

Development of Quantitative Real-Time PCR Primers for Detection of *Prevotella intermedia*

Soon-Nang Park^{1,2,3} and Joong-Ki Kook^{1,2,3*}

¹Korean Collection for Oral Microbiology, ²Department of Oral Biochemistry, and ³Oral Biology Research Institute, School of Dentistry, Chosun University, 375 Seosuk-Dong, Dong-Gu, Gwangju 501-759, Republic of Korea

(received November 17, 2015; revised December 09, 2015; accepted December 11, 2015)

Prevotella intermedia-specific quantitative real-time PCR (qPCR) primers were previously designed based on the nucleotide sequences of RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*). However, the several clinical strains isolated from Korean populations are not detectable by the qPCR primers. The purpose of this study was to develop new *P. intermedia*-specific qPCR primers based on the *rpoB*. The specificity of the primers was determined by conventional PCR with 12 strains of *P. intermedia* and 52 strains (52 species) of non-*P. intermedia* bacteria. The sensitivity of primers was determined by qPCR with serial dilutions of the purified genomic DNAs (40 ng to 4 fg) of *P. intermedia* ATCC 25611^T. The data indicated that only *P. intermedia* strains were detected by the *P. intermedia*-specific qPCR primers (RTPiF2/RTPiR2); in addition, as little as 40 fg of *P. intermedia* genomic DNA could be detected. These results suggest that these qPCR primers are useful in detecting *P. intermedia* from the bacterial infectious lesions including dental plaque and oral tissue lesions.

Key words: *Prevotella intermedia*, *rpoB*, qPCR primers

서 론

*Prevotella intermedia*는 그람 음성 혐기성 간균으로 치주질환의 원인균 중 하나로 잘 알려져 있다. 실제로 *P. intermedia*는 성인성 치주염, 임신성 치은염, 급성괴사성 궤양성치은염(acute necrotizing ulcerative gingivitis) 및 HIV 연관성 치은염 등에 이환된 환자의 치은연하부위에서 빈번하게 검출되고 있으며, 구강 농양 병소에서도 검출됨이 보고되었다[1-3]. 최근 한국인의 치은염 환자를 대상으로 연구 결과에 의하면, *P. intermedia*가 치은연하 치면세균막에 존재할 경우 비외과적 치료 후 예후가 좋지 않다는 보고가 있다[4]. *P. intermedia*가 치주질환을 유발시키는데 있어서 중요한 독성인자로는 구강 상피세포에 침입[5], 내독소[6], succinate, isobutyrate, isovlerate 및 ammonia 등과 같은 독성 대사산물[7], 용혈소 및 적혈구 응집소[1] 등이 있다.

치주질환의 병인론 연구를 위한 선행 연구로써 치주질환과 밀접한 원인균종을 찾는 역학연구가 선행되어야 한다. 치주질환과 밀접한 관련이 있는 세균 종을 찾는 분자역학 연구를 수행하기 위해서는 많은 수의 샘플에서 세균 종을 신속 정확하게 검출할 수 있는 방법이 있어야 한다. 현재까지 개발된 여러 세균 검출법들 중에서 가장 신속 정확하고, 민감도가 높으며 정성 및 정량적 방법이 가능한 방법은 실시간 중합효소연쇄반응법(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)이라 할 수 있다. 최근 본 연구자 팀은

*Correspondence to: Joong-Ki Kook, Korean Collection for Oral Microbiology, Department of Oral biochemistry, and Oral Biology Research Institute, School of Dentistry, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju 501-759, Korea.
Tel.: +82-62-230-6877, Fax: +82-62-224-3706
E-mail: jkkook@chosun.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

