



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

碩士學位論文

Loop-mediated isothermal Amplification
(LAMP)법을 이용한 *Vibrio alginolyticus*
의 신속 진단법 개발

濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

洪承賢

2013年 2月

Loop-mediated isothermal Amplification
(LAMP)법을 이용한 *Vibrio alginolyticus*
의 신속 진단법 개발

指導教授 許文洙

洪承賢

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2013 年 2 月

朴昭炫의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 ____이 승 현____(印)

委 員 ____정 준 범____(印)

委 員 ____허 문 수 ____ (印)

濟州大學校 大學院

2013 年 2 月

Development of a Loop-mediated
Isothermal Amplification (LAMP)
for Detection of *Vibrio*
alginolyticus

Seung-hyun Hong
(Supervised by professor Moon-Soo Heo)

A thesis submitted in partial fulfillment
of the requirement for the degree of
Master of Science

Department of Marine life science
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2013

목 차

목 차	i
List of Tables	iii
List of Figures	iv
Abstract	vi
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	5
2.1. 시험균주	5
2.2. DNA 추출	6
2.3. LAMP primer 제작	7
2.4. PCR primer 제작 및 PCR	8
2.5. LAMP법의 최적 반응 온도 확립	13
2.6. LAMP법의 최적 반응 시간 확립	14
2.7. LAMP법의 최적 반응 조건 확립	15
2.8. LAMP법과 PCR법 검출 한계치 비교	16

III. 결 과	17
3.1. LAMP법의 최적 반응 온도 확립	17
3.2. 최적 반응 시간 확립	19
3.3. LAMP법의 최적 반응 조건 확립	21
3.4. LAMP법과 PCR법의 민감도 확인	26
3.5. LAMP법 특이도 확인	27
IV. 요 약	30
V. 참고 문헌	32
VI. 감사의 글	38

List of tables

Table 1. Sequence of LAMP primer used for specific amplification of <i>V.alginolyticus</i>	9
Table 2. Sequence of PCR primer used for amplification of <i>V.alginolyticus</i>	11

List of figures

- Fig 1. Schematic representation of mechanism of LAMP 4
- Fig 2. The partial nucleotide sequence of sigma factor (*rpoX*) gene of *V. alginolyticus* (GenBank accession number FJ358498.1) used for the LAMP primer design. Nucleotide sequences used for primer design are indicated by boxes and arrows. 10
- Fig 3. The partial nucleotide sequence of sigma factor gene of *V. alginolyticus* (GenBank accession number FJ358498.1) used for the PCR primer design. 12
- Fig 4. Optimum temperature of the LAMP reaction for detection of *Vibrio alginolyticus* . Lane 1, DNA template in the reaction, amplification at 45.0°C; Lane 2, amplification at 50.0°C; Lane 3, amplification at 55.0°C; Lane 4, amplification at 60.0°C; Lane 5, amplification at 65.0°C; Lane 6, amplification at 70.0°C; Lanes M, 100bp DNA Marker (Intron biotechnology, Inc., Korea) 18
- Fig 5. Optimum time of the LAMP reaction for detection of *Vibrio alginolyticus* . Lane 1, DNA template in the reaction, amplification for 0 min; Lane 2, amplification for 20 min; Lane 3, amplification at 40 min; Lane 4, amplification for 60 min; Lane 5, amplification for 80 min; Lane 6, amplification for 100 min; Lanes M, 100bp DNA Marker (Intron biotechnology, Inc., Korea) 20
- Fig 6. Optimum deoxynucleotide triphosphate(dNTP) concentration of the LAMP reaction for detection of *Vibrio alginolyticus* . Lane 1, 0 μ M dNTP; Lane 2, 100 μ M dNTP; Lane 3, 200 μ M dNTP; Lane 4, 300 μ M dNTP; Lane 5, 400 μ M dNTP; Lane 6, 500 μ M dNTP. Lanes M, 100bp DNA Marker (Intron biotechnology, Inc., Korea) 22
- Fig 7. Optimum MgSO₄ concentration of the LAMP reaction for detection of *Vibrio alginolyticus* . Lane1,0mM MgSO₄; Lane2, 2mM MgSO₄; Lane3, 4mM MgSO₄;

Lane4, 6mM MgSO₄; Lane5, 8mM MgSO₄; Lane6, 10mM MgSO₄. Lanes M, 100bp DNA Marker (Intron biotechnology, Inc., Korea) 23

Fig 8. Optimum betaine concentrations of the LAMP reaction for detection of *Vibrio alginolyticus*. Lane1, 0.0M betaine; Lane2, 0.4M betaine; Lane3, 0.6M betaine; Lane4, 0.8M betaine; Lane5, 1.0M betaine; Lane6, 1.4M betaine; Lanes M, 100bp DNA Marker (Intron biotechnology, Inc., Korea) 24

Fig 9. Optimum bst polymerase concentrations of the LAMP reaction for detection of *V. alginolyticus*. Lane1, 4U bst polymerase; Lane2, 8U bst polymerase; Lane3, 12U bst polymerase; Lane4, 16U bst polymerase; Lane5, 20U bst polymerase; Lanes M, 100bp DNA Marker (Intron biotechnology, Inc., Korea) 25

Fig 10. Sensitivity of *V. alginolyticus* identification by LAMP and conventional PCR. (A) LAMP products (B) conventional PCR products. Lane 1 1.0×10¹ CFU/mL; Lane 2 1.0×10² CFU/mL; Lane 3 1.0×10³ CFU/mL; Lane 4 1.0×10⁴ CFU/mL; Lane 5 1.0×10⁵ CFU/mL; Lane 6 1.0×10⁶ CFU/mL; Lane 7 1.0×10⁷ CFU/mL; Lane 8 1.0×10⁸ CFU/mL; Lane M 100bp DNA Marker (Intron biotechnology, Inc., Korea) 28

Fig 11. Specificity of *rpoS* gene for the LAMP detection of *V. alginolyticus*. Lane 1 *Vibrio campbellii* KCCM 40864; Lane 2 *Vibrio furnisii* KCCM 41679; Lane 3 *Vibrio ichthyoenteri* KCCM 40870; Lane 4 *Vibrio fluvialis* KCCM 40827; Lane 5 *Vibrio harvey* KCCM 40866; Lane 6 *Vibrio alginolyticus* KCCM 40513; Lane 7 *Vibrio vulnificus* KCCM41665; Lane 8 *Vibrio cholerae* KCCM 41626; Lanes M, 100bp DNA Marker (Intron biotechnology, Inc., Korea) 29

ABSTRACT

The development of rapid, accurate and sensitive diagnostic methods for the identification of pathogens is fundamental for treating and controlling, or even eradicating of infectious disease. Classical pathogenic identifications are based on their culture methods and their microscopic evaluation, which were know for its negative effects such as slow and sensitivety in standaizing its growth and culture conditions. Therefore, the setting up of more rapid, sensitive and accurate diagnostic methods has long been desired in clinical molecular diagnosis of pathogens.

The loop-mediated isothermal amplification method (LAMP), an PCR based diagnostic method based on autocycling strand displacement DNA synthesis in the presence of exonuclease-negative *Bst* DNA polymerase under isothermal condition. With the help of four specific primers that recognize six different sequences on a target DNA, LAMP has high specificity in pathogenic identification in short time. Since year 2000, the LAMP method has been tested in diagnosis of several viral, bacterial, fungal and protozoans species. Hence in the present study, LAMP is used as diagnostic tool in identification of the most dreadful aquatic pathogenic species *Vibrio alginolyticus* and to develop species specific LAMP primers, optimization of LAMP reaction conditions like annealing temperature, elongation time and other PCR chemical concentration such as $MgSO_4$, dNTPs, Betaine and *Bst* polymerase.

LAMP primers composed of two outer primers which initiate strand displacement and two inner primer which amplify "the loop" structure through

the reaction. The LAMP products were shown a typical ladder-like pattern on gel electrophoresis which indicated that stem-loop DNA with inverted repeats was amplified.

