

2007년 8월

석사학위논문

DNA 프로브 *Pn23* 핵산염기서열을
기반으로 한 *Prevoella nigrescens*
의 검출을 위한 *PCR* 프라이머 개발

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 민 정

DNA 프로브 *Pn23* 핵산염기서열을
기반으로 한 *Prevotella nigrescens*
의 검출을 위한 *PCR* 프라이머 개발

*Development of PCR primers for the detection of the
Prevotella nigrescens based on the nucleotide
sequence of Pn23 DNA probe*

2007년 8월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 민 정

DNA 프로브 *Pn23* 핵산염기서열을
기반으로 한 *Prevoella nigrescens*
의 검출을 위한 *PCR* 프라이머 개발

지도교수 김 도 경

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2007년 4월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 민 정

김민정의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 박 주 철 인

위 원 조선대학교 교수 김 홍 중 인

위 원 조선대학교 교수 김 도 경 인

2007년 5월 일

조선대학교 대학원

목 차

표 목 차	ii
도 목 차	iii
<i>ABSTRACT</i>	iv
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 세균 및 배양조건	3
2. 세균 지놈 DNA의 추출	4
3. PCR 프라이머 쌍의 설계 및 제작	5
4. Gradient PCR	6
5. PCR 프라이머 쌍의 특이도 및 민감도 측정	6
III. 결 과	7
1. 각 PCR 프라이머 쌍들의 결합온도(annealing temperature) 결정	7
2. PCR 프라이머 쌍들의 특이성 검증	9
3. PCR 프라이머 쌍들의 민감도 조사	9
IV. 총괄 및 고안	13
V. 결 론	16
VI. 참고문헌	17

표 목 차

Table 1. Bacterial strains used in this study	4
Table 2. The PCR primers designed in this study	5
Table 3. The annealing temperatures and sensitivities of PCR primers	7

도 목 차

- Fig. 1. Gradient PCR in order to determine the annealing temperature of the primers (A) Pn23-F1/Pn23-R1, (B) Pn23-F2/Pn23-R2, (C) Pn23-F6/Pn23-R6 in *P. nigrescens* ATCC 33563^T and *P. nigrescens* ChDC KB50. 8
- Fig. 2. Gradient PCR in order to determine the annealing temperature of the primers Pn23-F7/Pn23-R7 in *P. nigrescens* ATCC 33563^T and *P. nigrescens* ChDC KB50. 8
- Fig. 3. Specificity test of the PCR primers (A) Pn23-F1/Pn23-R1, (B) Pn23-F2/Pn23-R2, (C) Pn23-F6/Pn23-R6, (D) Pn23-F7/Pn23-R7 with purified DNA of the type strain. 10
- Fig. 4. Specificity test of the PCR primers (A) Pn23-F1/Pn23-R1, (B) Pn23-F2/Pn23-R2, (C) Pn23-F6/Pn23-R6, (D) Pn23-F7/Pn23-R7 with purified genomic DNA of clinical isolates of *P. intermedia* and *P. nigrescens*. 11
- Fig. 5. Sensitivity test of the PCR primers (A) Pn23-F1/Pn23-R1, (B) Pn23-F2/Pn23-R2, (C) Pn23-F6/Pn23-R6, (D) Pn23-F7/Pn23-R7 with the purified genomic DNA serially diluted 10-fold from 4 ng to 4 fg of *P. nigrescens* ATCC 33563^T. 12

ABSTRACT

Development of PCR primers for the detection of the Prevotella nigrescens based on the nucleotide sequence of Pn23 DNA probe

Kim, Min Jung

Advisor : Prof. Do Kyung Kim, Ph.D.

Department of Dentistry

Graduate School of Chosun University

In a previous study, a *Prevotella nigrescens* (*P. nigrescens*)-specific DNA probe, Pn23, was cloned by shotgun method and southern blot hybridization. The purpose of this study was to develop the *P. nigrescens* species-specific PCR primers based on the nucleotide sequence of Pn23 DNA probe.

The specificity was tested against 10 clinical isolates of *P. nigrescens*, 6 clinical isolates of *P. intermedia* and 20 type strains of oral bacteria. The sensitivity of PCR primers was determined by testing serial dilutions of the purified genomic DNA of *P. nigrescens* ATCC 33563^T as a standard strand.

The data showed that the two sets of PCR primers, Pn23-F1/Pn23-R1 and Pn23-F2/Pn23-R2 had the species-specificity and the two sets of PCR primers, Pn23-F6/Pn23-R6 and Pn23-F7/Pn23-R7, had the strain-specificity for the *P. nigrescens* ATCC 33563^T. The detection limits of four primer sets was 0.4 pg~4 pg of the purified genomic DNA of *P. nigrescens* ATCC 33563^T.

These results suggested that the two sets of PCR primer, Pn23-F6/Pn23-R6 and Pn23-F7/Pn23-R7, could be useful in the quick identification of *P. nigrescens* ATCC 33563^T and particularly helpful in the confirmation of the strain. Moreover,

the two sets of PCR primer, Pn23-F1/Pn23-R1 and Pn23-F2/Pn23-R2, could be useful in the development of PCR kit for the epidemiological studies and bacteriological diagnosis or prognosis for the endontitis and periodontitis.

I. 서론

치주조직은 치아를 지지하는 백악질, 치주인대, 치조골 및 치은으로 구성되어 있으며, 이러한 치주조직에 염증이 발생하는 질환을 치주질환이라고 한다. 이러한 치주질환은 일반적으로 연령이 증가함에 따라 증가하는 경향을 보이고, 치아우식증과 더불어 구강 내에서 가장 빈번하게 발생하는 양대 구강질환으로 알려져 있다. 치주질환은 크게 치은염과 치주염으로 분류된다. 치은염은 약물이나 영양결핍, 성장이나 임신등에 의해 유발되고, 치주염은 이미 존재하는 치은염으로부터 발생하는 경우가 많지만 괴사성 질환 및 혈액성 장애, 유전적 장애와 같은 전신적인 요인에 의해 발병되기도 한다 (Samaranayak, 2003; Kim, 2006). 하지만, 국소적 요인인 치은연하치면세균막에 존재하는 세균이 주요한 원인 인자로 알려져 있다(Moore *et al.*, 1991).