DNA-dependent RNA polymerase beta-subunit 유전자 (*rpoB*) 핵산염기서열을 바탕으로 42종 구강 세균 중에 대한 중-특이 qPCR 프라이머 쌍들을 개발하여 소개하였다[8]. 그 논문에서 소개된 *P. intermedia* 중-특이 qPCR 프라이머 쌍인 Pi-F4와 Pi-R4는 75종(*P. intermedia* 포함) 구강 세균 표준균주와 *P. intermedia*를 포함하여 중-특이성 검사를 시행하여 *P. intermedia* 균주들(ATCC 25611^T와 ATCC 49046)의 지놈 DNA에서 PCR 산물이 증폭되었다. 하지만, 본 연구자팀의 후속 연구 과정 중 Pi-F4와 Pi-R4 프라이머 쌍은 한국인에서 분리동정된 *P. intermedia* 임상균주의 일부를 검출하지 못함을 알게되었다. 그러므로 본 연구는 *rpoB* 핵산염기서열을 바탕으로 *P. intermedia* 임상균주들까지 검출이 가능한 개선된 *P. intermedia* 특이적 qPCR 프라이머를 개발하기 위하여 시행하였다.

재료 및 방법

세균 및 세균 배양

본 연구에서 사용된 표준 균주들은 KCTC (Korean Collection for Type Cultures, Biological Resource Center, Korea), CCUG (Culture Collection, University of Göteborg, Sweden) 및 ATCC (Type Culture Collection, USA)에서 구입하여 사용하였다(Table 1). 또한 한국인유래 *P. intermedia* 임상균주들은 한국구강미생물자원은행(Korean Collection for Oral Microbiology, Gwangju, Korea)에서 분양받아 사용하였다.

Enterococcus spp., *Streptococcus* spp. 및 *Neisseria* spp. 균주들은 brain heart infusion (BHI, Difco Laboratories, Spark, MD,

Table 1. The bacterial strains used in this study

Species	strains	Species	strains
<i>Prevotella intermedia</i>	ATCC 25611 ^T , ATCC 49046, KCOM 1101, KCOM 1106, KCOM 1107, KCOM 1109, KCOM 1933, KCOM 1944, KCOM 1945, KCOM 1949, KCOM 2033, KCOM 2069	<i>Actinomyces naeslundii</i>	CCUG 20536 ^T
		<i>Tannerella forsythia</i>	ATCC 43037 ^T
		<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277 ^T
		<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ATCC 25586 ^T
		<i>Fusobacterium necrophorum</i>	ATCC 25286 ^T
		<i>Fusobacterium periodonticum</i>	ATCC 33693 ^T
		<i>Enterococcus faecalis</i>	KCTC 3206 ^T
<i>Prevotella baroniae</i>	CCUG 50418 ^T	<i>Treponema denticola</i>	ATCC 35405 ^T
<i>Prevotella bivia</i>	ATCC 29303 ^T	<i>Neisseria subflava</i>	ATCC 49275 ^T
<i>Prevotella brevis</i>	KCTC 5503 ^T	<i>Neisseria meningitidis</i>	ATCC 13077 ^T
<i>Prevotella buccae</i>	ATCC 33574 ^T	<i>Neisseria mucosa</i>	ATCC 19696 ^T
<i>Prevotella buccalis</i>	CCUG 15557 ^T	<i>Campylobacter rectus</i>	ATCC 33238 ^T
<i>Prevotella corporis</i>	ATCC 33547 ^T	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	ATCC 33624 ^T
<i>Prevotella dentalis</i>	ATCC 49559 ^T	<i>Capnocytophaga ochracea</i>	KCTC 5787 ^T
<i>Prevotella denticola</i>	CCUG 29542 ^T	<i>Streptococcus anginosus</i>	ATCC 700231 ^T
<i>Prevotella disiens</i>	CCUG 9558 ^T	<i>Streptococcus intermedius</i>	KCTC 3268 ^T
<i>Prevotella enoeca</i>	ATCC 51261 ^T	<i>Streptococcus constellatus</i>	ATCC 27823 ^T
<i>Prevotella heparinolytica</i>	ATCC 35895 ^T	<i>Streptococcus gordonii</i>	CCUG 33482 ^T
<i>Prevotella loescheii</i>	ATCC 15930 ^T	<i>Streptococcus mitis</i>	KCTC 3556 ^T
<i>Prevotella melaninogenica</i>	ATCC 25845 ^T	<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175 ^T
<i>Prevotella marshii</i>	CCUG E9.34 ^T	<i>Streptococcus oralis</i>	CCUG 13229 ^T
<i>Prevotella nigrescens</i>	NCTC 9336 ^T	<i>Streptococcus parasanguis</i>	CCUG 30417 ^T
<i>Prevotella oralis</i>	ATCC 33269 ^T	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CCUG 28588 ^T
<i>Prevotella oris</i>	CCUG 15405 ^T	<i>Streptococcus sanguinis</i>	CCUG 17826 ^T
<i>Prevotella oulorum</i>	ATCC 43324 ^T	<i>Streptococcus sobrinus</i>	ATCC 33478 ^T
<i>Prevotella pallens</i>	ATCC 700821 ^T	<i>Veillonella parvula</i>	KCTC 5019 ^T
<i>Prevotella ruminicola</i>	ATCC 19189 ^T	<i>Veillonella dispar</i>	KCOM 1301
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	ATCC 33384 ^T	<i>Eikenella corrodens</i>	KCOM 1378
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	ATCC 33389 ^T	<i>Gemella haemolysans</i>	KCOM 1381
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	CCUG 35333 ^T		