The amplification was observed at 65°C from 40 mins to 100 mins. Of which 100 mins elongation time was found to be good. The optimum MgSO₄ concentration was 4mM, while the dNTPs concentration lies in between 400~500 μM. The optimized amount of Betaine was 1.0 M and *Bst* concentration was 8 U. The optimized LAMP primers were also checked for its specificity with other *Vibrio* species showed that the designed primers were very specific to *Vibrio alginolyticus* only. Results also reveal that the LAMP assay could be 10 fold sensitive than the conventional PCR in detecting *Vibrio alginolyticus*. This could be the first report on using a rapid, and highly sensitive technique, LAMP assay, in the effective diagnosis of *Vibrio alginolyticus* a pathogenic bacteria and helps in the early detection of diseases particularly in aquaculture.

I. 서론

양식 해산어에서 발생하는 비브리오증은 물리적 스트레스 등으로 인하여 면역력이 약한 어류가 기회적으로 감염을 일으키는 조건성 병원체에 의한 증상으로 알려져 있다.

일반적으로 치어기때 발병률이 높으며 원인균으로는 매우 다양한 세균들이 보고되고 있다. 비브리오는 그람 음성 간균의 종속영양세균으로 대부분 옥시다아제(oxidase) 및 카탈라아제(catalase) 양성 균주로서 일부를 제외하고는 성장에 나트륨 이온을 필요로 하는 호염성 세균이다.

그중 *Vibrio alginolyticus* 는 고농도의 염분을 선호하는 호염성을 가지고 있으며 저수온에서는 드물게 발견되고 있으나 고수온이 되는 시점에서는 급격한 증가로 양식산 어류에서 많이 발견되고 있다. 이 균은 처음엔 해양 환경에서 *Vibrio parahaemolyticus* 와 유사한 세균으로 발견 되었지만 그 이후 많은 연구로 인하여 *V. alginolyticus* 로 명명 되었다 (Blake et al.1980)

비브리오증 감염 증상은 다른 세균성 질병에 비해 매우 다양하다. 체색흑화 증상 및 궤양이 보이기도 하며 때로는 지느러미의 발적, 체표 발적이 나타나기도 하며 해부학적 소견으로는 간의 출혈이나 울혈이 관찰되기도 한다.

다양한 비브리오 속 균의 동정에는 과거 생화학적 분석법 등을 이용하였으나 비브리오 속 내의 종 다양성 때문에 어려움이 많다고 알려져 있다. 임상으로부터 분리되는 비브리오 종 동정에는 표준화된 생화학적 동정법 및 키트가 시판되고 있으나. 환경 및 해양 동물 등 기타 시료로부터 분리되는 비브리오종인 경우에는 생화학적 특성의 다양성으로 인해 생화학적 동정에는 어려움이 많은 실정이다. 최근 이러한 동정법 중 분자진단학이 주목받고 있다.

분자 진단학(molecular diagnostics)은 분자생물학적 기술을 이용하여 DNA, RNA, 단백질 등의 생체지표물질(biomarker)을 검출하거나 측정하는 체외 진단학의 한 분야이다. 넓은 의미로는 항체를 이용한 면역진단의 영역을 포함하지만

현재는 좁은 의미에서 유전정보 물질인 DNA나 RNA를 분석하고 검출하는 검출하는 핵산진단학(nucleic acid diagnostics)과 같은 의미로 사용되고 있다.

핵산검사 기술은 유전법칙(laws of heredity)의 발견과 DNA가 유전물질(heredity material)임을 증명한 유전학적, 생화학적, 분자생물학적 지식의 진보는 현대 의학혁명의 원동력이 되는 DNA의 이중나선 구조의 발견을 이끌었다. 이 후 제한효소(restriction enzyme), 역전사효소(reverse transcriptase), 리가아제(ligase)를 이용한 최초의 재조합 DNA의 제조와 재조합 플라즈미드의 생산은 본격적인 재조합 핵산기술이 시대를 열었다.

이러한 기술적 진보 위에 재조합 핵산기술을 임상에 응용한 진단검사 방법이 발표되면서 진단의학의 새로운 시대가 열리게 되었다.

Kan은 1975년 분자보합(molecular hybridization) 방법, 1978년 제한효소 절편 길이 다양성(RELP: restriction fragment length polymorphism) 분석방법 등을 도입하였고 임상 분자유전학(clinical molecular genetics)은 유전 질환을 진단하고 치료하는데 핵심적인 분야로 자리잡게 되었다.

핵산검사 (NAT: nucleic acid test)는 체외진단검사 중 가장 빠른 속도로 성장하는 분야로 세계시장에서 약 20%의 연평균 성장률을 보이고 있다. NAT는 현재 30조 가량의 체외진단검사 시장중 8%의 점유율을 보이고 있지만 2008년에는 13% 이상을 차지하며 매출규모는 5조 이상이 될 것으로 보이며 어류질병에 진단법의 경우는 다수의 연구에 비해 전반적으로 상용화 단계에 미치지 못하여 향후 발전성이 매우 높다고 할수 있다.

이러한 진단법은 기본적으로 매우 적은 약의 발병원이라도 검출할 수 있는 감수성, 특정 발병원만을 정확하게 검출해야 하는 특이성, 적은 비용, 노력, 시간으로 간편하게 적용할 수 있어야 하는 간편성의 3가지 요소를 갖추어야 좋은 진단법이라 할 수 있다.

하지만 현재 양식어민의 경우 생물공학적인 지식이 부족하여 자체적인 어류질병의 진단은 육안적인 진단에 의존하고 있으며 감염어를 피검체로 하여 병원균을 배양 후 판단하는데 있어 정확도 측면에서 난해한 점이 많다. 특히 어류 질병 유발균의 경우에는 분자진단학적 접근이 필수적인데 이는 국공립 연구소에서 진단서비를 제공하고는 있지만 양식업체의 수에 비해 모자란 연구시설로 인한 병

목현상을 초래하여 일주일 내외의 진단시간을 소모하기 위해서는 PCR 관련 장비 및 시약 등 수백만원을 호가하는 시설 및 유지비가 소요되어 양식 어민의 관련 지식을 습득하더라도 부담스러운 비용이 아닐수 없다.

이에 감수성 및 특이성을 갖춘 분자 진단학적 기술을 양식어민이 쉽게 적용할 수 있는 방법인 LAMP(loop-mediated isothermal amplification)을 접목시키고자 한다.

LAMP는 2사슬 DNA, 6개 영역을 인식하는 4개의 primer, DNA polymerase, 기질 등을 동일 용기에 넣어 일정온도 (섭씨 약 65도) 하에서 증폭에서 검출까지 원스텝으로 실시할 수 있다. 증폭 효율이 높고, DNA를 1시간 정도에 $10^9 \sim 10^{10}$ 배까지 증폭시킬 수 있으며, 매우 높은 특이성을 나타내므로 목적 DNA 배열의 존재를 증폭산물의 유무로 판정할 수 있다. 즉 기존의 중합효소 연쇄반응법과 유사하지만 기존의 중합효소 연쇄반응이 변성(denaturation), 접합(annealing), 신장(extention) 세 가지 단계를 거치면서 온도의 변화를 주어야 하는 반면, 일정한 온도에서 접합 및 신장이 가능하다는 특징이 있다. 따라서 별도의 온도 구배를 두지 않고 주형 DNA의 증폭이 가능하게 됨에 따라 PCR 증폭법 보다 소요시간을 줄일 수 있으며 특히 고가의 PCR 장비가 아닌 등온 유지가 가능한 항온 수조나 오븐, 온장고 등 저가의 장비에서도 증폭이 가능하며, 장소에 구애받지 않게 됨에 따라 임상진단 실험실과 현장 및 기타 어느 장소에서도 어류질병의 병원체에 대한 진단이 가능한 장점을 가지고 있다. (Figure 1)

따라서 본 연구에서는 특이성, 감수성, 간편성을 갖춘 분자기법 중 하나인 LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification)를 이용하여 해산어류 양식어 종 중 가장 많은 비중을 차지하는 넙치의 세균성 질병인 *Vibrio alginoliticus* 신속진단법을 개발하고 최종적으로 전문지식이 없는 양식어민이 직접 주요 병원체의 감염 유무를 2시간내에 확인할 수 있는 진단법을 개발하고자 한다.

