

16S rDNA sequence에 대한 종특이성 primer를 이용한 중합효소연쇄반응증폭에 의한 *Porphyromonas endodontalis*의 동정에 관한 연구

염승희 · 임성삼 · 배광식
서울대학교 치과대학 치과보존학교실

ABSTRACT

A STUDY ON THE IDENTIFICATION OF *Porphyromonas endodontalis* BY PCR USING SPECIES SPECIFIC PRIMERS FOR THE 16S rDNA

Seung-Hee Eom, D.D.S., M.S.D., Sung-Sam Lim, D.D.S., M.S.D., Ph.D.,
Kwang-Shik Bae, D.D.S., M.S.D., Ph.D.,

Department of Conservative Dentistry, Graduate School, Seoul National University

P. endodontalis which was known to be associated with the infected root canals and periapical lesions is very difficult to detect by culture methods or traditional methods. Detection of bacteria using polymerase chain reaction(PCR) for 16S ribosomal DNA(rDNA) is fast, simple, and accurate with relatively small amount of target cells.

16S rDNA consist of conserved regions those are same to all species, and variable regions which represent species specificity. The 16S rDNA sequences of *P. endodontalis* and *P. gingivalis* were aligned and two highly variable regions were selected as a pair of species specific oligonucleotide primers for *P. endodontalis*. And then the pair of primers for PCR amplification was synthesized to identify *P. endodontalis*. The sequences of the species specific primers for the 16S rDNA of *P. endodontalis* were as follows :

sense primer(endo1): 5'-CTATATTCTTCTTTCTCCGCATGGAGGAGG-3'

antisense primer(endo2): 5'-GCATACCTTCGGTCTCCTCTAGCATAT-3'

In this study, for the identification of *P. endodontalis* without culture from the mixed clinical samples, PCR was done with species specific primers for the 16S rDNA sequences of *P. endodontalis*.

The results were as follows :

1. The species specificity of the primers for the 16S rDNA of *P. endodontalis* was determined by the PCR methods. About 490bp amplicon which was specific only for *P. endodontalis* was produced with *P. endodontalis*. No amplicon was produced by PCR with other strains similar to *P. endodontalis*.
2. The synthesized species specific primers reacted with conventionally identified *P. endodontalis* which we have in conservative dentistry laboratory.
3. The identification of *P. endodontalis* using PCR technique with samples collected from infected root canals or periapical lesions was more sensitive than that of culture methods.
4. Seven samples revealed including *P. endodontalis* by PCR technique. Five of them were related with pains, two of them with sinus tract, three of them with foul odor, and three of them with purulent drainage. *P. endodontalis* was shown to have great relation with pains.

Key Words : Polymerase Chain Reaction(PCR), 16S ribosomal DNA, universal primer, species specific primer

이 논문은 1996년도 서울대학교병원(지정진료)연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

I. 서 론

치근단 질환에서 미생물의 역할에 대해서는 논란이 있어 왔지만, 현재는 근관 감염에 혐기성 세균이 관여한다는 것에 대한 이견은 없다. 이들 혐기성 세균 중에서 black pigmented *Bacteroides* (BPB)와 감염근관과의 관련성은 여러 학자들에 의해 보고되어 왔다¹⁻¹⁰⁾.

BPB는 절대 혐기성 그람 음성균이며, 운동성이 없고, spore를 형성하지 않으며, 형태가 다양한 간구균이다. BPB는 14개의 종이 알려져 있고, 이 중 9개의 종이 사람에서 발견된다. BPB는 과거에는 *Bacteroides melaninogenicus*로 명명되었던 것이 *Bacteroides melaninogenicus subspecies asaccharolyticus*, *Bacteroides melaninogenicus subspecies melaninogenicus*, *Bacteroides melaninogenicus subspecies intermedius*의 3가지 아종으로 나뉘었는데, SDS-PAGE에 의한 polypeptide pattern과 DNA-DNA hybridization data를 통해 G+C content(52-54%)가 상대적으로 높으며, 전기영동상 malate-dehydrogenase(MDH) mobility가 빠른 *B. melaninogenicus subspecies asaccharolyticus*는 *Bacteroides asaccharolyticus*라는 독립된 종으로 분리되었다. 다시 이것과 비교하여 상대적으로 G+C content(46-48%)가 낮고 전기영동상 MDH의 움직임이 느리며, 지질 분석에 의해 13-methyl-tetradecanoic acid가 적고, 9개의 isoprene unit을 가지는 menaquinone이 있는 strain은 *Bacteroides gingivalis*로 분리하여 명명되었다. *Bacteroides endodontalis* (현재 *Porphyromonas endodontalis*)는 주로 근관내 감염에 나타나는 절대혐기성 세균으로 산소에 매우 민감하며 G+C content는 50~51%로 형태 유형으로는 *Bacteroides asaccharolyticus*(현재 *Porphyromonas asaccharolytica*)와 가장 유사하고 전기영동상 MDH mobility가 가장 빠르며, 1984년 Winkelhoff에 의해 발견되었다¹¹⁾. *Cytophaga flavobacter bacteroides* 문의 5개 subgroup중 하나인 *Bacteroides* subgroup에는 *Prevotella*, *Bacteroides*, *Porphyromonas* 등 3가지의 cluster(Genus)가 있다. 생화학적, 화학적으로 Genus *Bacteroides*(*Bacteroides*속)의 표준균주인 *B. fragilis*와는 성질이 다른 당비분해성 BPB인 *Bacteroides melaninogenicus subspecies asaccharolyticus*는 Genus *Porphyromonas* (*Porphyromonas* 속)로¹²⁾, 당분해성 BPB인 *Bacteroides melaninogenicus subspecies melaninogenicus*와 *Bacteroides melaninogenicus subspecies intermedius*는 Genus *Prevotella* (*Prevotella* 속)으로 명명되었다. *Prevotella* 속 중의 일부종이 나타내는 흑색색소는 protoporphyrin이며, *Bacteroides*는 흑색색소를 형성하지 않고, *Porphyromonas* 속의 전부가 나타내는 흑색색소는 protoheme으로 이는 protoporphyrin과 heme으로 이루어진 것이다. 1992

년 Shah는 *P. intermedia* 균주들의 DNA-DNA hybridization과 다양한 biochemical test결과 strain ATCC 25611과 ATCC 33563이 서로 유전적으로 다른 특성을 보이는 등 heterogeneity가 있는 것을 발견하여 strain ATCC 25611은 *Prevotella intermedia*로, strain ATCC 33563을 *Prevotella nigrescens*로 새로 명명하였다¹³⁾.

Sundqvist에 의하면 apical periodontitis가 있는 72개 치아의 30%인 22개에서 1종 이상의 BPB가 검출되었고, 그 중 *B. intermedius*(현재 *Prevotella intermedia*)가 14균주로 가장 많았고, 그 다음은 *B. endodontalis*순으로 발견되었다. BPB관련 22개 치아 중 16개는 급성치조농양이나 화농성 배농과 같은 심한 임상 증상과 관련이 있다고 하였다¹⁴⁾. 배농의 실험에 의하면 감염근관에서 분리된 *P. intermedia*의 다수가 *P. nigrescens*임이 밝혀 졌다^{15, 54)}.

감염성 질환의 진단을 위한 세균의 검출과 동정에는 신속함과 민감도가 중요한 요소이다. 전통적인 세균 동정법에는 생화학, 생리학적 검사법이 있고, 현대적 방법에는 세포 단백질에 대한 polyacrylamide gel electrophoresis¹⁶⁾, multilocus enzyme electrophoresis¹²⁾와, nucleic acid analysis법¹⁷⁾ 등이 있다. 배양이 까다롭고 동정이 힘든 미생물의 종간 이질성을 검사하는 방법으로는 DNA homology법, monoclonal antibody법, DNA probe법^{18, 19)} 등이 이용되었다. 1990년 Dix는 종간 다양성을 보이는 부분의 염기서열을 이용한 probe로 homologous DNA sequence를 가지는 매우 가까운 종간의 구별도 가능함을 보여 주었다²⁰⁾. 1994년 Moncla는 16S ribosomal RNA gene(16S rRNA gene, 16S rDNA)의 hypervariable region에 대한 probe를 이용한 결과 이것이 종특이성이 있음을 밝혔다²¹⁾.

