

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)법을 이용한 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*의 신속 진단법 개발

김정구¹ · 노지나² · 박동석¹ · 윤병수^{2*}

¹국립농업과학원 유전자분석개발과, ²경기대학교 일반대학원 생명과학과

Development of a Rapid Detection Method for *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Using the Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Jeong-Gu Kim¹, Ji-Na No², Dong Suk Park¹, and Byoung Su Yoon^{2*}

¹Genomics Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Republic of Korea

²Department of Life Science, College of Natural Science, Kyonggi University, Suwon 443-760, Republic of Korea

(Received April 28, 2011 / Accepted June 15, 2011)

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* is the causative agent of soft rot in crops such as potato and cabbages. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a simple DNA amplification method, as well as isothermal PCR technique. In this study, a new method for the rapid detection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* was developed using LAMP that named PCC-LAMP. Based on lytic murein transglycolase gene of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, a set of four primers for LAMP was designed. The optimal PCC-LAMP reaction temperature was established at 61°C. Under standard conditions, PCC-LAMP amplified 1×10^3 copies of clone PCC-pBX437 per reaction. Further, this method can also assay directly by SYBR Green I without electrophoresis. Amplification was not detected for five other bacterial species. In conclusion, PCC-LAMP may be a useful method for the detection *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in the field.

Keywords: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, cabbage, detection, LAMP, soft rot

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* (PCC)은 그람 음성 세균으로 *Pectobacterium carotovorum* 종의 다른 아종에 비하여 숙주 범위가 매우 넓어 경제 작물이라 일컬어 지는 배추, 양파, 감자 등의 광범위한 식물체에 펙틴질을 분해하는 효소를 대량 분비하여 무름병을 일으킨다(5). 특히 재배 면적 기준으로 우리나라 제 2작물인 배추의 경우 무름병에 의한 피해 규모가 매년 130여 ha에 이를 정도로 그 피해가 심각하며, 특히 전국 배추 생산량의 72%를 점유하고 있는 강원도 고랭지 배추의 피해는 매우 심각하다. 뿐만 아니라 무름병의 피해는 재배 과정에서 뿐만 아니라, 저장, 유통 중에서도 고온 다습한 환경만 주어진다면 그 피해가 기하급수적으로 커지는

경우도 있어 그 심각성이 더해진다. PCC는 다른 아종에 비해 균주간에 유전적 변이가 매우 다양한 것으로 알려져 있고, 유전체 염기서열도 최근에야 밝혀져 염기서열을 기반으로 한 검출 방법은 많이 연구되어 있지 않다.

특이 염기서열을 이용한 PCC의 검출법으로는 PCR 다형성 밴드 유래 DNA probe로써 배추 무름병균을 검출하는 방법(3)과, PCR 진단법(7)이 보고된 바 있으나, Southern blot을 실시해야 한다는 번거로움이 있을 뿐만 아니라, 실험실내에서는 검출이 가능하지만 고가의 장비와 전문적인 기술을 요하므로 현장에 직접 적용하기에는 어려움이 많다는 제약을 가지고 있다.

Notomi 등(6)은 등온에서 특정 유전자를 증폭시키는 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)법을 고안하였다. 이 방법은 strand displacement activity가 높은 *Bst* polymerase

* For correspondence. E-mail: bsyoon@kyonggi.ac.kr; Tel: +82-31-249-9645; Fax: +82-31-243-1707

Table 1. Bacterial strains used in this study

Scientific name	Strain No.
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	KACC10371 ^a
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	KACC10401
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	KACC10408
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	KACC10566
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	KACC13960
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	MAFF311018 ^b
<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC9361 ^c
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	ATCC13076
<i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i>	ATCC25748
<i>Escherichia coli</i>	ATCC29552

^a KACC, Korean Agricultural Culture Collection^b MAFF, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food^c ATCC, American Type Culture Collection

를 이용함으로써 4개의 프라이머에 의해 이루어진다. 먼저 내부 프라이머가 DNA에 결합하여 신장되고, 이어 그 바깥쪽으로 외부 프라이머가 결합되어 신장되면서 strand displacement가 발생하며 먼저 형성된 가닥은 떨어져 나오게 된다. 떨어져 나온 단일 가닥의 5'-말단에서부터 loop 구조가 형성되며 이는 3'-말단에서도 같은 과정이 반복되고 loop 구조가 신장되게 된다. LAMP를 수행하기 위해서는 증폭시킬 유전자의 6개의 위치를 인식하도록 특별히 고안된 4개의 프라이머를 사용하게 된다(2, 10, 13). 이는 일반 PCR이 2개의 위치를 인식하는 것과 비교했을 때, LAMP는 target DNA에 대한 특이성이 매우 높아짐을 의미한다(11).