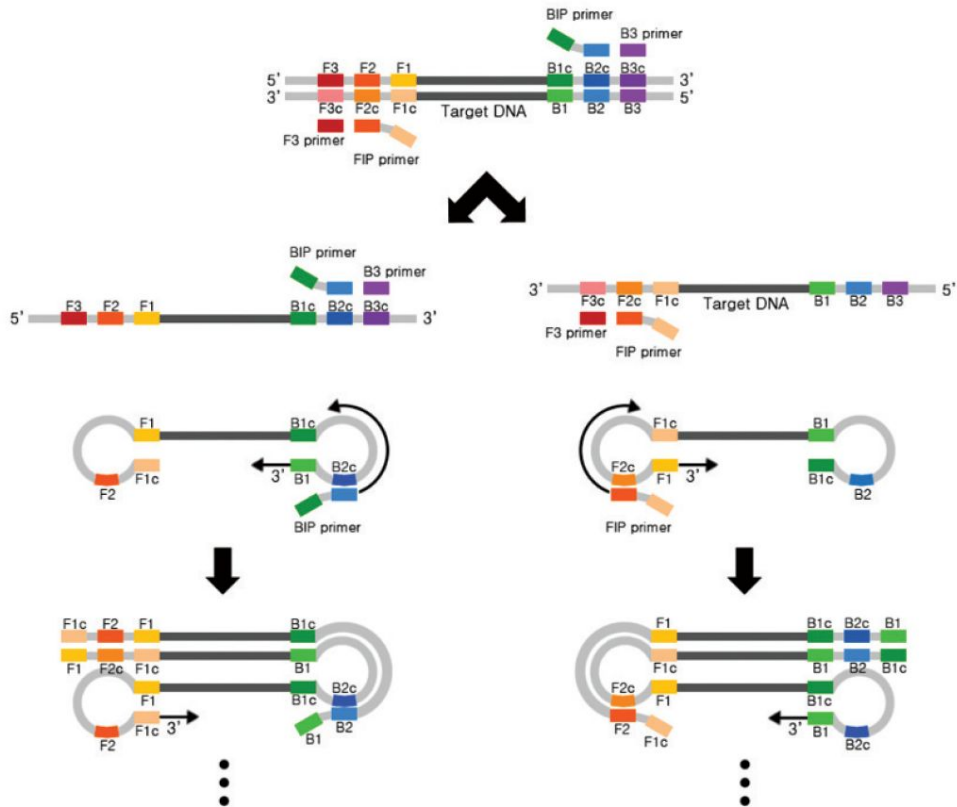


Figure 1 - Schematic representation of mechanism of LAMP. Steps in the LAMP reaction. This figure shows the process that starts from primer FIP. It should be remembered that DNA synthesis can also begin from primer BIP

II. 재료 및 방법

2.1. 시험균주

이 실험에 사용된 표준균주는 한국미생물보존센터 KCCM에서 분양받았다. 이 실험에는 *Vibrio alginolyticus* KCCM 40513과 *Vibrio campbellii* KCCM 40864, *Vibrio furnisii* KCCM 41679, *Vibrio ichthyenteri* KCCM 40870, *Vibrio fluvialis* KCCM 40827, *Vibrio harvey* KCCM 40866, *Vibrio vulnificus* KCCM41665, *Vibrio cholerae* KCCM41626을 사용하였다. 각각의 균주는 Marine broth (MB: Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)와 Tryptic soy broth (TSB: Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) 이용하여 배양조건에 따라 24시간 배양한 뒤에 본 실험에 사용하였다.

2.2. DNA 추출

Vibrio alginolyticus 외 8개의 DNA는 Bioneer사의 Genomic DNA Extraction Kit을 사용하여 추출하였다. 각각의 균주는 MB 와 TSB 이용하여 배양조건에 따라 24시간 배양한 뒤에 1.5 ml 튜부에 배양액 500 μ l 옮겨 담고 12000 rpm에 5분간 원심분리하여 상층액은 버리고 침전된 균체를 사용하였다. 실험은 제작사의 지시에 따라 진행하였다.

Lysozyme 40 μ l 첨가 후 37°C에서 1시간동안 반응 시킨 후 80°C에서 10분간 반응을 정지시킨 후 진행하였다.

200 μ l Tissue Lysis buffer(TL), Proteinase K 20 μ l 넣고 vortex 후 60°C로 1시간동안 반응시켰다. 그리고 Binding buffer (GC) 200 μ l 넣고 다시 60°C 10분 동안 반응 후 100 μ l Isopropanol 첨가 후 Binding column tube (2 mL tube) 에 옮기고 8000 rpm에 1분간 원심분리 시킨 후 Binding column 을 새로운 2 mL tube 에 옮긴 후 500 μ l washing buffer 1 (W1) 넣은 후 8000 rpm에 1분간 원심분리, 다음 washing buffer 2 (W2)를 넣고 8000 rpm에 1분간 원심분리 하였다. 완전한 washing을 위해 12,000 rpm 에 1분간 원심분리 후 Binding column 을 새로운 1.5 mL tube 에 옮긴 후 200 μ l Elution buffer (EL) 첨가 후 상온에서 1분간 반응 시킨 후 8000 rpm에 1분간 원심분리 하였다. 분리한 DNA는 -20°C에 저장 후 실험에 사용하였다.

2.3. LAMP primer 제작

LAMP 분석을 위해 *Vibrio alginolyticus*의 sigma 인자인 rpos gene(Genbank accession number: FJ358498.1)을 template sequence로 사용하여 LAMP primer designing software 인 primerExplorer (<http://primerexplorer.jp/e/index.html>)를 이용하여 *Vibrio alginolyticus* 특이 LAMP용 primer를 디자인 하였다. Primer set는 4개의 primer로 구성되어 있는데 target sequence의 6개의 특정 영역을 인지할 수 있는 두 개의 outer primer와 두 개의 inner primer로 이루어져 있다. LAMP의 FIP primer는 loop를 형성하는 sequence의 부분 TTTT spacer로 합하여 제작되었다. BIP primer도 마찬가지로 *vibrio alginolyticus* sequece의 상보적인 염기서열과 loop를 형성하는 sequence의 부분 TTTT spacer로 합하여 제작되었다. 또한 F3과 B3 primer는 각각 inner primer의 바깥쪽에 위치하도록 설계하였으며 제작하였다. 이 primer들은 Bioneer사(Korea)에 주문 의뢰하여 제작하였다. primer는 Table 1 에 나타내었다.

2.4 PCR primer 제작 및 PCR

PCR primer는 *V.alginolyticus* 표준균주의 *rpoS* 유전자 Sequence의 서열을 이용하여 제작하였다. (Table 2) PCR을 수행하기 위해 primer는 각각 20 pM과 AccuPower PCR Premix (1 U Taq DNA polymerase, 250 μ M dNTP, 10 mM Tris-HCl, 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, stabilizer and tracking dye: Bioneer, USA), template genomic DNA, 총 볼륨 20 μ l 반응액을 조성하였다. Initial denature 94°C에서 5분간, Denature 94°C에서 30초, Annealing 50°C에서 30초, Extension 72°C에서 1분을 총 30 cycle로 반응시킨 후 Last extension 72°C에서 5분간 더 진행시켰다. 이후 산물은 1×TAE (Tris-acetate-EDTA) buffer(Bioneer, USA)가 첨가된 1.5% agarose gel을 이용하여 50V에서 40분간 전기영동 실시 후 UV상에서 관찰하였다.

Table 1. Sequence of LAMP primer used for specific amplification of *V.alginolyticus*

Bacterial specie	Primer ^a	Length	Sequence
<i>V.alginolyticus</i>	F3	18mer	5'-AGTTCGATCCTGAGCCAG-3'
	B3	22mer	5'-GAGTTCAGAAATAGACAACCTCC-3'
	FIP	45mer	5'-GGCCATTGTTTCATTAATGCCG-TTTT-
	(F1C+TTTT+F2)	(F1C:21-mer,F2: 20-mer)	TCTACTTATGCGGTATGGTG-3'
	BIP	45mer	5'-CGGTACGTTTACCTGCTCATGT-TTTT-
	(B1C+TTTT+B2)	(B1C:24-mer,B2: 17-mer)	TTGCTCTCACTTTTTTGACG-3'



Figure 2. The partial nucleotide sequence of sigma factor (*rpoX*) gene of *V.alginolyticu*s (GenBank accession number FJ358498.1) used for the LAMP primer design. Nucleotide sequences used for primer design are indicated by boxes and arrows.