구강 내에는 약 7백여 종의 세균들이 서식하고 있으며, 치면세균막에는 약 4백여 종이 존재하는 것으로 알려져 있다(Mayrand and Greniner, 1998; Kim, 2006). 여러 역학 조사에 의하면 *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Tannerella forsythia* (*Bacteroides forsythus*), *Treponema denticola*, *Eikenella corrodens*, *Peptostreptococcus micros*, *Campylobacter rectus* 및 *Selenomonas sputigena* 등이 치주질환과 관련성이 높은 것으로 보고되었다(Mayrand and Greniner, 1998). 이러한 치주질환과 관련된 세균들은 세균성 심내막염, 흡인성 폐렴, 유아들의 골수염, 조산아 및 저체중아 출산, 심장병 및 뇌출혈 등 전신적인 병을 일으키는 원인이 되기도 한다 (Paster *et al.*, 2001; Joshipura *et al.*, 2003; Khader *et al.*, 2005).

그람음성 혐기성 간균인 *P. nigrescens* 종은 최근 다좌 효소 전기영동법(multilocus enzyme electrophoresis), DNA-DNA hybridization, 혈청학적 실험, 동위효소 검색, 전체 단백질의 전기영동 분석법 및 생화학적 특성 등에 의해 *P. intermedia*로 부터 독립되었다(Nakazawa *et al.*, 1988; Fukushima *et al.*, 1992; Shah *et al.* 1992; Frandsen *et al.*, 1995; Gmur and Thurnheer., 2002). *P. intermedia*는 성인성 치주염, 임신성 치

은염 및 급성괴사성케양성 치은염 등에서 많이 검출되고, *P. nigrescens*는 건강한 부위, 근관질환 병소 및 소아 치은염 병소 부위에서 빈번하게 검출된다고 보고되고 있으나, 치주질환의 연관성에서는 상이한 결과들이 보고되고 있으며, 이는 다양한 연구방법에 의한 차이 및 개체간의 차이에 의한 것으로 보여진다(Robertson *et al.*, 1999; Pearce *et al.*, 2000; Gang *et al.*, 2002; Jeong *et al.*, 2006). 따라서 재현성이 뛰어나며 신속하고 정확하게 *P. nigrescens*를 검출할 수 있는 방법의 개발이 요구된다.

최근의 연구들에서 무작위 클로닝법과 Southern blot 분석법에 의해 *P. nigrescens*를 종-특이적으로 검출할 수 있는 Pn23 DNA 프로브가 소개되었다(Gang *et al.*, 2002; Lee, 2006). DNA 프로브법은 기존의 세균배양법, 생화학검사법 및 DNA-DNA hybridization 법 등에 비해 재현성, 신속성 및 경제적 측면에서 뛰어나다. 그러나 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)법은 신속성, 경제성 및 민감도 측면에서 DNA 프로브법보다 더 큰 장점을 가지고 있다(Yoo *et al.*, 2003). 따라서 본 연구는 Pn23 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 *P. nigrescens*를 종-특이적으로 검출할 수 있는 PCR 프라이머를 개발하고자 시행되었다.

II. 재료 및 방법

1. 세균 및 배양조건

본 연구에서 이용된 *Prevotella* spp.의 표준균주와 참고균주 및 임상균주들은 Table 1에 나타내었다. *Prevotella* spp.의 표준균주 및 참고균주들은 American Type Culture Collection(ATCC, University Boulevard, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였고 임상에서 분리·동정된 *P. nigrescens* 균주와 *P. intermedia* 균주들은 한국미생물자원은행(Korean Collection for Oral Microbiology, Gwangju, Korea)에서 분양받아 사용하였다.

본 연구에 사용된 *P. nigrescens*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *A. actinomycetemcomitans* 및 *T. forsythia* 균종에 속하는 균주들은 trypticase soy broth(TSB)에 0.5% yeast extract, 0.05% cysteine HCl-H₂O, 0.5mg/ml hemin 및 2 μ g/ml vitamin K₁이 첨가된 배지에 접종하여, 85% N₂, 10% CO₂ 및 5% H₂가 공급되는 37 $^{\circ}$ C 혐기성 세균배양기에서 1-2일간 배양한 후 다음 실험에 사용하였다. *S. mutans* 균주는 20% 자당이 함유된 mitis salivarius-bacitracin(MBC; bacitracin 농도 0.5 μ g/ml) 한천배지에 도말하여, 37 $^{\circ}$ C CO₂ 세균배양기에서 1-2일간 배양한 후 다음 실험에 사용하였다.

Table 1. Bacterial strains used in this study

<i>Species or subspecies</i>	
<i>Prevotella nigrescens</i> ATCC* 33563 ^T	<i>Prevotella nigrescens</i> ChDC** B270
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611 ^T	<i>Prevotella nigrescens</i> ChDC B272
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 49046	<i>Prevotella nigrescens</i> ChDC B274
<i>Prevotella loescheii</i> ATCC 15930 ^T	<i>Prevotella nigrescens</i> ChDC B281
<i>Prevotella brevis</i> ATCC 19188 ^T	<i>Prevotella nigrescens</i> ChDC B282
<i>Prevotella ruminicola</i> ATCC 19189 ^T	<i>Prevotella nigrescens</i> ChDC B283
<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845 ^T	<i>Prevotella nigrescens</i> ChDC B288
<i>Prevotella bivia</i> ATCC 29303 ^T	<i>Prevotella nigrescens</i> ChDC KB5
<i>Prevotella oralis</i> ATCC 33269 ^T	<i>Prevotella nigrescens</i> ChDC KB6
<i>Prevotella corporis</i> ATCC 33547 ^T	<i>Prevotella nigrescens</i> ChDC KB50
<i>Prevotella buccae</i> ATCC 33574 ^T	<i>Prevotella intermedia</i> ChDC KB2
<i>Prevotella veroralis</i> ATCC 33779 ^T	<i>Prevotella intermedia</i> ChDC KB3
<i>Prevotella heparinolytica</i> ATCC 35895 ^T	<i>Prevotella intermedia</i> ChDC KB14
<i>Prevotella oulorum</i> ATCC 43324 ^T	<i>Prevotella intermedia</i> ChDC KB19
<i>Prevotella dentalis</i> ATCC 49559 ^T	<i>Prevotella intermedia</i> ChDC KB29
<i>Prevotella enoeca</i> ATCC 51261 ^T	<i>Prevotella intermedia</i> ChDC KB53
<i>Prevotella pallens</i> ATCC 700821 ^T	
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 ^T	
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 ^T	
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586 ^T	
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> ATCC 33384 ^T	

*ATCC, American Type Culture Collection; **ChDC, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University; T, Type strain.