USA) 배지를 이용하여 37°C 호기성 세균배양기(Thermo Forma, Waltham, MA, USA)에서 배양하였으며, *A. actinomycetemcomitans* 균주들은 tryptic soy broth (TSB, Difco Laboratories)에 0.6% yeast extract, 5% horse serum, 75 µg/ml bacitracin 및 5 µg/ml vancomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA)이 첨가된 배지에, 그외 균주들은 TSB에 0.5% yeast extract, 0.05% cysteine HCl-H₂O, 0.5 mg/ml hemin 및 2 µg/ml vitamin K₁가 첨가된 배지에 85% N₂, 10% CO₂, 5% H₂가 공급되는 37°C 혐기성 세균배양기(Bactron I, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA)에서 배양하였다.

qPCR 프라이머 설계 및 종-특이성 검증

*P. intermedia*의 *rpoB* 핵산염기서열(GenBank accession no. JX480867)을 바탕으로 PrimerSelect 프로그램(DNASTAR Inc., USA)을 이용하여 qPCR 프라이머를 설계하였으며 다음과 같다; RTPi-F2, 5'-ACC CAT TGG CAG AAG TTA CG-3'; RTPi-R2, 5'-TCA ATA GGA CAC AAG CGA CCA TAG-3'. 예상되는 PCR 증폭물의 크기는 130 bp이다. 이때 설계된 primer 쌍은 Bioneer 사

(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 제작하였다.

세균의 지놈 DNA들은 CTAB 방법에 따라 추출하였다[9]. qPCR 프라이머(RTPi-F2/RTPi-R2)의 *P. intermedia*에 대한 종-특이성 검증은 일반적인 PCR법을 이용하였으며, Bioneer 사(Korea)의 AccuPower[®] PCR PreMix (Bioneer) 및 MyGenie[™] 96 Gradient Thermal Block을 사용하여 제조사에서 제시한 방법으로 실시하였다. 이때 PCR 반응 용액의 RTPi-F2와 RTPi-R2 프라이머들은 각각 최종 1 pmole/µl 씩 넣었으며, 세균 지놈 DNA들은 각각 2ng을 넣어서 반응을 시켰다. PCR 반응 조건은 95°C에서 10분간 전변성 처리하였고, 95°C에서 10초간 변성, 60°C에서 20초간 결합, 72°C에서 20초간 중합 과정을 30회 시행하고, 72°C에서 5분간 최종 중합과정을 시행하였다. PCR이 끝난 후 PCR 반응물 중 5 µl를 1.5% 아가로스 겔을 매질로, Tris-acetate buffer (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA, [pH8.0])를 전해질로 사용하여 100V에서 15분간 전기영동하였다. 증폭물을 GoodView[™] Nucleic Acid Stain (SBS Greentech, Beijing, China)으로 염색하여 UV transilluminator로 PCR 증폭 여부를 확인하였다.