Table 2. Sequence of PCR primer used for amplification of *V.alginolyticus*

Bacterial specie	Primer	Length	Sequence
<i>V.alginolyticus</i>	F	23mer	5'-CCTTATGCTCACTATCTCAAAGA-3'
	R	19mer	5'-AAGTTATTACCTGGCCGTT-3'

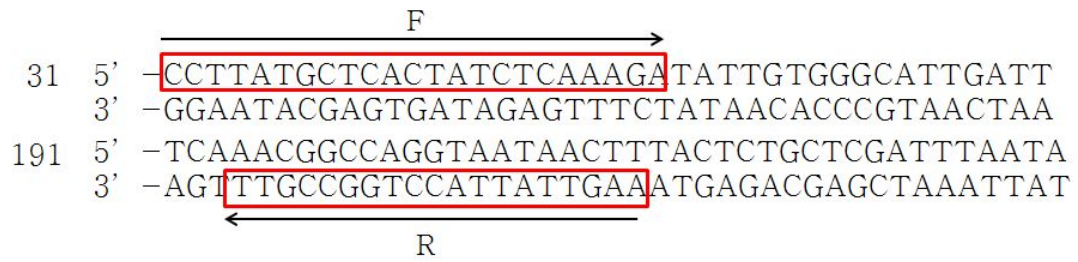


Figure 3. The partial nucleotide sequence of sigma factor (rpoX) gene of *V.alginolyticus*(GenBank accession number FJ358498.1) used for the PCR primer design.

2.5. LAMP법의 최적 반응 온도 확립

Vibrio alginolyticus-LAMP의 특이적 검출을 위하여 반응 최적 온도를 확인하고자 하였다. 조성은 20 pM F3와 B3 primer, 40 pM FIP와 BIP primer, template genomic DNA, 8 U *Bst* DNA polymerase large fragment (New England biolabs, Beverly, MA), 1 × ThermoPol Reaction Buffer (20 mM Tris-HCl(pH8.8), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.4% Triton X-100, New England biolabs, Beverly, MA), 400 μM dNTP (TaKaRa Biotechnology co., Ltd) 1 M Betaine (Sigma-Aldrich Corporation, USA) 6 mM MgSO₄ (New England biolabs, Beverly, MA), Distilled water (negative control)로 총 25 μl의 반응액을 조성하였다. *Bst* DNA polymerase large fragment 는 80℃ 이상의 온도에서는 불활성을 나타내므로 먼저 95℃에서 5분간 해리한 뒤 바로 얼음에 옮겨 식힌 후 따로 첨가하였다. 이 후 1시간 동안 DNA 변형 합성을 진행하였고, 80℃에서 10분간 반응시킨 후 종료하였다. DNA 변형 합성의 최적 온도 측정은 45.0~70.0℃ 사이에서 각기 다른 조건하에서 실시하였으며 각 LAMP반응이 끝난 후 증폭 산물들은 1×TAE (Tris-acetate-EDTA) buffer(Bioneer, USA)가 첨가된 1.5% agarose gel을 이용하여 50V에서 40분간 전기영동 실시 후 UV상에서 관찰하였다.

2.6. LAMP법의 최적 반응 시간 확립

Vibrio alginolyticus-LAMP의 빠른 진단을 위하여 *Vibrio alginolyticus* 검출에 필요한 최소 반응 시간을 확인하고자 하였다. 조성은 20 pM F3와 B3 primer, 40 pM FIP와 BIP primer, template genomic DNA, 8 U *Bst DNA polymerase large fragment* (New England biolabs, Beverly, MA), 1 × ThermoPol Reaction Buffer (20 mM Tris-HCl(pH8.8), 10 mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.4%Triton X-100, New England biolabs, Beverly, MA), 400 μM dNTP (TaKaRa Biotechnology co., Ltd) 1 M Betaine (Sigma-Aldrich Corporation, USA) 6 mM MgSO₄ (New England biolabs, Beverly, MA), Distilled water (negative control)로 총 25 μl의 반응액을 조성하였다. 95℃에서 5분간 해리 후, *Bst DNA polymerase large fragment*를 첨가하여 반응액의 polymerization 시간을 100분, 80분, 60분, 40분, 20분, 0분으로 조절하여 그 증폭 산물들은 1×TAE(Tris-acetate-EDTA) buffer(Bioneer, USA)가 첨가된 1.5% agarose gel을 이용하여 50V에서 40분간 전기영동 실시 후 UV상에서 관찰하였다.

2.7. LAMP법의 최적 반응 조건 확립

Vibrio alginolyticus-LAMP의 최적 반응액 조건을 확인하였다. dNTP의 농도는 각각 0 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M, 400 μ M 600 μ M을 첨가하여 조성함으로써 최적 반응 조건을 확인하였고, betaine 경우에는 0 M, 0.4 M, 0.6 M, 0.8 M, 1.0 M, 1.4 M 을 첨가하여 조성하였고 또한 Mg^{++} 의 농도는 0 mM, 4 mM, 8 mM, 12 mM, 16 mM, 18 mM을 조성하였고 *Bst* DNA polymerase 4 U, 8 U, 12 U, 16 U, 20 U 을 첨가하여 조성함으로써 최적 반응 조건을 확립하였다.

2.8. LAMP법과 PCR법 검출 한계치 비교

Vibrio alginolyticus 를 사용하여 MB에서 30℃에서 48시간 배양한 배양액을 연속적으로 희석하여 $1.0 \times 10^1 \sim 10^8$ cfu/mL의 농도로 조정하였다. 각 배양액과 희석액에서 1 mL 을 취하여 DNA 를 분리하고 LAMP와 PCR 법을 수행하여 검출 한계 값을 비교 하였다.

Ⅲ. 결 과

3.1. LAMP법의 최적 반응 온도 확립

최적 반응 온도 확립을 위하여 45.0℃, 50.0℃, 55.0℃, 60.0℃, 65.0℃, 70.0℃에서 1시간 동안 각기 등은 조건하에서 LAMP를 진행하였으며 각 LAMP 반응이 끝난 후 전기영동으로 확인하였고 55.0℃ ~ 65.0℃의 범위에서 신장되는 것을 확인하였다.(Fig. 4) LAMP 반응 산물은 전기영동상에서 몇몇의 각기 다른 크기의 DNA band로 나타나는데, LAMP 산물이 몇몇의 inverted-repeat 구조를 구성하기 때문이다. 따라서 LAMP법에 의한 DNA 증폭은 PCR법에 의한 증폭이 특이 DNA band를 나타내는 것과 달리 ladder 같은 pattern으로 나타난다.

최적 반응 온도는 반복실험을 통하여 63℃로 측정되어쓰며 이후의 실험은 최적 온도인 63℃에서 수행하였다.

