



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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](#)

석사학위논문

넙치에서 분리된 *Acholeplasma
laidlawii*의 배양법 및 LAMP
PCR을 이용한 검출방법 개발

제주대학교 대학원

해양생명과학과

강 선 혜

2017 년 2월

넙치에서 분리된 *Acholeplasma laidlawii*의 배양법 및 LAMP PCR을 이용한 검출방법 개발




지도교수 이 제 희

강 선 혜

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2017年 2月

강선혜의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	<u>완창</u>	
위 원	<u>이 제 희</u>	
위 원	<u>신상필</u>	

제주대학교 대학원

2017년 2월

요약문

*Acholeplasma laidlawii*는 세포벽이 결여된 작은 박테리아인 *Acholeplasmataceae*과, *Acholeplasma* 속으로 분류된다. 비록 그 생물학적 중요성이 확인되지 않았지만, 일부 *Acholeplasma* spp.는 해양생물을 포함한 여러 식물과 동물을 숙주로 하여 서식한다고 보고되어 있다. 지금까지, *Acholeplasma* spp.에 대한 어류에서의 병원성이 보고된 사례가 없으나, *Acholeplasma* spp.에 의한 체포케양 동반 염증반응은 어류도 *A. laidlawii*에 감염되어 유사한 증상을 일으킬 수 있음을 암시한다.

본 연구에서는 *A. laidlawii* 배양에 필요한 최적 배지조성을 탐색하였고, GenBank에 등록된 다른 *Acholeplasma* spp.의 염기서열을 참고하여 제작한 primer를 사용하여 *A. laidlawii*의 16S rDNA 부분 염기서열을 클로닝 하였다. 개발한 PPLO broth 배지에서 *A. laidlawii*를 배양하며 매 6시간 마다 600 nm의 흡광도를 측정하여 성장곡선을 작성하였고, *A. laidlawii* 생장의 정지기가 OD₆₀₀ 값이 약 0.6~0.7정도일 때에 시작되는 것을 확인하였다. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) PCR은 핵산 검출에 있어 간단, 신속할 뿐 아니라, 매우 높은 감도와 특이성을 갖는 분석방법이다. PrimerExplorerV4 software를 사용하여 LAMP PCR을 위한 internal (FIP, BIP), external (F3, B3), 그리고 Loop (LF, LB) primer를 제작한 후, *A. laidlawii* 검출을 위한 conventional 및 LAMP PCR법을 개발하였고, 두 방법 간의 효율을 비교하였다.

Summary

Acholeplasma laidlawii is a small bacterium, categorized into Family *Acholeplasmataceae*, Genus *Acholeplasma* which lacks the cell wall. Even though the biological importance was not revealed, it was reported that some bacteria of *Acholeplasma* spp. habitated in hosts such as plants and animals, including the marine organisms. So far, no case reported about the virulence of *Acholeplasma* spp. infected in fish, but the inflammation accompanying skin ulcer caused by *Acholeplasma* implies that the *A. laidlawii* also may infected into fish, and assumed to cause similar symptoms.

In this study, the media composition for *A. laidlawii* culture was developed, 16S rDNA partial nucleotide sequence was cloned using primers designed from those of the other 11 *Acholeplasma* spp. registered in GenBank database. *A. laidlawii* was cultured in developed PPLO broth media, then, optical density at 600 nm (OD600) was measured at every 6 hours. The acquired growth curve confirmed that the stationary phase began when O.D600 is around 0.6~0.7. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) PCR is a simple, rapid, and highly sensitive and specific technique for detection. The internal (FIP, BIP), external (F3, B3) and Loop (LF, LB) primers for LAMP PCR were designed using PrimerExplorerV4 software. Also, conventional and LAMP PCR methods for detection of *A. laidlawii* were developed, and the efficiency of those methods were compared.

목 차

요약문	i
SUMMARY	ii
목차	iii
표 목차	iv
그림 목차	v
1. 서론	1
2. 실험방법	3
2.1 <i>A. laidlawii</i> 배양조건 탐색 및 생장곡선 확인	3
2.2 Genomic DNA extraction	4
2.3 Primers	4
2.4 16S rDNA Gene partial nucleotide 분리 및 conventional PCR	6
2.5 최적 LAMP PCR 조건 탐색 및 효율 비교	6
3. 실험결과	7
3.1 배양조건 탐색 및 생장곡선 측정	7
3.2 Conventional PCR을 이용한 Primer test	11
3.3 <i>A. laidlawii</i> 16S rDNA Gene partial nucleotide 분리	12
3.4 Gradient PCR을 이용한 LAMP primer test	14
3.5 <i>A. laidlawii</i> 검출을 위한 LAMP PCR 효율 비교	15
4. 결론	17
참고문헌	20
감사의 글	24

표 목차

표 1. *A. laidlawii* 배양 배지 탐색 조건

표 2. *A. laidlawii* 16S rDNA 분리를 위한 primer

표 3. *A. laidlawii* 16S rDNA 검출을 위한 LAMP PCR용 primer

그림 목차

그림 1. *A. laidlawii*의 PPLO Agar plate 배양 결과

그림 2. 두 배양배지 조건에서 얻어진 *A. laidlawii*의 생장곡선

그림 3. 제작한 primer를 이용한 conventional PCR 결과

그림 4. *A. laidlawii*로부터 분리한 16S rDNA nucleotide sequence

그림 5. LAMP PCR용 external primer set을 이용한 gradient PCR 결과

그림 6. *A. laidlawii* 검출을 위한 conventional PCR 결과

그림 7. *A. laidlawii* 검출을 위한 LAMP PCR 결과

1. 서론

국내 최대 양식넙치 생산지인 제주도에서의 양식넙치 생산량 및 폐사량이 매년 비례하여 증가하고 있으며, 그 요인 중, 폐사원인이 불분명한 사례가 2009년에 비해 2015에 약 3배가량 높아진 것으로 나타났다(제주어류양식수협 통계자료). 또한, 출하 가능한 성어크기의 넙치에서도 명확한 원인을 밝힐 수 없는 체표 궤양병으로 인한 폐사가 지속적으로 발생하여 양식 산업에 큰 피해를 주고 있는 상황이다. 이에 따라, 폐사 원인균을 확인하기 위한 연구가 수행되어 그 결과가 보고되었고, 궤양조직으로부터 분리한 미생물이 *Mollicutes* 강(class), *Acholeplasmatales* 목(order), *Acholeplasmataceae* 과(family), *Acholeplasma* 속(genus)의 *Acholeplasma laidlawii* 이었음이 확인되었다(unpublished report).

*A. laidlawii*는 *Acholeplasma* spp.에 속하는 박테리아 중 하나로서, 크기가 0.2 ~ 0.45 μm 정도로 작고 다양하며 세포벽이 없다. 그 동안, 여러 동물 및 식물들로부터의 *A. laidlawii* 감염사례가 보고되어 왔으나(Brown et al., 2011; Helena et al., 2010; Vladislav et al., 2012), 해양생물에서는 2011년, Mud crab으로부터 분리하여, 인위감염실험을 통해 *A. laidlawii*의 병원성을 처음 보고한 이후(Chen et al., 2011), 지금까지 감염사례가 보고된 바 없다.