LAMP의 가장 큰 특징은 등온에서 유전자의 증폭이 이루어진다는 점으로, 온도의 구배가 필요한 PCR에 비해서 등온 조건은 몇가지 이점을 가지고 있다. 먼저 온도 조절이 필요 없기 때문에 상대적으로 반응 시간이 짧아진다. 따라서 좀 더 빠른 시간 내에 유전자 증폭을 가능하게 한다. LAMP를 이용한다면 전기영동 시간을 제외하고 한 시간 내에 유전자 증폭이 가능함을 기존 여러 논문에서 이미 보고되었다(8, 12). 더구나 온도 변화에 따른 DNA 손실 및 손상이 없기 때문에 증폭 효율이 매우 높다(4). 또한 등온 조건에서의 증폭은 LAMP가 다른 검출 방법들과 달리 현장성을 가질 수 있다는 근거가 된다 (1). 일정한 온도만 유지하면 되기 때문에 고가의 장비가 필요 없이 항온수조 등 간단한 장비만을 가지고도 반응이 가능하다. 따라서 LAMP를 이용한다면 굳이 실험실 내에서의 환경이 아니더라도 현장에서 특정 유전자의 검출이 가능해진다.

본 연구에서는 현장 적용성이 높은 LAMP법을 이용하여, 보다 신속하고 간편하게 배추의 세균성 무름병을 유발하는 PCC를 검출할 수 있는 진단법을 새로이 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양

본 연구에서는 한국농업미생물자원센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)로부터 분양받은 PCC 5균주와 특이성 검사를 위하여 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, *Escherichia coli* 이상 5균주를 사용하였다(Table 1). 사용된 균주는 영양배지에서 유지하였으며, 영양배양액에 접종하고 28°C에서 16시간 동안 진탕 배양하였다.

Genomic DNA 분리

균주의 genomic DNA 추출은 Accuprep[®] Genomic DNA Extraction kit (Bioneer Inc., Korea)를 사용하였다. 추출방법은 제조사의 지시를 따라 수행하였으며, 추출된 Genomic DNA 시료는 분광광도계(Eppendorf, Germany)를 이용하여 정량하였다.

PCC 클론 준비

PCC-LAMP의 최적조건을 확인하기 위하여 ERB3 F/R 프라이머(9) 이용하여 PCR을 수행하였고(Table 2), 이 PCR 생성물을 삽입시킨 PCC 클론을 제작하였다. 본 클론은 PCC의 lytic murein transglycolase 유전자의 일부인 437 bp가 pBX vector에 포함되어 있도록 제작되었으며, PCC-pBX437라 명명하였고, 클론 PCC-pBX437는 최적조건 확인, 민감도 확인 등의 실험에 PCR 주형으로 사용되었다.

LAMP 프라이머 제작

LAMP 프라이머 디자인 소프트웨어인 Primer Explorer (<http://primerexplorer.jp/e/index.html>)를 이용하여 PCC 특이 LAMP용 프라이머를 제작하였다. PCC-LAMP의 forward 프라이머인 Inner F는 PCC anti-sense sequence의 상보적인 염기서열(inner-sense)과 TTTT spacer 그리고 loop를 형성하는 염기서열(loop-sense)의 부분을 합한 것으로 설계되었으며, 이에 따라 44 nt의 long-nucleotide로 제작되었다. Reverse 프라이머인 Inner R도 마찬가지로 PCC sense sequence의 상보적인 염기서열(inner-antisense)과 TTTT spacer, loop를 형성하는 sequence(loop-antisense)의 부분으로 설계되었으며, 이에 따라 역시 44 nt의 long-nucleotide로 제작되었다. 또한 Outer F와 Outer R 프라이머는 각각 inner 프라이머의 바깥쪽에 위치하도록 설계하였으며 각기 19 nt의 크기로 제작하였다. 이 프라이머들은 Bionics 사(Korea)에 주문 의뢰하여 제작하였으며 inner 프라이머들에 대해서는 PAGE 정제 된 것을 사용하였다(Fig. 1 and Table 3).