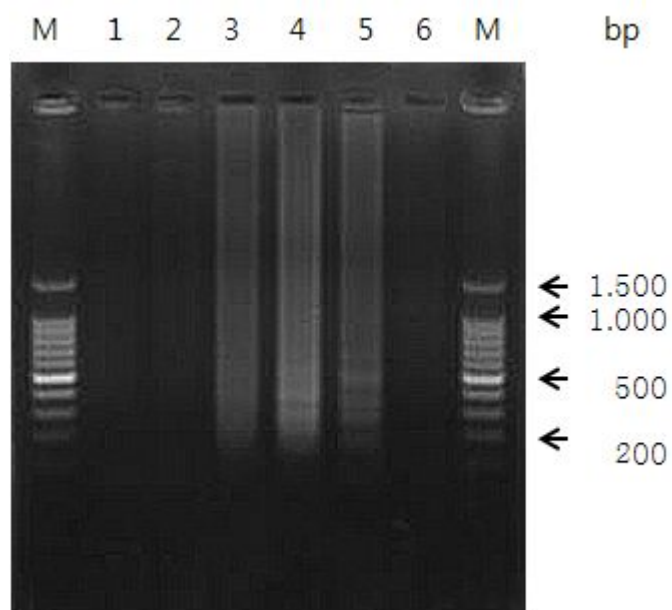


Figure 4. Optimum temperature of the LAMP reaction for detection of *Vibrio alginolyticus* . Lane 1, DNA template in the reaction, amplification at 45.0°C; Lane 2, amplification at 50.0°C; Lane 3, amplification at 55.0°C; Lane 4, amplification at 60.0°C; Lane 5, amplification at 65.0°C; Lane 6, amplification at 70.0°C; Lanes M, 100bp DNA Marker (Intron biotechnology, Inc., Korea)

3.2. 최적 반응 시간 확립

LAMP의 최단 반응 시간을 측정하기 위하여 *Bst DNA polymerase*를 첨가하여 63℃에서 각각 반응액의 polymerization 시간을 100분, 80분, 60분, 40분, 20분, 0분간 반응 시킨 뒤, 전기영동을 통해 확인하였고 그 결과 최소 40분 이상의 반응 뒤에 전기영동을 통하여 DNA 신장을 확인할수 있었다.(Fig 5)

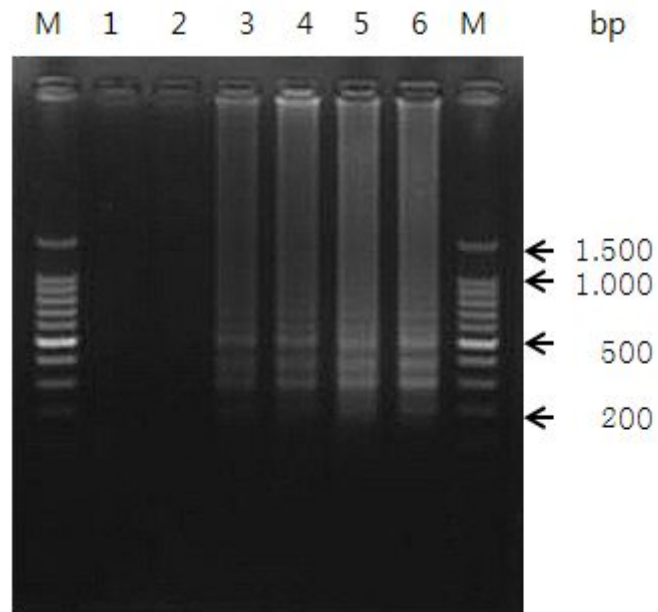


Figure 5. Optimum time of the LAMP reaction for detection of *Vibrio alginolyticus* . Lane 1, DNA template in the reaction, amplification for 0 min; Lane 2, amplification for 20 min; Lane 3, amplification at 40 min; Lane 4, amplification for 60 min; Lane 5, amplification for 80 min; Lane 6, amplification for 100 min; Lanes M, 100bp DNA Marker (Intron biotechnology, Inc., Korea)

3.3. LAMP법의 최적 반응 조건 확립

Vibrio alginolyticus-LAMP의 최적 반응조건을 확립하기 위하여 dNTP, MgSO₄, betaine, *Bst* DNA polymerase의 최적 농도를 구하였다.

dNTP의 최적 농도를 확립하기 위하여 각 반응액에 0 μM, 100 μM, 200 μM, 300 μM, 400 μM, 500 μM의 dNTP를 첨가하여 LAMP를 수행하고 그 생성물의 양을 정기영동을 통하여 비교하였다. 그 결과 dNTP의 양이 400 μM에서 500 μM일 때, DNA 신장이 가장 잘 이루어진 것을 확인할 수 있었다. (Fig 6)

MgSO₄의 각 반응액에 0 mM, 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM, 10 mM의 MgSO₄를 첨가하여 LAMP를 수행하고 그 생성물의 양을 정기영동을 통하여 비교하였다. 2 mM에서 6 mM일 때, DNA 신장이 가장 잘 이루어진 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여 과량의 MgSO₄는 LAMP 반응을 저해한다는 사실을 알 수 있었고 최종으로 최적 농도를 4 mM로 결정하였다. (Fig 7)

betaine의 최적 농도 확립을 위하여 각각 0.0 M, 0.4 M, 0.60 M, 0.8 M, 1.0 M, 1.4 M,을 첨가하여 LAMP를 수행하였다. 그 결과 농도가 높아 질수록 ladder pattern이 다양해지는 것을 관찰하였다. 최종적으로 1.0 M betaine 최적 농도로 결정하였다. (Fig 8)

Bst DNA polymerase의 최적 농도 확립을 위하여 각각 4 U, 8 U, 12 U, 16 U, 20 U을 첨가하여 LAMP를 수행하였다. 8 U을 첨가하였을 때 다양한 크기와 많은 생성물이 확인되어 *Bst* DNA polymerase 최적 농도를 8 U으로 결정하였다. (Fig 9)

따라서 LAMP를 위한 최적 반응 조건으로 총 25 μl를 기준으로 각각 400 μM dNTP, 4 mM MgSO₄, 1.0 M betaine, 8 U *Bst* DNA polymerase를 LAMP 표준 조건으로 결정하였다.

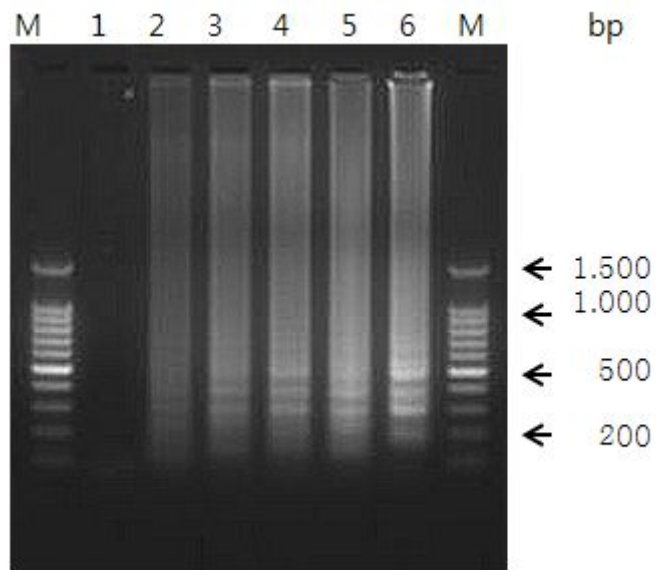


Figure 6. Optimum deoxynucleotide triphosphate(dNTP) concentration of the LAMP reaction for detection of *Vibrio alginolyticus* . Lane 1, 0 μM dNTP; Lane 2, 100 μM dNTP; Lane 3, 200 μM dNTP; Lane 4, 300 μM dNTP; Lane 5, 400 μM dNTP; Lane 6, 500 μM dNTP. Lanes M, 100bp DNA Marker (Intron biotechnology, Inc., Korea)

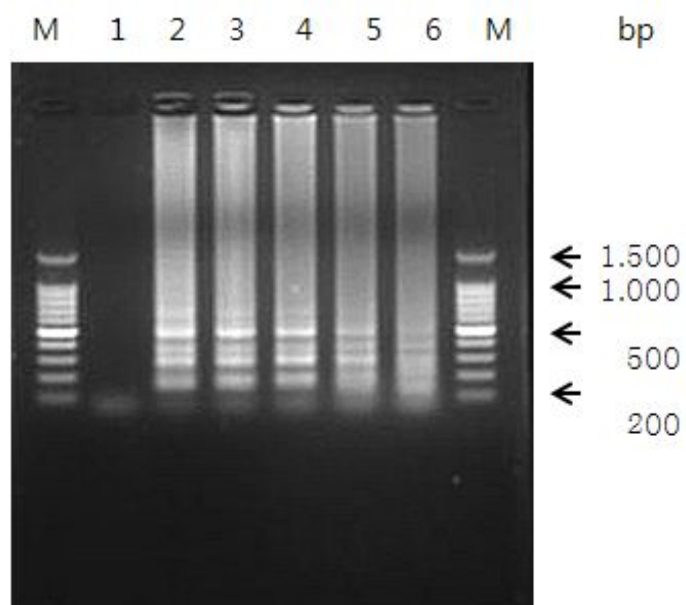


Figure 7. Optimum $MgSO_4$ concentration of the LAMP reaction for detection of *Vibrio alginolyticus*. Lane1, 0mM $MgSO_4$; Lane2, 2mM $MgSO_4$; Lane3, 4mM $MgSO_4$; Lane4, 6mM $MgSO_4$; Lane5, 8mM $MgSO_4$; Lane6, 10mM $MgSO_4$. Lanes M, 100bp DNA Marker (Intron biotechnology, Inc., Korea)

