3% Tryptic soy broth (DIFCO Laboratories), 0.1% Yeast extract (DIFCO Laboratories), 5 µg/ml vancomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA), 75 µg/ml bacitracin 및 10% horse serum (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA)으로 배합된 배지에서, *C. rectus*는 3.7% Brain Heart Infusion broth (BHI, DIFCO Laboratories), 0.5% Yeast extract, 2.0% sodium formate (Sigma), 3.0% sodium fumarate (Sigma), 0.5 mg/ml hemin, 2 µg/ml vitamin K₁으로 배합된 배지에서 배양하였다. 이 때 *A. actinomycetemcomitans*는 10% CO₂가 유지되는 배양기에서 배양하였으며, 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 이용하였다.

세균의 지놈 DNA의 추출

세균 지놈 DNA 추출은 Lippke 등(1987)의 방법을 변형하여 추출하였다. 즉, 각각의 세균 균주를 100 ml의 액체 배지에서 배양하고, 원심분리기에서 원심분리(7,000 × g, 10분)하여 세균 pellet을 얻었다. 이에 10 ml의 세포 용해 용액(5 M guanidine isothiocyanate, 50 mM Tris-HCl [pH 7.6], 10 mM EDTA, 2% *S*-lauryl sarcosinate, 140 mM 2-mercaptoethanol)을 넣고 잘 현탁한 후에 통법의 phenol/chloroform 추출법과 에탄올 침전법을 이용하여 지놈 DNA를 얻었다. 추출한 지놈 DNA 순도 및 농도는 자외선 분광기(Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech., Cambridge, UK)를 이용하여 260 및 280 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 구하였다.

Plasmid DNA 추출

E. coli DH5α에 도입된 *P. nigrescens* 지놈의 HindIII 제한효소절편이 함유한 재조합된 plasmid DNA는 통상

의 alkaline lysis법으로 AccuPrep™ Plasmid Extraction Kit(Bioneer Corp., Daejeon, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시대로 추출하였다.

DNA 프로브의 정제 및 표지

DNA 프로브의 정제는 QIAEX II®(QIAGEN Inc., Valencia, CA, 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 및 chemiluminescent detection

각 세균에서 추출한 5 µg의 지놈 DNA를 *Hind*III 또는 *Pst*I 제한효소로 절단한 것들을 각각 0.8% 아가로스 젤에 전기영동하고 통상의 capillary transfer법으로 nylon membrane(Roche Diagnostics)에 transfer하고, 120°C 진공오븐에서 30분 동안 baking하여 DNA를 membrane에 고정시켰다. Membrane을 hybridization 용액(5 × SSC, 50% formamide, 0.1% sodium-lauroylsarcosine, 0.02% SDS, 2% blocking reagent)으로 4시간 동안 prehybridization시킨 다음 이를 버리고, 새로운 hybridization 용액에 DIG-High Prime을 이용하여 labeling시킨 DNA 프로브를 첨가하여 12시간 hybridization하였다. 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. Blocking solution(buffer 2) 100 ml를 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 ml washing buffer로 2회 세척하였다. Detection buffer(buffer 3) 20 ml에서 2~5분간 안정되게 하였다. DNA쪽이 위로가게 하여 membrane을 polyethylene film상에 놓고 약 20방울(1 ml)의 CSPD®를 적용한 후, 즉시 polyethylene film으로 membrane을 덮어 기질이 membrane상에 고루 퍼질 수 있게 하였다. 5분간 상온에서 반응 후 과량의 액을 제거하고 film의 가장자리를 봉하여, 형광 반응이 일어나도록 37°C 배양기에서 15분간 반응시킨 후, 상온에서 X-ray film(Lumi-film chemiluminescent®, Roche Diagnostics)에 15~25분간 노출시켰다.

