



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2008년 2월

석사학위논문

DNA 프로브 *Pig27* 핵산염기서열을
기반으로 한 *Prevotella intermedia*의
검출을 위한 *PCR* 프라이머 개발

조선대학교 대학원

치 의 학 과

황 경 환

DNA 프로브 *Pig27* 핵산염기서열을
기반으로 한 *Prevotella intermedia*의
검출을 위한 *PCR* 프라이머 개발

*Development of PCR primers for the detection
of the Prevotella intermedia based on the
nucleotide sequence of Pig27 DNA probe*

2008년 2월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

황 경 환

DNA 프로브 *Pig27* 핵산염기서열을
기반으로 한 *Prevotella intermedia*의
검출을 위한 *PCR* 프라이머 개발

지도교수 국 중 기

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2007년 10월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

황 경 환

황경환의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 이 상 호 인

위 원 조선대학교 교 수 김 홍 중 인

위 원 조선대학교 교 수 국 중 기 인

2007년 11월 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	5
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	12
IV. 총괄 및 고안	14
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 was performed with primer pairs of (A) Pig27-F2/ Pig27-R2 or (B) Pig27-F5/ Pig27-R5 and four ng of genomic DNA of the purified genomic DNA of <i>P. intermedia</i> KB19 or <i>P. intermedia</i> ATCC 25611 ^T	8
Fig. 2. Specificity test of primers (A) Pig27-F2/ Pig27-R2 and (B) Pig27-F5/ Pig27-R5.	10
Fig. 3. Specificity test of primers (A) Pig27-F2/ Pig27-R2 or (B) Pig27-F5/ Pig27-R5 using the four ng of bacterial genomic DNA clinical isolates of <i>P. intermedia</i> or <i>P. nigrescens</i> as PCR templates.	11
Fig. 4. Sensitivity test of the primers.	13

ABSTRACT

Development of PCR primers for the detection of the Prevotella intermedia based on the nucleotide sequence of Pig27 DNA probe

Hwang, Kyung Hwan, D.D.S.

Advisor : Prof. Kook, Joong-Ki, D.D.S., M.S.D., Ph. D.

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

In a previous study, a *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*)-specific DNA probe, Pig27, was cloned by shotgun method and southern blot hybridization. The purpose of this study was to develop the *P. intermedia* species-specific PCR primers based on the nucleotide sequence of Pig27 DNA probe. The specificity of the PCR primers was tested against 6 clinical isolates of *P. intermedia*, 10 clinical isolates of *P. nigrescens* and 20 type strains of oral bacteria. The sensitivity of PCR primers was determined by testing 0.4 ng~4 fg of the purified genomic DNA. The data showed that the two sets of PCR primers, Pig27-F2/Pig27-R2 and Pig27-F5/Pig27-R5 had the species-specificity for the *P. intermedia* ATCC 25611^T. The detection limits of four primer sets was 0.4 pg~4 pg of the purified genomic DNA of *P. intermedia* ATCC 25611^T. These results suggested that the two sets of PCR primer, Pig27-F2/Pig27-R2 and Pig27-F5/Pig27-R5, could be useful in the detection kit of *P. intermedia* ATCC 25611^T.

I. 서론

치주질환은 치아우식증과 더불어 사람의 구강에서 가장 빈번하게 발생하는 양대 구강병 중 하나이다. 이러한 치주질환은 호르몬 장애, 영양결핍, 면역결핍성 질환, 특정 약물에 대한 과민반응 등의 전신적인 요인과 치은연하 치면세균막에 존재하는 치주질환 원인균 등에 의한 국소적 요인에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다. 이러한 원인 요인 중에서 치은연하 치면세균막에 존재하는 세균에 의한 치주질환의 발생이 가장 중요하다고 알려져 있다(Moore *et al.*, 1991). 또한 이러한 구강 내 치주질환 원인균종들은 심혈관계질환, 저체중아 출산, 흡인성 폐렴 및 유아 골수염 등의 전신질환을 유발할 수 있다고 보고되었다(Joshipura *et al.*, 2003; Khader *et al.*, 2005).

