

Development of Quantitative Real-Time PCR Primers for the Detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

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

¹Department of Oral Biochemistry and ²Oral Biology Research Institute, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

³Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical school, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

(received November 19, 2010 ; revised December 14, 2010 ; accepted December 16, 2010)

The purpose of this study was to develop species-specific real-time quantitative PCR (RT-qPCR) primers for use in the detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. These primers were designed based on the nucleotide sequences of the RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*). We assessed the specificity of the primers against nine strains of *A. actinomycetemcomitans*, eight strains (three species) of the *Haemophilus* genus, and 40 strains of 40 other oral bacterial species. Primer sensitivity was determined by testing serial dilutions of the purified genomic DNAs of *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384^T. Our data reveal that we had obtained species-specific amplicons for all of the tested *A. actinomycetemcomitans* strains, and that none of these amplicons occurred in any of the other species. Our PCR protocol proved able to detect as little as 2 fg of *A. actinomycetemcomitans* chromosomal DNA. Our findings suggest that these qRT-PCR primers are suitable for application in epidemiological studies.

Key words: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *rpoB*, qRT-PCR primer.

서 론

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*는 국소유년형치주염의 주요한 원인균으로 알려져 있으며(Mandell, 1984; Genco *et al.*, 1985; Zambon, 1985; Asikainen, 1986), 또

*Corresponding author: Dr. Joong-Ki Kook, Department of Oral Biochemistry, 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

[†]Contributed equally

한 세균성 심내막염을 유발시킬 수 있다고 보고되었다(van Winkelhoff and Slots, 1999). *A. actinomycetemcomitans*는 leukotoxin, cytolethal distending toxin, collagenase, chemotaxis inhibitor, 및 lipopolysaccharide 등의 독력인자들을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Kiley and Hot, 1980; Robertson *et al.*, 1982; Lally *et al.*, 1989; Ashkenazi *et al.*, 1992; Sugai *et al.*, 1998).

치주질환의 역학연구를 위해서는 치주질환과 관련된 세균종을 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 방법의 개발이 선행되어야 한다. 현재까지 여러 세균 검출법들 중에서 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR; slots *et al.*, 1995; Ashimoto, *et al.*, 1996; Conrads *et al.*, 1999; Trans and Rudney 1999)법이 전통적인 세균배양법, DNA 프로브법(Kook *et al.*, 2003), 16S ribosomal RNA 유전자(16S rDNA) 클로닝 및 핵산염기서열법 등보다 신속성, 정확성 및 경제성 측면에서 많이 이용되고 있다. 기존의 PCR법은 세균을 정성적으로 검출할 수 있으나 정량적으로 검출하기는 어렵다. 그러므로, 최근에는 정량 실시간 중합효소연쇄반응법(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)을 이용하여 정성 및 정량적으로 세균을 종 수준에서 검출하는 데 사용하고 있다.

PCR 및 qRT-PCR의 시행을 위해서는 표적유전자가 있어야 한다. 세균 분류학적 측면에서 DNA-DNA hybridization 법과 함께 16S rDNA 핵산염기서열 비교분석법은 세균을 종 수준으로 동정하는 데 주요한 기준이 된다(Krieg, 2001). 특히, 16S rDNA의 핵산염기서열은 종 간에 잘 보존이 되어 있기 때문에 중합효소연쇄반응 프라이머를 설계 및 개발하는 데 주요한 표적 유전자로 사용되고 있다. 하지만, 특정 종간의 핵산염기서열의 상동성이 매우 유사하여 세균의 종 수준에서의 동정뿐만 아니라 중합효소연쇄반응 프라이머의 설계가 어려운 경우가 있다. 최근 16S rDNA

를 대신하여 DNA-dependent RNA polymerase beta subunit 유전자(*rpoB*)가 세균의 종 및 아종 수준에서의 동정에 사용되고 있다(Drancourt and Raoult 2002; Khamis *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2010; Ko *et al.*, 2002). 그러므로 본 연구는 치주질환의 주요한 병원성 세균 중 하나인 *A. actinomycetemcomitans*의 종 수준에서의 정량적 검출을 위한 qRT-PCR 프라이머를 개발하기 위하여 시행하였다.

