

## 몇가지 과수병원성세균의 특이배렬검출 프라이머에 대한 연구

김광철, 리원진

경애하는 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《우리 나라 기후풍토에 적응된 키낮은 과일나무들을 육종하고 선진묘목생산기술을 연구개발하며 다수확재배기술체계를 확립하고 자체로 여러가지 농약과 생물학적병해충구제 기술을 적극 개발도입하여야 합니다.》

과일나무에 병이 발생하면 인차 다른 나무로 퍼져 피해를 주기때문에 병을 제때에 정확히 진단하고 그에 따르는 대책을 미리 세우는것은 과일생산과 질을 높이기 위한 중요한 담보로 된다. 지난 시기 과수병원균에 대한 진단은 주로 증상판단으로 진행되었고 최근에면역학적원리에 기초한 진단방법으로 진단의 신속성과 과학성이 개선[2]되었으나 여전히 제한성이 있다.

우리는 게놈배렬자료를 리용하여 주요과수병원성세균들에 대한 정확한 배렬분석을 한 데 기초하여 PCR기술[1, 4]로 과일나무에 피해를 주는 병원성세균들에 대한 검사를 유전자수준에서 정확히 하기 위한 특이배렬검출프라이머에 대한 연구를 하였다.

### 재료와 방법

DNA분리를 위한 재료로는 주요과수병원성세균들인 *Clavibacter michiganensis*, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas syringae*들을 리용하였다.

DNA증폭효소로는 *Taq* DNA폴리메라제(《Takara》)를 리용하였다. DNA분자크기표식자료는 DL2000 DNA Ladder(《MBI Fermentas》)를 리용하였다.

프라이머설계는 생명정보자료기지(2018년)와 DNASTAR소프트웨어를 리용하여 진행하였다. 세균으로부터 게놈DNA의 분리정제는 선행방법[3]에 준하여 진행하였으며 PCR조작은 선행방법[5]으로 하였다. 폴리아크릴아미드겔전기영동후 증폭산물들의 검사는 에티디움브로미드염색법으로 진행하였다.

### 결과 및 논의

#### 1) 병원성세균검출을 위한 프라이머설계

PCR로 주요과수병원성세균들을 특이적으로 검출하기 위한 표적배렬로서 16S rRNA배렬을 주목하고 4종의 세균들을 검출하기 위한 프라이머를 설계하였다. 중요한것은 프라이머조들이 같은 반응조건에서 증폭에 참가할수 있게  $T_m$ 값이 비교적 일치되어야 하며 또한 검출되는 증폭산물들이 일정하게 차이ना야 한다는것이다.

우선 자료기지에서부터 4개 속 병원성세균들의 16S rRNA배렬들을 수집하고 각각 정렬시켜 일치성배렬들을 얻었다.

매 병원성세균들의 16S rRNA유전자배렬들의 상동성을 비교한 결과 배렬의 거의 모든

구간에서 서로 불일치성을 나타냈다. 그러므로 우리는 임의의 배열구간을 취하여도 매 병원성세균에 특이적인 프라이머배열을 설계할수 있다고 보았다.

PCR프라이머는 보통 GC함량이 40~60%이고 55~65°C범위의 아닐링온도를 가진 길이가 18~22nt인 배열이다. 이러한 인자들은 호상 연관되어있으며 따라서 프라이머설계소프트웨어에서 요구되는  $T_m$ 을 선택하여 다른 파라미터들을 알수 있다.

PCR를 위한 프라이머설계에서는 같은 반응조건에서 증폭될수 있도록 증폭하려는 매 표적배열들의 프라이머들의 아닐링온도를 비교적 일치시키는것은 물론 검출에 유리하게 증폭산물들의 크기를 일정하게 차이나도록 하는것이 중요하다. 또한 PCR에서 일반적으로 나타나는 프라이머2량체와 머리핀구조형성을 최대한 감소시킬수 있도록 프라이머를 설계하는것이 중요하다.