최근의 분자생물학적 방법을 이용한 연구결과에 의하면, 사람의 구강 내에 존재하는 세균 종은 약 500 여종이 되는 것으로 보고되고 있으며, 그 중 세균 배양에 성공한 균종은 약 350 여종인 것으로 알려졌다(Paster *et al.*, 2001). 현재까지 진행된 치주질환의 원인균을 규명하는 연구 결과에 의하면, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* 및 *Tannerella forsythia*가 치주질환과 가장 관련성이 높은 것으로 보고되었다(Socransky *et al.*, 1998). 최근 한국인을 대상으로 치주질환 치료 후 예후와 밀접한 관련성이 있는 세균 종을 찾는 연구 결과에 의하면, *Prevotella intermedia*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* 및 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) 중에서 *P. intermedia*가 존재하는 치주질환 병소부위가 가장 예후가 좋지 않았던 것으로 보고되었다(Kook *et al.*, 2005). 여러 역학연구 결과에서도 *P. intermedia*는 성인성 치주염, 급성괴사성괴양성 치은염, 임신성 치은염 등에 이환된 병소부위 및 구강 농양 등에서 빈번하게 검출되는 병원성 세균으로 보고되었다(Okamoto M. *et al.*, 1999; Papapanou P.N. *et al.*, 2000, Milsom *et al.*, 1996).

치주질환과 관련된 세균종간의 역학조사를 하기 위해서는 각각의 세균 종을 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 방법이 개발 되어야 한다. 지금까지 개발된 여러 세균 검출법들 중에서 분자생물학적 방법이 가장 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 방법으로 알려져 있다. 세균의 종, 아종 및 균주 수준으로 검출 및 동정할 수 있는 DNA 프로브를 신속하고 경제적으로 개발할 수 있는 Inverted Dot Blot Hybridization(IDBH) 검색법이 개발되었고(Kook *et al.*, 2003), 이러한 방법으로 *P. intermedia*를 종-특이적으로 검출할 수 있는 Pig27 DNA 프로브가 소개되었다(Gang *et al.*, 2002; 이 등, 2006). 이러한 DNA 프로브법이 세균배양법 및 생화학검사법 등과 같은 전통적인 세

균검출 및 동정법보다는 신속성 및 정확성이 높다. 하지만, 세균 종-특이 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 프라이머를 개발하여 PCR법을 이용하여 세균 종을 검출하는 것이 DNA 프로브 법보다는 신속성, 정확성 및 경제성 측면에서 많은 장점이 있다. 그러므로 본 연구는 최근 Lee(2006)가 개발한 *P. intermedia* 종-특이 DNA 프로브인 Pig27의 핵산염기서열을 바탕으로 *P. intermedia*를 종 수준에서 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 PCR 프라이머를 개발하기 위하여 시행하였다.