폐사어로부터의 원인체 검출은 현미경 검경, 배지도말, conventional PCR법을 주로 사용하는데, 최근에는 일반 PCR법보다 더 간편하게 현장에서 검출확인이 가능하게 하는 진단방법을 개발하고 있다. 그 중 POCT(Point of care test)의 일환으로 높은 특이성과 조작성의 간편함 때문에 많이 활용되고 있는 하나인 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) PCR 방법(고리매개 등온증폭법)은 빠른 DNA증폭을 가능하게 하는 간단한 기술이며, 활성화된 중합효소가 일정한 단일온도에서 표적 DNA 특이적인 증폭을 유도한다. LAMP PCR법은 conventional PCR 기법보다 감도가 뛰어나며, 4~6개의 primer를 이용하는데 더 높은 증폭 효율을 위해 loop forward, loop backward primer를 추가로 사용할 수 있다(김 등, 2011; 안 등, 2008). LAMP PCR의 가장 큰 장점으로는 template

denaturation, primer annealing 및 extension의 구별된 단계 및 온도변화가 필요 없이 단일 온도만으로도 반응이 이루어지며, 결과를 신속히 얻을 수 있다는 것이다. 또한, 일반적인 PCR법의 경우, 증폭산물에 대한 추가적인 gel electrophoresis를 수행하여 그 산물을 확인 후 검출 여부를 알 수 있지만, LAMP PCR법의 경우에는 SYBR green이나 hydroxynaphtol blue, SYTO-82와 같은 염색 시료와 지시약을 이용하여 발색정도를 확인함으로써 PCR반응 직후에 검출 여부를 확인할 수도 있다(Abdullah et al., 2014; Barkway et al., 2011; Lenarcic et al., 2014; Mahony et al., 2013; Villari et al., 2013).

병원체를 검출하는 일반적인 PCR법이나 real-time PCR법은 관련기술을 가진 전문 인력과, 고가의 실험장비 및 시약들을 필요로 하며, 검출하기 까지 많은 시간을 소모하게 된다. 반면, LAMP PCR법은 고리매개 등온증폭법으로서, 상대적으로 시약의 가격이 저렴하고 전문적인 기술자나 실험기기가 필요하지 않은 간단한 방법이며, 다른 PCR법에 비해 2배 이상 빨리 그 결과를 확인할 수 있는 이점이 있다. LAMP PCR법은 등온조건에서 이루어지기 때문에 온도를 유지해 줄 수 있는 장치만을 필요로 하고, 어디서든 간편하게 해당 병원체 검출을 할 수 있다.

본 연구에서는 *A. laidlawii* 종의 배양법 및 감염어에서 *A. laidlawii*를 검출할 수 있는 특이성 높은 진단방법을 개발하여 실제 양식현장의 병어에서 검출 여부를 검토하였다. *A. laidlawii*와 같은 *Mollicutes* 강의 미생물인 *Mycoplasma* spp.를 배양하기 위한 상업용 배지는 이미 여러 제품들이 판매되고 있으나, *A. laidlawii*의 배양 특성에는 적합하지 않았을 뿐 아니라, *A. laidlawii*에 적합한 배양조건에 대한 정보가 부족하여, 최적 배지 조건을 탐색하였다. 그리고 *A. laidlawii*에 대한 신속 진단을 위하여, 반응시간이 짧고 특이성이 높은 LAMP PCR법을 개발한 후, conventional PCR 진단법과의 효율을 비교하고 현장진단에 적용시키고자 한다.

2. 실험 방법

2.1. *A. laidlawii* 배양조건 탐색 및 성장곡선 확인

넙치에서 분리된 *A. laidlawii*를 배양, 증식시키기 위한 최적 배지조성을 탐색하기 위하여 Difco™ PPLO Agar(Becton, Dickinson and Company, USA)에 10% Donor horse serum (biowest, France), 그리고 항생제인 Ampicillin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가하거나, 또는 Difco™ PPLO Agar에 20% Donor horse serum 그리고 항생제인 ampicillin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가한 후 *A. laidlawii*의 성장정도를 비교하였다. 제작된 배지에 *A. laidlawii*를 접종하여, 37°C에서 10일간 배양한 뒤, 형성된 단일 colony를 위의 두 조건의 배지에서 PPLO Agar 대신 PPLO broth를 사용한 배지에 넣고 37°C에서 175 rpm으로 교반 배양하였다. 배양액을 spin-down하여 모아진 *A. laidlawii*를 OD₆₀₀=1로 희석한 후, 100 μl 를 새로운 broth 배지 100 ml에 접종, 매 6시간마다 OD₆₀₀ 값을 측정하여 성장곡선을 작성함으로써 배지 조성에 따른 성장차이를 비교하였다.

표 1. *A. laidlawii* 배양 배지 탐색 조건

	조건 1	조건 2
Media	PPLO Broth	PPLO Broth
Serum	10% horse serum	20% horse serum
Antibiotics	Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Ampicillin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

2.2. Genomic DNA extraction

10일 간 배양한 *A. laidlawii* 배양액 2 ml을 13,500 rpm에서 5분 간 원심 분리하여 상등액을 제거한 후, genomic DNA 분리에 사용하였다. Genomic DNA는 Promega사의 Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 분리하였다. 분리된 genomic DNA는 NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, USA)를 사용하여 정량하였고, A260/280 ratio가 1.7 이상인 DNA만을 실험에 사용하였고, 1% agarose gel 상에서 전기영동 하여 단일밴드로 나타난 것을 확인하였다.

2.3. Primers

*A. laidlawii*의 16S rDNA partial nucleotide를 분리하기 위해 GenBank에 등록되어 있는 11종의 *Acholeplasma* spp. 16S rDNA nucleotide 서열들을 참고하여 primer를 구상하였다. Integrated DNA Technologies사의 Oligo Analyzer version 3.1 (<http://sg.idtdna.com/calc/analyzer>)과 Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>)를 이용하여 GC비율 및 melting temperature 등을 확인 후 제작하였다(표 2).

표 2. *A. laidlawii* 16S rDNA 분리를 위한 primer

Primer name	Melting Temperature (°C)	Sequence (5' → 3')
De. Achole 16S Cl F1	60.7	GCGGCGTGCCTAATACATGCAA
De. Achole 16S Cl F2	60.9	GACGGGCGGTGTGTACAAACC
De. Achole 16S Cl R1	60.0	TCCTACGGGAGGCAGCAGTA
De. Achole 16S Cl R2	60.3	CACGACACGAGCTGACGACAAC

A. laidlawii 16S rDNA의 신속진단을 위한 LAMP PCR용 F3, B3, FIP, BIP, LF, LB primer들은 Primer3 및 PrimerExplorer V4 software (<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/>)를 이용하여 melting temperature를 60~65°C 사이로 구성하였다. Melting temperature, GC비율 및 hairpin 구조 등의 quality는 Integrated DNA Technologies OligoAnalyzer version 3.1 software를 사용하여 검증한 후 제작하였다(표 3).

표 3. *A. laidlawii* 16S rDNA 검출을 위한 LAMP PCR용 primer

Primer name	Melting Temperature(°C)	sequence (5' → 3')
Achole LAMP set 1 - F3	59.27	CCTGGAGCGAAACTCACAA
Achole LAMP set 1 - B3	59.44	ACCTTAGACGGCTCCCTC
Achole LAMP set 1 - FIP	69.5	ACCGCAACATGCTGATTTGCGA-CGGATTGGAGTCTGCAACTC
Achole LAMP set 1 - BIP	70.6	TTCTCGGGGTTTGTACACACCG-CTTTCGGGTTAGGCCACC
Achole LAMP set 1 - LF	59.5	TAGCGATTCCGACTTCATGGA
Achole LAMP set 1 - LB	59.19	CCACGAAAGTGGGCAATACC
Achole LAMP set 2 - F3	59.47	GCTTCTCGACTCCATGAAGT
Achole LAMP set 2 - B3	59.45	TCCCGTAGGGATACCTTGTT
Achole LAMP set 2 - FIP	68.4	CGGTGTGTACAAACCCCGAGAA-CGGAATCGCTAGTAATCGCA
Achole LAMP set 2 - BIP	70.6	ACCACGAAAGTGGGCAATACCC-GACCCTACCTTAGACGGCTC
Achole LAMP set 2 - LF	59.4	CGTATTCACCGCAACATGCT
Achole LAMP set 2 - LB	59.84	TGGCCTAACCCGAAAGGG

