

## Pi29-L DNA 프로브를 이용한 *Prevotella intermedia* ATCC 25611의 동정

국중기\* · 백동헌<sup>1</sup>

조선대학교 치과대학 구강생화학교실, <sup>1</sup>단국대학교 치과대학 미생물 및 면역학 교실

**Identification of *Prevotella intermedia* ATCC 25611 Using Pi29-L DNA Probe. Kook, Joong-Ki\* and Dong-Heon Baek<sup>1</sup>.** Dept. of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University, and <sup>1</sup>Dept. of Oral Microbiology and Immunology, College of Dentistry, Dankook University, Korea – Recently, we introduced a new method for rapid screening of bacterial species- or subspecies-specific DNA probes, named “inverted dot blot hybridization screening method”. We then applied this method to develop species- or strain- specific DNA probes for *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. In those studies, among 96 candidate DNA probes which were screened by the new method, 5 probes were confirmed as being putatively strain-specific: 3 probes for *P. nigrescens* 9336 (ATCC 33563), one for each *P. intermedia* ATCC 25611 and one for *P. nigrescens* G8-9K-3 (ATCC 49046). In the present study, we evaluated by Southern blot analysis a DNA probe Pi29-L, one of the 96 candidate probes described above, whether it is specific for the strain ATCC 25611 of *P. intermedia*. Our data show that the probe Pi29-L is potentially *P. intermedia* ATCC 25611-specific, which can be useful for the detection and identification of the strain, particularly in maintenance of the strain.

**Key words:** DNA probe, identification, Pi29-L, *Prevotella intermedia* ATCC 25611

치주질환은 치주조직의 염증과 구조의 소실을 야기시키는 질환으로 다양한 전신적 및 국소적 요인들에 의하여 발병된다. 여러 발병 요인 중 치주질환과 가장 밀접한 관계가 있는 국소적 요인인 치면세균막내 병원성 세균에 대하여 많은 연구가 진행되어 오고 있다[1, 5, 6, 19, 20, 24]. 여러 원인 세균 중 중 하나가 *Prevotella intermedia*이다. *P. intermedia*는 10여년 전에 DNA 상동성 조사[8, 27], 혈청학적 실험[11, 22], isoenzyme 검색[7] 및 전체단백질의 전기영동 분석[25] 등의 자료를 근거로 *P. intermedia* 와 *P. nigrescens*로 재분류되었다[7, 25]. 여러 역학적 연구 결과, *P. intermedia*는 주로 치주질환에 연관이 깊고, *P. nigrescens*는 건강한 부위나 근관병소에 연관이 깊은 것으로 보고되고 있다[10] 하지만, 다른 보고에 의하면 건강한 부위에서도 *P. intermedia*가 검출됨이 보고되고 있다[17]. 이러한 상반된 연구 결과의 이유는 현재로서는 알려지지 않았지만 숙주의 면역력이나 균주간의 독력 차이에 기인할 것으로 사료된다.

특정 질환과 세균간의 역관계를 연구하거나, 진단이나 예후 평가에 있어서 신속하고 정확한 세균의 동정은 매우 중요하다. 또한, 같은 세균 중이라도 숙주에 대한 독력에 차이가 있기 때문에 세균 종 수준이 아닌 이종 수준에서의 동정이 매우 중요하다. 현재 가장 신속하고, 정확하다고 알려진 세균 동정법이 중합효소연쇄반응법으로 알려져 있고, 이를

바탕으로 세균 종 수준에서 널리 이용되는 표적 유전자가 16S 또는 23S rDNA이다. 이들 유전자의 핵산염기서열은 같은 세균 종간에 상동성이 잘 보존되어 있어 세균 분류학에 있어서 가장 신뢰를 받는 유전자들이다[2, 26]. 하지만, 이들 유전자를 이용해서는 아종 수준에서의 동정은 불가능하다. DNA 프로브법은 민감도와 특이도가 뛰어나지만 아니라, 프로브로 사용하는 DNA의 핵산염기서열이 같은 종의 균주간에 상동성이 크지 않기 때문에 세균의 속(family) 수준에서부터 균주 수준까지 동정할 수 있는 장점이 있다[4, 12, 16]. 하지만, 세균 종 또는 아종 이하 수준에서 세균을 동정할 수 있는 DNA 프로브를 검색하는 일은 많은 시간, 경비 및 노동력이 필요하다는 단점이 있다. 최근 Kook 등[13]은 “inverted dot blot hybridization screening method”라고 명명된 신속하고, 간편하게 세균 종 또는 아종 특이 DNA 프로브를 검색할 수 있는 새로운 방법을 고안하였다. 이 방법을 이용하여 96개의 후보 DNA 프로브를 5번의 inverted dot blot hybridization과 4번의 Southern blot hybridization을 통하여 *Fusobacterium nucleatum*의 4가지 아종 각각에 대한 잠재적인 아종-특이 DNA 프로브들을 클로닝할 수 있었다. 또한 Kook 등[15]은 32개의 후보 DNA 프로브들을 검색하여 *P. intermedia* ATCC 25611에 대한 잠재적인 균주-특이 DNA 프로브인 Pi34를 클로닝하여 보고하였다. 그 당시 실험 결과, 본 연구에서 사용한 Pi29-L 프로브는 *P. intermedia* ATCC 25611 균주 자체 지놈 DNA에 강한 반응을 보였지만, 같은 종인 *P. intermedia* G8-9K-3 지놈 DNA에도 약한 양성 반응을 보였기 때문에 자세한 연구에서 제

