

Development of Species-specific PCR Primers for Detecting *Peptoniphilus mikwangii*

Soon-Nang Park¹, Junhyeok Lee³ and Joong-Ki Kook^{1,2*}

¹Korean Collection for Oral Microbiology and Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Chosun University, 309 Pilmun-daero, Dong-Gu, Gwangju 61452, Republic of Korea

²Oral Biology Research Institute, Chosun University, 309 Pilmun-daero, Dong-Gu, Gwangju 61452, Republic of Korea

³Farragut High School, 11237 Kingston Pike, Knoxville, TN 37934, USA

(received August 10, 2017; revised September 04, 2017; accepted September 05, 2017)

In a previous study, *Peptoniphilus mikwangii* was isolated from the human oral cavity as a new species. The purpose of this study was to develop *P. mikwangii*-specific PCR primers. The PCR primers were designed, based on the nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA (16S rDNA). The specificity of the primers was tested using genomic DNAs of 3 strains of *P. mikwangii* and 27 strains (27 species) of non-*P. mikwangii* bacteria. The sensitivity of primers sensitivity was determined using PCR, with serial dilutions of the purified genomic DNAs (4 ng to 4 fg) of *P. mikwangii* KCOM 1628^T. The data showed that *P. mikwangii*-specific qPCR primers (B134-F11/B134-R1 & B134-F5/B134-R5) could detect only *P. mikwangii* strains, and 400 fg or 40 fg of *P. mikwangii* genome DNA. These results suggest that PCR primers are useful in detecting *P. mikwangii* from the oral cavity.

Key words: *Peptoniphilus mikwangii*, 16S rDNA, PCR primers

*Correspondence to: Joong-Ki Kook, Korean Collection for Oral Microbiology and Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Chosun University, 309 Pilmun-daero, Dong-Gu, Gwangju 61452, Republic of Korea
Tel.: 82-62-230-6877, Fax: 82-62-236-2734
E-mail: jkook@chosun.ac.kr
ORCID : 0000-0003-2628-2870

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.

서론

*Peptoniphilus mikwangii*는 그람 양성 혐기성 세균으로 한국인의 상악 측절치와 견치 사이 부위의 수술 후 감염 병소에서 처음 분리되었다[1]. *Peptoniphilus* 속은 *Anaerococcus*, *Gallicola*, *Parvimonas* 및 *Finegoldia* 속들과 더불어 사람의 구강 정상 세균 총을 이루는 그람 양성 혐기성 구균들이다[2-5]. *P. mikwangii*의 구강 내 감염성 질환과의 관련성은 아직 밝혀져 있지 않고 있다.

치주질환, 치수염, 치근단질환 및 악골골수염과 같은 구강 내 감염성 질환과 특정 세균 종(species) 간의 역학 관계를 밝히기 위해서는 해당 세균 종에 대한 검출법이 확립되어야 한다. 현재까지 개발된 여러 세균 검출법들 중에서 중합효소연쇄반응법은 신속하고 정확한 방법으로 현재 많이 사용되고 있다[6]. 중합효소연쇄반응법을 수행하기 위해서는 종-특이 중합효소연쇄반응 프라이머의 개발이 필요하고, 이를 위해서는 표적 유전자를 선정하여야 한다. 중합효소연쇄반응 프라이머 개발을 위해 사용되는 표적 유전자는 모든 세균들에게 존재하며, 종간의 상이하면서 같은 세균 종 내의 균주들 간의 상동성이 잘 보존된 염기서열이 존재해야 한다. 이러한 조건을 만족하는 유전자들 중에서 16S ribosomal RNA 유전자(16S rDNA)가 많이 사용되고 있다[7-9].

본 연구는 최근 한국인에서 처음으로 분리 동정된 *P. mikwangii*에 대한 종-특이 중합효소연쇄반응 프라이머를 16S

rDNA 핵산염기서열을 기반으로 개발하기 위해 시행하였다.

재료 및 방법

세균 및 세균 배양

본 연구에서 사용된 균주들은 KCOM (Korean Collection for Oral Microbiology, Gwangju, Korea), ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA), KCTC (Korean Collection for Type Cultures, Biological Resource Center, Daejeon, Korea) 및 CCUG (Culture Collection, University of Göteborg, Göteborg, Sweden)에서 분양받아 사용하였다 (Table 1).