Sample의 채취, 수송 및 배양기간 등 전통적인 배양법이 지닌 문제를 극복하기 위해 이루어진 여러 연구들 역시 시간과 기술적인 제약이 뒤따른다. 이에 비해 중합효소연쇄반응법(Polymerase chain reaction:PCR)은 매우 적은 양의 균만 존재해도 비교적 간단하고 신속하게 균을 동정할 수 있는 장점이 있다. 염기 서열을 증폭시키는데 target DNA, 1쌍의 primer, dNTP, DNA polymerase, 및 적당한 농도의 MgCl₂만이 요구되는 PCR법은 1984년 Kary Mullis에 의해 처음 개발되었다^{22, 23, 24)}.

PCR법을 이용한 연구는 Griffen, Leys, Watanabe등 근래에 와서 많이 이루어 지고 있으나^{25, 26, 27)}, 주로 치주 원인균인 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*나 *Porphyromonas gingivalis*에 대한 것들이 대부분이다. 이에 비해 치근단 감염에 나타나는 *Porphyromonas endodontalis*에 대한 연구는 부족한 실정이다. 또한, 치근단 감염은 polymicrobial mixed infection이므로 특정균의 분리 동정에는 어려움이 더 많다^{28, 29, 30, 31)}. 그렇기 때문에 16S rDNA 염기 서열을 이용한 동정 방법이 각광 받고 있는데, 16S rDNA는

모든 종에서 동일한 conservative region과 종특이성을 보이는 variable region이 있어, 세균의 conservative region에 대한 universal primer를 이용하면 균의 유무를 알 수 있고, variable region에 대한 primer를 이용하면 특정세균의 검출에 이용할 수 있기 때문이다.

따라서, 본 연구에서는 *Porphyromonas endodontalis*의 16S rDNA 염기서열에서 종특이성 primer를 디자인하고 제작하여, 종특이성을 확인하고, 실제 임상 sample에 대한 중합효소연쇄반응법을 시행하여 세균 배양을 통하지 않고 보다 쉽게 *P. endodontalis*를 동정, 규명하여 보고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 임상 sample의 채취 및 세균의 배양.

근관치료를 위해 서울대학교 병원 치과진료부 보존과에 내원한 환자중 항생제를 복용하거나, 근관치료를 받던 중인 사람을 제외한 환자의 37개 sample에서 동통, 치근단 방사선 투과상의 크기, 누공의 유무, 근관내 화농성 삼출액의 유무 등의 임상증상을 기록하고 해당 치아를 rubber dam으로 격리, 3% H₂O₂, 5% iodine으로 1분간씩 소독하고, 5% sodium thio-sulfate로 치면의 iodine을 불활성화 시킨 후, 근관을 개방하고, file또는 paper point를 이용하여 근관내 내용물을 채취하여 prerduced transport fluid(RTF)에 넣어 수송하였다. Abscess의 경우 마취후 chlorhexidine또는 betadine으로 표면을 닦고 멸균 거즈로 건조한 후, 18G needle을 Luer Lock syringe에 장착해 농을 흡인하고 흡입된 공기를 뺀 후, needle cap을 씌워 밀봉하였다.

-70℃의 deep freezer(BioFreezer, Giant star, Hanil science industrial, Korea)에 보관된 표준균주 및 임상에서 채취된 sample에서의 균의 배양은 혐기성 조건(85% N₂, 5% CO₂, 10% H₂)하에서 menadione(10mg/l)과 hemin(5mg/l)을 첨가한 columbia rabbit blood agar를 사용하였고, 37℃의 혐기성 세균배양기(Coy, Model No. 77, Ann Arbor, Michigan, USA)에서 배양하였다. 통상의 생화학적 동정에는 Rapid ID 32A(BioMerieux SA/69280 Marcy-l'Etoile, France)를 사용했다.

배양된 세균은 멸균된 면봉을 이용해서 수확하여 10ml

phosphate buffered saline(PBS:pH 7.0)에 현탁한 후, 원심분리기(Micro 17R, Hanil science industrial, Korea)를 이용하여 5000xg에서 5분 동안 원심분리하여 세균침전물을 얻고, 두 번 더 세척하였다.

2. Primer의 design 및 합성

Internet(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)을 통하여 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 GenBank에서 *P. endodontalis*(accession No. L16491) 및 이와 매우 가까운 종인 *P. gingivalis*(accession No. L16492)의 16S rDNA 염기서열을 얻고 software(GeneWork)를 이용하여 서열을 비교하고, primer로 사용할 종특이성 부위의 서열을 결정하여 sense primer와 antisense primer를 design했다. Design한 primer는 TaKaRa(TaKaRa Shuzo. Co., LTD., Otsu, Shiga, Japan)사에 의뢰, 합성 제작 하였다.

Table1은 균의 유무를 확인하기 위한 universal primer의 서열과 *P. endodontalis*에 대한 sense와 antisense primer의 서열이다. Fig. 1은 제작된 primer를 이용하여 computer software상에서 가상의 PCR을 시행한 결과이다. Amplify software는 선택된 부위의 DNA를 증폭시키는 PCR이나 이와 관련된 실험을 설계, 분석하고 모의실험을 해볼 수 있는 프로그램이다.

3. DNA extraction.

*P. endodontalis*에 대한 종특이성 primer를 검증하기 위해 다섯가지 표준균주(Table 2)와 본 교실에서 분리, 배양된 3개의 *P. endodontalis*균주, 그리고 임상 sample로부터 중합효소연쇄반응에 사용될 DNA를 추출했다.

1 loopful의 순수 계대배양한 표준균주와 1000μl의 RTF에 보관된 sample 100μl를 원심분리하여 얻은 세균 침전물을 각각 PBS로 2회 세척한 후 DNA를 추출하였다. DNA의 추출은 상품화된 QIAamp tissue kit(QIAGEN, Germany)을 사용하여 제조사의 지시에 따라 추출하였다. 표준균주에서 추출된 DNA는 UV spectrophotometer(Beckman, U.S.A.)로 농도를 측정 하였다.

Table 1. The sequences of universal primers for bacteria and species specific primers for *P. endodontalis*

Universal primers for bacteria
sense primer: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
antisense primer: 5'-AGGCCCGGAACGTATTCAC-3'
species specific primers for <i>P. endodontalis</i>
sense(endo1): 5'-CTATATTCTTCTTCTCCGCATGGAGGAGG-3'
antisense (endo2): 5'-GCATACCTTCGGTCTCCTCTAGCATAT-3'