2.4. 16S rDNA Gene partial nucleotide 분리 및 conventional PCR

A. laidlawii 16S rDNA 분리 및 conventional PCR은 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch TP350 (TaKaRa, Japan)을 이용하여 수행하였다. 순수 분리된 *A. laidlawii*로부터 분리한 genomic DNA를 주형으로 하고, de. achole primer F1과 R1 및 F2와 R2 set를 사용하여 증폭하였다. 분리한 genomic DNA 1 μ l (50 ng/ μ l)를 주형으로 하였고, 5 pmol의 primer와 5 \times HOT FIREPol blend master mix (Solis BioDyne, Estonia)를 사용하여 최종 20 μ l로 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응은 95 $^{\circ}$ C에서 15분 간 pre-denaturation 후, 95 $^{\circ}$ C에 30초 간 denaturation, 58 $^{\circ}$ C에 30초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에 40초 간 extension 과정을 30 cycle 반복하여 수행하였으며 추가로 72 $^{\circ}$ C에서 5분 간 반응하였다. PCR 산물은 Ethidium Bromide (EtBr)을 포함한 1% agarose gel을 이용하여 100 volt에서 30분 간 전기영동하여 증폭된 산물의 크기를 확인하였다. 전기영동으로 확인된 예상크기의 PCR 산물은 Gel & PCR Purification system (BIOFACT, South Korea)으로 용출, TOP clonerTM TA - Blunt Kit (Enzymomics, South Korea)을 사용하여 제조사에서 제시한 방법대로 Cloning한 후, 염기서열 분석을 의뢰했다(GENOTECH, South Korea).

2.5. 최적 LAMP PCR 조건 탐색 및 효율 비교

A. laidlawii 16S rDNA 검출을 위해 제작한 LAMP PCR용 primer의 최적 온도를 확인하기 위하여 두 set의 external primer F3 및 B3를 사용하여 gradient PCR을 수행하였다. Annealing 온도를 50 $^{\circ}$ C, 53 $^{\circ}$ C, 55 $^{\circ}$ C, 58 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C, 그리고 65 $^{\circ}$ C로 설정하였고, 95 $^{\circ}$ C 5분 간 pre-denaturation 후, 95 $^{\circ}$ C에서 30초 간 denaturation, 각 온도조건별로 30초 간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 40초 간 extension을 30회 반복한 후, 72 $^{\circ}$ C에서 2분 간 추가로 반응하였다. 각 PCR 산물들은 1% agarose gel을 이용하여 100 volt에서 30분 간 전기영동하여 증폭된 크기를 확인함으로써 제작한 primer의 최적 annealing 온도 조건을 탐색하였다.

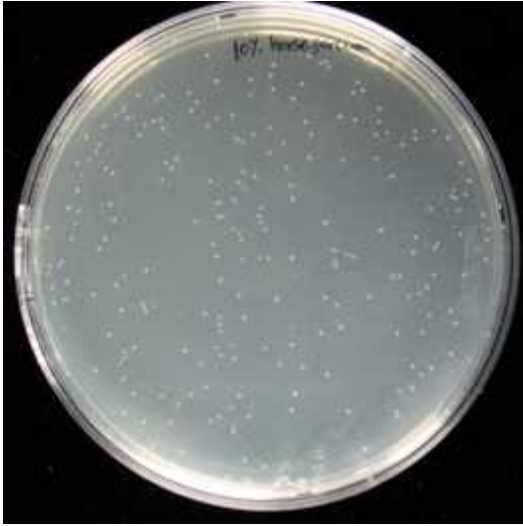
LAMP PCR은 Thermal Cycler Dice Real Time System TP850 (Takara, Japan)를 이용하여 수행하였다. Gradient PCR에서 사용한 것과 동일한 양의 *A. laidlawii* genomic DNA를 주형으로 사용하여 표 3에서 제작한 두 set의 LAMP PCR용 primer에 대한 test를 수행하였으며 최종 20 μ l volume으로 10 μ l의 Isothermal Master Mix (OptiGene, Japan)를 사용하였다. 각 LAMP PCR primer 농도는 선행연구들을 참고하여(Lenarcic et al., 2014; Mahony et al., 2013; Villari et al., 2013) 0.2 μ l(2 pmol)의 External primer (F3, B3), 0.4 μ l (4 pmol)의 Internal primer (FIP, BIP) 그리고 0.2 μ l의 Loop primer (LF, LB)를 사용하였다. PCR 반응은 65 °C에서 30초 간 pre-denaturation 후, 65 °C에서 30분 간 증폭시켰고, 얻어진 PCR 산물을 1% agarose gel에서 100 volt, 30분간 전기영동하여 결과를 확인하였다. 또한, *A. laidlawii* 검출에 있어 conventional 및 LAMP PCR의 효율을 비교하기 위하여 100 ng의 genomic DNA를 단계희석 후, 각각 100, 10, 1, 0.1, 그리고 0.01 ng을 주형으로 사용한 PCR을 수행하였다.

3. 실험결과

3.1. 배양조건 탐색 및 성장곡선 측정

넙치에서 분리, 배양된 균주를 PPLO Agar plate에 10일간 37°C에서 배양하였을 때 원형의 일반적인 세균의 colony 크기보다 작은 크기의 colony를 확인하였다(그림 1). 배양된 colony를 표 1의 조건 1 및 조건 2의 배지 100 ml에 접종 후 매 6시간마다 OD₆₀₀ 값을 측정하여 성장곡선을 그렸을 때 *Vibrio cholerae* 나 *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus mutans* 등에 비해 doubling time이 상대적으로 길었으며, 이는 기존의 보고와도 유사한 결과를 보인 것으로 확인되었다(Raquel et al., 2010; Takenaka et al., 2016; Yang et al., 2012). 6시간 마다 성장곡선 측정하였을 때, 조건 1의 경우 초기 24시간까지는 지연기(Lag phase)로서 큰 변화가 일어나지 않았지만 24시간 이후부터 72시간까지 점차적으로 대수 증식기(Log phase)에 접어들며 OD₆₀₀값이 약 0.6이후 정지기(Stationary phase) 및 사멸기(Death phase)를 보였다. 또한, 36시간부터 48시간까지는 생장이 잠시 둔화되는 양상을 확인하였다(그림 2A). 한편, 조건 2의 배지에서는 특징지을 만한 지연기가 없었으나 54시간까지의 저성장 곡선과 이후 78시간까지의 속성장 곡선을 보이는 대수증식기가 확인되었으며, 78시간 이후부터는 정지기에 접어드는 것으로 나타났다(그림 2B). 다른 배지조건하에서 8일 이상 배양하며 성장곡선을 확인하였지만, 두 조건 모두에서 극적으로 사멸기에 접어드는 것은 확인하지 못했다(Data not shown). 최대 OD₆₀₀값이 조건 1의 경우 0.656, 조건 2의 경우 0.425로서, 시간 및 효율에서 10% horse serum과 100 µg/ml의 ampicillin을 첨가한 PPLO broth 배지가 *A. laidlawii* 배양에 더 나은 것으로 확인되었다.