Table 1. The bacterial strains used in this study

Species	strains
<i>Peptoniphilus mikwangii</i>	KCOM 1628 ^T , KCOM 1637, KCOM 1641
<i>Peptoniphilus harei</i>	KCTC 5952 ^T
<i>Peptoniphilus orbachii</i>	KCTC 5947 ^T
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	KCTC 3321 ^T
<i>Peptoniphilus indolicus</i>	KCTC 15023 ^T
<i>Peptoniphilus methionivorax</i>	KCTC 15197 ^T
<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	KCTC 35950 ^T
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	ATCC 33384 ^T
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	CCUG 35333 ^T
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277 ^T
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ATCC 25586 ^T
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	ATCC 33693 ^T
<i>Campylobacter rectus</i>	ATCC 33238 ^T
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	ATCC 33624 ^T
<i>Prevotella intermedia</i>	ATCC 25611 ^T
<i>Prevotella nigrescens</i>	NCTC 9336 ^T
<i>Neisseria mucosa</i>	ATCC 19696 ^T
<i>Tannerella forsythia</i>	ATCC 43037 ^T
<i>Treponema denticola</i>	ATCC 35405 ^T
<i>Streptococcus anginosus</i>	ATCC 700231 ^T
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175 ^T
<i>Streptococcus sobrinus</i>	ATCC 33478 ^T
<i>Streptococcus gordonii</i>	CCUG 33482 ^T
<i>Streptococcus mitis</i>	KCTC 3556 ^T
<i>Streptococcus parasanguis</i>	CCUG 30417 ^T
<i>Streptococcus salivarius</i>	CCUG 50207 ^T
<i>Enterococcus faecalis</i>	KCTC 3206 ^T
<i>Eikenella corrodens</i>	KCOM 1378

Neisseria spp., *Enterococcus* spp. 및 *Streptococcus* spp. 균주들은 brain heart infusion (BHI, BD diagnostics, Sparks, MD, USA) 배지를 이용하여 37°C 호기성 세균배양기(Thermo Forma, Waltham, MA, USA)에서 배양하였다[10]. *Aggregatibacter 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 배지에서 배양하였다[10]. 그 외 균주들은 TSB에 0.05% cysteine HCl-H₂O, 0.5% yeast extract, 0.5 mg/ml hemin 및 2 µg/ml vitamin K₁이 첨가된 배지를 이용하여 혐기성 조건(85% N₂, 10% CO₂, 5% H₂) 하에 37°C 혐기성 세균배양기(Bactron I, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA)에서 배양하였다[10].

P. mikwangii 종-특이 중합효소연쇄반응 프라이머 쌍 설계

*P. mikwangii*의 16S rDNA 핵산염기서열(GenBank accession no. KJ728812)을 바탕으로 PrimerSelect 프로그램(DNA STAR Inc., Madison, WI, USA)을 이용하여 중합효소연쇄반응 프라이머 두 쌍을 설계하였으며 다음과 같았다; B134-F11, 5'-CCA AGT CGC ATG ACA TGG AAA TC-3'; B134-R1, 5'-GGC GGA GTG CTT ATT GTG TTT-3'. B134-F5, 5'-GCA AGT CGA GCG ATG AAA AGG-3'; B134-R5, 5'-TGT TTA CTG CGG CAC CGA GAT TAC-3'. 이들 중합효소연쇄반응 프라이머 쌍들의 예상되는 PCR 증폭물의 크기는 각각 668 bp 및 796 bp였다. 이때 설계된 primer 쌍은 Bioneer 사(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 제작하였다.

P. mikwangii 종-특이 중합효소연쇄반응 프라이머 쌍들의 최적결합온도 결정, 종-특이성 및 민감도 검증

중합효소연쇄반응의 주형으로 사용할 세균의 지놈 DNA들은 선행연구에서 제시한 방법으로 추출하여 사용하였다[10].

