

2006년 2월  
박사학위논문

*Prevotella intermedia* 동정에 이용될  
Pig6 DNA 프로브의 특이성 평가

조선대학교 대학원

치 의 학 과

정 승 우

*Prevotella intermedia* 동정에 이용될  
Pig6 DNA 프로브의 특이성 평가

Evaluation of a Pig6 DNA probe in the  
identification of *Prevotella intermedia* G8-9K-3

2006년 2월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

정 승 우

*Prevotella intermedia* 동정에 이용될  
Pig6 DNA 프로브의 특이성 평가

지도교수 장 현 선

이 논문을 박사학위신청 논문으로 제출함

2005년 10월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

정 승 우

# 목 차

<i>ABSTRACT</i> .....	iv
<i>I. 서론</i> .....	1
<i>II. 연구 재료 및 방법</i> .....	4
<i>III. 연구결과</i> .....	10
<i>IV. 총괄 및 고안</i> .....	18
<i>V. 결론</i> .....	21
참고문헌 .....	22

# 표 목 차

Table 1. The PCR primers designed in this study .....	8
Table 2. The results of homologous search (BLASTX) of Pig6 DNA probe .....	15

# 도 목 차

Fig. 1. Inverted dot blot hybridization (**A**) and Southern blot analysis (**B**) to determine the specificity of the Pig6 DNA probe. .... 12

Fig. 2. The nucleotide sequences of Pig6 DNA probe. The 813 base pairs of nucleotides were obtained. The PCR primer sites are indicated by underline. .... 13

Fig. 3. Nucleotide sequence homologous search of Pig6 DNA by Blastn program supported by the Institute for Genomic Research (<http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html>) ..... 14

Fig. 4. Specificity test of PCR with Pig6-F3 or Pig6-R3 primers (**A**) and Pig6-60F and Pig6-770R primers (**B**) and the genomic DNA of type strains of *Prevotella* spp. and clinical isolates of *P. intermedia* and *P. nigrescens* ..... 16

Fig. 5. Sensitivity test of PCR with primers (**A**) Pig6-F3 and Pig6-R3, (**B**) Pig6-60F and Pig6-770R, and the purified genomic DNA of *P. intermedia* G8-9K-3 ..... 17

# ABSTRACT

Evaluation of a Pig6 DNA probe in the  
identification of *Prevotella intermedia* G8-9K-3

*Jeong, Seung-U, 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 the strain-specific PCR primers for the identification of *Prevotella intermedia* G8-9K-3 which is frequently used in the pathogenesis studies of periodontitis. The *Hind*III-digested genomic DNA of *P. intermedia* G8-9K-3 were cloned by random cloning method. The specificity of cloned DNA fragments were determined by Southern blot analysis. The nucleotide sequence of cloned 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 Pig6 DNA probe were hybridized with the genomic DNA from *P. intermedia* strains (ATCC 25611 and G8-9K-3) isolated from the Westerns, not the strains isolated from Koreans. The Pig6 DNA probe were consisted of 813 bp. Pig6-F3 and Pig6-R3 primers, designed base on the nucleotide sequences of Pig6 DNA probe, were also specific to the

only both *P. intermedia* ATCC 25611 and *P. intermedia* G8-9K-3. In the other hand, Pig6-F7 and Pig6-R7 primers were specific to the only *P. intermedia* G8-9K-3. These results indicate that Pig6-F7 and Pig6-R7 primers have proven useful for the identification of *P. intermedia* G8-9K-3, especially with regard to the maintenance of the strain.



# I. 서 론

치주낭에는 약 400여 종의 세균이 서식하고 있으며(Paster et al., 2001), 이들은 세균 종들 간의 독특한 형태의 복합체를 형성하여 일종의 biofilm을 이루고 있다(Socransky et al., 1988). 하지만, 여러 역학조사에 의하면, 치주질환과 관련된 세균 종의 수는 제한적임이 보고 되었다(Slot et al., 1986; Dzink et al., 1988). 특히, 미생물학적 진단에 있어서 *Actinobacillus actinomycetem-comitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*(*Bacteroides forsythus*), *Treponema denticola* 등의 세균 종의 검출에 초점이 맞춰지고 있다(Slots and Listgarten, 1988; Kook et al., 2005).

*Prevotella intermedia*는 그람 음성 혐기성 간균(rod)으로 치주질환의 원인균 중 하나로 잘 알려져 있다. 실제로 *P. intermedia*는 성인성 치주염, 임신성 치은염, 급성괴사성궤양성치은염(acute necrotizing ulcerative gingivitis) 및 HIV 연관성 치은염 등에 이환된 환자의 치은연하부위에서 빈번하게 검출되고 있으며(Okamoto et al., 1999; Papapanou et al., 2000), 구강 농양 병소(Milsom et al., 1996)에서도 검출됨이 보고 되었다. 최근 한국인의 치은염 환자를 대상으로 연구 결과에 의하면, *Prevotella intermedia*가 치은연하치면세균막에 존재할 경우 비외과적 치료 후 예후가 좋지 않다는 보고가 있다(Kook et al., 2005).

*P. intermedia*가 치주질환을 유발시키는 데 있어서 중요한 독성인자(virulence factor)로는 구강 상피세포에 침입(invasion)(Dorn et al., 1998), 내독소(Kim et al., 2004), succinate, isobutyrate, isovlerate 및 ammonia 등과 같은 독성 대사산물(Saito et al., 2001), 용혈소 및 적혈구 응집소(Okamoto et al., 1999) 등이 있다. 이들의 연구 결과를 살펴보면, 표준균주(ATCC 25611<sup>T</sup>)와 임상분리 균주들 간의 독성인자의 존재 유무나 활성 정도 등의 차이가 존

재하였다. 예를 들면, 구강 상피세포에 대한 침입 실험 결과, 치주낭에서 분리된 *P. intermedia* 17 균주는 구강 상피세포를 침입할 수 있는 능력을 가졌지만, 치근단 병소에서 분리된 *P. intermedia* 17 균주와 표준균주인 ATCC 25611<sup>T</sup>는 구강 상피세포에 대한 침입 능이 없었다(Okamoto et al., 1999). 또한, 적혈구 용혈 작용 및 응집능력에 대한 연구 결과에서도, 임상 분리 균주들 간의 활성 정도가 차이가 존재하였다(Okamoto et al., 1999). 이는 같은 종에 속하지만, 균주들 간의 특성이 다양하기 때문에 치주질환 병인론 연구에 있어서, 치주질환 환자 개인의 병원체에 대한 반응뿐만 아니라 균주 수준에서의 연구도 필요하다는 것을 시사한다.

