

Original Article

Int J Oral Biol 46:155-159, 2021
 pISSN: 1226-7155 • eISSN: 2287-6618
<https://doi.org/10.11620/IJOB.2021.46.4.155>

Development of strain-specific polymerase chain reaction primers to detect *Fusobacterium hwasookii* strains

Yun Kyong Lim¹ and Joong-Ki Kook^{1,2*}

¹Korean Collection for Oral Microbiology and Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju 61452, Republic of Korea

²Institute of Dental Science, Chosun University, Gwangju 61452, Republic of Korea

This study aimed to develop strain-specific polymerase chain reaction (PCR) primers to detect *Fusobacterium hwasookii* KCOM 1249^T, *F. hwasookii* KCOM 1253, *F. hwasookii* KCOM 1256, *F. hwasookii* KCOM 1258, and *F. hwasookii* KCOM 1268 on the basis of nucleotide sequences of a gene specific to each strain. The unique genes for each *F. hwasookii* strain were determined on the basis of their genome sequences using Roary. The strain-specific PCR primers based on each strain-specific gene were designed using PrimerSelect. The specificity of each PCR primer was determined using the genomic DNA of the 5 *F. hwasookii* strains and 25 strains of oral bacterial species. The detection limit and sensitivity of each strain-specific PCR primer pair were determined using the genomic DNA of each target strain. The results showed that the strain-specific PCR primers correspond to *F. hwasookii* KCOM 1249^T, *F. hwasookii* KCOM 1253, *F. hwasookii* KCOM 1258, *F. hwasookii* KCOM 1256/*F. nucleatum* subsp. *polymorphum* KCOM 1260, or *F. hwasookii* KCOM 1268/*Fusobacterium* sp. oral taxon 203 were developed. The detection limits of these strain-specific PCR primers ranged from 0.2 to 2 ng of genomic DNA for each target strain. The results suggest that these strain-specific PCR primers are valuable in quality control for detecting specific *F. hwasookii* strains.

Keywords: *Fusobacterium hwasookii*, Strain-specific, Polymerase chain reaction primers, Detection

Introduction


*Fusobacterium hwasookii*는 그람 음성의 혐기성 세균으로 한국인의 치주질환에 이환된 치아의 치은연하치면세균막에서 분리되어 새로운 종으로 보고되었다[1]. 현재까지 *F. hwasookii* 균종은 한국인에게서 분리된 5개 균주(ChDC F128^T, ChDC F145, ChDC F174, ChDC F206, and ChDC F300)만이 보고되었다.

세균 종 수준에서의 분류에 있어 중요한 기준은 16S ribosomal gene (16S rDNA) 핵산 염기서열비교분석법과 세균 지놈 핵산염기서열 기반의 상동성 비교법이다[2,3]. 즉, 분류가 필요한 균주 16S rDNA

의 상동성이 기존 세균 종의 표준균주와 98.6% 이상이면, 지놈 핵산 염기서열을 바탕으로 digital DNA-DNA hybridization이라 할 수 있는 genome-to-genome distance 분석법 또는 average nucleotide identity (ANI) 분석법에 의한 값이 각각 70% 이상 또는 94-95% 이상이면, 이들이 같은 종으로 분류할 수 있다[3]. ANI 분석법에 의하면, 비교하고자 하는 두 균주의 지놈 핵산염기서열 중 60% 이상이 비교 대상이 되어야 한다는 조건이 있다[4]. 이는 같은 세균 종이라도 유전자 핵산염기서열은 40%까지 다를 수 있다는 것을 의미한다.

세균 균주의 보존 과정에서 균주 수준에서의 동정을 위해, 균주-특이 DNA 프로브 핵산염기서열을 기반으로 균주-특이 polymerase chain

Received October 19, 2021; Revised December 7, 2021; Accepted December 7, 2021

*Correspondence to: Joong-Ki Kook, E-mail: jkkook@chosun.ac.kr  <https://orcid.org/0000-0003-2628-2870>

Copyright © The Korean Academy of Oral Biology

© This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

reaction (PCR) 프라이머가 개발되어 보고되었다[5-7]. 본 연구는 5개 *F. hwasookii* 균주 각각의 지놈 핵산염기서열의 상동성 비교 분석을 통해 각 균주에만 존재하는 유전자를 찾고, 해당 유전자의 핵산염기서열을 바탕으로 각 균주를 동정할 수 있는 균주-특이 PCR 프라이머를 개발하기 위해 시행되었다.