A



B

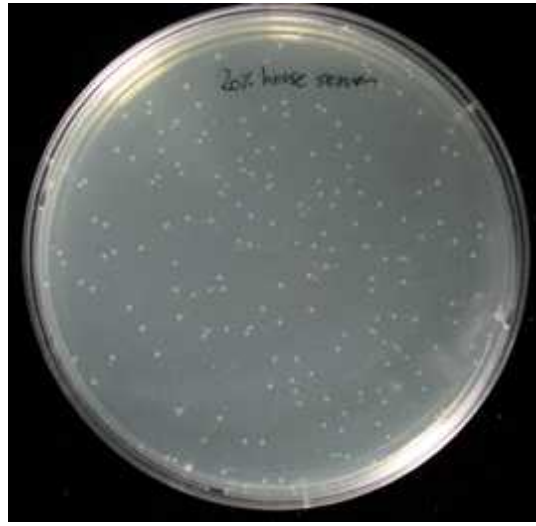
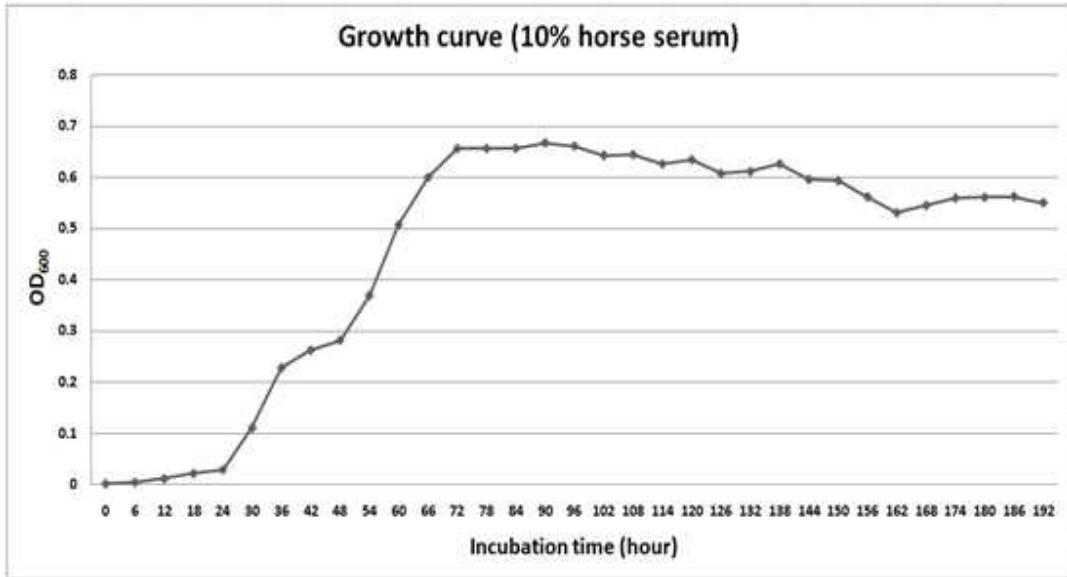


그림 1. *A. laidlawii*의 PPLO Agar plate 배양 결과

A: 조건 1 Agar plate, B: 조건 2 Agar plate *A. laidlawii* spreading 후 37°C에서 10일간 배양하여 얻어진 colony.

A



B

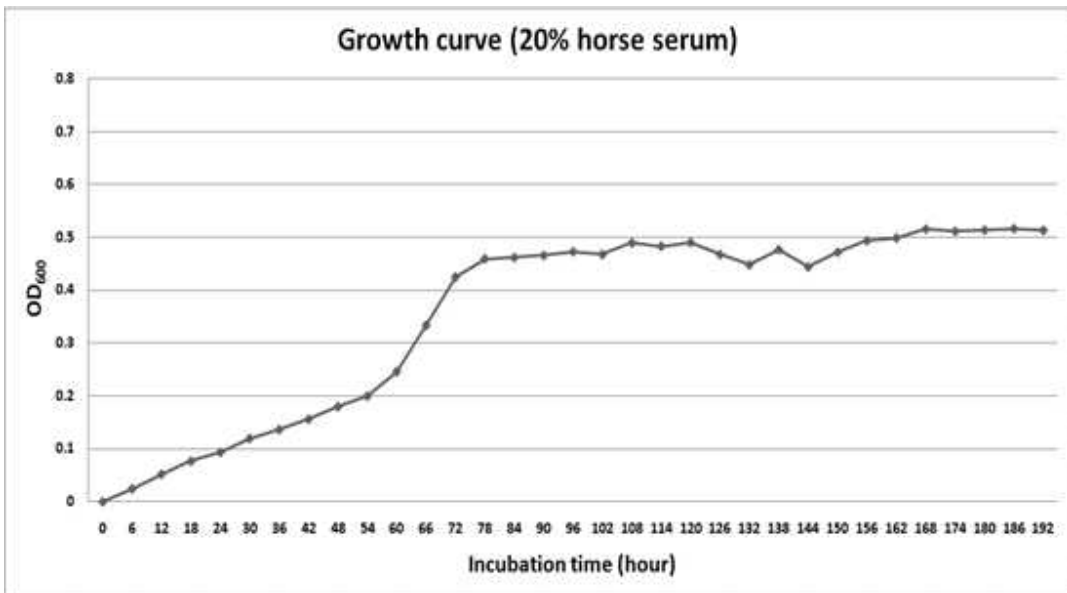


그림 2. 두 배양배지 조건에서 얻어진 *A. laidlawii*의 성장곡선

A : 10% horse serum + Ampicillin, B : 20% horse serum + Ampicillin + Kanamycin. 37°C에서 배양하며 매 6시간 마다 OD₆₀₀값을 측정하여 얻어진 성장곡선.

3.2. Conventional PCR을 이용한 Primer test

표 2의 De. Achole 16S Cl primer를 사용하여 *A. laidlawii*로부터 16S rDNA의 검출이 가능한지를 확인하기 위한 PCR을 수행하였다. 순수 분리된 *A. laidlawii* cell로부터 genomic DNA 추출 후, 제작된 primer의 가능한 모든 조합을 사용하여 PCR 증폭여부를 확인하였다.

PCR 산물의 전기영동 결과, 4가지 조합 모두에서 양호한 산물을 확인할 수 있었으며, de. Achole 16S Cl F1과 R1 primer를 사용한 PCR 산물은 약 1,300 bp 크기로 나타났으며, F2와 R2 primer를 사용한 산물은 약 700 bp, F1과 R2는 약 1,000 bp, 그리고 F2와 R1을 사용한 경우에는 약 1,050 bp의 산물을 확인할 수 있었다 (그림 3). 얻어진 PCR 산물들 중 가장 큰 크기가 확인된 de. Achole 16S Cl F1, R1 primer의 산물은 cloning 후 염기서열 결정에 사용하였다.

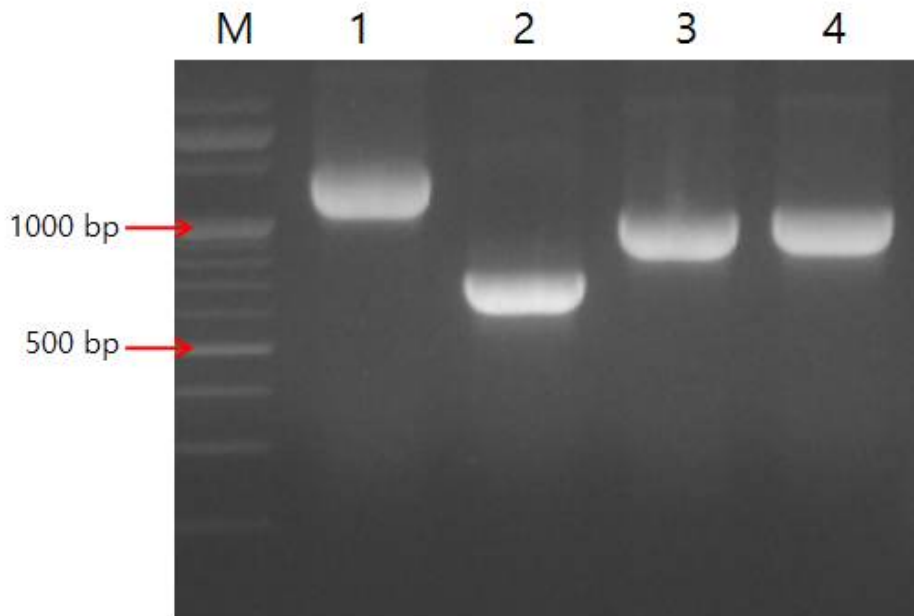


그림 3. 제작한 primer를 이용한 conventional PCR 결과

각 50 ng의 *A. laidlawii* genomic DNA를 주형으로 가능한 모든 조합의 primer set를 사용하여 PCR을 수행하였으며, 4개의 set 모두에서 양호한 PCR 증폭 결과를 확인하였다. lane 1: de. Achole F1과 R1 set, lane 2: de. Achole F2과 R2 set, lane 3: de. Achole F1과 R2 set, lane 4: de. Achole F2과 R1 set, M: 100 bp Marker