Table 2. Specific primers for PCR detection of the PCC gene

Target gene	Sequence (5'→3')		Product (bp)
Lytic murein Transglycolase	ERB3-F	TGCGACACCTCTCATCACG	437
	ERB3-R	CTTATCACGCTGTAACCAGC	

```

TGCACACCTCCTCATCACGCTGTTTGTAGCCCGCTGCTTTTTAGCGCTACGGT
CTGTGCCGACACGATCCCTCGTGCCGCGCAGGCGTATCGCAGTGATGTGATCCG
outer-F
CAGCGCACGGTTGGATTGGGGCATGAATGCCCCGATTGCTGACTTTGCGGCGC
inner-sense
AGTTGCATCAGGAAAGCGGCTGGAATCCTCGGGCCGTTTCACCCGTCGGTGCG
loop-sense
CAAGGGCTGGCTCAGTTTATGCCGACCACCGCCGACTGGTTTACGGGTATCGT
loop-antisense inner-antisense
TCCTGAACCTTCGCGCTAATCAACCGTTTAATCCTGCCTGGGCTATCCGTGCTC
outer-R
TGACGGGCTACGATCGCTGGCTGTGGACGCGAATCAGCGCCAGCAACGACTGCG
AACGTATGGCGATGACCTTGTCTCCTACAACGGCGGGCTTGGCTGGTTACAGC
GTGATAAG
    
```

Fig. 1. Sequences and locations of four primers for PCC-LAMP. This sequences are show PCC-pBX437 clone. Upper six parts are need for designing four primers to LAMP method.

LAMP법의 최적 조건 확립

PCC-LAMP의 특이적 검출을 위하여 반응 최적 온도를 확인하고자 하였다. 조성은 PCC-pBX437 클론 1 ng/μl과 20 pM 내부 프라이머(inner primers), 10 pM 외부 프라이머(outer primers), 8 U *Bst* DNA polymerase large fragment (New England Biolabs, USA), 1× ThermoPol Reaction Buffer [20 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, New England Biolabs, USA], 10 mM dNTP, 5% DMSO, DW로 총 25 μl의 반응액을 조성하였다. *Bst* polymerase large fragment는 80°C 이상의 온도에서는 불활성을 나타내므로 먼저 94°C에서 5분간 해리 후 바로 얼음에 옮긴 후, 따로 첨가하였다. 이후 1시간 동안 DNA 변형합성을 진행하였고, 80°C에서 10분간 반응시킨 후 종료하였다. DNA 변형 합성의 최적 온도 측정은 50.0°C-65.0°C 사이에서 각기 등온조건하에서 실시하였으며, 각 LAMP 반응이 끝난 후 증폭산물들은 1.5% agarose gel을 이용하여 100 V에서 25분간 전기영동(Mupid-one, Advance, Japan)하였다. Agarose gel은 ethidium bromide (Sigma Chemical Co.)로 염색하여 UV상에서 관찰하였다.

PCC-LAMP의 프라이머의 특이성 확인

PCC-LAMP에서는 네 개의 특이 프라이머에 의한 염기서열 특이성이 요구되므로 4개의 프라이머 중 하나 혹은 두 개 이상을 제외시켜 조성하고 정상적인 증폭산물과 비교하여 프라이머의 특이성을 확인하였다. LAMP 조건은 본 연구에서 확립된 표준조건으로 수행하였다.

PCC-LAMP의 민감도 확인

PCC를 검출함에 있어 PCC-LAMP의 검출한계를 측정하기 위하여 초기 기질 양에 따른 PCC-LAMP를 각기 수행하였다. PCC-pBX437 클론을 1×10⁶부터 1×10²까지 단계적으로 희석하여 주형으로 사용하였으며, LAMP 조건은 본 연구에서 확립된 표준조건으로 수행하였다. 주형가당의 copy수는 아래의 계산식을 따랐다.

$$\frac{6 \times 10^{23} (\text{copies} / \text{mol}) \times \text{concentration} (\text{g} / \mu\text{l})}{MW (\text{g} / \text{mol})} = \text{amount} (\text{copies} / \mu\text{l})$$

PCC-LAMP의 기질 특이성 확인

PCC-LAMP가 PCC에 특이적인지 확인하기 위하여, PCC가 아닌 다른 균주들의 Genomic DNA를 주형으로 사용하여 각기 PCC-LAMP를 수행하였다. 사용된 균주는 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (MAFF311018), *Shigella dysenteriae* (ATCC9361), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (ATCC13076), *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (ATCC25748), *Escherichia coli* (ATCC29552)이며 Genomic DNA를 추출하여 같은 조건하에 1 ng/μl로 각각 주형가당으로 하여 실험을 수행하였고, 이를 positive control과 비교하였다. 또한 PCC의 5균주 (KACC10371, KACC10401, KACC10408, KACC10566, KACC13960)의 Genomic DNA 1 ng/μl를 각각 주형으로 하여 실험을 수행하여 PCC에 대한 PCC-LAMP의 반응성을 확인하였다.

