

Nested PCR과 DNA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay를 이용한 *Ralstonia solanacearum*의 검출

고영진 · 조홍범^{1*}

다이아프로브(주) 진단사업부, 서경대학교 생물공학과

본 연구는 polymerase chain reaction (PCR) 기법과 DNA enzyme-linked immunosorbent assay (DNA ELISA) 기법을 이용하여 토양내 식물병원균인 *Ralstonia solanacearum*를 검출하고자 하였다. 토양 시료로부터 분석에 사용될 *R. solanacearum* DNA를 추출하기 위하여 몇 가지 방법을 비교 평가한 결과 기존의 DNA 추출 방법에 비하여 Guanidin isothiocyanate와 Chelex-100 resin을 사용하는 방법이 토양 내에 존재하는 다양한 종류의 반응 저해 물질과 *R. solanacearum*만의 고유한 PCR 반응 저해물질들을 제거하는데에 효과적이었다. *R. solanacearum*만을 특이적으로 검출하기 위해 *fliC* 유전자 부위에 특이적인 몇 종의 primer들을 제작하였다. 이들 중 높은 민감도와 특이도를 나타내는 두 set의 primer Rsol/*fliC* (forward; 5-GAACGCCAACGGTGCGAACT-3 and reverse; 5-GGCGG CCTTCAGGGAGGTC-3, designed by J. Schönfeld *et al.*)와 RS_247 (forward; 5-GGCGGCTGTGCGGCRG-3 and reverse; 5-CGGTCGCGTTGGCAAC-3, designed by this study)를 선정하여 nested PCR을 수행할 수 있도록 고안하였다. Nested PCR primer에 biotin을 표지하였고 nested PCR 산물의 내부 서열과 특이적으로 교잡반응을 할 수 있는 probe를 제작하여 PCR 결과를 DNA-EIA 반응으로 확인 분석할 수 있도록 하였다. Primary PCR과 nested PCR의 산물을 전기영동 상에서 확인한 결과, nested PCR이 약 10² 정도의 높은 민감도를 나타내었고 DNA-EIA의 경우 10²~10³ 정도의 민감도를 상승시켜주는 것으로 확인되었다.

Key words □ DNA enzyme immunoassay, *Ralstonia solanacearum*

*Ralstonia solanacearum*은 열대와 온대기후 지역에서 주요 농작물을 포함한 450여 종의 식물에서 풋마름병을 유발하는 식물병원균이다(9). 특히 고온 다습한 환경에서 가지과 작물들에 가장 큰 피해를 끼치고 있으며(13), 근래에 들어서는 유럽지역에서 감자를 숙주로 하여 낮은 온도에서도 적응할 수 있는 아종들이 발견되고 있다(26). 1998년 7월 제주에서 국내 최초로 감자 풋마름병이 발견된 이래 지금은 우리나라 남부 전 지역에서 감자 풋마름병이 발생되고 있다. 고추와 토마토의 경우에는 더 오래 전부터 풋마름병이 발생되었으며, 최근에와서 발생 빈도가 매우 높아지고 있다(1).

*R. solanacearum*은 편모의 운동성을 이용하여 식물 뿌리의 상처부위로 감염되며 뿌리층에서 집락을 형성한 후 빠르게 퍼져나가 최종적으로 도관을 막음으로써 풋마름병을 유발한다(27, 28). 또한 토양 중에서 월동하고 5년 이상 생존이 가능하며 30 cm 이상의 심층토양에서는 표토층에 비해 수분함량이 높아 장기생존이 가능하다(3). 따라서 청고병 발병 유무를 확인하는 식물의 돌기나 결절 부위에서의 검출 기법뿐 아니라 경작 이전에 토양으로부터 *R. solanacearum*의 존재 유무를 확인하는 것이 매우 중요하다(21).

*R. solanacearum*을 검출하기 위한 PCR 기법의 대부분은

rRNA 유전자 부위를 증폭하여 검출하는 방법이었으며(2, 7, 18, 25, 29), PCR-ribotyping과 RFLP를 병행하여 *R. solanacearum*의 검출과 종간의 분류를 시행하기도 하였다(17). 그러나, *R. solanacearum*의 16S rRNA 유전자는 종간의 유사도가 98% 이상이기 때문에 *R. picketti*와 같이 동일 속의 이종 세균도 양성 결과로 나타났다(23). 이후 16S rRNA 유전자와 함께 endoglucanase, *hrpB* (19) 등과 같은 기능성 유전자를 대상으로 하는 실험이 진행되었는데 *R. solanacearum* strain 1을 검출하기 위하여 삽입 유전자(IS)내에 특이적인 유전부위를 증폭하는 방법을 사용했다는 보고도 있었다(15).