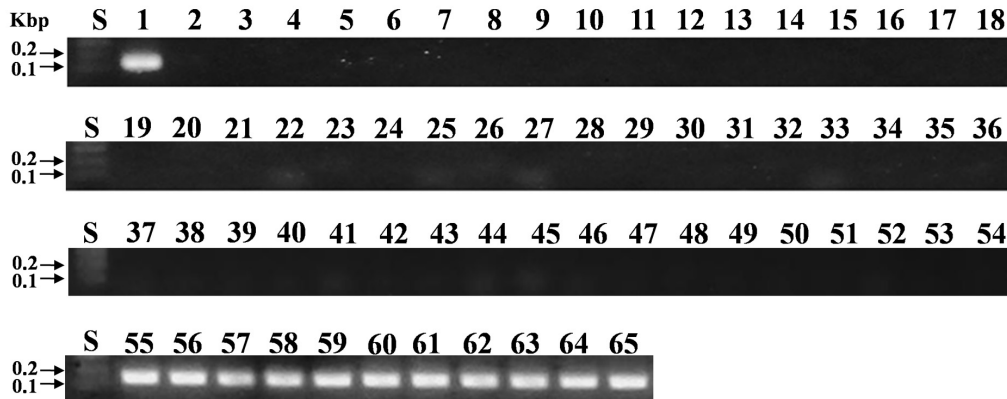


Fig. 1. Specificity tests of the *P. intermedia*-specific qPCR primers with 40 ng of each bacterial genomic DNA. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gels. Lanes: S, size marker (100 bp ladder); 1, *P. intermedia* ATCC 25611^T; 2, (-) control DDW; 3, *P. baroniae* CCUG 50418^T; 4, *P. bivia* ATCC 29303^T; 5, *P. brevis* KCTC 5503^T; 6, *P. buccae* ATCC 33574^T; 7, *P. buccalis* CCUG 15557^T; 8, *P. corporis* ATCC 33547^T; 9, *P. dentalis* ATCC 49559^T; 10, *P. denticola* CCUG 29542^T; 11, *P. disiens* CCUG 9558^T; 12, *P. enoeca* ATCC 51261^T; 13, *P. heparinolytica* ATCC 35895^T; 14, *P. loescheii* ATCC 15930^T; 15, *P. melaninogenica* ATCC 25845^T; 16, *P. marshii* CCUG E9.34^T; 17, *P. nigrescens* NCTC 9336^T; 18, *P. oralis* ATCC 33269^T; 19, *P. oris* CCUG 15405^T; 20, *P. oulorum* ATCC 43324^T; 21, *P. pallens* ATCC 700821^T; 22, *P. ruminicola* ATCC 19189^T; 23, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384^T; 24, *H. aphrophilus* ATCC 33389^T; 25, *A. odontolyticus* CCUG 20536^T; 26, *A. naeslundii* CCUG 35333^T; 27, *T. forsythia* ATCC 43037^T; 28, *P. gingivalis* ATCC 33277^T; 29, *F. nucleatum* ATCC 25586^T; 30, *F. necrophorum* ATCC 25286^T; 31, *F. periodonticum* ATCC 33693^T; 32, *E. faecalis* KCTC 3206^T; 33, *T. denticola* ATCC 35405^T; 34, *N. subflava* ATCC 49275^T; 35, *N. meningitidis* ATCC 13077^T; 36, *N. mucosa* ATCC 19696^T; 37, *C. rectus* ATCC 33238^T; 38, *C. gingivalis* ATCC 33624^T; 39, *C. ochracea* KCTC 5787^T; 40, *S. anginosus* ATCC 700231^T; 41, *S. intermedius* KCTC 3268^T; 42, *S. constellatus* ATCC 27823^T; 43, *S. gordonii* CCUG 33482^T; 44, *S. mitis* KCTC 3556^T; 45, *S. mutans* ATCC 25175^T; 46, *S. oralis* CCUG 13229^T; 47, *S. parasanguinis* CCUG 30417^T; 48, *S. pneumoniae* CCUG 28588^T; 49, *S. sanguinis* CCUG 17826^T; 50, *S. sobrinus* ATCC 33478^T; 51, *V. parvula* KCTC 5019^T; 52, *V. dispar* KCOM 1301; 53, *E. corrodens* KCOM 1378; 54, *G. haemolysans* KCOM 1381; 55, *P. intermedia* ATCC 49046; 56, *P. intermedia* KCOM 1101; 57, *P. intermedia* KCOM 1106; 58, *P. intermedia* KCOM 1107; 59, *P. intermedia* KCOM 1109; 60, *P. intermedia* KCOM 1933; 61, *P. intermedia* KCOM 1944; 62, *P. intermedia* KCOM 1945; 63, *P. intermedia* KCOM 1949; 64, *P. intermedia* KCOM 2033; 65, *P. intermedia* KCOM 2069.