Materials and Methods

1. 세균 및 세균 배양

본 연구에서 사용된 균주들은 Table 1에 정리하였다. 이들 균주들은 한국구강미생물자원은행(Korean Collection for Oral Microbiol-

ogy, Gwangju, Korea), American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA), 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, Biological Resource Center, Daejeon, Korea) 및 Culture Collection, University of Göteborg (CCUG, Göteborg, Sweden)에서 분양받아 사용하였다.

Fusobacterium spp., *Capnocytophaga* spp., *Prevotella* spp., *Leptotrichia buccalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Tannerella forsythia* 및 *Selenomonas noxia* 균주들은 tryptic soy broth (BD Diagnostics, Spark, MD, USA)에 0.05% cysteine HCl-H₂O, 0.5% yeast extract, 5 µg/mL hemin 및 2 µg/mL vitamin K₁이 첨가된 배지를 이용하여 85% N₂, 10% CO₂, 5% H₂ 가스를 공급한 37°C 혐기성 세균배양기(Bactron I; Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA)에서 배양하였다. *Streptococcus* spp., *Actinomyces naeslundii*, *Neisseria meningitidis* 균주들은 brain heart infusion (BD Diagnostics) 배지를 이용하여 37°C, CO₂를 공급하는 세균배양기(Thermo Forma, Waltham, MA, USA)에서 배양하였다[8].

2. *F. hwasookii* 5개 균주에 대한 균주-특이 PCR 프라이머 쌍 설계

본 연구에서 사용된 5개의 *F. hwasookii* 균주들의 지놈 핵산염기서열(Table 2)을 바탕으로, 각 균주에만 존재하는 유전자를 찾기 위해, 웹 사이트(<http://sanger-pathogens.github.io/Roary>)에서 제공하는 대량의 지놈 핵산염기서열 데이터를 빠르게 분석할 수 있는 Roary 프로그램[9]을 이용하여 각각의 균주들에만 존재하는 유전자를 검색하였다. 이들 중에서 기능이 밝혀지지 않은 유전자의 핵산염기서열을 바탕으로, PrimerSelect 프로그램(DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)을 이용하여 PCR 프라이머 쌍을 설계하였다. 이들의 핵산염기서열 및 예상되는 PCR 증폭물의 크기는 Table 3에 정리하였다. 이들 PCR 프라이머들은 바이오니아사(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 제작하였다.

Table 1. The bacterial strains used in this study

Species	Strains
<i>Fusobacterium hwasookii</i>	KCOM 1249 ^T , KCOM 1253, KCOM 1256, KCOM 1258, KCOM 1268
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>	ATCC 25586 ^T
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i>	ATCC 10953 ^T
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>vincentii</i>	ATCC 49256 ^T
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	ATCC 51191 ^T
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	ATCC 33693 ^T
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	ATCC 25286 ^T
<i>Fusobacterium simiae</i>	CCUG 16798 ^T
<i>Leptotrichia buccalis</i>	CCUG 34316 ^T
<i>Actinomyces naeslundii</i>	CCUG 35333 ^T
<i>Campylobacter rectus</i>	ATCC 33238 ^T
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	ATCC 33624 ^T
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	KCTC 5787 ^T
<i>Neisseria meningitidis</i>	ATCC 13077 ^T
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277 ^T
<i>Prevotella baroniae</i>	CCUG 50418 ^T
<i>Prevotella bivia</i>	ATCC 29303 ^T
<i>Prevotella intermedia</i>	ATCC 25611 ^T
<i>Prevotella nigrescens</i>	ATCC 33563 ^T
<i>Prevotella oralis</i>	ATCC 33269 ^T
<i>Prevotella oris</i>	CCUG 15405 ^T
<i>Selenomonas noxia</i>	KCTC 5746 ^T
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175 ^T
<i>Streptococcus sanguinis</i>	CCUG 17826 ^T
<i>Streptococcus sobrinus</i>	ATCC 33478 ^T
<i>Tannerella forsythia</i>	ATCC 43037 ^T