최근 Schfeld 등(21)은 flagellin 유전자(*fliC*) 부위를 검출 target으로 하여 Southern blot hybridization의 방법으로 토양 내에 존재하는 *R. solanacearum*을 검출하였다. 연구 결과 *fliC* 유전자는 아종 간에도 공통적으로 갖고 있으며 균주 특이성도 매우 높은 것으로 확인되었으나 토양에서의 DNA 회수와 PCR 수율이 낮아서 검출 효율성이 떨어지는 것으로 보고되었다. 따라서 본 연구에서는 토양으로부터 순수한 DNA를 효율적으로 회수하고, 새로운 primer를 고안하여 PCR 산물의 특이성과 수율을 높이는 방법을 모색하는 한편 DNA enzyme-linked immunosorbent assay (DNA ELISA)의 방법을 적용하여 토양 내에 존재하는 *R. solanacearum*을 효율적으로 검출할 수 있는 기법을 개발하고자 하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-2-940-7187, Fax: 82-2-919-0345
E-mail: hbcho@skuniv.ac.kr

재료 및 방법

균주의 종류 및 배양 조건

다양한 *Ralstonia solanacearum* strain과 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae*, *Xanthomonas xonopodis* 등 실험에 사용한 균주는 Table 1에 정리하였다. *R. solanacearum* 균주들은 CPG (casamino acid 1 g/L, peptone 10 g/L, glucose 5 g/L) 액체 배지와 1.8% 한천, 0.05% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)가 포함되어진 TZC 고체 평판배지에서 28°C의 온도로 배양되었고, 기타 다른 균주들은 Luria broth 배지에서 34°C로 배양되었다. 토양 시료 1g 당 1×10^9 에서 1×10^3 까지 농도별로 희석한 *R. solanacearum*을 접종하였고 균주의 농도는 Haemacytometer (Marienfeld, Germany)를 이용하여 계수하였다. 이후 *R. solanacearum*이 접종되어진 토양으로부터 DNA를 직접 추출하여 실험에 사용하였고 균주가 접종되지 않은 토양 시료를 대조균으로 사용하였다.

DNA의 추출 및 정제

배양액과 토양으로부터 *R. solanacearum*의 DNA를 추출하였다. 1 ml의 배양액을 원심분리하여 cell pellet을 얻었고 phosphate buffer saline (PBS, 0.01 M phosphate beffer, 0.0027 M potassium chloride, 0.137 M sodium chloride; pH 7.4)으로 3회 세척한 뒤 200 μ l의 PBS에 재현탁시켰다. 토양 시료의 경우 500 μ l 부피의 시료를 준비하였다. 준비되어진 시료에 DNAzol (MRC, USA) 1 ml을 첨가하여 잘 섞고, 이후 과정은 DNAzol 제조사에서 제시하는 사용 방법을 준수하였다. DNAzol 처리 이후 얻어진 DNA pellet에 200 μ l의 chelex-100 resin 5%를 첨가하여 10분간 끓인 다음 원심분리하고 상등액 5 μ l를 취하여 PCR 반응의 DNA 주

형으로 사용하였다.

Primer, probe와 PCR

실험에 사용되어진 primer와 probe는 Table 2에 나타내었다. Primer와 probe는 Primer3 프로그램(Whitehead Institute, MT center for Genome research)을 통하여 제작되었다. *RsolfliC* forward와 reverse primer는 *fliC* 유전자 내의 400 bp PCR 산물을 얻는데 사용되었고 RS_247 forward와 reverse는 nested PCR을 통하여 247 bp의 산물을 얻는데 사용되었다. Probe는 nested PCR 산물에 상보적인 서열로 제작되었다.

PCR은 AmplifonII를 통하여 수행되었다. Primary PCR은 10 \times PCR buffer에 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dUTP와 0.5 μ l의 10 pmol primer set와 1 U의 Taq 중합효소 및 5 μ l의 주형 DNA로 조성되어 수행되었다. 반응 조건은 초기 94°C 5분 후, 94°C 1분, 61°C 1분, 72°C 1분으로 구성된 40 cycles의 반응 후 72°C 5분으로 구성되었다. Primary PCR의 반응 산물은 nested PCR의 주형 DNA로 사용되어졌으며 nested PCR의 조성은 동일하되, 반응 조건은 94°C 30초, 55°C 40초, 72°C 30초로 구성된 30 cycles로 구성되었다. PCR 반응 결과 산물은 2.5% agarose 전기영동 상에서 확인하였다.