DNA 프로브들의 핵산염기서열 결정

DNA 프로브인 Pn17 및 Pn34의 핵산염기서열 결정은 통상의 extension termination법을 이용하여 Bioneer 사에 의뢰하여 시행하였다. 이때 ChDC-F(5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG AA-3') 및 ChDC-R(5'-CCT CAC TAA AGG GAA CAA AAG C-3') 프라이머는 두 DNA 프로브의 핵산염기서열결정에 공통적으로 사용하였다. Pn17-F1(5'-AAG TCG TTG TTG AGC GTG AA-3'), Pn17-R1(5'-AAA GAT TTC GCC AAG TGC TA-3'), Pn17-F0.5(5'-CGT AAA AAG AAG TTG CCT GTG A-3'), Pn17-R0.5(5'-CGC ACC ATT CGC TCT GA-3') 및 Pn17-F2(5'-CGC GAG CGA ATG AAT GT-3') 프라이머는 Pn17 DNA 프로브의 핵산염기서열결정에, Pn34-F1(5'-GAC GGA ATG CCT CAA CTA TCT GTA-3') 및 Pn34-R1(5'-ATT GGG CGG TAA GGC TCA GT-3') 프라이머는 Pn34 DNA 프로브의 핵산염기서열결정에 추가적으로 사용하였다. 이들 프라이머의 설계는 PrimerSelect 프로그램(Version 5.00; DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA)을 이용하였으며, Bioneer 사에 의뢰하여 합성하였다. 이들 DNA 프로브의 핵산염기서열을 결정한 후 GenBank에 등록하였다.

실험 결과

Pn17 및 Pn34 DNA 프로브들의 종-특이성을 알아보기 위해, *P. intermedia*와 *P. nigrescens*를 포함한 6종 15 균주의 혐기성 구강미생물 참고균주들을 지놈 DNA를 *Hind*III 제한효소로 절단한 후 Southern blot 분석을 실시하였다. 그 결과 두 프로브 모두 *P. intermedia*와 *P. nigrescens* 지놈 DNA와만 hybridization하였고, *P. intermedia*와 *P. nigrescens*를 제한효소절편길이다양화에 의해 검출할 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 1).

*P. intermedia*와 *P. nigrescens* 임상분리 균주들의 지놈 DNA들을 이용하여 Pn17 DNA 프로브의 종-특이성을 Southern blot 분석법으로 조사하였다. 그 결과 참고균주인 *P. nigrescens* ATCC 33586^T와 임상에서 분리한 *P. nigrescens* 균주들(ChDC KB5, KB6, KB50 및 B270)의 지놈을 *Hind*III 제한 효소로 절단한 경우에는 모두 같은 크기(2.5 kbp)의 반응 밴드가 보였다(Fig. 2A). 하지만, 서양인과 한국인에서 분리된 *P. intermedia* 균주들은 서로 상이한 크기의 반응 밴드를 보였다(Fig. 2A). *Pst*I 제한 효소로 절단한 경우에 있어서는 *P. nigrescens* ATCC 33586^T와 임상에서 분리한 *P. nigrescens* 균주들(ChDC KB5, KB6, KB50 및 B270)간의 동일한 크기의 반응 밴드들(약 5.0 kbp 및 1.0 kbp)도 있었고, 서로 상이한 밴드들도 나타났다(Fig. 2B). *P. intermedia* 균주들의 경우