*P. mikwangii*를 종-특이적으로 검출하기 위해 설계된 PCR 프라이머 쌍들(B134-F11/B134-R1 및 B134-F5/B134-R5)의 최적결합온도(optimal annealing temperature)를 구하기 위하여 AccuPower[®] PCR PreMix (Bioneer) 및 MyGenie[™] 96 Gradient Thermal Block (Bioneer)을 사용하여 gradient PCR을 실시하였다. 이때 *P. mikwangii* KCOM 1628^T와 유전학적으로 가장 가까운 *P. asaccharolyticus* KCTC 3321^T 지놈 DNA를 주형으로 사용하였다. PCR 반응 용액에는 세균 지놈 DNA 4 ng, 중합효소연쇄반응 프라이머 1 pmole/µl 씩 넣어 사용하였다. PCR 반응 조건은 95°C에서 10분간 전변성 처리하였고, 95°C에서 10초간 변성, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 또는 70°C에서 20초간 결합, 72°C에서 30초 동안 중합 과정을 30회 시행

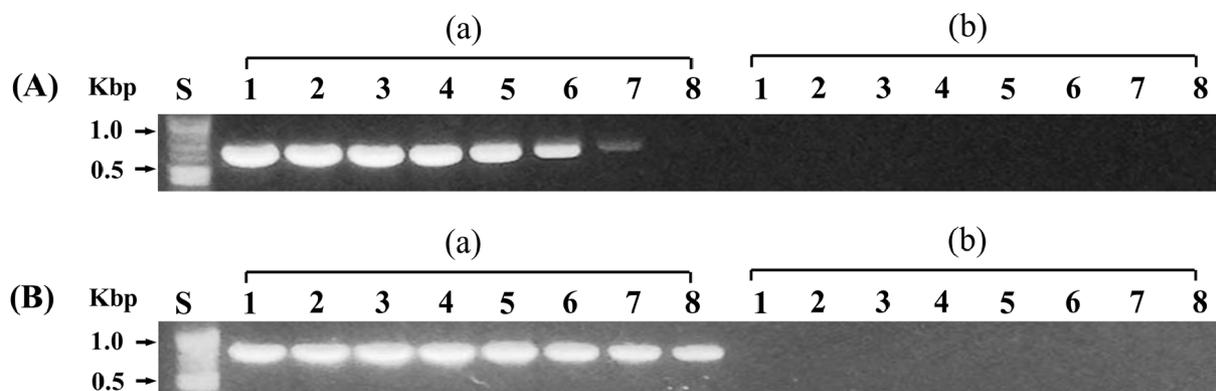


Fig. 1. Gradient PCR. In order to determine the optimal annealing temperature, PCR was performed with primers B134-F11/B134-R1 (A) and B134-F5/B134-R5 (B) and the genomic DNA of *Peptoniphilus mikwangii* KCOM 1628^T (a) or *P. asaccharolyticus* KCTC 3321^T (b) at the annealing temperature of 1, 56°C; 2, 58°C; 3, 60°C; 4, 62°C; 5, 64°C; 6, 66°C; 7, 68°C; 8, 70°C. S, 1 K base pair DNA ladder.