qPCR

qPCR은 *AccuPower[®] GreenStar[™]* qPCR PreMix (Bionner, Korea) 및 *Exicycler[™] 96* Real-Time Quantitative Thermal Block(Bionner)을 이용하여 실시하였다. PCR PreMix에 RTPi-F2와 RTPi-R2 프라이머 각각 60 pmoles와 세균 유전체 40 ng에서 4 fg까지 10배씩 희석된 양을 각각 PCR tube에 넣고, DEPC water를 첨가하여 최종 반응물이 50 µl가 되도록 한 후 voltexing하고, 2,500 rpm에서 10초간 원심분리 하였다. qPCR 조건은 95°C에서 10분간 전변성 과정을 거친 후 95°C에서 10초간 변성, 60°C에서 20초간 결합, 72°C에서 20초간 중합 과정을 40회 반복하였으며, 60-94°C에서 1°C씩 1초간 스캔하여 melting curve를 분석하였다.

결 과

일반적인 PCR법으로 *P. intermedia*의 검출을 위해 설계된 qPCR 프라이머(RTPi-F2/RTPi-R2)의 중-특이성을 조사한 결과, *P. intermedia* 균주(표준균주를 포함한 서양인 유

래 2주 및 임상균주 10주)에서만 130 bp의 PCR 증폭물이 확인되었으며, 본 연구에서 사용된 *P. intermedia* 종 이외의 구강에 존재하는 52종(52 균주) 지놈 DNA에서는 PCR 증폭물이 확인되지 않았다 (Fig. 1).

본 연구에서 설계된 qPCR 프라이머 쌍(RTPi-F2/ RTPi-R2)의 최소검출한도를 측정하기 위해 *P. intermedia* ATCC 25611^T의 유전체 DNA를 40 ng부터 4 fg까지 10배씩 희석하여 qPCR을 수행하였다. 그 결과 RTPi-F2/ RTPi-R2 프라이머 쌍은 *P. intermedia* ATCC 25611^T 지놈 DNA 40 fg까지 검출할 수 있는 것을 확인하였다(Table 2 및 Fig. 2A).

qPCR 프라이머(RTPi-F2/RTPi-R2)에 의한 비특이적 PCR 산물 유무를 검증하기 위해 melting curve 분석을 실시한 결과, melting curve가 단일한 패턴을 보여 비특이적 PCR 산물이 증폭되지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 1B).

고 찰

본 연구 결과 *P. intermedia*를 중-특이적으로 검출하기

Table 2. Determination of C_T value for a dilution series of 40 ng of genomic DNA of *Prevotella intermedia* ATCC 25611^T

Genomic DNA amount	Cell number corresponding to DNA amount	C _T
40 ng	1.5 x 10 ⁷	12.6
4 ng	1.5 x 10 ⁶	16.4
400 pg	1.5 x 10 ⁵	19.8
40 pg	1.5 x 10 ⁴	23.1
4 pg	1.5 x 10 ³	26.8
400 fg	1.5 x 10 ²	30.1
40 fg	1.5 x 10 ¹	33.3
4 fg	1.5 x 10 ⁰	ND [†]
0	0	ND