Table 2. The GenBank accession numbers of the genomic DNA sequences of five *Fusobacterium hwasookii* strains

Strains	GenBank accession number
<i>Fusobacterium hwasookii</i> KCOM 1249 ^T (ChDC F128)	NZ_ALVD000000000.1
<i>Fusobacterium hwasookii</i> KCOM 1253 (ChDC F145)	NZ_ATKE000000000.1
<i>Fusobacterium hwasookii</i> KCOM 1256 (ChDC F174)	NZ_CP013331.1
<i>Fusobacterium hwasookii</i> KCOM 1258 (ChDC F206)	NZ_CP013336.1
<i>Fusobacterium hwasookii</i> KCOM 1268 (ChDC F300)	NZ_CP013334.1

3. *F. hwasookii* 5개 균주에 대한 균주-특이 PCR 프라이머들의 종-특이성 및 민감도(검출 한계) 검증

본 연구에서 이용된 균주들의 지놈 DNA는 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 방법에 따라 추출하였다[10]. 추출된 지놈 DNAs는 260 nm 파장에서의 흡광도를 비색정량기(EPOCH™ Microplate Spectrophotometer; BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 측정하였다.

본 연구에서 설계한 *F. hwasookii* 5개 균주 각각에 대한 PCR 프라이머 쌍들의 균주 특이성 검증은 AccuPower® PCR PreMix (Bioneer) 와 MyGenie™ 96 Gradient Thermal Block (Bioneer)을 사용하였다. 즉, PCR PreMix 반응 튜브에 2 ng의 지놈 DNA, 각각의 프라이머 쌍을 1 pmole 넣고, 최종 20 µL가 되도록 나머지는 멸균된 증류수를 넣었다. PCR 반응은 전변성 과정(95°C에서 5분) 후, 변성과정(95°C에서 30초), 결합과정(Table 3의 각 균주에 해당하는 온도에서 30초), 중합과정(72°C에서 30초) 등을 30회 시행하고, 최종 중합과정(72°C에서 5분)을 시행하였다. PCR 증폭물 확인은 아가로스 젤을 매질로 이용하여 전기영동하고, GoodView™ Nucleic Acid Stain (SBS Greentech, Beijing, China)으로 염색하여 UV transilluminator로 확인하였다.

본 연구에서 설계된 *F. hwasookii* 5개 균주 특이 PCR 프라이머 쌍들의 민감도는 각각의 균주 지놈 DNA를 2 ng부터 2 fg까지 10배씩 순차적으로 희석하여 PCR 주형으로 이용하였으며, 앞에서 시행한 균주 특이성 검증을 위한 PCR과 같은 조건에서 PCR을 시행하여 측정하였다.

Results

F. hwasookii 5개 균주 각각에 대한 균주-특이 PCR 프라이머 쌍을 개발하기 위해서, 이들 균주들의 지놈 핵산염기서열을 미국국립보건원에서 제공하는 Genome 검색 프로그램(www.ncbi.nlm.nih.gov)에서 내려받아, 각 균주에만 있는 유전자를 Roary 프로그램[9]을 이용하여 분석하였다(Supplementary Tables 1–5). 그 결과, KCOM 1249^T, KCOM 1253, KCOM 1256, KCOM 1258, KCOM 1268 균주 각각에만 존재하는 유전자 수는 282, 70, 279, 149, 227개였다(Supplementary

Tables 1–5). 이들 중, 균주-특이성을 높이기 위해, 아직 기능이 밝혀지지 않은 유전자(hypothetic gene)를 무작위로 골라서 균주-특이 PCR 프라이머 쌍을 설계하기 위한 주형 유전자로 정하였다(Table 3).