\*Corresponding author

Tel: 82-62-230-6877, Fax: 82-62-224-3706

E-mail: jkkook@chosun.ac.kr

외되었다. 하지만, 그 결과가 거짓 양성 반응일 가능성이 있다고 판단되어 Southern blot hybridization을 시행한 결과 Pi29-L 프로브도 잠재적인 *P. intermedia* ATCC 25611-특이성이 있음을 검증하게되어 보고하고자 한다.

본 연구에 사용한 세균종의 균주는 Table 1에 기록하였고, 모두 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, U.S.A.)에서 구입하였다. *P. nigrescens*, *P. intermedia* 및 *P. gingivalis*는 3% Tryptic soy broth(Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.), 0.5% yeast extract(Difco Laboratories), 0.05% cysteine HCl, 0.5 mg/ml의 hemin, 2 µg/ml의 vitamin K<sub>1</sub>으로 배합된 배지에서, *F. nucleatum*은 Schaedler broth(Difco Laboratories) 배지에서, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*는 3% Tryptic soy broth, 0.1% yeast extract, 5 µg/ml의 vancomycin(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, U.S.A.), 75 µg/ml Bacitracin 및 10% horse serum(GibcoBRL, Gaithersburg, MD, U.S.A.)으로 배합된 배지에서, 그리고 *Campylobacter rectus*는 3.7% Brain Heart Infusion broth(Difco Laboratories), 0.5% yeast extract, 2.0% sodium formate(Sigma-Aldrich Co.), 3.0% sodium fumarate(Sigma-Aldrich Co.), 0.5 mg/ml의 hemin, 2 µg/ml의 vitamin K<sub>1</sub>이 배합된 배지에서 배양하였다. 이 때 *A. actinomycetemcomitans*는 10% CO<sub>2</sub>가 유지되는 배양기에서, 그 이외의 모든 세균 종들은 85% N<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>의 혼합가스가 공급되는 37°C 혐기성 배양기(Model Bactron I, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, U.S. A.)에서 2~7일 동안 배양하여 다음의 실험에 이용하였다.

세균 지놈 DNA 추출은 Lippke 등[18]의 방법을 변형하여 사용하였다[14]. 추출한 지놈 DNA 순도 및 농도는 자외선 분광기(Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech., Cambridge, UK)를 이용하여 260 및 280 nm에서 흡광도를 측정하여 구

하였다. 플라스미드는 통상의 alkaline lysis법[23]으로 AccuPrep™ Plasmid Extraction Kit(Bioneer Co., Daejeon, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시대로 추출하였다. Pi29 플라스미드 삽입 DNA의 핵산염기서열 결정은 통상의 extension termination 법을 이용하여 바이오니아사(Bioneer Corp.)에 의뢰하여 시행하였다. 이때 사용한 핵산염기서열 결정 프라이머는 ChDC-F(5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG AA-3'), Pi29-F1(5'-ACA CAT CGG CTT TGA GTT CT-3'), Pi29-R1(5'-GAC CAT CCC AGC CAG ACG A-3'), 그리고 ChDC-R(5'-CCT CAC TAA AGG GAA CAA AAG C-3') 등이었다. 이들 프라이머의 설계는 PrimerSelect 프로그램(Version 5.00; DNASTAR, Inc., Madison, USA)을 이용하였으며, 바이오니아사(Bioneer Co.)에 의뢰하여 합성하였다. Pi29 DNA 제한효소절편의 핵산염기서열을 결정한 후 GenBank에 등록하였다(accession number AY232444).

