

Prevotella intermedia에서의 Hemin 결합 단백질 유전자의 분리 및 염기서열 분석

김 신¹ · 김성조²

부산대학교 치과대학 ¹소아치과학교실, ²치주과학교실

국문초록

본 연구는 치주질환 주요 병인균주 중의 하나인 *P. intermedia*를 대상으로 하여, 이 균주에서의 hemin 결합 단백질 유전자를 분리하고 염기서열을 결정하기 위하여 수행되었다. 본 연구에서는 약 5,000개의 recombinant colony들을 스크리닝하여 hemin 결합 단백질 유전자를 포함하고 있는 것으로 여겨지는 1개의 클론(pHem1)을 확인하였다. Restriction enzyme mapping 결과 pHem1의 insert DNA의 크기는 약 2.5kb이었으며, *P. intermedia* chromosomal DNA 내에는 hemin 결합 단백질 유전자가 single copy로 존재하였고, transcript의 크기는 약 1.8kb이었다. 분리한 pHem1 유전자는 1개의 ORF를 가지고 있으며, ORF의 크기는 2,550bp로 약 850개의 아미노산 폴리펩타이드로 구성되어 있다. 또한, pHem1 유전자는 이미 밝혀진 다른 유전자들과 상동성을 보이지 않았다. 본 연구는 *P. intermedia*에서의 porphyrin 생리 및 hemin 획득기전을 분자생물학적으로 규명하는데 있어 중요한 의의가 있으리라 사료된다. 향후 pHem1 유전자의 특성 분석 등이 수행되어야 할 것으로 여겨진다.

주요어 : Hemin, Hemin 결합 단백질, *Prevotella intermedia*, 유전자 클로닝

I. 서 론

생명체에 있어 필수 영양소로서 중요한 역할을 하는 철분은 세균의 성장과 대사에 영향을 미쳐 감염성질환의 발병과 진행에 있어 중요한 요소로 작용한다^{1,2)}. 숙주 내에는 세포 내부 및 외부에 철분이 풍부하게 존재하지만, 항균기전의 일환으로 세균에 대해서는 이에 대한 접근이 매우 제한되어 있다. 실제로, 숙주 내에서 실제 활용 가능한 유리 hemin 및 철분의 농도는 매우 낮아, 유리철분의 경우 단지 10^{-18} M 정도로³⁾, 이는 세균의 성장에 있어 필요한 수준인 10^{-6} M ($0.2\sim 4\ \mu\text{M}$)에 크게 미달한

다. 따라서, 세균 특히 병원성세균들은 이러한 철분이 제한된 숙주 내 환경에서 서식하고 병원성을 발휘하기 위해, 필수 영양소인 철분을 숙주로부터 획득하기 위한 고도의 친화력을 갖는 철분 획득기전들을 소유하고 있다.

치주질환은 만성 염증성 질환으로 치은 결합조직과 치조골의 파괴를 초래하며, 방치 시 치아의 상실을 야기할 수도 있다³⁾. 치주질환의 주 원인요소는 치은 열구 내에 존재하는 특정 그람 음성 혐기성 세균이다. *Prevotella intermedia*는 치주질환 주요 병인균주 중의 하나로 성인성 치주염 환자의 치주낭 내에 우세하게 존재한다^{4,6)}. 또한, *P. intermedia*는 급성괴사성 궤양성 치은염과 임신성 치은염과도 연관이 있다^{7,8)}.

*P. intermedia*를 포함한 black-pigmented Bacteroides는 유리철분을 활용하지는 못하고, siderophore를 생성하지 않으며, hemin 의존성으로 철분 공급원으로 hemin이 필수적인데, 이는 hemin과 protoheme의 구성요소인 porphyrin ring을 생성하는 능력이 이들 균주에 결여되어 있는 것에 기인하는 것

교신저자 : 김 신

부산시 서구 아미동 1-10
부산대학교 치과대학 소아치과학교실
Tel: 051-240-7449
E-mail: shinkim@pusan.ac.kr

※ 이 논문은 2001년도 부산대학교병원 의학연구소 연구비(2001-01-31)에 의하여 연구되었음.