2. 세균 지놈 DNA의 추출

세균 지놈 DNA를 G-spinTM Genomic DNA Extraction Kit(iNtRON Co., Seoul, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 추출하였다. 혈액 한천배지에서 배양한 세균 한 균락을 액체배지 3ml에 접종한 후 후기 로그기까지 배양한 다음, 세균배양액을

1분간 원심분리(13,000 rpm)하였다. 300 μ l의 G-완충용액을 넣고 잘 혼합하여 65°C에서 15분간 반응시킨 후 250 μ l의 결합용액을 넣고 혼합한 다음, 세균 lysates를 G-spinTM column에 넣고 1분간 원심분리(13,000 rpm)하였다. Column에 500 μ l의 세척용액 A를 넣고 1분간 원심분리(13,000 rpm)한 후 500 μ l의 세척용액 B를 넣고 1분간 원심분리(13,000 rpm) 하였다. 세척용액을 완전히 제거하기 위해 다시 2분간 원심분리 하였다. G-spinTM column을 eppendorf tube에 장착하고 50 μ l의 용출용액을 첨가하였다. 5분간 실온에 방치한 후 1분간 원심분리(13,000 rpm)하여 세균 지놈 DNA를 추출하였다.

3. PCR 프라이머 쌍의 설계 및 제작

선행연구의 보고에 의해 Pn23 DNA 프로브들의 핵산염기서열은 4,561 bp로 구성되어 있음이 밝혀졌다(Lee, 2006). 본 연구에서는 Pn23 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 Primer Select 프로그램(DNASTAR Inc.)을 이용하여 4쌍의 PCR 프라이머를 설계한 후 제작하였다(Table 2).

Table 2. The PCR primers designed in this study

Primer pairs (positions)*	Sequence of oligonucleotides (5'→3')	Size of amplicons (bp)
Pn23-F1 (437-458 nts) Pn23-R1 (712-686 nts)	GTAGCGGCACCGTAAAGGAATG GACCGAGTTAAACCAGGCAGAGAA	276
Pn23-F2 (1595-1614 nts) Pn23-R2 (1981-1960 nts)	GGCGCGGCTGAAGTGGTAAG TTCGGA AAAAGGCTGGAGTCTGG	387
Pn23-F6 (2103-2124 nts) Pn23-R6 (2764-2742 nts)	GCTGCTTCGCCGTATCCTCCTA GCGCAATAAATCGGTCCCCTAAG	662
Pn23-F7 (2892-2911 nts) Pn23-R7 (3436-3413 nts)	CCTACGCCTGGGGTGAGACG TGCTGCCTACTTCCTTGCTGTTTT	545

*The positions are based on the nucleotide sequences of the Pn23 DNA probe.

4. Gradient PCR

P. nigrescens 종의 검출과 동정을 위하여 설계·제작된 종-특이적 PCR 프라이머의 적정 결합온도를 구하기 위해 초기 변성과 변성의 조건을 각각 95°C에서 5분, 95°C에서 30초 시행하였다. 결합조건은 55~70°C 사이에서 30초간 반응하도록 설정하고, 중합은 72°C에서 30초로 하여 세 과정(변성, 결합, 중합)을 30회 반복하였으며 추가적 중합은 72°C에서 10분간 시행하였다.

PCR은 *AccuPower*[®] PCR PreMix(Bioneer, Daejeon, Korea)와 Peltier thermal cycler(Model PTC-200 DNA engine[™], MJ Research Inc., Watertown, MA, USA)를 이용하여 시행하였다. *AccuPower*[®] PCR PreMix에는 각각 5nmole 씩의 4가지 deoxynucleoside triphosphate, 0.8mole의 KCl, 0.2mole의 Tris-HCl(pH 9.0), 0.03mole의 MgCl₂ 및 1unit의 *Taq* DNA polymerase가 함유되어있다. 여기에 4ng의 세균 지놈 DNA와 각각 10pmole 씩의 forward와 reverse 프라이머를 넣어 총 20 μl의 PCR 혼합용액이 되도록 하여 PCR을 시행하였다. 최종반응물 중 2μl를 1.5% agarose gel 에서 전기영동하여, 그 증폭여부를 확인하였다.

5. PCR 프라이머 쌍의 특이도 및 민감도 측정

P. nigrescens 균주의 검출 및 동정을 위해 설계된 프라이머 쌍들의 종-특이성을 알아보기 위해, 20 종(21 균주)의 *Prevotella* spp. 표준균주와 참고균주들, 임상에서 분리된 *P. nigrescens* 10 균주 및 *P. intermedia* 6 균주들의 지놈 DNA를 주형으로 하여 PCR을 시행하였다. 이 때 PCR 조건은 다음과 같았다. 초기 변성은 94°C에서 5분간 시행하였고, 변성(94°C, 30초), 결합(각 프라이머 적정 온도에서 30초), 중합(72°C, 30초)의 세 과정을 30회 반복하였으며, 추가적인 중합을 72°C에서 10분간 시행하였다. *AccuPower*[®] PCR PreMix(Bioneer, Daejeon, Korea)에 총 20μl의 PCR 혼합용액이 되도록, 4ng의 세균 지놈 DNA와 각각 10pmole씩의 forward와 reverse 프라이머를 넣어 PCR을 시행하였다.

각 PCR 프라이머 쌍들을 이용하여 검출할 수 있는 최소한의 지놈 DNA를 알기위해 민감도를 측정하였다. *P. nigrescens* ATCC 33563^T의 지놈 DNA를 4ng에서 4fg까지 10배씩 희석하여 PCR를 시행하였다.

III. 결 과

1. 각 PCR 프라이머 쌍들의 결합온도(*annealing temperature*) 결정

PCR 프라이머들의 결합온도를 구하기 위해, 결합조건을 55~70℃ 사이에서 30초간 반응하도록 설정하여 gradient PCR을 시행하였다. 그 결과, 실험한 모든 온도에서 단일 PCR 산물이 증폭되었다. 이 결과를 바탕으로 본 연구에서는 4 종류의 PCR 프라이머쌍(Pn23-F1/Pn23-R1, Pn23-F2/Pn23-R2, Pn23-F6/Pn23-R6 및 Pn23-F7/Pn23-R7)들의 결합온도를 모두 65℃로 결정하였다(Table 3, Fig. 1과 Fig. 2).