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. intermedia* 균주와 *P. nigrescens* 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 intermedia</i> ATCC 25611 ^T	<i>Prevotella intermedia</i> ChDC KB2
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 49046 (G8-9K-3)	<i>Prevotella intermedia</i> ChDC KB3
<i>Prevotella nigrescens</i> ATCC* 9336 ^T	<i>Prevotella intermedia</i> ChDC KB14
<i>Prevotella loescheii</i> ATCC 15930 ^T	<i>Prevotella intermedia</i> ChDC KB19
<i>Prevotella brevis</i> ATCC 19188 ^T	<i>Prevotella intermedia</i> ChDC KB29
<i>Prevotella ruminicola</i> ATCC 19189 ^T	<i>Prevotella intermedia</i> ChDC KB53
<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845 ^T	<i>Prevotella nigrescens</i> ChDC** B270
<i>Prevotella bivia</i> ATCC 29303 ^T	<i>Prevotella nigrescens</i> ChDC B272
<i>Prevotella oralis</i> ATCC 33269 ^T	<i>Prevotella nigrescens</i> ChDC B274
<i>Prevotella corporis</i> ATCC 33547 ^T	<i>Prevotella nigrescens</i> ChDC B281
<i>Prevotella buccae</i> ATCC 33574 ^T	<i>Prevotella nigrescens</i> ChDC B282
<i>Prevotella veroralis</i> ATCC 33779 ^T	<i>Prevotella nigrescens</i> ChDC B283
<i>Prevotella heparinolytica</i> ATCC 35895 ^T	<i>Prevotella nigrescens</i> ChDC B288
<i>Prevotella oulorum</i> ATCC 43324 ^T	<i>Prevotella nigrescens</i> ChDC KB5
<i>Prevotella dentalis</i> ATCC 49559 ^T	<i>Prevotella nigrescens</i> ChDC KB6
<i>Prevotella enoeca</i> moore ATCC 51261 ^T	<i>Prevotella nigrescens</i> ChDC KB50
<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 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 후 250 μ l의 결합용액을 넣고 혼합한 다음, 세균 lysates를 G-spinTM

column에 넣고 1분간 원심분리(13,000rpm)하였다. Column에 500 μ l의 세척용액 A를 넣고 1분간 원심분리(13,000rpm)한 후 500 μ l의 세척용액 B를 넣고 1분간 원심분리(13,000rpm) 하였다. 세척용액을 완전히 제거하기 위해 다시 2분간 원심분리 한 후 G-spinTM column을 eppendorf tube에 장착하고 50 μ l의 용출용액을 첨가하였다. 5분간 실온에 방치한 후 1분간 원심분리(13,000rpm)하여 세균 지놈 DNA를 추출하였다.

3. PCR 프라이머 쌍의 설계 및 제작

선행연구의 보고에 의해 Pig27 DNA 프로브들의 핵산염기서열은 1,841 bp로 구성되어 있음이 밝혀졌다(Lee, 2006). 본 연구에서는 Pig27 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 Primer Select 프로그램(DNASTAR Inc.)을 이용하여 2 쌍의 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)
Pi27-F2 (974-997nts)	5'-CCGCTACAAGTGGCATAATAAGAA-3'	345
Pi27-R2 (1299-1318nts)	5'-TGGCAGGAAGAGCGACAGAT-3'	
Pi27-F5 (387-405nts)	5'-GCGCGGTA AAAAGCGTAGGT-3'	595
Pi27-R5 (961-981nts)	5'-TG TAGCGGCGGTTATTTGATG-3'	

*The positions are based on the nucleotide sequences of the Pig27 DNA probe.

4. Gradient PCR

P. intermedia 종의 검출과 동정을 위하여 설계·제작된 종-특이적 PCR 프라이머의 적정 결합온도를 구하기 위해 초기 변성과 변성의 조건을 각각 95 $^{\circ}$ C에서 5분, 95 $^{\circ}$ C에서 30초 시행하였다. 결합조건은 55~70 $^{\circ}$ C 사이에서 30초간 반응하도록 설정하고, 중합은 72 $^{\circ}$ C에서 30초로 하여 세 과정(변성, 결합, 중합)을 30회 반복하였으며 추가적 중합은 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 시행하였다. 이때 *P. intermedia*의 표준균주(ATCC 25611)와 한국인에서 분리 동정된 하나의 임상균주(KB6)의 지놈 DNA를 이용하여 gradient PCR을 하였으며, 두 균주의 DNA 모두에서 가장 많은 PCR 증폭물을 보이는 동일한 온도를 결합온도로 정하였다.

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 μ l의 PCR 혼합 용액이 되도록 하여 PCR을 시행하였다. 최종반응물 중 2 μ l를 1.5% agarose gel을 이용하여 100V에서 15분간 전기영동하여, 그 증폭여부를 확인하였다.