최근 Kim 등(2005)은 치주질환의 원인균종 중 하나인 *Fusobacterium nucleatum*의 표준균주(ATCC 25586<sup>T</sup>)에 대한 균주 특이 PCR(polymerase chain reaction) 프라이머를 개발하였다. 이들의 연구는 inverted dot blot hybridization(IDBH) 검색법을 이용한 *F. nucleatum* 아종-특이 DNA 프로브를 개발하는 과정에서 *F. nucleatum* ATCC 25586<sup>T</sup> 유전체 DNA와만 결합하는 프로브(Fu12)가 있음을 발견하고, 이의 핵산염기서열을 결정하여 PCR 프라이머를 개발한 것이다. 또한 김(2005)은 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>과 *P. intermedia* ATCC 49046(G8-9K-3) 균주들의 각각에 대한 균주-특이 DNA 프로브와 이들의 핵산염기서열을 바탕으로 한 각각의 균주들에 대한 균주-특이 PCR 프라이머를 개발하였다.

최근 김(2005)의 연구 과정에서 IDBH 검색 결과 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>과 *P. intermedia* ATCC 49046 유전체 DNA와만 반응하는 Pig6라고 명명된 DNA 프로브가 클로닝 되었다. 본 연구에서는 한국인에서 분리 동정된 *P. intermedia* 균주들과 서양인에서 분리 동정된 균주들(*P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>과 *P. intermedia* ATCC 49046)의 유전체 DNA를 이용하여 Pig6 DNA 프로브의 *P. intermedia*에 대한 종-특이성 여부를 검증하고, 종-

특이 PCR 프라이머 쌍을 개발하고자 하였다. 그 결과 예상과는 달리 Pig6 DNA 프로브는 서양인에서 분리 동정된 균주들의 유전체 DNA와만 hybridization하였고, Pig6 DNA 염기서열을 결정하여 PCR 프라이머 쌍을 설계한 결과, *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>과 *P. intermedia* G8-9K-3 두 균주에 특이한 PCR 프라이머 쌍과 *P. intermedia* G8-9K-3 균주에 특이한 PCR 프라이머 쌍이 개발되었다. 이러한 결과는 Pig6 DNA 프로브와 이를 바탕으로 개발된 PCR 프라이머 쌍들이 인종간의 *P. intermedia*의 유전학적 차이에 대한 연구 및 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>과 *P. intermedia* G8-9K-3 균주들의 동정에 유용하게 사용될 수 있음을 간접적으로 시사하는 것으로 이에 보고하는 바이다.

## II. 연구 재료 및 방법

### II-1. 세균 및 배양 조건

본 연구에서 이용된 *Prevotella* spp.의 표준균주 및 참고균주들은 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>, *P. intermedia* G8-9K-3, *P. loescheii* ATCC 15930<sup>T</sup>, *P. melaninogenica* ATCC 25845<sup>T</sup>, *P. bivia* ATCC 29303<sup>T</sup>, *P. oralis* ATCC 33269<sup>T</sup>, *P. corporis* ATCC 33547<sup>T</sup>, *P. buccae* ATCC 33574<sup>T</sup>, *P. veroralis* ATCC 33779<sup>T</sup>, *P. oulorum* ATCC 43324<sup>T</sup>, *P. brevis* ATCC 19188<sup>T</sup>, *P. ruminicola* ATCC 19189<sup>T</sup>, *P. heparinolytica* ATCC 35895<sup>T</sup>, *P. dentalis* ATCC 49559<sup>T</sup>, *P. pallens* ATCC 700821<sup>T</sup> 및 *P. enoeca* ATCC 51261<sup>T</sup> 등이다. 이들 균주들은 American Type Culture Collection(ATCC, University Boulevard, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한, 임상에서 분리 동정된 *Prevotella* spp. 균주들인 *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 등은 한국구강미생물자원은행(Korean Collection for Oral Microbiology, College of Dentistry, Chosun University, Gwangju, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 본 연구에 사용된 모든 균주들은 TSB(trypticase soy broth)에 0.5% yeast extract, 0.05% cysteine HCl-H<sub>2</sub>O, 0.5 mg/ml hemin 및 2 µg/ml vitamin K<sub>1</sub>이 첨가된 배지에 접종하여 85% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 혐기성 세균배양기에서 1-2일간 배양하여 다음 실험에 사용하였다.

## II-2. 세균 유전체 DNA의 추출

세균의 유전체 DNA는 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit(iNtRON Co., Seoul, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 세균 유전체 DNA를 추출하였다. 이를 간략히 설명하면 다음과 같다. 혈액천배지에서 배양한 세균 1 균락을 3 ml의 액체배지에 접종한 다음, 후기 로그기까지 배양하고, 이 중 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 µl의 결합 용액을 넣고 잘 혼합하였다. 이러한 세균 lysates를 G-spin™ column에 넣고 13,000 rpm에서 1분간 원심분리(12,000× g) 하였다. Column에 500 µl의 수세 용액 A를 넣고 다시 1분간 원심분리(12,000× g) 하였다. 여기에 500 µl의 수세 용액 B를 넣고 다시 1분간 원심분리하고, G-spin™ column을 새로운 eppendorf tube에 넣고 100 µl의 용출 용액을 넣고 1분간 실온에 방치한 다음 13,000 rpm에서 1분간 원심분리(12,000× g)하여 세균 유전체 DNA를 추출하였다.