F. hwasookii 5개 균주 각각에 대한 PCR 프라이머 쌍의 균주-특이성을 *F. hwasookii*와 유전학적으로 유사한 종인 *Fusobacterium* spp.와 *L. buccalis* 균주들의 지놈 DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하여 조사하였다. 그 결과 5개 프라이머 쌍 모두 각각의 표적이 되는 *F. hwasookii* 균주 지놈 DNA를 주형으로 한 경우에서만 예상되는 크기의 PCR 증폭물이 생성되었다(Fig. 1). 또한, *F. hwasookii* 5개 균주 각각에 대한 PCR 프라이머 쌍의 균주-특이성을 17개 구강 내 세균 중 각각의 표준균주 지놈 핵산염기서열을 주형으로 PCR을 수행하여 조사한 결과에서도, 각각의 표적이 되는 *F. hwasookii* 균주 지놈 DNA를 주형으로 한 경우에서만 PCR 증폭물이 생성되었다(Fig. 2).

본 연구에서 설계한 *F. hwasookii* 5개 균주 각각에 대한 균주-특

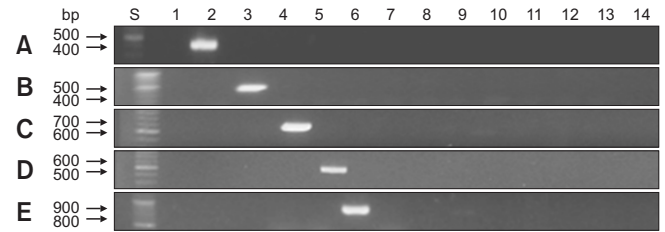


Fig. 1. Specificity test of the F128-F7/F128-R7 primers (A), F145-F1/F145-R1 primers (B), F174-F2/F174-R2 primers (C), F206-F3/F206-R3 primers (D) and F300-F1/F300-R2 primers (E) with 2 ng of genomic DNA of each type strain of *Fusobacterium* spp. and *Leptotrichia buccalis*. The polymerase chain reaction reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. Lanes: S, size marker; 1, negative control (distilled deionized water); 2, *F. hwasookii* KCOM 1249^T; 3, *F. hwasookii* KCOM 1253; 4, *F. hwasookii* KCOM 1256; 5, *F. hwasookii* KCOM 1258; 6, *F. hwasookii* KCOM 1268; 7, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T; 8, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T; 9, *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T; 10, *F. nucleatum* subsp. *animalis* ATCC 51191^T; 11, *F. periodonticum* ATCC 33693^T; 12, *F. necrophorum* ATCC 25286^T; 13, *F. simiae* CCUG 16798^T; 14, *L. buccalis* CCUG 34316^T.

Table 3. The information of polymerase chain reaction primers designed in this study

Strain	Gene	location (nts)	Primer names: oligonucleotide sequences (5 → 3)	Annealing temperature (°C)	Size of amplicon (bp)
KCOM 1249 ^T	H5V36_03235	698,051.. 699,487	F128-F7: AATTGCAAAAAGCCATAGTA F128-R7: AAGTTAGAAGTATTTGGGTTAT	55	414
KCOM 1253	H5V38_03895	846,254.. 851,005	F145-F1: TCCTGCGAGATTCCAAGAGACA F145-R1: CTGCCAGATAGGAGGTTCCATTC	58	458
KCOM 1256	RN87_03580	758,533.. 761,922	F174-F2: GACCGAATACTAAATGGGATGATG F174-R2: TCCACCTGCTTTAAAATGCTCTA	60	626
KCOM 1258	RN92_09875	2,064,924.. 2,067,143	F206-F3: TTGGGAATCTAAAAAGCACTAT F206-R3: GAAGCCATGTCTCCAATCA	60	520
KCOM 1268	RN97_11600	2,364,909.. 2,366,555	F300-F1: TAAAGGGAGATGTAGAGATAAGTAA F300-R2: GTAAGCCCCGTATTTGAA	54	853