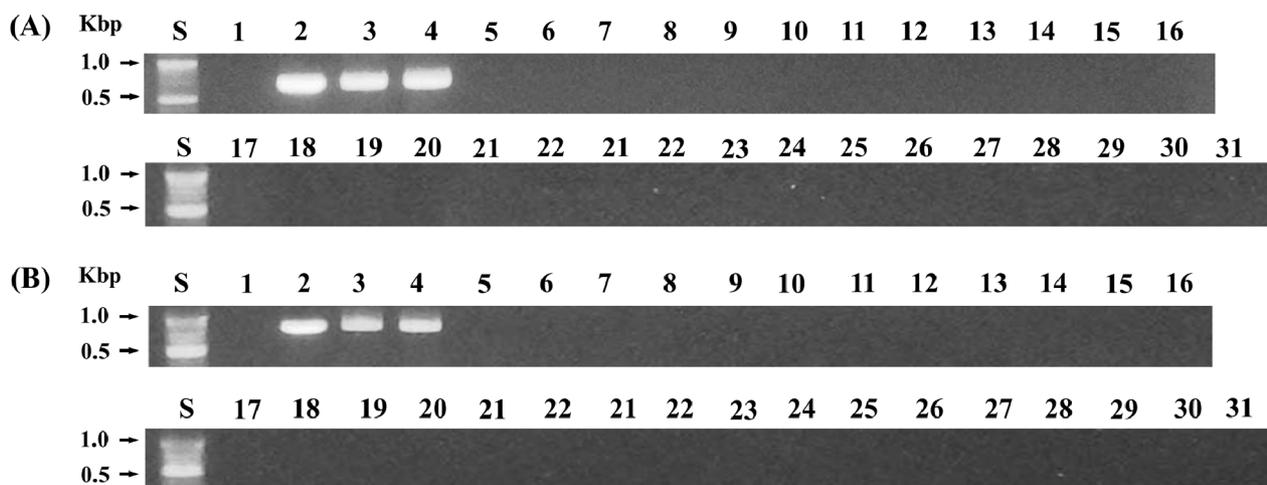


Fig. 2. Specificity test of the primers. The PCR were performed with the primers B134-F11/B134-R1 (A) and B134-F5/B134-R5 (B) with the purified genomic DNAs of used in this study. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. Lanes: S, 1 K base pair DNA ladder; 1, (-) control DDW; 2, *Peptoniphilus mikwangii* KCOM 1628^T; 3, *P. mikwangii* KCOM 1637; 4, *P. mikwangii* KCOM1641; 5, *P. harei* KCTC 5952^T; 6, *P. orbachii* KCTC 5947^T; 7, *P. asaccharolyticus* KCTC 3321^T; 8, *P. indolicus* KCTC 15023^T; 9, *P. methioninivorax* KCTC 15197^T; 10, *P. lacrimalis* KCTC 35950^T; 11, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 33384^T; 12, *Actinomyces odontolyticus* CCUG 35333^T; 13, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277^T; 14, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586^T; 15, *Fusobacterium periodonticum* ATCC 33693^T; 16, *Campylobacter rectus* ATCC 33238^T; 17, *Capnocytophaga gingivalis* ATCC 33624^T; 18, *Prevotella intermedia* ATCC 25611^T; 19, *Prevotella nigrescens* NCTC 9336^T; 20, *Neisseria mucosa* ATCC 19696^T; 21, *Tannerella forsythia* ATCC 43037^T; 22, *Treponema denticola* ATCC 35405^T; 23, *Streptococcus anginosus* ATCC 700231^T; 24, *Streptococcus mutans* ATCC 25175^T; 25, *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478^T; 26, *Streptococcus gordonii* CCUG 33482^T; 27, *Streptococcus mitis* KCTC 3556^T; 28, *Streptococcus parasanguis* CCUG 30417^T; 29, *Streptococcus salivarius* CCUG 50207^T; 30, *Enterococcus faecalis* KCTC 3206^T; 31, *Eikenella corrodens* KCOM 1378.



Fig. 3. Sensitivity test of the primers. The PCR were performed with the primers B134-F11/B134-R1 (A) and B134-F5/B134-R5 (B) with the purified genomic DNA of *P. mikwangii* KCOM 1628^T. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. Lanes: S, 1 K base pair DNA ladder; 1, 4 ng; 2, 400 pg; 3, 40 pg; 4, 4 pg; 5, 400 fg; 6, 40 fg; 7, 4 fg; 8, (-) control DDW.

하고, 72°C에서 5분간 최종 중합과정을 시행하였다. 중합효소연쇄반응이 끝난 후, 총 반응물 중 4 µl를 1.5% 아가로스 젤을 매질로 전기영동하여 중합효소연쇄반응 증폭 여부를 확인하였다. 이때, 전기영동은 Tris-acetate buffer (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA, [pH8.0])를 전해질로 사용하여 100V에서 15분간 실시하였으며, 증폭물은 GoodView™ Nucleic Acid Stain (SBS Greentech, Beijing, China)으로 염색하여 UV transilluminator로 확인하였다[10].

PCR 프라이머 쌍들(B134-F11/B134-R1 및 B134-F5/B134-R5)의 *P. mikwangii*에 대한 종-특이성 검증을 위한 PCR 반응조건은 gradinet PCR과 같았고, 다만 결합온도는 B134-F11/B134-R1 쌍의 경우 64°C, B134-F5/B134-R5 쌍의 경우 68°C로 사용한 것만 차이가 있었다.

PCR 프라이머 쌍들(B134-F11/B134-R1 및 B134-F5/B134-R5)의 민감도는 *P. mikwangii* KCOM 1628^T의 지놈 DNA를 4 ng부터 4 fg까지 10배씩 희석하여 중합효소연쇄반응을 시행하여 측정하였으며, 이때 중합효소연쇄반응 조건은 위에 기술한 종-특이성 검증 시와 같았다.