[†]ND, not detected

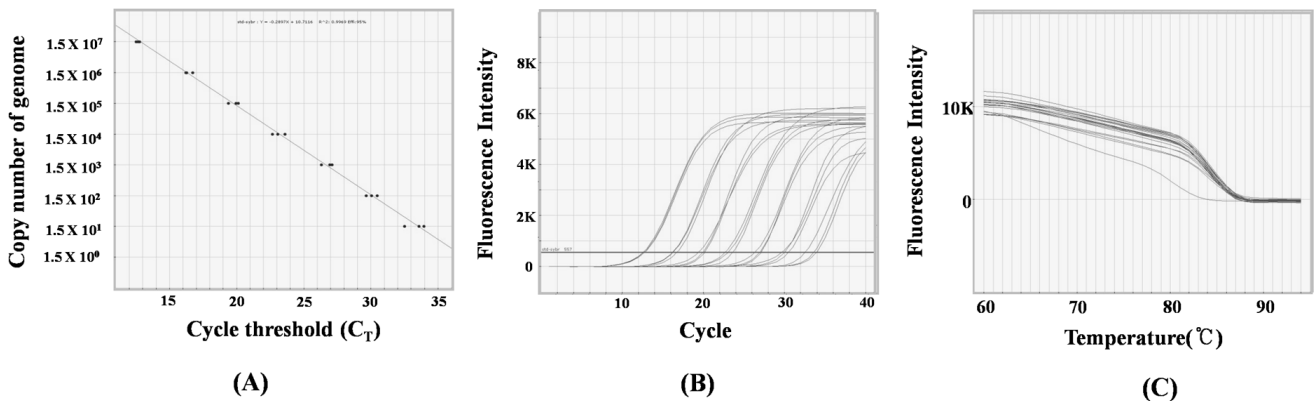


Fig. 2. Standard curve (A), amplification plot (B), and melting curve (C) were obtained by qPCR using the RTPi-F2/RTPi-R2 primers from 10-fold serial dilutions of genomic DNA of *Prevotella intermedia* ATCC 25611^T range from 40 ng to 4 fg. In the standard curve, the regression equation for the standard curve was: Y = -0.2897X + 10.7116. The R² value was 0.9969.

위해 설계된 RTPi-F2/RTPi-R2 프라이머는 qPCR에 의해 *P. intermedia* 지놈 DNA를 40 fg까지 중-특이적으로 검출할 수 있음을 알 수 있었다(Table 2 & Fig. 2). *P. intermedia* ATCC 25611의 세균 지놈 크기가 약 2.57 Mb (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_JAEZ00000000.1)인 점을 감안하면, RTPi-F2/RTPi-R2 프라이머 쌍은 *P. intermedia*를 qPCR법에 의해 15 균주에 해당하는 세균 지놈 DNA까지도 검출할 수 있음을 의미한다.

qPCR 프라이머 설계 시 여러 컴퓨터 프로그램을 사용하는 데, 프로그램에서 제시하는 최적결합온도(optimal annealing temperature)는 실제와는 다른 경우가 많다[10,11]. 본 연구에서도 PrimerSelect (DNASTAR Inc.)를 사용하여 얻은 RTPi-F2/RTPi-R2의 최적결합온도는 53.5°C였지만, 실제 최적결합온도는 60°C였다(data not shown). 즉, *P. intermedia*와 유전자 수준에서 가장 가까운 *P. nigrescens* ATCC 33563^T 균주와 *P. intermedia* ATCC 25611^T의 지놈 DNA를 이용하여 gradient PCR (결합온도를 51-62°C 사이에서 1°C 간격으로)을 실시하여, *P. intermedia* ATCC 25611^T의 지놈 DNA만 검출되는 온도 중 PCR 증폭물 밴드 진하기가 동일하게 유지되는 온도를 최종 결합온도로 정하였다. 이러한 결과들을 고려하면, 세균 중-특이 PCR (qPCR 포함) 최적결합온도를 정할 때에는 컴퓨터 프로그램에서 제시해주는 온도보다는 표적 세균 종 및 그와 가장 유전자 수준에서 가까운 종의 지놈 DNA를 이용한 gradient PCR을 수행하여 얻는 것이 더욱 효율적이라는 것을 알 수 있었다.

