

중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)을 이용한 *Porphyromonas endodontalis*의 동정에 대한 연구

서울대학교 치과대학 치과보존학교실

이상엽 · 윤수한

Abstract

IDENTIFICATION OF *PORPHYROMONAS ENDODONTALIS* USING POLYMERASE CHAIN REACTION(RCR)

Sang-Yup Lee, Soo-Han Yoon

Dept. of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Seoul National University

Porphyromonas endodontalis, an anaerobic Gram negative cocobacillus which was known to be associated with the infected root canals and periapical lesions, is very difficult to culture and to detect by the traditional method in that it requires much time to induce the specific black pigmentation, and it is very sensitive to oxygen and the antibiotics added in the culture medium.

In this study, the nucleotide sequences of the 'probe h' (0.73kb), one of the specific DNA probes to *P. endodontalis* (ATCC 35406) which had been developed by our department, was determined and then a pair of primers for PCR amplification was fabricated to identify *P. endodontalis*.

The plasmids containing 'probe h' were purified by Wizard™ Midipreps DNA Purification System (Promega Corp.), and the nucleotide sequences of the 'probe h' were determined by the dideoxy chain termination method using TaqTrack Sequencing System (Promega Corp.) and detected by fluorescent labelling method. The sense/antisense PCR primers were designed with computer software (Lasergene, DNASTAR Inc.). PCR was done with a programmable GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer-Cetus Co.). Each sample containing the whole genomic DNA of *P. endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* was itaily denatured at 94°C for 5 min and then subjected to 30 cycles, each of them consisting of 60s at 94°C, 60s at 60°C, and 90s at 72°C. The amplified DNA was resolved electrophoretically in a 1.0% agarose gel in 1X TAE buffer, stained with EtBr, and photogra-

※ 본 논문은 1997년도 서울대학교병원 지정진료연구비 지원에 이루어진 것임.

phed on a UV transilluminator.

The results were as follows :

1. The nucleotide sequences of 'probe h' (743 base pairs) were obtained by dideoxy chain termination method, and from that results the specific primers to *P. endodontalis* (ATCC 35406), 'Primer H1/ Primer H2', were designed.
2. It has been found that 'Primer H1/H2' could detect *P. endodontalis* (ATCC 35406) using PCR.
3. The PCR system with this primers may be a powerful technique to amplify the specific sequences of 'probe h' of *P. endodontalis* (ATCC 35406) that produce distinct identification of it from other black-pigmented *Bacteroides*, and this could help us to determine the nature of periapical disease.

Key words : *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406, probe h, dideoxy chain termination method, sense/antisense PCR primers, Primer H1/ Primer H2

I. 서 론

미생물은 치수 및 치근단 질환의 발병과 진행에 있어서 주요한 원인 인자로, 많은 연구자들에 의해 그 역할이 점차 중요시 되어왔으며^{1,2,3)}, 최근들어 혐기성 세균의 배양기술이 발전함에 따라 혐기성 세균에 대한 연구가 증대되고 있다^{4,5,6)}. 이들 혐기성 세균 중 하나인 Black-pigmented *Bacteroides* (BPBs)는 구강내 감염과 관련이 있다고 알려져 있다⁷⁾. 1985년 Winkelhoff등은 감염근관 및 치근단 농양에서 조사한 표본의 90% 이상에서 *B. endodontalis*를 분리해 낼 수 있었고, *B. intermedius*는 감염된 치수강으로부터 가장 흔하게 분리되는 BPB라고 하였으며, *B. gingivalis* 역시 치근단 농양과 관련되어 나타난다고 하였다^{7,15)}.

지난 15년 동안 최신의 생화학적, 화학적 방법에 의해 *Bacteroides melaninogenicus*등은 여러 개의 새로운 종으로 나누어지게 되어 세균 분류학에서 각 균종의 역할을 좀 더 잘 평가할 수 있게 되었다^{8,9)}. 즉, asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides*인 *B. asaccharolyticus*, *B. gingivalis* 및 *B. endodontalis*는 처음에는 *B. melaninogenicus* subsp. *asaccharolyticus*로 여겨졌

으나, 구강내에서 이들 미생물의 임상적 중요성이 인식되면서 광범위한 분류학적 연구가 진행되어 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)에 의한 polypeptide pattern과 DNA-DNA hybridization data를 통한 DNA 염기 조성 및 enzyme polymorphism에 관한 연구에 의해서 이들 사이의 이질성이 밝혀지게 되었다. 그 결과 *B. asaccharolyticus*, *B. gingivalis* 및 *B. endodontalis*는 *Bacteroides* 균종의 type species인 *B. fragilis*와는 매우 다른 생화학적, 화학적 성질을 가지는 *Porphyromonas*라는 새로운 균속으로 독립하게 되었다. *Porphyromonas* 속의 세 가지 균속은 G+C(Guanine + Cytosine) contents와 전기영동상에서의 malate dehydrogenase의 mobility 정도 및 menadione의 필요성에 따라 구분 가능하다¹⁰⁾. 이들 세균 중 치근단 질환에서만 특이하게 검출되는 *P. endodontalis*는 capsule membrane의 차이로 세 가지 혈청형, 즉 O₁K₁ (HG 370), O₁K₂ (HG 182), O₁K⁻ (HG 181)로 나뉜다¹¹⁾. 이들이 각각 서로 다른 pathologic potential을 가지고 있는지는 명확하지 않으나, Winkelhoff등¹²⁾에 의하면 *P. endodontalis*의 다른 혈청형은 capsule 구조의 존재에 기인한 병원성

(pathogenicity)과 세균독성(virulence)의 차이와 관련이 있을 것이라고 하였다.