3.3. *A. laidlawii* 16S rDNA Gene partial nucleotide 분리

GenBank에 등록되어 있는 *Acholeplasma sp.* 서열들을 참고하여 구상한 primer를 사용하여 *A. laidlawii* 16S rDNA 유전자의 부분서열을 증폭하여 얻어진 PCR 산물을 cloning 후, sequencing하여 GenBank에 등록하였다(Accession no. LC 201977). 얻어진 서열을 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 BLASTN 프로그램으로 비교한 결과, *Acholeplasma laidlawii* strain PG-8A ribosomal RNA gene, complete sequence (GenBank accession no NR 074448.1) 및 *Acholeplasma laidlawii* strain KHS 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (GenBank accession no. JN 935887.1)와 99%의 homology를 갖는 1,392 bp의 *A. laidlawii*의 16S rDNA nucleotide sequence를 확인할 수 있었다(그림 4).

1	GCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTGAACGAAGCATCTTCGGATGCTTAGTGGCGAACGG	60
61	GTGAGTAACACGTAGATAACCTACCTTTAACTCGAGGATAACTCCGGGAAACTGGAGCTA	120
121	ATACTGGATAGGATGTGTGCATGAAAAAACACATTTAAAGATTTATCGGTTTAAAGAGGG	180
181	GTCTGCGGCGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAAGCCTACCAAGACGATGATGCGTAGCC	240
241	GGACTGAGAGGTCTACCGGCCACATTGGGACTGAGAACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGC	300
301	AGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGGGGAAACCCGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGAC	360
361	GAAGTACTTCGGTATGTAAAGTCTTTTTATATGGGAAGAAAAATTAATAATTGACGGTAC	420
421	CATATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCGAG	480
481	CGTTATCCGATTTACTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGTGGTTATAAAAAGTTTGTGGTGTA	540
541	AGTGCAGTGCCTAACGCTGTGAGGCTATGAAAATATATACTAGAGTGAGACAGAGGCA	600
601	AGTGGAATTCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAA	660
661	GGCGGCTTGCTGGGTCTATACTGACACTGATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT	720
721	AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGAACTAAGTGTGGCCAAAAGGTCAGT	780
781	GCTGCAGTTAACGCATTAAGTTCTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTCAA	840
841	AGGAATTGACGGGACCCCGCACAAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGA	900
901	AAAACCTTACCAGGTCTTGACATACTCTGCAAAGGCTTAGAAATAAGTTCGGAGGCTAAC	960
961	AGATGTACAGGTGGTGCACGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC	1020
1021	CGCAACGAGCGCAACCCTTATTGCTAGTTACCATCATTAAAGTTGGGGACTCTAGCGAGAC	1080
1081	TGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACC	1140
1141	TGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGGAACAAAGAGAAGCGATAGGGTGACCTGGAGCG	1200
1201	AAACTCACAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGG	1260
1261	AATCGCTAGTAATCGCAAATCAGCATGTTGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACA	1320
1321	CCGCCCGTC	1329

그림 4. *A. laidlawii*로부터 분리한 16S rDNA nucleotide sequence

배양된 *A. laidlawii*로부터 타 종의 *acholeplasma sp.*에서 구상한 primer를 사용하여 얻어진 PCR 산물의 염기서열은 다른 *acholeplasma*와 최대 99%의 homology를 보였으며, 총 1,329 bp로 확인되었다. 얻어진 서열은 accession number LC 201977로 GenBank에 등록하였다.

3.4. Gradient PCR을 이용한 LAMP primer test

A. laidlawii 검출용 LAMP PCR법 개발을 위해 얻어진 16S rDNA 염기서열로부터 표 3의 primer를 제작한 후, external primer set에 대한 gradient PCR을 수행하여 최적 annealing temperature를 탐색하였다. LAMP PCR primer test를 위해 50 °C, 53 °C, 55 °C 및 58 °C의 annealing temperature로 gradient PCR을 수행한 결과 primer set 1의 경우 50~58°C 조건하에서 거의 동일한 양의 많은 증폭산물이 확인되었다. Primer set2에서는 50~58°C까지의 산물이 확인되었으나, 온도가 높을수록 증폭산물의 양이 감소하였을 뿐 아니라, 가장 많은 증폭산물을 보였던 50°C의 결과도 primer set 1에 비해 증폭산물의 양이 매우 적은 것으로 확인되었다(그림 5). 한편, primer set 1 과 set 2의 경우 모두 60°C 및 65°C에서는 증폭산물이 육안으로 관찰되지 않았다(data not shown).

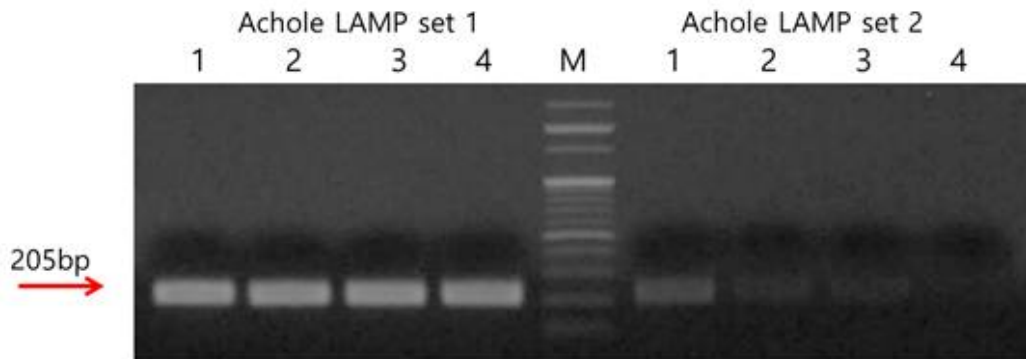


그림 5. LAMP PCR용 external primer set을 이용한 gradient PCR 결과

External primer에 대한 최적 annealing temperature 탐색을 위해 50~58°C의 조건으로 gradient PCR을 수행하였다. Primer set 1의 경우 모든 조건에서 많은 양의 증폭산물이 확인되었으나, primer set 2에서는 높은 온도일수록 산물의 양이 감소하였을 뿐 아니라 set 1 보다 증폭산물의 양이 매우 적은 것으로 확인되었다. Lane 1: 50 °C, lane 2: 53 °C, lane 3: 55 °C, lane 4: 58 °C, M: 100 bp Marker

3.5. *A. laidlawii* 검출을 위한 LAMP PCR 효율 비교

개발한 LAMP PCR법의 *A. laidlawii* 검출 효율을 평가하기 위하여 conventional PCR법과 증폭산물의 양을 비교하였다. 또한 최저 검출한계치 확인을 위해 주형의 양을 달리하여 PCR을 수행한 후, 그 산물을 확인하였다. 분리한 *A. laidlawii* genomic DNA를 serial dilution하여 각각 100, 10, 1, 0.1 그리고 0.01 ng을 PCR 반응의 주형으로 사용함으로 검출의 최저 한계치를 확인하였다. 더불어, *A. laidlawii*에 특이적인 conventional PCR (그림 6) 및 LAMP PCR (그림 7)을 수행한 후 전기영동하여 두 결과를 비교함으로 개발한 LAMP PCR법의 검출 효율을 검증하였다. Conventional PCR 결과, 100 및 10 ng을 주형으로 사용한 결과에서 증폭된 산물을 확인할 수 있었으나 1~0.01 ng을 주형으로 사용한 결과에서는 육안으로 증폭산물을 확인할 수 없었다(그림 6.). 한편, LAMP PCR 결과에서는 100~1 ng까지 증폭산물을 쉽게 육안으로 확인할 수 있었으며, 산물의 양도 conventional PCR보다 월등히 많은 것으로 확인되었다(그림 7). 이러한 결과를 바탕으로 볼 때, *A. laidlawii* 검출을 위해 LAMP PCR 법을 적용하는 것이 감도 및 소요시간 면에서 유리할 것으로 판단되었다.