최근 16S ribosomal DNA gene (16S rDNA) 염기서열을 바탕으로 *P. intermedia*를 중-특이적으로 검출할 수 있는 qPCR 프라이머 쌍이 소개되었다[12]. 그 연구에서 소개된 qPCR 프라이머는 TaqMan 프로브법에 사용하기 위한 것이었으며, *P. intermedia*를 10²-10⁷ 마리에 해당하는 지놈 DNA를 10배씩 연속 희석하여 민감도를 측정하였다. 일반적으로 TaqMan 프로브 법은 qPCR 프라이머와 더불어 중-특이적 프로브를 더 이용하기 때문에 본 연구에서 이용한 SYBR Green 법에 비해 특이성이 더 좋은 것으로 알려져 있다. 하지만, *P. intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* 및 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 검출을 위한 두 방법을 비교한 연구 결과에 의하면, 두 방법의 특이성, 정확성 및 민감도의 차이가 유의성이 없었다[13]. TaqMan 프로브 법을 수행하기 위해서는 중-특이적 프로브가 필요하고, 프로브에 6-carboxylfluorescein와 6-carboxytetramethylrhodamine 같은 reporter 및 quencher 염색물질들이 필요하기 때문에 SYBR Green 법에 비해 번거롭고 비경제적이다. 그러므로 많은 수의 구강 내 세균

감염성질환 병소 샘플에서 구강 세균 종을 정성 및 정량적으로 비교하기 위해서는 SYBR Green 법을 이용하는 것이 실용적이라 생각된다.

qPCR 프라이머를 설계하기 위해서는 표적 유전자가 있어야 한다. 현재까지 가장 많이 선호되는 표적 유전자는 16S rDNA이다. 왜냐하면, 16S rDNA는 세균분류학적 측면에서 기준이 되고, 같은 종에 속하는 균주들간에 상동성이 잘 보존되어 있으며, 지금까지 알려진 최소한 모든 세균 종 표준균들의 핵산염기서열이 알려져 있어 프라이머 제작이 용이 하기 때문이다[14,15]. 하지만 16S rDNA는 세균 종간에 copy 수에 차이가 있기 때문에 임상 샘플에서 세균 종들의 정량적 비교에는 한계가 존재한다. 또한, 특정 세균 종들간의 16S rDNA 핵산염기서열 상동성이 99.9% 이상인 경우가 있기 때문에 중-특이 qPCR 프라이머 설계가 불가능할 경우가 있다[16]. 16S rDNA의 qPCR 프라이머 설계 시 표적유전자로서의 단점을 보완할 수 있는 표적유전자가 *rpoB*이다. 즉, *rpoB*는 16S rDNA와 같이 세균분류학적 측면에서 세균 종내 핵산염기서열 상동성이 잘 보존되어 있고, 대부분의 세균들에서 copy 수가 하나이기 때문에 임상 샘플에서 세균 종의 존재 비율을 정량적으로 정확히 비교할 수 있다는 장점이 있다[17]. 하지만, 모든 세균 종 표준균주들에 대한 *rpoB* 핵산염기서열이 결정되지 않은 단점은 있다. 그러므로 향후 모든 세균 종 표준균주들에 대한 *rpoB* 핵산염기서열이 결정되어 데이터베이스화된다면 16S rDNA를 대신해서 *rpoB*가 세균 중-특이 qPCR 설계를 위한 표적 유전자가 될 것으로 생각된다.

이상의 연구결과를 요약하면, 본 연구에서 개발된 *P. intermedia* 중-특이 qPCR 프라이머(RTPi-F2/RTPi-R2)는 종 특이성 및 균주 15 마리까지 검출할 수 있는 높은 민감도를 갖는 것이 확인되었으며, 향후 치주질환을 포함한 구강 내 세균감염정질환의 분자역학 연구에 있어서 *P. intermedia*를 중-특이적으로 검출하는 데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2015학년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interest.