Black-pigmented *Bacteroides*의 발현빈도에 관한 연구를 살펴보면, Haapasalo 등¹³⁾은 임상 증상이 있는 경우에는 54%, 임상증상이 없는 경우에는 44%의 발현빈도를 보인다고 하였으며, Sundqvist¹⁴⁾는 급성 환자의 73%에서, Winkelhoff 등¹⁵⁾은 치근단 농양의 90% 이상에서 발견되었다고 하여, 50%에서 90%까지의 발현 빈도를 보이는 것으로 나타났다. 1992년 Hashioka 등¹⁶⁾도 자발통과 타진반응 및 근관내 악취를 보이는 근관에서 *Porphyromonas*와 *Prevotella*가 특징적으로 많이 나타난다고 보고한 바 있다¹⁷⁾.

*Porphyromonas*는 산소에 매우 민감한 절대적 혐기성 세균인데 이중 *P. endodontalis*는 *P. gingivalis*에 비해 black pigment가 나타나는데 소요되는 시간이 더 길고, 배지에서의 doubling time이 6-10시간으로 *P. gingivalis*의 2-3배이며, 산소에 대해 더욱 민감하다^{18,19)}. 또한 배지에 들어가는 vancomycin이나 kanamycin에 매우 민감하고 신선한 배지에서 잘 자란다^{11,20)}. 따라서 *P. endodontalis*는 배양이 몹시 까다롭고 다른 세균과 섞여 있을 경우 순수 분리가 힘들어 최근에 이르러 발견된 세균이다²¹⁾. 또한 같은 종인 *P. gingivalis*나 *P. asaccharolytica*와 생리적으로 비슷하여 배양 후의 생화학적 검사만으로는 동정이 힘들다¹¹⁾.

최근에 본 교실에서는 혐기성 배양법, 간접 면역형광법, 제한효소절편분석법 등을 이용하여 환자의 치근단 병소로부터 *P. endodontalis*를 배양 분리하는 데 성공하였으며, DNA 프로브법을 이용하여 *P. endodontalis*에 특이하게 반응하는 3종의 DNA 프로브를 제작하였다²²⁾. 하지만 이러한 방법은 혐기성 세균 배양과정을 거쳐야 하기 때문에 많은 시간 소요와 노동력 및 경제력을 필요로 한다. 그러므로 까다로운 혐기성 세균 배양과정을 거치지 않고도 민감하고 특이하며 신속하고 또한 용이하게 혐기성 세균을 동정할 수 있는 방법의 개발이 감염근관과 치근단 병소와 관련된 병원성 미생물을 밝히는데 필수적이다. 중합효소연쇄반응(Poly-

merase chain reaction ; PCR)은 민감도와 신속성이 우수한 방법으로, 본 연구에서는 이를 이용하여 *P. endodontalis*를 동정할 수 있는 방법을 개발하고자 한다. 이를 위해서 먼저 본 교실에서 제작한, *P. endodontalis* ATCC 35406에 특이하게 반응하는 DNA 프로브인, 'probe h' (0.9 kbp)의 DNA 염기서열을 분석하고, 이를 바탕으로 *P. endodontalis* ATCC 35406에 대한 특이 primer (specific primer)를 고안 및 제작하여 이를 *P. endodontalis* 및 여러 가지 Black-pigmented *Bacteroides*의 표준균주에서 추출한 지놈 DNA와 중합효소연쇄반응을 시행하여 그 특이성 (specificity)을 알아보려 한다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 세균 및 배양

본 실험에 사용한 세균은 표 1과 같다.

혐기성세균은 5 µ/ml hemin과 0.5 µml Vit. K를 첨가한 BHI (Brain Heart Infusion) broth (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.)에 접종하여, 80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂가 든 37°C 혐기성 배양기 (Coy anaerobic chamber M.I., U.S.A.)에서 2~3일 동안 배양하였다.