Table 3. The annealing temperatures and sensitivities of PCR primers

Primer pairs	Annealing temperature (°C)	Sensitivities (amount of genomic DNA, pg)
Pn23-F1 Pn23-R1	65	0.4
Pn23-F2 Pn23-R2	65	4
Pn23-F6 Pn23-R6	65	4
Pn23-F7 Pn23-R7	65	0.4

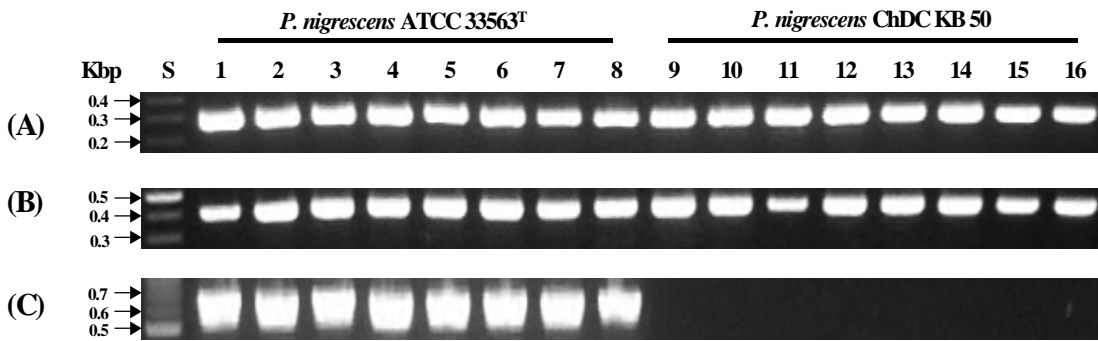


Fig. 1. Gradient PCR in order to determine the annealing temperature of the primers (A) Pn23-F1/Pn23-R1, (B) Pn23-F2/Pn23-R2, (C) Pn23-F6/Pn23-R6 in *P. nigrescens* ATCC 33563^T and *P. nigrescens* ChDC KB50. 4 ng of each bacterial genomic DNA was used as PCR templates and each PCR temperature. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. Lanes: S, size marker (100 bp ladder); 1 and 9, 55.0°C; 2 and 10, 55.4°C; 3 and 11, 56.2°C; 4 and 12, 57.5°C; 5 and 13, 59.2°C; 6 and 14, 61.4°C; 7 and 15, 63.9°C; 8 and 16, 67.7°C.

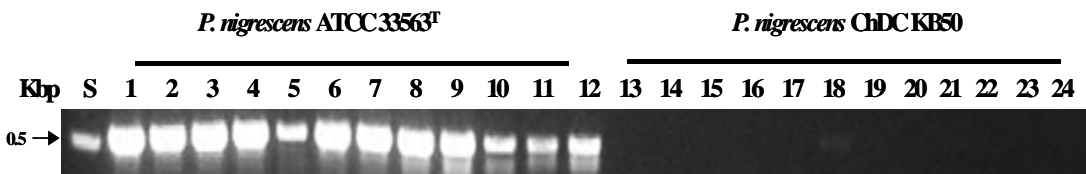


Fig. 2. Gradient PCR in order to determine the annealing temperature of the primers Pn23-F7/Pn23-R7 in *P. nigrescens* ATCC 33563^T and *P. nigrescens* ChDC KB50. 4 ng of each bacterial genomic DNA was used as PCR templates and each PCR temperature. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. Lanes: S, size marker (100 bp ladder); 1 and 13, 55.0°C; 2 and 14, 55.4°C; 3 and 15, 56.2°C; 4 and 16, 57.5°C; 5 and 17, 59.2°C; 6 and 18, 61.4°C; 7 and 19, 63.9°C; 8 and 20, 66.1°C; 9 and 21, 67.7°C; 10 and 22, 68.9°C; 11 and 23, 69.7°C; 12 and 24, 70.0°C.

2. PCR 프라이머 쌍들의 특이성 검증

Pn23 DNA 프로브 핵산염기서열을 바탕으로 설계한 4 종류의 PCR 프라이머 쌍들을 이용하여 *P. nigrescens* 및 *P. intermedia* 표준균주, 참고균주, 한국인에서 분리된 임상균주들을 대상으로 PCR을 실시하였다. 그 결과, 두 쌍의 프라이머(Pn23-F1/Pn23-R1, Pn23-F2/Pn23-R2) 경우에는 본 연구에 사용된 모든 *P. nigrescens* 균주의 지놈 DNA를 검출할 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 3과 Fig. 4). 나머지 두 쌍의 프라이머(Pn23-F6/ Pn23-R6, Pn23-F7/Pn23-R7) 경우에는 *P. nigrescens* ATCC 33563^T 균주만의 지놈 DNA에서 PCR 산물이 증폭됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3과 Fig. 4).

3. PCR 프라이머 쌍들의 민감도 조사

PCR법에 의한 프라이머 쌍들 각각에 대한 *P. nigrescens* ATCC 33563^T 지놈 DNA량의 검출 한계를 알아보기 위한 민감도를 측정된 결과, Pn23-F2/Pn23-R2와 Pn23-F6/Pn23-R6 프라이머 쌍들에서는 4pg까지 검출되었고, Pn23-F1/Pn23-R1과 Pn23-F7/Pn23-R7 프라이머 쌍들에서는 0.4pg까지 검출되었다(Fig. 5와 Table 3).