DNA enzyme immunoassay

DNA Enzyme-linked immunosorbent assay (DNA ELISA)는 nested PCR 반응 산물과 probe간의 교잡반응을 응용하였다. DEIA 반응을 수행하기 위한 plate를 준비하기 위하여, 우선 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC, Sigma E-7750, USA) 용액 상에서 probe를 bovine serum albumin (BSA, Sigma, USA)에 고정시키고 이를 96-well plate

Table 1. Strains used in this study

Species	Strain	Biovar	Host plant	Geographic origin	Source of reference ^a
<i>R. solanacearum</i>	DSM9544	1	Tomato	United States	KCCM
<i>R. solanacearum</i>	KACC10698	4	Tomato	Korea	KACC
<i>R. solanacearum</i>	KACC10699	2	Potato	Korea	KACC
<i>R. solanacearum</i>	KACC10702	4	Potato	Korea	KACC
<i>R. solanacearum</i>	KACC10706	4	Potato	Korea	KACC
<i>R. solanacearum</i>	KACC10708	4	Tomato	Korea	KACC
<i>R. solanacearum</i>	KACC10711	3	Pepper	Korea	KACC
<i>R. solanacearum</i>	KACC10722	2	Potato	Korea	KACC
<i>R. solanacearum</i>	KACC10815	ND ^b	Potato	Egypt	KACC
<i>R. solanacearum</i>	KACC10816	3	Potato	Fidji	KACC
<i>E. coli</i>	KCCM11234				KCCM
<i>P. aeruginosa</i>	KCCM11328				KCCM
<i>B. glumae</i>					Seoul National Univ.
<i>X. xonopodis</i>					Seoul National Univ.

^aKCCM, Korean Culture Center of Microorganisms; KACC, Korean Agricultural Culture Collection

^bND, not determined

Table 2. Characteristics of primers and probe used to detect *R. solanacearum*

Primer or probe ^a	Sequence (5' → 3')	Length	Modification 5' end
RsolfliC ^b -F	GAA CGC CAA CGG TGC GAA CT	20	
RsolfliC ^b -R	GGC GGC CTT CAG GGA GGT C	19	
RS_247-F	GGC GGT CTG TCG GCR ^c G	16	
RS_247-R	CGG TCG CGT TGG CAA C	16	Biotin
RS_200-F	CAA CTA CAA CGG CAA CAA GC	20	
RS_200-R	TCA GGG AGG TCA GAT CGG TA	20	
RS_250-R	CCG TAC TGG AAG GTC GTC G	19	
RS_122-F	TTC GAC GAC CTT CCA GTA	18	
RS_122-R	CGG TCG CGT TGG CAA C	16	
RS_fliC-P	GTC ACC AAC GTC GAC ATG TC	20	Amine

^aF, forward; R, reverse; P, probe

^bprimer RsolfliC from Schönfeld et al.

^cR, A or G

(F96 well plate, Nunc)에 0.2 pmol/μl 농도로 100 μl 씩 분주하여 상온에서 18 시간 이상 반응시켰다. 반응 후 Tween20이 포함된 PBS (PBST, 0.1% Tween in PBS)로 3회 세척하고 0.5% BSA가 포함된 PBS로 blocking 하는 단계로 수행하였다. Nested PCR 반응 산물은 95°C에서 10분간 변성시키고 96-well plate에 첨가되어 60°C에서 한 시간 반응하였다. 반응 후 PBST로 세척하고 streptavidin-peroxidase (1:2000, Sigma S-5512, USA) 100 μl를 첨가하여 37°C에서 한 시간 반응시킨 후 세척하고 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine (TMB, Sigma T0440, USA) 100 μl를 첨가하여 streptavidin-peroxidase와 15분간 반응시켰다. 2 M의 H₂SO₄ 50 μl를 넣어주어 효소 반응을 정지시키고 ELISA plate reader (Molecular Device, USA)에서 450 nm의 흡광값을 측정하였다.

dUTP와 Uracil nucleosidic glycosylase

잘못되어진 음성 결과와 교차오염을 방지하기 위하여 실험과정에 dUTP-uracil-N-glycosidase (UNG) 방법을 도입하였는데, PCR 수행시 dUTP가 첨가되어진 dNTP 혼합용액을 사용함으로써 반응 산물에 dUTP가 첨가되도록 하였다. 반응 조성에 10 U UNG를 첨가하고 반응 조건에 초기 37°C에서 30분을 시행하여 UNG의 반응이 수행되도록 하였다.

