

Pig27 및 Pn23 DNA 프로브를 이용한
Prevotella intermedia 및 *Prevotella*
*nigrescens*의 검출

Detection of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* using Pig27 and Pn23 DNA probes

2006년 2월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

이 영 석



조선대학교

CHOSUN UNIVERSITY



100355612 2006-09-13

Pig27 및 Pn23 DNA 프로브를 이용한
Prevotella intermedia 및 *Prevotella*
*nigrescens*의 검출

지도교수 장 현 선

이 논문을 박사학위신청 논문으로 제출함

2005년 10월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

이 영석

이영석의 박사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 수 김 병 

위원 원광대학교 교수 수 유 형 

위원 조선대학교 교수 수 국 중 

위원 조선대학교 교수 수 김 도 

위원 조선대학교 교수 수 장 현 

2005년 12월 일

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	iv
I. 서론	1
II. 연구 재료 및 방법	3
III. 연구결과	10
IV. 총괄 및 고안	23
V. 결론	27
참고문헌	28

표 목 차

Table 1. The results of homologous search (BLASTX) of Pig27 DNA probe	21
Table 2. The results of homologous search (BLASTX) of Pn23 DNA probe	22

도 목 차

Fig. 1. Composite summary of the inverted dot blot hybridization screening.	13
Fig. 2. Southern blot analysis to determine the specificity of the Pig27 DNA probe	14
Fig. 3. Southern blot analysis to determine the specificity of the Pn23 DNA probe	15
Fig. 4. Nucleotide sequences of Pig27 DNA probe	16
Fig. 5. Nucleotide sequences of Pn23 DNA probe	17
Fig. 6. Nucleotide sequence homologous search of Pig27 DNA by Blastn program supported by The Institute for Genomic Research (http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html)	19

ABSTRACT

Detection of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* using Pig27 and Pn23 DNA probes

Lee, Young-Seok, D.D.S., M.S.D.

Advisor : Prof. Jang, Hyun-Seon, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

The purpose of this study is to develop species-specific DNA probe for the identification of *Prevotella intermedia* and *P. nigrescens*. The *Hind*III-digested genomic DNAs of *P. intermedia* ATCC 49046 and *P. nigrescens* ATCC 33563^T were cloned by shotgun method. The candidate species-specific DNA fragments were primary screened by inverted dot blot hybridization and then confirmed by Southern blot analysis. The nucleotide sequences of species-specific DNA probes were determined by chain termination method. The data showed that Pig27 and Pn23 DNA probes were specific to the *P. intermedia* and *P. nigrescens*, respectively. The Pig27 DNA probe contains leucine rich repeat domain protein and ADP-ribosylglycohydrolase. These results indicate that the Pig27 and Pn23 DNA probes could be useful in detection of the *P. intermedia* and *P. nigrescens*, respectively, at the species level.

I. 서 론

치주질환은 치아우식증과 더불어 구강 내에서 가장 빈번하게 발생하는 양대 구강병 중 하나이며, 다양한 전신적 및 국소적 원인 인자에 의해 발병 및 진행되지만, 치은연하치면세균막에 존재하는 세균이 주요한 원인 인자인 것으로 알려져 있다. 구강 내에는 약 500여 종의 세균이 서식하는 것으로 알려져 있으며(Paster et al., 2001), 이들 세균 종들 중 *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*(*Bacteroides forsythus*), *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum* 등이 주요한 원인 세균종인 것으로 보고되고 있다(Dzink et al., 1988; Moore et al., 1991).

여러 치주질환 원인균종들 중에서, *P. intermedia*는 그람 음성 혐기성 간균으로써 종 내(intraspecies)에 두 가지 DNA 그룹이 존재함이 보고되었고 (Johnson and Holdeman, 1983), DNA-DNA hybridization(Fukushima et al., 1992; van Steenbergen et al., 1982), 혈청학적 실험(Nakazawa et al., 1988), isoenzyme 검색(Frandsen et al., 1995) 및 전체단백질의 전기영동 분석(Shah and Gharbia, 1992) 등의 자료를 근거로 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*로 재분류되었다(Shah and Gharbia, 1992; Frandsen et al., 1995). 이러한 분류학적 변화에 의해 치주질환이 이환된 병소부위와 건강한 부위에서 *P. intermedia*와 *P. nigrescens* 두 균종의 검출 빈도에 대한 연구가 진행되었다. 여러 연구결과에 의하면, *P. intermedia*는 치주질환이 이환된 병소 부위, *P. nigrescens*는 건강한 부위나 근관병소에 연관이 깊은 것으로 보고되고 있다(Gharbia et al., 1994). 또한, *P. nigrescens*보다는 *P. intermedia*가 탐침 후 자발적 출혈(bleeding on probing)이 있는 치주질환 병소에서 검출 빈도가 높다는 보고도

있다(Kook et al., 2005). 그러나, 다른 보고에 의하면 건강한 부위에서도 *P. intermedia*가 검출됨이 보고되고 있다(Kononen, 1993).

*P. intermedia*와 *P. nigrescens*의 치주질환과의 역학관계를 연구하거나, 진단이나 예후 평가에 있어서 신속하고 정확한 세균의 동정은 매우 중요하다. 현재 두 균종을 임상 샘플에서 검출할 수 있는 중합효소연쇄반응(PCR, polymerase chain reaction)법이 개발되어 이용되고 있다(Baumgartner et al., 1999). PCR법이 여러 세균 동정법들 중에서 가장 간편하고, 신속한 방법이지만, 여러 세균 종을 표적으로 할 경우에는 Socransky 등(1994)에 의해 개발된 "Checkerboard" DNA-DNA hybridization법이 더 권장될 수 있다. 그러나, 기존의 "Checkerboard" DNA-DNA hybridization법에서는 세균 지놈 DNA 전체를 labeling하여 프로브로 이용하기 때문에 유전학적으로 비슷한 균종간의 교차반응이 일어날 수 있고, 상대적으로 많은 양의 지놈 DNA가 필요하다는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위해서는 플라스미드 벡터에 클로닝할 수 있을 정도 크기의 균종-특이 DNA 프로브의 개발이 필요하다. 최근 Kook 등(2003b)은 "inverted dot blot hybridization screening method"라고 명명된 신속하고, 간편하게 세균 종 또는 아종 특이 DNA 프로브를 검색할 수 있는 새로운 방법을 고안하였다. Gang 등(2002)은 *P. nigrescens* 9336^T(ATCC 33563^T)에 대한 특이 DNA 프로브인 Pn23을 보고하였다. 그러나 그들의 연구에서는 오직 *P. nigrescens* 균종 중 ATCC 33563^T 균주 하나만을 이용하였기 때문에, Pn23 DNA 프로브가 균주-특이적인지 아니면, *P. nigrescens* 종-특이적인지를 명확하게 밝히지 못하였다.

그러므로 이 연구에서는 inverted dot blot hybridization screening method를 이용하여 *P. intermedia*에 대한 종-특이 DNA 프로브를 클로닝하고, Pn23 DNA 프로브의 균주- 혹은 종-특이성을 한국인에서 분리 배양된 *P. nigrescens* 균주 및 이에 유전학적으로 가장 가까운 *P. intermeida* 균주의

지놈 DNA를 추출하여 Southern blot hybridization을 이용하여 검증하고자 한다.

II. 연구재료 및 방법

II-1. 세균 및 배양 조건

이 연구에서 사용된 *P. intermedia* ATCC 25611^T, *P. intermedia* ATCC 49046 및 *P. nigrescens* ATCC 33563^T 등은 American Type Culture Collection(ATCC, University Boulevard, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 한국인의 구강에서 분리 동정된 *P. intermedia* KB2, *P. intermedia* ChDC KB3, *P. intermedia* ChDC KB14, *P. intermedia* ChDC KB18, *P. intermedia* ChDC KB19, *P. intermedia* ChDC KB29, *P. intermedia* ChDC KB53, *P. nigrescens* ChDC KB5, *P. nigrescens* ChDC KB6, *P. nigrescens* ChDC KB50 및 *P. nigrescens* ChDC B270 균주들은 조선대학교 치과대학 생화학교실에서 분양받아 사용하였다. 모든 균주들은 tryptic soy broth (TSB)에 0.5% yeast extract, 0.05% cysteine HCl-H₂O, 0.5 mg/ml hemin 및 2 µg/ml vitamin K₁이 첨가된 배지에 접종하고, 5% H₂, 10% CO₂ 그리고 85% N₂가 공급되는 37°C 협기성 배양기에서 배양하여 사용하였다.