우리는 위의 조건들에 부합되도록 소프트웨어 DNASTar를 리용하여 병원성세균들을 PCR로 검출하기 위한 프라이머들을 설계하였다.(표)

표. 설계한 프라이머배열과 특성값

균종	프라이머 이름	프라이머배열(5'→3')	염기수 /개	$T_m/^\circ\text{C}$	증폭산물 크기/bp
<i>C. michiganensis</i>	Pcom-F	GATTAGATACCCTGGTAGTCC	21	60.54	187
	Pcla-R	GAATTAATCCGCATGCTCCG	20	60.57	
<i>R. solanacearum</i>	Pcom-F	GATTAGATACCCTGGTAGTCC	21	60.54	233
	Pral-R	GCATCTCTGCTTCGTTAGTGG	21	60.45	
<i>E. herbicola</i>	Pcom-F	GATTAGATACCCTGGTAGTCC	21	60.54	273
	Perw-R	CCATGCAGCACCTGTC	16	59.67	
<i>P. syringae</i>	Pcom-F	GATTAGATACCCTGGTAGTCC	21	60.54	438
	Ppse-R	AGGCCCGGACACTCAAGAACTCG	24	58.38	

설계한 모든 프라이머배열들의 다중정렬결과는 가능한 모든 표적배열들과 상보적이라는것을 보여주었다.

## 2) 병원성세균DNA검출조건의 수립

과수병원성세균DNA와 특이적인 배열검출프라이머들을 리용하여 PCR로 검출하기 위한 실험을 하였다. PCR조건은 다음과 같다.

예비변성 95°C 5min→변성 95°C 30s, 아닐링 60°C 45s, 연장 72°C 1min, 30회 순환→  
→최종연장 72°C 10min→4°C 보관→전기영동

반응체적을 20μL로 하고 여기에 주형DNA를 50ng, 프라이머액을 각각 5pmol씩 첨가하여 아닐링온도 60°C에서 4종류의 프라이머를 리용한 특이PCR를 진행한 다음 폴리아크릴아미드겔전기영동을 하였다.

먼저 *C. michiganensis*로부터 분리정제한 DNA를 주형으로 하고 *C. michiganensis*특이의 프라이머를 리용하여 PCR를 진행하였을 때 예상한대로 187bp의 증폭산물이 얻어졌으며 다른 세균DNA들로부터는 그 어떤 증폭산물때도 관찰되지 않았다.(그림 1)

다음으로 *R. solanacearum*으로부터 분리정제한 DNA를 주형으로 하고 *Ralstonia*특이의 프라이머를 리용하여 증폭반응을 진행하였을 때 예상되는 233bp의 증폭산물이 얻어졌으며 다른 세균DNA들로부터는 그 어떤 증폭산물때도 관찰되지 않았다.(그림 2)

또한 *E. herbicola*로부터 분리정제한 DNA를 주형으로 하고 *Erwinia*세균특이의 프라이머를 리용하여 증폭반응을 진행하였을 때 예상되는 273bp의 증폭산물이 얻어졌으며 다른

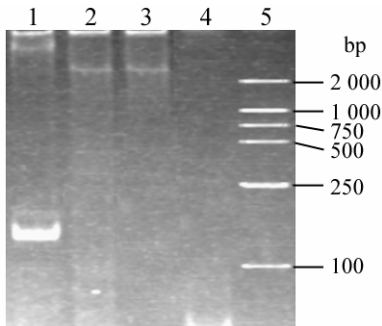


그림 1. *C. michiganensis* DNA를 리용한  
PCR산물의 전기영동상

1—*C. michiganensis* DNA, 2—*R. solanacearum* DNA, 3—*E. herbicola* DNA, 4—*P. syringae* DNA,  
5—분자크기표식자(DL2000)