## II-3. 플라스미드 DNA 추출

Southern blot analysis에 프로브로 사용할 Pig6 DNA 절편이 함유된 제조합 플라스미드는 AccuPrep™ Plasmid Extraction Kit(Bioneer Corp., Daejeon, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시대로 추출하였다. 즉, 세균배양액 1 ml을 30초간 원침(12,000× g)하고, 얻어진 세균 덩어리를 250 µl의 Resuspension buffer를 가하여 잘 현탁한 후, 250 µl Lysis buffer를 첨가하여 천천히 잘 혼합한 다음, 350 µl의 Neutralization buffer를 첨가한 즉시 잘 섞은 후에 얼음에 5분간 방치하였다. 이것을 100분간 원심분리(12,000× g)하여 상청액을 binding column tube에 옮기고, 1분간 원심분리

(12,000× *g*)하였다. 여과액은 버리고, binding column tube에 80% 에탄올을 700  $\mu$ l 넣은 후 1분간 원심분리(12,000× *g*)하였다. Binding column tube에 남아있을 여분의 에탄올을 제거하기 위해 여과액을 버리고, 다시 30초간 원심분리(12,000× *g*)하였다. Binding column을 새로운 eppendorf tube로 옮기고, 여기에 100  $\mu$ l의 용출 용액을 넣고 1분간 기다린 다음 다시 1분간 원심분리 (12,000× *g*)하여 여과액을 -70°C에서 보관하여 다음 실험에 사용하였다.

#### **II-4. DNA 프로브의 정제 및 표지**

DNA 프로브의 정제는 QIAEX II<sup>®</sup>(QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 정제하였다. 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  $\mu$ l를 넣은 후 QIAEX II를 30초간 희석한 다음 20  $\mu$ l를 넣고, 50°C에서 10분 동안 중탕하여 젤을 완전히 녹인 후, 30초간 원심분리(13,000× *g*)하여 상청액은 버리고, buffer QX1 500  $\mu$ l로 압착결정을 세척한 다음 30초 동안 원심분리(13,000× *g*)하였다. buffer PE 500  $\mu$ l로 2회 세척하여 30초 동안 원심분리(13,000× *g*)한 후 10~15분 정도 압착결정을 건조시킨 다음 10 mM Tris-Cl(pH 8.5) 20  $\mu$ l로 elution하여 실험에 사용하였다.

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

## ***II-5. Southern blot hybridization***

Southern blot을 시행하기 위해 각 세균에서 추출한 5 µg의 genomic DNA를 0.8% Agarose gel에 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× 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 유전체 또는 DNA 프로브를 첨가하여 12시간 hybridization시켰다. Membrane을 실온에서 5분간 2× wash 용액(2× SSC, 0.1% SDS)으로 2회 세척하고 다시 0.5× wash 용액(0.5× SSC, 0.1% SDS)으로 68°C에서 15분간 2번 세척하였다.

표지된 DNA 프로브가 membrane 상의 표적 DNA 가닥과 hybridization됨을 알아보기 위한 detection 과정은 Roche Diagnostics사의 chemiluminescent detection kit를 사용하였으며, 제조회사의 지시대로 시행하였다. 이를 설명하자면, membrane을 100 ml의 Blocking solution(buffer 2)에 넣고 30분간 배양한 후 buffer 2에 anti-DIG-AP conjugate를 75 mU/ml(1:10000) 첨가하여 희석한 20 ml antibody solution에 membrane을 넣고 30분간 반응시켜서 15분간 100 ml의 washing buffer로 2회 세척하였다. Membrane을 20 ml의 Detection buffer(buffer 3)에서 2~5분간 안정되게 하였다. DNA쪽이 위로가게 하여 membrane을 polyethylene film상에 놓고 약 1 ml의 기질 (CSPD<sup>®</sup>)용액을 적용한 후, 즉시 반대 측 sheet로 덮어 기질이 membrane상에 고루 퍼질 수 있게 하였다. 5분간 상온에서 반응 후 과량의 액을 제거하고 film의 가장자리를

봉하여, luminescent reaction이 일어나도록 37°C 배양기에서 15분간 반응시킨 후, 상온에서 X-ray film(Lumi-film chemiluminescent<sup>®</sup>, Roche Diagnostics)에 1~3 시간 노출시켰다.

## II-6. 핵산염기서열 결정

핵산염기서열 결정은 바이오니아사에 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')을 이용하였으며, 그 결과는 SeqMan 프로그램(Version 5.00; DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA)을 이용하여 분석하였다. 핵산염기서열 결정 후 염기서열의 상동성 검색은 미국 국립보건원에서 제공하는 BLAST 프로그램을 이용하였다.

## II-7. PCR 프라이머 쌍의 설계 및 제작

Pig6 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 PrimerSelect 프로그램(DNASTAR Inc.)을 이용하여 PCR 프라이머를 설계하였다(Table 1). 이 때 설계된 프라이머 쌍은 Bioneer사(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 제작하였다.

Table 1. The PCR primers designed in this study

Primer pairs	Sequence of oligonucleotides (5'→3')	Size of amplicons (bp)	Annealing temperature (°C)
Pig6-F3	5'-TGT CCG ATT ATG ATA GGT GGT TTT-3'	454	50
Pig6-R3	5'-AAT CCC CCT TTC AGC GTA ATG-3'		
Pig6-60F	5'-ATC AAC AAC TTA CCG AAA CTA CAT-3'	711	55
Pig6-770R	5'-ATA AAT AAC AAC ACT GGC ATA AT-3'		



## II-8. PCR 프라이머 쌍의 특이도 및 민감도 측정

앞에서 설계된 *P. intermedia* G8-9K-3 동정을 위한 프라이머 쌍의 종-특이성을 알아보기 위하여, 15종의 *Prevotella* spp에 대한 표준균주와 9 균주의 *P. intermedia* 임상분리 균주 및 5 균주의 *P. nigrescens* 임상분리 균주 유전체 DNA 4  $\mu$ l를 주형으로 하여 PCR을 시행하였다. 또한 각각의 PCR 쌍의 민감도(sensitivity)를 측정하기 위하여 유전체 DNA 4 ng에서 4 fg까지 10배씩 희석하여 PCR 주형으로 사용하였다.