5. PCR 프라이머 쌍의 특이도 및 민감도 측정

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

각 PCR 프라이머 쌍들을 이용하여 검출할 수 있는 최소한의 지놈 DNA를 알기 위해 민감도를 측정하였다. *P. intermedia* ATCC 25611^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 55~66.1℃ 사이에서 30초간 반응하도록 설정하여 gradient PCR을 시행하였다. 그 결과, 실험한 모든 온도에서 단일 PCR 산물이 증폭되었다. 이 결과를 바탕으로 본 연구에서는 결합온도를 Pi27-F2/Pi27-R2는 60℃로 Pi27-F5/Pi27-R5는 62℃로 결정하였다(Table 3, Fig. 1).

Table 3. The annealing temperatures and sensitivities of PCR primers

Primer pairs	Annealing temperature (°C)	Sensitivities (amount of genomic DNA, pg)
Pi27-F2 Pi27-R2	60	0.4
Pi27-F5 Pi27-R5	62	4

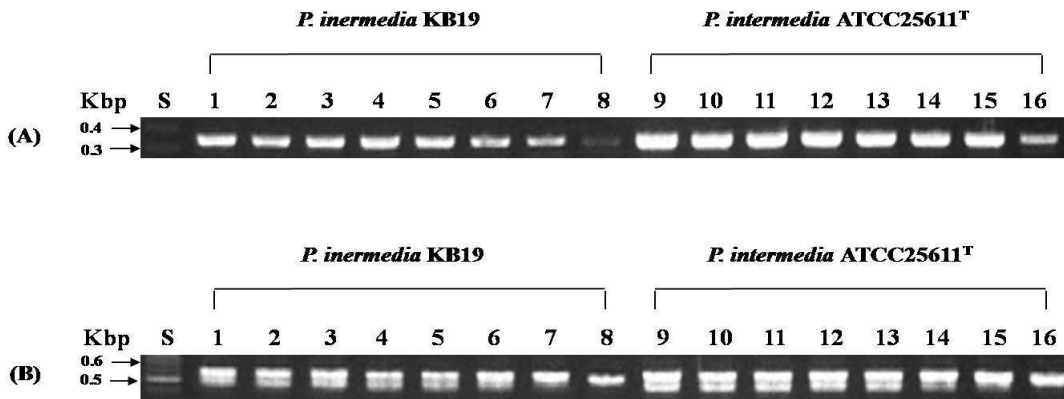


Fig. 1. Gradient PCR was performed with primer pairs of (A) Pig27-F2/ Pig27-R2 or (B) Pig27-F5/ Pig27-R5 and four ng of genomic DNA of the purified genomic DNA of *P. intermedia* KB19 or *P. intermedia* ATCC 25611^T. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. S, size marker; 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, 66.1°C.

2. PCR 프라이머 쌍들의 특이성 검증

Pig27 DNA 프로브 핵산염기서열을 바탕으로 설계한 2 종류의 PCR 프라이머 쌍들의 *P. intermedia*에 대한 종 특이성을 검증하기 위하여 *P. intermedia*와 이와 유전학적으로 가장 가까운 *P. nigrescens* 균종들의 표준균주, 참고균주, 한국인에서 분리된 임상균주들을 대상으로 PCR을 실시하였다. 그 결과, 두 쌍의 프라이머(Pi27-F2/Pi27-R2와 Pi27-F5/Pi27-R5) 경우에는 본 연구에 사용된 모든 *P. intermedia* 균주의 지놈 DNA를 종-특이적으로 검출할 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 2 과 Fig. 3).