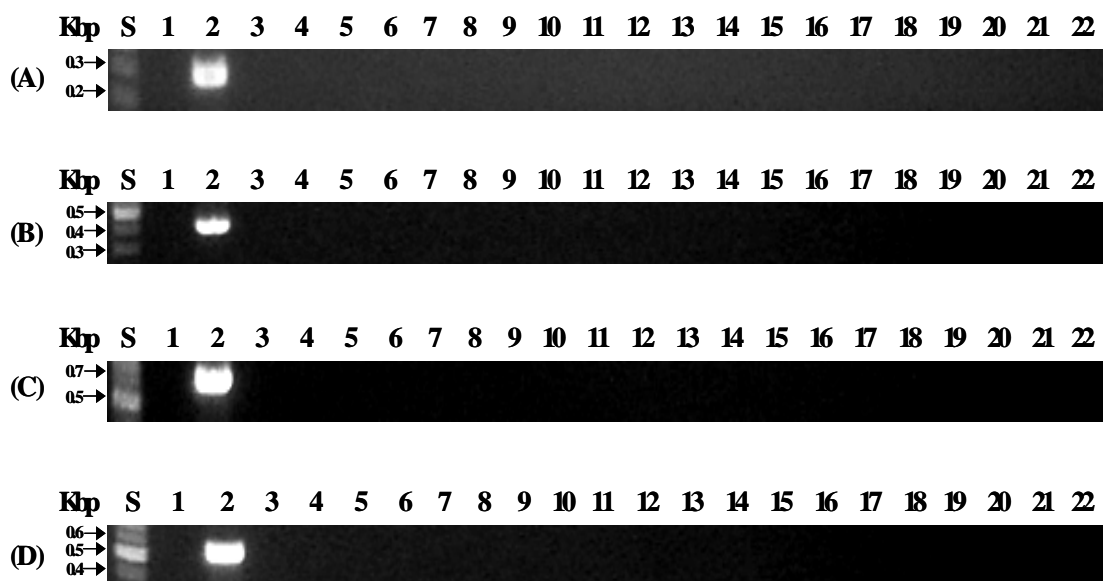


Fig. 3. Specificity test of the PCR primers (A) Pn23-F1/Pn23-R1, (B) Pn23-F2/Pn23-R2, (C) Pn23-F6/Pn23-R6, (D) Pn23-F7/Pn23-R7 with purified DNA of the type strain. 4 ng of each bacterial genomic DNA was used as PCR templates. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. Lanes: S, size marker (100 bp ladder); 1, (-) negative control; 2, *P. nigrescens* ATCC 33563^T; 3, *P. intermedia* ATCC 25611^T; 4, *P. intermedia* ATCC 49046 (G8-9K-3); 5, *P. Loescheil* ATCC 15930^T; 6, *P. brevis* ATCC 19188^T; 7, *P. ruminicola* ATCC 19189^T; 8, *P. melaninogenica* ATCC 25845^T; 9, *P. bivia* ATCC 29303^T; 10, *P. oralis* ATCC 33269^T; 11, *P. corporis* ATCC 33547^T; 12, *P. buccae* ATCC 33574^T; 13, *P. verovalis* ATCC 33779^T; 14, *P. heparinolytica* ATCC 35895^T; 15, *P. oulorum* ATCC 43324^T; 16, *P. dentalis* ATCC 49559^T; 17, *P. enoea moore* ATCC 51261^T; 18, *P. pallens* ATCC 700821^T; 19, *P. gingivalis* ATCC 33277^T; 20, *F. nucleatam* ATCC 25586^T; 21, *A. actinomycetemcomitarns* ATCC 33384^T; 22, *S. mutans* ATCC 25175^T.

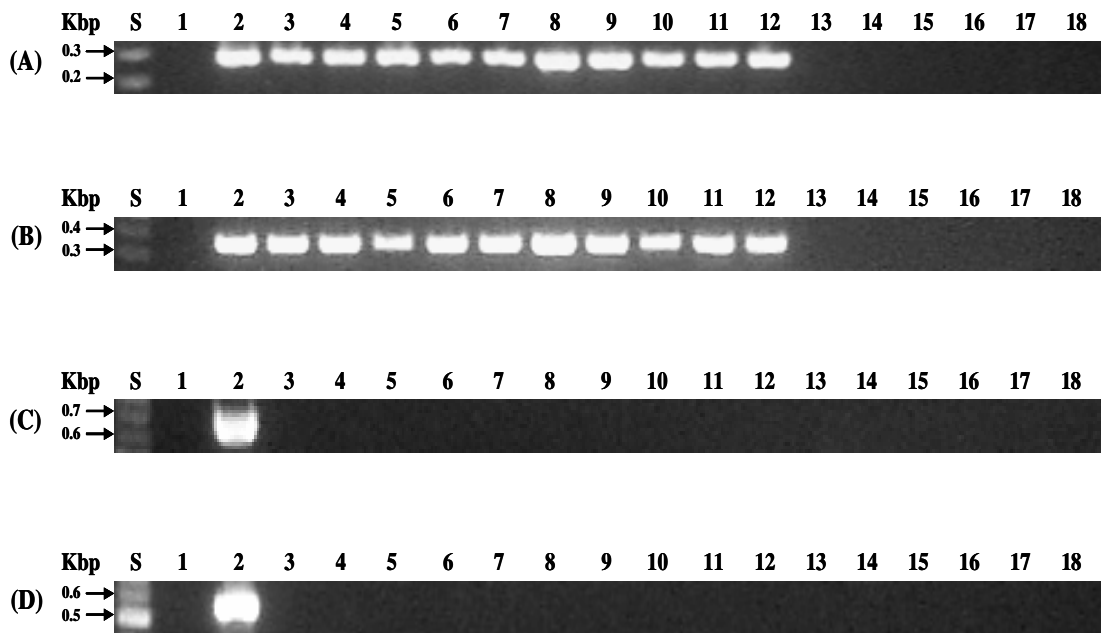


Fig. 4. Specificity test of the PCR primers (A) Pn23-F1/Pn23-R1, (B) Pn23-F2/Pn23-R2, (C) Pn23-F6/Pn23-R6, (D) Pn23-F7/Pn23-R7 with purified genomic DNA of clinical isolates of *P. intermedia* and *P. nigrescens*. 4 ng of each bacterial genomic DNA was used as PCR templates. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. Lanes: S, size marker (100 bp ladder); 1, (-) negative control; 2, *P. nigrescens* ATCC 33563^T; 3, *P. nigrescens* ChDC B270; 4, *P. nigrescens* ChDC B272; 5, *P. nigrescens* ChDC B274; 6, *P. nigrescens* ChDC B281; 7, *P. nigrescens* ChDC B282; 8, *P. nigrescens* ChDC B283; 9, *P. nigrescens* ChDC B288; 10, *P. nigrescens* ChDC KB5; 11, *P. nigrescens* ChDC KB6; 12, *P. nigrescens* ChDC KB50; 13, *P. intermedia* ChDC KB2; 14, *P. intermedia* ChDC KB3; 15, *P. intermedia* ChDC KB14; 16, *P. intermedia* ChDC KB19; 17, *P. intermedia* ChDC KB29; 18, *P. intermedia* ChDC KB53.