In vivo pot assay

실제 청고병을 유발시키는 *R. solanacearum*의 검출여부를 확인하기 위하여 in vivo pot assay를 수행하였다. 지름 10 cm 포트에 바로커 상토(한국농자재 주식회사)를 180 g 채우고 고추 종자를 파종한 다음 25~35°C로 유지되는 하우스에서 재배하였다. 모종이 4엽기가 되었을 때 뿌리에 상처를 내고 *R. solanacearum* 현탁액 30 ml (10⁷ CFU/ml)를 관주하여 발병을 유도하였다. 이후 모종의 발병을 확인하고 발병되어진 모종의 뿌리 근처의 토관으로부터 *R. solanacearum*을 분리하였으며, 분리되어진 균주의

genomic DNA를 회수하여 PCR 및 DNA EIA의 주형 DNA로 사용하였다.

결 과

DNA 추출 및 정제

토양으로부터 *R. solanacearum*의 genomic DNA를 추출하기 위하여 SDS 분해법, STET 상에서의 끓이는 방법, resin을 첨가하여 끓이는 방법과 DNAzol을 이용하는 방법을 각각 독립적으로 또는 복합적으로 적용하여 실험을 수행하였다. 동일한 시료로부터 각 방법들을 통하여 genomic DNA를 추출하고 이를 16S rDNA와 *fliC* 유전자를 증폭한 뒤 전기영동 상에서 PCR 반응 산물을 비교하였다. 그 결과 DNAzol을 사용하여 DNA를 추출하는 방법이 다른 방법들에 비하여 PCR 증폭 효율이 가장 우수하였으며, 추출과정을 비교하였을 때에도 효소의 반응을 수행시키는 단계, 층분리를 유도하는 단계 및 마지막 단계에서 알코올로 침전시키는 단계가 없기 때문에 소요 시간이나 처리 과정이 매우 빠르고 간편하였다. 이 후 본 실험에서 적용한 chelex-100 resin을 넣고 끓이는 방법은 토양 내에 존재하는 PCR 저해물질을 제거하는데 매우 효과적이었다(Fig. 1).

PCR을 통한 *R. solanacearum*의 검출

DSM9544 및 KACC의 9종의 *R. solanacearum* 아종에서 RsolfliC primer 조합에 의하여 증폭되어진 400 bp의 PCR 반응 산물을 확인할 수 있었다. 반면 대조균주인 *B. glumae*, *X. xonopodis*, *E. coli*와 *P. aeruginosa*에서는 증폭이 되지 않았다. 이후 primary PCR을 주형으로 하는 nested PCR을 수행하여 247 bp의 PCR 반응 산물을 확인할 수 있었으며(Fig. 2), 이로써 실험에 사용되어진 *R. solanacearum*의 모든 아종에서 *fliC* 유전자 부위가 공통적으로 존재한다는 것을 확인하였다. 액체 배양의 경우, 순차적인 회석법으로 처리되어진 시료를 대상으로 위의

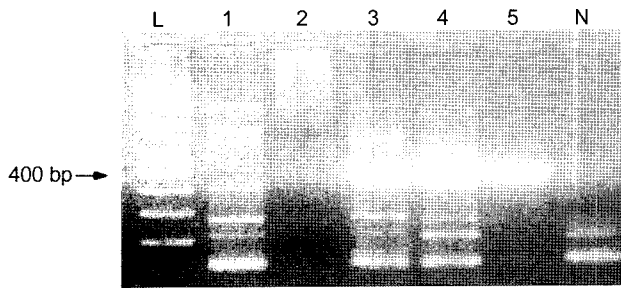


Fig. 1. Results of agarose gel electrophoresis of amplified genomic DNA of *R. solanacearum* extracted by each method. Lane 1, genomic DNA extracted by SDS lysis method; 2, STET method; 3, boiling with chelex X-100 resin method; 4, DNAzol method; 5, DNAzol treatment and boiling with chelex X-100 resin; L, ladder; N, negative control.

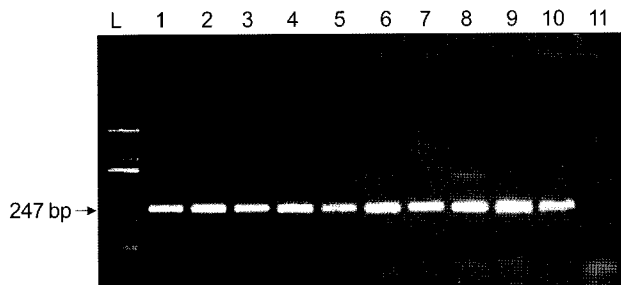


Fig. 2. Nested PCR products of *R. solanacearum* strains studied. Lanes 1 to 10, reference strains DSM9544, KACC 10698, 10699, 10702, 10706, 10708, 10711, 10722, 10815, 10816, respectively. L, ladder; N, negative control.