재료 및 방법

세균 및 세균 배양

본 연구에서 사용된 균주들은 Table 1과 같다. 이들 균주들은 ATCC (American Type Culture Collection, USA), CCUG (Culture Collection, University of Göteborg, Sweden) 및 KCTC(Korean Collection for Type Cultures, Biological Resource Center, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 그리고, 한국인에서 분리된 임상균주들은 한국구강미생물자원은행(Korean Collection for Oral Microbiology, Gwangju, Korea)에서 분양받아 사용하였다.

A. actinomycetemcomitans 균주들은 0.6% yeast extract, 5% horse serum, 75 µg/ml bacitracin 및 5 µg/ml vancomycin (Sigma, USA)이 첨가된 tryptic soy broth(TSB, Difco Laboratories, USA)에서 배양하였다. *Haemophilus* spp. 균주들은 0.5% yeast extract, 0.5 mg/ml hemin 및 2 µg/ml vitamin K₁가 첨가된 TSB 배지에서, 연쇄상구균들은 Todd Hewitt broth(TH broth, Difco Diagnostics)에서 배양하였다. 그외 균주들은 TSB(trypticase soy broth)에 0.5% yeast extract, 0.05% cysteine HCl-H₂O, 0.5 mg/ml hemin 및 2 µg/ml vitamin K₁가 첨가된 배지에 배양하였다. *Haemophilus* spp. 및 *Streptococcus* spp. 균주들은 37°C 호기성 세균배양기(ThermoForma, USA)에서 배양하였으며, 그외 모든 균주들은 85% N₂, 10% CO₂, 5% H₂가 공급되는 37°C 혐기성 세균배양기(Bactron I, Sheldon Manufacturing Inc., USA)에서 배양하였다.

세균 지놈 DNA 추출

세균의 지놈 DNA들은 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit(iNtRON Co., Seoul, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 추출하였다. 즉, 세균 배양액 1.5 ml를 10,000 × g의 원심력을 이용하여 세균을 수확한 다음 50 µl의 Pre-incubation solution과 3 µl의 lysozyme solution을 넣고 잘 혼합한 다음 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 여기에 250 µl의 G-buffer solution을 넣고 잘 혼합한 다음 65°C에서 15분간 반응시키고, 250 µl의 Binding solution을 넣고 잘 혼합한 다음 vortexing하였다. 이러한

cell lysates를 G-spin™ column에 넣고 13,000rpm에서 1분간 원심분리하였다. Column에 500 µl의 washing buffer A를 넣고 다시 1분간 원심분리하였다. 여기에 500 µl의 washing buffer B를 넣고 다시 1분간 원심분리하고, G-spin™ column을 새로운 eppendorf tube에 넣고 100 µl의 elution buffer를 넣고 1분간 실온에 방치한 다음 13,000rpm에서 1분간 원심분리하였다.

qRT-PCR 프라이머의 설계

*A. actinomycetemcomitans*의 *rpoB* 핵산염기서열(GenBank accession no. AY362930)을 바탕으로 PrimerSelect 프로그램(DNASTAR Inc., USA)을 이용하여 qRT-PCR 프라이머를 설계하였으며 다음과 같다; forward primer (Aa3-F), 5'- GGC GAG CCT GIA TTT GAT GTG CG-3'; and reverse primer (Aa3-R), 5'- GTG CCC GGT GCT GCG TCT TTG-3'. 예상되는 PCR 증폭물의 크기는 113 bp이다. 이때 설계된 primer 쌍은 Bioneer사(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 제작하였다.

qRT-PCR 프라이머의 종-특이성 검증

qRT-PCR 프라이머(Aa3-F/Aa3-R)의 *A. actinomycetemcomitans*에 대한 종-특이성은 일반적인 PCR법을 이용하여 실시하였으며, 이는 AccuPower® PCR PreMix(Bioneer) 및 MyGenie™ 96 Gradient Thermal Block(Bioneer)을 이용하여 실시하였다. PCR 반응 혼합용액이 20 µl가 되도록 20 pmoles씩의 Aa3-F/Aa3-R 프라이머와 4 ng의 세균 유전체 DNA를 넣고 95°C에서 10분간 predenaturation, 95°C에서 10초간 denaturation, 72°C에서 30초간 annealing과 extension 과정을 30회 시행하였다. PCR이 끝난 후 20 µl의 반응물 중 10 µl를 Tris-acetate buffer (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA, [pH8.0])를 전해질로 사용하고 1.5% 아가로스 젤을 매질로 이용해서 100V에서 15분간 전기영동하였다. 증폭물을 ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator로 발색 여부를 확인하였다.