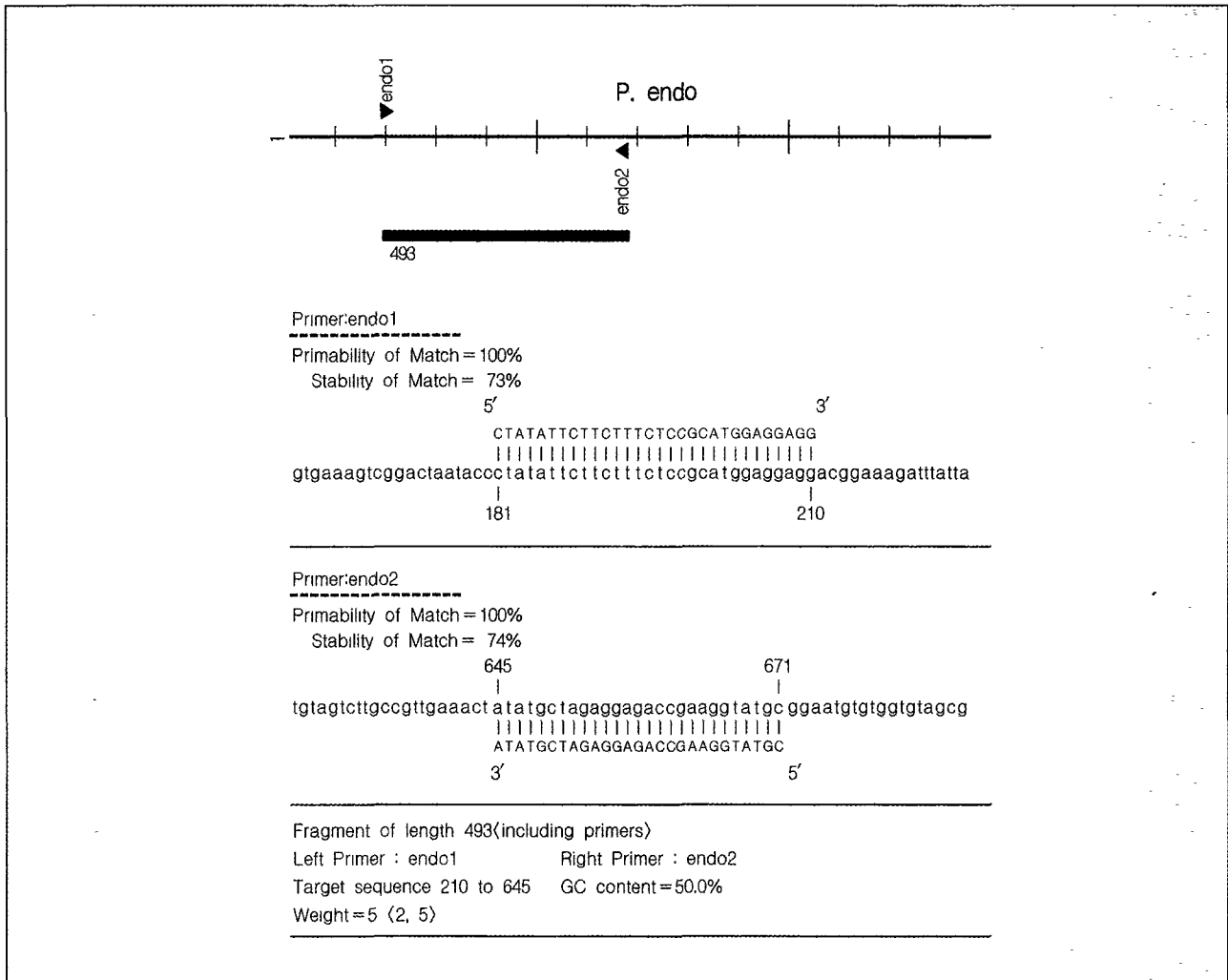


Fig. 1. The results of virtual PCR using species specific primers (endo1 and endo2) for *P. endodontalis* on the Amplify software(v.1.2 β for Macintosh).

endo 1 : species specific sense primer for *P. endodontalis*

endo 2 : species specific antisense primer for *P. endodontalis*

4. primer의 종특이성 검증 및 중합효소연쇄반응

Primer의 종특이성 검증 및 sample 시료에서의 *Porphyromonas endodontalis*의 동정을 위해 중합효소연쇄반응(PCR)을 시행하였다. Sample은 반응성분이 Table 3과 같이 미리 배합된 AccuPower™PCR Premix-Top(Bioneer, Cheongwon, Chungbuk, Korea)을 사용하여 PCR을 시행하였다. Taq polymerase, 10X PCR buffer, MgCl₂, dNTP mixture, 20 pM씩의 sense와 antisense primer 및 target DNA가 포함된 반응액을 PCR machine(GeneAmp PCR system 2400, Perkin Elmer, USA)을 이용하여 94℃에서 5분간 초기 변성시킨 다음, 94℃에서 1분간 변성, 55℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 1분 30초간 extension을 33회 반복

하고, 마지막으로 72℃에서 10분간 더 extension시킨 후 반응을 종료시켰다(Fig. 2). PCR산물은 4℃로 보관하였다.

각각의 PCR product를 ethidium bromide를 첨가한 1.0% agarose gel에 loading하여 80V에서 40분간 전기영동(Electrophoresis power supply-EPS200, Hoefer HE 33, Pharmacia Biotech, California, USA)하고, UV transilluminator(SL-20 Image visualizer, Seolin scientific Co., Ltd., Korea)상에서 특정위치에서 amplicon이 생긴 것을 확인하고 polaroid camera(Seolin Scientific Co., Ltd.)로 촬영하였다. Size marker로는 100bp DNA ladder(Gibco BRL, Life technologies Co. U.S.A.)를 사용하였다.

Table 2. Type strains of 5 species for proving specificity of endo 1 and endo 2 primers

Bacterial strains
<i>Porphyromonas endodontalis</i> ATCC 35406
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611
<i>Prevotella nigrescens</i> ATCC 33563
<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845

ATCC: American Type Culture Collection
(Rockville, MD, U.S.A.)

Table 3. Contents of AccuPower™PCR Premix-Top(Bioneer, Korea)

Reaction size	
20μl	
1U	Taq DNA Polymerase
250uM	Each dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
10mM	Tris-HCl(pH 9.0)
40mM	KCl
1.5mM	MgCl ₂
	Stabilizer and tracking dye

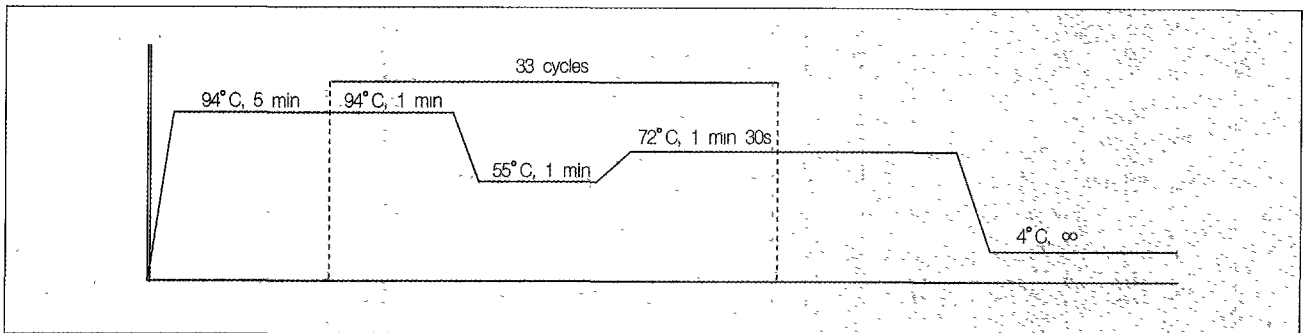


Fig. 2. PCR cycles.

Ⅲ. 실험성적

1. primer의 종특이성 검증

제작된 종특이성 primer를 Table 2의 5가지 종의 표준균주에서 추출한 target DNA에 대해 중합효소연쇄반응을 시행한 결과 *Porphyromonas endodontalis* (ATCC 35406)에서만 약 490bp의 위치에서 증폭이 일어나, 제작된 primer가 *Porphyromonas endodontalis*에만 특이하게 반응하는 primer임이 확인 되었다(Fig. 3). 또한, 본 교실에서 채취하여 통상의 방법으로 배양된 3개의 *P. endodontalis*²⁰⁾와 *P. endodontalis*에 대한 종특이성 primer를 반응시켰을 때 표준균주에서와 같은 위치에서 amplicon이 확인되었다(Fig. 4)

2. mixed sample에서 *P. endodontalis*의 동정

총 37개 mixed sample에서 QIAamp tissue kit을 사용하여 추출한 DNA에 *P. endodontalis*에 대한 종특이성 primer로 중합효소연쇄반응증폭을 시킨 결과, 총 7 sample에서 *P. endodontalis*가 검출되었다(Fig. 5). 생화학적 동정법으로는 한개의 균주가 *P. endodontalis*로 동정되었고 이와 가까운 균주인 *P. gingivalis*와 *P. asaccharolytica*로 동정된 것이 하나씩 있었다. 이 sample들은 PCR에서 *P. endodontalis*로 확

인되어 PCR법이 더 민감도가 높은 것을 알 수 있었다.