프로브로 사용할 DNA 절편(Pi29-L)은 이를 함유한 재조합 플라스미드를 HindIII로 절단한 다음 1.0% 아가로스젤에 전기영동한 후 AccuPrep™ Gel Purification Kit(Bioneer Co.)를 이용하여 정제하였고, DIG-High Prime(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)을 이용하여 제조회사의 지시대로 Digoxigenin-11-dUTP(DIG)로 표지하였다. Pi29-L DNA 프로브가 *P. intermedia* ATCC 25611 균주에 대한 특이성을 갖는지를 검증하기 위하여 이전에 기술한 데[13]로 Southern blot hybridization법을 시행하였다. 표지된 DNA 프로브가 membrane 상의 표적 DNA 가닥과 hybridization 됨을 알아보기 위한 detection 과정은 chemiluminescent detection kit®(Roche Diagnostics)를 사용하였으며, 제조회사의 지시대로 시행하였다.

Pi29 DNA 절편의 핵산염기서열 결정 결과 1,787 bp로 구성되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 1). 이를 GenBank 데이터 베이스를 바탕으로 BLASTN 검색프로그램으로 핵산염기서열 상에서의 상동성 검색을 한 결과 새로운 유전자였다. 핵산염기서열을 MapDraw 프로그램(Version 5.00; DNASTAR, Inc.)으로 제한효소절단 자리를 분석한 결과, 502번째 염기에 또 다른 HindIII 제한효소자리가 있었다(Fig. 1). 이는 *P. intermedia* ATCC 25611 지놈 DNA의 제한효소절편을 클로닝할 때 HindIII 제한효소에 부분 절단(partial cutting)된 DNA 절편이 클로닝된 결과였다. 두개의 HindIII 제한효소 DNA 절편 중 크기가 큰 것을 Pi29-L(1,284 bp, Fig. 2), 작은 것을 Pi29-S라고 명명하고, 이번 연구에서는 Pi29-L DNA 절편을 프로브로 이용하였다. 이는 다음의 2가지 이유 때문이었다. 첫째, 많은 수의 핵산 염기들로 구성된 DNA 프로브일수록 확률적으로 특이성이 더 좋기 때문이고, 둘째, 656-1,787번째 핵산 염기들로 구성된 open reading frame (ORF; 376 아미노산 잔기로 구성됨)이 존재하였고, 이 유전자들의 기능은 아직 밝혀지지 않았지만, 차후에 그 기능이

Table 1. Bacterial strains used in this study.