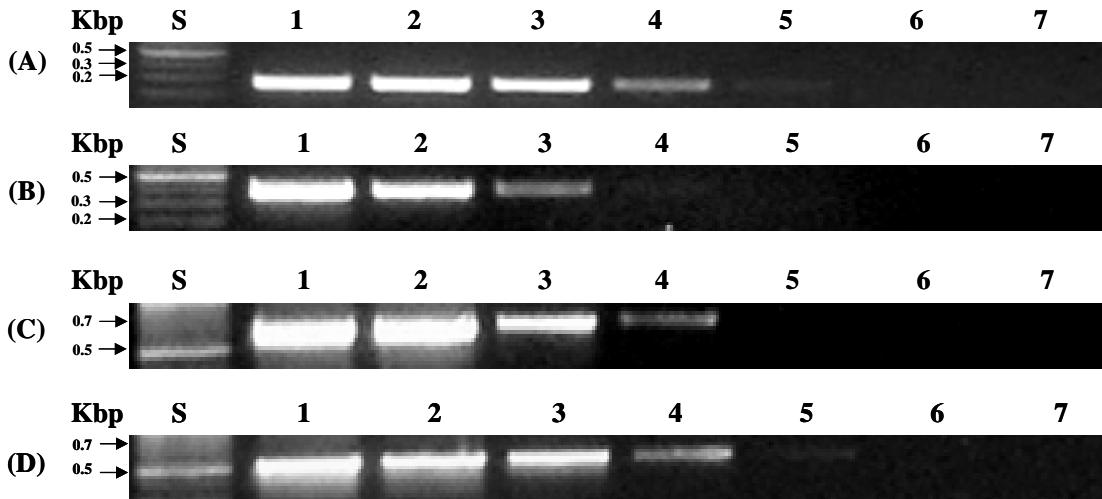


Fig. 5. Sensitivity test of the PCR primers (A) Pn23-F1/Pn23-R1, (B) Pn23-F2/Pn23-R2, (C) Pn23-F6/Pn23-R6, (D) Pn23-F7/Pn23-R7 with the purified genomic DNA serially diluted 10-fold from 4 ng to 4 fg of *P. nigrescens* ATCC 33563^T. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. Lanes: S, Size marker (100 bp DNA ladder); 1, 4 ng; 2, 0.4 ng; 3, 40 pg; 4, 4 pg; 5, 0.4 pg; 6, 40 fg; 7, 4 fg.

IV. 총괄 및 고안

본 연구는 *P. nigrescens*에 대한 종-특이 DNA 프로브로 알려진 Pn23의 핵산염기서열을 바탕으로 *P. nigrescens*에 대한 종-특이 PCR 프라이머를 제작하기 위하여 시행되었다. 그 결과, *P. nigrescens* 종의 표준균주(ATCC 33563^T)와 임상균주의 지놈 DNA 모두를 검출할 수 있는 두 개의 프라이머 쌍(Pn23-F1/Pn23-R1 및 Pn23-F2/Pn23-R2)들이 개발되었다. 현재 세균 분류학적 측면에서 가장 신뢰성이 높은 방법 중 하나가 16S rDNA 핵산염기서열 비교법이다. 16S rDNA는 구조 유전자로서 돌연변이가 비교적 잘 일어나지 않고, 세균 종에 상관없이 염기서열이 잘 보존된 부분과 세균 종간에 상이성 큰 부분이 교차하면서 존재하기 때문에 이러한 특성을 이용하여 세균을 종 수준에서 동정할 수 있는 PCR 프라이머 개발(Ashimoto *et al.*, 1996)이나 oligonucleotide 프로브 개발(Choi *et al.*, 2000)에 이용되고 있다. 실제로 16S rDNA 핵산염기서열을 바탕으로 한 *P. nigrescens*를 종-특이 PCR 프라이머 쌍들이 개발되어 소개되어 있다(Ashimoto *et al.*, 1996; Baumgartner *et al.*, 1999; Siqueir *et al.*, 2002). 그러나 이러한 16S rDNA를 바탕으로 설계된 PCR 프라이머들은 *P. nigrescens*와 유전학적 측면에서 가장 가까운 *P. intermedia*의 임상 분리 균주들의 지놈 DNA도 비특이적으로 검출됨이 보고된 바 있다(Siqueir *et al.*, 2002). 이러한 단점을 극복하기 위하여 특정 세균 종에 대한 종-특이 PCR 프라이머를 16S rDNA 핵산염기서열 및 기능 유전자의 핵산염기서열을 바탕으로 설계한 2가지 이상의 PCR 프라이머를 개발하여 사용하기도 한다(Kim *et al.*, 2005). 그러므로 본 연구에서 개발된 두 종류의 *P. nigrescens* 종-특이 PCR 프라이머 쌍들은 기존에 개발된 다른 PCR 프라이머 쌍들과 함께 역학조사에 사용한다면 좀 더 정확한 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

기존의 end-point PCR법은 임상 샘플에서 *P. nigrescens*의 정성분석에 이용되고 있으나, 정량적인 분석은 불가능하다. 최근 이러한 단점을 보완하는 quantitative real-time PCR(qRT-PCR)법이 개발되어 이용하고 있다(Greiner *et al.*, 2001; Nagashima *et al.*, 2005). 따라서 향후 연구에는 본 연구에서 개발된 Pn23-F1/Pn23-R1과 Pn23-F2/Pn23-R2 프라이머 쌍들을 *P. nigrescens*의 정량분석에 사용 가능할

것으로 생각된다.

본 연구 결과 *P. nigrescens* ATCC 33563^T 균주 지놈 DNA만을 을 검출할 수 있는 두 종류의 프라이머 쌍(Pn23-F6/Pn23-R6 및 Pn23-F7/Pn23-R7)도 개발되었다. Pn23 DNA 프로브가 본 연구에서 사용된 모든 *P. nigrescens*와 hybridization할 수 있었기 때문에 예상하지 못했던 결과였다. 이러한 결과의 원인은 현재의 연구로만으로 알 수 없지만, *P. nigrescens* 종-특이 PCR 프라이머 쌍이 설계된 부분이 Pn23 DNA 핵산염기서열 중 전반부(437 nt~1960 nt)이고, *P. nigrescens* ATCC 33563^T 균주-특이 PCR 프라이머가 설계된 부분이 후반부(2103 nt~3413 nt)인 점을 고려한다면, Pn23 DNA 프로브 전반부의 핵산염기서열은 *P. nigrescens* 균주들에서 상동성이 잘 보존된 유전자에 해당하는 부분이고, 후반부는 *P. nigrescens* ATCC 33563^T 균주에 특이적으로 존재하는 유전자에 해당하는 부위일 가능성이 있다. 따라서 향후 연구에서 전반부와 후반부를 적절한 제한효소로 절단한 다음 Southern blot 분석을 시행하여 이를 증명하고자 한다.