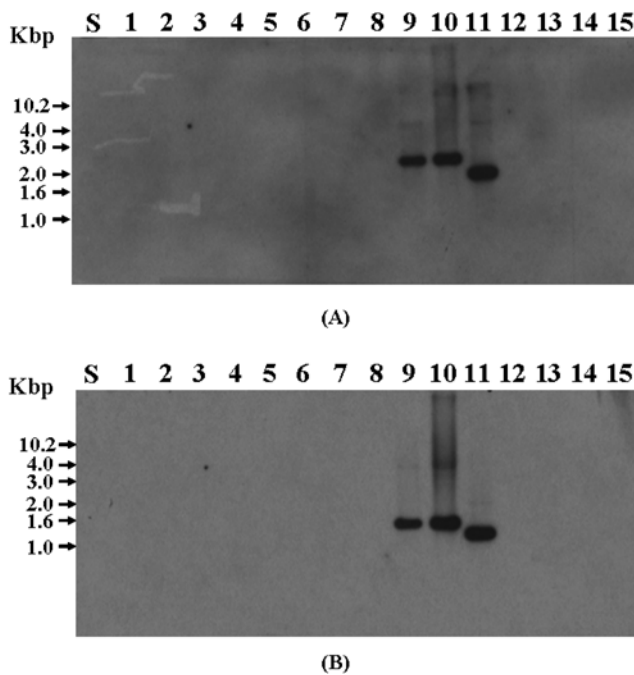


Fig. 1. Southern blot analysis to investigate the specificity of (A) Pn17 and (B) Pn34 DNA probes with the *Hind*III-digested genomic DNAs of reference strains. Lanes: S, *Hind* III-digested λ DNA size marker; 1, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T; 2, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 23726; 3, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T; 4, *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T; 5, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T; 6, *P. gingivalis* ATCC 33277^T; 7, *P. gingivalis* ATCC 53978; 8, *P. gingivalis* ATCC 49417; 9, *P. intermedia* ATCC 25611^T; 10, *P. intermedia* ATCC 49046; 11, *P. nigrescens* ATCC 33563^T; 12, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43717^T; 13, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718; 14, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384; 15, *C. rectus* ATCC 33238^T. kbp, kilobase pairs.

에 있어서는 참고균주인 *P. intermedia* ATCC 25611^T과 한국인에서 얻은 임상 분리 균주인 *P. intermedia* ChDC KB14, KB18 및 KB19가 같은 밴드 양상을 보였고, 참고균주인 *P. intermedia* ATCC 49046과 임상 분리 균주인 *P. intermedia* ChDC KB2, KB3, KB29 및 KB53이 같은 크기의 반응 밴드를 보였다(Fig. 2B).

Pn17 DNA 프로브의 핵산염기서열을 분석한 결과 2,517 bp(GenBank accession no. GU393245)로 구성되어 있음을 알 수 있었다. Pn17 DNA의 핵산염기서열을 미국 국립보건원에서 제공하는 Blastx 프로그램으로 검색한 결과 *Prevotella veroralis* F0319 균주의 DNA-directed RNA polymerase beta (*rpoB*) 단백질(GenBank accession number; ZP_05858236)과 아미노산 염기서열 수준에서 92% 동일하다는 것을 알 수 있었다. 또한 Pn17 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 MapDraw 프로그램(Version 5.00; DNASTAR, Inc., Madison, USA)을 이용하여 *Pst*I 제한효소절편 자리를 검색한 결과 931, 1108, 1813 뉴클레오타이드 자리에 존재하였다. 이는 Fig. 2B에서 Pn17 DNA 프로브로 반응하는 *Pst*I 제한효소로 절단된 *P.*

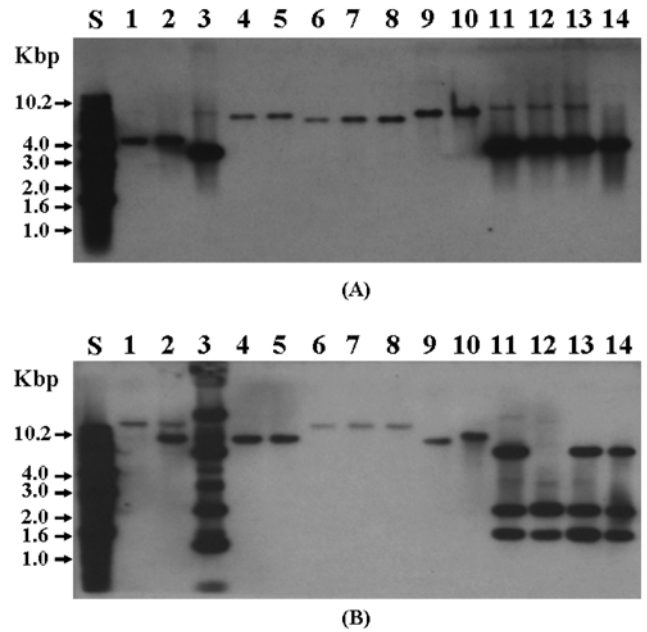


Fig. 2. Southern blot analysis to confirm the specificity of the Pn17 DNA probe with the (A) *Hind*III- or (B) *Pst*I-digested genomic DNAs of clinical strains of *P. intermedia* and *P. nigrescens*. Lanes: S, *Hind* III-digested λ DNA size marker; 1, *P. intermedia* ATCC 25611^T; 2, *P. intermedia* ATCC 49046; 3, *P. nigrescens* ATCC 33563^T; 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.

nigrescens ATCC 33586^T 지놈 절편 중 178 bp와 706 bp가 존재함과 비교할 때 서로 일치하는 결과였다(Fig. 2B).