References

1. Okamoto M, Maeda N, Kondo K, Leung KP. Hemolytic and hemagglutinating activities of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. FEMS Microbiol Lett. 1999;178: 299-304.
2. Papapanou PN, Neiderud AM, Papadimitriou A, Sandros J, Dahlén G. "Checkerboard" assessments of periodontal microbiota and serum antibody responses: a case-control study. J Periodontol. 2000;71:885-897. doi:10.1902/jop.2000.71.6.885.
3. 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;44:41-43.
4. Kook JK, Sakamoto T, Nishi N, Kim MK, Seong JH, Son YN, Kim DK. 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. 2005;49:9-16. doi: 10.1111/j.1348-0421.2005.tb03634.x. Erratum in: Microbiol Immunol. 2005; 49:295. doi: 10.1111/j.1348-0421.2005.tb03634.x.
5. Dorn BR, Leung KL, Progulsk-Fox A. Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. Infect Immun. 1998;66:6054-6057.
6. Kim SJ, Ha MS, Choi EY, Choi JI, Choi IS. *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide stimulates release of nitric oxide by inducing expression of inducible nitric oxide synthase. J Periodontal Res. 2004;39:424-431. doi: 10.1111/j.1600-0765.2004.00757.x.
7. Saito K, Takahashi N, Horiuchi H, Yamada T. Effects of glucose on formation of cytotoxic end-products and proteolytic activity of *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Porphyromonas gingivalis*. J Periodontal Res. 2001;36:355-360. doi: 10.1034/j.1600-0765.2001.360602.x.
8. Park SN, Lim YK, Kook JK. Development of quantitative real-time PCR primers for detecting 42 oral bacterial species. Arch Microbiol. 2013;195:473-482. doi: 10.1007/s00203-013-0896-4.
9. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel FM, Brent R, editors. Current Protocols in Molecular Biology. New York: Greene Publ. Assoc. and Wiley Interscience; 1990. p. 241-245.
10. Kim SG, Kim SH, Kim MK, Kim HS, Kook JK. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using species-specific 16S rDNA primers. J Microbiol. 2005;43:209-212.
11. Shin HS, Kim MJ, Kim HS, Park SN, Kim DK, Baek DH, Kim C, Kook JK. Development of strain-specific PCR primers for the identification of *Fusobacterium nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T and subsp. *vincentii* ATCC 49256^T. Anaerobe. 2010;16:43-46. doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.04.003.
12. Kuboniwa M, Amano A, Kimura KR, Sekine S, Kato S, Yamamoto Y, Okahashi N, Iida T, Shizukuishi S. Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. Oral Microbiol Immunol. 2004;19:168-176. doi: 10.1111/j.0902-0055.2004.00135.x.
13. Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y, Maeda T, Kokeguchi S, Petelin M, Arai H, Tanimoto I, Nishimura F, Takashiba S. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* gene and total bacteria. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003;39:81-86. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00224-4.
14. Woese CR. Bacterial evolution. Microbiol Rev. 1987;51: 221-271.
15. Krieg NR. Identification of Procaryotes. In Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM, editors. Bergeys manual of systematic bacteriology. 2nd ed. vol. 1. New York: Springer; 2001. p. 33-38.
16. Park SN, Park JY, Kook JK. Development of *Porphyromonas gingivalis*-specific quantitative real-time PCR primers based on the nucleotide sequence of *rpoB*. J Microbiol. 2011;49:315-319. doi: 10.1007/s12275-011-1028-y.
17. Severinov K, Mustaev A, Kukarin A, Muzzin O, Bass I, Darst SA, Goldfarb A. Structural modules of the large subunits of RNA polymerase. Introducing archaeobacterial and chloroplast split sites in the beta and beta' subunits of *Escherichia coli* RNA polymerase. J Biol Chem. 1996; 271:27969-7974.