로 여겨지며, 이들 균주는 electron transport system에 있어 주요한 구성요소 중의 하나인 cytochrome을 hemin으로부터 형성할 수 있다. 실제 치주병소 부위에는 만성염증의 결과로 국소출혈이 일어나고, 적혈구가 용해되어 hemin이 유리되며, 유리된 heme이 병원 균주를 위한 철분 공급원으로 활용될 수 있다.

Hemin 획득에 있어서의 최초의 단계는 세포표면에 hemin이 결합되는 것이다. 이 과정에서 hemin 고갈 상태에서 증가되어 발현되는 세포막단백질이 hemin의 결합 및 이동에 관여할 수 있다⁹⁻¹¹. *P. intermedia*가 heme 의존성으로 *in vitro*에서 성장을 위한 유일한 철분 공급원으로 hemin을 활용함이 이미 오래전부터 알려져 왔음에도 불구하고, 이 균주에 있어서의 hemin 획득 기전에 관하여는 최근까지 별로 알려진 바가 없다. *P. intermedia*의 세포표면에 hemin 결합을 위한 기전이 존재하여, 세포외막에 존재하는 hemin 결합 단백질에 의해 hemin의 결합과 획득이 일어날 수 있다.

본 연구는 치주질환 주요 병원균주 중의 하나인 *P. intermedia*를 연구대상으로 하여, 이 균주에서의 hemin 결합 단백질을 유전자를 분리하고 염기서열을 결정하기 위해 수행되었다. 이는 이 균주에서의 porphyrin 생리 및 hemin 획득기전을 규명하는데 있어 중요한 의의가 있으리라 사료된다.

II. 연구대상 및 방법

1. 균주 및 배양조건

사용된 *P. intermedia* strain은 ATCC 25611이었으며, 이들 균주를 hemin(5 µg/ml)과 menadione(1 µg/ml)이 포함된 enriched trypticase soy agar 또는 2.1%(w/v) Mycoplasma broth base(BBL, Becton Dickinson, Cockeysville, MD)를 이용하여, 37°C의 혐기성 glove box (10% H₂/10% CO₂/80% N₂) 내에서 배양하였다. 세균의 성장은 660 nm 파장에서의 흡광도를 측정하여 결정하였다. pUC18 plasmid를 위한 host strain으로는 *Escherichia coli* DH5α (*supE44 ΔlacU169 (φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*)를 활용하였다. *E. coli* DH5α는 LB 배지(1% tryptone, 1% sodium chloride, 0.5% yeast extract)에서 배양하였다.

2. DNA 분리

Marmur¹²의 방법을 이용하여 *P. intermedia*로부터 chromosomal DNA를 분리하였으며, plasmid DNA의 추출 및 기타 분자생물학적인 기법은 Sambrook과 Russell¹³의 방법에 의거하였다.

3. *P. intermedia*의 genomic library의 제조 및 형질전환

*P. intermedia*로부터 분리한 chromosomal DNA를 *Sau3A*I로 부분 절제한 후 3-10kb 크기의 DNA를 electrolution하고, *Sa*II로 절제한 pUC18 vector에 ligation하여 genomic DNA library를 제조하였고, *E. coli* DH5α에 형질전환하여 사용하였다. 형질전환은 Sambrook과 Russel¹³의 방법에 의하였다. 간략히 소개하면, 대장균 세포를 log phase까지 성장시킨 후 원심분리하여 세포를 회수하고, 이를 calcium chloride buffer(pH 7.5)에 ml 당 5~7×10⁸의 밀도로 분산시켜 얼음 속에서 60분간 처리한 후, library DNA를 넣고 역시 얼음 속에서 30분간 위치시켰다. 그 후 42°C에서 2분간 열처리하고, LB media를 첨가하여 37°C에서 1시간 배양한 다음, ampicillin을 포함한 LB plate에 plating하여 37°C에서 밤새 배양하였다. LB plate에는 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactopyranoside(X-gal)와 isopropyl beta-D-thiogalactoside(IPTG)도 포함되어 있었으며, 배양종료 후 white colony만 선택하여 모았다.