Pn34 DNA 프로브의 *P. intermedia* 및 *P. nigrescens*에 대한 종-특이성을 Southern blot 분석법으로 조사한 결과, 표준균주인 *P. nigrescens* ATCC 33586^T와 임상에서 분리한 *P. nigrescens* 균주들(ChDC KB5, KB6, KB50 및 B270)의 지놈을 *Hind*III 제한 효소로 절단한 경우에는 모두 같은 크기(1.9 kbp)의 반응 밴드가 보였다(Fig. 3A). *P. intermedia* 균주들은 서양인에서 분리된 균주들의 경우 약 2.3 kbp의 반응 밴드가 보였지만, 한국인에서 분리된 균주들은 약 5.0 kbp를 보이는 균주들(*P. intermedia* ChDC KB14, KB18 및 KB19)과 약 6.0 kbp를 보이는 균주들(*P. intermedia* ChDC KB2, KB3, KB29 및 KB53) 두 가지 유전형형을 보였다(Fig. 3A). *Pst*I 제한 효소로 절단한 경우에 있어서는 *P. nigrescens* ATCC 33586^T 균주의 경우 4.2 kbp, 6.0 kbp 및 14.0 kbp 크기의 반응 밴드가 보였고, 한국인에서 분리된 임상 분류 균주들의 경우 *P. nigrescens* ChDC KB6 균주만 3.2 kbp와 1.5 kbp 크기의 반응 밴드를 보였고, 나머지 임상 분류 균주들(ChDC KB5, KB50 및 B270)은 모두 4.2 kbp 반응 밴드만 보였다(Fig. 3B). *P. intermedia* 균주들의 경우에 있

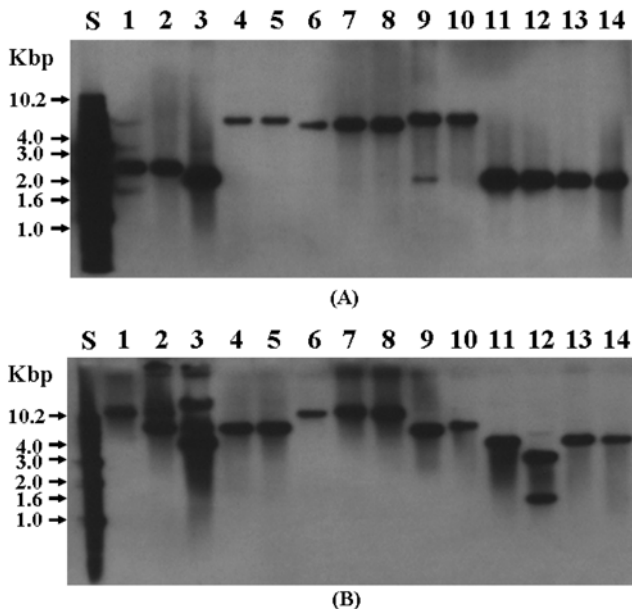


Fig. 3. Southern blot analysis to confirm the specificity of the Pn34 DNA probe with the (A) *Hind*III- or (B) *Pst*I-digested genomic DNAs of clinical strains of *P. intermedia* and *P. nigrescens*. The lanes are the same as in Fig. 2.

어서는 참고균주인 *P. intermedia* ATCC 25611^T균주와 한국인에서 얻은 임상 분리 균주 중 *P. intermedia* ChDC KB14, KB18 및 KB19가 약 10.2 kbp의 같은 반응 밴드를 보였고, 참고균주인 *P. intermedia* ATCC 49046과 임상 분리 균주인 *P. intermedia* ChDC KB2, KB3, KB29 및 KB53에서 약 6.0 kbp의 같은 크기의 반응 밴드를 보였다. 하지만, *P. intermedia* ATCC 49046의 경우는 임상 분리 균주들과는 달리 약 14.0 kbp 크기의 반응 밴드 하나가 더 보였다(Fig. 3B).