실험을 수행한 결과 1×10^4 cell/g 농도의 시료까지 400 bp의 반응 산물을 전기영동 상에서 확인 할 수 있었으며 1×10^3 cell/g 농도의 시료까지 247 bp의 반응 산물을 확인 할 수 있었다(Fig. 3). 토양 시료의 경우 400 bp의 반응 산물은 1×10^5 , 247 bp의 경우 1×10^3 cell/g 농도까지 확인 할 수 있었다(Fig. 4). 위의 실험의 결과로 토양 시료의 경우에는 액체 배양액에 비하여

primary PCR 감도가 1×10 배 낮았고, nested PCR의 민감도는 primary PCR에 비하여 1×10^2 배 높았다.

DNA enzyme immunoassay

Nested PCR에 사용되어진 primer에는 biotin이 표지되었고, probe에는 amine이 표지되었다. 5' 말단에 amine이 표지된 probe는 EDAC와 MES 방법을 통하여 BSA와 결합되어진 후 96-well plate에 코팅되었다. DNA ELISA는 biotin이 표지된 primer로 증폭되어진 nested PCR 반응 산물과 96-well plate에 코팅되어진 probe 간의 교잡반응으로 진행되었다. Probe와 교잡되어진 nested PCR 반응 산물은 streptavidin-peroxidase와 결합되어지고 반응 후 잔류된 streptavidin-peroxidase에 발색기질인 TMB를 첨가하여 효소 반응을 유도한 뒤 그 값을 측정하였다(Table 3). 반응을 유도하고 값을 측정하는데 있어서 두 가지의 변수가 있었는데, 하나는 96-well plate를 코팅할 때 사용되었던 probe의 농도이고 다른 하나는 교잡 반응을 수행할 때의 온도였다. Probe의 농도는 5~10 pmol/microwell, 교잡반응 온도는 60°C 에서 가장 안정되고 높은 반응성을 나타내었다.

In vivo pot assay

풋마름병에 걸린 모종으로부터 *R. solanacearum*을 분리하고 genomic DNA를 추출하여 PCR 및 DNA EIA를 통하여 검출하고자 하였다. 4엽기 때의 모종에 *R. solanacearum*을 관주하고 발병 징후를 관찰한 결과, 관주 후 약 2주 내에 풋마름병의 증상을 보였으며 모종으로부터 분리되어진 *R. solanacearum*을 본 실험에 사용되어진 방법으로 검출한 결과 PCR 산물을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

고 찰

본 실험에서 primary PCR을 통하여 증폭하고자 하였던 *fliC*는 *R. solanacearum* GMI1000의 696과 1095의 위치에 존재하는 유전자로써 실험 대상인 모든 *R. solanacearum* 아종에서 *fliC* 유전자의 400 bp PCR 반응 산물을 확인 할 수 있었던 반면 *R.*

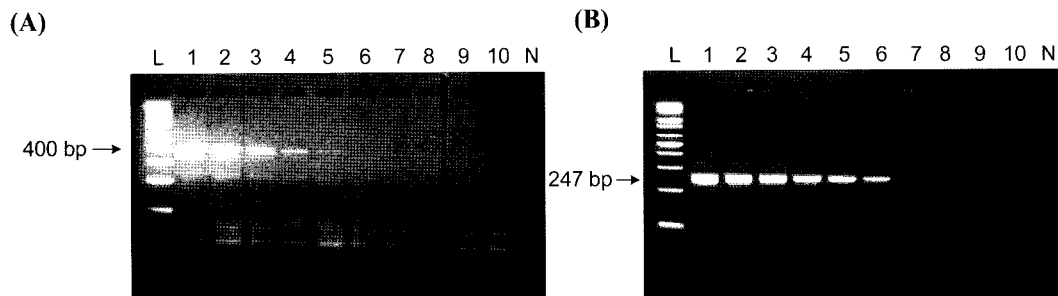


Fig. 3. Threshold of detection for *R. solanacearum* in culture broth by PCR. Results of agarose gel electrophoresis of amplified DNA from tenfold serial dilutions of cell concentration. Lanes 1 to 10, cell concentration of *R. solanacearum* diluted 1×10^8 to 1×10^{-1} , respectively. (A) Amplification of 400 bp PCR fragment by primary PCR; (B) Amplification of 247 bp PCR fragment by nested PCR. L, ladder; N, negative control.