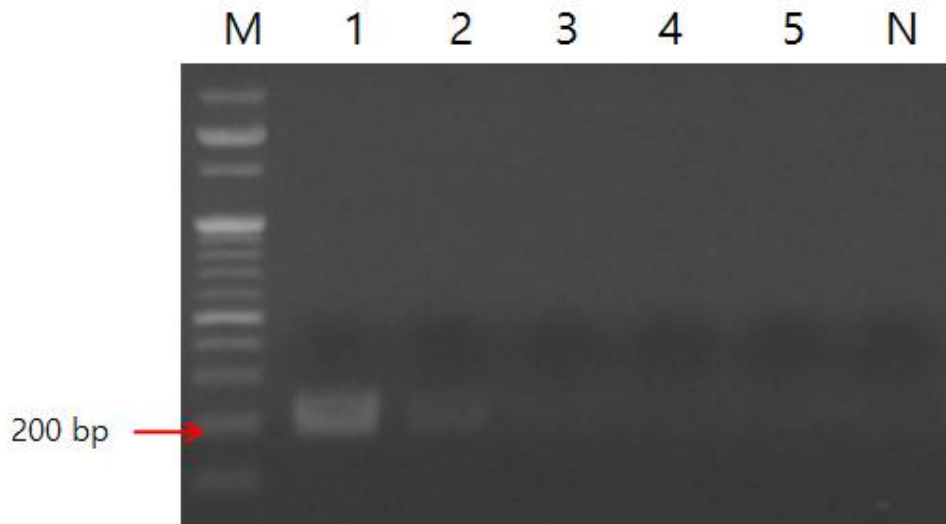


그림 6. *A. laidlawii* 검출을 위한 conventional PCR 결과

A. laidlawii 16S rDNA 특이적 primer를 사용하여 주형의 농도별 conventional PCR 반응을 수행하였다. 주형량 100 ng 및 10 ng에서 증폭산물을 확인할 수 있었으나 그 이하의 농도에서는 육안으로 확인할 수 없었다. Lane 1: gDNA 100 ng, lane 2: gDNA 10 ng, lane 3: gDNA 1 ng, lane 4: gDNA 0.1 ng, lane 5: gDNA 0.01 ng, N: Negative control (D.W)

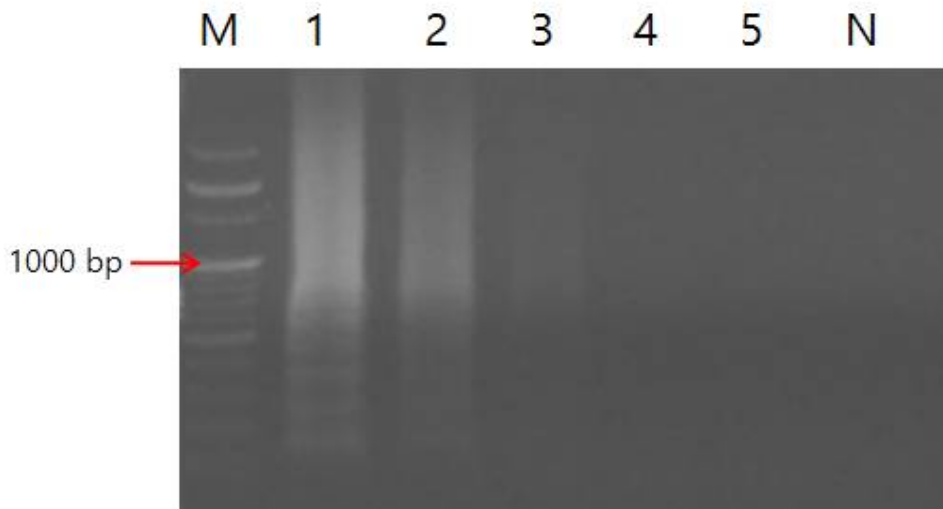


그림 7. *A. laidlawii* 검출을 위한 LAMP PCR 결과

제작한 primer로 LAMP PCR을 수행한 결과. 제작한 LAMP PCR용 primer를 사용하여 주형의 양을 달리한 농도별 LAMP PCR 반응을 수행하였다. 주형량 100~1 ng까지 쉽게 증폭산물이 확인되었으며, 1000 bp 이하에서 LAMP PCR의 특징인 ladder링 현상이 확인되었다. Lane 1: gDNA 100 ng, lane 2: gDNA 10 ng, lane 3: gDNA 1 ng, lane 4: gDNA 0.1 ng, lane 5: gDNA 0.01 ng, lane N: Negative control (D.W)

4. 고 찰

최근 제주도내 양식장의 넙치 성어에서 원인불명의 체표궤양 및 폐사가 발생하여 많은 경제적인 피해가 일어나고 있다. 기본적인 검사를 통해서 원인균이 확인되지 않은 병어에서 공통적인 원인 미생물로 *Acholeplasma* 종이 추정되는 사례가 증가하고 있는 상황이다. *A. laidlawii*는 세포벽이 없으며, 크기가 다양한 박테리아로 일반적으로 병어에서 검출되는 세균들 보다 상대적으로 오랜 배양시간이 필요하다. 병원성을 가지고 있으며(Chen et al., 2011) 항생제 내성 시험을 통해서 Ampicillin과 Kanamycin등에 내성을 가지고 있는 것을 확인하였다(unpublished data). *A. laidlawii* 감염의심 증상으로는 체표의 궤양 형성 및 근위축 그리고 적혈구 응집반응 등이 있다. 그동안 해양생물에서는 보고된바 있지만 어류에서는 *Acholeplasma* spp.가 보고되지 않았다.

병어에서 질병 진단 시 기본적으로 현미경 및 배지 그리고 PCR 기법을 주로 사용하는데 최근에는 전문적이고 어려운 진단기법에서 벗어나 진단시간을 단축하고 손쉬운 진단법을 이용해서 진단키트를 개발하는 추세다.

LAMP PCR법은 *Bst* polymerase를 사용하여 온도에 따른 변성을 거치지 않고 등온에서 접합, 신장이 수행되어 증폭이 일어나며 주로 4~6개의 primer를 사용해서 대상 종에 대한 PCR 특이성을 높일 수 있는 장점이 있다. 등온을 유지하면 DNA 증폭이 가능하기 때문에 고가의 PCR기기 없이 water bath와 heat block등 등온 유지 장치만 있으면 검출이 가능하다. 형광 dye를 사용할 경우 검출 결과를 육안으로도 확인 가능하기 때문에 현장에서도 즉석에서 사용이 가능하며 최근, 현장에서의 LAMP PCR 진단법 적용사례가 늘어나고 있다.