Pn34 DNA 프로브의 핵산염기서열을 분석한 결과 1,918 bp(GenBank accession no. GU393244)로 구성되어 있었으며, Blastx 프로그램으로 검색한 결과 첫 번째와 169 번째 핵산염기서열(1-169 nts)들은 *Prevotella veroralis* F0319 균주의 *rpoB* 단백질(GenBank accession number; ZP_05858236)과 아미노산 염기서열 수준에서 95% 동일하였고, 695-1918 nts들은 *Prevotella veroralis* F0319 균주의 DNA-directed RNA polymerase beta' (*rpoB'*) 단백질(GenBank accession number; ZP_05858235)과 아미노산 염기서열 수준에서 94%의 상동성을 보였다. Pn34 DNA 프로브의 *rpoB* 부분은 Pn17의 *rpoB*보다 3'쪽에 위치한 것으로 분석되었다.

Pn34 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 MapDraw 프로그램을 이용하여 *Pst*I 제한효소절편 자리를 검색한 결과 존재하지 않았다. 이는 Pn34 DNA 프로브로 반응하는 *Pst*I 제한효소로 절단된 *P. nigrescens* ATCC 33563^T 지놈 절편이 모두 1.9 kbp보다 크다는 것과 비교할 때 서로 일치하는 결과였다(Fig. 3B).

고 찰

본 연구 결과 Pn17과 Pn34 DNA 프로브들은 제한효소 절편길이다양성을 이용한 방법에 의해 *P. intermedia*와 *P. nigrescens* 균주들을 동시에 검출할 수 있음을 알 수 있었다. 특히 DNA 프로브 Pn17의 경우는 *Hind*III 및 *Pst*I 제한효소 모두를 이용하여 두 세균 종을 동정할 수 있으며, Pn34의 경우는 *Hind*III 제한효소만이 두 세균 종의 동정에 이용 가능하였다. Pn17과 Pn34 DNA 프로브들은 DNA-의존성 RNA 중합효소(RNAP)를 구성하는 beta 및 beta' 폴리펩타이드를 암호화하는 것들이었다. 즉, RNAP는 2개의 alpha, 1개의 beta, 1개의 beta', 및 1개의 omega subunit로 구성된 catalytic core(촉매 중심)와 여기에 promoter에 결합되는 sigma factor가 결합되어 holoenzyme이 되어 전사를 촉매할 수 있게 된다.

현재 분류학적 측면에서 가장 많이 이용되고 있는 유전자는 16S rRNA 유전자이다. 하지만, 몇몇 종들에 있어서는 16S rRNA 유전자 핵산염기서열의 상동성이 98% 이상이기 때문에 이 유전자의 핵산염기서열로는 각각의 종을 동정할 수가 없는 경우가 있다(Khamis 등, 2004). 최근 세균의 종 수준에서의 분류 및 동정에 있어서 16S rRNA 유전자를 대체할 수 있는 유전자로 *rpoB*를 많이 이용하고 있다(Drancourt 와 Raoult, 2002; Khamis 등, 2003; Khamis 등, 2004; Kim 등, 1999; Ko 등, 2002; Renesto 등, 2001). 앞으로 *P. nigrescens* ATCC 33563^T 균주에서 *rpoB* 유전자의 5'말단 부분과 3'말단 부분을 클로닝하고, 완전한 *rpoB* 유전자의 핵산염기서열을 결정한다면, 이를 바탕으로 *Prevotella* spp.의 분류 및 동정에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