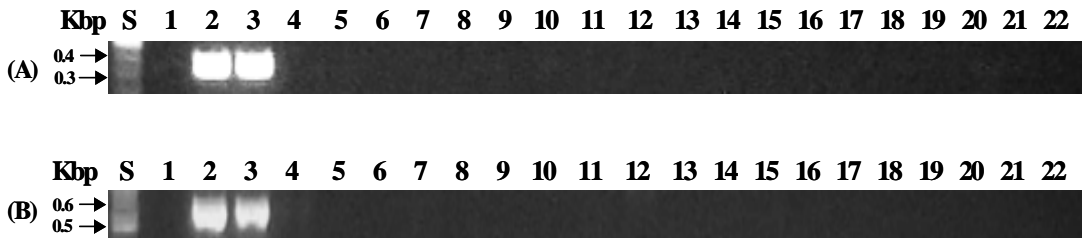


Fig. 2. Specificity test of primers (A) Pig27-F2/ Pig27-R2 and (B) Pig27-F5/ Pig27-R5. Four ng of each bacterial genomic DNA were used as PCR templates. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. S, size marker; 1, sterilized deionized water; 2, *P. intermedia* ATCC25611^T; 3, *P. intermedia* ATCC49046^T; 4, *P. nigrescens* ATCC 9336^T; 5, *P. loescheii* ATCC15930^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. enoeca* ATCC 51261^T; 18, *P. pallens* ATCC 700821^T; 19, *P. gingivalis* ATCC 33277^T; 20, *F. nucleatam* ATCC 25586^T; 21, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC 33384^T; 22, *Streptococcus mutans* ATCC 25175^T.

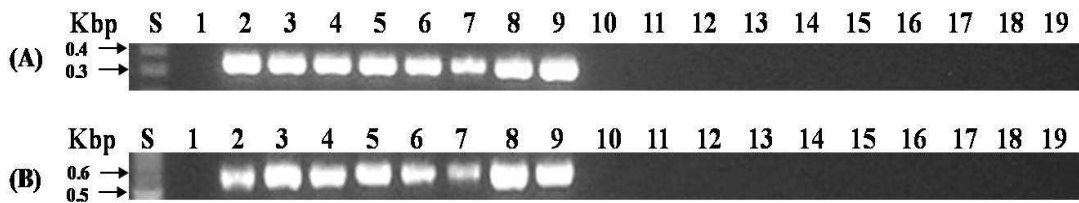


Fig. 3. Specificity test of primers (A) Pig27-F2/ Pig27-R2 or (B) Pig27-F5/ Pig27-R5 using the four ng of bacterial genomic DNA clinical isolates of *P. intermedia* or *P. nigrescens* as PCR templates. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. S, size marker; 1, sterilized deionized water; 2, *P. intermedia* ATCC 25611^T; 3, *P. intermedia* ATCC 49046^T; 4, *P. intermedia* KB2; 5, *P. intermedia* KB3; 6, *P. intermedia* KB14; 7, *P. intermedia* KB19; 8, *P. intermedia* KB29; 9, *P. intermedia* KB53; 10, *P. nigrescens* B270; 11, *P. nigrescens* B272; 12, *P. nigrescens* B274; 13, *P. nigrescens* B281; 14, *P. nigrescens* B282; 15, *P. nigrescens* B283; 16, *P. nigrescens* B288; 17, *P. nigrescens* KB5; 18, *P. nigrescens* KB6; 19, *P. nigrescens* KB50.

3. PCR 프라이머 쌍들의 민감도 조사

PCR법에 의한 프라이머 쌍들 각각에 대한 *P. intermedia* ATCC 25611^T 지놈 DNA 량의 검출 한계를 알아보기 위한 민감도를 측정한 결과, Pig27-F2/Pig27-R2 프라이머 쌍에서는 0.4pg까지 검출되었고, Pig27-F5/Pig27-R5 프라이머 쌍에서는 4pg까지 검출되었다(Fig. 4와 Table 3).