Species or subspecies	Strains
<i>Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum</i>	ATCC 25586
<i>F. nucleatum subsp. nucleatum</i>	ATCC 23726
<i>F. nucleatum subsp. fusiforme</i>	ATCC 51190
<i>F. nucleatum subsp. polymorphum</i>	ATCC 10953
<i>F. nucleatum subsp. vincentii</i>	ATCC 49256
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	ATCC 43717
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	ATCC 43718
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	ATCC 33384
<i>Prevotella intermedia</i>	ATCC 25611
<i>P. intermedia</i>	ATCC 49046
<i>P. nigrescens</i>	ATCC 33563
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 53978
<i>P. gingivalis</i>	ATCC 33327
<i>P. gingivalis</i>	ATCC 49417
<i>Campylobacter rectus</i>	ATCC 33238

```

1  AAAGCTTCCGCG TTCGATGGTC TTCACCTTCT TAGGTATGCT GATACTTGTG AAACCACAGT CGGCAAAGGC ACCTGCGCCA
81  ATTTTTTCAA TATCTGCATC ATCATGAAAC TTCACGGTGG TCATATTCTT ACAACCACTG AAAGCATTAA GTTCTATATT
161 CTTCACTGAC TTGGGGAAGT TGAATGATTC AAGTTTCTCG GCATTGGCAA AGGCATTAGA CTCAATGGTT TCCAAATCGC
241 AGTACCCTC AATATTGAAA TTCTTGAGTT TCTTATTGTG CGCAAATGCA GAGGCITTGA TTGCTTCAG CTTCGAACCT
321 TCAGGAATTG TGATTTTCTC TAACTCCCCA CATTCTGAGA AGGCAGCAGC AATCTCGGTA ATAGAAGCTG GCAAACCAC
401 TTCTTTCAAT TTATCGCAAG CTCGGAACAC ATCGGCTTTG AGTTCTTTAA CTTTAGAAGG GGTTTGAAAA TTAACAGTAA
481 CAAGTTCTTT CATATTACGG AAAGCTTTAC GATTACCACT GAAGAGTATT CTGGAGAAGG CGAAGTTGAC AAACGAGGTA
561 AAGTTAACAG TCTAACTCAG GCAATTATTC ATTATCGCAG TACACATCTG TCTAAAGAAG AAGATTTAGA ACTTCTGAC
641 GTTGGTACTG ATAGAAGCAT GTGGATTGAG GGCACATTGA ACAATACATA TCAATTTGAC TTTGGTGTG CATACGCTTA
721 TCAGATTCAG CTTCTAAAA AATTGATACA ATTAGAAACC ACGTTTCTTA AGAATGATGA TGAATTAGGT CATGTGGAGG
801 CATTGCTAAG TGGTAATCTA ACAGACGCAA AATTGCTTGA TCCTACAGAC ACAGCAAAC AGTACCCGTT GTTTGTTGCT
881 GCTAAGGGAC TTAATATTCC TGATGAGTTG ACTGCATTGC GCCAAGACTT ATTTTCAATT ATACGTGAGT CTGCTGAAAA
961 TGAAGCGGT CTAATATGTA CCACAGACTT TACTACAAAT ATTGGTCTAA TCAAAGGCTA TCTCGCAGAA TATGACTCTT
1041 GGTGAGAAA TCTCCAAGAG ACAGAATTAA GCGAAGAGCA GATTGTTTGC TTACAGAATC TTGATACTGT ACTTTTACT
1121 GTCGAAATGC CTGATGGTAG CAATGTCAA GTAAGCTCA TTACCCCACT TCACCCACTT CGTCTGGCTT GGATGGTCAA
1201 CTTATATGAG TTGTACCAAG ATTGGGAAGA AAAGACTTTA GAATATCCTA AGTACCATAA GGCITGGTAT CGAAAGTTAG
1281 ATAAACTTTT CATGGGATTA TTGCCAATGG AGATTGCCCC TCTCGTACTT AGCGAAAGCT CTTTGAAGA GGCATATCAG
1361 TATATTGGTG AAATCACATT CGGTGGGGT GCATATGCAC AACCATCTTA CGGAAGAGAA GATGCTTTTG CTTCTGGCTA
1441 CCGTCAGTTG AAGTCATATA CTGGGATGTT ACTTAATGTG GCTCGTGAAA AGCAGATTGA TAGTGATGTG AGCAAAGATT
1521 TAGTTGTTTC TCATCTGTTT AATTACGGTT TGTCCATCC ATACACGGAT AAACCTTGCA TCAACCTCTT CAACGCCGGA
1601 GATGCAGCTG TTTTGTCTA GGCTCTTATA GAGTTAGAGA AAATTGGGCT TGGTCTTGAC CTAACATATG AAATCCGTTT
1681 GTTCTCGGAT GACAATATGC TACAATCAGG CGAAGCATTG AAAGAGTTGC TTGATCCAGA AGGCTATGGT AGAACCGCTG
1761 CTGAAGCCGA AGTATTTTCA CAAGCTT

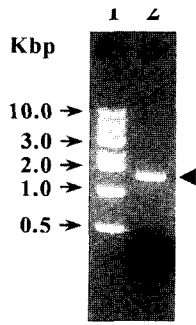
```

**Fig. 1. The nucleotide sequences of Pi29 DNA fragment. The 1,787 base pairs of nucleotides were obtained.** The *Hind*III restriction enzyme sites (in italic) are indicated by underline. The Pi29-L DNA fragment (502-1,787 nts) was used in this study. The nucleotide sequence of the Pi29 DNA fragment has been submitted to the GenBank under the accession number AY232444.

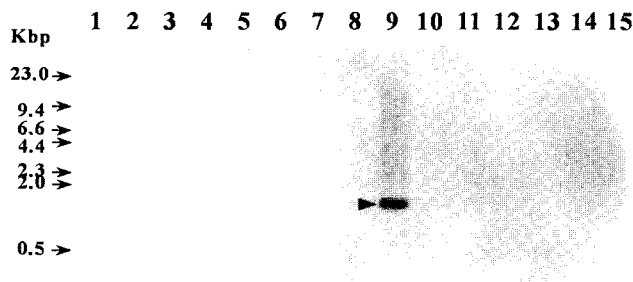
밝혀진다면 좀 더 유용하게 활용할 수 있기 때문이었다. 다른 한편으로 DNA 프로브의 크기가 크면, DNA 절편을 정제하는 등의 기술적인 측면에서 어려움이 있지만, 1,284 bp(Pi29-L) 정도의 크기라면 500 bp(Pi29-S)로 구성된 DNA 절편에 비해 조작성이 떨어지지 않기 때문에 크기가 큰 Pi29-L DNA 절편을 프로브로 사용하게 되었다.