세균이 배양된 36개의 sample중 13개 sample에서 16종의 BPB가 배양되었으며, 생화학적 검사 결과 *P. endodontalis*로 동정된 하나의 균주와 *P. endodontalis*와 가까운 세균인 *P. gingivalis*로 동정된 1균주가 PCR에서 *P. endodontalis*로 규명되었다(Fig. 6).

3. 임상증상과의 관계

Table 4에서와 같이 BPB가 검출된 13개의 sample중 누공이 있는 경우는 5개, 약취는 6개, 화농성 배농이 있었던 것은 4개, 동통의 기왕력이 있었던 것은 3개였다. *P. endodontalis*가 검출된 7 sample의 경우에는 동통과 관련된 것이 5개, 누공이 있는 것은 2개, 약취 3개, 화농성 배농이 있었던 것은 3개로 *P. endodontalis*는 동통과 관련이 큰 것으로 나타났다. 전체 sample중 abscess에서 채취된 2개 *P. endodontalis*가 검출되었으며, 다른 BPB도 자랐다.

Ⅳ. 총괄 및 고안

감염근관에서 발견되는 *Bacteroides* subgroup중 *Porphyromonas*와 *Prevotella*의 일부는 혈액 한천 배지에서 갈색이나 검정색의 균집을 형성한다. 세균이 배양되었던 총

Table 4. The relationships between clinical symptoms and the presence of *P. endodontalis* and BPB in infected dental root canals

	sample No.														
	3	4	5*	6	10	13	14*	15	18	21	23	24†	33*	35	37
BPB were cultured	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
<i>P. endodontalis</i> is identified															
by biochemical battery													+		
by PCR using samples			+				+				+	+	+	+	+
Clinical symptoms															
sinus tract					+	+	+	+				+			+
foul odor			+	+		+			+	+			+		
purulent drainage	+							+		+		+			+
pain			+				+	+		+		+	+		
history of pain	+											+	+		

Any samples without BPB or *P. endodontalis* were excluded from this table.

* : samples were aspirated from periapical abscesses.

† : *P. endodontalis* was cultured and confirmed by PCR.

: *P. endodontalis* was cultured and misidentified as *P. gingivalis* by biochemical battery, but identified as *P. endodontalis* by PCR.

36 sample 중 13개(36.1%)에서 16종의 BPB가 자랐으며, 두 종류 이상의 BPB가 동일 배지내에서 나타난 것은 3가지 sample로 *P. endodontalis*와 *P. intermedia*였다. sample에서 직접 PCR을 이용해 *P. endodontalis*가 검출된 것은 7경우(19.4%)로 sample의 PCR에서 *P. endodontalis*의 존재를 알 수 있었다. BPB가 배양된 경우에 *P. endodontalis*로 동정되지 못한 것은 *P. endodontalis*가 자라지 못했거나, 또는 형태가 유사한 많은 BPB colony중 일부 만이 계대배양되었기 때문에 누락되었던 것으로 사료된다.

Paster등은 Cytophaga-flavobacter-Bacteroides(CFB) phylum의 Bacteroides group을 16S rDNA 유전자의 염기서열을 비교 분석하여 계통 발생학적 분류를 하였다. 대표 39 균주의 16S rDNA 염기서열의 95%가 결정되었고, *P. nigrescens* ATCC 33563과 ATCC 25261은 3개의 base만 차이가 있음을 보였다. *Prevotella*의 평균 중간 유사성은 대략 91%정도였으며 16S rDNA 염기서열 비교시 *P. intermedia* (serotype I)와 *P. nigrescens*(serotype II)는 94.7%의 유사성만 보이는 분명히 분리된 종이라 하였다³³⁾.

Porphyromonas cluster의 평균 중간유사성은 약 87%이며, *Porphyromonas*와 *Prevotella*는 약 80%, *Porphyromonas*와 *Bacteroides*간에는 84%의 유사성이 있다고 보고 하였다³³⁾.

본 실험에 사용한 5개종의 표준균주들은 모두 중간 유사성이 매우 가까운 것으로 이들을 분리, 동정하는데는 제약이 따

른다. 특히, *P. endodontalis*는 다른 구강내 세균과는 달리 근관 내에서만 유일하게 발견되는데, 배양시 집락 발현 시간이 7일 이상이며, *P. gingivalis*에 비해 doubling time 또한 2~3배 길며, 산소에 더 민감하여 배양이 매우 까다롭고 순수 분리도 힘들다³⁴⁾. 배당은 leakage model실험에서 *P. endodontalis*는 peptone-yeast extract-glucose broth(PYG)에서는 4일 후부터 turbidity가 나타나며, 14일 이상 viable하며, brain heart infusion broth(BHI)에서는 11간만 viable했고, 2일 후부터 turbidity가 나타났다고 하였다. 또한 bromocresolpurple(bp)PYG, bpBHI에서는 viability가 유지 되지 않았다고 보고하였다³⁵⁾.

Winkelhoff는 *P. endodontalis*를 혈청학적으로 분류하였는데, 열에 안정하고 혈청학적으로 차이를 보이는 capsule의 유무에 따라, capsule이 있는 O:K₁(HG370, HG410, HG421), O:K₂(HG182, HG413)과, capsule이 없는 O:K(HG181)의 3가지 혈청형의 존재를 밝혔다^{11,6)}. 이들은 또한 혈청형에 따른 pathogenicity와 virulence에 차이가 있을 수 있겠으나, 각 혈청형의 병발생능 차이는 분명하지 않다고 하였다. Herweijer는 *P. endodontalis*는 3개의 major protein과 25개의 minor protein을 갖고 있다고 하였고, A,B,C 3개의 major protein은 59, 43, 41, kDa의 molecular mass를 가지며 그 기능은 아직 잘 모르지만, 이 중 하나는 fibrillar structure나 porin structure의 subunit일 것이라 보고하였다. 또한 몇몇 minor protein은 특이하게 서로 다른 성

장 특성을 보인다 하였다. Bacterial virulence factor는 성장 환경에 의해 조절되어 온도, pH, nutrition, 환경변화에 따른 세포막 구조의 변화에 따라 차이가 난다고 하였다³⁷⁾. *P. endodontalis*는 치근단 파괴, 농양의 형성, 치조골의 상실과 심한 급성 염증에 관여하고 있는 것으로 알려져 있으며^{2,38,39,40)}, *P. intermedia*와 cross inhibition 관계에 있다고 Winkelhoff는 보고하였으나⁴¹⁾, Sundqvist는 *P. intermedia*와 같이 한 근관내에 존재하며, 상관관계가 없다고 하였고⁴²⁾, 실험적 monoinfection에서는 virulence가 낮으나 mixed infection에서는 중요한 역할을 하는 것으로 보고 되었다^{28,38)}. Hashioka는 *P. endodontalis*가 악취와 관련이 있으며, 이외에 삼출액과 누공과도 관련이 있음을 보고하였다⁹⁾. 본 연구에서는 *P. endodontalis*가 검출된 7 sample에서 동통과 관련된 경우가 5개, 누공이 2개, 악취 3개, 화농성 배농이 3개로 Hashioka의 연구와 유사한 결과를 보였지만 주로 동통과 관련이 큰 것으로 나타났다. 이에 대해서는 실험 sample내의 다른 균주의 존재 및 연관성에 대한 추가적인 고찰이 필요할 것으로 사료된다.