Table 3. The four specific primers for PCC-LAMP

Name	Sequence (5'→3')	mer	Tm (°C)	GC (%)
Outer F	GCAGTGATGTGATCCGCAG	19	59	57
Outer R	CCAGGCAGGATTAACGGT	19	57	52
Inner F	GGATTCCAGCCGCTTTCCTGATTTTTGGCATGAATGCCCCGATT	44	71	50
Inner R	CGCAAGGGCTGGCTCAGTTTTTTAGTTTCAGGAACGATACCGCT	44	71	150

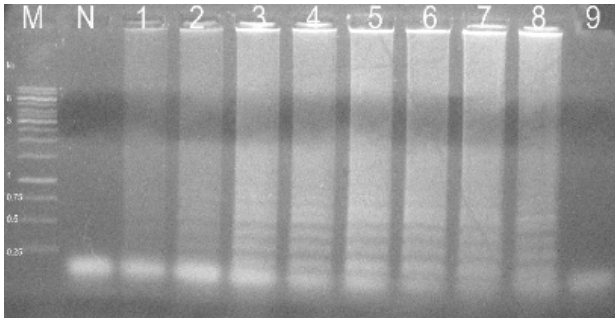


Fig. 2. Optimal reaction temperature of PCC-LAMP. LAMP was performed under range of 50.0°C to 65.0°C as reaction temperature. Lanes: M, 1 kb ladder (Fermentas); N, negative control without template at 50.0°C; 1 to 9, are LAMP products at 50.4°C, 51.3°C, 52.5°C, 54.2°C, 56.4°C, 58.9°C, 61.0°C, 63.9°C, and 65.0°C, respectively. LAMP products are shown in lanes 1 to 8. Optimal reaction temperature was determined as 61°C in lane 7.

SYBR Green I을 이용한 PCC의 형광 검출

Exicycler™ Quantitative Thermal Block (Bioneer)을 이용하여 Real-time LAMP를 수행하였다. 이는 이중가닥에 결합하여 형광을 나타내는 SYBR Green I을 이용함으로써 증폭산물을 형광을 통해서 쉽게 확인하기 위함이다. LAMP 조건은 확립된 표준조건을 따르며, 60분의 반응 동안 1분 간격으로 형광 값을 측정하였다. 또한 반응이 끝난 tube를 UV하에서 관찰하여 육안으로도 형광을 확인하였다.

현장 시료에서의 PCC검출

실험실에서 배양된 균주가 아닌, 실제 시료에서도 PCC-LAMP가 적용가능한지 확인하기 위하여, 무름병 증상을 보이는 배추의 genomic DNA를 추출하여 PCC-LAMP를 수행하였다. 동시에 무름병에 걸리지 않은 배추와 감자의 genomic DNA를 주형으로 하여 PCC-LAMP를 수행함으로써 실험 결

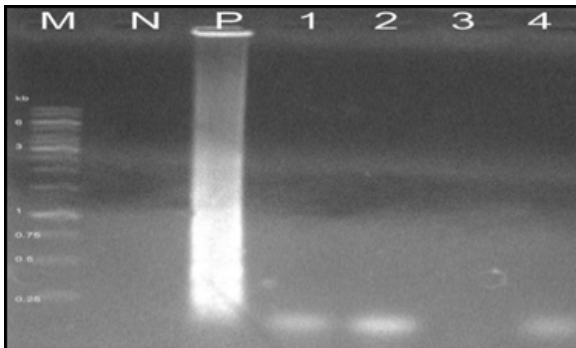


Fig. 3. Requirements for four PCC-LAMP primers. LAMP was performed using combinations of primers minus one or two primer(s). Lanes: M, 1 kb ladder (Fermentas); N, negative control without any primers; P, positive control with all primers; 1 to 4, LAMP products lacking inner-F (lane 1), outer-R (lane 2), inner-F and inner-R (lane 3), inner-F and outer-F (lane 4).