구강 내 감염성 질환의 연구에 있어서 이와 관련된 세균들의 검출 및 동정하는 방법에는 전통적인 세균배양법, DNA 프로브법, PCR법 등이 개발되어 이용되고 있다 (Savitt *et al.*, 1990; Morita *et al.*, 1991; Premaraj *et al.*, 1999; Baumgartner *et al.*, 1999; Siqueir *et al.*, 2002). 이러한 방법들 중 DNA 프로브법은 전통적인 세균 배양법이나 생화학검사법 등에 비해 민감도와 특이도가 뛰어나고 세균의 종 수준에서부터 균주 수준까지 동정할 수 있는 장점이 있다. 그러나 종-특이 DNA 프로브를 클로닝하기 위해서는 많은 시간과 인력 그리고 경제적인 문제 등 제약이 따른다(Kook *et al.*, 2003). 이에 반해 PCR법은 특정 핵산염기서열이 밝혀져 있는 주형 유전자가 있어야 PCR 프라이머 쌍을 설계할 수 있다는 단점은 있지만, DNA 프로브법을 포함한 다른 세균 동정법들과 비교할 때 가장 신속하고 간편한 방법이며, 본 연구에서와 같이 세균을 종 수준 뿐만아니라 균주 수준까지 검출할 있다는 장점이 있다. 그러므로 본 연구에서 이용된 종-특이 DNA 프로브 개발과 이의 핵산염기서열을 바탕으로 한 종-특이 PCR 프라이머 개발의 모델을 이용한다면 구강 내 감염성질환의 역학연구를 위한 구강 내 세균 종들의 검출을 위한 PCR 프라이머 키트 개발이 용이해 질 것으로 생각된다.

이상의 연구결과를 종합할 때, Pn23-F1/n23-R1 및 Pn23-F2/Pn23-R2 PCR 프라이

며 들은 *P. nigrescens*를 종-특이적으로 검출할 수 있는 구강세균 진단키트 개발에 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 또한 Pn23-F6/Pn23-R6와 Pn23-F7/Pn23-R7 PCR 프라이머들은 숙주-세균 상호작용을 연구하는데 주로 이용되는 *P. nigrescens* 표준균주인 ATCC 33563^T 균주를 신속하고 정확하게 검출하는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 *P. nigrescens* 종을 특이적으로 검출할 수 있는 Pn23 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 *P. nigrescens*에 대한 종-특이 PCR 프라이머를 개발하기 위하여 시행하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Pn23-F1/Pn23-R1과 Pn23-F2/Pn23-R2 프라이머 쌍들은 *P. nigrescens* ATCC 33563^T 및 *P. nigrescens* 임상균주의 지놈 DNA를 종-특이적으로 검출하였다.
2. Pn23-F6/Pn23-R6 및 Pn23-F7/Pn23-R7 프라이머 쌍들은 *P. nigrescens* ATCC 33563^T 균주만의 지놈 DNA를 검출할 수 있었다.
3. 이들 PCR 프라이머 4쌍들이 검출할 수 있는 최소한의 *P. nigrescens* ATCC 33563^T 지놈 DNA 양은 0.4pg~4pg 이었다.

이상의 연구결과를 종합할 때, Pn23-F1/Pn23-R1 및 Pn23-F2/Pn23-R2 PCR 프라이머 들은 *P. nigrescens*를 종-특이적으로 검출할 수 있는 구강세균 진단키트 개발에 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 또한 Pn23-F6/Pn23-R6와 Pn23-F7/Pn23-R7 PCR 프라이머들은 숙주-세균 상호작용을 연구하는데 주로 이용되는 *P. nigrescens* 표준균주인 ATCC 33563^T 균주를 신속하고 정확하게 검출하는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

VI. 참고 문헌

- Ashimoto, A., C. Chen, I. Bakker, and J. Slots. 1996. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol. Immunol.* 11, 266-273.
- Baumgartner, J.C., K.-S. Bae, T. Xia, J. Whitt, and L.L. David. 1999. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and polymerase chain reaction for differentiation of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *J. Endodo.* 25, 324-328.
- Choi B.K., S.H. Park, Y.J. Yoo, S.H. Choi, J.K. Chai, K.S. Cho, and C.K. Kim. 2000. Detection of major putative periodontopathogens in Korean advanced adult periodontitis patients using a nucleic acid-based approach. *J. Periodontol.* 71, 1387-1394.
- Frandsen, E.V., K. Poulsen, and M. Kilian. 1995. Confirmation of the species *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 429-435.
- Fukushima, H., H. Moroi, J. Inoue, T. Onoe, T. Ezaki, E. Yabuuchi, K.P. Leung, C.B. Walker, W.B. Clark, and H. Sagawa. 1992. Phenotypic characteristics and DNA relatedness in *Prevotella intermedia* and similar organisms. *Oral Microbiol. Immunol.* 7, 60-64.
- Gang, S.-W., S.-H. Kim, D.K. Kim, J.-H. Seong, B.-O. Kim, J.J. Han, and J.-K. Kook. 2002. Study on isolation of *Prevotella nigrescens* 9336-specific DNA probes

using random cloning method. *J. Korean Acad. Periodontol.* 32, 269-279.

Gmur, R. and T. Thurnheer. 2002. Direct quantitative differentiation between *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in clinical specimens. *Microbiology* 148, 1379-1387.

Grenier O., P.J. Day, P.P. Bosshard, F. Imeri, M. Altwegg, and D. Nadal. 2001. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal secretions by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3129-3134.

Jeong, S.-U., Y.Y. So, S.J. Kang, M.-J. Kim, H.-S. Jang, K.Y. Lee, B.-O. Kim, and J.-K. Kook. 2006. Development of *Prevotella intermedia* ATCC 49046 strain-specific PCR primer based on a Pig6 DNA prob. *Kor. J. Microbiol.* 42, 89-94.

Joshiyura, K.J., H.C. Hung, E.B. Rimm, W.C. Willett, and A. Ascherio. 2003. Periodontal disease, tooth loss, and incidence of Ischemic stroke. *Stroke* 34, 47-52.

Khader, Y.S. and Q. Ta'ani. 2005. Periodontal diseases and the risk of preterm birth and low birth weight: a meta-analysis. *J. Periodontol.* 76, 161-165.

Kim S.-G., S.H. Kim, M.J Kim, H.S. Kim, and J.-K. KooK. 2005. Identification of *Actinovacillus actinomycetemcomitans* using species-specific 16S rDNA primers. *Kor. J. Microbiol.* 43, 209-212.

Kim, H.-S. 2006. Ph. D. Comparison of the frequency of *Fusobacterium nucleatum* in dental plaque between healthy region and periodontitis lesion. Graduate School of Chosun University, Gwangju, Republic of Korea.

Kook, J.-K., M.-K. Kim, J.H. Seong, D.K. Kim, B.O. Kim, J.C. Park, K.K. Kim, S.J. Choe, and B.M. Min. 2003. A new method for rapid screening of bacterial species- or subspecies-specific DNA probes. *FEMS Microbiol Lett.* 219, 121-127.