qRT-PCR

qRT-PCR은 바이오니아사(Bionner, Korea)의 AccuPower® GreenStar™ qPCR PreMix 및 Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative Thermal Block를 사용하여 실시하였다. PCR PreMix에 forward 및 reverse 프라이머 각각 60 pmoles와 세균 유전체 DNA를 PCR tube에 넣고, PCR PreMix kit에 동봉된 DEPC water를 넣어 최종 반응물이 50 µl가 되도록 한 후 충분히 vortexing하였다. qRT-PCR 조건은 95°C에서 10분간 predenaturation 시행한 후 95°C에서 10초간 denaturation, 72°C에서 30초간 annealing과 extension하고, scanning하는 과정을 45회 반복하였으며, melting curve 분석은 60~94°C에서 1°C씩 1초간 시행하였다.

Table 1. The bacterial strains used in this study

Species	strains
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	ATCC 33384 ^T , ATCC 43717, ATCC 43718, KCOM 1299, KCOM 1300, KCOM 1302, KCOM 1304, KCOM 1306, KCOM 1308
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	ATCC 33389 ^T , KCOM 1287, KCOM 1288, KCOM 1289, KCOM 1290
<i>Haemophilus paraphrophilus</i>	ATCC 29242 ^T , KCOM 1297
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	ATCC 33392 ^T
<i>Neisseria sicca</i>	ATCC 29256 ^T
<i>Neisseria subflava</i>	ATCC 49275 ^T
<i>Neisseria meningitidis</i>	ATCC 13077 ^T
<i>Neisseria mucosa</i>	ATCC 19696 ^T
<i>Actinomyces georgiae</i>	CCUG 32935 ^T
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	CCUG 20536 ^T
<i>Actinomyces israelii</i>	ATCC 12102 ^T
<i>Actinomyces meyeri</i>	CCUG 21024 ^T
<i>Actinomyces naeslundii</i>	CCUG 35333 ^T
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277 ^T
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	ATCC 35406 ^T
<i>Prevotella intermedia</i>	ATCC 25611 ^T
<i>Prevotella nigrescens</i>	ATCC 33563 ^T
<i>Tannerella forsythia</i>	ATCC 43037 ^T
<i>Campylobacter rectus</i>	ATCC 33238 ^T
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	ATCC 33624 ^T
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	KCTC 5787 ^T
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	KCTC 5789 ^T
<i>Propionibacterium propionicum</i>	KCTC 5342 ^T
<i>Propionibacterium acnes</i>	KCTC 3314 ^T
<i>Rothia dentocariosa</i>	KCTC 3204 ^T
<i>Selenomonas artemidis</i>	KCTC 5742 ^T
<i>Selenomonas noxia</i>	KCTC 5749 ^T
<i>Eubacterium limosum</i>	KCTC 2487 ^T
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ATCC 25586 ^T
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	ATCC 25286 ^T
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	ATCC 33693 ^T
<i>Fusobacterium canifelinum</i>	CCUG 49733 ^T
<i>Fusobacterium simiae</i>	CCUG 16798 ^T
<i>Leptotrichia buccalis</i>	CCUG 34316 ^T
<i>Streptococcus gordonii</i>	CCUG 33482 ^T
<i>Streptococcus anginosus</i>	ATCC 700231 ^T
<i>Streptococcus intermedius</i>	KCTC 3268 ^T
<i>Streptococcus constellatus</i>	ATCC 27823 ^T
<i>Streptococcus mitis</i>	KCTC 3556 ^T
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175 ^T
<i>Streptococcus oralis</i>	CCUG 13229 ^T
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	CCUG 30417 ^T
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CCUG 28588 ^T
<i>Streptococcus sanguinis</i>	CCUG 17826 ^T
<i>Streptococcus sobrinus</i>	ATCC 33478 ^T
<i>Veillonella parvula</i>	KCTC 5019 ^T

ATCC, American Type Culture Collection; CCUG, Culture Collection, University of Göteborg; KCTC, Korean Collection for Type Cultures; KCOM, Korean Collection for Oral Microbiology.