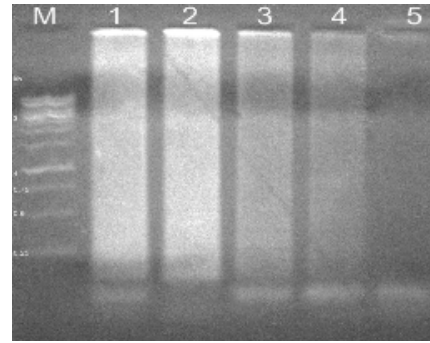


Fig. 4. Detection limit of PCC-LAMP. Each LAMP was performed under standard condition with different quantities of initial template DNA; lane 1, 1×10^6 ; lane 2, 1×10^5 ; lane 3, 1×10^4 ; lane 4, 1×10^3 ; lane 5, 1×10^2 copies. LAMP products were shown in lanes 1 to 4, so the detection limit of PCC-LAMP was determined as 1×10^3 copies. Lane M is 1 kb ladder (Fermentas).

과를 비교· 분석하였다.

결과 및 고찰

LAMP법의 최적 조건 확립

PCC-LAMP의 최적 반응온도를 확인하기 위하여 반응 온도를 50.0°C-65.0°C으로 각기 등온조건을 유지하고 실험을 수행하였다. 50.4°C부터 63.9°C의 범위에서 증폭이 가능함을 확인되었다. 특히 50.4°C에서 58.9°C까지는 점점 증폭 정도가 높아지다가 61.0°C가 지나면서 낮아짐이 확인되었고, 따라서 PCC-LAMP의 최적온도는 약 61°C로 판단하였다(Fig. 2).

PCC-LAMP의 프라이머의 특이성 확인

4개의 프라이머에 대한 PCC-LAMP의 특이성을 확인하기 위하여 프라이머를 하나 또는 두 개를 제외하여 조성한 후 실험을 수행하였다. 4개의 프라이머가 모두 포함된 positive control을 제외하고는 모두 증폭이 이루어지지 않았다(Fig. 3). 따라서 PCC-LAMP는 프라이머에 특이성이 높아 반응을 위해서는 4개의 프라이머가 모두 필요함을 확인하였다.

PCC-LAMP의 민감도 확인

PCC-LAMP의 검출한계를 확인하기 위하여 PCC-pBX437 클론을 1×10^6 부터 1×10^2 copy수까지 단계적으로 희석하여 실험을 수행하였다. 그 결과, copy수가 적어질수록 반응성이 단계적으로 낮아지는 것을 확인하였으며 1×10^6 부터 1×10^3 copy수까지 증폭이 이루어졌음을 확인하였다(Fig. 4). 따라서 PCC-LAMP는 반응당 1×10^3 copy수까지 검출이 가능한 것으로 판단하였다.

PCC-LAMP의 기질 특이성 확인

PCC-LAMP의 기질 특이성을 분석하기 위하여 PCC 외의 병원균의 genomic DNA를 주형으로 하여 실험을 수행하였다. Positive control을 제외하고 다른 병원균에서는 PCC-LAMP

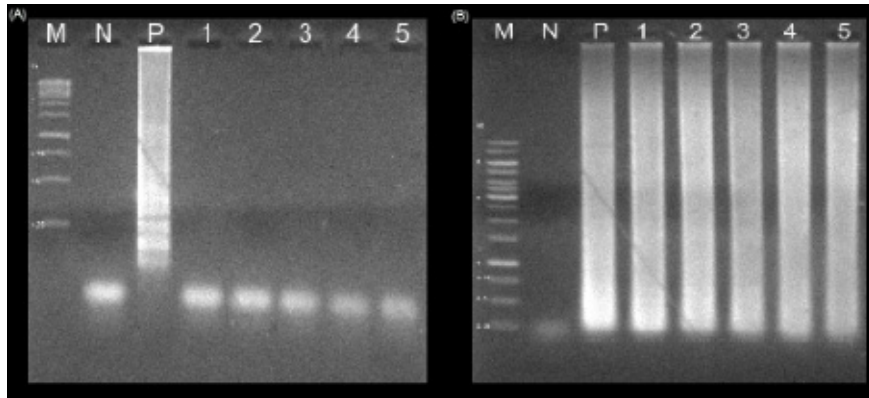


Fig. 5. Specificity of LAMP primers for PCC specific amplification. LAMP was performed under standard condition. Lane M is 1 kb ladder (Fermentas). Lane N is negative control without template. Lane P is positive control with the clone PCC-pBX437. (A) Template DNAs were from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (MAFF311018, lane 1), *Shigella dysenteriae* (ATCC9361, lane 2), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (ATCC13076, lane 3), *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (ATCC25748, lane 4) and *Escherichia coli* (ATCC29552, lane 5), respectively. Amplification occurred only in the positive control. (B) Template DNA for lanes 1 to 5 were KACC10371, KACC10401, KACC10408, KACC10566, and KACC13960, respectively. All lanes were amplified successfully except the negative control.