II-2. 세균 지놈 DNA의 추출

세균의 지놈 DNA는 인트론사(iNtRON Co., Seoul, Korea)의 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 추출하였다. 이를 간략히 설명하면 다음과 같다. 혈액한천배지에서 배양한 세균 1 군락을 3 ml의 액체배지에 접종한 다음, 후기 로그기까지 배양하고, 이중 1.5 ml를 10,000× g의 원심력을 이용하여 수확하였다. 수확한 세균에 50 µl의 Pre-incubation 용액과 3 µl의 lysozyme 용액을 넣고 잘 혼합한 다음 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 여기에 250 µl의 G-완충 용액을 넣고 잘 혼합한

후 65°C에서 15분간 반응시키고, 250 μ l의 결합 용액을 넣고 잘 혼합하였다. 이러한 세균 lysates를 G-spinTM column에 넣고 13,000 rpm에서 1 분간 원심분리(12,000 \times g) 하였다. Column에 500 μ l의 수세 용액 A를 넣고 다시 1 분간 원심분리(12,000 \times g) 하였다. 여기에 500 μ l의 수세 용액 B를 넣고 다시 1분간 원심분리하고, G-spinTM column을 새로운 eppendorf tube에 넣고 100 μ l의 용출 용액을 넣고 1분간 실온에 방치한 다음 13,000 rpm에서 1 분간 원심분리(12,000 \times g)하여 세균 지놈 DNA를 추출하였다.

II-3. 세균 지놈 DNA 절편의 클로닝

위에서 추출한 *P. intermedia* ATCC 49046 균주 지놈 DNA 100 ng을 *Hind* III 제한효소로 절단한 후, *Hind* III 제한효소로 절단시키고 bacterial alkaline phosphatase로 dephosphorylation시킨 pBluscriptII KS(+) vector(Stratagen Inc., Woodinville, WA, USA) 50 ng을 T4 DNA ligase (Bioneer Corp., Seoul, Korea)를 이용하여 4°C에서 16시간 동안 ligation시켰다. 이러한 ligation 반응물을 CaCl₂로 처리한 *Escherichia coli*(*E. coli*) DH5 α 에 transformation시키고 ampicillin(100 μ g/ml)-LB 한천평판배지에 도발하여 37°C에서 16시간 배양하였다. 세균 군락 각각을 3 ml의 ampicillin-LB broth에 접종하여 37°C에서 16시간 배양하여 플라스미드 추출에 이용하였다.

II-4. 플라스미드 DNA 추출

E. coli DH5 α 에 transformation시킨 각각의 재조합된 플라스미드 DNA는 AccuPrepTM Plasmid Extraction Kit(Bioneer Corp., Daejeon, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시대로 추출하였다. 이를 간략히 설명하면, 세균배양액 1 ml을 30초간 원침(12,000 \times g)하고, 얻어진 세균 덩어리를 250 μ l의

Resuspension buffer를 가하여 잘 혼탁한 후, 250 μ l Lysis buffer를 첨가하여 천천히 잘 혼합한 다음, 350 μ l의 Neutralization buffer를 첨가한 즉시 잘 섞은 후에 얼음에 5분간 방치하였다. 이것을 10분간 원심분리($12,000 \times g$)하여 상청액을 binding column tube에 옮기고, 1 분간 원심분리($12,000 \times g$)하였다. 여과액은 버리고, binding column tube에 80% 에탄올을 700 μ l 넣은 후 1분간 원심분리($12,000 \times g$)하였다. Binding column tube에 남아있을 여분의 에탄올을 제거하기 위해 여과액을 버리고, 다시 30초간 원심분리($12,000 \times g$)하였다. Binding column을 새로운 eppendorf tube로 옮기고, 여기에 100 μ l의 용출 용액을 넣고 1분간 기다린 다음 다시 1분간 원심분리 ($12,000 \times g$)하여 여과액을 -70°C 에서 보관하며 다음 실험에 사용하였다.

II-5. DNA 프로브의 정제 및 표지

DNA 프로브의 정제는 QIAEX II[®](QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 시행하였다. 1.5% 아가로스 젤 상에서 전기영동한 후 DNA 절편이 있는 부분을 깨끗하게 절제하여 1.5 ml eppendorf tube에 담고, buffer QX1을 아가로스 젤 250 mg당 600 μ l를 넣은 후 QIAEX II를 30초간 희석한 다음 20 μ l를 넣고, 50°C 에서 10분 동안 중탕하여 젤을 완전히 녹인 후, 30초간 원심분리($13,000 \times g$)하여 상청액은 버리고, buffer QX1 500 μ l로 압착결정을 세척한 다음 30초 동안 원심분리($13,000 \times g$)하였다. buffer PE 500 μ l로 2회 세척하여 30초 동안 원심분리($13,000 \times g$)한 후 10~15분 정도 압착결정을 건조시킨 다음 10 mM Tris-Cl(pH 8.5) 20 μ l로 elution하여 실험에 사용하였다.

DNA 프로브는 DIG-High Prime(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)을 이용하여 표지하였다. 표지 과정은 1 μ g의 DNA에 최종 부피가 16 μ l가 되도록 종류수를 넣고 끓는 물에서 10분간 가열하여 DNA를 변성시

킨 후 재빨리 얼음에 넣어 식혔다. 여기에 $4 \mu\text{l}$ DIG-High Prime을 첨가하여 잘 섞고 잠깐 원심분리한 후 37°C 에서 12시간 배양하였다. 배양 후 0.2 M EDTA를 넣어 반응을 정지시켰다.

II-6. Inverted dot blot hybridization

*P. intermedia*에 대한 종-특이 DNA 프로브를 신속하게 검색하기 위하여 Kook 등(2003b)이 개발한 inverted dot blot hybridization 검색법을 이용하였다. 이를 간략히 설명하자면, 앞에서 클로닝한 20 ng의 *P. intermedia* ATCC 49046 또는 지놈 DNA *Hind*III 제한효소절편(Pig27 또는 Pn23)을 95°C 에서 10분간 끓인 다음 바로 얼음에 5분간 방치한 다음 nylon membrane(Roche Diagnostics)에 blotting하고, 120°C 진공오븐에서 30분 동안 baking하여 DNA를 membrane에 고정시켰다. 이때 세균의 지놈 DNA를 DIG-oxigenin dUTP로 표지하여 프로브로 사용하여 통법으로 hybridization하였다.

II-7. Southern blot hybridization

Inverted dot blot hybridization법에 의해 검색된 *P. intermedia*에 대한 종-특이 후보 DNA 프로브(Pig27) 및 Gang 등(2002)의 연구에서 클로닝된 Pn23 DNA 프로브의 *P. nigrescens*에 대한 종-특이성을 검증하기 위해 Southern blot hybridization을 시행하였다. 이 연구에서 사용된 모든 균주로부터 추출한 5 μg 의 지놈 DNA를 0.8% 아가로스 젤에 전기영동하고 Vacuum Blotter(Model 785, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 통상의 vacuum transfer법으로 nylon membrane((Roche Diagnostics))에 transfer하고, 120°C 진공오븐에서 30분 동안 baking하여 DNA를 membrane에 고정시켰다.

Hybridization은 통법으로 시행하였다. 이를 간략히 설명하자면, membrane을

hybridization 용액($5\times$ 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(Roche Diagnostics)을 이용하여 labeling시킨 각 세균의 전체 지놈 또는 *Hind*III 제한효소 DNA 절편을 첨가하여 12시간 hybridization시켰다. Membrane을 실온에서 5분간 2× wash 용액 (2× SSC, 0.1% SDS)으로 2회 세척하고 다시 0.5× wash 용액 ($0.5\times$ SSC, 0.1% SDS)으로 68°C에서 15분간 2회 세척하였다.

II-8. Chemiluminescent detection

표지된 DNA 프로브가 membrane 상의 표적 DNA 가닥과 hybridization됨을 알아보기 위한 detection 과정은 chemiluminescent detection kit(Roche Diagnostics)를 사용하였으며, 제조회사의 지시대로 시행하였다. 이를 설명하자면, membrane을 100 ml의 Blocking solution(buffer 2)에 넣고 30분간 배양한 후 완충용액 2에 anti-DIG-AP conjugate를 75 mU/ml (1:10000) 첨가하여 희석한 20 ml 항체 완충용액에 membrane을 넣고 30분간 반응시켜서 15분간 100 ml의 수세 용액으로 2회 세척하였다. Membrane을 20 ml의 검출 완충용액 (완충용액 3)에서 2~5분간 안정되게 하였다. DNA쪽이 위로가게 하여 membrane을 polyethylene film상에 놓고 약 1 ml의 기질 (CSPD[®])용액을 적용한 후, 즉시 반대 측 sheet로 덮어 기질이 membrane상에 고루 퍼질 수 있게 하였다. 상온에서 5분간 반응 후 과량의 액을 제거하고 film의 가장자리를 봉하여, luminescent reaction이 일어나도록 37°C 배양기에서 15분간 반응시킨 후, 상온에서 X-ray film (Lumi-film chemiluminescen[®], Roche Diagnostics.)에 1~3 시간 노출시켰다.