결 과

*A. actinomycetemcomitans*의 검출을 위해 설계된 qRT-PCR 프라이머(Aa3-F/Aa3-R)의 종-특이성을 일반적인 PCR 방법으로 조사한 결과, *A. actinomycetemcomitans* 균주(참고 균주 3주 및 임상균주 6주)에서만 113 bp의 PCR 증폭물을 모두 확인할 수 있었고 3종(8균주)의 *Haemophilus* spp. 및 구강 내 다른 세균종(40 중 40균주)에서는 PCR 증폭물은 확인되지 않았다 (Table 2).

본 연구에서 qRT-PCR을 수행하여 qRT-PCR 프라이머(Aa3-F/Aa3-R)의 Standard curve와 최소검출한도를 측정

Table 2. Summary of the results of specificity test of the Aa3-F/Aa3-R primers

Genus and species (no. of strains tested /no. species)	<i>rpoB</i>
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (9/1)	+
<i>Haemophilus</i> spp. (8/3)	-
<i>Neisseria</i> spp. (4/4)	-
<i>Actinomyces</i> spp. (5/5)	-
<i>Porphyromonas</i> spp. (2/2)	-
<i>Prevotella</i> spp. (2/2)	-
<i>Tannerella forsythia</i> (1/1)	-
<i>Campylobacter rectus</i> (1/1)	-
<i>Capnocytophaga</i> spp. (3/3)	-
<i>Propionibacterium</i> spp. (2/2)	-
<i>Eubacterium limosum</i> (1/1)	-
<i>Rothia dentocariosa</i> (1/1)	-
<i>Selenomonas</i> spp. (2/2)	-
<i>Fusobacterium</i> spp. (5/5)	-
<i>Leptotrichia buccalis</i> (1/1)	-
<i>Streptococcus</i> spp. (11/11)	-
<i>Veillonella parvula</i> (1/1)	-

하기 위해 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384^T의 유전체 DNA를 40 ng부터 4 fg까지 10단계씩 희석하여 실험한 결과 2 fg까지 검출되는 것을 확인할 수 있었다(Table 2 및 Fig. 1)

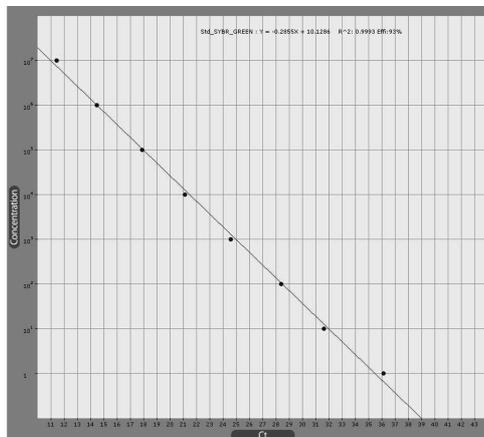
고 찰

본 연구에서 설계된 Aa3-F/Aa3-R 프라이머는 qRT-PCR에 의해 *A. actinomycetemcomitans* 지놈 DNA를 4 fg까지 종-특이적으로 검출할 수 있음을 알 수 있었다. *A. actinomycetemcomitans*의 세균 지놈 크기가 2.1 Mb인 점을 고려하면, Aa3-F/Aa3-R 프라이머 쌍은 qRT-PCR법에 의해 *A. actinomycetemcomitans* 1.7 균주에 해당하는 세균 지놈 DNA까지도 검출이 가능하다는 것을 의미한다.

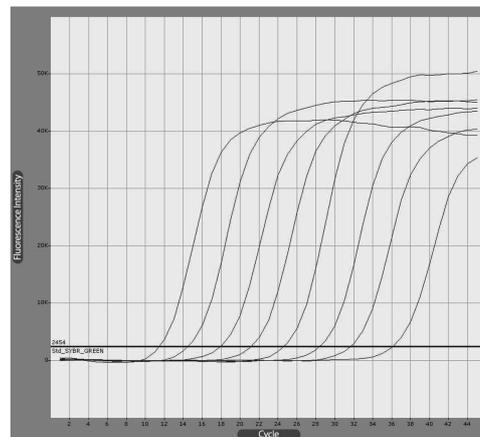
Aa3-F/Aa3-R의 설계 시 PrimerSelect 프로그램에서 제시한 optimal annealing temperature(OAT)는 56.5°C였다 (data not shown). 하지만, 본 실험실의 경험에 의하면 실