PCR은 *AccuPower*<sup>®</sup> PCR PreMix(Bioneer Corp.)와 Peltier thermal cycler(Model PTC-200 DNA engine<sup>™</sup>, MJ Research Inc., Watertown, MA, USA)를 이용하여 시행하였다. *AccuPower*<sup>®</sup> PCR PreMix에는 5 nmole씩의 4가지 deoxynucleoside triphosphate, 0.8 mole의 KCl, 0.2 mole의 Tris-HCl(pH 9.0), 0.03 mole의 MgCl<sub>2</sub> 그리고, 1 unit의 *Taq* DNA polymerase가 들어있다. 여기에 2 ng의 세균 유전체 DNA와 20 pmoles의 각각의 프라이머 쌍을 넣고 PCR을 시행하였다. 이 때 PCR 조건은 다음과 같았다. 초기 변성은 94°C에서 5분간 시행하였고, 변성(94°C, 30분), 결합(50°C 또는 55°C, 30초) 및 중합(72°C, 30초)의 세 과정을 32회 반복하고, 추가적인 중합(72°C, 30초)을 10분간 시행하였다.

PCR이 끝난 후 20  $\mu$ l의 반응물중 2  $\mu$ l를 1.5% agarose gel과 Tris-acetate buffer(0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA, [pH8.0])를 이용해서 100 V에서 30분간 전기영동하였다. 증폭물은 ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator로 발색시켜 크기를 확인하였다.

### III. 연구 결과

#### II-1. *Pig6* DNA 프로브를 이용한 *Southern blot hybridization*

*Pig6* DNA 프로브의 Inverted dot blot hybridization의 결과(Fig. 1A)와 같이 *Southern blot hybridization*에서도 *Pig6* DNA 프로브는 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>과 *P. intermedia* G8-9K-3 균주들의 유전체 DNA들과 반응을 보였다(Fig. 1). 이 때 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>과는 약 3.1 kbp 크기의 반응 띠가 생성되었고, *P. intermedia* G8-9K-3와는 813 bp 크기의 반응 띠가 나타났다. 하지만, 한국인에서 분리 동정된 *P. intermedia* 균주들의 유전체 DNA와는 약 8-9 kbp 크기의 반응 띠가 희미하게 보이지만, 그 intensity (강도)는 매우 미미하였다(Fig. 1). 또한 *P. intermedia*와 유전학적으로 가장 가까운 *P. nigrescens* 균주들의 표준균주(ATCC 33563<sup>T</sup>) 및 한국인 분리 균주들과도 반응을 하지 않았다(Fig. 1).

#### II-2. *Pig6* DNA 프로브의 핵산염기서열 결정 및 상동성 검색

*Pig6* DNA 프로브의 핵산염기서열 결과 813 bp로 구성되어 있었다(Fig. 2). *P. intermedia* 17 균주의 전체 유전체 DNA의 핵산염기서열이 The Institute of Genomic Research(TIGR)에 의해 밝혀져 있고, 이 연구소에서 제공하는 BLASTN 프로그램으로 상동성 검색을 한 결과, 2개의 아직 기능이 밝혀지지 않은 hypothetical 단백질과 핵산염기서열 수준에서 하나는 72%, 다른 하나는 61% 상동성을 보였다(Fig. 3). *Pig6* DNA 프로브의 핵산염기서열을 미국립보건원에서 제공해주는 BLASTX 프로그램을 이용하여 아미노산 수준에서 상동성이 있는 단백질을 검색한 결과 아직 기능이 밝혀져 있지 않은 hypothetical protein, pyoverdine chromophore precursor synthetase, phospholipase D와 같은 단백질과 가장 유사성이 있는 것으로 조사되었다(Table 2).

### II-3. PCR 프라이머 설계 및 PCR 프라이머 쌍의 특이성과 민감도

Pig6 DNA 핵산염기서열을 바탕으로 두 가지의 PCR 프라이머 쌍(Pig6-F3와 Pig6-R3 프라이머 쌍 및 Pig6-60F와 Pig6-770R 프라이머 쌍)들을 설계하였다. 이들을 이용한 PCR을 시행한 결과 Pig6-F3와 Pig6-R3 프라이머 쌍은 Southern blot hybridization과 같이 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>과 *P. intermedia* G8-9K-3 균주들의 유전체 DNA들로부터 PCR 산물을 증폭시켰다(Fig. 4A). 하지만, Pig6-60F와 Pig6-770R 프라이머 쌍으로부터는 *P. intermedia* G8-9K-3 균주 유전체 DNA에서 PCR 증폭물을 확인할 수 있었다(Fig. 4B). 또한 이 들 두 가지 PCR 프라이머 쌍들은 모두 한국인에서 분리 동정된 *P. intermedia* 또는 *P. nigrescens* 균주의 유전체 DNA들을 주형으로 하는 PCR 결과 모두 음성 반응을 보였다.

PCR법에 의한 두 가지 프라이머 쌍들 각각에 대한 *P. intermedia* G8-9K-3 유전체 DNA량의 검출 한계를 알아보기 위한 민감도 실험을 실시하였다. 그 결과 두 가지 프라이머 쌍들 모두 4 pg까지 검출 가능하였다(Fig. 5).