4. Hemin 결합 clone의 확인

White colony들을 hemin(5 µg/ml)과 ampicillin(50 µg/ml)을 포함하고 있는 LB plate에 replica plating하여 37°C의 배양기 내에서 7일 간 배양한 후, 짙은 갈색을 보이는 colony를 선택하였다.

5. Restriction endonuclease analysis와 Southern hybridization

Sambrook 등¹³의 방법에 따라 DNA를 여러 제한효소로 반응시킨 후 전기영동하고, 변성시킨 후 중화하여 nitrocellulose filter에 옮겼다. 그 후 random primer로 labeling한 DNA probe와 hybridization 시키고 X-ray film(X-Omat, Kodak)에 노출시켰다.

6. Random priming

DNA labeling은 Feinberg와 Vogelstein¹⁴의 방법으로 수행하였다. 간략히 소개하면, 30 µCi α-³²P dATP와 Klenow enzyme 2 unit을 포함하고 있는 20 µl의 standard random priming buffer와 클로닝 한 DNA 50 ng을 37°C에서 1시간 반응시켰다.

7. Northern hybridization

Total RNA는 Jang 등¹⁵의 방법으로 분리하였다. 분리한 RNA를 formaldehyde로 변성시켜 1.2% formaldehyde

agarose gel에서 전기영동 한 후 nitrocellulose filter에 옮겼다. 그 후 random primer로 labeling한 DNA probe와 68°C에서 12시간 반응시키고, primary washing solution(2X SSPE와 0.1% SDS)과 secondary washing solution(0.2X SSC와 0.01% SDS)으로 nitrocellulose filters를 각각 세척한 후, nitrocellulose filters를 plastic wrap으로 포장하여 X-ray film (X-Omat, Kodak)에 12시간 동안 노출시켰다.

8. 염기서열 결정 및 분석

Sanger 등¹⁶⁾의 dideoxy-chain termination 방법에 따라 pHem1 DNA를 Sequenase version 2.0 nucleotide sequencing kit(United States Biochemicals, Cleveland, OH)으로 처리한 후, DNA sequencer인 ABI Prism 310 (Perkin-Elmer Corporation, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 염기서열의 분석은 NCBI의 BLAST에 의하였다.

III. 연구성적

1. Hemin 결합 유전자의 분리

*SaII*으로 절제한 pUC18 vector에 *Sau3AI*으로 부분 절제한 *P. intermedia* chromosomal DNA를 ligation하여 genomic DNA library를 만들었다(Fig. 1). 이 genomic DNA library

를 *E.coli* DH5 α 에 형질전환하여 얻은 약 5,000개의 transformants를 hemin plate에 replica plating 하여 짙은 갈색을 보이는 colony를 분리하였다. 분리한 클론을 pHem1으로 명명하였고, restriction enzyme mapping 결과 pHem1의 insert DNA의 크기는 약 2.5kb이었다.

pHem1의 insert DNA가 *P. intermedia* chromosomal DNA 내에 single copy로 존재하는지를 알기 위하여 southern hybridization을 수행하였다. pHem1 DNA를 *EcoRI* 과 *XhoI* 과 반응시켜 0.7% low melting agarose gel에서 전기영동한 후, 2.5kb insert DNA를 추출하였다. Chromosomal DNA를 여러 제한 효소로 처리한 후 0.7% agarose gel에서 전기영동하고, random primer방법으로 labeling한 probe DNA와 hybridization하였다(Fig. 2). *P. intermedia* chromosomal DNA 내에는 hemin 결합 단백질 유전자가 single copy로 존재하였다.