가 반응하지 않은 것을 확인하였다(Fig. 5A). 또한 PCC의 5 균주의 genomic DNA를 주형으로 하여 실험을 수행함으로써 PCC에 대한 PCC-LAMP의 반응성을 확인하였다. PCC-pBX437 클론으로 실험을 수행했을 때와 마찬가지로 PCC genomic DNA에서도 높은 반응성을 보이는 것을 확인하였다(Fig. 5B).

SYBR Green I을 이용한 PCC의 형광 검출

PCC-LAMP의 증폭산물을 전기영동 과정 없이 형광으로 확인하기 위하여 SYBR Green I을 포함하여 real-time LAMP를 수행하여 형광도를 측정하였고, 반응이 끝난 tube는 UV하에서 육안으로 형광 검출 여부를 확인하였다(Fig. 6A). Real-

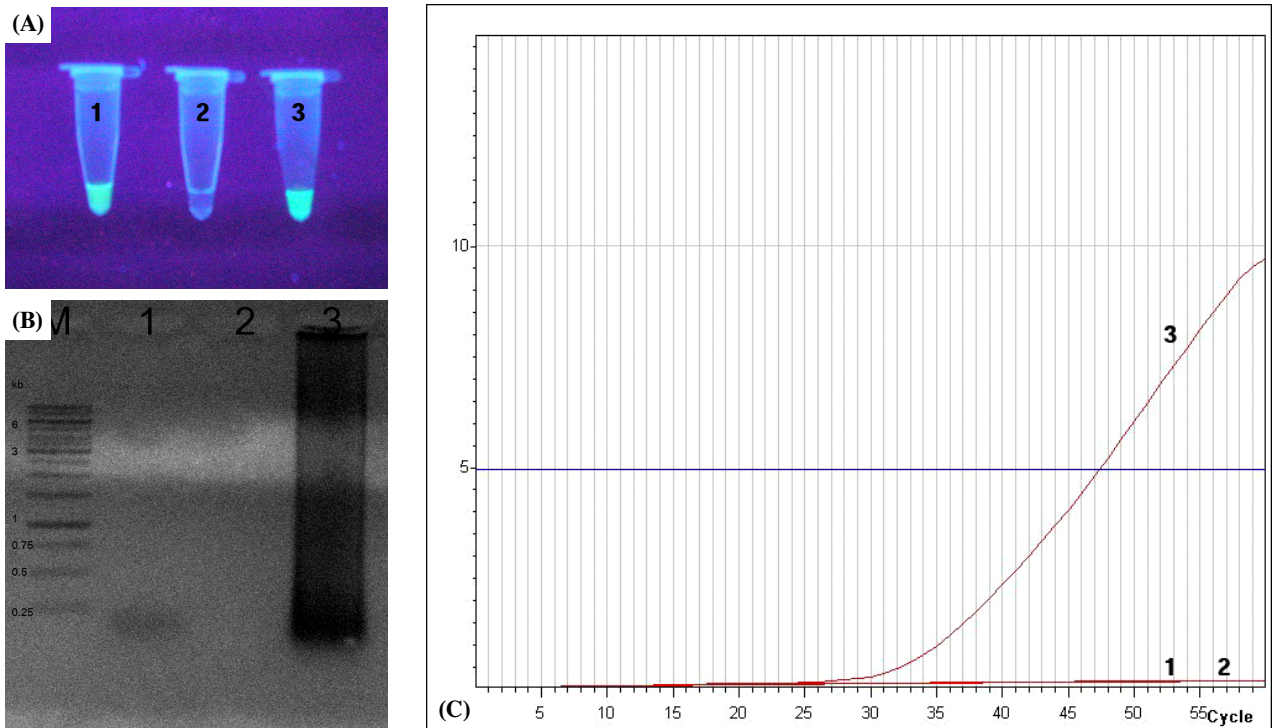


Fig. 6. Observation of LAMP product by SYBR Green I. LAMP was performed under standard conditions with SYBR Green I. Tube 1 is negative control without template. Tube 2 is negative control without primers. Tube 3 is positive control. (A) fluorescence under UV light; (B) Electrophoresis of real-time LAMP. Lane M is 1 kb ladder (Fermentas). (C) Fluorescence of real-time LAMP. Polymerization occurred only in the positive control (tube 3).