본 연구에서는 넙치에서 분리된 *A. laidlawii*의 genomic DNA에 대하여 분자계통분류방법에 널리 사용되고 있는 16S rDNA를 대상으로 하여(Woese et al., 1990; Woo et al., 2008) 그 부분서열을 분리하였고, sequencing 후 종 동정을 진행하였으며, *A. laidlawii* 배양에 최적화된 배지 조건을 탐색하였다. *Acholeplasma*는 분류학적으로 최근까지도 *Mycoplasma* 속(genus)에 포함시켜

연구 되었듯이, 둘 간의 유연관계가 매우 높다(Weisburg et al., 1989). 따라서, *A. laidlawii* 배양에 최적화된 배지 조성 탐색을 위해 *Mycoplasma* spp.를 배양할 수 있는 PPLO 배지에 10% 및 20% horse serum, ampicillin 그리고 kanamycin을 첨가하여 성장률을 비교하였고, 10% horse serum과 ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가 후 배양하는 것이 ampicillin에 내성이 없는 세균을 저해할 수 있고, *A. laidlawii*의 성장을 촉진시키는 데에 효과적임을 확인하였다(표 1, 그림 1, 2). 두 배양배지 조건하에서 얻어진 성장곡선을 확인한 결과, *A. laidlawii*와 가까운 유연관계에 있는 *Mycoplasma genitalium*의 성장곡선을 확인한 일부 연구결과와 비교해 볼 때, 정지기까지의 OD₆₀₀ 값이 상대적으로 낮은 것을 확인할 수 있었다(Ueno et al., 2008). 한편, 10% horse serum을 첨가한 배지에서는 대수증식기에 한 차례 생장이 둔화되는 양상을 확인하였으며(그림 2A), 이는 추가 실험을 통해 배지 조성과의 연관성이 있는지를 밝혀야 할 것으로 판단된다. 또한 두 배지조건 모두에서 정지기 이후에 뚜렷한 사멸기로 접어드는 것이 확인되지 않았는데, 이러한 결과는 분류학적으로 가까운 *Mycoplasma genitalium* 및 *Mycoplasma pneumoniae*은 물론, *streptococcus pneumoniae* 등의 세균이 정지기 이후 신속한 사멸기로 접어드는 것과 비교해 보았을 때 다른 양상을 보이는 결과라 할 수 있다(Furness et al., 2016; Sham et al., 2013; Ueno et al., 2008;). 분리된 16S rDNA의 부분 염기서열을 확인한 결과, 다른 종의 16S rDNA와 높은 homology를 보임으로, *A. laidlawii*의 rDNA 역시 진화적으로 잘 보존되어 있음을 확인하였다(그림 4). 병원체를 진단하는 방법으로는 면역크로마토그래피 기반의 진단키트를 사용하는 방법이 있으나, 진단이 가능한 대상 병원체의 범위가 제한적이어서 많이 사용되고 있지 않는 실정이며, 다양한 종에 대해 진단이 가능하며 상대적으로 쉽게 진단법을 적용할 수 있는 일반 PCR, Real-time PCR, LAMP PCR 등이 활용되고 있다.(Eibach et al., 2016; Miller et al., 2016; Stratakos et al., 2016) 본 연구에서는 *A. laidlawii* 종을 진단하기 위해 conventional PCR 및 LAMP PCR을 이용한 진단법을 개발하고 conventional PCR 기법과 LAMP PCR 기법의 검출 한계치를 비교하였다(그림 7). 실험결과, conventional PCR기법의 검출한계는 10 ng, LAMP PCR 기법의 검출 한계치는 1 ng 이상인 것으로 확인되었으며, 기존의 연구결과와 같이 LAMP PCR의 감도가 conventional PCR보다

높은 것으로 확인되었다(Barkway 2011;). 하지만, 어류의 조직에 감염되어 있는 *A. laidlawii*를 검출하기 위한 실험은 진행하지 못하였기에, 개발한 LAMP PCR 법에 대한 현장적용을 위해서는 폐사어 및 감염 추정 어류에서부터의 진단 가능성을 먼저 확인해야 할 것이다. Conventional PCR의 경우 2시간 30분, LAMP PCR의 경우 30분이 소요되기 때문에 LAMP PCR을 수행할 경우 시간 단축의 이점이 있음과 동시에 만약 어류조직에서의 검출을 확인할 수 있으면, 현장에서 적용이 가능할 것으로 판단되었다. 이후에 추가적으로 형광 dye를 이용해서 LAMP PCR을 수행하였을 때 동일한 결과를 얻을 수 있을지 검증한 이후 현장에서 *A. laidlawii*에 의한 폐사가 의심되었을 때 이 진단법을 이용해서 신속, 간편하게 질병의 진단이 가능할 것이다. 추후 *Acholeplasma* sp. 외에도 다양한 양식어류에 심각한 피해를 야기할 수 있는 병원균에 대한 LAMP PCR 진단법을 개발하는 데에 본 연구 결과는 참고 및 활용 가능성이 높을 것으로 판단된다.

참고문헌

- Barkway C.P., Pocock R.L., Vrba V., Blake D.P. 2011. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the species-specific detection of *Eimeria* that infect chickens. *BMC Veterinary Research*. 7(1), 67-74.
- Chen J.G., Lou D., Yang J.F. 2011. Isolation and Identification of *Acholeplasma* sp. From the Mud Crab, *Scylla serrate*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011, 209406.
- Chernov V.M., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., Medvedeva E.S., Grygorieva T.Y., Trushin M.V., Vishnyakov I.E., Sabantsev A.V., Borchsenius S.N., Chernova O.A. 2014. Extracellular membrane vesicles secreted by mycoplasma *Acholeplasma laidlawii* PG8 are enriched in virulence proteins. *Journal of Proteomics*. 110, 117-128.
- Cook J., Aydin-Schmidt B., González I.J., Bell D., Edlund E., Nassor M.H., Msellem M., Ali A., Abass A.K., Mårtensson A., Björkman A. 2015. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for point-of-care detection of asymptomatic low-density malaria parasite carriers in Zanzibar. *Malaria Journal*. 14(1), 43.
- Eibach D., Krumkamp R., Hahn A., Sarpong N., Adu-Sarkodie Y., Leva A., Käismaier J., Panning M., May J., Tannich E. 2016. Application of a Multiplex PCR assay for the detection of gastrointestinal pathogens in a rural African setting. *BMC Infectious Diseases*. 16(1), 150.
- Francis-Floyd R., Reed P., Gibbs P., Shotts E., Bolon B., Coleman W., Klinger R. 2011. Isolation of *Acholeplasma laidlawii* from Centrarchids in a Central Florida Lake. *Journal of Aquatic Animal Health*. 10(3), 252-258.
- Furness G., Pipes F.J., McMurtrey M.J. 1968. Analysis of the Life Cycle of *Mycoplasma pneumoniae* by Synchronized Division and by Ultraviolet and X Irradiations. *Journal of Infectious Diseases*. 118(1), 7-13.

- He Y., Xu T., Fossheim L.E., Zhang X.H. 2012. FliC, a Flagellin Protein, Is Essential for the Growth and Virulence of Fish Pathogen *Edwardsiella tarda*. PLoS ONE 7(9), e45070.
- Kirchhoff H., Beyene P., Fischer M., Flossdorf J., Heitmann J., Khattab B., Lopatta D., Rosengarten R., Seidel G., Yousef C. 1987. *Mycoplasma mobile* sp. Nov., a new species from fish. International Journal of Systematic Bacteriology. 37(3), 192-197.
- Lenarčič R., Morisset D., Pirc M., Llop P., Ravnikar M., Dreo T. 2014. Loop-Mediated Isothermal Amplification of Specific Endoglucanase Gene Sequence for Detection of the Bacterial Wilt Pathogen *Ralstonia solanacearum*. PLoS ONE9(4), e96027.
- Loseva N.L., Gordon L.K., Alybyev A.Ju., Andreyeva I.N., Kolesnikov O.A., Chermov V.M., Ponomareva A., Kemp R.B. 2004. Effect of induced changes in membrane permeability on the defence response of *Chlorella Vulgaris* to infection by *Acholeplasma laidlawii*. Thermochemica Acta 422, 95-100.
- Loseva N.L., Gordon L.K., Minibayeva F.V., Alyabyev A.Ju., Chernov V.M., Chernova O.A., Andreyeva I.N., Rachimova G.G., Tribunskih V.I., Estrina R.I., Gogolev Ju.B., Kemp R.B. 2002. Direct and indirect calorimetric studies of stress responses of chlorella cells to infection with the mycoplasma, *Acholeplasma laidlawii*. Thermochemica Acta. 390, 39-46.
- Mahony J., Chong S., Bulir D., Ruyter A., Mwawasi K., Waltho D. 2013. Development of a Sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay That Provides Specimen-to-Result Diagnosis of Respiratory Syncytial Virus Infection in 30 Minutes. Journal of Clinical Microbiology. 51(8), 2696-2701.
- Martinez R.M., Megli C.J., Taylor R.K. 2010. Growth and Laboratory Maintenance of *Vibrio cholerae*. Current Protocols in Microbiology. Current Protocols in Microbiology. unit 6A.1