P. nigrescens ChDC KB5와 KB6 균주들은 같은 환자의 구강 내에서 분리되었다. 하지만 Southern blot 분석법 결과에 의하면, 이들이 같은 환자의 구강 내에서 분리된 같은 종에 속하지만, 제한효소절편길이다양화에 의해 구별이 될 정도로 지놈 DNA의 염기상에 차이가 있음을 알 수 있었다(Fig 2B 및 3B). 이는 유전학적으로 서로 다른 균주가 같은 환자의 구강 내에 존재할 수 있다는 것을 의미한다. 반면, *P. intermedia* ChDC KB2, KB3 및 KB53들과 *P. intermedia* ChDC KB14, KB18 및 KB19들은 같은 환자의 서로 같거나 혹은 서로 다른 치아 부위에서 검출되었지만, 본 연구에서 사용된 DNA 프로브에는 서로 같은 반응 밴드를 보였다(Fig. 2 및 3). van Steenbergem 등(1991)은 환자로부터 분리 배양한 10 균주의 *P. intermedia*와 *P. nigrescens* 지놈 DNA의 제한효소절편 패턴을 연구한 결과 모든 균주들이 서로 상이한 양상을 갖음을 관찰하여 이 종들의 유전적 다양성을 발표하였다. Mättö 등(1996)도 ribotyping법에 의해 *P. intermedia* 종의 임상 분류 균주들 간에 유전적 다양성이 존재함을 발표하였다.

치주질환 병소의 치면세균막 또는 치근관 감염 부위의 치수를 이용하여 각각의 병소에 존재하는 세균을 짧은 시간 동안 많은 종류의 세균의 존재 유무를 알아볼 수 있는 checkerboard DNA-DNA hybridization method을 이용한 역학 연구 결과가 진행되었다(Papapanou 등, 2000; Siqueira 등, 2000; Socransky 등, 1994). 이러한 방법은 동시에 많은 종류의 DNA를 이용하여 동시에 많은 샘플을 대상으로 hybridization 반응을 시킬 수 있다는 장점이 있다. 하지만, 이때 사용되는 프로브가 세균 전체 지놈 DNA를 사용하기 때문에 유전학적으로 상동성이 높은 세균 종들 끼리 교차반응을 보일 수 있다는 단점이 있다. 이러한 단점은 세균을 종 수준에서 동정할 수 있는 DNA 프로브를 개발함으로써 극복될 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구 결과를 종합하면, Pn17 및 Pn34 DNA 프로브는 sothern blot 분석법을 통한 제한효소절편길이다양성에 의해 *P. intermedia*와 *P. nigrescens* 균주들을 동시에 검출할 수 있음을 알 수 있었고, 두 DNA 프로브의 핵산 염기서열은 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*를 동시에 검출할 수 있는 multiplex PCR 프라이머 개발에 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