Lee, Y.-S. 2006. Detection of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* using Pig27 and Pn23 DNA probe. Graduate school of Chosun University, Gwangju, Republic of Korea.

Mayrand, D. and D. Grenier. 1998. Bacterial interactions in periodontal diseases. *Bull. Inst. Pasteur.* 96, 125-133.

Moore, W.E., L.H. Moore, P.R. Ranney, R.M. Smibert, J.A. Burmeister, and H.A. Schenkein. 1991. The microflora of periodontal sites showing active destructive progression. *J. Clin Periodontol.* 18, 729-739.

Morita, M., T. Yamamoto, and T. Watanabe. 1991. Identification by biotinylated DNA probes of *Capnocytophaga* species isolated from supragingival calculus. *J. Dent. Res.* 70, 1048-1051.

Nagashima, S., A. Yoshida, N. Suzuki, T. Ansai, and T. Takehara. 2005. Use of the genomic subtractive hybridization technique to develop a real-time PCR assay for quantitative detection of *Prevotella* spp. in oral biofilm samples. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2948-2951.

Nakazawa, F., J.J. Zambon, H.S. Reynolds, and R.J. Genco. 1988. Serological studies of oral *Bacteroides intermedius*. *Infect. Immun.* 56, 1647-1651.

Paster, B.J., S.K. Boches, J.L. Galvin, R.E. Ericson, C.N. Lau, V.A. Levanos, A. Sahasrabudhe, and F.E. Dewhirst. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.* 183, 3770-3783.

Pearce, M.A., D.A. Devine, R.A. Dixon, and T.J. van Steenberg. 2000. Genetic heterogeneity in *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotell corporis* and related species isolated from oral and nonoral sites. *Oral Microbiol. Immunol.* 15, 89-95.

Premaraj T., N. Kaoki, K. Fukui, H. Kato, and K. Watanabe. 1999. Use of PCR and sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis techniques for differentiation of *Prevotella intermedia* sensu stricto and *Prevotella nigrescens*. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1057-1061.

Robertson, K.L., D.B. Drucker, A.S. Blinkhorn, and R.M. Davies. 1999. A comparison of techniques used to distinguish strains of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Anaerobe.* 5, 119-122.

Samaranayake L.P. 2003. Essential microbiology for dentistry, 2nd edition. 224-232.

Savitt, E.D., M.W. Keville, and W.J. Peros. 1990. DNA probes in the diagnosis of periodontal microorganisms. *Arch. Oral Biol.* 35, 153-159.

Siqueir, J.F., I.N. Rôças, M. De Uzeda, A.P. Colombo, and K.R. Santos. 2002. Comparison of 16S rDNA-based PCR and checkerboard DNA - DNA hybridisation for detection of selected endodontic pathogens. *J. Med. Microbiol.* 51, 1090-1096.

Shah, H.N. and S.E. Gharbia. 1992. Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 542-546.

Yoo, S.Y., M.-H. Choi, and S.S. Lim. 2003. Methods for the identification of Mutans Streptococci. *Oarl Biology Res.* 27, 437-445.

저작물 이용 허락서

학 과	치의학과	학 번	20057718	과 정	석사
성 명	한글: 김 민 정	한문: 金珉廷	영문: Kim, Min Jung		
주 소	광주광역시 동구 운림동 라인아파트 203동 106호				
연락처	E-mail : friendany@hanmail.net				
논문제목	한글: DNA 프로브 Pn23 핵산염기서열을 기반으로 한 <i>Prevotella nigrescens</i> 의 검출을 위한 PCR 프라이머 개발				
	영문 : Development of PCR primers for the detection of the <i>Prevotella nigrescens</i> based on the nucleotide sequence of Pn23 DNA probe				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함.
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의() 반대()

2007 년 8 월 일

저작자: 김 민 정 (인)

조선대학교 총장 귀하

(국문초록)

DNA 프로브 Pn23 핵산염기서열을 기반으로 한 *Prevotella nigrescens*의 검출을 위한 PCR 프라이머의 개발

김 민 정

조선대학교 대학원 치의학과

(지도교수: 김 도 경)

최근의 연구에서 무작위 클로닝법과 Southern blot hybridization법에 의해 *Prevotella nigrescens*(*P. nigrescens*)를 종-특이적으로 검출할 수 있는 Pn23 DNA 프로브가 보고되었다. 본 연구는 Pn23 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 하여 *P. nigrescens* 균주들을 종-특이적으로 검출할 수 있는 PCR 프라이머를 개발하고자 시행되었다.

Pn23 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 PCR 프라이머를 설계하였고, 프라이머의 종-특이성을 검증하기 위하여 임상에서 분리된 *P. nigrescens* 10 균주와 *P. intermedia* 6 균주, 그리고 20 종의 *Prevotella* spp.에 대한 표준균주 및 참고 균주의 지놈 DNA를 주형으로 하여 PCR을 시행하였다. 또한 각 PCR 프라이머의 민감도를 측정하기 위하여 지놈 DNA 4fg부터 4ng까지 PCR 주형으로 사용하였다.

PCR 프라이머 Pn23-F1/Pn23-R1 쌍 및 Pn23-F2/Pn23-R2 쌍들은 본 연구에서 사용된 모든 *P. nigrescens* 균주들을 종-특이적으로 검출하였으며, PCR 프라이머 Pn23-F6/Pn23-R6 쌍 및 Pn23-F7/Pn23-R7 쌍들은 *P. nigrescens* ATCC 33563^T만을 균주-특이적으로 검출하였다. 프라이머 각각에 대한 *P. nigrescens* ATCC 33563^T 지놈 DNA량의 검출 한계를 알아보기 위한 민감도 실험결과, 네 가지 프라이머는 각각 0.4pg 또는 4pg까지 검출 가능하였다.

이상의 연구결과를 종합할 때, Pn23-F1/Pn23-R1 및 Pn23-F2/Pn23-R2 PCR 프라이머 들은 *P. nigrescens*를 종-특이적으로 검출할 수 있는 구강세균 진단키트 개발에 이

용될 수 있을 것으로 사료된다. 또한 Pn23-F6/Pn23-R6와 Pn23-F7/Pn23-R7 PCR 프라이머들은 숙주-세균 상호작용을 연구하는데 주로 이용되는 *P. nigrescens* 표준균주인 ATCC 33563^T 균주를 신속하고 정확하게 검출하는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.