Genomic DNA는 mutation, transformation, transduction, conjugation 등에 의하여 변화되지만, 환경 영향을 덜받으며, genetic composition은 비교적 오랜동안 안정적이므로 전통적인 형질형 분석과 달리 배양이 힘든 세균의 동정에는 핵산 서열의 변이를 검사하는 유전형 분석이 시도되어 이용되었다.

Strzempko는 genomic similarity에 기초한 whole-cell DNA probe를 이용한 방법을 보고 하였으나 이는 genomic homology를 가지는 다른 종간에도 위양성을 나타낼 수 있다고 하였다⁴³⁾. 또한 short oligonucleotide probe를 이용한 방법도 소개되었는데, DiRienzo는 한정된 특정 genetic region에 대해⁴⁴⁾, Dix는 중간 다양성을 보이는 부분의 서열을 이용한 probe를 사용하여²⁰⁾, homologous DNA sequence를 가지는 매우 가까운 종간의 구별도 가능함을 보여 주었다. 1994년 Moncla는 16S rDNA의 hypervariable region이 종특이성이 있음을 보고 하였다²¹⁾. Paster는 16S rDNA 염기서열 중 종특이성이 있는 부위를 이용한 분류를 하여 최신 분류학의 시초가 되었다^{33,45)}.

비교적 최근에 개발된 genotyping 방법인 PCR법을 이용하여 균을 동정하는 많은 연구가 이루어져 왔는데, 이들 연구에서 PCR법은 시간이 훨씬 적게 걸리고 specificity가 높은 것으로 보고되었다.

Steenbergen은 *P. gingivalis*에 대해 restriction endonuclease analysis(REA), ribotyping, PCR with arbitrary primer(AP-PCR)의 3가지 molecular typing방법을 비교하였는데, REA typing은 매우 민감하고, 종간 이질성을 입증할 수 있지만 많은 수의 DNA fragment를 형성하여, 많은 isolate를 평가하기에는 어렵다고 하였고, 반면 ribotyping

과 AP-PCR은 제한된 수의 band를 형성하기 때문에 비교가 쉽다 하였다. ribotyping은 시간의 소비가 많은데 AP-PCR은 쉽고 재현이 가능하고 빠르며 single colony에도 적용이 가능하여 epidemiological study에 유용하다 하였다⁴⁶⁾.

Watanabe는 *P. gingivalis*의 fimbrial gene에 대한 primer로 PCR을 시행하여 배양과 DNA hybridization법과 비교 하였다. 배양법은 시간 소모가 많고, 수송 도중의 여러 요소가 조절되기 힘들어서 antibiotic sensitivity test에 적당하다 하였다. DNA hybridization은 viability에 관계없이 pathogen을 검출할 수 있지만 6000개 정도의 균수가 있어야 유용하기 때문에 pathogen의 수가 적거나 fluctuate하면 이용이 힘들다 하였다²⁷⁾.

Burstain은 인공 배지에서의 배양이 힘든 몇 안되는 병원균의 하나인 *Treponema pallidum*을 진단 하는데 매우 유용한 방법으로 PCR법을 제시했다⁴⁷⁾. Slots는 *P. gingivalis*의 collagenase gene에 대한 primer로는 밝혀지지 않은 6개의 specimen에 대하여 16S rDNA에 대한 primer를 사용한 PCR을 시행한 결과 species specific amplicon을 확인 하였다⁴⁸⁾. 이 외에도 여러 연구에서 16S rDNA의 종특이성 primer를 이용한 PCR법이 매우 편리하고 유용한 방법으로 제시되었다^{25,26,27,49,50-57)}.

PCR에 필요한 조성 중 primer는 증폭반응의 중요한 성패 요인의 하나로 꼽을 수 있다. fimbrial gene²⁷⁾, collagenase gene⁴⁷⁾, 또는 16S와 23S ribosomal spacer region²⁵⁾ 등이 사용되어 왔으나, rDNA 염기서열은 진화 과정 동안에 보존되어 왔으며, 특히, 16S rDNA 염기서열에 기초한 계통분류법이 정착되면서^{33,45,58,59,60)} 이에 대한 종특이성 primer를 제작, 합성하여 중합효소연쇄반응(PCR)에 이용하는 연구들이 활발히 이루어지고 있다^{21,50,51,52,53,60)}. 주로 배양이 까다로운 치주원인균에 대해 이루어 졌으며, 다른 방법과 비교시 민감도와 특이도가 훨씬 높고 간단한 방법으로 평가되고 있다. 본 실험에 사용하기 위해 제작된 primer는 *P. asaccharolytica*가 형태, 생리학적으로는 *P. endodontalis*와 가장 가까운 것으로 되어 있으나^{11,34)}, 이는 구강내에서는 거의 발견되지 않기 때문에 구강내 발견되는 가장 가까운 균인 *P. gingivalis*의 16S rDNA 서열을 비교하여 제작하였다. 제작된 *P. endodontalis*의 primers는 *P. asaccharolytica*를 target DNA로 하여 Amplify software를 이용하여 가상의 PCR을 행했을 때 amplicon을 형성하지 않아 *P. asaccharolytica*와 교차반응하지 않는 primer임을 확인하였다. 실제로 생화학적 검사에서 동정한 결과가 *P. asaccharolytica*였던 균주가 PCR에서는 *P. endodontalis*로 밝혀졌으며, 생화학적 검사는 가능성 있는 유사균을 제시하기 때문에 실제와는 다를 수 있다.

Slots은 치은 연하 표본에서 치주원인균을 검출하는 실험에서 50개의 target cell만 있으면 동정이 가능했으며, hemoglobin이나 다른 compound가 결과를 방해하지 않는다고 하

었다. 그러나, 매우 근소한 차이의 16S rDNA 서열을 갖는 경우에는 구별이 매우 힘들고, 이 부분의 서열이 밝혀지지 않은 어떤 종에서는 cross reaction이 일어날 수 있다고 하였다⁵¹⁾.

PCR을 하기 위한 sample은 소량의 DNA만 있어도 가능하기 때문에 DNA의 양이 충분하면 열변성만으로도 실험이 가능하므로 DNA에 대한 특별한 처치가 반드시 필요한 것은 아니다²²⁾. 그러나, template molecule이 많을수록 cross contamination에 의해 위양성의 가능성이 커지고 여러 종류의 세균 중에서 target 세균의 DNA가 적은 경우에 PCR 증폭의 특이성이 떨어지며 효과적이지 않은 조건에서는 생산량이 감소한다. 또한, starting DNA의 비율이 불분명할 때는 product로부터 target DNA의 함량을 추측하는데 어려움이 있다. 뿐만 아니라 정확히 밝혀지지 않는 않지만 대부분의 실험 연구에서도 여러가지 PCR 억제 요인이 있음을 시사하므로 DNA의 정제가 필요하다는 의견이 많다²²⁾.

Burstain은 *Treponema pallidum*을 PCR로 검출하는 실험에서 sample을 단순히 boiling한 것과 순수하게 추출한 것을 나누어 중합효소연쇄반응을 했을 때, 둘 다 positive PCR result가 나왔지만, 10⁴개 이상에서는 boiled sample에서는 실패하였고 정제된 DNA에서만 성공하였다고 보고하였다. 이것은 tissue나 leukocyte에 의해 방해된 것이라 추측하였고, proteolysis나 DNA extraction, 또는 둘다의 방법이 필요하다 하였다. 또한, 다양한 혈액 성분을 검사한 결과 heme로부터 유래된 porphyrin compound가 주된 억제 물질일 것이라 추측하였으며, hematin역시 0.8uM에서도 중합효소연쇄반응을 억제하는 것으로 보고있다⁴⁷⁾. 따라서 DNA 정제를 위한 부가적인 노력이 필요하다고 사료된다.