참고 문헌

- Ali RW, Johannessen AC, Dahlen G, Socransky SS, and Skaug N. Comparison of the subgingival microbiota of periodontally healthy and diseased adults in northern Cameroon. *J Clin Periodontol.* 1997;24:830-35.
- Baumgartner JC, Bae KS, Xia T, Whitt J, David LL. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and polymerase chain reaction for differentiation of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *J Endodontics.* 1999; 25:324-8.
- Conrads G, Mutters R, Fischer J, Brauner A, Luticken R, Lampert F. PCR reaction and dot-blot hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally healthy individuals. *J Periodontol.* 1996;67:994-1003.
- DiRienzo JM, Cornell S, Boehringer H. Use of randomly cloned DNA fragments for the identification of oral spirochetes. *Oral Microbiol Immunol.* 1991;6:88-96.
- Drancourt M, Raoult D. *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol.* 2002;40: 1333-8.
- Frandsen EV, Poulsen K, Kilian M. Confirmation of the species *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Int J Syst Bacteriol.* 1995;45:429-35.
- Fukushima H, Moroi H, Inoue J, Onoe T, Ezaki T, Yabuuchi E, Lung KP, Walker CB, Clark WB, Sagawa H. Phenotypic characteristics and DNA relatedness in *Prevotella intermedia* and similar organisms. *Oral Microbiol Immunol.* 1992;7:60-4.
- Gang S-W, Kim S-H, Kim D-K, Seong J-H, Kim B-O, Han J-J, Kook J-K. Study on isolation of *Prevotella nigrescens* 9336-specific DNA probe using random cloning method. *J Korean Acad Periodontol.* 2002;32:269-79.
- Gharbia SE, Haapasalo M, Shah HN, Kotiranta A, Lounatmaa K, Pearce MA, Devine DA. Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infections. *J Periodontol.* 1994;65:56-61.
- Gmur R, Wyss C. Monoclonal antibodies to characterize the antigenic heterogeneity of *Bacteroides intermedius*. In Macario AJL, Conway de Macario E. (eds), *Monoclonal Antibodies Against Bacteria*, vol. I, pp 91-119, Academic Press, New York, 1985.
- Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;20: 340-9.
- Khamis A, Colson P, Raoult D, Scola BL. Usefulness of *rpoB* gene sequencing for identification of *Afpia* and *Bosea* species, including a strategy for choosing discriminative partial sequences. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:6740-9.
- Khamis A, Raoult D, La Scola B. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J Clin Microbiol.* 2004;42:3925-31.
- Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, Kim SJ, Bai GH, Chae GT, Kim EC, Cha CY, Kook YH. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J Clin Microbiol.* 1999;37:1714-20.
- Kim J-H, Yoo SY, Lim S-A, Kook J-K, Lim S-S, Park S-H, Hwang H-K. Identification of putative pathogens in acute endodontic infections by PCR based on 16S rDNA. *J Kor Acad Conserv Dent.* 2003;28:178-83.
- Kim M-K, Kim H-S, Kim B-O, Yoo SY, Seong J-H, Kim D-K, Lee SE, Choe S-J, Park J-C, Min B-M, Jeong M-J, Kim DK, Shin Y-K, Kook J-K. Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rDNA primers for simultaneous detection of *Fusobacterium nucleatum* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Microbiol Biotechnol.* 2004;14: 110-5.
- Ko KS, Lee HK, Park MY, Lee KH, Yun YJ, Woo SY, Miyamoto H, Kook YH. Application of RNA polymerase beta-subunit gene (*rpoB*) sequences for the molecular differentiation of *Legionella* species. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:2653-8.
- Kook J-K, Jung H-K, Seong J-H, Son J-B, Kim B-O, Kim D-K. Cloning of DNA probes for *Campylobacter rectus* ATCC 33238. *J Korean Acad Dent Health.* 2002;26:511-21.
- Krieg NR. Identification of Prokaryotes. In Garrity G. (ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 1, pp 33-8, Springer Verlag, New York, 2001.
- Lippke JA, Strzempko MN, Raia FF, Simon SL, French, CK. Isolation of intact high-molecular-weight DNA by using guanidine isothiocyanate. *Appl Environ Microbiol.* 1987;53: 2588-9.
- Mättö J, Saarela M, von Troil-Lindén B, Könönen E, Jousimies-Somer H, Torkko H, Alaluusua S, Asikainen S. Distribution and genetic analysis of oral *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol.* 1996; 11:96-102.
- Nakazawa F, Zambon JJ, Reynolds HS, Genco RJ. Serological

- studies of oral *Bacteroides intermedius*. Infect Immun. 1988;56:1647-51.
- Papapanou PN, Neiderud AM, Papadimitriou A, Sandros J, Dahlen G. "Checkerboard" assessments of periodontal microbiota and serum antibody responses: a case-control study. J Periodontol. 2000;71:885-97.
- Renesto P, Gouvernet J, Drancourt M, Roux V, Raoult D. Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. J Clin Microbiol. 2001;39:430-7.
- Shah HN, Gharbia SE. Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1992;42:542-6.
- Siqueira JF, Rocas IN Jr, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2000;89:744-8.
- Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. Biotechniques. 1994;17:788-2.
- Teanpaisan R, Douglas CW, Eley AR, Walsh TF. Clonality of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolated from periodontally diseased and healthy sites. J Periodontal Res. 1996;31:423-32.
- van Steenberg TJ, Van der Velden U, Abbas F, de Graaff J. Microflora and bacterial DNA restriction enzyme analysis in young adults with periodontitis. J Periodontol. 1991;62:235-41.
- van Steenberg TJ, Vlaanderen CA, de Graaff J. Deoxyribonucleic acid among strains of *Bacteroides melaninogenicus* and related species. J Appl Bacteriol. 1982;53:269-76.
- Yoo SY, Kim M-K, Kim H-S, Hwang H-K, Kim P-S, Lim S-Y, Oh S-H, Min J-B, Kook J-K. Identification of bacteria from periapical abscess using 16S rDNA clone libraries. Kor J Microbiol Biotechnol. 2004;32:195-8.