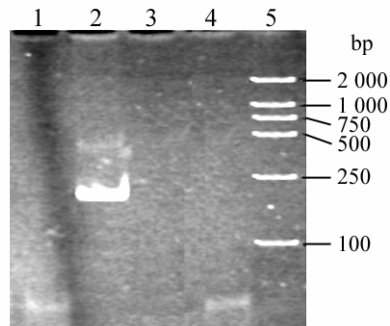


그림 2. *R. solanacearum* DNA를 리용한  
PCR산물의 전기영동상

1—*C. michiganensis* DNA, 2—*R. solanacearum* DNA, 3—*E. herbicola* DNA, 4—*P. syringae* DNA,  
5—분자크기표식자(DL2000)

세균DNA들로부터는 그 어떤 증폭산물떠도 관찰되지 않았다.(그림 3)

또한 *P. syringae*로부터 분리정제한 DNA를 주형으로 하고 *P. syringae*특이의 프라이머를 리용하여 증폭반응을 진행하였을 때 예상되는 438bp의 증폭산물이 얻어졌으며 다른 세균DNA들로부터는 그 어떤 증폭산물떠도 관찰되지 않았다.(그림 4)

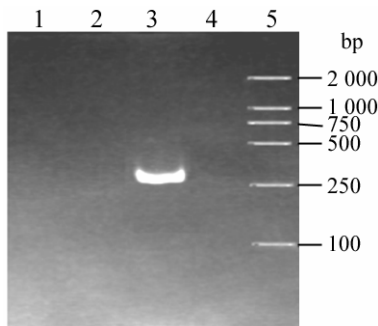


그림 3. *E. herbicola* DNA를 리용한  
PCR산물의 전기영동상

1—*C. michiganensis* DNA, 2—*R. solanacearum* DNA, 3—*E. herbicola* DNA, 4—*P. syringae* DNA,  
5—분자크기표식자(DL2000)

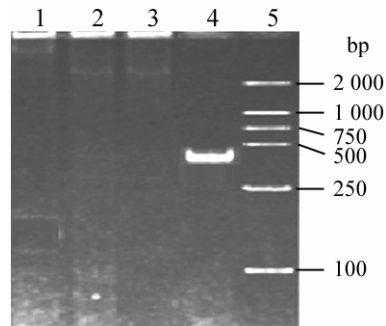


그림 4. *P. syringae* DNA를 리용한  
PCR산물의 전기영동상

1—*C. michiganensis* DNA, 2—*R. solanacearum* DNA, 3—*E. herbicola* DNA, 4—*P. syringae* DNA,  
5—분자크기표식자(DL2000)

이상의 연구결과로부터 우리가 설계한 검출프라이머들은 파수병원성세균DNA에 대하여 특이적이며 PCR에 의하여 병원성세균들을 검사하는데 효과적으로 리용할수 있다는것을 알수 있다.

## 맺 는 말

1) PCR에 의한 16S rRNA배열증폭으로 *Clavibacter michiganensis*, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas syringae*를 특이적으로 검출하기 위한 특이프라이머들을 설계하고 합성하였다.

2) 병원성세균DNA를 리용하여 검출특이프라이머들의 PCR검사조건을 확립하였다.

## 참 고 문 헌

- [1] L. Locateli et al.; Appl. Microbiol., 25, 220, 2002.
- [2] L. Panawala et al.; Molecular Biology, 16, 140, 2017.
- [3] M. J. Stulberg et al.; Plant Disease, 99, 333, 2015.
- [4] Kai-Wen Chien et al.; Crop Protection, 67, 1, 2015.
- [5] W. S. Kaneshiro et al.; Disease Detection and Losses Plant Disease, 92, 1444, 2008.

주체110(2021)년 1월 5일 원고접수

## **On the Specific Sequence Detection Primers of Some Fruit Tree Pathogenic Bacteria**

*Kim Kwang Chol, Ri Won Jin*

We considered 16S rRNA sequence as target sequence to detect the major fruit tree pathogenic bacteria exceptionally and designed primers to detect the bacteria of four species. The PCR was run, using the fruit tree pathogenic bacteria DNA and specific sequence detection primers.

The specific sequence detection primers were specific to some fruit pathogenic bacteria species, so that it could be used to identify that bacteria species.

Keywords: PCR, primer, 16S rRNA sequence, pathogenic bacteria DNA