2. pHem1의 transcript 크기 확인

*P. intermedia*에서 total RNA를 분리하여 formaldehyde로 변성시킨 1.2% agarose gel에서 전기영동한 후 nitrocellulose filter에 옮겨, 2.5kb probe DNA와 hybridization하였다. RNA standard marker인 28S와 18S RNA와 size를 비교한 결과 transcript의 크기는 약 1.8kb이었다(Fig. 3).

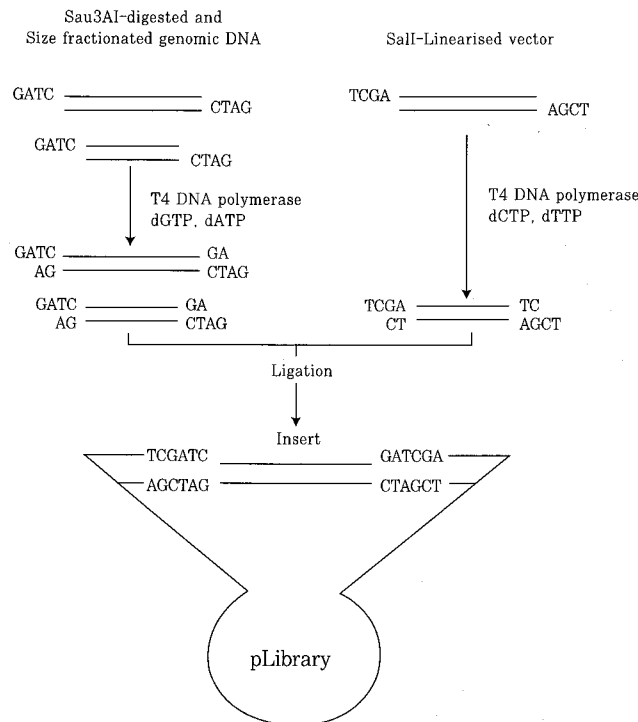
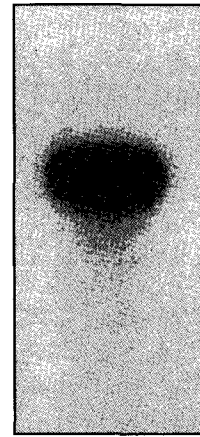
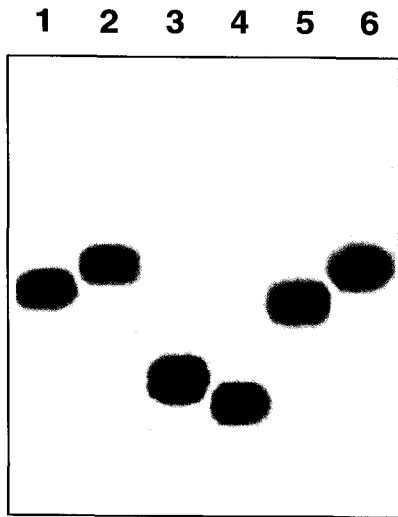


Fig. 1. Clonic strategy for hemin-binding protein gene.



← 1.8 kb

Fig. 2. Southern hybridization of cloned DNA. The total chromosomal DNAs were digested with various restriction enzymes, electrophoresed on a 0.7% agarose gel, transferred to nitrocellulose filter, and then hybridized with a ³²P-labeled 2.5kb DNA probe. Final washes were under high stringency conditions. Lane 1, genomic DNA digested with *Bam*HI; 2, *Bgl*II; 3, *Eco*RI; 4, *Hin*dIII; 5, *Pst*I; 6, *Pvu*II.