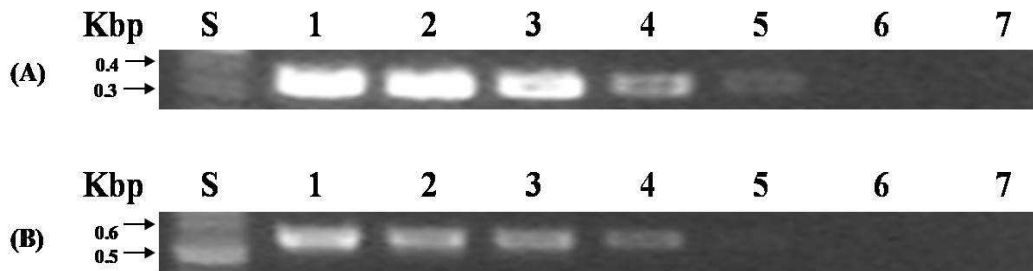


Fig. 4. Sensitivity test of the primers. The PCRs were performed with the primers (A) Pig27-F2/ Pig27-R2 or (B) Pig27-F5/ Pig27-R5 and the purified genomic DNA of *P. intermedia* ATCC 25611^T. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. Lanes: S (100 base pair DNA ladder); 1, 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

치주질환은 구강 내 세균에 의해 발생하는 감염성 질환이기 때문에 치주질환의 병인론 연구를 위해서는 역학 연구가 선행되어야 한다. 치주질환 병소와 건강한 치주조직에 존재하는 세균의 분포를 조사하여 치주질환의 발생과 밀접한 관련이 있는 세균종을 찾는 역학연구를 시행하고, 이들 세균 종들이 숙주 조직을 파괴하여 질병을 유발시키는 독소인자를 찾아내는 연구를 통해서 치주질환의 예방 및 치료를 위한 표적 병원성 세균종을 결정한다(Ashimoto *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 2000; Kim, 2006). *P. intermedia*는 현재까지의 역학 및 병인론 연구의 결과 가장 일반적인 성인성 치주염을 비롯한 치근단 낭종에서도 중요한 병원성 세균종으로 조사되었고, 숙주의 적혈구를 파괴하여 치은연하 치면세균막에 존재하는 철이나 헤민(hemin)을 영양분으로 필요로 하는 다른 치주질환 병원성 세균종의 성장을 돕는다는 것이 보고되었다(Stubbs *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2003). 하지만, *P. intermedia*의 치주질환에서의 역학연구가 모두 일치한 것은 아니었다. 이러한 이유는 인종이나 지역에 따라 숙주의 섭취물의 차이, 연구조사 방법의 차이 등이 가장 큰 것으로 생각된다.

세균을 분류하는 방법은 분자생물학이 발전하면서 세균의 16S rRNA 유전자(16S rDNA)의 염기서열의 상동성의 차이, DNA-DNA hybridization 법을 통하여 세균종을 분류하고 있다. 즉, 비교하는 두 세균의 16S rDNA의 상동성이 97%이상이고, DNA-DNA hybridization 결과 70% 이상이면 같은 세균종으로 평가한다(Krig, 2001). 그리고 각 세균 종들의 표준균주의 16S rDNA 염기서열의 상동성 정도를 비교하여, 세균을 분류한다. 이외에도 세균의 생화학적 특성, 지방산 조성 등의 표현형 차이를 연구하여 세균 종간의 차이를 밝히기도 하지만, 앞의 두 16S rDNA 핵산염기비교분석법 및 DNA-DNA hybridization 법이 연구한다. 하지만, 이 두 방법을 이용하기 위해서는 세균을 배양해서 이들 세균으로부터 지놈 DNA를 추출해야한다. 그러므로 임상에서 두 방법을 이용해서 역학조사를 한다는 것은 불가능하다.