time LAMP의 형광 증가 그래프 상에서는 positive control, 즉 프라이머와 template가 모두 존재할 때 증폭이 이루어짐이 확인되었다(Fig. 6C). 이는 전기영동 상에서도 동일한 결과를 나타내었다(Fig. 6B). 또한 육안으로 확인했을 때, template를 포함하지 않은 negative control (tube1)에서 약간의 형광이 나타나는 것이 확인되었지만 프라이머를 포함하지 않은 negative control (tube2)의 경우에서 봤을 때 프라이머의 비특이적 dimer 형성으로 인한 형광으로 판단하였다. 특히 SYBR Green I에 의한 육안 판별은 굳이 real-time LAMP를 위해 고가의 장비를 사용하지 않더라도 LAMP 반응 후, tube에 직접 SYBR Green I을 첨가해주는 것만으로도 확인이 가능함을 확인하였다(자료 미제시). 프라이머 이합체(primer dimer)에 의한 형광은 증폭산물에 의한 형광에 비교했을 때 비교적 약하기 때문에, SYBR Green I을 이용한다면 전기영동 과정 없이 쉽게 LAMP 증폭산물을 확인할 수 있을 것으로 사료된다.

현장 시료에서의 PCC 검출

실험실에서 배양된 균주가 아닌 실제 시료에서도 PCC-LAMP 적용이 가능한지 알아보기 위하여 무름병 증상을 보이는 배추의 genomic DNA를 PCC-LAMP로 진단하였고, 무름병에 걸리지 않은 배추와 감자의 genomic DNA를 PCC-LAMP로 진단한 결과와 비교하였다. 무름병에 걸리지 않은 배추와 감자는 증폭되지 않은 반면, 무름병 증상을 보이는 배추는 PCC-LAMP에 의해 증폭됨을 확인하였다(Fig. 7). 따라서 실제 시료에서도 PCC-LAMP가 적용 가능함이 확인되었다.

본 연구는 배추에 무름병을 일으키는 PCC를 보다 간단한 방법으로 검출하기 위하여 loop-mediated isothermal amplification (LAMP)를 이용한 진단법을 개발하였다. PCC-LAMP

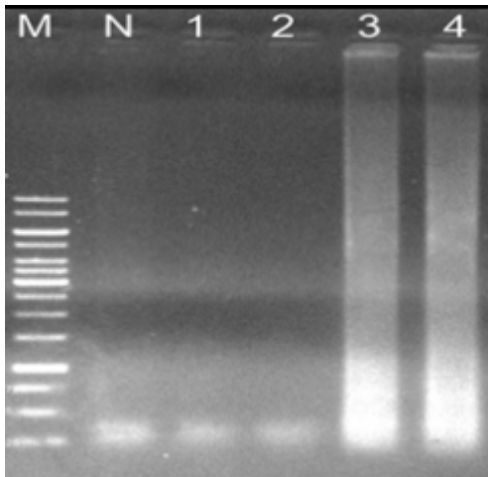


Fig. 7. Application of PCC-LAMP to field samples. Lanes: M, 1 kb ladder (Fermentas); N, negative control without template; 1 to 4, the LAMP products produced using genomic DNA of healthy potato (lane 1), healthy cabbage (lane 2) and cabbage samples with soft rot (lane 3 and 4) as templates, respectively. Lane 3 and 4 were amplified successfully. PCC-LAMP can apply in field sample.

로 명명된 본 진단법은 PCC의 lytic murein transglycolase 유전자의 일부를 포함하는 클론을 제작하여 최적조건이 확립되었으며 61°C에서 최적 반응을 보이는 것으로 확인되었다. 또한 최적 조건 하에서 PCC-pBX437 클론의 1×10^3 copy수의 검출한계를 확인하였다. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, *Escherichia coli*의 5균주에 음성 반응이 확인된 PCC-LAMP는 PCC 배양 균주의 genomic DNA를 추출하였을 때와 실제 무름병 증상을 보이는 배추 시료에서의 양성 반응을 확인하여 PCC에 대한 특이성과 높은 반응성이 증명되었다.