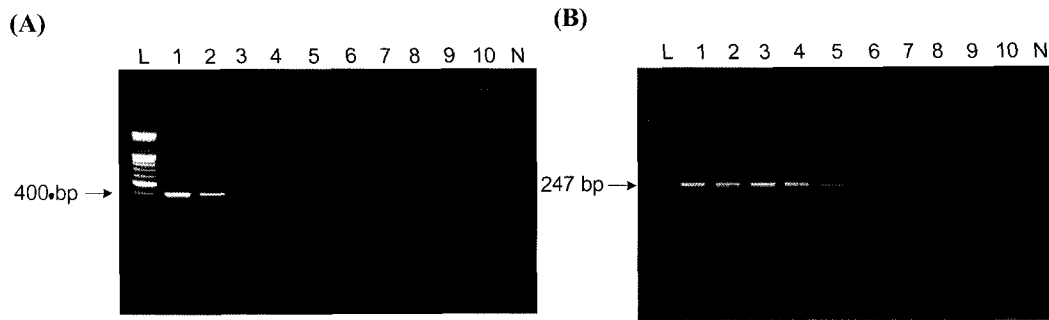


Fig. 4. Threshold of detection for *R. solanacearum* in soil by PCR. Results of agarose gel electrophoresis of amplified DNA from tenfold serial dilutions of cell concentration. Lanes 1 to 10, cell concentration of *R. solanacearum* diluted 1×10^8 to 1×10^{-1} , respectively. (A) Amplification of 400 bp PCR fragment by primary PCR; (B) Amplification of 247 bp PCR fragment by nested PCR. L, ladder; N, negative control.



Fig. 5. Symptom of *R. solanacearum* infection in pepper plants and results of nested PCR. (A) Agroinoculated wild-type pepper plant; (B) Agroinoculated pepper plant infected by *R. solanacearum* (C) Amplification of 247 bp PCR fragment by nested PCR from wild-type and *R. solanacearum* infected plants *in vivo* assay; 1, (A); 2, (B); L, ladder; N, negative control.

*solanacearum*과 유사한 토양내의 이중 세균에서는 검출되지 않았다. *fliC* 유전자 내의 위치는 3종류의 biovar를 포함하는 6종류의 *R. solanacearum* 아종 - DSM9544와 K60 (biovar 1), 1609와 1737과 267 (biovar 2), GMI1000 (biovar 3) -의 유전자 서열을 비교하였을 때, *fliC*의 가장 중앙에 위치하고 있었으며 종간의 유전적 다양성도 가장 심하였다. *fliC* 유전자는 편모 단백질의 비기능적 위치를 담고 있기 때문에 병원성을 좌우하는 부분도 아니며 유전자의 수평적 이동도 발견되지 않는다(30). 즉 *fliC* 유전자는 종내와 아종간의 연관성이 깊기 때문에 *R. solanacearum*의 검출을 위한 유전자 지표로서 매우 유효함을 확인할 수 있었다.

토양으로부터 직접 추출한 DNA로부터 분자생물학적 기법을 수행하는 데 있어서는 humic acid와 같은 반응 저해물질로 인한

어려움이 많다. 이들이 포함되어진 PCR 혼합 용액 내에서는 *Thermus aquaticus*의 DNA 중합효소, Amplitaq Gold 뿐만 아니라 다른 다양한 종류의 내열성 DNA 중합효소 모두가 활성에 저해를 받는 것으로 알려져 있으며(16), 본 연구의 수행과정에서도 *R. solanacearum*의 액체 배양액과 토양 시료에서 PCR 반응을 저해하는 또 다른 물질이 존재한다는 것도 알 수 있었다. 이에 본 연구에서는 일반적으로 사용되는 DNA 회수 방법을 개선하여 토양으로부터 빠르고 단순하면서도 PCR 저해물질을 효과적으로 제거할 수 있는 방법을 고안하였다. Chelex-100 resin을 넣고 끓이는 방법은 기존의 guanidine thiocyanate 분해법이나 킬레이트 물질을 첨가하여 독성을 갖거나 인체에 유해한 시약을 사용하는 방법들과 비교하였을 때 알코올 침전 반응을 거치지 않고도 PCR에 바로 사용할 수 있는 순수한 DNA를 얻을 수 있었다.

Table 3. Absorbance values of DNA ELISA from amplified DNA according to tenfold serial dilutions of *R. solanacearum*

PCR product of <i>R. solanacearum</i> from	Cell density of <i>R. solanacearum</i>							
	1×10^4	1×10^3	1×10^2	1×10^1	1×10^0	1×10^{-1}	1×10^{-2}	1×10^{-3}
Culture broth	1.889	1.732	1.004	0.719	0.368	0.033	0.004	0.002
Soil	1.684	0.965	0.522	0.211	0.027	0.006	0.001	0.001

Enzyme Immunoassay (ELISA) 기법은 바이러스, 곰팡이 및 세균을 검출하기 위하여 사용되는데 특히 임상의학 분야에서 특정 세균이나 이에 대한 항체의 스펙트럼을 측정하기 위하여 사용되고 있다(24). *R. solanacearum*의 검출 감도를 높이기 위하여 사용되어진 DNA ELISA는 기존의 ELISA 방법에 DNA 교잡반응을 응용한 기법이다(4, 5, 6, 8, 12). 이 기법은 증폭되어진 반응 산물을 96-well plate에 첨가함으로써 다른 요인들로 부터의 간섭을 줄이고 교잡 효율을 높일 수 있다. 또한 교잡반응 후 측정되어진 반응값으로 반정량적 측정이 가능하며, 이는 전기영동 상에서의 감도를 비교하는 것에 비하여 보다 유효하다(14).