II-9. 핵산염기서열 결정 및 핵산염기서열의 상동성 검색

핵산염기서열 결정은 바이오니아사(Daeheon, Korea)에 의뢰하여 결정하였다. 이때 사용되는 프라이머는 ChDC-GEM-F(5'-TTC CCA GTC ACG ACG TTG TAA AA-3')와 ChDC-GEM-R(5'-GTG TGG AAT TGT GAG CGG ATA AC-3')이었으며, 그 결과는 SeqMan 프로그램(Version 5.00; DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA)을 이용하여 분석하였다.

III. 연구결과

III-1. 세균 지놈 DNA의 *Hind*III 제한절편의 클로닝

P. intermedia ATCC 49046 지놈 DNA의 *Hind* III 제한절편의 클로닝의 결과 약 100여 개의 세균 접락이 나타났다(자료는 제시 안함). *Hind* III 제한절편 지놈 DNA가 함유된 재조합 플라스미드를 얻기 위해, 20개의 세균 접락을 배양하고, 플라스미드를 추출하여 *Hind* III 제한효소로 절단하여 0.8% agarose 젤 상에서 전기영동 하였다. 그 결과 *P. intermedia* ATCC 49046 지놈 DNA의 *Hind*III 제한효소절편을 16개를 얻었다. 이들 *P. intermedia* ATCC 49046 지놈 DNA을 함유한 재조합 플라스미드들을 각각 pBL-Pig*(^{*}는 배양한 세균의 순서를 의미함)라고 명명하였으며, 재조합 플라스미드에 삽입된 지놈 DNA는 Pig*라고 명명하였다 (Fig. 1).

III-2. Inverted Dot blot hybridization 및 Southern blot analysis에 의한 *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* 각각에 대한 종-특이 DNA 프로브의 검증

P. intermedia 및 *P. nigrescens* 각각에 대한 종-특이 DNA 프로브를 검색하기 위해 Inverted dot blot hybridization을 시행하였다. 그 결과 12개의 DNA *Hind*III 제한효소 절편(Pig12-Pig28)이 *P. intermedia* 종-특이 DNA 프로브 후보였다(Fig. 1).

이 연구에서는 총 12개의 종-특이 후보 DNA 프로브들 중 Pig27을 *P. intermedia*에 대한 종-특이성 검증에 이용하였고, Gang 등(2002)이 *P. nigrescens* G8-9K-3 균주-특이성이 있을 것이라 보고한 Pn23 DNA 프로브의 균주 혹은 종 특이성을 한국인에서 분리된 *P. intermedia* 및 *P.*

*nigrescens*를 대상으로 Southern blot hybridization법에 의해 확인하였다. Pig27 DNA 프로브를 이용한 Southern blot hybridization 결과 이 연구에 사용된 *P. intermedia* 지놈 DNA와 모두 hybridization 하였지만, *P. nigrescens* ATCC 33563^T 지놈 DNA와는 반응하지 않았다(Fig. 2). *Hind*III 제한효소로 절단한 지놈 DNA를 이용하여 Southern blot hybridization한 경우 *P. intermedia* ATCC 49046과 *P. intermedia* KB29 균주에서 Pig27 DNA 프로브와 같은 크기인 1.8 kbp의 반응 띠를 보였다(Fig. 2A). 그리고 *P. intermedia* ATCC 25611^T과 나머지 한국인 분리 균주들에서는 1.3 kbp 크기의 반응 띠가 나타났다(Fig. 2A). 그러나, *Pst*I 제한효소로 절단한 지놈 DNA를 이용하여 Southern blot hybridization 한 경우에서는 *Hind*III 제한효소를 이용한 경우와 반응 띠의 양상이 상이하였다(Fig. 2B). 즉, *P. intermedia* ATCC 25611^T에서만 2.2 kbp 크기의 반응 띠가 형성되었고, 나머지 균주들에서는 3.5 kbp 또는 10 kbp 이상의 반응 띠가 보였다(Fig. 2B).

Pn 23 DNA 프로브를 이용한 Southern blot hybridization 결과 *P. nigrescens* 균주들의 지놈 DNA들에서만 반응 띠가 생성되었다(Fig. 3). *Hind*III 제한효소로 절단한 지놈 DNA를 이용하여 Southern blot hybridization한 경우 한국인에서 분리된 *P. nigrescens* 균주들에서는 약 3.8 kbp 크기의 반응 띠가 나타났다(Fig. 3A). 또한, *Pst*I 제한효소를 이용한 경우에는 *P. nigrescens* ATCC 33563^T 균주에서는 약 12 kbp와 1.2 kbp 크기의 반응 띠가 생성되었고, 한국인에서 분리된 *P. nigrescens* 균주에서는 약 10.0 kbp와 6.5 kbp 크기의 반응 띠가 나타났다(Fig. 3B).

III-3. Pig27과 Pn23 DNA 프로브들의 핵산염기서열 결정

Pig27과 Pn23 DNA 프로브들의 핵산염기서열을 결정한 결과 각각 1,841 bp와 4,561 bp로 구성되어 있었다(Fig. 4와 5). *P. intermedia* 17 균주의 전체 지놈 DNA의 핵산염기서열이 The Institute of Genomic Research

(TIGR)에 의해 밝혀져 있었고, 이 연구소에서 제공하는 BLASTN 프로그램으로 상동성 검색을 한 결과, ADP-ribosylglycohydrolase라 생각되는 유전자와 leucine rich repeat domain 단백질 유전자의 핵산염기서열과 유사한 부분이 존재함을 알 수 있었다(Fig. 6). 미국립보건원에서 제공하는 BLASTX 프로그램을 이용하여 단백질 아미노산 염기서열 수준에서 상동성 검색을 한 결과는 Table 1과 Table 2와 같았다. Pig27 DNA 프로브의 핵산염기서열에는 *PstI* 제한효소 인식부위가 존재하지 않았으며(Fig. 4), Pn23 DNA 프로브의 핵산염기서열에는 3,685 bp에 하나의 *PstI* 제한효소 인식부위가 존재하였다(Fig. 5).

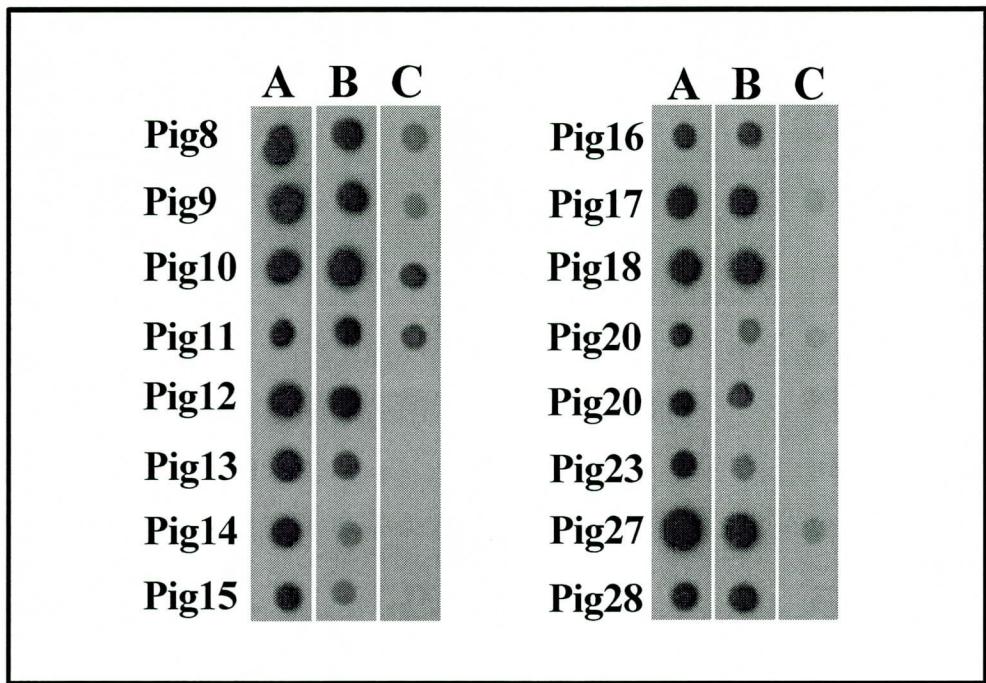


Fig. 1. Composite summary of the inverted dot blot hybridization screening. The 16 recombinant plasmid DNAs containing genomic DNA fragments derived from *P. intermedia* ATCC 49046 were hybridized with DIG-labeled genomic DNAs. The genomic DNAs were from: (A) *P. intermedia* ATCC 25611^T, (B) *P. intermedia* ATCC 49046, and (C) *P. nigrescens* ATCC 33563^T. Pig (Pig8–Pig28) means the recombinant plasmids containing genomic DNA fragments from *P. intermedia* ATCC 49046.