2. Whole-genomic DNA의 추출

Whole-genomic DNA는 배양액 1.5 ml를 소형원심분리기에서 2분간 원심분리하여 세균 pellet을 얻고 이를 Tris-EDTA (TE) 완충액 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) 567 µl, 10% SDS 30 µl, protease K (20 mg/ml) 3 µl에 다시 현탁하였다. 이를 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 5 M NaCl 100 µl를 첨가하여 잘 섞고 hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)/NaCl 용액(10% CTAB을 포함한 0.7 M NaCl) 80 µl를 첨가 후 다시 잘 섞고 65°C에서 10분간 배양하였다. 이를 동량의 chloroform/isoamylalcohol (24 : 1)과 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25 : 24 : 1)로 순서대로 추출하였다. 상층의 DNA 수용액을 취하여 새 시험관에 옮기고 0.6배 용량의 isopropanol을

첨가하여 추출된 세균의 whole-genomic DNA를 침전시킨 후 70% 에타놀로 침전 DNA를 씻고 냉동 건조하였다. 건조된 DNA를 TE 완충액 100 μ l에 용해하여 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

3. DNA 농도 측정

추출한 DNA는 UV-Spectrophotometer (BECKMAN, U.S.A.)를 이용하여 260 nm 및 280 nm에서 그 농도 및 순수도를 측정하였다.

4. 플라스미드 ('probe h')의 추출

'probe h'를 함유한 플라스미드는 alkaline lysis 법을 이용하여 추출하였으며 (Sambrook *et al.*, 1989), Wizard™ Midiprep DNA purification system (Promega Corp., U.S.A.)을 이용하여 정제하였다.

5. 유전자 염기서열 분석 및 PCR primer 고안

'probe h'를 함유한 플라스미드는 alkali denaturation method를 이용하여 single stranded DNA로 전환하였다 (Sambrook *et al.*, 1989).

'probe h'의 DNA 염기서열은 다음과 같이 통상의 dideoxy-chain termination 방법으로

결정하였다. 정제된 template DNA 3~5 μ g이 들어있는 작은 플라스크 원심 분리관 (0.5 ml)에 pUC/M13 reverse primer와 pUC/M13 forward primer (0.5 pmol/ml) 1 μ l와 반응 완충액 (5X concentrate; 200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 250 mM NaCl) 2 μ l를 가한 다음, 최종적으로 혼합액의 양이 10 μ l가 되도록 증류수로 조절하였다. 이를 65°C에서 2분간 가열하고, 15~30분에 걸쳐 35°C 이하까지 서서히 식혀서 annealing하였다. 이 template-primer를 잠시 원심분리하여 용액 튜브 바닥에 모으고, 얼음 위에서 식힌 다음, DNA 합성을 두 단계로 나누어 진행하였다. 첫 단계는 방사능 표지 단계로서, 위의 template-primer에 0.1 M dithiothreitol (DTT) 1.0 μ l, dNTP 혼합용액 (각 1.5 mM의 dGTP, dCTP, dATP, dTTP) 2.0 μ l, [α -³⁵S]dATP (specific activity >1000 Ci/mole) 0.5 μ l를 가하고 마지막으로 Sequenase (1.6 unit/ml)를 2.0 μ l 가하였다. 이를 잘 섞고 실온에서 2~5분간 반응시킨 후, 각 8 mM의 ddGTP, ddATP, ddCTP, 혹은 ddCTP를 함유한 termination mixture (각 80 mM의 dGTP, dATP, dCTP, 및 dTTP와 50 mM NaCl을 공통적으로 포함)를 2.5 μ l가 들어 있는

Table 1. Bacterial strains used in this study.

| Strain | Source / Reference | Serotype |
|--|--------------------|-------------------------------|
| <i>Porphyromonas endodontalis</i> | | |
| 35406 | ATCC | O ₁ K ₁ |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | | |
| 381 | Forsyth | a |
| W 50 | ND* | b |
| A7A1-28 | SUNYab | c |
| <i>Prevotella intermedia</i> | | |
| 9336 | NCTC | b |
| G8-9K-3 | SUNYab | c |
| <i>Actinomyces actinomycetemcomitans</i> | | |
| Y4 | Forsyth | b |
| 75 | SUNYab | a |
| 67 | SUNYab | c |

ND* : not determined

네 가지 튜브에 3.5 μl 씩 넣은 후, 37°C에서 3~5분간 계속해서 반응시켰다. 반응시간이 지난 후 반응 정지액 (95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05 xylene cyanol FF) 4 μl 를 각 튜브에 가하고 잘 섞은 후 전기영동할 때까지 얼음 위에 놓아두었다.

전기영동에는 8% acrylamide/bis-acrylamide (19:1), 8.3 M urea, 1X TBE (0.089 M Tris base, 0.089 M boric acid, 및 0.002 M EDTA)의 조성을 갖는 젤과 LKB 2010 Macro-phor sequencing system 및 LKB 2297 power supply (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden)를 이용하였다. 젤은 상부가 0.2 mm, 하부가 0.7 mm인 wedge-shape gradient gel로서 길이는 53cm이었다. 전기영동 하루 전에 casting된 젤을 thermostatic plate에 부착하고 thermostatic plate를 순환 수조를 이용하여 20분간 55°C로 가열하면서, 젤로부터 이온화된 물질을 제거하기 위하여 1500V에서 5분간 pre-run한 후, bromophenol blue가 젤 밖으로 빠져나갈 때까지 2500V로 전기영동하였다.