결론적으로 본 연구에서는 DNAzol과 chelex-100 resins를 이용하여 토양으로부터 PCR 저해물질을 쉽게 제거하고 DNA를 빠르고 효율적으로 추출할 수 있었으며, *RsolftiC* primer 조합과 DNA ELISA 기법으로 *R. solanacearum*의 검출 감도 및 정확성을 높일 수 있었다. 최근 정 등(11)의 연구에서는 RT-PCR을 통하여 토양시료로부터 *R. eutropha*의 모니터링을 수행하였는 바, 본 연구에서 수행한 DNA ELISA의 반정량적 특성 분석기법과 RT-PCR을 병행한다면 잠복기가 긴 *R. solanacearum*의 동태를 토양시료로부터 직접 모니터링이 가능할 것으로 판단된다.

참고문헌

1. 농촌진흥청 농업과학기술원. 2000. 채소 병해충 진단과 방제.
2. Boudazin, G., A.C. Le Roux, K. Josi, P. Labarre, and B. Jouan. 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. *Eur. J. Plant Pathol.* 105, 373-380.
3. Brian, E.G. and R.S. Todd. 2001. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3866-3872.
4. Buck, G.E. 1996. Detection of *Bordetella pertussis* by rapid-cycle PCR and colorimetric microwell hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1355-1358.
5. Chevrier, D., M.Y. Popoff, M.P. Dion, and D. Hermant. 1995. Rapid detection of *Salmonella* subspecies I by PCR combined with non-radioactive hybridisation using covalently immobilised oligonucleotide on a microplate. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 10, 245-252.
6. Cho, S.-N., G.M.E. van der Vliet, S. Park, S.-H. Baik, S.-K. Kim, Y. Chong, A.H.J. Kolk, P.R. Klatser, and J.-D. Kim. 1995. Colorimetric microwell plate hybridization assay for detection of amplified *Mycobacterium tuberculosis* DNA from sputum samples. *J. Clin. Microbiol.* 33, 752-754.
7. Fegan, M., M. Taghavi, L.I. Sly, and A.C. Hayward. 1998. Phylogeny, diversity and molecular diagnostics of *Ralstonia solanacearum*, p. 19-33. In P. Prior, C. Allen, and J.G. Elphinstone (ed.), Bacterial wilt disease-molecular and ecological aspects. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
8. Fujita, S.-I., B.A. Lasker, T.J. Lott, E. Reiss, and C.J. Morrison. 1995. Microtitration plate enzyme immunoassay to detect PCR-amplified DNA from *Candida* species in blood. *J. Clin. Microbiol.* 33, 962-967.
9. Hayward, H.C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29, 65-87.
10. Holben, W.E. 1994. Isolation and purification of bacterial DNA from soil, p. 727-751. In R.W. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdicsek, S. Smith, A. Tabatabai, and A. Wollum (ed.), Methods of soil analysis, part 2. Microbiological and biochemical properties. Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wis., USA.
11. Jung, K.-J., B.-H. Kim, E. Kim, J.-S. So, and S.-C. Koh. 2002. Monitoring expression of *bphC* gene from *Ralstonia eutropha* H850 induced by plant terpenes in soil. *Kor. J. Microbiol.* 42, 340-343.
12. Katz, J.B., A.D. Alstad, G.A. Gustafson, and K.M. Moser. 1993. Sensitive identification of bluetongue virus serogroup by a colorimetric dual oligonucleotide sorbent assay of amplified viral nucleic acid. *J. Clin. Microbiol.* 31, 3028-3030.
13. Kelman, A. 1998. One hundred and one years of research on bacterial wilt, p. 1-5. In P. Prior, C. Allen, and J. Elphinstone (ed.), Bacterial wilt disease. Molecular and ecological aspects. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
14. Lebech, A.-M., K. Hansen, F. Brandrup, O. Clemmensen, and L. Halkier-Sorensen. 2000. Diagnostic value of PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in clinical specimens from patients with erythema migrans and Lyme neuroborreliosis. *Mol. Diagn.* 5, 139-150.
15. Lee, Y.-A., S.-C. Fan, L.-Y. Chiu, and K.-C. Hsia. 2001. Isolation of an insertion sequence from *Ralstonia solanacearum* race 1 and its potential use for strain characterization and detection. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3943-3950.
16. Miller, D.N., J.E. Bryant, E.L. Madsen, and W.C. Ghiorse. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4715-4724.
17. Moissenet, D., P. Bidet, A. Garbarg-Chenon, G. Arlet, and H. Vu-Thien. 2000. *Ralstonia paucula* (formerly CDC group IV c-2): unsuccessful strain differentiation with PCR-based methods, study of the 16S-23S spacer of the rRNA operon, and comparison with other *Ralstonia* species (*R. eutropha*, *R. pickettii*, *R. gilardii*, and *R. solanacearum*). *J. Clin. Microbiol.* 39, 381-384.
18. Patrik, K.H. and E. Maiss. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *J. Phytopathol.* 148, 619-626.
19. Poussier, S., P. Prior, J. Luisetti, C. Hayward, and M. Fegan. 2000. Partial sequencing of the *hrpB* and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Syst. Appl. Microbiol.* 23, 479-486.
20. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
21. Schfeld, J., H. Heuer, J.D. van Elsas, and K. Smalla. 2003. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the basis of PCR amplification of *fliC* fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7248-7256.
22. Seal, S.E., L.A. Jackson, J.P. Young, and M.J. Daniels. 1993. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii*, and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1587-1594.
23. Taghavi, M., C. Hayward, L.I. Sly, and M. Fegan. 1996. Analysis