Saiki는 정제된 genomic DNA로부터의 생산량과는 달리 600개 이상의 세포에서는 더이상 생산량이 증가하지 않았으며, 4800개 세포부터는 오히려 감소한다는 결과를 발표하였다. 이는 cell debris 때문에 DNA가 trap되거나 PCR process의 억제, 또는 이 두가지 모두의 이유 때문일 것이라 하였다^{24,62)}. 본 실험에서 사용한 sample은 근관 및 치근단 병소에서 채취한 내용물로 1000μl의 RTF에 보관, 수송된 것을 vortex mixer로 진탕하여 100μl씩 취하여 사용하였기 때문에 실제 sample의 양은 매우 소량이었다. 따라서 이 경우 kit를 사용한 DNA의 추출이 어려운 작업이었기 때문에 실험 방법과 실험성적에서 다루지는 않았지만, PCR에서 *P. endodontalis*가 검출된 7개의 sample에 대해 50μl씩 취하여 PBS로 두번 세척 후 50μl의 DDW를 넣고 5분간 boiling만 한 후 바로 PCR을 시행해 보았는데 그 결과 7개 중 3개 sample에서 amplicon이 확인되었다. DNA의 양이 소량인 경우에는 boiling만으로도 PCR이 가능하였지만, 결과가 항상 일정한 것이 아니므로 DNA정제 과정을 거치는 것이 좋으리라 사료된다.

DNA를 순수하게 정제하는 방법은 매우 다양하다. 본 실험에서와 같이 소량의 DNA를 다루는 경우에는 이 정제 과정이

까다로운 작업이 될 수 있기 때문에 상품화된 QIAamp tissue kit의 사용은 이 과정을 훨씬 편리하고 빠르게 할 수 있었다. 제조사의 설명에 따르면, 각각의 단계에 사용되는 buffer의 성분은 제조사의 knowhow로서 공개되지 않지만, 이를 사용해 정제한 DNA는 protein, nuclease, 또는 다른 오염물이나 억제물이 없고, eluted DNA의 길이는 평균 30kb정도로 얻어지는데 이는 변성이 용이하고 증폭효율에 적당한 길이라고 하였다.

AccuPower™PCR Premix-Top(Bioneer, Korea, Table 3)은 미리 dNTP, polymerase, PCR buffer등이 혼합되어 있는 상품으로 여기에 target DNA와 sense 및 antisense primer, 그리고 DDW를 넣어 PCR을 시행하였다. 이는 PCR 준비과정을 훨씬 손쉽고 빠르게 할 수 있었으며, contamination과 같은 방해 요소를 없앨 수 있어 대량 작업시에 특히 편리할 것으로 사료된다. 이 제품은 PCR에 필요한 구성 성분이 혼합되어 1회 분량씩 동결 건조되어 있으며, 안정화 물질을 첨가하여 용액 상태에서보다 10배, 이 stabilizer가 포함되지 않고 동결 건조된 것에 비해 3배 이상 안정성이 있어 상온에서도 활성이 한달간 유지되며 냉동보관시 2년이상 활성이 유지된다고 한다. 또한 여기에 첨가된 polymerase안정화 물질은 반응액의 내열성을 2배 이상 증가시켰고, 94℃에서 20분 이상 안정하기 때문에 10분 이상 pre-denaturation 후 PCR을 시행해도 polymerase 활성에 영향을 주지 않는다 한다. 또한 tracking dye및 침강제가 포함되어 따로 sample loading buffer를 가할 필요가 없다고 하였으나 이것은 매우 빠르게 실시되어 loading buffer를 추가하는 것이 더 좋았다.

본 연구에서는 감염 근관과 치근단 병소의 주원인균의 하나인 *P. endodontalis*를 배양을 통하지 않고 직접 채취한 sample에서 동정하고자 16S rDNA 염기서열을 이용한 종특이성 primer를 제작하여 중합효소연쇄반응법을 시행하였으며, 유사한 실험을 하기 위한 protocol로 다음의 과정을 제안해 보고자 한다.

1. PCR을 위한 DNA의 추출을 위해 1loopful의 순수계대배양한 균주나 RTF에 보관된 sample 100μl를 취하여 원심 분리하여 얻은 침전물을 PBS로 2회 세척하고 QIAamp tissue kit을 사용하여 제조사의 지시에 따라 추출한다. 추출한 DNA는 100μl elution buffer로 elution한다.
2. Taq polymerase, 10X PCR buffer, MgCl₂, dNTP mixture가 미리 혼합되어 있는 상품인 AccuPower™ PCR Premix-Top에 20pM 씩의 sense 및 antisense primer와 target DNA를 10ng, 또는 농도를 알 수 없는 target의 경우 elution된 DNA 10μl씩을 넣고 DDW로 최종부피를 조정하여 준다.
3. 반응액을 PCR machine을 이용하여 94℃에서 5분간 초기 변성시킨 다음, 94℃에서 1분간 변성, 55℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 1분 30초간 extension을 33회 반복

하고, 마지막으로 72℃ 에서 10분간 더 extension시킨 후 반응을 종료시키고 PCR산물은 4℃로 보관한다.

4. PCR product를 ethidium bromide를 첨가한 1.0% agarose gel에 loading하여 80V에서 40분 간 전기 영동 하고, UV transilluminator상에서 특정 위치에서 amplicon 이 생긴 것을 확인하고 polaroid camera로 촬영하여 결과를 기록한다.

16S rDNA에 대한 종특이성 primer를 이용한 상기의 중합 효소연쇄반응은 매우 소량의 target만 있어도 이를 검출할 수 있었으며, DNA를 추출, 정제하는 sample에 대한 준비과정을 거치더라도 매우 편리하고 정확한 방법이었다. target DNA가 소량인 경우에는 DNA를 정제하는 방법 뿐 아니라 간단히 끓여 DNA를 추출하는 두 방법을 모두 사용하면 더 정확한 검출이 가능할 것으로 생각되며, 끓이는 방법을 사용할 경우에는 혈액 성분이나 세포구성 성분에 대한 전처리 과정을 시행하는 것이 바람직할 것으로 여겨진다. 이 전처리 과정에 대해서는 조금 더 간단하고 확실한 활용 방법에 대한 지속적인 연구와 검증을 해나가야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 감염 근관과 치근단 병소의 주원인균의 하나인 *Porphyromonas endodontalis*를 배양을 통하지 않고 직접 채취한 sample에서 정확하고 빠르게 동정하고자 16S rDNA 염기서열을 이용한 종특이성 primer를 제작하고 중합효소연쇄반응법을 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *Porphyromonas endodontalis*의 16S rDNA 염기서열을 이용하여 제작한 primer는 다른 유사한 종의 표준균주와는 반응하지 않았고 *P. endodontalis*와 반응시에만 약 490bp의 특이 amplicon이 생성되는 종특이성 primer임이 확인되었다.
2. 제작된 종특이성 primer는 통상의 방법으로 동정된 *P. endodontalis*와도 반응하여 약 490bp의 특이 amplicon이 생성되었다.
3. 근관 및 치근단 병소에서 채취된 sample에 대한 *P. endodontalis*의 동정시 종특이성 primer를 이용한 중합효소연쇄반응법이 배양법보다 더 높은 예민도(sensitivity)를 보였다.
4. *P. endodontalis*가 검출된 7 sample의 경우에는 동통과 관련된 것이 5개, 누공이 있는 것은 2개, 약취 3개, 화농성 배농이 있었던 것은 3개로 *P. endodontalis*는 동통과 관련이 큰 것으로 확인되었다.