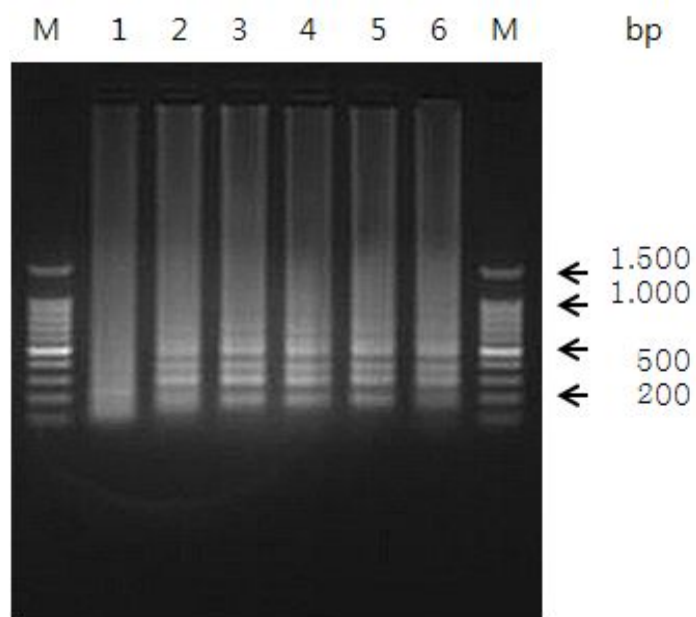


Figure 8. Optimum betaine concentrations of the LAMP reaction for detection of *Vibrio alginolyticus*. Lane1, 0.0M betaine; Lane2, 0.4M betaine; Lane3, 0.6M betaine; Lane4, 0.8M betaine; Lane5, 1.0M betaine; Lane6, 1.4M betaine; Lanes M, 100bp DNA Marker (Intron biotechnology, Inc., Korea)

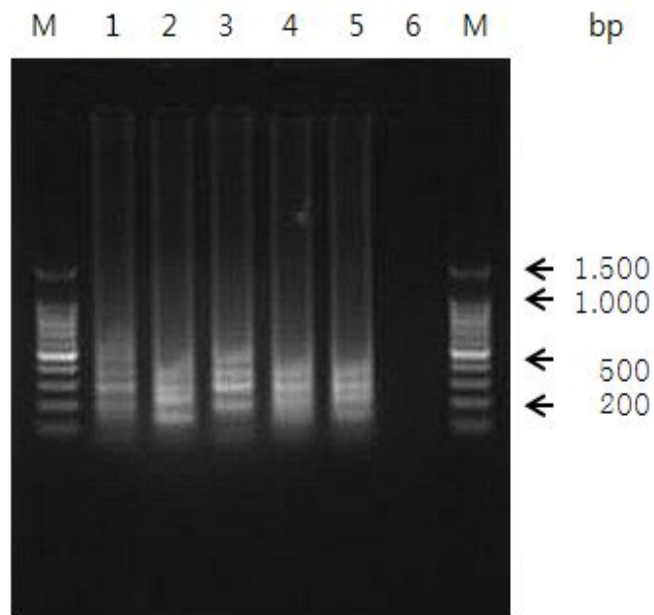


Figure 9. Optimum bst polymerase concentrations of the LAMP reaction for detection of *V.alginolyticus*. Lane1, 4U bst polymerase; Lane2, 8U bstpolymerase ; Lane3, 12U bst polymerase; Lane4, 16U bst polyme rase; Lane5, 20U bst polymerase; Lanes M, 100bp D NA Marker (Intron biotechnology, Inc., Korea)

3.4. LAMP법과 PCR법의 민감도 확인

최적 조건 확립후 LAMP 검출법의 민감도는 *V. alginolyticus* 배양액을 연속적으로 희석하여 $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^8$ CFU/mL의 농도로 조정하여 Bioneer사의 Genomic DNA Extraction Kit을 사용하여 DNA 추출 후 LAMP 검출법과 PCR 방법의 검출 한계 값을 비교 하였다.

LAMP 검출 한계 측정 결과 1.0×10^1 cfu/mL까지 LAMP를 통해 검출할 수 있는 것으로 확인되었다. 일반 PCR의 경우 1.0×10^2 cfu/mL 까지 검출한계를 확인하였다.(Fig 10) 따라서 LAMP 검출법이 일반 PCR 법 보다 더 높은 검출한계를 가지며 민감도가 100배 정도 더 높은 것을 확인할 수 있었다.

3.5. LAMP법 특이도 확인

최적 조건 확립 후 LAMP 검출법을 특이도 *V. alginolyticus* 표준균주와 *Vibrio* 종 7개를 사용해 LAMP 검출법의 특이도를 확인하였다. 전기영동을 통하여 확인한 결과 *V. alginolyticus* 균주는 양성반응을 보였으나, 음성 지표균은 모두 음성 반응을 나타내었다. 따라서 LAMP 검출법의 중 특이적인 밴드가 검출되어 특이도가 높은 검출법임을 알 수 있었다. (Fig 11)

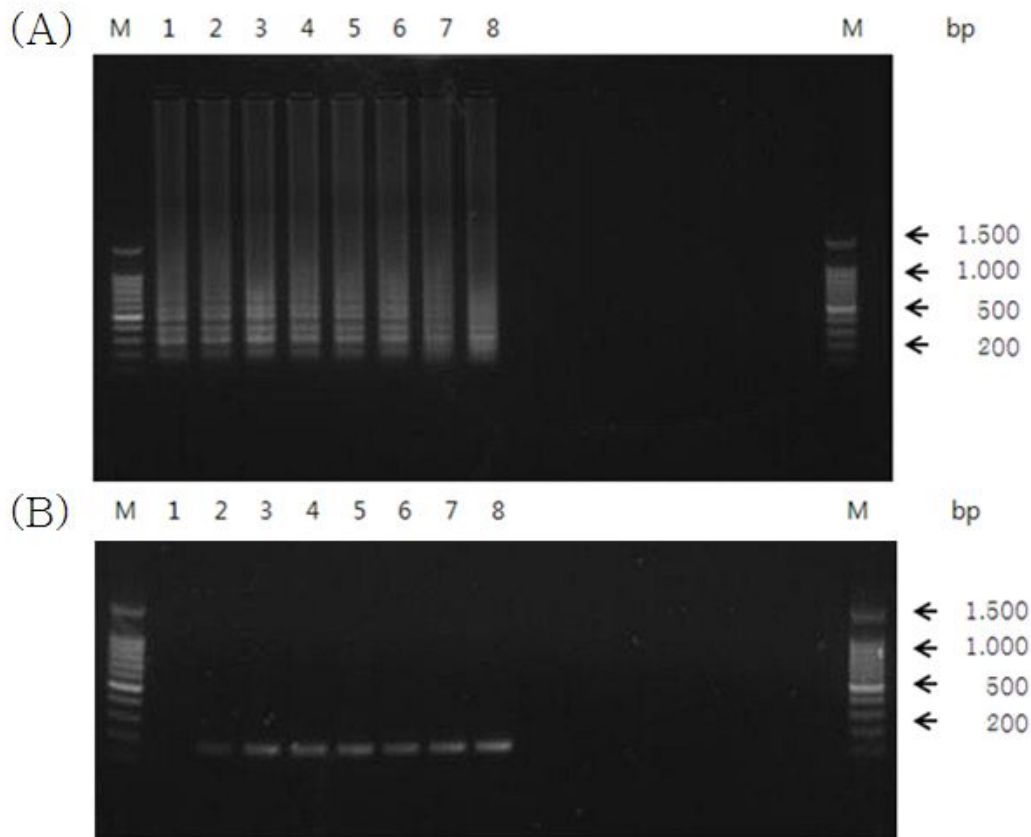


Figure 10. Sensitivity of *V. alginolyticus* identification by LAMP and conventional PCR. (A) LAMP products (B) conventional PCR products. Lane 1 1.0×10^1 CFU/mL; Lane 2 1.0×10^2 CFU/mL; Lane 3 1.0×10^3 CFU/mL; Lane 4 1.0×10^4 CFU/mL; Lane 5 1.0×10^5 CFU/mL; Lane 6 1.0×10^6 CFU/mL; Lane 7 1.0×10^7 CFU/mL; Lane 8 1.0×10^8 CFU/mL; Lane M 100bp DNA Marker (Intron biotechnology, Inc., Korea)