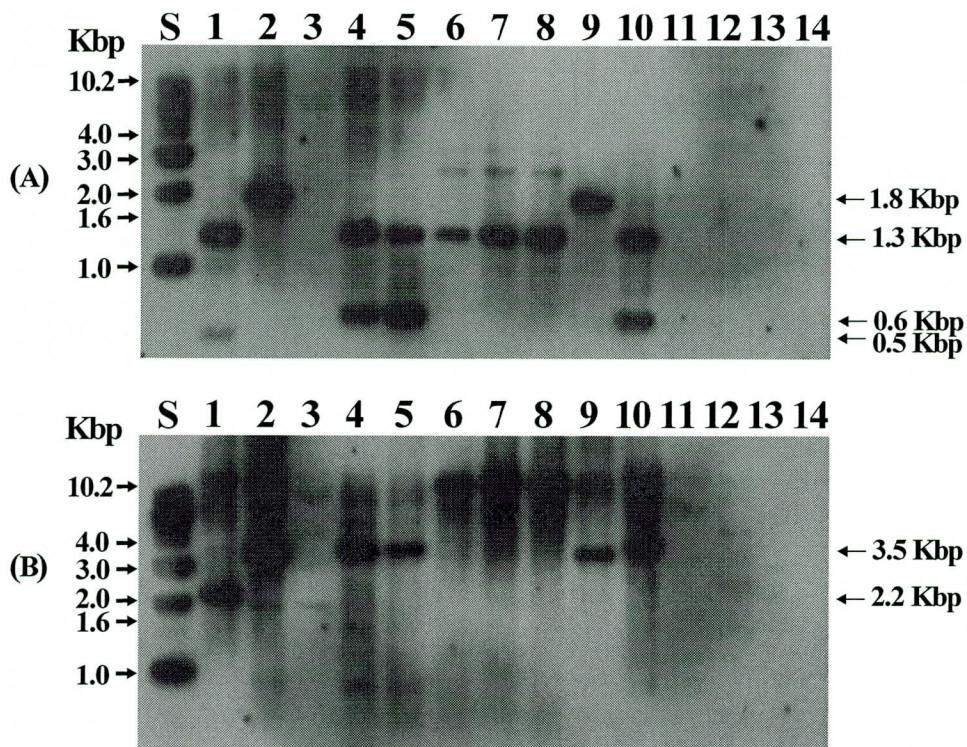


Fig. 2. Southern blot analysis to determine the specificity of the Pig27 DNA probe. The *Hind*III (A)- or *Pst*I (B)-digested bacterial genomic DNAs were electrophoresed and transferred to a nylon membrane; the nylon membrane was hybridized with a DIG-labeled Pig6 DNA fragment. lanes: S, 1 kbp DNA ladder (Bioneer Corp.); 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.

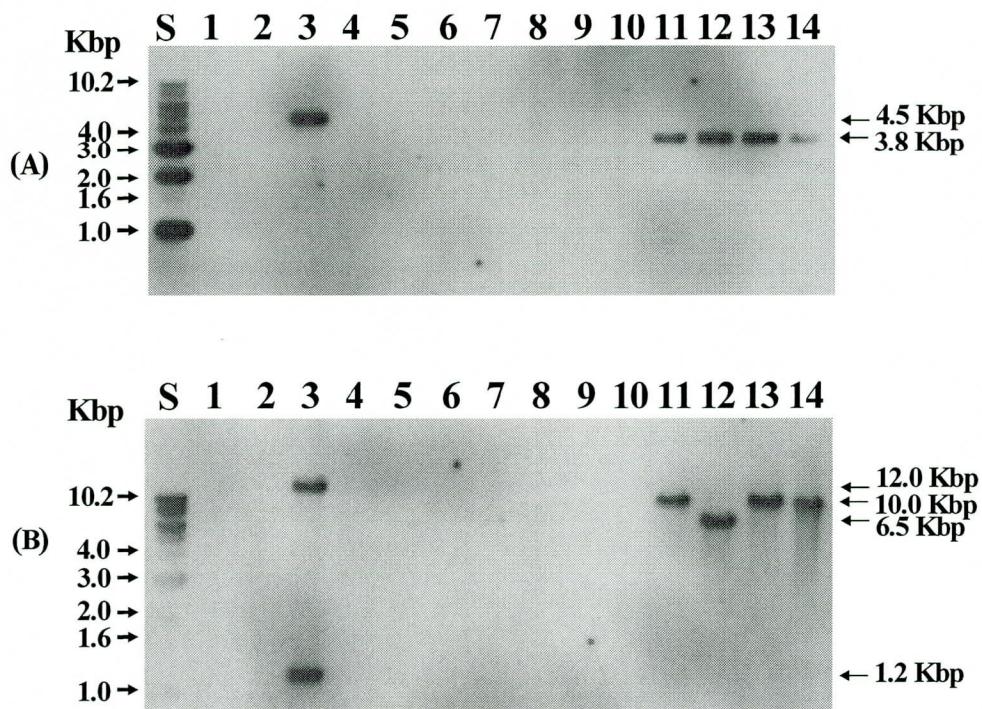


Fig. 3. Southern blot analysis to determine the specificity of the Pn23 DNA probe. The *Hind*III (A)- or *Pst*I (B)-digested bacterial genomic DNAs were electrophoresed and transferred to a nylon membrane; the nylon membrane was hybridized with a DIG-labeled Pig6 DNA fragment. lanes: S, 1 kbp DNA ladder (Bioneer Corp.); 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.

1 AAGCTTGGAA CTTGACGAAC CGTCAGCAT AGGCTATACG TTAAGGGAT TGGGTGCTGC
61 ATTGTGGGGC TTGTTCCACG CTACCAACTT TGAAGAAGGA TTGTTTCTTG TTGTCATG
121 AGCGGGTGTAT GCGGATACAA ATGCAGCTGT TGCTTGIGCC GTGTTAGGAG CTAATTGCG
181 CTACGCTTCT ATACCTAAA AATACATTGA CGGACTAACAA AGAAAAGACG ATTGATACCG
241 TATAATTGAT GATTGGTAA AAATTACCT ATGATTATT GCTACACAAG ATGAAATAT
301 TTITCACAAG TATAACTGTC GTGTAACCTG CTATACATCA ACCATTACA AACCTATTG
361 TTGTTGTTTC TAAAAGCCCC TGTTTGGCC CGTAAAACGG TAGGTTTCC ATGCCAAAAG
421 AGCGGCTTTC GCAACGTCAA AGCGTAATT CGACTTTTA ACAGAATTAT CTTTACAAAG
481 ATAAACAGAA AGACTCTCAC TGCTCACCA GTAGGTTGT TAAAAAATAT CTGGATATA
541 GCCTACCTA CCAACTTCT TATACCGAAC TAACGTATA TATACTGCG TCAGACAGTA
601 ATAATGAAAG TGTTTAAAG TTATAAACAT CTAAGAAATA TACAGAAACT ATTAATGCAA
661 ACCATAAAA ATATATCAIT CTATAACAAA TATTTAATT CCCTTTGAT TGTAAAAAAT
721 AATAACTATA TTGCAATAC TATTATATCA AGATAGATTA ATACTTAAA GCATATACGA
781 AAACCGCAA CAGGGAGCAG GCTGACTTAG TTAATCAGAA AGTACTCCCT AATGAAAATC
841 ATCTCTGTC CAACCGAGT AAGCGTACAG AAGGATTAAT CGAAGCGAT ACCCAGTCCA
901 TTAGAACTCG TCAAAGGAAC TGTTTGGCC AAATCTGCT GCTATTACCC ATTCAATTAC
961 CATCAAATAA CGCCCGCTAC AAGTGGCATA ATAAGAACAA TTATGAAAG AACCTTACCT
1021 ATCATCACCC TCTGCTACT CTCTGCTTG CAGGTATGTG CACAAAAGAA AACTATGAC
1081 TTCCAAGAAG GAAAGCTCTA TTACAAGGTT ACAGATGAA CAAAGCTACT TGTAGAAGIT
1141 ACAACAGAGC TTGAAGAACT CTTACAAACT ACTGGAACGC TATACAATAA ACCACTGAA
1201 GGCGATAATTG TAGTOCCAGC TAACGTAAAA TACCAAGGCA AACAGTACCC AGTAAATGCC
1261 ATTGGCGACA ACTCTTTCGG AGGTTGGGTT AAGATTACAT TGTCGCTCT TCCCTGCCAGC
1321 GTAACTACTT TAGGOGAACCA GGTTTCTCT TCTTGCACAG GCTGAAAGCG CATTACAGTG
1381 GATAAAAGACA ACCCAGTGT GAAAGACATT GACGGTGTAC TTTCGATAA GAGGGAAAT
1441 AACTAAATTG CTATACCAA TATGAGGGCA GCCAACTATG AAATCTCTGA GGGAACTTAA
1501 GAACCTAGTC CTGTAGCACT CTCTCTTGC AACCAATATG AGTCAATAAA GTTCCCTICA
1561 ACGTGTGAAGA AGATAGGCAT GCTCTCTTTC GGTCATGTG TGAAATTGCA CGAAGTAACT
1621 GTTCCAATA ATATTACAGA CCTCGGCTAC TTGCTTCT ATAATTGTAC AGGCTTGGAG
1681 AAAGCCATT TCAAGGCTGA TATTACCGAA TTAAACGAT ATATGTTAG CAGATGCACA
1741 GCATTAAGAAG AGGTTACCCCT CCTCTACT ATAGAACCTA TTGGCACTTG GGCCTTGGAA
1801 AGCTGTGTTT CAATGAAGAA TATTACATG CCAGAAAGCT T

Fig. 4. Nucleotide sequence of Pig27 DNA probe.