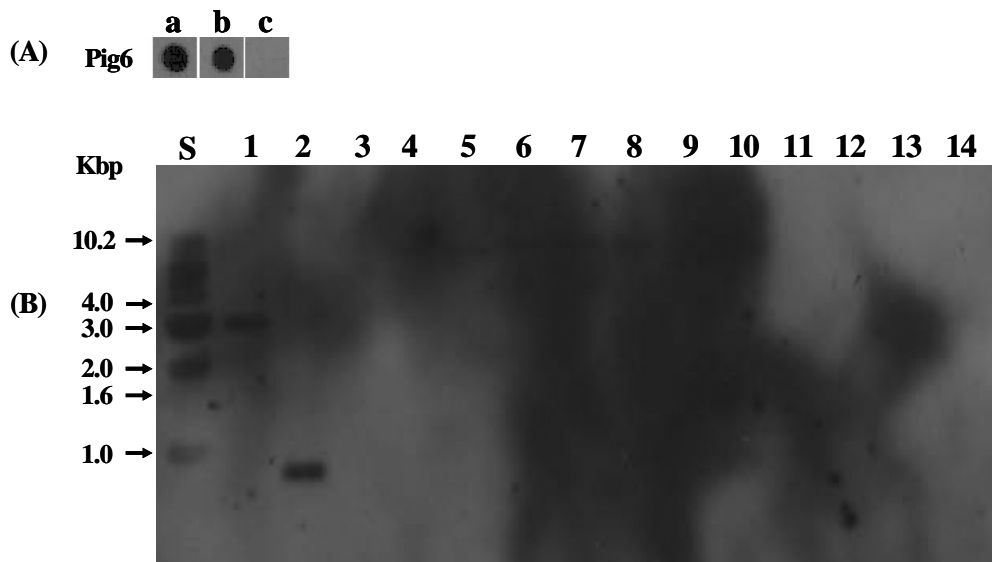


Fig. 1. Inverted dot blot hybridization (A) and Southern blot analysis (B) to determine the specificity of the Pig6 DNA probe. The *Hind*III-digested bacterial genomic DNAs were electrophoresed and transferred to a nylon membrane; the nylon membrane was hybridized with a DIG-labeled Pig6 DNA fragment. lanes: S, 1 kbp DNA ladder (Bioneer Corp.); 1, *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>; 2, *P. intermedia* G8-9K-3; 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.

```

1  AAGCTTGAAC ACITTOGCTT GTTAAAAAGA TAAAAAATAT CATTGTGAAA ATATAATATA
61  TCAACAACCTT ACCGAAACTA CATGTCCGAA TATGATAGGT GTGAGGATTT TAAAAAGTCC
    Pig6-60F
121 GATTATGATA GTTTTTTGTC CGATTATGAT AGGTGGTTTT ATGCTATTCG ACCTTAAATT
    Pig6-F3
181 TGCAACATAA ATCCAAAAGT TTCAAATAAA CTGATAATGA GGAAAAAAGC AGATAACGAA
241 CCCTCTTTGG AGCAGATAAG GAACATGAAA TTTTCGGAAG AACGTTTCCA ACTGCTCGAT
301 ACCATTGCGG ATATGGTAAG CGACGAGTTC GACCGGCGTA AATTAATAGA AGAGGAAAGT
361 TGTCTACATC TAAAAAATAC AATTCATGAG CCGTAGAGC TCAAGCCAAC TGAGAATAAA
421 CCAGTGCATC GCATATTGTG GCAGCGACTC GTAAACATAT TTAATATTGA CAGTTATTCT
481 AATATTCACA GCTCATTTCA CAACAAGGAC GAACAAGCCA CTTAATAACC TATATAAATA
541 AAGCAACAAA CGTCAATTCT CTGACATAGC ATTACGCTGA AAGGGGGATT CATTATAGAA

    3'-TT GCAGTTAAGA GACTGTATCG-5', Pig6-R3

601 CAAATTTTGC AAAGCAAATA GACAGAAAAT ATTTAAAAGA GAGTTCTACA TCTAATCGAG
661 AAGACTATTA AAAGTCAAG CGCCTCGGC AGAGAATGCT GGGGCGGCTT TTTATATTAT
721 ATAGTTAGTG TAAGTTCAAT ATTAAGAATT ATGCCAGTGT TGTTATTTAT AAGAAAAATA

    Pig6-770R, 3'-TAA TACGGTCACA ACAATAAATA-5',

781 TAATTTAATA TACTTATAAT TAAAGTGAAG CTT

```

Fig. 2. The nucleotide sequences of Pig6 DNA probe. The 813 base pairs of nucleotides were obtained. The PCR primer sites are indicated by underline.

```

Plus Strand HSPs:
Score = 1387 (214.2 bits). Expect = 6.4e-75. Sum P(2) = 6.4e-75
Identities = 449/617 (72%), Positives = 449/617 (72%), Strand = Plus / Plus

Pig6 :      17 GCTTGTTAAAAAGATAAAAAATATCATTTTGTA AAAATATAATATATCAACAACCTTACCGAA 76
          !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
Pi 17: 1725390 GCTTGTTAAAAAGAATAAAAAATATCAATTGTAAAACATAACATATCAACAACCTTGCAGCG 1725449

Pig6 :      77 A-CTACATGTCOGAATATGATAGGTGTGAGGATTTTAAAAAGTCOGATTATGATAGTTTT 135
          ! !! !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
Pi 17: 1725450 ATCTG-ATGTCOGATTATGATAGGTGGAAGAAATGCAGAATGTCOGATTATGATAGTTTT 1725508

Pig6 :     136 TTGTCOGATTATGATAGGTGGTTTTATGCTATTTCGACCTTAAATTTGCAACATAAATCCA 195
          !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
Pi 17: 1725509 TTGTCOGATTATGATAGGTGGTTTTGTGCCGTTTCGACCTTAAATTTGCAACATAA--CCA 1725566

Pig6 :     196 AAAGT-TT-CAAATAAA-CTGATAATGAGGAAAAAGCAGATAACGAAACCOCTCTTTGGAG 252
          ! ! ! !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
Pi 17: 1725567 AAAATATTACAAATAAAACTAATTATGAGAAAAAGCAAATAACGAGCCCACTAAAGAG 1725626

Pig6 :     253 CAGATAAGGAACATGAAATTTTCGGAAGAACGTTTCCAACCTGCTCGATACCATTCGGGAT 312
          !!!!! ! ! ! !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
Pi 17: 1725627 CAGATACAGAATATGAAGTATTCGGAAGAACGCTTCCAACCTGCTCGATACCATTCGGGAG 1725686

Pig6 :     313 ATGGTAAGCGAAGAGTTTCGACCGCGTAAATTAATAGAAGAGGAAGTTGTCTACATCTT 372
          !!!!! !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
Pi 17: 1725687 ATGGTGAGCGAAGAGTTTCGAACGTCGAAATTAATAGAAAAGG---GCTATCCATATCTC 1725743

Pig6 :     373 AAAAAACAATTCATGAGCCCGTAGAGCTCAAGCCAACTGAGAATAAACCAGTGCATCGC 432
          !!!!! !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
Pi 17: 1725744 GAAAACCCATTCCCTATATCCATAGAGCCCGAGCCACCACCCAA-AATGCAGC-C-TGC 1725800

Pig6 :     433 -AT--ATTGTGGCAGCGACTCGTAAACATATTTAATATTGACAGTTATTCTAATATTCAC 489
          ! ! ! !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
Pi 17: 1725801 TATCCAACATGGCAGCGGCTCGAAAACCTTCTCAATGCAGACTGCCATTCTCATAATAAG 1725860

Pig6 :     490 -AGCTCATTTCAACAAGGACGAACAAGCCACTTAATA-ACCTATATAAATA-AAGCAA 546
          ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! !
Pi 17: 1725861 GAAGACAAG-C-CA-CTTG-ACAAACCAGATAAATAAAACAACCATAACGCCAGAACCTC 1725916

Pig6 :     547 CAA-ACGTCAATTCTCTGACATAGCA-TTACG-CTGAAAGGGGATTCAATTATA-GAACA 602
          ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! !
Pi 17: 1725917 CGACACGAGTTGCTCGA-A-AGGAGTTCCAACAGGGAGGCTACTTAACTATATGTACA 1725974

Pig6 :     603 -AATTTT-GCAAAGCAA 617
          ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! !
Pi 17: 1725975 GAATACGAGCAAAACAA 1725991