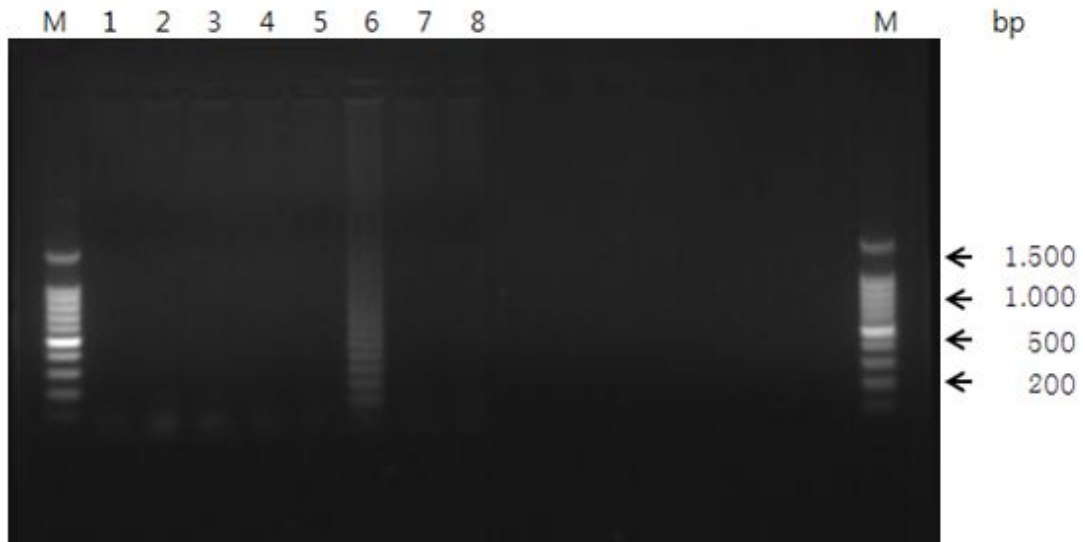


Figure 11. Specificity of *rpoS* gene for the LAMP detection of *V. alginolyticus*. Lane 1 *Vibrio campbellii* KCCM 40864; Lane 2 *Vibrio furnisii* KCCM 41679; Lane 3 *Vibrio ichthyoenteri* KCCM 40870; Lane 4 *Vibrio fluvialis* KCCM 40827; Lane 5 *Vibrio harvey* KCCM 40866; Lane 6 *Vibrio alginolyticus* KCCM 40513; Lane 7 *Vibrio vulnificus* KCCM41665; Lane 8 *Vibrio cholerae* KCCM 41626; Lanes M, 100bp DNA Marker (Intron biotechnology, Inc., Korea)

IV. 요약

등온증폭법은 기존의 중합효소 연쇄반응에서 사용되는 Taq. DNA polymerase와는 다르게 *Bst.* DNA polymerase를 사용하므로 가능한 실험방법이다. *Bst.* DNA polymerase는 Taq. DNA polymerase와는 달리 5'-3' exonuclease의 성격을 가지고 있어 DNA의 이중나선 구조를 열에 의한 변성을 거치지 않고 Tm 값에 가까운 접합 온도에서 접합 및 신장을 수행한다.

또한 2사슬 DNA, 6개 영역을 인식하는 4개의 primer, DNA polymerase, 기질 등을 동일 용기에 넣어 일정온도 (섭씨 약 65도) 하에서 증폭에서 검출까지 원스텝으로 실시할 수 있다. 증폭 효율이 높고, DNA를 1시간 정도에 $10^9 \sim 10^{10}$ 배까지 증폭시킬 수 있으며, 매우 높은 특이성을 나타내므로 목적 DNA 배열의 존재를 증폭산물의 유무로 판정할 수 있다. 즉 기존의 중합효소 연쇄반응법과 유사하지만 기존의 중합효소 연쇄반응이 변성(denaturation), 접합(annealing), 신장(extention) 세 가지 단계를 거치면서 온도의 변화를 주어야 하는 반면, 일정한 온도에서 접합 및 신장이 가능하다는 특징이 있다. 따라서 별도의 온도 구배를 두지 않고 주형 DNA의 증폭이 가능하게 됨에 따라 PCR 증폭법 보다 소요시간을 줄일 수 있으며 특히 고가의 PCR 장비가 아닌 등온 유지가 가능한 항온 수조나 오븐, 온장고 등 저가의 장비에서도 증폭이 가능하며, 장소에 구애받지 않게 됨에 따라 임상진단 실험실과 현장 및 기타 어느 장소에서도 어류질병의 병원체에 대한 진단이 가능한 장점을 가지고 있다.

본 연구에서는 *V. alginolyticus* 의 진단 방법으로 LAMP법을 사용하였다. LAMP법의 최적 반응 온도 결과에서는 $55^{\circ}\text{C} \sim 65.0^{\circ}\text{C}$ 의 범위에서 신장되는 것을 확인하였다. 최단 반응 시간을 측정하기 위해 100분~0분까지 반응 시간을 두고 반응시킨 결과 40분 이상의 반응 뒤에 LAMP의 특이 pattern을 확인할 수 있었다. 최적 반응액 조성에서 dNTP 반응 조건에서는 $400\mu\text{M}$ 에서 $500\mu\text{M}$ 일 때, DNA 신장이 가장 잘 이루어 졌으며 MgSO_4 농도에서는 2mM,에서 6mM일 때 betaine 최적 농도로 1.0M, *Bst* DNA polymerase의 최적 농도로는 8U *Bst*

DNA polymerase 최적 농도로 결정하였다.

최종적으로 최적 반응 온도 63°C 반응 시간 80분, dNTP 400 μ M, MgSO₄ 4 mM, betaine 1.0 M, 8 U *Bst* DNA polymerase 을 최적 조건으로 결정하였다.

최적 조건 확립 후 LAMP 검출법을 적용한 민감도와 특이도 실험결과를 살펴 보면 *V. alginolyticus*와 *Vibrio* 중 7개 비교 실험한 결과 *V. alginolyticus* 만 종 특이적인 검출이되어 특이도가 높은 검출법임을 알 수 있었다. LAMP 검출법과 일반 PCR 법의 민감도를 비교해 본 결과 LAMP 검출법의 *V. alginolyticus* 검출 한계는 10¹ cfu/mL이었으나 일반 PCR의 경우 10² 까지 검출한계 였으므로 LAMP 검출법이 일반 PCR 법 보다 더 높은 검출한계를 가지며 민감도가 100배 정도 더 높은 것을 확인할 수 있었다. 또 소요 시간 PCR 방법의 경우 3시간 이상 소요되지만 LAMP 검출법은 2시간 이내에 신속한 검출이 가능하였다.

따라서 본 연구에서 개발한 LAMP 검출법이 다른 분자생물학적 검출법보다 특이도와 민감도가 매우 높고 신속하고 간편한 진단법으로 실용적인 진단법으로써 잠재적인 가치가 있다고 사료된다.

V. 참고 문헌

Cai S, Lu Y, Wu ZH, Jian J, Wang B, Huang Y. Loop mediated isothermal amplification method for rapid detection of *vibrio alginolyticus*, the causative agent of vibriosis in mariculture fish. Lett Appl Microbiol. 2010;50(5):480-5.

Fall J, Chakraborty G, Kono T, Maeda M, Itami T, Sakai M. Establishment of loop mediated isothermal amplification method (LAMP) for the detection of *vibrio nigripulchritudo* in shrimp. FEMS Microbiol Lett. 2008;288(2):171-7.

Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H, et al. Detection of four plasmodium species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. J Clin Microbiol. 2007;45(8):2521-8.

Han F, Ge B. Quantitative detection of *vibrio vulnificus* in raw oysters by real-time loop-mediated isothermal amplification. Int J Food Microbiol. 2010;142(1):60-6.

Han F, Ge B. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *vibrio vulnificus* in raw oysters. Foodborne pathogens and disease. 2008;5(3):311-20.

Han F, Wang F, Ge B. Detecting potentially virulent *vibrio vulnificus* strains in raw oysters by quantitative loop-mediated isothermal amplification. Appl Environ Microbiol. 2011;77(8):2589-95.

Hara Kudo Y, Yoshino M, Kojima T, Ikedo M. Loop mediated isothermal amplification for the rapid detection of salmonella. FEMS Microbiol Lett. 2006;253(1):155-61.

HE N, LEI Z, LIANG C. Rapid detection of *vibrio cholerae* by loop-mediated isothermal amplification method . China Tropical Medicine. 2009;1:011.

Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, Sawai K, Onoe S, Takahashi Y, et al. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification. Theriogenology. 2004;62(5):887-96.

Horisaka T, Fujita K, Iwata T, Nakadai A, Okatani AT, Horikita T, et al. Sensitive and specific detection of yersinia pseudotuberculosis by loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol. 2004;42(11):5349-52.

Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of mycobacterium tuberculosis complex, M. avium, and M. intracellulare in sputum samples. J Clin Microbiol. 2003;41(6):2616-22.

Kono T, Savan R, Sakai M, Itami T. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. J Virol Methods. 2004;115(1):59.

Kuboki N, Inoue N, Sakurai T, Di Cello F, Grab DJ, Suzuki H, et al. Loop-mediated isothermal amplification for detection of african trypanosomes. J Clin Microbiol. 2003;41(12):5517-24.

Maruyama F, Kenzaka T, Yamaguchi N, Tani K, Nasu M. Detection of bacteria carrying the *stx2* gene by in situ loop-mediated isothermal amplification. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(8):5023-8.

Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of infection and chemotherapy.* 2009;15(2):62-9.

Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes.* 2002;16(3):223-9.

Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, Hase T, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template. *Clin Chem.* 2001;47(9):1742-3.

Nemoto J, Sugawara C, Akahane K, Hashimoto K, Kojima T, Ikedo M, et al. Rapid and specific detection of the thermostable direct hemolysin gene in *vibrio parahaemolyticus* by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Food Protection®.* 2009;72(4):748-54.

Njiru ZK, Mikosza ASJ, Armstrong T, Enyaru JC, Ndung'u JM, Thompson ARC. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *trypanosoma brucei rhodesiense*. *PLoS neglected tropical diseases.* 2008;2(2):e147.

Notomi T. [Loop-mediated isothermal amplification]. *Nihon rinsho, Japanese journal of clinical medicine.* 2007;65(5):957.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(12):e63.

Ohtsuka K, Yanagawa K, Takatori K, Hara-Kudo Y. Detection of salmonella enterica in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of salmonella isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(11):6730-5.

Okada K, Chantaroj S, Taniguchi T, Suzuki Y, Roobthaisong A, Puiprom O, et al. A rapid, simple, and sensitive loop-mediated isothermal amplification method to detect toxigenic vibrio cholerae in rectal swab samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;66(2):135-9.

Parida M, Santhosh S, Dash P, Tripathi N, Saxena P, Ambuj S, et al. Development and evaluation of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and real-time detection of japanese encephalitis virus. *J Clin Microbiol.* 2006;44(11):4172-8.

Saito R, Misawa Y, Moriya K, Koike K, Ubukata K, Okamura N. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of mycoplasma pneumoniae. *J Med Microbiol.* 2005;54(11):1037-41.

Savan R, Igarashi A, Matsuoka S, Sakai M. Sensitive and rapid detection of edwardsiellosis in fish by a loop-mediated isothermal amplification method. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(1):621-4.

Song T, Toma C, Nakasone N, Iwanaga M. Sensitive and rapid detection of shigella and enteroinvasive escherichia coli by a loop mediated isothermal amplification method. FEMS Microbiol Lett. 2006;243(1):259-63.

Srisuk C, Chaivisuthangkura P, Rukpratanporn S, Longyant S, Sridulyakul P, Sithigorngul P. Rapid and sensitive detection of vibrio cholerae by loop mediated isothermal amplification targeted to the gene of outer membrane protein ompW. Lett Appl Microbiol. 2009;50(1):36-42.

Surasilp T, Longyant S, Rukpratanporn S, Sridulyakul P, Sithigorngul P, Chaivisuthangkura P. Rapid and sensitive detection of *vibrio vulnificus* by loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick targeted to rpoS gene. Mol Cell Probes. 2011;25(4):158-63.

Techathuvanan C, Draughon FA, D'Souza DH. Loop Mediated isothermal amplification (LAMP) for the rapid and sensitive detection of *salmonella typhimurium* from pork. J Food Sci. 2010;75(3):M165-72.

Thai HTC, Le MQ, Vuong CD, Parida M, Minekawa H, Notomi T, et al. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. J Clin Microbiol. 2004;42(5):1956-61.

Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. Nature protocols. 2008;3(5):877-82.

Yamazaki W, Ishibashi M, Kawahara R, Inoue K. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *vibrio parahaemolyticus*. BMC microbiology. 2008;8(1):163.

Yamazaki W, Kumeda Y, Misawa N, Nakaguchi Y, Nishibuchi M. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of the tdh and trh genes of *vibrio parahaemolyticus* and related vibrio species. Appl Environ Microbiol. 2010;76(3):820-8.

Yamazaki W, Seto K, Taguchi M, Ishibashi M, Inoue K. Sensitive and rapid detection of cholera toxin-producing vibrio cholerae using a loop-mediated isothermal amplification. BMC microbiology. 2008;8(1):94.

Yeh HY, Shoemaker C, Klesius P. Sensitive and rapid detection of flavobacterium columnare in channel catfish ictalurus punctatus by a loop mediated isothermal amplification method. J Appl Microbiol. 2006;100(5):919-25.

VI. 감사의 글

학위 졸업논문을 쓰면서 지난 2년에 대학원 생활을 돌이켜 보며 끝났다는 후련함과 아쉬움이 교차합니다. 주변 분들의 도움을 받아 이렇게 석사과정을 마치게 되어 감사의 글을 올립니다.

우선 미숙하고 부족함 많은 저에게 많은 격려와 지도를 아끼지 않으신 허 문수 교수님께 감사의 마음을 전합니다. 그리고 바쁘신 가운데서도 논문을 심사해주시고 격려를 아끼지 않으셨던 정 준범 교수님, 이 승헌 교수님께 감사의 말씀을 전합니다. 그리고 많은 가르침을 주신 송 춘복 교수님, 최 광식 교수님, 이 제희 교수님, 전 유진 교수님, 여 인규 교수님, 이 경준 교수님, 김 기영 교수님, 정 석근 교수님, 이 영돈 교수님, 박 상률 교수님께도 진심으로 감사의 말씀을 전합니다.

대학원 생활동안 많은 관심과 격려를 해주신 병규형, 영환이형, 철영이형, 영건이형, 만철이형, 주상이형, 태원이형, 민주누나, 봉근이형, 윤범이형, 선경이누나, 익수형, 용재형, 창영이형, 동민이형, 현식이형에게 진심으로 감사를 전하고, 부족한 선배 밑에서 고생한 민선, 경미, 지운, 지현, 다예, 향실, 민규, 그리고 유학생 하리, 다라니에게도 고맙다는 말을 전합니다.

그리고 의지가 되어준 동기 아름이, 은아, 나래, 민영, 동휘, 대학 생활동안 함께한 선배님, 후배님들에게도 감사의 마음을 전하고 옆에서 항상 응원해준 나의 친구들과 선배님들, 내조의 여왕 이슬이에게도 감사드립니다.

마지막으로 항상 철없는 아들 뒷바라지 하시느라 고생하시는 사랑하는 아버지와 어머니 그리고 가족들에게 이 논문을 바칩니다.