1 AAGCTTCITA GGTTGATAGTC CTTGGTGGCG TGTACCATTT ATAACCACA TIGCATCTGC
 61 CAATGTTT TGGTGAGAAA GAGGTGTTGA TATTCTAAC CAGCGTATT CCAATAGATA
 121 AGTCATATTG CGAAGGTCGC CAGACACGGC AGCTGAAAG GCTGCTTGT CTATGGCTT
 181 AACCGATGTA AGTCCCGCT CGGTTTCCCT TCTGCTTA AAGGCTGCTA TIGTACGGTT
 241 CTGACCATTT CGGAAGAGTA CAAATTCAA TCGTGGAG CCAAGTACTG AGTCGAATT
 301 ACCATTATTG TGTAACACAT ACTTCGTTGG GTTCTGCCA TTGATGCCG CAATGACCGC
 361 AGCATCGTTC AAACGCTGOG ACAACTCGCT GIGGTCGAGT GGCCAAGAGT CTATGTGTTG
 421 GTCTATTICA TTGTCGGTAG CGGCACCGTA AAGGAATGCT TCGCTCTGCT CCCAGTCGOG
 481 TCTTGCATTT TTGAAAGCGT CGCAGGCAAC ATCTATATCG CCTTGTGAA GTTGGCCAGC
 541 CTTAOGTTT TGATAAAGGT TCTGGCACCC CTGGTAGAGA ATATCAGCCT TGGCTGCCA
 601 GTCTGCATAG GTGGGCTAA CAACCGTTTC GAGATAGTTG GCTATTACTT TACCAATT
 661 TGCTTCCCG GCATTTCGGC TACTGGTTT CTCTGCCG TTAACTCGG TCTGTTGTC
 721 TTCTGTTACA AGTGGACTTG GIGITACATC GTGGCTGCTG CTGCTGAAA CGAACCGT
 781 TGAGAGTGT CTCGCCAGCA AAAGCATTC TAATTTTGT ACTTTTTCA TIGTATCTG
 841 AATTAAAAC TTATGTTA TGACITATTG TGATGAATIG TTATCCCTAT TTTCTACAA
 901 ACGGTATCTT TACAGAGTTG CAAACGTTGG GTTTTCTTA TTATAGGAAG AACCTTCGT
 961 ATGCTATTCC GATGTGATG GCTGGCTGT CGTGTGATCC TTCTCTAGA TTTCGATAAT
 1021 TATACTCOGC CTTTATGGCA ATCTGTTGTA TTGGATAGTA GTTATACCA GCCCCAAAAA
 1081 TGGCTTGTGTT GGCTCTACTC TTGGTTCGGC CATGTATGTA AGAGTCGAA TGTCAATGT
 1141 GTCCGAAGAG GTAAGACGT TGGTGTGCG CGCGCAGCT GTGAAATTGT GAGAACGATAT
 1201 CGTAGCCAAA TTCAACATC ATTGCCATIG CGTGGCTGCC AAAGTCTT CCGTGTGCCG
 1261 ATTCTGAGGG CTTGACGTTATG TGTTGTTAG GGTATGCCA CTTGGAAATT TC TTTGCT
 1321 TGCTTACGTA ACCGTAGTCA ATGTTGCCCT GIGCTATCCA GTGGAAGGGA TTAAGGTA
 1381 AGTCAGGCT GCGAAGATAA ACGTTTCTT TTATCTTTT CTTGCTCC CGTGTGCTGT
 1441 CGTGTGGTAC GTTGTGTC ATGGACTGTC CGGGGTATGC GCTGACACCT ATGCGAAGTC
 1501 CGGGGACAGA GTAGTGTGCG ATACGTCGA GTGCCCCATA CTTGTGGCA ACCTCGAATT
 1561 CGAACGGACT TGACGTGCTT TTCTGAATCC AATTGGCGG GCTGAAGTGG TAAGGGTCCA
 1621 ATCCCTGGAC GAACTGGCCC TCGTATCTGA AGTGGCTT ACCCCCCCCAG AACGAGATAAC
 1681 CGGTCTGGTG CCACGTGCTT GGAAGTATGG TATTTTGGC TTCCGGTGGG TACACGGTGA
 1741 AGAAGTTCAAG CGGTCTATGG TGTTGTTA CCAGTCGAA AGGCACTACA ATATGTCCTG
 1801 CCCTGATGTT GAATGCCATC CGGAATGATT TCTGAAAGCA GAATGCTCC AATTCCACCT
 1861 CGCTCTT CTCGGTTTCG TTCTCAAAATT CTATTGCTTC ATGGCTTGTG TACTCTATTG
 1921 ATGAGCTGT TCTTCGGTGT TCAAACCTCA TTCTGAAACC CAGACTCCAG CCTTTTGGCA
 1981 AGTGTATCC AAGGTAGATT ACTGGATGG GAAATGCGAA CGGGCCATGA CTGGGGTGTG
 2041 CTTTATAAAAG TCGGGTGTG GTGTAACGGT TTCCGGTGTG CCTATAAAAG TTGGGGAAA
 2101 AGGCTGCTTC CGGTATCTT CCTAACCTAA GCTGTTTCC TTICACATGG TICATTACCG
 2161 AATCTGCGC ACCTACTTGT CGCGTGGAG TGGTGTGTTAA CGCGAAAAC AAGGCTCTG
 2221 CGAGCAATCT TGTAGTTATC CTGTTCTAA AATAGCTTGTG TGTATTAAAT GTAAACTAAT

Fig. 5. Nucleotide sequence of Pn23 DNA probe. The *Pst*I restriction enzyme sites are indicated by underline. (*Continued on next page*).