Fig. 3. Northern blot analysis of isolated gene. Total RNA was isolated, electrophoresed, transferred onto nitrocellulose filters, and then hybridized with the radiolabeled DNA probe. The 1.8 kb transcript is indicated.

```

2101 aaatcaccctg gaaaaaagc gggtaaccg ctgcccttgg cgtttttct gggcaagaag
2111 tctcgaagat ttccgagga gggcggaaq aaatlatcag aatggggct agaattttta
2221 agaacagcttc gttataatgg tgcctgacc ttccagcaga agtaccaaaa ctggccctgaa
2281 gcalcaagcgg tggatctctc cpalgctcgg ctggagctcg agcaccctga tggccgcttc
2341 gatllaaaaa cggatgatcgg atlltttccg gacctcgata ccgacagcgc gacagatcca
2401 cggacttggg cagctggcctc gaggccctc gaaactcttg tggccacct tgaagagctg
2461 gcccagcagc tccgtgctcg gggcggccag gggagcgcgc actgctggag gatccatca
2521 gctcgcacctc ctggcctggc ctgatccacc ccggcctga cccagagga cggccgcaa
2581 aatcctgctc agccgctgt ctggcggag ccagccgca gcccaccaac aagcccacg
2641 cccagaggtt cggagccga cgtcacttag ctccagctg cccagagacc tccgcccga
2701 aggcctgcta aaggagcgg aacagctaga aagccagctcc gggaaacgg tgcgaccctc
2761 gplgaaigt cagctactgg gctactgga caagggnaa ccgacgcca aagaaagac
2821 agttagctc cactgacct adttgggat ctggttaagf tggaaaccc tcaaatlta
2881 ggaacccgaa attccagct gggccacct ctggttaagf tggaaaccc tcaaatlta
2941 actgagctgc tttctggcc ccaagctctc gatgaccag ggcctcaact ccttctctga
3001 tctcctgccc gpatgctcg cgttactctc cagcctgag agccgacag tcaaggagag
3061 cgtctagctc gtcggcaaa ctllctgct ttcccaagag aatctgctc cacttctctg
3121 cggactcgg gaaggaagc tgatctctc ggtcaagca gtcctgccc agcctgcca
3181 ggaatcggc ctctgctggc aagtggcag agagccgag ctgctgacc tgaagtgag
3241 cggcagcgc gactgctg aacctcag tccactgag gcccagctc ctggcaaac tccaaaac
3301 cggcaaac cagcctgag tccagcctc tccactgag gcccagctc ctggcaaac tccaaaac
3361 atcgaactc ttaactaga taagtgact gctcctact ctactctac tctcctgac
3421 tctcactcg gaaactgac agcctgctc atccagcga cctctgagc tgcagagctg
3481 ggcctgctg tccgactct gctaccctc ctccagcag tccatgccc gaagpactg
3541 atcccagctc agctgacct actgacagc ctctatgga tcatcagct tcttggccc
3601 cagatcttg gcccactctc tgcactctc ggaagccac ccagctgctc ggcctcctc
3661 ggaagcga cgtactgctc actgctctc gactgagc acagctgtg gcttttacc
3721 ctcccccgc cgttgcagc cactaccgc gcccagacc ccctcaccg gacpcttacc
3781 cccagacta ctcccccga tccagcga aaacgctacc ggtgctcgg ccatctgac
3841 gggctgcca tgaatcggc tccgcaatc ggggctctt tgggggggt ctcccgcat
3901 ctgcaatcc tctcggccc cgcctgccc gaaatcacc tctactcag cagpactct
3961 ctggtgaga cggcccacc gggcagcacc gctcagcag cccagcacc cgttcagc
4021 aaggaagcc cagtgcggg gactgctc ctctcagc tcttggatc cgtgagctc
4081 atggcaag caccagctc caactggctc ctctcagc agcagcctc cactgaaac
4141 cccgtcgaag cagactctc gctactgctc ttccagctg tgcagctat cgtgcaagc
4201 gactgacc gacactctc gtcgggact gggcagacc gggcactct cgtctgact
4261 cccgagcgc ccaatggact cactgctct ggcctcctc ccagcactg gactgacta
4321 cagatctcg cagcctcgg actccagc atcacttgc ccgactgca gactgctc
4381 tggagcgcg ccccagca gggcagcaga cctctcagg gaaacttcc aagcctgacc
4441 agcctcact cactcactc cccgtcacc ttccagcga ttttgcact caccgaaag
4501 atggcaag caccagctc caactggctc ctctcagc agcagcctc cactgaaac
4561 atgactgag agactgctc ctccagcga tctcagctg tgcagctat cgtgcaagc
4621 atggcagc atcctctc caccgctca gttctcagc gggcactga gggcagctc
4681 cggagcag gatctcgtc gggcagcgc aggtccgact aaggcagct gaagagcaa
4741 ccccgctcg cagctggccc tacttacc atcctgccc gctgagccc ttggatcacc
4801 caaggaagt ctaccgaac cctttggcaa aatcctgct atctgagca aaggttga
4861 tatacggaaa aatctgctc actgcccgc aagcaggtt atgagcagc aagcctga
4921 ccaaatccc ttaagctgag ttctgctc actgagcgc agcagcctc gaaagctca
4981 aagactctc ttgactctc tttttctc ggtgactg ctgctgca acaaaaac
5041 cccgctacc agcctgctc tgttggccc atcagagct accactctc tttccagc
5101 taactgctc cagcagcgc cagatccca atactgctc tctagctag cctgctg
5161 gcccactc cagcagctc ctgagcgc ctactact cctctgctc atctctacc
5221 cagtggctc tgcagctg gaaagctc gttctaccg ttggactca agcagctg
5281 taccgataa ggcagcgc tccgctgaa cgggggctc gtcacagc cccagctg
5341 cccagcgc ctaccagca ctgagatcc taccagctg cacttgaaa agcctcagc
5401 tccagcgc gaaagcgc gacagctc cgttagcgc cagctgca cagcagc
5461 gcccagcgc gctccagc gaaagcctc gctatctc tactctc gcttctc
5521 acctgact tgaagctc tttttgact pctctcagc gggcagcgc ctctgaaa
5581 cccagcgc cggcctctc ttaagctc tggcctctc ctggctctc gctactg
5641 tcttctgctc gttactcctc gattctgctc ataccgctc taccgctctc gactgactc
5701 ataccgctc cccagcgc cagcagcgc gggcagctc agtggcgc gaaagcagc
5761 agcccactc cccagcgc cctctcagc cggctgccc gattctacc tgcagctc
5821 agcagctc tcccagctc aagcagcgc gtagcagca cgaactctc ctgactc
    
```