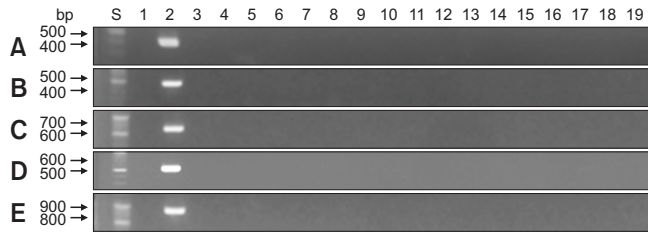


Fig. 2. Specificity test of the F128-F7/F128-R7 primers (A), F145-F1/F145-R1 primers (B), F174-F2/F174-R2 primers (C), F206-F3/F206-R3 primers (D) and F300-F1/F300-R2 primers (E) with 2 ng of genomic DNA of each type strain of oral bacteria. The polymerase chain reaction reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. Lanes: S, size marker; 1, negative control (distilled deionized water); 2, positive control (*Fusobacterium hwasookii* KCOM 1249^T, *F. hwasookii* KCOM 1253, *F. hwasookii* KCOM 1256, *F. hwasookii* KCOM 1258, and *F. hwasookii* KCOM 1268 in (A), (B), (C), (D), and (E), respectively); 3, *Actinomyces naeslundii* CCUG 35333^T; 4, *Campylobacter rectus* ATCC 33238^T; 5, *Capnocytophaga gingivalis* ATCC 33624^T; 6, *Capnocytophaga ochracea* KCTC 5787^T; 7, *Neisseria meningitidis* ATCC 13077^T; 8, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277^T; 9, *Prevotella baroniae* CCUG 50418^T; 10, *Prevotella bivia* ATCC 29303^T; 11, *Prevotella intermedia* ATCC 25611^T; 12, *Prevotella nigrescens* ATCC 33563^T; 13, *Prevotella oralis* ATCC 33269^T; 14, *Prevotella oris* CCUG 15405^T; 15, *Seelenomonas noxia* KCTC 5746^T; 16, *Streptococcus mutans* ATCC 25175^T; 17, *Streptococcus sanguinis* CCUG 17826^T; 18, *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478^T; 19, *Tannerella forsythia* ATCC 43037^T.

이 PCR 프라이머 쌍의 민감도(검출한계)를 측정된 결과, F128-F7/F128-R7, F174-F2/F174-R2, F206-F3/F206-R3과 F300-F1/F300-R2 쌍들은 각각 *F. hwasookii* KCOM 1249^T, *F. hwasookii* KCOM 1256, *F. hwasookii* KCOM 1258 및 *F. hwasookii* KCOM 1268 균주 지놈 DNA 2 pg까지 검출이 가능하였고, F145-F1/F145-R1 쌍은 *F. hwasookii* KCOM 1253 균주 지놈 DNA 0.2 pg까지 검출할 수 있었다(Fig. 3).

Discussion

본 연구는 *F. hwasookii* KCOM 1249^T, *F. hwasookii* KCOM 1253, *F. hwasookii* KCOM 1256, *F. hwasookii* KCOM 1258 및 *F. hwasookii* KCOM 1268 각각의 지놈 DNA 핵산염기서열을 Roary 프로그램을 이용하여, 각각의 균주들에만 존재하는 유전자 핵산염기서열을 바탕으로 균주-특이 PCR 프라이머 쌍을 개발하기 위해 시행되었다. 그 결과 *F. hwasookii* KCOM 1249^T, *F. hwasookii* KCOM 1253, *F. hwasookii* KCOM 1256, *F. hwasookii* KCOM 1258 및 *F. hwasookii* KCOM 1268 각각의 균주를 특이적으로 검출할 수 있는 F128-F7/F128-R7, F145-F1/F145-R1, F174-F2/F174-R2, F206-F3/F206-R3 및 F300-F1/F300-R2 쌍들이 설계되었으며, 25종 구강 세균 균주들의 지놈 DNA를 이용하여 균주-특이성이 있음을 확인하였다(Figs. 1 and 2). 또한, 이들 프라이머 쌍들은 *F. hwasookii* 5개 균주 각각의 지놈 DNA를 2 pg 또는 0.2 pg까지 검출할 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 3).