현재 임상미생물학 분야에서 가장 널리 사용하고 있는 세균 검출법은 중합연쇄반응법이다(Ashimoto *et al.*, 1996). 이때 사용되는 종-특이 PCR 프라이머의 표적 유전자로 가장 많이 사용되고 있는 것이 16S rDNA이다. 하지만, 16S rDNA는 약 1,500 bp로 구성되어 있고, 상동성이 잘 보존된 부분이 많기 때문에 실제로 종-특이 PCR 프라이머를 설계할 수 있는 핵산염기서열이 제한되어 있다. 이러한 이유로 현재 house keeping genes의 핵산염기서열을 바탕으로 PCR 프라이머를 개발하여 사용하기도 한

다. 또한 제한적이기는 하지만, 종-특이 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 PCR 프라이머를 개발하여 사용하기도 한다(Kim, 2006). 최근에는 PCR이 결합온도에 따라 교차반응을 일으키는 단점을 보완하기 위해 2 가지 이상의 유전자를 대상으로 각각의 종-특이 PCR 프라이머를 개발하기도 한다(Kim *et al.*, 2005). 특히, 16S rDNA를 바탕으로 설계된 PCR 프라이머들은 *P. intermedia*와 유전학적 측면에서 가장 가까운 *P. nigrescens*의 임상 분리 균주들의 지놈 DNA도 비특이적으로 검출됨이 보고된 바 있다(Siqueir *et al.*, 2002). 이러한 이유로 본 연구는 *P. intermedia*의 종-특이 DNA라 보고된 Pig27의 핵산염기서열을 바탕으로 종-특이 PCR 프라이머 쌍을 개발하기 위하여 시행되었다. 본 연구 결과 두 가지 프라이머 쌍(Pig27-F2/Pig27-R2 및 Pig27-F5/Pig27-R5)이 *P. intermedia*에 대한 종-특이성이 있었으며 각각은 세균의 100마리 또는 1000마리에 해당하는 0.4 pg 및 4 pg의 지놈 DNA를 검출 할 수 있는 감수성을 가짐을 알 수 있었다. 그러므로 본 연구에서 개발된 두 가지 PCR 프라이머는 기존에 개발된 *P. intermedia*의 종-특이 PCR 프라이머 쌍들과 더불어 구강 내 감염성 병소에서 *P. intermedia*를 검출하는 데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서 사용된 PCR법에 의한 감수성 검사는 정확한 방법은 되지 않는다. 그래서 이러한 방법은 semiquantitative 법이라 할 수 있다. 최근에는 치면세균막에 존재하는 세균의 수 및 특정 세균 종의 수를 비교적 정확하게 정량할 수 있는 quantitative real-time PCR(qRT-PCR) 법이 개발되었다(Greiner *et al.*, 2001; Nagashima *et al.*, 2005). qRT-PCR 법도 기존의 PCR법과 같이 특정 유전자의 핵산염기서열을 바탕으로 프라이머를 개발하는 것은 같다. 프라이머의 설계에 있어서 기존의 PCR법보다는 PCR 증폭물의 크기가 제한적이며, 방법에 따라 두 개의 프라이머 사이에 종-특이적인 프로브를 설계해야하는 까다로움은 있지만, 실시간으로 증폭되는 PCR 산물을 검출할 수 있기 때문에 이를 바탕으로 시료에 존재하는 세균의 수를 측정할 수 있다 장점이 있기 때문에 현재 qRT-PCR법을 많은 연구자들이 선호하는 방법이다. 이러한 qRT-PCR의 표적 유전자도 현재로써는 16S rDNA를 가장 많이 사용하고 있지만 16S rDNA의 염기서열이 비교적 짧아 제한적이기 때문에 다른 표적 유전자를 찾아야 할 것으로 생각된다. 그러므로 차후에 본 연구에서 사용된 Pig27 DNA 프로브의 핵산염기서열을 이용하여 qRT-PCR 프라이머를 개발하는 일을 시행할 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 연구결과를 종합할 때, Pig27-F2/Pig27-R2 및 Pig27-F5/Pig27-R5 PCR 프라이머 쌍들은 *P. intermedia*를 종-특이적으로 검출할 수 있는 구강세균 진단키트 개발에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 *P. intermedia* 종을 특이적으로 검출할 수 있는 Pig27 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 *P. intermedia*에 대한 종-특이 PCR 프라이머를 개발하기 위하여 시행하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Pig27-F2/Pig27-R2과 Pig27-F5/Pig27-R5 프라이머 쌍들은 *P. intermedia* ATCC 25611^T 및 *P. intermedia* 임상균주의 지놈 DNA를 종-특이적으로 검출하였다.
2. 이들 PCR 프라이머 2쌍들이 검출할 수 있는 최소한의 *P. intermedia* ATCC 25611^T 지놈 DNA양은 Pig27-F2/Pig-R2는 0.4pg, PigF5/Pig-R5는 4pg 이었다.