2281 ATAATIGAAT CAAAATTAA GIGITTTCT CTTTCATCGC AATACTAAA TATTATGTAT
 2341 TTTAGATAA AAAAGATTTA TTTTTCGCGA AAAATACTA CATTAGGGTA TATGTCTAT
 2401 TTGTTTAGT GTTTAAATG TCTTGTATG GCTATTTAC TTGTAACCA TCATCTAAA
 2461 TGGGAGCGG ATGCTATGTT TCTATTAAC GAAATGGGG CAAAGTGTAT GCTATTACAA
 2521 TGAATIGTGA TACAATTAA GGAGGTATAC TCTCTGGITA GAAGTGTGCT ATATATATAA
 2581 TAAGGTGAA TCTCCAATGC AAAAGTATGC TTTTTGTTT TTATATGTGA TGTTGTTACA
 2641 AATAGTTCGC AACGCAATTIC GTGGGGCAAC GTGAATATTT CACAGAATAT TTGCCATATT
 2701 ATTCCAATCC TTAGCAGCG TTATGGAGA CGGTTACCG CCTTAGGGGA CGGATTATTT
 2761 GGGCCCGCAT ATCCGTATAT ATCCACAAAA TGACGAATAG AAACGCGTT GCGATGAAAT
 2821 GAATACACGT ATTICATAAT GGGAAATAC GGATTGACA ATGTAAGGAT AGGGCAACA
 2881 TGAATGGC CCGTACCGCT GGGGIGAGAC GIGGGGCACT TIGIGAATGT TGTGTTGG
 2941 TTTTGTTGTT GTTGTGTTG GTTTGGGAA ATGTTGCAA CCTGTTCTT CAGTGTATGT
 3001 TACATATCG CAGAACAAAA GTATGGTTT TGGGGTCAA AAGTATGGT TTGTTGTTAC
 3061 AAAAAGGGGG TTTTACAAC GCAAAAGGG GGTTTGTAA AGAGCAATATA GGTATAATGG
 3121 GTGIGTGAAGA TGTCTAACG AGCTATGTGA TAGATTGCTA TGTACAAACC TTGACGGTGT
 3181 TTTTGTGTT AGAAAGGGTA GGAACAAATG GATACAGAGA GCCTAAACGG ACTGTTAATT
 3241 TCACAAAAAA GTGACTGAAA ATGGTGGTG TATAAAGTTA TTTTATAAC TTGTTCTCA
 3301 ACAGTCGTG TTGTTGCCC AACTCTTTA CTGCGTGC ACTGCCAAT CAAGCATATT
 3361 GTGGACAAGG ATAAAGGAA AGAAAAAACC GAAACGTATA ACCAATGAAT ATAAAACAGC
 3421 AAGGAAGTAG GCACCGAGACA ACCTGATGAT ATAACCAAT GCAACTATGG AAAGATTCA
 3481 AAGCTTAATT TTGTCATCA TACTGGTAGC CTTGCGTACG GCAAACTATG CACAACCCAT
 3541 TAGAAAAAAA CGGCAACAG TGGCAA AC TGTAATGCC AAAAATTATT ATGCACTGGC
 3601 AATAAAGGCA ATAAAGGAA ACAATCTGC CGAACTAGAT GCTAACATTA AGCATATTGG
 3661 CAACATCGAC TGGCTGATAG CTGAGACAA TTATCACGCT TATACACTTT TGGGTATGC
 3721 ATTACTGTAT AAAAACAGA CTGCTACACA GAAACTTATT GAAAGAAAGG CTGATATTGG
 3781 CTGTTGTTGC TCTGACCGATG TGTTACGTA TGATGCACTT TATATGGCTA TAAACAAACG
 3841 CGATATGAAT CTGTAAGGC AGTTGTTGC ATTAGGAACC AACCTAACCG CCTTATAAA
 3901 CGAAGATGGG CTATGCCAT TGATGATGIG TTGCAACTTG AACAAAGTTC CAATGGCATIC
 3961 TCTTTATTA GAAAACGGTG CAAAAGCTGA TGGCGTAGGC AATCTGGAG GCGATAATGT
 4021 AAGTTTCTT TTAATGGTIG CGGTAGAAAA GAAGAATATA AATAATGGTAC ATTGCTGCT
 4081 GAAACACGGG GCAAAACGAA ATGTAAGAA CAATACAGGG CAAACTCTA TCTGATTGC
 4141 ACGTAGCCAA AAGTCGGCAA AAATGTAG ACTATTGGAG AAAAGTAAAC GCACCCOCAC
 4201 AGCAATATG CTGACAGCA ACATAATAGA ACAACTTAAG CAACATAACA GTATGACGAA
 4261 AAAAATGGTT TATATATTGG TTGGCTCTT TTCTTGTAA GGTGCGGCC AAACATAACCC
 4321 AAACCTAGCA TCAACAAAAG CAGTCAAOG CAATGCCAAA GCAAAAGTC TGTGCAAGGA
 4381 GAAAAGCGAT ACCAAAGAGC AGAAAATAA CAATGCCACC ACAAACTGGG ACGCTATCCA
 4441 TGCAAAATAT CCAGCCAAGA AATACAAAAC CGAGGACACC TGGAACTTG CGTGGTATAA
 4501 AGACTACACG GGAGACTCGG ATAGCAGTCC CATGATGAA CTGAAAAGCA TGAAAATAAG
 4561 C

Fig. 5. (Continuous from previous page).

Score = 3769 (571.6 bits), Expect = 9.5e-166, P = 9.5e-166
 Identities = 801/851 (94%), Positives = 801/851 (94%), Strand = Plus / Plus

Pig27: 1 AAGCTTGGAACTTGACGAACCGTCAAGCATAGGCTATACTGTTAAAGGGATTGGGTGCTGC 60
 Pi 17: 2107632 AAGCTTGGAACTTGACGAACCGTCAAGCATAGGCTACACGTTAAAGGCATTGGGTGCTGC 2107691

Pig27: 61 ATTGTGGTGCCTGTTCCACGCTACCAACTTGAAGAAGGATTGTTTCCTGTTGTCATG 120
 Pi 17: 2107692 ATTGTGGTGCCTGTTCCACGCTACCAACTTGAAGAAGGATTGTTTCCTGTTGTCATG 2107751

Pig27: 121 AGCGGGTGTGCCGATACAAATGCAGCTGTGCCGTGCCGTGTTAGGAGCTAAATTGG 180
 Pi 17: 2107752 AGCGGGTGTGCCGATACAAATGCAGCTGTGCCGTGCCGTGTTAGGAGCTAAATTGG 2107811

Pig27: 181 CTACGCTTCTATACCTCAAAAATACATTGACGGACTAACAGAAAAGACGATTGATACG 240
 Pi 17: 2107812 CTACGCTTCTATACCTCAAAAATACATTGACGGACTAACAGAAAAGACGATTGATACG 2107871

Pig27: 241 TATAATTGATGATTGGTAAAAATTACCTATGATITATTGCTACACAAGATGTAATAT 300
 Pi 17: 2107872 TATAATTGATGATTGGTAAAAATTACCTATGATTTATTGCTACACAATGTTGTAATAT 2107931

Pig27: 301 TTTTCACAAGTATAACTGTCGTGTAACTCGCTATACATCAACGCATTACAAAACCTATTG 360
 Pi 17: 2107932 TTTTCACAAGAGTAACTATCGTGTAACTCGCTATACATCAACGCATTACAAAACCTATTG 2107991

Pig27: 361 TTTTGTGTTCTAAAAGCGGCTGTTTGCGCGTAAAACGCTAGGTTTGATCGCAAAG 420
 Pi 17: 2107992 TTTTGTGTTCTAAAAGCGGCTGTTTGACCGTAAAAGCGCAGGTTTGATCGCAAAG 2108051

Pig27: 421 AGCCGCTTTCGCAACGTCAAAGCGTAATTACGACTTTAACAGAATTATCTTTACAAAG 480
 Pi 17: 2108052 AGCCGCTTTCGCAACGTCAAAGCGCAATTATGACTTTAACGGAATTCTCTTTACGAAG 2108111

Pig2p 481 ATAAACAGAAAAGACTCTCACTGCTTACCCAGTAGGTTGTTAAAAAATATCTCGCATATA 540
 Pi 17: 2108112 TTAAACAGAAAAGACTCTCACTGCTTACCCAGTAGGTTGTTAAAAAATATCTCGCATATA 2108171

Pig27: 541 GCCTACCCCTACCAACTTCTTATACCGAACAACGTTATATATACGTCAGACAGTA 600
 Pi 17: 2108172 GCCTACCCCTACCAACTTCTTATACCGAACAACGTTATATATACGTCAGACAGTA 2108231

Pig27: 601 ATAATGAAGATGTTAAAAGTTATAAACATCTAACAGAAATATACAGAAACTATTAATGCAA 660
 Pi 17: 2108232 ATAATCAAGATGTTAGAAGTTATAAACATCTAACAGAAATATACAGAAACTATTAATGCAA 2108291

Pig27: 661 ACCATAAAAAATATATCATTCTATAACAAATATTAAATTCTTCTTGTGTTGTTGAAAAAAT 720
 Pi 17: 2108292 ACCATAAAAAATATATCATTCTATAACAAATATTAAATTCTTCTGATTGTTGAAAAAAT 2108351

Fig. 6. Nucleotide sequence homologous search of Pig27 DNA by Blastn program supported by The Institute for Genomic Research (<http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html>). Pi 17, *Prevotella intermedia* 17.

Pig27: 721 AATAACTATATTGCAATACTATTATCAAGATAGATTAATCTAAAAGCATATACGA 780
 ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Pi 17: 2108352 AATAATTATATTGCAACACCACTACATAAAGGTTGATTAATCTAAAAGCATATACCA 2108411
 ||||| ||||| ||||| |||||
 Pig27: 781 AAAGCAGCAACAGGGAG-CAGGCTGACTTAGTTAACAGAAA-GTA-CTCCC-TAATGAA 836
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Pi 17: 2108412 AAGGCAGCAAAGGGAGTCAG-CTGTCGTACCTAACAAAAAGTAGCTCCCTATTAA 2108470
 ||||| |||||
 Pig27: 837 AATC-ATCTTC 846
 ||||| |||||
 Pi 17: 2108471 CAACTATAATC 2108481

Score = 218 (38.8 bits), Expect = 7.8e-36, Sum P(2) = 7.8e-36
 Identities = 200/349 (57%), Positives = 200/349 (57%), Strand = Plus / Plus