```

Fig. 3. Nucleotide sequence homologous search of Pig6 DNA by Blastn program supported by the Institute for Genomic Research (<http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html>). Pi 17, *Prevotella intermedia* 17.

```

Minus Strand HSPs:

Score = 121 (24.2 bits). Expect = 5.1. P = 0.99
Identities = 57/92 (61%), Positives = 57/92 (61%), Strand = Minus / Plus

Pig6 :    227 TTTTTCCTCATTATCAGTTTATTTGAAACTTTTGGATTTATGTTGC-AAATTTAAGGTCG 169
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Pi 17: 624735 TTTTTCCTCATCAATAATTTTCTTTTA-TTTTCCCTTTGGTTTGCCAAAATTTGCGTAC 624793

Pig6 :    168 AATAGCA-TAAAACCACCTATC-ATAATCGGA 139
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Pi 17: 624794 ATTTGCAATCCAACCTACTAATTTATAATAGAA 624825

```

Fig. 3. (*Continued*)

Table 2. The results of homologous search (BLASTX) of Pig6 DNA probe.

Protein name (species of protein origin)	Accession No. of GenBank	identities	Positives	Gaps
hypothetical protein ( <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7)	NP_704261	30/152 (19%)	74/152 (48%)	19/152 (12%)
hypothetical protein PF11_0213 ( <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7)	NP_701073	31/106 (29%)	55/106 (51%)	10/106 (9%)
hypothetical protein TP04_0185 ( <i>Theileria parva</i> ).	EAN31537	29/130 (22%)	62/130 (47%)	14/130 (10%)
pyoverdine chromophore precursor synthetase ( <i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolica 1448A)	YP_274139	20/67 (29%)	34/67 (50%)	0/67 (0%)
Phospholipase D ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	NP_012956	35/148 (23%)	66/148 (44%)	18/148 (12%)