Table 3. Determination of C_T value for a dilution series of 40 ng of genomic DNA of *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384

Genomic DNA amount	Cell number corresponding to DNA amount	C_T
40 ng	1.7×10^7	11.43
4 ng	1.7×10^6	14.47
400 pg	1.7×10^5	17.91
40 pg	1.7×10^4	21.15
4 pg	1.7×10^3	24.61
400 fg	1.7×10^2	28.42
40 fg	1.7×10^1	31.63
4 fg	1.7×10^0	36.13
0	0	ND



(a)



(b)

Fig. 1. (A) Standard curve and (B) minimal limit of detection obtained by qRT-PCR using the Aa3-F/Aa3-R primers from 10-fold serial dilutions of genomic DNA of *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384^T range from 40 ng to 4 fg.

제 PCR에서 최적의 annealing temperature는 이보다 5-12°C 정도 높았다(Kim *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2010). 본 연구에서도 OAT를 구하기 위하여, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384^T와 *Haemophilus aphrophilus* ATCC 33389^T 균주의 지놈 DNA를 이용하여 61-72°C 사이에서 1°C 간격으로 gradient PCR를 실시한 결과, annealing temperature를 72°C로 정하였다(data not shown).

최근 lipopolysaccharide의 생합성 과정에 참여하는 효소 중 하나인 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid transferase 유전자(*waaA*) 핵산염기서열을 바탕으로 *A. actinomycetemcomitans*을 검출할 수 있는 qRT-PCR법이 개발되었다(Hyvärinen *et al.*, 2009). 이 연구 결과 소개된 qRT-PCR 프라이머의 민감도는 약 40 fg으로 TaqMan 프로브법을 이용한 qRT-PCR을 시행한 것이었다. 이러한 점을 감안할 때, 본 연구에서 개발된 Aa3-F/Aa3 프라이머쌍은 Hyvärinen 등이 개발한 것 보다 경제적이면서 더 높은 민감도로 *A. actinomycetemcomitans*를 검출하는 데 사용가능 할 것이라 생각된다.

본 연구에서 *A. actinomycetemcomitans* 검출을 위한 표적 유전자로 *rpoB*는 *Escherichia coli*의 핵산염기서열(4,026bp)을 기준으로 여러 세균종들간의 핵산염기서열의 상동성 분석을 한 결과 9개의 보존된 영역과 그들 사이의 8개의 상동성이 떨어지는 영역이 있는 것으로 알려져 있다(Severinow *et al.*, 1996). 또한, *rpoB*는 16S rDNA과 같이 세균분류학적 측면에서 같은 세균 종에 속하는 균주들 간에 핵산염기서열이 잘 보존되어 있고, 16S rDNA보다 핵산염기서열이 약 3배 정도 크며, 세균 종간의 상이성이 크다. 그러므로 앞으로 유전자 클로닝 기법 및 핵산염기서열 분석 기법이 좀 더 발전하게 되어 모든 세균 종들의 표준균주에 대한 *rpoB* 핵산염기서열 데이터가 확보 되면, 멀지 않아서 16S rDNA를 대신해 *rpoB*가 세균의 종을 기준하는 하나의 중요한 기준이 될 것으로 생각된다.

이상의 연구결과를 요약하면, 본 연구에서 *A. actinomycetemcomitans* 검출을 위해 개발된 qRT-PCR 프라이머(Aa3-F/Aa3-R)는 SYBR green을 이용한 qRT-PCR법으로 세균 1.7 마리까지도 검출할 수 있는 민감도를 갖으며, *Haemophilus spp.*를 포함한 43종의 다른 구강 내 세균종 균주들의 지놈 DNA에 대한 교차반응이 없었기 때문에 치주질환과의 역학연구에 *A. actinomycetemcomitans*을 중-특이적으로 검출하는 데 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것임(2009-0076542).