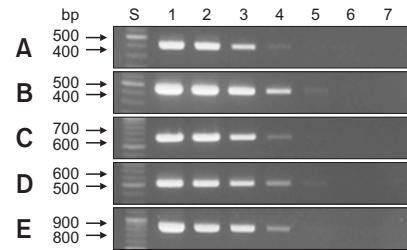


Fig. 3. Sensitivity test of the F128-F7/F128-R7 primers (A), F145-F1/F145-R1 primers (B), F174-F2/F174-R2 primers (C), F206-F3/F206-R3 primers (D) and F300-F1/F300-R2 primers (E) with the purified genomic DNA of *Fusobacterium hwasookii* KCOM 1249^T, *F. hwasookii* KCOM 1253, *F. hwasookii* KCOM 1256, *F. hwasookii* KCOM 1258, and *F. hwasookii* KCOM 1268, respectively. The polymerase chain reaction reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. Lanes: S, 100 base pair DNA ladder (Bioneer, Korea); 1 through 7, purified genomic DNA serially diluted 10-fold, from 2 ng to 2 fg.

본 연구에서 설계된 *F. hwasookii* 5개 균주 각각에 대한 프라이머 쌍들의 균주-특이성을, 미국국립보건원에서 제공하는 핵산염기서열 데이터베이스를 기반으로 한 Blastn 검색 프로그램(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)을 이용하여 추가로 조사하였다. 그 결과, *F. hwasookii* KCOM 1249^T와 *F. hwasookii* KCOM 1253 균주 각각에 대한 균주-특이 프라이머 쌍들(각각 F128-F7/F128-R7와 F145-F1/F145-R1)의 전방 및 후방 프라이머 핵산염기서열 모두에 대한 100% 상동성을 갖는 다른 균주는 검색되지 않았다(데이터 제시는 생략). *F. hwasookii* KCOM 1258 균주-특이 PCR 프라이머 쌍 중 전방 프라이머(F206-F3)의 핵산염기서열과 100% (22/22) 일치하는 부분이 *Fusobacterium pseudoperiodonticum* KCOM 2555과 *F. pseudoperiodonticum* KCOM 2653 균주 지놈 핵산염기서열(각각 GenBank accession no. CP024704와 CP024705)에 존재하였지만, 후방 프라이머(F206-R3)의 핵산염기서열과 상동성이 있는 부분은 *F. pseudoperiodonticum* KCOM 2555과 *F. pseudoperiodonticum* KCOM 2653 균주 지놈 핵산염기서열에는 존재하지 않았다(데이터 제시는 생략). 또는 전방 및 후방 프라이머들 모두와 상동성이 있는 균주는 존재하지 않았다. 즉, 본 연구에서 설계된 F128-F7/F128-R7, F145-F1/F145-R1와 F206-F3/F206-R3 프라이머 쌍들은 각각 *F. hwasookii* KCOM 1249^T, *F. hwasookii* KCOM 1253과 *F. hwasookii* KCOM 1258 균주들에 대한 균주-특이성이 있음을 확인할 수 있었다.

반면에 *F. hwasookii* KCOM 1256 균주-특이 PCR 프라이머 쌍이라 조사되었던 전방 프라이머(F174-F2)와 후방 프라이머(F174-R2) 핵산염기서열은 *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* KCOM 1260의 지놈 핵산염기서열(GenBank accession no. CP21934)의 각각 2,032,435...2,032,412 nts와 2,031,810..2,031,832 nts 핵산염기서열과 95.83% (23/24, 5'에서 5번째 핵산염기서열이 guanine 대신 thymidine임)와 100% (23/23) 상동성을 보였다. 전방 프라이머의 상동성이 95.83%이지만, 결합운도를 낮출 경우 F174-F2/F174-R2 프라이머 쌍에 의해 *F. nuclea-*