전기영동이 끝난 후 젤을 5% acetic acid, 15% 메타놀 조성의 용액에 약 45분간 담구어 urea를 제거하고, 3MM 용지 (Whatman, Maidstone, England)에 옮긴 후, slab gel dryer (DrygelSr; Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, California, U.S.A.)를 이용하여 75°C에서 2시간 건조하였다. 3MM 용지 위에 건조된 젤을 Biomax MR 필름 (Eastman Kodak Company, Rochester, New York, U.S.A.)에 밀착시켜서 하룻밤 동안 자기방사법을 시행한 후, 필름을 현상하여 DNA 염기서열의 자기방사선 사진을 얻어 이를 분석하였다.

PCR primers의 설계는 computer software (Lasergene, DNASTAR Inc., U.S.A.)를 이용하여 제작하였다.

6. 중합효소연쇄반응 (PCR)

설계된 PCR primers는 표 3과 같고, 이는 TaKaRa사 (Japan)에 의뢰하여 제작하였다.

PCR은 GeneAmp PCR System 2400 (Perkin

Elmer-Cetus Co., U.S.A.)을 이용하여 시행하였다. 2cc Eppendorf tube에 10X PCR buffer 8 μl , 200 μM dNTP mixture (dATP, dGTP, dCTP, 및 dTTP) 8 μl , 1 μl sense/antisense primer 20 pM, 10 ng template DNA 5 μl , 2.5U Ex Taq DNA polymerase 0.5 μl 를 넣고, 이곳에 최종 용량이 100 μl 가 되게 멸균된 증류수를 넣어 반응시켰으며 모든 반응은 얼음 위에서 시행했다. PCR condition은 Taq을 제외한 reaction mixture를 94°C에 5분 두어 primer와 template간의 nonspecific binding을 최소화하는 Hot start법을 사용하였고 표 2와 같이 30 주기로 시행하였으며 PCR 산물은 4°C에서 보관하였다.

PCR 산물은 전기영동으로 horizontal gel apparatus (Hoefer, California, U.S.A.)를 이용하여 agarose를 TAE 완충액에 용해시켜 0.7% 용액으로 만들어 사용하였으며, size marker로는 bacteriophage의 λ DNA를 EcoR I 과 Hind III로 소화한 절편 (Boehringer Mannheim, 558552, Germany)을 사용하였다. 전기영동은 TAE 완충액에서 30V로 2시간동안 시행하였으며, 전기영동 후 증류수에 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ethidium bromide (EtBr)를 넣어 30분간 염색 후 증류수로 탈색시키고 UV transilluminator (LKB, Uppsala, Sweden)에서 polaroid 667 film을 polaroid camera (SL - 5 GD - Photographic System, Seoul, Korea)에 장착하여 촬영하였다.

III. 실험결과

1. 'probe h'의 유전자 염기 서열 결정 및 PCR primers의 제작

프로브의 유전자 염기 서열은 그림 1과 같다. 그 결과 743 bps의 유전자 염기 서열을 보이고 있으며, 이를 토대로 computer software (Lasergene, DNASTAR Inc., U.S.A.)를 이용하여 중합효소연쇄반응을 위한 24-mer로 구성된 *P. endodontalis* ATCC 35406의 특이 primer인 'Primer H1'과 'Primer H2' (표 3)를 amplicon이 약 0.5 kbp가 되게 설계하였다.

Table 2. The PCR condition used in this study

| Cycle | Denaturation | Annealing | Polymerization |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| First cycle | 5 min. at 94°C | 30 sec. at 60°C | 2.5 min. at 72°C |
| Subsequent cycles (29 cycles) | 30 sec. at 94°C | 30 sec. at 60°C | 2.5 min. at 72°C |

Table 3. The Primers designed from the nucleotide sequences of 'probe h'.

| primer name | nucleotides sequences |
|------------------------------|------------------------------------|
| Primer H1 (sense primer) | 5' --CTAAATAAAACGCCCTTGATAAC --3' |
| Primer H2 (antisense primer) | 5' --TTCTAGGCTTCCATTGTCCCAGTC --3' |

2. 중합효소연쇄반응

중합효소연쇄반응 결과는 그림 2, 3과 같다. 그림 2에서 Lane 1은 negative control로 증류수를 사용하였고, Lane 2는 plasmid인 'probe h'를 positive control로 사용한 것이며, Lane 3은 *P. endodontalis* ATCC 35406의 whole genomic DNA를 사용한 것이다. positive control과 같은 위치에서 (약 0.5 kbp) 밴드 상이 나타남을 보인다. 그림 3은 여러 가지 Black-pigmented *Bacteroides*의 표준균주 (표 1)에서 추출한 지놈 DNA와 'Primer H1/H2'를 반응시킨 결과를 보이며 특이하게 *P. endodontalis* (Lane 1)만을 증폭함을 보였으나 다른 균주에서는 전혀 증폭되지 않음을 보인다.