- of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 10-15.
24. Tanyuksel, M., C. Guney, E. Araz, M.A. Saracli, and L. Doganci. 2004. Performance of the immunoglobulin G avidity and enzyme immunoassay IgG/IgM screening tests for differentiation of the clinical spectrum of toxoplasmosis. *Kor. J. Microbiol.* 40, 211-215.
25. Van der Wolf, J.M., S.G.C. Vriend, P. Kastelein, E.H. Nijhuis, P.J. van Bekkum, and J.W.L. van Vuurde. 2000. Immunofluorescence colony-staining (IFC) for detection and quantification of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* biovar 2 (race 3) in soil and verification of positive results by PCR and dilution plating. *Eur. J. Plant Pathol.* 106, 123-133.
26. Van Elsas, J.D., P. Kastelein, P. van Bekkum, J.M. van der Wolf, P.M. de Vries, and L.S. van Overbeek. 2000. Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and microcosm soils in temperate climates. *Phytopathology* 90, 1358-1366.
27. Vasse, J., P. Frey, and A. Trigalet. 1995. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8, 241-251.
28. Wallis, F.M. and S.J. Truter. 1978. Histopathology of tomato plants infected with *Pseudomonas solanacearum*, with emphasis on ultrastructure. *Physiol. Plant Pathol.* 13, 307-317.
29. Weller, S.A., J.G. Elphinstone, N.C. Smith, N. Boonham, and D.E. Stead. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2853-2858.
30. Winstanley, C. and J.A.W. Morgan. 1997. The bacterial flagellin gene as a biomarker for detection, population genetics and epidemiological analysis. *Microbiology* 143, 3071-3084.

(Received June 7, 2007/Accepted August 27, 2007)

ABSTRACT : Detection of *Ralstonia solanacearum* with Nested PCR and DNA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Young-Jin Ko and Hong-Bum Cho^{1*} (Department of diagnosis, Diaprobe Lab., ¹Department of Biotechnology, Seokyeong University, Seoul 136-704, Korea)

In this study, we used the method of guanidin isothiocyanate and boiling with Chelex-100 resin to extract genomic DNA of *Ralstonia solanacearum* from soil. It is more efficient than general protocols to remove inhibitory compounds in soil and *R. solanacearum* own. Then, we applied polymerase chain reaction and DNA enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to identify and detect pathogen. The *fliC* gene of *R. solanacearum* was selected for specific detection of pathogen and primer sets were designed. Among the primer sets, two specific and sensitive primer sets, Rsol*fliC* (forward; 5-GAACGCCAACGGTGC GAACT-3 and reverse; 5-GGCGGCCTTCAGGGAGGTC-3, designed by J. Schönfeld *et al.*) and RS_247 (forward; 5-GGCGGICT-GTCGGCRG-3 and reverse; 5-CGGTCGCGTTGGCAAC-3 designed by this study), were designed to perform nested PCR. Nested PCR primer was labeled with biotin for hybridization between nested PCR product and probe to analyze with DNA ELISA.