tum subsp. *polymorphum* KCOM 1260 지놈 DNA가 증폭될 확률이 높고, 이때 예상되는 PCR 증폭물의 크기도 626 bp가 되기 때문에, F174-F2/F174-R2 프라이머 쌍은 *F. hwasookii* KCOM 1256와 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* KCOM 1260 균주를 모두 검출할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 *F. hwasookii* KCOM 1268 균주-특이 PCR 프라이머 쌍이라 조사되었던 F300-F1와 F300-R2 프라이머 쌍들의 핵산염기서열을 Blastn 검색 프로그램으로 상동성을 조사한 결과, *Fusobacterium* sp. oral taxon 203 지놈 핵산염기서열(GenBank accession no. CP016200)의 각각 244,686..244,662 nts와 243,834..243,851 nts에 100% 상동성이 있음을 확인할 수 있었고, 이때 예상되는 PCR 증폭물 크기도 853 bp였다(데이터 제시는 생략). 이는 F300-F1/F300-R2 프라이머 쌍은 *F. hwasookii* KCOM 1268과 *Fusobacterium* sp. oral taxon 203 균주를 동시에 검출할 수 있음을 의미한다. 이러한 결과는 균주-특이 PCR 프라이머 쌍을 설계할 때에는 대조군으로 사용되는 균주들의 지놈 DNA를 이용한 종-특이성 조사를 위한 PCR을 시행하기 앞서, GenBank라는 핵산염기서열 데이터베이스 기반 상동성 검색 프로그램인 Blastn을 이용한 상동성 검사를 시행해야 함을 시사한다.

이상의 연구 결과를 요약하면, 본 연구에서 Roary 프로그램을 이용하여 *F. hwasookii* 5개 균주의 지놈 핵산염기서열 중 각각의 지놈에만 존재하는 유전자를 바탕으로 균주-특이 PCR 프라이머를 설계한 결과, *F. hwasookii* KCOM 1249^T, *F. hwasookii* KCOM 1253와 *F. hwasookii* KCOM 1258 균주들 각각에 대한 균주-특이 PCR 프라이머 쌍

을 개발하였으며, *F. hwasookii* KCOM 1256/*F. nucleatum* subsp. *polymorphum* KCOM 1260 균주들에 대한 특이 PCR 프라이머 쌍 및 *F. hwasookii* KCOM 1268/*Fusobacterium* sp. oral taxon 203 균주들에 대한 특이 PCR 프라이머 쌍을 개발하였다. 이들 균주-특이 PCR 프라이머 쌍들은 각각의 균주들의 정도 관리에 사용할 수 있을 것으로 판단된다. 향후 연구에서 *F. hwasookii* KCOM 1256과 *F. hwasookii* KCOM 1268 각각에 대한 균주-특이 PCR 프라이머 쌍 개발이 필요할 것으로 생각된다.

Acknowledgements

이 논문은 2020학년도 조선대학교 학술연구비(2020-737716-01)의 지원을 받아 연구되었음.

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Supplementary Data

Supplementary data is available at <http://www.kijob.or.kr> only.

References

1. Cho E, Park SN, Lim YK, Shin Y, Paek J, Hwang CH, Chang YH, Kook JK. *Fusobacterium hwasookii* sp. nov., isolated from a human periodontitis lesion. *Curr Microbiol* 2015;70:169-75. doi: 10.1007/s00284-014-0692-7.
2. Krieg NR. Identification of procaryotes. In: Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Vol. 1. New York: Springer; 2001. p. 33-8.
3. Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen H, Arahal DR, da Costa MS, Rooney AP, Yi H, Xu XW, De Meyer S, Trujillo ME. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2018; 68:461-6. doi: 10.1099/ijsem.0.002516.
4. Lee I, Ouk Kim Y, Park SC, Chun J. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;66:1100-3. doi: 10.1099/ijsem.0.000760.
5. Kim HS, Song SK, Yoo SY, Jin DC, Shin HS, Lim CK, Kim MS, Kim JS, Choe SJ, Kook JK. Development of strain-specific PCR primers based on a DNA probe Fu12 for the identification of *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T. *J Microbiol* 2005;43:331-6.
6. 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;16:43-6. doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.04.003.
7. Kim MJ, Min JB, Lim SA, Kook JK. Strain-specific PCR primers for the detection of *Prevotella intermedia* ATCC 49046. *Int J Oral Biol* 2011;36:79-82.
8. Park SN, Lim YK, Kook JK. Development of quantitative real-time PCR primers for detecting 42 oral bacterial species. *Arch Microbiol* 2013;195:473-82. doi: 10.1007/s00203-013-0896-4.
9. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MT, Fookes M, Falush D, Keane JA, Parkhill J. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* 2015;31:3691-3. doi: 10.1093/bioinformatics/btv421.
10. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Curr Protoc Mol Biol* 2001;Chapter 2:Unit 2.4. doi: 10.1002/0471142727.mb0204s56.