참고문헌

1. Griffie MB, Patterson SS, Miller CH, Kafrawy AH, Newton CW : The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. Oral Surg.11:457-461,1980.
2. van Winkelhoff AJ, Carlee AW, de Graaff J : *B. endodontalis* and other BPB species in odontogenic abscess. Infection and Immunity. Vol.49:494-497,1985.
3. Haapasalo M, Ranta H, Ranta K, Shah HN : Black-pigmented *Bacteroides* spp. in human apical periodontitis. Infect Immunol. 53:No.1:149-153,1986.
4. Yoshida M, Fukushima H, Yamamoto K, Ogawa K, Toda T, Sagawa H : Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals of teeth with periapical pathosis. JOE. 13:No.1:24-28,1987.
5. van Steenberg TJM, van Winkelhoff AJ, van der Velden U, de Graaff J : Taxonomy, virulence and epidemiology of BPB species in relation to oral infections. Infection. (17),No.3:194-196,1987.
6. Baumgartner JC : Microbiologic and pathologic aspects of endodontics. Current opinion in dentistry. 1:737-743,1991.
7. Baumgartner JC, Falker WA : Bacteria in the apical 5mm of infected root canals. JOE.17:No.8:380-383,1991.
8. van Winkelhoff AJ, van Steenberg TJM, de Graaff J : The role of BPB in human oral infections. J Clin Periodontol.15:145-155,1988.
9. Hashioka K, Yamasaki M, Nakane A, Horiba N, Nakamura H : The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. JOE 18:No.11:558-561,1992.
10. Sundqvist G : Bacteriological study of necrotic dental pulps. (Odontological dissertation No. 7). Umea university odontological dissertations. No.7, Sweden. 5-89,1976.
11. van Steenberg TJ, van Winkelhoff AJ, Maryland D, Grenier D, de Graaff J : *Bacteroides endodontalis* sp. nov. and Asaccharolytic BPB species from infected dental root canals. Int J of Syst Bacteriol.34:118-120,1984.
12. Shah HN, Collins MD : Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *B. gingivalis*, and *B. endodontalis* in new Genus *Porphyromonas*. Int J of Syst Bacteriol.38:28-131,1988.
13. Shah HN, Gharbia SE : Biochemical and chemical studies on strains designated *P. intermedia* and proposal of a new pigmented species, *P. nigrescens* species nov. Int J Syst Bacteriol. Oct:542-546,1992.
14. Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U : Prevalence of Black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. JOE. 15:No.1:13-19,1989.
15. Dougherty WJ, Bae KS, Watkins BJ, MS, Baumgartner JC: Black-pigmented bacteroides in coronal and apical segments of infected root canals. JOE. Vol24, No.5:356-358,1998.
16. Bae KS . Differentiation of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* using SDS-PAGE. J Korean academy of conservative dentistry. Vol 22, No.2, 693-701, 1997.
17. Zambon JJ, Sunday GJ, Smutko JS : Molecular genetic analysis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* epidemiology. J Periodontol.61:75-80,1990.
18. Moncla BJ, Braham PH, Persson GR, Page RC, Weiberg A, Karlinsky J, Mc Roberts : Direct detection of *P. gingivalis* in Macaca fascicularis dental plaque samples using an oligonucleotide probe. J Periodontol.65:398-403,1994.

19. Mättö J, Saarela M, et al.: Distribution and genetic analysis of oral *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. Oral Microbiol Immunol. 11:96-102,1996.
20. Dix K, Watanabe SM, McArdle S, Lee DI, Randolph C, Moncla BJ, De Schwartz : Species-specific oligodeoxynucleotides probe for the identification of periodontal bacteria. J. Clinical Microbiol.Feb:319-323,1990.
21. Moncla BJ: The use of whole-cell DNA probes for the identification of *Bacteroides intermedia* isolates in a dot blot assay. JDR. 67(10): 1267-1270,1988.
22. Henry AQ Erich: PCR Technology. Stockton Press. -pp.38, 1989.
23. Kary B Mullis, Faloona FA : Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase- catalyzed chain reaction. Methods in enzymology. vol.155, 335-350.
24. Saiki RK, Scharf S, Faloona FA, Kary B Mullis, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N : Enzymatic amplification of β -Globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science Vol. 239: 1350-1354,1998.
25. Griffen AL, Leys EJ, Fuerst PA : Strain identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using the polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol 7:240-243,1992.
26. Leys EJ, Griffen AL, Strong SJ, Fuerst PA : Detection and strain identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by nested PCR. J. Clin Microbiol. May,1288-1294,1994.
27. Watanabe K, Frommel TO : Detection of *Porphyromonas gingivalis* in oral plaque samples by use of the PCR. J. Dent Res.72(6): 1040-1044, June, 1993.
28. Fabricius L : Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. Scand J Dent Res. Vol.90, 200-206, 1982.
29. Fukushima H, Yamamoto K, Hirohata K, Sagawa H, Leung K-P, Walker CB : Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. JOE.16:No. 11:534-538,1990.
30. Nair PNR : Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. JOE.13:No.1:2939, 1987.
31. Brook I : Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abscess. Oral Microbiol Immunol. 6:123-125,1991.
32. Shin JH, Kim HW, Yoon SH : A study of genomic clonal types of *Porphyromonas endodontalis* and *Prevotella intermedia* isolated from infected root canals with restriction endonuclease analysis. J of Korean academy of conservative dentistry. Vol. 22, No. 1, :413-427,1997.
33. Paster BJ, Dewhirst FE, Olsen IE, Fraser GJ : Phylogeny of *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* species and related bacteria. J. Bacteriol. Feb:725-732,1994.
34. van Winkelhoff AJ, van Steenberg TJM, Kippuw N, de Graaff J : Further characterization of *B. endodontalis* and asaccharolytic BPB species from the oral S cavity. J Clin Microbiol. Vol.22,No.1:75-79,1985.
35. Bae KS, Baumgartner JC, Nakata TT : Development of anaerobic bacterial leakage model. JOE. Vol 24, No.4:233-235,1998.
36. van Winkelhoff AJ, Kippuw N, de Graaff J : Serological characterization of Black pigmented *Bacteroides endodontalis*. Infection and Immunity. Mar:972-974,1986.
37. Herweijer JA, Loo BG, Mirdza E, Neiders : Characterization of total membrane protein of *P. endodontalis*. JOE. Vol 18,No.12: 620-624,1992.
38. van Winkelhoff AJ, van Steenberg TJM, de Graaff J : *Porphyromonas endodontalis* : Its role in endodontic infection. JOE. Vol.18,No.9:431-434,1992.
39. Sundqvist GK, Eckerbom MI, Larsson AP, Sjögren UT : Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. Infect Immun.25:685-693,1979
40. Wayman BE, Murata SM, Alneida RJ, Fowler CB : A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. JOE.18:No.4:152-155,1992.
41. van Winkelhoff AJ, Kippuw N, de Graaff J : Cross inhibition between BPB species. JDR.66(11):Nov:1663-1667,1987.
42. Sundqvist G : Associations between microbial species in dental root canal infections. Oral Microbiol Immunol.7:257-262,1992.
43. Strzempko MN, Simon SL, French CK, Lippke JA, Raia FF, Savitt ED, Vaccaro KK : A cross-reactivity study of whole genomic DNA probes for *Haemophilus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides intermedia* and *B. gingivalis*. JDR. 66(10):1543-1546,1987.
44. DiRienzo JM, Cornell S, Kazoroski L, Slots J : Probe specific DNA fingerprinting applied to the epidemiology of localized juvenile periodontitis.Oral Microbiol Immunol.5:49-56,1990.
45. Paster BJ, Dewhirst FE, Weisburg WG, Tordoff LA, Fraser GJ, Hespell RB, Stanton TB, L Zablen L, Mandelco L, Woese CR : Phylogenetic analysis of the spirochetes. J Bacteriol. Vol. 173, No. 19:101-109,1991.
46. van Steenberg TJM, Menard C, Tjihof CJ, Mouton C, de Graaff J : Comparison of the molecular typing methods in studies of transmission of *Porphyromonas gingivalis*. J Med Microbiol Vol 39: 416-421,1993.
47. Burstain JM, Grimpel E, Lukehart SA, Norgard MV, Radolf JD : Sensitive detection of *Treponema pallidum* by using the PCR. J. clin Microbiol. Jan, 62-69, 1991.
48. Slots J, Flynn J, Guoliang Li: PCR analysis of the *P. gingivalis* collagenase gene. Clinical infectious diseases. 20(suppl2):S167-168,1995.
49. Riggio MP, Macfarlane TW, Mackenzie D, Lennon A, Smith AJ, Kinane D : Comparison of PCR and culture methods for detection of Aa and *P. gingivalis* in subgingival plaque samples. J. Periodontol Res. 31:496-501,1996.
50. Casey chen and Slots J : AP-PCR of periodontal pathogens: discriminative primers and genetic diversity. Cincinal infectious disease.20(suppl 2):S 301-303,1995.
51. Solts J, Ashimoto A, Flynn MJ, LT G, Casey chen : Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with PCR. Cincinal infectious disease. 20(suppl 2):304-307,1995.
52. Wahlfors J, Meurman JM, Väisänen P, Alakuijala P, Korhonen A, Torkko H, Jänne J : Simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* by a rapid PCR methods. JDR.74(11):1796-1801,1995.
53. Milson SE, Sprague SV, Dymock D, Weightman AJ, Wade WG : Rapid differentiation of *P. intermedia* and *P. nigrescens* by 16S rDNA PCR-RFLP. J. Med Microbiol. 44:41-43,1996.
54. Conrads G, Mutters R, Fischer J, Brauner A, Lütticken R, Lampert F : PCR reaction and Dot-Blot hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally healthy individuals. J Periodontol.67:994-1003,1996.
55. Bae KS, Baumgartner JC, Shearer TR, David LL : Occurrence of *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* in infections of endodontic origin. JOE. Vol.23,No.