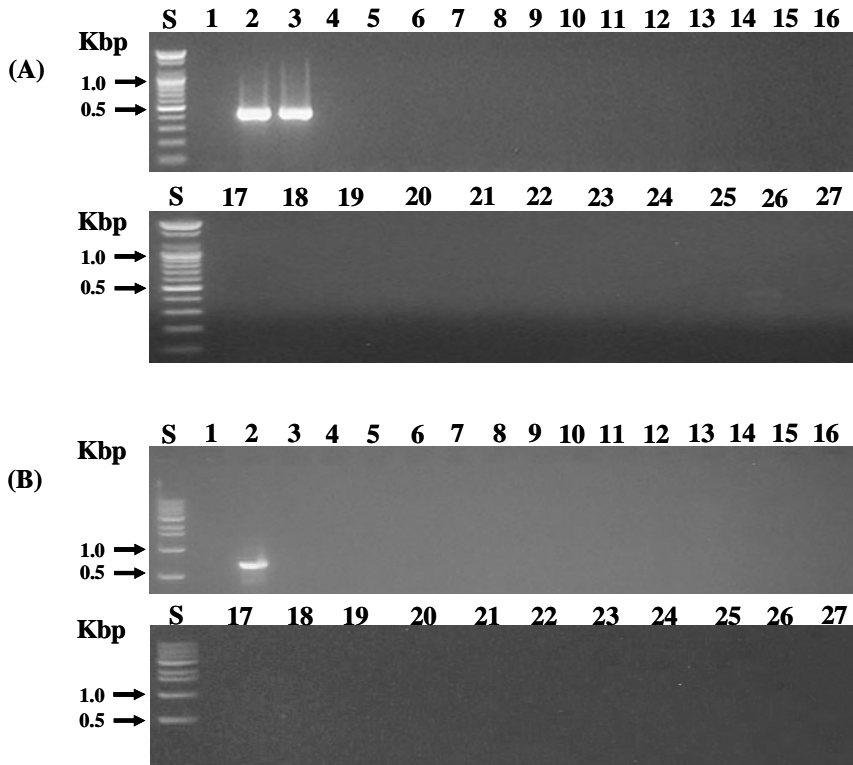


Fig. 4. Specificity test of PCR with Pig6-F3 or Pig6-R3 primers (A) and Pig6-60F and Pig6-770R primers (B) and the genomic DNA of type strains of *Prevotella* spp. and clinical isolates of *P. intermedia* and *P. nigrescens*. Lanes: S, 100 bp (A) or 1 kbp (B) DNA ladders (Bioneer Corp.); 1, *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>; 2, *P. intermedia* G8-9K-3; 3, *P. loescheii* ATCC 15930<sup>T</sup>; 4, *P. melaninogenica* ATCC 25845<sup>T</sup>; 5, *P. bivia* ATCC 29303<sup>T</sup>; 6, *P. oralis* ATCC 33269<sup>T</sup>; 7, *P. corporis* ATCC 33547<sup>T</sup>; 8, *P. buccae* ATCC 33574<sup>T</sup>; 9, *P. veroralis* ATCC 33779<sup>T</sup>; 10, *P. oulorum* ATCC 43324<sup>T</sup>; 11, *P. brevis* ATCC 19188<sup>T</sup>; 12, *P. ruminicola* ATCC 19189<sup>T</sup>; 13, *P. heparinolytica* ATCC 35895<sup>T</sup>; 14, *P. dentalis* ATCC 49559<sup>T</sup>; 15, *P. pallens* ATCC 700821<sup>T</sup>; 16, *P. enoeca* ATCC 51261<sup>T</sup>; 17, *P. intermedia* KB2; 18, *P. intermedia* ChDC KB3; 19, *P. intermedia* ChDC KB14; 20, *P. intermedia* ChDC KB18; 21, *P. intermedia* ChDC KB19; 22, *P. intermedia* ChDC KB29; 23, *P. intermedia* ChDC KB53; 24, *P. nigrescens* ChDC KB5; 25, *P. nigrescens* ChDC KB6; 26, *P. nigrescens* ChDC KB50; 27, *P. nigrescens* ChDC B270.



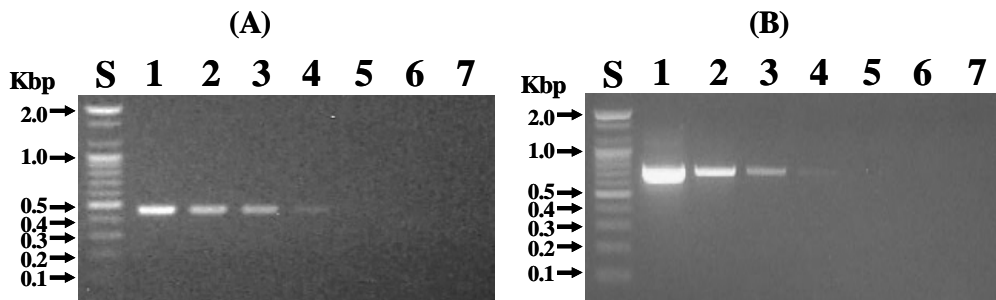


Fig. 5. Sensitivity test of PCR with primers (A) Pig6-F3 and Pig6-R3, (B) Pig6-60F and Pig6-770R, and the purified genomic DNA of *P. intermedia* G8-9K-3. The PCR products were electrophoresed in 1.5% agarose gel. Lanes: S, 100 base pair DNA ladder (Bioneer Corp.); 1 through 7, purified genomic DNA serially diluted 10-fold from 4 ng to 4 fg.

## IV. 총괄 및 고안

본 연구 결과 Pig6 DNA 프로브는 서양인에서 분리 동정된 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>와 *P. intermedia* G8-9K-3 균주들의 유전체 DNA들과 강한 hybridization 반응 띠가 형성되었지만, 한국인에서 분리 동정된 *P. intermedia* 균주들과는 거의 반응을 하지 않았다(Fig. 1). 이러한 결과의 원인을 현재의 연구만으로는 알 수 없지만, Pig 6 DNA 프로브의 핵산염기서열에 코딩된 단백질이 서양인과 한국인 또는 동양인 숙주에 따라 존재 여부가 틀리거나, 유전자가 있지만 핵산염기서열의 상동성에 차이가 많이 나기 때문에 생긴 결과라 생각된다. 이러한 가설들 중에서 Pig6 DNA 프로브의 핵산염기서열이 한국인에서 분리 동정된 *P. intermedia* 균주들의 상동성이 있는 유전자와 상동성이 차이가 있어서 미약한 반응 띠가 생겼다는 것이 가장 타당하리라 생각된다. 이러한 가설을 검증하기 위해서, 다음 연구에서 low stringency 조건과 hybridization 온도를 낮추어서 Southern blot hybridization을 시행하고자 한다.

본 연구 결과 Pig6 DNA 프로브가 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>와 *P. intermedia* G8-9K-3 균주를 제한효소절편길이다양성(restriction fragment length polymorphism; RFLP)에 의해 두 균주를 동정하는 데 이용될 수 있음을 알았다(Fig. 1). 최근 Shin 등(2004)은 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup> 균주 유전체 DNA에서 유래된 Pi30 DNA 프로브를 이용한 Southern blot hybridization법에 의해 *P. intermedia* 종을 균주 수준에서 동정할 수 있음을 보고하였다. 또한, Kook 등(2003a)은 Pi34 DNA 프로브를 이용하여 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup> 균주를 Southern blot hybridization법으로 동정할 수 있음을 보고하였다. 이러한 결과는 DNA 프로브법이 세균의 속에서 균주 수준까지 동정할 수 있어 세균 동정에 있어서 매우 유용하게 이용될 수 있다(Krieg, 2001)는 것을 증명한 것이라 생각된다.

Pig6 DNA 프로브의 핵산염기서열을 미국립보건원에서 제공하는 BLASTN 프로그램을 이용하여 핵산염기서열 수준에서의 상동성을 검색한 결과 현재의 GenBank 데이터베이스에서는 상동성을 갖는 유전자가 존재하지 않았다. 그래서 BLASTX 프로그램을 이용하여 단백질 수준에서의 상동성 검색을 실시한 결과, 아직 기능이 밝혀져 있지 않는 단백질, *Pseudomonas syringae* pv. phaseolica 1448A 균주의 pyoverdine chromophore 전구체 합성효소, *Saccharomyces cerevisiae*의 phospholipase D 등과 19-29% 범주에서 상동성을 보였다. 이러한 단백질들 중 pyoverdine chromophore 전구체 합성효소는 철을 흡착할 수 있는 siderophore의 일종인 pyoverdine을 합성하는 효소이다(Baysse et al., 2002). 즉, Pyoverdine은 dihydroxyquinoline chromophore로 구성되어 있다. 이 때 chromophore는 6개에서 12개의 아미노산으로 구성된 다양한 펩타이드 체인이다(Budzikiewicz, 1993; Meyer, 2000). Chromophore 단백질의 특징은 일정한 파장의 빛을 반사해서 색깔을 띤다는 것이다. 현재 *P. intermedia*에서 chromophore 단백질 발현에 대한 보고는 없었다.