Pig27: 1345 TTTCTTTCT-TGCACAGGCT-TGAAGCGCATTACAG-TGGATAAAGACAACCCAGTGCTG 1401
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Pi 17: 782759 TTTCTACATCTGCA-ACGCTATGAAA-GCGTTGAGGTTCATAGGATAATA-AGACCTT 782815
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Pig27: 1402 AAAGACATT-GACGGTGTACTTTCTGATAAGAGCGGAAATAACTAATTGCTTATCCAA 1460
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Pi 17: 782816 TGCGTCTGTAGACGGCGTGCCTTCGATAAGAACATAGAAAAGCTTTAAAGTATCCGAA 782875
 ||||| |||||
 Pig27: 1461 TATGAGGGCAGCCAATATGAAATTCTGTAGGGAACCTTAACTAGCAG-TCCTGTAGCAT 1519
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Pi 17: 782876 GGGCAGAGGTGGCGAGTATGTCGTGCCGA--AACGGT-GAAGA-AGATAGACAAATAT 782930
 ||||| |||||
 Pig27: 1520 TCITCCITTGCAACCAATTAGAGTCATAAAAGTCCCT-C--AA--CGTTGAAGAAGAT 1574
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Pi 17: 782931 TCGTTCTATGAGGTTATGGGCTT-ACGAAGGTAACCTGCCGAAGTCGCTACCGAGAT 782989
 ||||| |||||
 Pig27: 1575 AGGCATGCTC-CTTCGGTCATTGTTGAAATTGCAAGAAG-TAACTGTTCAAATAAT 1632
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Pi 17: 782990 AG-CAAGCTGGCATTGCAACATAAAAGCAATT-ACGACCATTACTTGGCCGAAAT 783047
 ||||| |||||
 Pig27: 1633 ATT-A-CAGACCTCGGCTACTTGCTT-TCTAT-AATTGTCAGGGCTT 1677
 ||||| ||||| ||||| |||||
 Pi 17: 783048 CTTGAGCAGA-TAGGCT-TTGGCGTGTATGAATTGTCAGGGACTG 783092

Fig. 6. (*Continuous*)

Table 1. The results of homologous search (BLASTX) of Pig27 DNA probe.

Protein name (species or strain of protein origin)	Accession No. of GenBank	Identities	Positives	Gaps
cell surface protein (<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A)	NP_619156	71/215 (33%)	107/215 (49%)	23/215 (10%)
cell surface protein (<i>Methanosarcina barkeri</i> str. fusaro)	YP_305509	62/194 (31%)	102/194 (52%)	0/194 (0%)
hypothetical protein CbeiDRAFT_3669 (<i>Clostridium beijerincki</i>)	ZP_00908184	64/186 (34%)	97/186 (52%)	1/186 (0%)
surface antigen BspA (<i>Bacteroides forsythus</i>)	AAC82625	65/196 (33%)	106/196 (54%)	12/196 (6%)

Table 2. The results of homologous search (BLASTX) of Pn23 DNA probe.

Protein name (species or strain of protein origin)	Accession No. of GenBank	Identities	Positives	Gaps
iron-regulated protein A precursor (<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400)	ZP_00637157	69/225 (30%)	102/225 (45%)	34/225 (15%)
Guanosine polyphosphate pyrophosphohydrolases/synthetases homolog (<i>Rickettsia felis</i> URRWXCal2)	ZP_00637157	65/227 (28%)	99/227 (43%)	13/227 (5%)
proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 10 (<i>Xenopus tropicalis</i>)	NP_001016356	39/120 (32%)	55/120 (45%)	5/120 (4%)
CNPV042 ankyrin repeat protein (<i>Canarypox virus</i>)	NP_955065	48/149 (32%)	71/149 (47%)	8/149 (5%)
Ankyrin (<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400)	EAN74022	53/180 (29%)	79/180 (43%)	19/180 (10%)

IV. 총괄 및 고안

세균 감염성 질환의 병인론 연구를 위해서는 먼저 역학연구가 선행되어야 하며, 역학연구를 위해서는 병소 존재하는 병원체를 동정(identification)하는 일이 매우 중요하다. 구강 내에는 약 500여 종의 세균이 서식하고 배양이 가능한 균주가 약 350 종이기 때문에 모든 세균 종을 대상으로 하는 역학조사가 이루어지기 어렵다. 현재까지 알려진 세균 동정법 중 분자생물학적 방법을 이용한 DNA 프로브법과 PCR법 등이 많이 이용되고 있다(DiRienzo et al., 1991; Komiya et al., 2000; Milsom et al., 1996; Socransky et al., 1994; Ashimoto et al., 1996). PCR법에 의한 역학연구에 있어서 가장 많이 이용되는 표적 유전자가 16S rRNA이다. 16S rRNA 유전자(16S rDNA)는 구조 유전자로서 세균이 진화하는 동안 변화가 많지 않고, 같은 종에서 보존이 잘되어 있다는 장점이 있다(Krieg, 2001). 또한 모든 세균 종간에 핵산염기서열 상동성이 매우 높은 부분과 상이한 부분이 존재하기 때문에 대부분의 세균 종을 검출할 수 있는 PCR 프라이머와 종-특이 PCR 프라이머를 설계할 수 있다는 장점이 있다(Tanner et al., 1994). 그러나 경우에 따라서는 세균 종간의 16S rDNA 핵산염기서열이 99% 이상이 되는 경우(*Streptococcus intermedius*와 *S. constellatus*)가 있기 때문에 모든 세균 종에 대한 특이 PCR 프라이머를 16S rDNA만을 이용할 수는 없다(Takao et al., 2004). 이런 경우에는 특정 유전자를 표적으로 한 PCR 프라이머를 설계하기도 한다. 즉, 전술한 *S. intermedius*와 *S. constellatus*의 구별을 위해서 *S. intermedius*에는 존재그러나, *S. constellatus*에는 존재하지 않는 intermedilysin(ily) 유전자를 표적으로 하는 PCR법을 이용한 경우다(Takao et al., 2004). 그러나, 이러한 경우 세균 종에 대한 특이 유전자를 알고 있어야 한다는 단점이 있다. 그러므로 세균 종에 대한 종-특이 DNA 프로브를 개발한다면, 이를 이용한

DNA 칩을 이용한 microarray법을 이용하거나, 이들의 핵산염기서열을 밝혀 종-특이 PCR 프라이머를 설계한 PCR 법을 이용하여 역학 연구를 수행할 수 있을 것이다.

최근 Kook 등(2003b)은 세균을 종 또는 아종 수준에서 동정할 수 있는 DNA 프로브를 신속하게 검색할 수 있는 inverted dot blot hybridization(IDBH) 검색법을 소개하였다. 이들의 연구에 의하면, 기존의 방법에 의해서는 96번의 Southern blot hybridization을 시행해야 그러나, 5번의 dot blot hybridization과 4번의 Southern blot hybridization만으로도 *Fusobacterium nucleatum*의 4가지 아종에 대한 특이 프로브를 성공적으로 클로닝 하였다(Kook et al., 2003b). 이 연구결과에서도 2번의 inverted dot blot hybridization과 1번의 Southern blot hybridization을 통해 *P. intermedia* 균종에 특이적으로 반응하는 Pig27 DNA 프로브를 클로닝할 수 있었다. 또한 선행 연구(Gang et al., 2002)에서 *P. nigrescens* ATCC 33563^T 균주에 특이적일 것이라고 제안하였던 Pn23 DNA 프로브를 이 연구에서 *P. nigrescens* 임상분리 균주들을 대상으로 Southern blot hybridization을 실시한 결과 *P. nigrescens* 균종에 대하여 특이적임을 알 수 있었다. 또한 최근 IDBH 검색법을 이용하여 균주-특이 DNA 프로브들이 개발되었다(Kook et al., 2003a; Kim et al., 2005). 이러한 여러 연구결과물들을 종합하면, 세균 종-, 아종- 혹은 균주-수준 특이 DNA 프로브를 신속하게 클로닝 하는 데 있어 IDBH 검색법은 그 효용성이 뛰어남을 알 수 있었고, 구강 내 감염성 질환의 역학연구에 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

Pig27 DNA 프로브의 핵산염기서열의 상동성 검색 결과 *P. intermedia* 17 균주의 leucine rich repeat(LRR) domain 단백질(2,106,976–2,107,905 nts)과 상동성이 57%인 부분(1,345–1,677 nts)이 존재함을 알 수 있었다. 구강 내 미생물들 중 LRR domain을 갖는 단백질 중 하나가 *Tannerella forsythia*