- 10:620-623,1997.
56. Gharbia SE, Haapasalo M, Shah HN, Kotiranta A, Lounatmaa K, Pearce MA, Devine DA : Characterization of *P. intermedia* and *P. nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infections. *J Periodontol.* 65:56-61,1994.
 57. Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T: Association of Black-pigmented *Bacteroides* with endodontic infections. unpublished,1998.
 58. Ward DM, Weller R, Bateson MM : 16S rRNA sequence reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature.* Vol.345: May,63-65,1990.
 59. Arnanm R, Springer N, Ludwig W, Görtz HD, Schleifer KH : Identification in situ and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. *Nature.* Vol 351,9 may:161-164,1991.
 60. de Buyser ML : Characterization of *Staphylococcus* species by rRNA gene restriction patterns. *J Gene Microbiol.*135: 989-999,1989.
 61. Ashimoto A, Flynn MJ, Slots J : Molecular genetic detection of *Bacteroides heparinolyticus* in adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 10:284-287,1995.
 62. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA : Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science.* Vol.239:487-491,1988.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 3. PCR profiles of *P. endodontalis* amplified with species specific primers for the 16S ribosomal DNA of *P. endodontalis*. About 490bp amplicon was seen only in lane 2.

SM: size marker (100bp DNA ladder)

lane 1: blank

lane 2: *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406

lane 3: *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

lane 4: *Prevotella intermedia* ATCC 25611

lane 5: *Prevotella nigrescens* ATCC 33563

lane 6: *Prevotella melaninogenica* ATCC 25845

Fig. 4. Fingerprints obtained after PCR with species specific primers for the 16S ribosomal DNA of *P. endodontalis* with extracted DNA from cultured *P. endodontalis*.

SM: size marker (100bp DNA ladder)

lane 1: blank

lane 2: *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406

lane 3, 4, 5: cultured *Porphyromonas endodontalis*

Fig. 5. Agarose gel electrophoresis patterns of PCR with species specific primers for the 16S ribosomal DNA of *P. endodontalis* and DNA extracted from clinical mixed samples using QIAamp tissue kit. About 490bp amplicons were seen in lane 1, 3, 5, and 7.

SM: size marker (100bp DNA ladder)

lane 1: *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406

lane 2: sample No. 32

lane 3: sample No. 33

lane 4: sample No. 34

lane 5: sample No. 35

lane 6: sample No. 36

lane 7: sample No. 37

Fig. 6. Amplification of *P. endodontalis* by PCR with species specific primers for the 16S ribosomal DNA of *P. endodontalis* and extracted DNA from cultured BPB using QIAamp tissue kit. About 490bp amplicon was seen in lane 1, and 4.

SM: size marker(100bp DNA ladder)

lane 1: *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406

lane 2: sample No. 3

lane 3: sample No. 4

lane 4: sample No. 5

사진부도

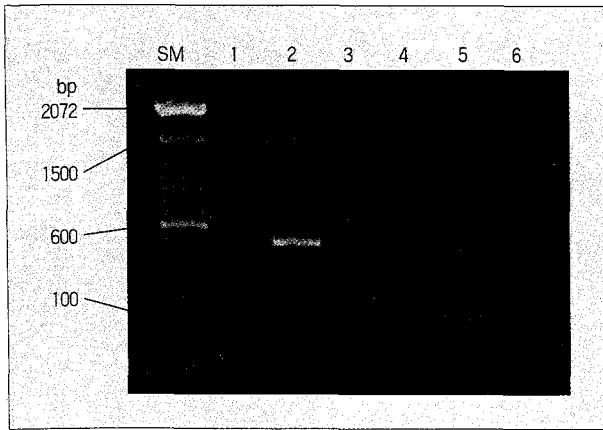


Fig. 3

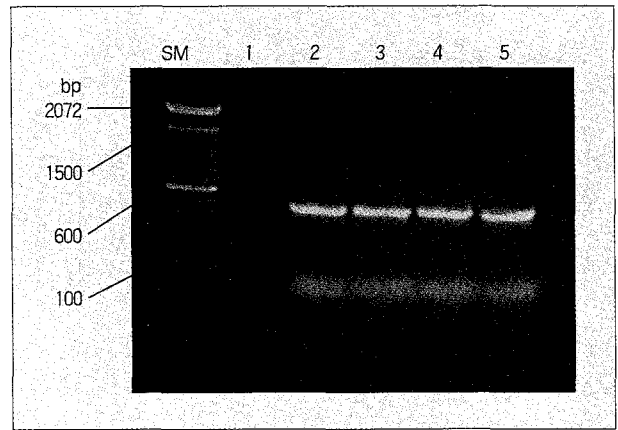


Fig. 4

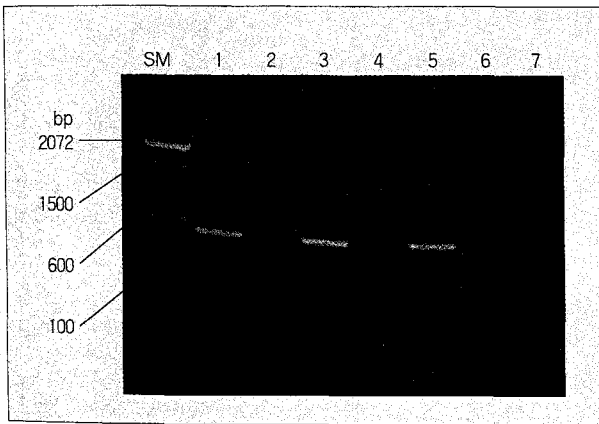


Fig. 5

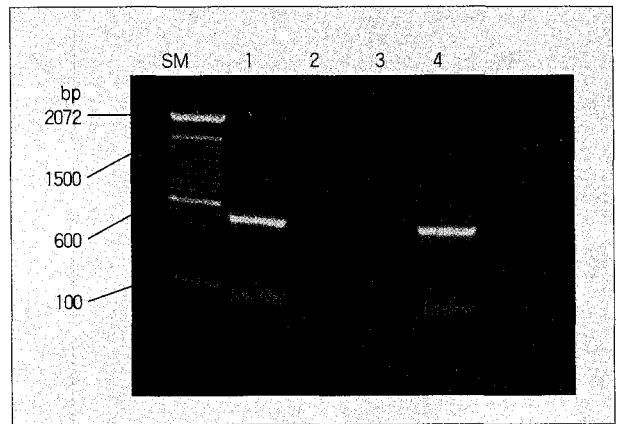


Fig. 6