IV. 총괄 및 고안

현재까지 근관감염이나 치근단 병소의 병원성 미생물에 대한 연구는 대부분 배양(culture)에 의해 이루어 졌으나 근관내에서 주로 나타나는 혐기성 세균을 배양하는 것은 시간 소모와 노력이 많이 들며 배양 방법에 따라 다른 결과를 초래하기도 한다. 특히, 전형적으로 산소에 매우 취약한 혐기성 또는 호탄산가스성 세균은 짧은 시간 동안만이라도 산소에 노출되면 곧 죽게 된다. 이러한 세균들은 철저한 혐기적 배양법에 의하여 동정 분류되어 왔고 많은 부분이 세균

배양에 의존되었지만 이러한 방법들을 통상적인 환자 진단에 이용하기에는 많은 제약이 있다. 환자의 진단에 이용하기 위해서는 치료실에서 채취한 시료를 일단 실험실까지 수송해야 하는데 그 동안 세균이 수초이상 산소에 노출되지 않도록 주의해야 한다. 비록 이러한 혐기성 세균을 무산소 상태로 수송할 수 있도록 적절한 배지가 고안되어 있긴 하지만, 수송 도중의 온도변화나 그 외 여러 원인에 의해 세균이 죽을 수 있다. 이 세균들 중 많은 것들은 아주 까다로운 영양조건을 갖고 있어서 더욱 복잡한 조성의 배지를 필요로 한다. 또한 여러 세균을 동정하기 위하여 이용하는 선택 배지 및 생화학적 검사에는 많은 비용과 시간이 소모된다^{18, 23, 24)}.

PCR은 혼합 감염으로 여겨지는 치수 및 치근단 질환에서 여러 가지 병원균을 복잡한 배양과정 없이도 동정이 가능하며, 또한 이들 세균이 발병을 일으키는 독소를 발현하는 유전자를 클로닝한 경우에 있어, 이들 유전자 염기열을 동정할 수 있는 특이 primer를 제작함으로써 치수 및 치근단 병변의 진단과 성질을 밝히는데 큰 역할을 할 수 있으리라 사료된다. 지금까지 PCR을 이용하여 미생물을 동정 검출한 연구에 대하여 알아보면, Watanabe²⁵⁾은 *P. gingivalis*의 fimbrial gene에 대한 특이 primer를 제작하여 이를 PCR로 증폭한 후, 4명의 진행성

50

5'—*GAATT* CCCAG AACGC CTTCT CGGAG GGAAA AGGCT TAAAA AGCTA TCCTC
 100
 AGTCA ATATA TCCTA TTGCT CTATT GGTAT GGATG AGTTG CCTGA TCTAA
 150
ATAAA ACGCC CTTTG ATAAC TTCAA AATTG GTGGA ATGTA TTGGC ACTAT
 200
 GTTGG AGCTG GACGT GCCAG TGGGC TATCA GTAAA TTTCA AAAAC ATCAA
 250
 AAGAG TGAAA GGGAT CTCTG CAATT CCTGT GGAAA CTAAG TTTAC TTGGT
 300
 ACCAA AAAGT AAATG ACAAT TGGGA AGAAC TCCCC CTAGA CAATA CCAAG
 350
 GTGAC AGAGA AGGAT GGGGT ATTTA CATTT GCCCC CTCTA TTCTC AGGAA
 400
 TGGTA CAGCC CTCCG TACGC TGTA AATTG AAAGT GCTGC TTATC CTGAT
 450
 CTTGC TGGAG ATGAC GAGAT GGGGC TTTTC ACCTA CAATA TGGTT CTCTC
 500
 AAATC TTATT ATCAA ACTTG AACAT CCCCA ACTCC TTGCC GAGCT AACTG
 550
 TTACT GAAGA GTCAA TTGGC AAAGA TGAAA ACAAC GAAGA GTTGA CAGAC
 600
 TTCAA CATGA TGATG CAGAT TAAAG GAACC CTTAA TAGCA ATATT GGGAT
 650
TGACT GGGAC AATGG AAGCC TAGAA GAACT CACCA TAACC TCCAC AGAGA
 700
 CACAG CGGGT GAGTT CTACA GTTGC ACTGG GGAGT GTGGT GCGTA TCTAC
 743
 GTCTA TGGGA GTGGA GCTAT TACCT TCTAG ATGCT TAGAA *TTC*—3'

Fig. 1. Nucleotides sequences of 'probe h' (the specific probe to *P. endodontalis* ATCC 35406). The 743 base pairs of nucleotides were obtained. The underlined portions are the template of sense/antisense PCR primers respectively designed from this data. Both end of the sequences (in italics) indicate the *EcoR* I sites.