(*Bacteroides forsythus*) ATCC 43037의 BspA이다(Sharma et al., 1998). BspA 단백질은 세포외기질 단백질인 fibronectin 및 fibrinogen과 LRR 모티브를 통해 결합하는 일종의 부착단백질이며, 사람의 acute monocytic leukemia 환자로부터 확립한 THP-1 세포주의 TLR-2 의존성 경로를 통해 골흡수와 연관된 pro-inflammatory cytokines(TNF- α 와 IL-1 β)의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Sharma et al., 1998; Hajishengallis et al., 2002). 또한 최근에는 생쥐를 모델로 한 생체 실험에서 *T. forsythia*가 BspA 단백질에 의해 치조골 소실을 유도시킴이 보고되었다(Sharma et al., 2005). 최근 Kook 등(2005)은 한국인의 치주질환 환자의 비외적 치료의 예후 판정을 예측할 수 있는 진단학적 세균표적이 될 수 있는 균종을 찾기 위한 연구결과를 발표하였다. 즉, 처음 내원 시 치주질환에 이환된 환자의 치면세균막을 채취하고, clinical parameter를 측정하고, 잇솔질, 치면세균막제거 및 치근면활택술을 시술한 후 한달 간격으로 검진을 한 다음 초기 치료가 완료되는 3개월 후에 초기 내원 시와 동일한 검사를 한 다음, 치면세균막 내에 존재하는 4가지 치주질환 원인균종(*P. intermedia*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*)의 존재 유무를 종-특이 프라이머를 이용하여 PCR법으로 조사 하였다. 그 결과, 초기 치료 완료 후 경과가 좋지 않았던 환자(탐침 후 자발적 출혈이 있는 경우를 기준으로 삼음)의 초기 치료 전 치면세균막 내에 *P. intermedia* 또는 *T. forsythia*가 존재하는 경우가 통계학적으로 유의성이 있다는 결과를 얻었다. *P. intermedia* 17의 전체 지놈에는 LRR domain 단백질 유전자가 6개가 존재하였다(http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/shared/AllGeneList.cgi?sub_org_val=gpi&feat_type=ORF). 이러한 연구결과들을 종합하면, 아직 *P. intermedia*의 LRR domain 단백질들의 기능이 밝혀져 있지만, BspA 단백질과 같은 기능을 할 수도 있는 가능성�이 있다. 따라서 향후 연구에서 *P. intermedia* LRR domain

단백질의 기능 연구를 시행한다면, *P. intermedia*의 치주질환 병인 기전의 일단을 밝힐 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 연구결과를 종합하면, Pig27과 Pn23 DNA 프로브들은 각각 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*를 균종-특이적으로 검출 및 동정하는 데 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

이 연구는 치주질환의 원인균인 *Prevotella intermedia*와 *P. nigrescens* 각각을 종 수준에서 동정할 수 있는 DNA 프로브를 개발하기 위하여 실시하였으며, *P. intermedia* ATCC 49046과 *P. nigrescens* ATCC 33563^T 각각의 균주 지놈 DNA를 *Hind*III 제한효소로 절단하여 shotgun 법으로 클로닝하고, Southern blot analysis를 시행하여 종-특이성을 검증하였고, 종-특이 검증된 프로브의 핵산염기서열을 결정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Pig27 및 Pn23 DNA 프로브는 *Prevotella intermedia*와 *P. nigrescens* 각각의 균종에 특이적임을 알 수 있었다.
2. Pig27 및 Pn23 DNA 프로브 핵산염기서열 결정 결과 각각이 1,841 bp 및 4,563 bp로 구성되었다.
3. Pig27 DNA 프로브에는 leucine rich repeat domain 단백질과 ADP-ribosylglycohydrolase를 코딩하는 핵산염기서열이 존재하였다.

이상의 연구결과를 종합하면, Pig27과 Pn23 DNA 프로브들은 각각 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*를 균종-특이적으로 검출 및 동정하는 데 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 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.* 1996;11(4):266-73.
2. 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 Endod.* 1999 May;25(5):324-8.
3. DiRienzo JM, Cornell S, Boehringer H. Use of randomly cloned DNA fragments for the identification of oral spirochetes. *Oral Microbiol Immunol.* 1991;6(2):88-96.
4. Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1988;15(5):316-23.
5. Frandsen EV, Poulsen K, Kilian M. Confirmation of the species *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Int J Syst Bacteriol.* 1995;45(3):429-35.
6. Fukushima H, Moroi H, Inoue J, Onoe T, Ezaki T, Yabuuchi E, Leung KP, Walker CB, Clark WB, Sagawa H. Phenotypic characteristics and DNA relatedness in *Prevotella intermedia* and similar organisms. *Oral Microbiol Immunol.* 1992;7(1):60-4.
7. Gang SW, Kim SH, Kim DK, Seong JH, Kim BO, Han JJ, and Kook JK. Study on isolation of *Prevotella nigrescens* 9336-specific DNA

- probe using random cloning method. J. Korean. Acad. Periodontol. 2002;32(2):269-279.
8. 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(1):56-61.
 9. Hajishengallis G, Martin M, Sojar HT, Sharma A, Schifferle RE, DeNardin E, Russell MW, Genco RJ. Dependence of bacterial protein adhesins on toll-like receptors for proinflammatory cytokine induction. Clin Diagn Lab Immunol. 2002;9(2):403-11.
 10. Johnson J L, Holdeman L V. *Bacteroides intermedius* comb. nov. and descriptions of *Bacteroides corporis* sp. nov. and *Bacteroides levii* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1983;33(1):15 - 25.
 11. Kim HS, Song SK, Yoo SY, Jin DC, Shin HS, Lim CK, Kim MS, Kim JS, Choe SJ, Kook JK. Development of strain-specific PCR primers based on a DNA probe Fu12 for the identification of *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T. J Microbiol. 2005;43(4):331-6. Erratum in: J Microbiol. 2005;43(5):473.
 12. Komiya A, Kato T, Nakagawa T, Saito A, Takahashi J, Yamada S, Okuda K. A rapid DNA probe method for detection of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Periodontol. 2000;71(5):760-7.
 13. Kononen E. Pigmented *Prevotella* species in the periodontally healthy oral cavity. FEMS Immunol Med Microbiol. 1993;6(2-3):201-5.
 14. Kook JK, Han JJ, Kim HS, Seong JH, Kim DK, Baek DH, Choe SJ.

Cloning of a Potentially Strain-Specific DNA Probe of *Prevotella intermedia* ATCC 25611 by Inverted Dot Blot Hybridization Screening Method. J Microbiol Biotechnol. 2003a;13:282-286.

15. Kook JK, Kim MK, Seong JH, Kim DK, Kim BO, Park JC, Kim KK, Choe SJ, Min BM. A new method for rapid screening of bacterial species- or subspecies-specific DNA probes. FEMS Microbiol Lett. 2003b;219(1):121-7.
16. Kook JK, Sakamoto T, Nishi K, Kim MK, Seong JH, Son YN, Kim DK. Detection of *Tannerella forsythia* and/or *Prevotella intermedia* might be useful for microbial predictive markers for the outcome of initial periodontal treatment in Koreans. Microbiol Immunol. 2005;49(1):9-16. Erratum in: Microbiol Immunol. 2005;49(3):295.
17. Krieg NR. Identification of Prokaryotes, pp. 33-38. In G. Garrity (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1, 2th ed. 2001 Springer Verlag, New York, U.S.A.
18. Milsom SE, Sprague SV, Dymock D, Weightman AJ, Wade WG. Rapid differentiation of *Prevotella intermedia* and *P. nigrescens* by 16S rDNA PCR-RFLP. J Med Microbiol. 1996;44(1):41-3.
19. Moore WE, Moore LH, Ranney RR, Smibert RM, Burmeister JA, Schenkein HA. The microflora of periodontal sites showing active destructive progression. J Clin Periodontol. 1991;18(10):729-39.
20. Nakazawa F, Zambon JJ, Reynolds HS, Genco RJ. Serological studies of oral *Bacteroides intermedius*. Infect Immun. 1988;56(6):1647-51.
21. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival

- plaque. J Bacteriol. 2001;183(12):3770–83.
22. 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(4):542–6.
 23. Sharma A, Inagaki S, Honma K, Sfintescu C, Baker PJ, Evans RT. *Tannerella forsythia*-induced alveolar bone loss in mice involves leucine-rich-repeat BspA protein. J Dent Res. 2005 May;84(5):462–7. Erratum in: J Dent Res. 2005;84(6):576.
 24. Sharma A, Sojar HT, Glurich I, Honma K, Kuramitsu HK, Genco RJ. Cloning, expression, and sequencing of a cell surface antigen containing a leucine-rich repeat motif from *Bacteroides forsythus* ATCC 43037. Infect Immun. 1998;66(12):5703–10.
 25. Shin YK, Jeong SU, Yoo SY, Kim MK, Kim HS, Kim BO, Kim do K, Hwang HK, Kook JK. Pi30 DNA probe may be useful for the identification of *Prevotella intermedia* at the species or strain level. Microbiol Immunol. 2004;48(12):931–6.
 26. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. Biotechniques. 1994;17(4):788–92.
 27. Takao A, Nagamune H, Maeda N. Identification of the anginosus group within the genus *Streptococcus* using polymerase chain reaction. FEMS Microbiol Lett. 2004;233(1):83–9.
 28. Tanner A, Maiden MF, Paster BJ, Dewhirst FE. The impact of 16S ribosomal RNA-based phylogeny on the taxonomy of oral bacteria. Periodontol 2000. 1994;5:26–51.

29. van Steenbergen TJ, Vlaanderen CA, de Graaff J. Deoxyribonucleic acid homologies among strains of *Bacteroides melaninogenicus* and related species. *J Appl Bacteriol.* 1982;53(2):269-76.