- Miller S., Masuya H., Zhang J., Walsh E., Zhang N. 2016. Real-Time PCR Detection of Dogwood Anthracnose Fungus in Historical Herbarium Specimens from Asia. *PLoS One*. 11(4), e0154030.
- Pollack J.D. 1978. Differentiation of *Mycoplasma* and *Acholeplasma*. *International Journal of Systematic bacteriology*. 28(3), 425-426.
- Sham L.T., Jensen K.R., Bruce K.E., Winkler M.E. 2013. Involvement of FtsE ATPase and FtsX Extracellular Loops 1 and 2 in FtsEX-PcsB Complex Function in Cell Division of *Streptococcus pneumoniae* D39. *mBio*. 4(4), e00431-13.
- Stratakos A.C., Linton M., Millington S., Grant I.R. 2016. A loop-mediated isothermal amplification method for rapid direct detection and differentiation of non-pathogenic and verocytotoxigenic *Escherichia coli* in beef and bovine faeces. *Journal of Applied Microbiology*. 121(6),
- Takenaka S., Oda M., Domon H., Ohsumi T., Suzuki Y., Ohshima H., Yamamoto H., Terao Y., Noiri Y. 2016. Vizantin inhibits bacterial adhesion without affecting bacterial growth and causes *Streptococcus mutans* biofilm to detach by altering its internal architecture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 480(2), 173-179.
- Ueno P.M., Timenetsky J., Centonze V.E., Wewer J.J., Cagle M., Stein M.A., Krishnan M., Baseman J.B. 2008. Interaction of *Mycoplasma genitalium* with host cells: evidence for nuclear localization. *Microbiology*. 154, 3033-3041.
- Villari C., Tomlinson J.A., Battisti A., Boonham N., Capretti P., Faccoli M. 2013. Use of Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of *Ophiostoma clavatum*, the Primary Blue Stain Fungus Associated with *Ips acuminatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(8), 2527-2533.
- Watts M.R., James G., Sultana Y., Ginn A.N., Outhred A.C., Kong F., Verweij J.J., Iredell J.R., Chen S.C., Lee R. 2014. A Loop-Mediated Isothermal

- Amplification (LAMP) Assay for *Strongyloides stercoralis* in Stool That Uses a Visual Detection Method with SYTO-82 Fluorescent Dye. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 90(2), 306-311.
- Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87(12), 4576-4579.
- Woo P.C., Lau S.K., Teng J.L., Tse H., Yuen K.Y. 2008. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*. 14(10), 908-934.
- Weisburg W.G., Tully J.G., Rose D.L., Petzel J.P., Oyaizu H., Yang D., Mandelco L., Sechrest J., Lawrence T.G., Van Etten J., Maniloff J., Woese C. R. 1998. A Phylogenetic Analysis of the *Mycoplasma*: Basis for Their Classification. *Journal of Bacteriology*. 171(12), 6455-6467.
- 김정구, 노지나, 박동석, 윤병수. 2011. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)법을 이용한 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*의 신속 진단법 개발. *미생물학회지*. 47(1), 103-109
- 김은미, 전효성, 김지정, 김희정, 신연경, 송재영, 여상건, 박최규. 2015. 등온증폭법을 이용한 폐지인플루엔자바이러스 신속 진단법 개발. *Korean Journal of Veterinary Service*. 38(2), 107-116.
- 안영창, 남윤형, 박수민, 조민호, 서재원, 윤일규, 박용형, 장원철. 2008. 등온 증폭법을 이용한 결핵균의 빠른 검출 시스템 개발. *Journal of the Korean Chemical Society*. 52(3), 273-280.
- 안영창, 조민호, 윤일규, 정덕현, 이은영, 김진호, 장원철. 2010. 등온증폭법과 Real-time PCR을 이용한 *Salmonella* 검출. *Journal of the Korean Chemical Society*. 54(2), 215-221.
- 조애리, 동희진, 조성범. 2013. 오리 도체에서 등온유전자증폭기법을 이용한 *Salmonella* spp. 신속 고감도 검출 기법 연구. *Korean Society for Food Science of Animal Resources*. 33(5), 655-663.

감사의 글

2015년부터 석사과정 2년간 여러모로 지도해주시고 보듬어주신 이제희 교수님께 감사드립니다. 제주대학교 해양생명과학과에서 학부 때부터 많은 것들을 가르쳐주신 송춘복 교수님, 최광식 교수님, 전유진 교수님, 김기영 교수님, 여인규 교수님, 이경준 교수님, 허문수 교수님, 정준범 교수님, 이승헌 교수님, 정석근 교수님, 박상률 교수님, 이영돈 교수님께 감사드립니다. 그리고 acholeplasma의 연구를 위해 도움을 주신 강봉조 박사님과 윤원준 대표님께도 감사인사를 드립니다.

자주 보지는 못했지만 2년 동안 같은 실험실에서 지내며 도움을 줬던 Sanjaya, 영어로 인해 언어의 장벽을 함께 느껴줬던 Thiunuwan, 멀리 있었지만 항상 관심을 주셨던 민영언니와 숙경언니, 학부 졸업에 전적인 도움을 줬던 성도오빠, 항상 유쾌한 완창 박사님, 천사같은 은영언니와 다정했던 지연언니 그리고 석사동기인 Nadee, Sachith에게도 감사하다는 말을 하고 싶습니다. 항상 만날 때 마다 조언과 격려를 해주시는 철홍오빠, 영득오빠께도 감사드립니다.

그동안 수산백신연구센터에서 지내는 동안 정말 많은 것을 배울 수 있었습니다. 배우는 동안 이해부족과 모든 것에서 모자랐던 저를 가르쳐 주시느라 2년 내내 답답함과 화병으로 많이 힘드셨을 임봉수 박사님, 들어왔을 때부터 저의 부족함에 심각한 편두통을 매일매일 앓으셨지만 꼭 참고 석사과정동안 많은 실험을 가르쳐 주시고 항상 제 편에서 생각해주시며 박사님이 자주 사용하시는 “각다구”라는 단어처럼 이리저리 날뛰고 장난을 치고 있을때도 매번 당황하긴 하시지만 웃어주신 정형복 박사님, 현장에 대해 많은 것을 알려주신 진창남 박사님, 임창용 선생님, 박진주 선생님, 지금은 스리랑카로 돌아갔지만 자주 전화해주고 스리랑카 말을 배우고 싶게 해주는 Viraj 오빠님, 너무 성격이 다르다보니 진짜 정말 많이 싸우고 욕하고 했지만 생각보다 많이 의지했던 정인이도..... 앞으로 하극상이 뭔지를 보여줄게? 주구장창 한번 잘 싸워보자..ㅋㅋ 모두 감사하고 고맙고 사랑합니다.

마지막으로 수능이후부터 제주도에 올 때부터 제가 원하는 대로 하게 도와주신 부모님과 언니, 외할머니, 외할아버지께도 감사인사를 드립니다. 알라뵤!!