Pi29-L DNA 프로브의 *P. intermedia* ATCC 25611에 대한 특이성을 검증하기 위하여 또 다른 *P. intermedia* 균주인 ATCC 49046을 포함한 치주질환과 연관된 5종 13 균주의

지놈 DNA를 *Hind*III로 절단하여 Southern blot hybridization을 실시한 결과, *P. intermedia* ATCC 25611 지놈 DNA에서만 약 1.3 kbp에서 반응하는 것을 알 수 있었다(Fig. 3). 이러한 결과는 Pi29-L DNA 절편이 *P. intermedia* ATCC 25611의 검출 및 동정에 특이적으로 사용될 수 있음을 시사해 준다고 생각된다. van Steenberg 등[28]은 환자로부터 분리 배양한 10 균주의 *P. intermedia*와 *P. nigrescens* 지놈 DNA의 제한효소절편 패턴을 연구한 결과 모든 균주들이 서로 상이한 양상을 갖음을 관찰하여 이 종들의 유전적 다양



**Fig. 2.** Agarose gel (1.0%) electrophoresis of Pi29-L DNA fragment. Lane 1, 1 kbp DNA ladder; 2, purified Pi29-L DNA fragment (arrowhead; 1.3 kbp).



**Fig. 3.** Southern blot analysis with DNA probe Pi29-L. lane 1-5, *Hind*III-digested genomic DNA of *F. nucleatum* ATCC 25586, 23726, 10953, 49256, and 51190, respectively; lane 6-8, *P. gingivalis* ATCC 53978, 33277, and 49417, respectively; lane 9-10, *P. intermedia* ATCC 25611 and *P. intermedia* G8-9K-3; lane 11, *P. nigrescens* 9336; lane 12-14, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43717, 43718, and 33384, respectively; and lane 15, *C. rectus* ATCC 33238. Arrowhead indicates the position of the hybrids formed with DNA probe Pi29-L.

성을 발표하였다. Mättö 등[21]도 ribotyping 법에 의해 *P. intermedia* 종의 임상 분류 균주들간에 유전적 다양성이 존재함을 발표하였다. 이러한 연구 결과들을 종합할 때 이번 연구에서 클로닝한 Pi29-L도 *P. intermedia* ATCC 25611 균주 특이 DNA 프로브일 가능성이 높다고 생각된다. 앞으로 임상시료로부터 균주들을 분리 배양하여 부가적인 실험에 의해 Pi29-L DNA 프로브가 *P. intermedia* ATCC 25611을 특이적으로 검출 및 동정할 수 있다는 것이 검증된다면, *P. intermedia* ATCC 25611 균주의 보존에 있어서 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

최근 Kook 등[13]은 세균 종 또는 아종 수준에서 동정할 수 있는 DNA 프로브를 검색할 수 있는 inverted dot blot hybridization screening 법을 이용하여 *F. nucleatum*의 4가지 아종을 특이하게 동정할 수 있는 DNA 프로브[13], *P. nigrescens* 9336 특이 DNA 프로브[9], *P. intermedia* G8-9K-3[3], *C. rectus* ATCC 33238 특이 DNA 프로브[14], 그리고 *P. intermedia* ATCC 25611 균주-특이 DNA 프로브[15]를 개발하였다. 이러한 결과를 종합해보면, inverted dot

blot hybridization screening 법이 세균 종 수준에서 균주 수준까지 특이 DNA 프로브를 검색하고 클로닝하는 데 효과적으로 이용될 수 있음을 직접적으로 시사함을 알 수 있었다. 그러므로, inverted dot blot hybridization screening 법은 병원성 미생물뿐만 아니라 모든 분야의 미생물의 검출, 동정 및 분류에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R05-2001-000-00451-0) (Joong-Ki Kook) 연구비 지원으로 수행되었으며 재단에 감사를 드립니다. 또한, 본 연구의 결과에 대한 논의 및 기술에 많은 조언을 해주신 서울대학교 치과대학 최선진 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