Fig. 4. Nucleotide sequence of cloned gene. Box indicates initiation codon.

3. pHem1의 염기서열 결정

Sanger 등¹⁶⁾의 dideoxy-chain termination 방법에 따라 pHem1 DNA를 Sequenase version 2.0 nucleotide sequencing kit(United States Biochemicals, Cleveland, OH)으로 처리한 후, DNA sequencer인 ABI Prism 310 (Perkin-Elmer Corporation, USA)을 이용하여 염기서열을 결정하였다. pHem1 유전자는 1개의 ORF를 가지고 있으며, ORF의 크기는 약 2,550bp로 850여개의 아미노산 폴리펩타이드로 구성되어 있다. NCBI program을 이용하여 BLAST search를 한 결과 pHem1 유전자는 이미 밝혀진 다른 유전자들과 상동성을 보이지 않았다.

IV. 총괄 및 고찰

염증성 치주질환에 있어 주요 병인균주 중의 하나인 *P. intermedia*는 우리 철분을 활용하지는 못하며, 성장을 위한 유일한 철분 공급원으로 hemin을 활용함이 이미 오래 전부터 알려져 왔음에도 불구하고, 이 균주에 있어서의 hemin 획득 기전에 관하여는 최근까지 별로 알려진 바가 없다. 다른 hemin 의존성 균주에서의 연구결과들을 종합하여 보면 *P. intermedia*에 있어서도 hemin 획득기전에 있어 최초의 단계라 할 수 있는 hemin 결합 단백질이 세포막 상에 존재할 수 있다. 본 연구는, 치주질환 주요 병인균주 중의 하나인 *P. intermedia*를 연구대상으로 하여, 이 균주에서의 hemin 결합 단백질 유전자를 분리하고 염기서열을 결정하기 위해 수행되었다.