무엇보다도 PCC-LAMP는 실험실 내의 환경에서 검출뿐만 아니라 현장 적용에 초점을 맞추었다. 등은 증폭이라는 특징을 가지는 LAMP법을 도입함으로써 고가의 장비가 필요 없어 항온수조 등의 간단한 장비만을 가지고 PCC 검출이 가능함을 확인하였다. 또한 SYBR Green I을 이용함으로써 형광 발현을 통하여 증폭산물을 확인할 수 있어, 전기영동 과정을 생략할 수 있어 더욱 간단한 진단이 가능함이 입증되었다. 다만 SYBR Green I은 UV 하에서만 관찰이 가능하므로, 만일 육안으로 증폭산물을 확인 할 수 있는 방법이 좀 더 개발된다면 PCC-LAMP는 현장에서의 PCC 검출에 매우 유용한 진단법으로 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

적용

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* (PCC)는 세균성 무름병균으로 주로 감자, 양배추 등의 식물에서 질병을 일으킨다. 본 연구에서는 현장에서 신속하게 진단하기 위해 loop-mediated isothermal amplification법을 이용하여 1시간 내에 등온에서 검출 가능한 진단법을 개발하였으며, 이를 PCC-LAMP법이라 명명하였다. PCC의 lytic murein transglycolase 유전자를 특이적으로 증폭시키는 4개의 프라이머를 제작하였으며 최적 온도가 61°C임을 확인하고 최적 조건을 확립하였다. 최적 조건을 바탕으로 4개의 프라이머가 1×10^3 copies까지 검출하는 민감성을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 개발된 PCC-LAMP법은 특이성 검사를 통해 PCC만이 특이적으로 검출됨을 확인하였으며, 이는 실제 시료에서도 적용 가능함을 확인하였다. PCC-LAMP법을 통하여 PCC를 신속하고 정확하게 검출함으로써 현장에서 유용하게 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 농촌진흥청 어젠다 과제 “나노 바이오 기술 융합 식물병원균 신속다량진단 키트개발”의 제 5세부과제 “초고속 및 정량 PCR에 의한 식물병원성 세균의 정량적 예측”(과제번호 200901OFT072251077)의 지원을 받아 수행되었으며, 저자 일동은 이에 감사하는 바입니다.

참고문헌

1. Aoi, Y., M. Hosogai, and S. Tsuneda. 2006. Real-time quantitative LAMP (loop-mediated isothermal amplification of DNA) as a simple method for monitoring ammonia-oxidizing bacteria. *J. Biotechnol.* 125, 484-491.
2. Blomstrom, A.L., M. Hakhverdyan, S.M. Reid, J.P. Dukes, D.P. King, S. Belak, and M. Berg. 2008. A one-step reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for simple and rapid detection of swine vesicular disease virus. *J. Virol. Methods* 147, 188-193.
3. Kang, H.W., S.J. Go, and S.W. Kwon. 1998. PCR specific detection of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by DNA probe selected from PCR polymorphic bands. *Plant Pathol. J.* 14, 164-170.
4. Kiatpathomchai, W., W. Jareonram, S. Jitrapakdee, and T.W. Flegel. 2007. Rapid and sensitive detection of Taura syndrome virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods* 146, 125-128.
5. Kim, Y.C., D.U. Song, B.H. Cho, and K.C. Kim. 1993. Cloning of the DNA fragment involved in the pathogenicity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, plant soft rot bacterium. *Plant Pathol. J.* 9, 213-217.
6. Nagamine, K., T. Hase, and T. Notomi. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes* 16, 223-229.
7. No, J.N., M.S. Yoo, D.S. Park, J.G. Kim, and B.S. Yoon. 2009. Development of a new PCR method for detection of *Pectobacterium carotovorum*. *Kor. J. Microbiol.* 45, 306-311.
8. Otori, A., S. Endo, A. Sano, K. Yokoyama, K. Yarita, M. Yamaguchi, K. Kamei, M. Miyaji, and K. Nishimura. 2006. Rapid identification of *Ochroconis gallopava* by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Vet. Microbiol.* 114, 359-365.
9. Roh, E., S. Lee, D. Fa, J. Choi, E. Moon, and S. Heu. 2009. Diverse antibacterial activity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* isolated in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 42-50.
10. Tsugunori, N., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, and T. Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28, e63.
11. Tsugunori, N. 2007. Loop-mediated isothermal amplification. *Nippon Rincho.* 65, 957-961.
12. Xu, H.D., J. Feng, Z.X. Guo, Y.J. Ou, and J.Y. Wang. 2009. Detection of red-spotted grouper nervous necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods* 163, 123-128.
13. Zhang, F., L. Ma, X. Xu, J. Zheng, Y. Shi, Y. Lu, and Y. Miao. 2009. Sensitive and rapid detection of *Karenia mikimotoi* (Dinophyceae) by loop-mediated isothermal amplification. *Harmful Algae* 8, 839-842.