결 과

*P. mikwangii*을 종-특이적으로 검출하기 위해 16S rDNA 핵산염기서열을 기반으로 설계된 중합효소연쇄반응 프라이머 쌍들(B134-F11/B134-R1 및 B134-F5/B134-R5)의 적정 결합온도를 측정한 결과, *P. mikwangii* KCOM 1628^T 지놈 DNA를 주형으로 한 경우 B134-F11/B134-R1 쌍은 68°C까지 PCR 증폭물이 생성되었지만, 64°C까지 가장 진한 PCR 증폭물이 보였다. B134-F5/B134-R5 쌍의 경우 70°C까지 비교적 비슷한 진하기의 PCR 증폭물이 생성되었다(Fig. 1). 반면에 대조군으로 사용한 *P. asaccharolyticus* KCTC 3321^T 지놈 DNA에서는 B134-F11/B134-R1 및 B134-F5/B134-R5 쌍을 이용하여 PCR를 시행한 결과 본 실험에 사용한 모든 결합온도에서 PCR 산물이 증폭되지 않았다(Fig. 1). 이러한 결과를 바탕으로 B134-F11/B134-R1 및 B134-F5/B134-R5 쌍의 최종 결합온도를 각각 64°C 및 68°C로 정하였다.

*P. mikwangii*을 검출하기 위해 16S rDNA 핵산염기서열을 기반으로 설계된 중합효소연쇄반응 프라이머 쌍들(B134-F11/B134-R1 및 B134-F5/B134-R5)의 종-특이성을 조사한 결과, 본 실험에 사용된 3균주의 *P. mikwangii* 지놈 DNA에서 668 bp과 796 bp의 PCR 증폭물이 확인되었다(Fig. 2). 또한 *P. mikwangii*를 제외한 6종 *Peptoniphilus* spp. 표준균주들을 포함한 구강 내 세균 종들의 지놈 DNA에서는 중합효소연쇄반응 증폭물이 확인되지 않았다(Fig. 2).

본 연구에서 *P. mikwangii*를 종-특이적으로 검출하기 위

해 설계된 PCR 프라이머 쌍들(B134-F11/B134-R1 & B134-F5/B134-R5)의 민감도(최소검출한도)를 측정하기 위해 *P. mikwangii* KCOM 1628^T의 지놈 DNA를 4 ng부터 4 fg까지 10배씩 희석하여 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 그 결과 B134-F11/B134-R1 프라이머 쌍은 400 fg까지, B134-F5/B134-R5 프라이머 쌍은 40 fg까지 *P. mikwangii* KCOM 1628^T의 지놈 DNA를 검출할 수 있었다(Fig. 3).

고 찰

본 연구 결과 *P. mikwangii*를 종-특이적으로 검출하기 위해 16S rDNA 핵산염기서열을 기반으로 설계된 B134-F11/B134-R1 및 B134-F5/B134-R5 프라이머 쌍들은 중합효소연쇄반응법에 의해 *P. mikwangii* 지놈 DNA를 각각 400 fg 및 40 fg까지 종-특이적으로 검출할 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 2 및 3). *P. mikwangii* KCOM 1628^T의 세균 지놈 크기가 약 1.5 Mb인 점[11]을 고려하면, B134-F11/B134-R1 및 B134-F5/B134-R5 프라이머 쌍들은 *P. mikwangii*를 각각 약 240 및 24 마리에 해당하는 지놈 DNA까지 검출할 수 있는 민감도가 있음을 의미한다.

본 연구에서 중합효소연쇄반응 프라이머 설계에 사용한 PrimerSelect (DNASTAR Inc.) 프로그램을 이용할 때, 중합효소연쇄반응 프라이머와 주형 지놈 DNA 간의 최적결합온도가 자동적으로 제시된다. 하지만, 최적결합온도는 gradient PCR을 실시하여 구할 수 있다[9,12]. 본 연구에서도 PrimerSelect (DNASTAR Inc.)를 이용하여 얻은 B134-F11/B134-R1 및 B134-F5/B134-R5 프라이머 쌍 각각의 최적결합온도는 57.5 및 58.2°C였지만, 실제 최적결합온도는 각각 64°C 및 68°C였다(Fig 1). 즉, *P. mikwangii*와 유전자 수준에서 가장 가까운 *Peptoniphilus asaccharolyticus* 균주(KCTC 3321^T)의 지놈 DNA를 이용하여 결합온도를 56-70°C 사이에서 2°C 간격으로 중합효소연쇄반응을 실시하여 *P. asaccharolyticus* KCTC 3321^T 균주 지놈 DNA에서는 증폭물이 보이지 않고, *P. mikwangii* 균주(KCOM 1628^T) 지놈 DNA에서 생성된 증폭물들의 밴드 진하기가 동일하게 유지되는 온도 중 가장 높은 온도를 최종 결합온도로 정하였다.