본 연구에서는 Hanson과 Hansen¹⁷⁾의 방법에 의거하여 hemin 결합 단백질 유전자의 클로닝을 수행하였다. 이들은 *Hemophilus influenza*에서의 hemin 결합단백질 유전자의 클로닝을 위해, recombinant colony들을 hemin이 함유되어 있는 LB-amp agar plate에 replica plating하여 수일 간 배양한 후, hemin 결합과 관련되어 특징적으로 나타나는 짙은 갈색의 착색을 보이는 colony를 putative clone으로 선택하였다. 본 연구에서도 이러한 방법에 의해 약 5,000개의 recombinant colony들을 스크리닝하여, hemin 결합 단백질 유전자를 포함하는 것으로 여겨지는 1개의 클론(pHem1)을 확인하였다.

Restriction enzyme mapping 결과 pHem1의 insert DNA의 크기는 약 2.5kb이었으며, *P. intermedia* chromosomal DNA 내에는 hemin 결합 단백질 유전자가 single copy로 존재하였고, transcript의 크기는 약 1.8kb 이었다. 분리한 pHem1 유전자는 1개의 ORF를 가지고 있으며, ORF의 크기는 약 2,550bp로 850여개의 아미노산 폴리펩타이드로 구성되어 있다. NCBI program을 이용하여 BLAST search를 한 결과 pHem1 유전자는 이미 밝혀진 다른 유전자들과 상동성을 보이지 않았다.

치주질환 주요 병인균주 중의 하나인 *P. intermedia*에서의 hemin 결합 단백질 유전자를 분리하여 염기서열 결정을 수행

한 본 연구는 이 균주에서의 porphyrin 생리 및 hemin 획득기전을 분자생물학적으로 규명하는데 있어 중요한 의의가 있으리라 사료된다. 향후 pHem1 유전자의 특성 분석 등이 수행되어야 할 것으로 여겨진다.

V. 결 론

본 연구는 치주질환 주요 병인균주 중의 하나인 *P. intermedia*를 연구대상으로 하여, 이 균주에서의 hemin 결합 단백질 유전자를 분리하고 염기서열을 결정하기 위해 수행되었다. 본 연구에서는 약 5,000개의 recombinant colony들을 스크리닝하여 hemin 결합 단백질 유전자를 포함하고 있는 것으로 여겨지는 1개의 클론(pHem1)을 확인하였다. Restriction enzyme mapping 결과 pHem1의 insert DNA의 크기는 약 2.5kb이었으며, *P. intermedia* chromosomal DNA 내에는 hemin 결합 단백질 유전자가 single copy로 존재하였고, transcript의 크기는 약 1.8kb 이었다. 분리한 pHem1 유전자는 1개의 ORF를 가지고 있으며, ORF의 크기는 2,550bp로 약 850개의 아미노산 폴리펩타이드로 구성되어 있다. 또한, pHem1 유전자는 이미 밝혀진 다른 유전자들과 상동성을 보이지 않았다. 본 연구는 *P. intermedia*에서의 porphyrin 생리 및 hemin 획득기전을 분자생물학적으로 규명하는데 있어 중요한 의의가 있으리라 사료된다. 향후 pHem1 유전자의 특성 분석 등이 수행되어야 할 것으로 여겨진다.