이상의 연구결과를 종합할 때, Pig27-F2/Pig27-R2 및 Pig27-F5/Pig27-R5 PCR 프라이머들은 *P. intermedia*를 종-특이적으로 검출할 수 있는 구강세균 진단키트 개발에 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 극소량의 *P. intermedia*를 검출이 가능할 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

Kook JK, Sakamoto T, Nishi K, Kim MK, Seong JH, Son YN, Kim DK. 2005. 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.* 49, 9-16. Erratum in: *Microbiol Immunol.* 2005;49, 295.

Krieg, NR. 2001. Identification of Procaryotes. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Garrity, G. ED), Vol. 1, second ed., pp33-38. Springer Verlag, New York.

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.

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.

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.

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.

Okamoto, M., Maeda, N., Kondo, K. and Leung, K.P. 1999 Hemolytic and hemagglutinating activities of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *FEMS Microbiol Lett.* **178**:299-304,

Papapanou, P.N., A.M. Neiderud, A. Papadimitriou, J. Sandros, and G. Dahlen. 2000. "Checkerboard" assessments of periodontal microbiota and serum antibody responses: a case-control study. *J. Periodontol.* 71, 885-897.

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.

Silva TA, Rodrigues PH, Ribeiro RN, Noronha FS, Farias Lde M, Carvalho MA. 2003 Hemolytic activity of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* strains: influence of abiotic factors in solid and liquid assays. *Res Microbiol.* 154, 29-35.

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.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 25, 134-44.

Stubbs S, Lewis MA, Waddington RJ, Embery G. 1996. Hydrolytic and depolymerising enzyme activity of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Dis.* 2, 272-8.

(국문초록)

DNA 프로브 Pig27 핵산염기서열을 기반으로 한 *Prevotella intermedia*의 검출을 위한 PCR 프라이머의 개발

황 경 환

조선대학교 대학원 치의학과

(지도교수: 국 중 기)

최근의 연구에서 IDBH법과 Southern blot hybridization법에 의해 *Prevotella intermedia*(*P. intermedia*)를 종-특이적으로 검출할 수 있는 Pig27 DNA 프로브가 보고되었다. 본 연구는 Pig27 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 하여 *P. intermedia* 균주들을 종-특이적으로 검출할 수 있는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 프라이머를 개발하고자 시행되었다.

Pig27 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 PCR 프라이머를 설계하였고, 프라이머의 종-특이성을 검증하기 위하여 임상에서 분리된 *P. intermedia* 6 균주와 *P. nigrescens* 10 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 10배씩 희석한 PCR 주형으로 사용하였다.

PCR 프라이머 Pig27-F2/Pig27-R2 쌍 및 Pig27-F5/Pig27-R5 쌍들은 본 연구에서 사용된 모든 *P. intermedia* 균주들을 종-특이적으로 검출하였다. 프라이머 각각에 대한 *P. intermedia* ATCC 25611^T 지놈 DNA량의 검출 한계를 알아보기 위한 민감도 실험결과, 2 가지 프라이머는 각각 0.4pg 또는 4pg까지 검출 가능하였다.

이상의 연구결과를 종합할 때, Pig27-F2/Pig27-R2 및 Pig27-F5/Pig27-R5 PCR 프라이머쌍들은 *P. intermedia*를 종-특이적으로 검출할 수 있는 구강세균 진단키트 개발에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.