치주염 환자와 2명의 사춘기전 치주염 환자로 부터 치은연하 치태를 채취하여 세균 배양과 PCR을 시행하였는데 그 결과 배양으로 동정이 안된 군에서도 PCR으로는 동정이 가능했다고 보고하였다. Wahlfors²⁶⁾은 *A. actinomycetem-*

*comitans*와 *P. gingivalis*의 특이 primer를 이용하여 치주염이 있는 환자의 치태 표본으로 부터 동시에 이들 세균을 PCR로 동정하는데 성공하였는데 배양법으로는 *A. actinomycetem-*
*comitans*가 25%, *P. gingivalis*가 42% 검출된

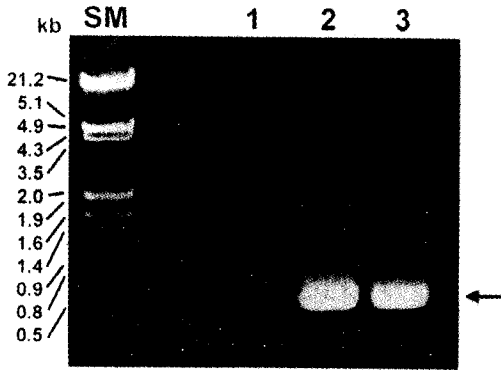


Fig. 2. PCR products using 'Primer H1/H2'. The arrow indicates the specific amplicon (about 0.5 kbp) of *P. endodontalis* ATCC 35406. Lane SM; *EcoR* I and *Hind* III digested - λ DNA size marker, Lane 1; negative control (DDW.), Lane 2; positive control ('probe h') Lane 3; The whole genomic DNA of *P. endodontalis* ATCC 35406.

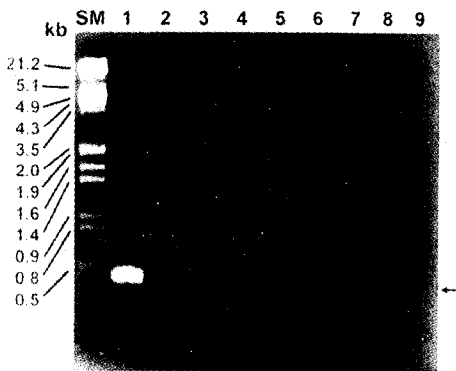


Fig. 3. Running agarose gel with PCR products of various microorganisms. Only *P. endodontalis* ATCC 35406 produced the specific amplicon of 0.5 kbp (the arrow). Lane SM; *EcoR* I and *Hind* III digested - λ DNA size marker, Lane 1; *P. endodontalis* ATCC 35406, Lane 2; *P. gingivalis* 381, Lane 3; *P. gingivalis* W50, Lane 4; *P. gingivalis* A7A1-28, Lane 5; *P. intermedia* 9336, Lane 6; *P. intermedia* G8-9K-3, Lane 7; *A. a* Y4, Lane 8; *A. a* 75, Lane 9; *A. a* 67.

반면, PCR으로는 각각 44%, 56%로 검출되었고, 배양법으로 동정에 성공한 균주는 한 증례를 제외하고 PCR을 이용하여 동정에 성공하였다고 하였다. 또한 Bodinka등²⁷⁾은 *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) collagenase gene (*prtC*-1002bp)의 548 bps fragment의 middle portion을 PCR로 증폭하여 *Porphyromonas gingivalis*와 같은 치주염의 주요 원인균의 virulence factor를 동정함으로써 PCR이 감염성의 역학 연구와 임상 진단에 매우 가치가 있음을 밝혔고, Leys등²⁸⁾은 *A. actinomycetemcomitans*를 배양분리하지 않고 PCR을 이용하여 치태 표본에서 직접 동정하는데 성공하였다.

본 실험에서는 *P. endodontalis* ATCC 35406의 지놈 DNA로부터 클론링한 'probe h'의 DNA 염기서열을 바탕으로 고안된 'Primer H1/H2'로 PCR 시행시 *P. gingivalis*, *P. intermedia*, 및 *A. actinomycetemcomitans*와는 반응을 하지 않고 *P. endodontalis* ATCC 35406에만 특이하게 반응하는 것을 밝혔다. 따라서 이는 치근단 병소에서 *P. endodontalis*를 신속하고 민감하게 동정할 수 있는 좋은 방법으로 사용될 수 있다.

*P. endodontalis*의 특이 PCR primer를 제작하기 위해 우선 *P. endodontalis*가 가지고 있는 특이한 유전자 염기서열을 정의하는 작업으로 *P. endodontalis*의 특이 프로브로 알려진 'probe h' (0.9 kbp)를 이용하여 dideoxy-chain termination 방법으로 염기서열을 분석하였다. 본 실험의 결과 743 base pairs의 염기서열을 얻었다 (그림 1). 이 결과는 예상했던 바와 다르게 약 150 bps정도 적게 나타났는데, 이는 엄등의 연구²²⁾에서 'probe h'의 크기를 결정할 때, 그 크기를 전기영동 상에 나타나는 DNA size marker에 대한 상대적 위치로만 결정할 수밖에 없었기 때문에 이 과정에서 약간의 오차가 있었던 것으로 사료된다.