참고문헌

1. Bullen JJ : The significance of iron in infection. Rev Infect Dis, 3:1127-1138, 1981.
2. Weinberg ED : Iron and infection. Microbiol Rev, 42:45-66, 1978.
3. Williams RC : Periodontal disease. N Engl J Med, 322:373-381, 1990.
4. Tanner ACR, Haffer C, Bratthall GT, et al. : A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. J Clin Periodontol, 6:278-307, 1979.
5. Slots J, Bragd L, Wikstrom M, et al. : The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. J Clin Periodontol, 13:570-577, 1986.
6. Socransky SS, Haffajee AD : The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. J Periodontol, 63:322-331, 1992.
7. Chung CP, Nisengard RJ, Slots J, et al. : Bacterial IgG and IgM antibody titers in acute necrotizing ul-

- cerative gingivitis. J Periodontol, 54:557-562, 1983.
8. Kornman KS, Loesche WJ : The subgingival microbial flora during pregnancy. J Periodont Res, 15:111-122, 1980.
 9. Kim SJ, Chung HY : Isolation and characterization of a putative hemin-binding protein from *Prevotella intermedia*. 대한치주과학회지, 30:737-746, 2000.
 10. Kim SJ, Chu L, Holt SC : Isolation and characterization of a haemin-binding cell envelope protein from *Porphyromonas gingivalis*. Microb Pathog, 21:65-70, 1996.
 11. 김경미, 최점일, 김성조 : *Prevotella nigrescens*에서의 Hemin 조절 세포막 단백질의 순수분리 및 특성분석. 대한치주과학회지, 32:351-360, 2002.
 12. Marmur J : A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganism. J Mol Biol, 3:208-218, 1961.
 13. Sambrook J, Russell DW : Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York, 2001.
 14. Feinberg AP, Vogelstein BA : A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem, 137:266-267, 1984.
 15. Jang YK, Jin YH, Kim M, Fabre F, et al. : Molecular cloning of rhp51⁺ gene in *Schizosaccharomyces pombe*, whose amino acid sequence is highly conserved from prokaryotic RecA to the mammalian Rad51 homolog. Gene, 5:130-142, 1998.
 16. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR : DNA sequencing with chain-termination inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA, 74:5463-5467, 1977.
 17. Hanson MS, Hansen EJ : Molecular cloning, partial purification, and characterization of a hemin-binding lipoprotein from *Haemophilus influenzae* type b. Mol Microbiol, 5:267-278, 1991.

Abstract

MOLECULAR CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF THE GENE FOR
THE HEMIN-BINDING PROTEIN FROM *Prevotella intermedia*

Shin Kim¹, Sung-Jo Kim²

¹Department of Pediatric Dentistry, ²Department of Periodontology,
College of Dentistry, Pusan National University

Prevotella intermedia is one of the most frequently implicated pathogens in human periodontal disease and has a requirement for hemin for growth. This study has identified a hemin-binding *P. intermedia* protein by expression of a *P. intermedia* genomic library in *Escherichia coli*, a bacterium which does not require or transport exogenous hemin. The genomic library of *P. intermedia* was constructed into plasmid pUC18, transformed into *Escherichia coli* strain DH5 α , and screened for recombinant clones using hemin-binding activity by plating onto hemin-containing agar. Approximately 5,000 recombinant *E. coli* colonies were screened onto LB-amp-hemin agar, single clone (pHem1) was exhibited a clearly pigmented phenotype. The 2.5 kb insert DNA of pHem1 was determined by restriction enzyme mapping. Southern blot analysis of *Bam*HI, *Bg*III, *Eco*RI, *Hind*III and *Pst*I-digested *P. intermedia* DNA indicated that single copy of the gene was present in the genome. Northern blot analysis revealed that the size of transcript was approximately 1.8 kb. The cloned gene contained a single ORF, consisting of approximately 850-residue amino acids. A BLAST search of the Institute for Genomic Research genes with similar nucleotide sequence revealed no significant similarity. It needs further investigation to clarify the mechanisms of heme uptake in *P. intermedia*.

Key words : Hemin, Hemin-binding protein, *Prevotella intermedia*, Gene cloning