DNA 프로브를 이용한 Southern blot hybridization으로 세균을 동정하는 방법보다는 PCR법을 이용하는 것이 시간적 및 경제적 측면에서 장점이 있다. 본 연구에서도 Pig6 DNA 핵산염기서열을 바탕으로 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>과 *P. intermedia* G8-9K-3 두 균주 모두를 검출할 수 있는 것과, *P. intermedia* G8-9K-3 균주만을 검출할 수 있는 PCR 프라이머 쌍을 개발하였다. 최근 Kim 등(2005)은 *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586<sup>T</sup>를 균주-수준에서 동정할 수 있는 PCR 프라이머 쌍을 균주-특이 DNA의 핵산염기서열을 바탕으로 개발하였다. 또한 김(2005)도 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>과 *P. intermedia* ATCC 49046(G8-9K-3)에 대한 각각의 균주-특이 DNA 프로브의 핵산염기서열 바탕으로 균주-특이 PCR 프라이머 쌍을 설계하였다. 본 연구의 결과는 앞의 두 연구와는 달리 *P. intermedia* ATCC

25611<sup>T</sup>과 *P. intermedia* G8-9K-3 두 균주를 모두 검출할 수 있는 DNA 프로브를 바탕으로 설계됐다는 차이점이 있다. 이는 같은 세균 종 내의 균주들 간의 핵산염기서열에도 차이가 많다는 것을 시사한다. 또한 김(2005)이 개발한 *P. intermedia* ATCC 49046(G8-9K-3)에 대한 균주-특이 PCR 프라이머 쌍과 본 연구에서 개발한 PCR 프라이머 쌍을 이용하여 *P. intermedia* ATCC 49046(G8-9K-3) 균주를 동정하는 데 이용한다면, 더 효능성이 높아지리라 생각된다.

## V. 결 론

본 연구에서는 한국인에서 분리 동정된 *P. intermedia* 균주들과 서양인에서 분리 동정된 균주들(*P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>과 *P. intermedia* ATCC 49046)의 유전체 DNA를 이용하여 Pig6 DNA 프로브의 *P. intermedia*에 대한 종-특이성 여부를 검증하고, 종-특이 PCR 프라이머 쌍을 개발하고자 하였다. 그 결과는 다음과 같았다.

1. Southern blot 분석 결과 Pig6 DNA 프로브는 서양인에서 분리 동정된 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>과 *P. intermedia* G8-9K-3 균주와만 hybridization하였다.
2. Pig6 DNA 프로브는 813 bp의 핵산염기로 구성되어 있었으며, 아직 기능이 밝혀져 있지 않는 단백질, *Pseudomonas syringae* pv. phaseolica 1448A 균주의 pyoverdine chromophore 전구체 합성효소, *Saccharomyces cerevisiae*의 phospholipase D 등과 19-29% 범주에서 상동성을 가졌다.
3. Pig6 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 설계된 Pig6-F3와 Pig6-R3 프라이머 쌍에 의해서는 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>과 *P. intermedia* G8-9K-3 두 균주를 동시에 동정할 수 있었다.
4. Pig6-60F와 Pig6-770R 프라이머 쌍은 *P. intermedia* G8-9K-3 균주만을 동정할 수 있었다.

이상의 연구결과를 종합하면, 이상의 연구결과를 종합하면, Pig6-F3와 Pig6-R3 및 Pig6-60F와 Pig6-770R 프라이머 쌍들은 *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>과 *P. intermedia* G8-9K-3 두 균주를 동시에 혹은 *P. intermedia* G8-9K-3 균주만을 동정할 수 있어, 두 균주의 보존적 측면에서 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. 김미광. *Prevotella intermedia* ATCC 25611과 *Prevotella intermedia* ATCC 49046 균주-특이 동정법 개발. 조선대학교 대학원 박사학위논문. 2005
2. Budzikiewicz H. Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiol Rev.* 1979;43(3):422-42.
3. Dorn BR, Leung KL, Progulsk-Fox A. Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. *Infect Immun.* 1998;66(12):6054-7.
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. 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<sup>T</sup>. *J Microbiol.* 2005;43(4):331-6. Erratum in: *J Microbiol.* 2005;43(5):473.
6. Kim SJ, Ha MS, Choi EY, Choi JI, Choi IS. *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide stimulates release of nitric oxide by inducing expression of inducible nitric oxide synthase. *J Periodontal Res.* 2004;39(6):424-31.
7. 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.

8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Meyer JM. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. Arch Microbiol. 2000;174(3): 135-42.
12. 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.
13. Okamoto M, Maeda N, Kondo K, Leung KP. Hemolytic and hemagglutinating activities of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. FEMS Microbiol Lett. 1999;178(2):299-304.
14. 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(6):885-97.
15. 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.
16. Saito K, Takahashi N, Horiuchi H, Yamada T. Effects of glucose on formation of cytotoxic end-products and proteolytic activity of *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Porphyromonas gingivalis*. J Periodontal Res. 2001;36(6):355-60.
  17. 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.
  18. Slots J, Bragd L, Wikstrom M, Dahlen G. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. J Clin Periodontol. 1986;13(6):570-7.
  19. Slots J, Listgarten MA. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. J Clin Periodontol. 1988;15(2):85-93.
  20. Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL, Hillman JD. Associations between microbial species in subgingival plaque samples. Oral Microbiol Immunol. 1988;3(1):1-7.