이번 실험에서 *P. endodontalis* ATCC 35406에 대한 특이 primer의 제작에는 성공하였다. 그러나, 이 primers로 *P. endodontalis*의 다른 혈청형 (serotype b, c)과의 반응을 알아보지 못하였으므로 이에 대한 연구가 더 필요하며, 이 primer의 민감도 (sensitivity)를 알아보기

위해서도 직접 환자에게서 채취한 세균을 이용하여 배양법과의 비교 연구를 해야 할 것으로 사료된다. 실제로 이번 연구에는 포함되어 있지 않지만 그 민감도를 알아보기 위하여 본 교실에서 보관 중인 *P. endodontalis*의 wild type과 반응시켜 본 결과 6개의 표본 중 1개에서만 동일한 결과를 보여 이에 대해서는 앞으로 더 많은 검증 작업이 필요하리라 사료된다. 또한 이 primer의 PCR 조건을 밝히기 위해 annealing 온도를 바꿔가면서 PCR을 시행해 보았는데, 그 결과 60°C에서 가장 특이하게 증폭되는 것을 관찰하였다. annealing 온도를 55°C로 했을 경우에는 *P. endodontalis*의 0.5 kbp의 band 외에 *P. intermedia* G8-9K-3에서도 약 2.5 kbp의 증폭이 있었다. 이는 PCR 조건에서의 annealing 온도가 특이성(specificity)에 매우 중요한 요소임을 시사한다. 이번 연구 결과를 이용하여 치료실에서 진단을 위해 직접 *P. endodontalis*를 동정하는 데는 아직 어려움이 있으리라 사료되며, 앞으로 더 많은 연구와 실험 자료가 필요하리라 여겨진다. 이번 연구에서 비록 'Primer H1/H2'와 다른 혈청형의 표준 균주와의 반응을 알 수는 없었으나, 이 primers로 *P. endodontalis* ATCC 35406를 다른 Black-pigmented *Bacteroides*와 동정 분리하는 것은 가능한 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 치수와 치근단 질환의 주요 원인균으로 알려진 *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406에 특이하게 반응하는 DNA 프로브 'probe h'의 DNA 염기서열을 dideoxy-chain termination 방법으로 분석하여 *Porphyromonas endodontalis*에 특이하게 반응하는 중합효소연쇄반응을 위한 특이 primer를 제작하였고, 이를 여러 가지 Black-pigmented *Bacteroides*의 표준균주에서 추출한 지놈 DNA와 중합효소연쇄반응을 시킨 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406의 특이 프로브 'probe h'의 유전자 염기서열은

743 base pairs였다.

2. *P. endodontalis*의 특정 염기열을 증폭시킬 수 있는 특이 primer인 'Primer H1/H2'를 이용하여 PCR을 시행시 약 0.5 kbp의 amplicon을 생산함으로써 *P. endodontalis* ATCC 35406을 동정할 수 있었다.
3. 'Primer H1/H2'는 다른 Black-pigmented *Bacteroides*에서는 반응되지 않으므로 이 primers는 *P. endodontalis* ATCC 35406에 대해 특이성 (specificity)이 있음을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Kakehashi S., Stanley H. R., Fitzgerald R. J. : The effects of surgical exposure of dental pulp in germ-free and conventional laboratory lab. *Oral Surg.* 20 : 340-349, 1965.
2. Zavistoski J., Van Winkelhoff A. J., Van Steenburgen T. J., Dzing J., Onderdonk A. : Quantitative bacteriology of endodontic infection. *Oral Surg.* 49 : 171-174, 1980.
3. Fukushima H., Yamamoto K., Hirohara K., Sagawa H., Leung K-P. : Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. *J. Endodon.* 16 : 534-538, 1990.
4. Griffe M. B., Patterson S. S., Miller C. H., Kafrawy A. H., Newton C. W. : The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. *Oral Surg.* 50 : 457-461, 1980.
5. Attebery H. R., Kimura J. T., Carroll G. W. : An acute anaerobic infection following endodontic treatment. *J. Endodon.* 6 : 793-795, 1980.
6. Kannagara D. W., Thadepalli H., McQuirter J. L. : Bacteriology and treatment of dental infections. *Oral Surg.* 50 : 103-109, 1980.
7. Van Winkelhoff A. J., Van Steenburgen T.