세균 종-특이성 중합효소연쇄반응 프라이머를 설계하기 위한 표적 유전자차로는 16S rDNA가 가장 많이 사용되고 있다. 그 이유는 16S rDNA는 세균의 종-수준에서 분류를 하는 황금기준 중의 하나이기 때문에 모든 세균 종의 16S rDNA 데이터가 잘 확보되어 있기 때문이다[13].

이상의 연구결과를 요약하면, *P. mikwangii* 종-특이적으로 검출하기 위해 개발된 B134-F11/B134-R1 및 B134-F5/B134-R5 프라이머 쌍들은 종 특이성이 뛰어나며, *P.*

mikwangii 균주를 약 240 및 24 마리까지 검출할 수 있는 민감도를 갖는다는 것이 확인되었다. 이들 프라이머 쌍들은 항 후 구강 내 세균 감염성질환과의 연관성을 밝히는 역학 연구에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2016학년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interest.

References

1. Cho E, Park SN, Shin Y, Lim YK, Paek J, Kim HK, Hwang CH, Jo E, Jin D, Chang YH, Kook JK. *Peptoniphilus mikwangii* sp. nov., isolated from a clinical specimen of human origin. *Curr Microbiol.* 2015;70:260-266. doi:10.1007/s00284-014-0712-7.
2. Murdoch DC. Gram-positive anaerobic cocci. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:181-120.
3. Ezaki T, Kawamura Y, Li N, Li ZY, Zhao L, Shu S. Proposal of the genera *Anaerococcus* gen. nov., *Peptoniphilus* gen. nov. and *Gallicola* gen. nov. for members of the genus *Peptostreptococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51:1521-1528.
4. Murdoch DA, Shah HN. Reclassification of *Peptostreptococcus magnus* (Prevot 1933) Holdeman and Moore 1972 as *Finegoldia magna* comb. nov. and *Peptostreptococcus micros* (Prevot 1933) Smith 1957 as *Micromonas micros* comb. nov. *Anaerobe* 1999;5:555-559.
5. Tindall BJ, Euzéby JP. Proposal of *Parvimonas* gen. nov. and *Quattrionicoccus* gen. nov. as replacements for the illegitimate, prokaryotic, generic names *Micromonas* Murdoch and Shah 2000 and *Quadracoccus* Maszenan et al. 2002, respectively. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56:2711-2713.
6. Lee SM, Yoo SY, Kim HS, Kim KW, Yoon YJ, Lim SH, Shin HY, Kook JK. Prevalence of putative periodontopathogens in subgingival dental plaques from gingivitis lesions in Korean orthodontic patients. *J Microbiol.* 2005;43:260-265.
7. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. 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.
8. Lee YJ, Kim MK, Hwang HK, Kook JK. Isolation and identification of bacteria from the root canal of the teeth diagnosed as the acute pulpitis and acute periapical abscess. *J Korean Acad Conserv Dent.* 2005;30:409-422. doi: <https://doi.org/10.5395/JKACD.2005.30.5.409>.
9. 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.
10. Han MJ, Chung CH, Kim HJ, Kook JK, Yoo SY. Detection of periodontal disease related bacteria from the implant-abutment interface in oral cavity. *J Korean Acad Prosthodont.* 2008;46:116-124.
11. Cho E, Park SN, Kim HK, Kim DS, Jung J, Baek JH, Lim YK, Jo E, Choi MH, Chang YH, Shin Y, Paek J, Shin JH, Kim J, Choi SH, Park HS, Kim H, Kook JK. Draft genome sequence of the novel *Peptoniphilus* sp. strain ChDC B134, isolated from a human periapical abscess lesion. *Genome Announc.* 2013;1:pii:e00822-13. doi: 10.1128/genomeA.00822-13.
12. 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 51190^T and subsp. *vincentii* ATCC 49256^T. *Anaerobe* 2010;16:43-46. doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.04.003.
13. 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.