### REFERENCES

1. Albandar J. M., L. J. Brown, and H. Loe. 1997. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. *J. Periodontol.* **68**: 973-981.
2. 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.
3. Bak, J. S., S. H. Kim, D. K. Kim, J. H. Seong, B. O. Kim, M. K. Kim, and J. K. Kook. 2002. Study on development of DNA probe for identification of *Prevotella intermedia* G8-9K-3. *J. Korean Acad. Periodontol.* **32**: 281-290.
4. DiRienzo, J. M., S. Cornell, and H. Boehringer. 1991. Use of randomly cloned DNA fragments for the identification of oral spirochetes. *Oral Microbiol. Immunol.* **6**: 88-96.
5. Dzink, J. L., S. S. Socransky, and A. D. Haffajee. 1988. The predominant culturable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.* **15**: 316-323.
6. Dzink, J. L., A. C. Tanner, A. D. Haffajee, and S. S. Socransky. 1985. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *J. Clin. Periodontol.* **12**: 648-659.
7. 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.
8. 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.
9. 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 probe using random cloning method. *J. Korean Acad. Periodontol.* **32**: 269-279.

10. Gharbia, S. E., M. Haapasalo, H. N. Shah, A. Kotiranta, K. Lounatmaa, M. A. Pearce, and D. A. Devine. 1994. Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infections. *J. Periodontol.* **65**: 56-61.
11. Gm. Jr., R., and C. Wyss. 1985. Monoclonal antibodies to characterize the antigenic heterogeneity of *Bacteroides intermedius*. p. 91-119. In A.J.L. Macario and E. Conway de Macario (ed.), *Monoclonal Antibodies Against Bacteria*, vol. I, Academic Press, New York.
12. Korniya, A., T. Kato, T. Nakagawa, A. Saito, J. Takahashi, S. Yamada, and K. Okuda. 2000. A rapid DNA probe method for detection of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontol.* **71**: 760-767.
13. 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.
14. Kook, J. K., H. K. Jung, J. H. Seong, J. B. Son, B. O. Kim, and D. K. Kim. 2002. Cloning of DNA probes for *Campylobacter rectus* ATCC 33238. *J. Korean Acad. Dent. Health.* **26**: 511-521.
15. Kook, J. K., J. J. Han, H. S. Kim, J. H. Seong, D. K. Kim, D. H. Baek, and S. J. Choe. 2003. Cloning of a potentially strain-specific DNA probe of *Prevotella intermedia* ATCC 25611 by inverted dot blot hybridization screening method. *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**: 282-286.
16. Krieg, N. R. 2001. Identification of Prokaryotes. p. 33-38. 2nd ed. In G. Garrity (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, Springer Verlag, New York.
17. Kononen, E. 1993. Pigmented *Prevotella* species in the periodontally healthy oral cavity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **6**: 201-205.
18. Lippke, J. A., M. N. Strzempko, F. F. Raia, S. L. Simon, and C. K. French. 1987. Isolation of intact high-molecular-weight DNA by using guanidine isothiocyanate. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2588-2589.
19. Moore, W. E. 1987. Microbiology of periodontal disease. *J. Periodontal. Res.* **22**: 335-341.
20. Moore, W. E., L. H. Moore, R. 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.
21. Mättö, J., M. Saarela, B. von Troil-Linden, E. Könönen, H. Jousimies-Somer, H. Torkko, S. Alaluusua, and S. Asikainen. 1996. Distribution and genetic analysis of oral *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol. Immunol.* **11**: 96-102.
22. Nakazawa, F., J. J. Zambon, H. S. Reynolds, and R. J. Genco. 1988. Serological studies of oral *Bacteroides intermedius*. *Infect. Immun.* **56**: 1647-1651.
23. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, p. 1.38-1.39. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
24. Savitt, E. D. and S. S. Socransky. 1984. Distribution of certain subgingival microbial species in selected periodontal conditions. *J. Periodont. Res.* **19**: 111-123.
25. 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.
26. Slots, J., A. Ashimoto, M. J. Flynn, G. Li, and C. Chen. 1995. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Clin. Infect. Dis.* **20**(suppl. 2): 304-307.
27. van Steenberg, T. J., C.A. Vlaanderen, and J. de Graaff. 1982. Deoxyribonucleic acid among strains of *Bacteroides melaninogenicus* and related species. *J. Appl. Bacteriol.* **53**: 269-276.
28. van Steenberg, T. J., U. Van der Velden, F. Abbas, and J. de Graaff. 1991. Microflora and bacterial DNA restriction enzyme analysis in young adults with periodontitis. *J. Periodontol.* **62**: 235-241.

(Received Feb. 13, 2003/Accepted May 10, 2003)