- J., De Graaff J. : The role of Black-pigmented *Bacteroides* in human oral infection. J. Clin. Periodontol. 15 : 145-155, 1988.
8. Yoshida M., Fukushima H., Yamamoto K., Ogawa K., Toda T., Sagawa H. : Correlation between clinical symptom and microorganisms from root canal of teeth with periapical pathosis. J. Endodon. 13 : 24-28, 1987.
 9. Baumgartener C., Falkler W. A. : Bacteria in the apical 5mm of infected root canals. J. endodon. 17 : 380-383, 1991.
 10. Shah H. D. : Proposal for reclassification of *Bacteroides asac charolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new Genus *Porphyromonas*. Int. J. of Syst. Bacteriol. 38 : 128-131, 1988.
 11. Van Steenburgen T. J., Van Winkelhoff A. J., Mayrand D., Grenier D., De Graaff J. : *Bacteroides endodontalis* sp. nov, and *Asaccharolyticus* Black-pigmented *Bacteriodes* species from infected dental root canals. Int. J. of Syst. Bacteriol. 34 : 118-120, 1984.
 12. Van Winkelhoff A. J., Kippuw N., De Graaff J. : Serotological characterization of Black-pigmented *Bacteroides endodontalis*. Infect. Immun. 51 : 972-974, 1986.
 13. Haapasalo M., Ranta H., Ranta K., Shah H. N. : Black-pigmented *Bacteroides* spp. in human apical periodontitis. Infect. Immun. 53 : 149-153, 1986.
 14. Sundqvist G., Johansson E., Sj gren U. : Prevalence of Black-pigmented *Bacteroides species* in root canal infections. J. Endodon. 15 : 13-19, 1989.
 15. Van Winkelhoff A. J., Carlee A. W., De Graaff J. : *Bacteroides endodontalis* and other Black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. Infect. Immun. 49 : 494-497, 1985.
 16. Hashioka K., Yamasaki M., Nakane A., Hori N., Nakamura H. : The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. J. Endodon. 18 : 558-561, 1992.
 17. Johnson J. L., Holdema L. V. : *Bacteroides intermedius* comb. nov. and description of *B. corporis* sp. nov. and *B. levii* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 33 : 15-25, 1983.
 18. Pantera M. J. : Antigenic studies of oral and nonoral black-pigmented *Bacteroides* strains. Infect. Immun. 39 : 565-574, 1980.
 19. Herweijer J. A. : Characterization of total membrane proteins of *Porphyromonas endodontalis*. J. Endodon. 18 : 620-624, 1992.
 20. Tay F. : Evaluation of non-active DNA probe for detecting *P. gingivalis* in subgingival specimens. Oral Microb. Immun. 7 : 344-348, 1992.
 21. Van Winkelhoff A. J. : Further characterization of *Bacteroides endodontalis*, an asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species from the oral cavity. J. Clinic. Micro. 75-79, 1985.
 22. 엄원석, 윤수한. : 무작위로 클로닝한 *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406 지놈 DNA의 제한절편 hybridization법에 의한 세균동정. 대한치과보존학회지 20 (2) : 645-654, 1995.
 23. Hanazawa S. : Monoclonal antibody against *Porphyromonas (Bacteroides) endodontalis* lipopolysaccharide and application of the antibody for direct identification of the species. J. Clinic. Microbiol. 29 : 2550-2553, 1991.
 24. Sundqvist G. : Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* spp. in human apical periodontitis. Infect. Immun. 53 : 13-19, 1989.
 25. Watanabe K., T. O. Frommel. : Detection of *Porphyromonas gingivalis* in oral plaque samples by use of Polymerase chain reaction. J. Dent. Res. 72 (6) : 1040-1044,

- 1993.
26. Wahlfors J., Meurman J. H. : Simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* by a rapid PCR method. J. Dent. Res. 74(11) : 1796-1801, 1995.
 27. Bodinka A., Schmidt H., Henkel B., Flemmig T. F., Klaiber B., Karch H. : Polymerase chain reaction for the identification of *Porphyromonas gingivalis* collagen genes. Oral Microbiol. Immunol. 9 : 161-165, 1994.
 28. Eugene J. Leys., Ann L., Griffen, Sheryl J., Strong, and Paul A. Fuerst. : Detection and strain identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by Nested PCR. J. Clin. Microbiol. 32 : 1288-1294, 1994.

Fig. 1. Nucleotides sequences of 'probe h' (the specific probe to *P. endodontalis* ATCC 35406). The 743 base pairs of nucleotides were obtained. The underlined portions were the template of sense/antisense PCR primers

respectively designed from this data. Both end of the sequences (in italics) indicate the *EcoR* I sites.

Fig. 2. PCR products using 'Primer H1/H2'. The arrow indicates the specific amplicon (about 0.5 kbp) of *P. endodontalis* ATCC 35406. Lane SM; *EcoR* I and *Hind* III digested - λ DNA size marker, Lane 1; negative control (DDW.), Lane 2; positive control ('probe h') Lane 3; The whole genomic DNA of *P. endodontalis* ATCC 35406.

Fig. 3. Running agarose gel with PCR products of various microorganisms. Only *P. endodontalis* ATCC 35406 produced the specific amplicon of 0.5 kbp (the arrow). Lane SM; *EcoR* I and *Hind* III digested - λ DNA size marker, Lane 1; *P. endodontalis* ATCC 35406, Lane 2; *P. gingivalis* 381, Lane 3; *P. gingivalis* W50, Lane 4; *P. gingivalis* A7A1-28, Lane 5; *P. intermedia* 9336, Lane 6; *P. intermedia* G8-9K-3, Lane 7; *A. a* Y4, Lane 8; *A. a* 75, Lane 9; *A. a* 67.