참 고 문 헌

- Ashimoto, A., C. Chen, I. Bakker and J. Slots. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 1996;11: 266-273.
- Ashkenazi, M., R.R. White, and D.K. Dennison. Neutrophil modulation by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. I. Chemotaxis, surface receptor expression and F-actin polymerization. *J Periodontol Res.* 1992;27:264-273.
- Asikainen, S. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and spirochetes in relation to age in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol.* 1986;57:537-541.
- Conrads, G., T.F. Flemmig, I. Seyfarth, F. Lampert, and R. Luttkicken. Simultaneous detection of *Bacteroides forsythus* and *Prevotella intermedia* by 16S rRNA gene-directed multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 1999;37:1621-1624.
- Drancourt, M. and D. Raoult. *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4333-4338.
- Genco, R.J., J.J. Zambon, and P.A. Murray. Serum and gingival fluid antibodies as adjuncts in the diagnosis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontal disease. *J Periodontol.* 1985;56:1-50.
- Hyvärinen K, Laitinen S, Paju S, Hakala A, Suominen-Taipale L, Skurnik M, Könönen E, Pussinen PJ. Detection and quantification of five major periodontal pathogens by single copy gene-based real-time PCR. *Innate Immun.* 2009;15:195-204.
- Khamis, A., D. Raoult, B. La Scola. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J Clin Microbiol.* 2004;42:3925-3931.
- Kiley, P. and S.C. Holt. Characterization of the lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 and N27. *Infect Immun.* 1980;30:862-873.
- Kim, B. J., S. H. Lee, M. A. Lyu, S. J. Kim, G. H. Bai, G. T. Chae, E. C. Kim, C. Y. Cha, and Y. H. Kook. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J Clin Microbiol.* 1999;37:1714-1720.
- Kim HS, Lee DS, Chang YH, Kim MJ, Koh S, Kim J, Seong JH, Song SK, Shin HS, Son JB, Jung MY, Park SN, Yoo SY, Cho KW, Kim DK, Moon S, Kim D, Choi Y, Kim BO, Jang HS, Kim CS, Kim C, Choe SJ, Kook JK. Application of *rpoB* and zinc protease gene for use in molecular discrimination of *Fusobacterium nucleatum* subspecies. *J Clin Microbiol* 2010;48:545-53.
- 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
- Ko KS, Lee HK, Park MY, Lee KH, Yun YJ, Woo SY, Miyamoto H, Kook YH. Application of RNA polymerase beta-subunit gene (*rpoB*) sequences for the molecular differentiation of *Legionella* species. *J Clin Microbiol* 2002;40:2653-2658.
- 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. A new method for rapid screening of bacterial species- or

- subspecies-specific DNA probes. FEMS Microbiol Lett. 2003;219:121-127.
- Krieg, N. R. Identification of Prokaryotes. In D. R. Boone, R. W. Castenholz, and G. M. Garrity (ed.), Bergeys manual of systematic bacteriology, 2nd ed., vol. 1, p. 33-38. Springer, New York, NY. 2001.
- Lally, E.T., I.R. Kieba, D.R. Demuth, J. Rosenbloom, E.E. Golub, N.S. Taichman, and C.W. Gibson. Identification and expression of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin gene. Biochem Biophys Res Commun. 1989;159: 256-262.
- Mandell, R.L. A longitudinal microbiological investigation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Eikenella corrodens* in juvenile periodontitis. Infect Immun. 1984;45:778-780.
- Robertson, P.B., M. Lantz, P.T. Marucha, K.S. Kornman, C.L. Trummel, and S.C. Holt. Collagenolytic activity associated with *Bacteroides* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Periodontal Res. 1982;17:275-283.
- 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.
- Shin HS, Kim MJ, Kim HS, Park SN, Kim do K, Baek DH, Kim C, Kook JK. Development of strain-specific PCR primers for the identification of *Fusobacterium nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190T and subsp. *vincentii* ATCC 49256T. Anaerobe 2010;16:43-46.
- Slots, J., A. Ashimoto, M.J. Flynn, G. Li, and C. Chen. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. Clin Infect Dis. 1995;20(Suppl 2):S304-307.
- Sugai, M., T. Kawamoto, S.Y. Peres, Y. Ueno, H. Komatsuzawa, T. Fujiwara, H. Kurihara, H. Suginaka, and E. Oswald. The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytolethal distending toxin. Infect Immun. 1998;66: 5008-5019.
- Tran, S.D. and J.D. Rudney. Improved multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, and *Porphyromonas gingivalis*. J Clin Microbiol. 1999;37:3504-3508.
- van Winkelhoff, A.J. and J. Slots. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. Periodontol 2000. 1999;20:122-135.
- Woese, C.R. Bacterial evolution. Microbiol Rev. 1987;51:221-271.
- Zambon, J.J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J Clin Periodontol. 1985;12:1-20.