

오이모자의 바이러스의 純化와 抗血清 製造

李 淳 炯·李 起 運·鄭 鳳 朝

Purification and Serology of Cucumber Mosaic Virus

Lee S. H., K. W. Lee, B. J. Chung

ABSTRACT

Purely isolated cucumber mosaic virus (CMV) was multiplied in *Nicotiana tabacum*, Ky-57 and the virus was purified by the modified method that was developed through this study. The concentration of purified CMV was 24.25 mg/ml.

The purified virus, mixed with a complete adjuvant (1:1) was injected into rabbits intramuscularly. Two injections at 10 day interval was enough to produce a good quality antiserum. The titer of the antiserum was 1/1280 when determined by agar gell-diffusion test.

The produced antisera will be used to facilitate the detection of CMV infected vegetables and other crops.

緒 論

最近 우리나라의 園藝作物 栽培가 擴大됨에 따라 寄主範圍가 가장 넓은 오이 모자이크 바이러스(Cucumber mosaic virus: CMV)는 특히 菜蔬에 많은 被害를 주고 있다.²⁾

本病은 1976年 Doolittle⁴⁾과 Jagger⁶⁾가 처음 報告한 以來 많은 研究가 遂行되었다. Tomlinson¹⁴⁾ 등은 部分 純化한 CMV를 토끼에 注射하여 抗血清을 製造하였다.

Scott¹²⁾(1993)와 Murrant¹¹⁾(1965)는 citrate buffer, borate buffer, thioglycolic acid를 利用하여 罹病 담배 葉으로 부터 높은 含量의 CMV를 純化하였으며 Takamami와 Tomaru(1969)는 CMV純化에서 EDTA의 效果에 對하여 試驗하였다.¹³⁾

本 試驗에서는 CMV를 純化한後 토끼에 注射하여 抗血清 製造 實驗을 遂行하였다. 試驗을 始終 指導하여 주신 日本 植物 바이러스 研究所 枋原 比呂志 博士께 謝意를 表하는 바이다.

材料 및 方法

供試된 바이러스는 CMV를 使用하였으며 담배 *Nicotiana tabacum*, Ky-57)에 汁液接種하여 純化用 바이

러스를 增殖하였다. 供試 바이러스는 동부(*Vigna sesquipedalis*) 外 數種의 指標植物에 接種하여 他바이러스의 汚染與否를 檢定하였다.

接種 4日後에 收穫한 담배 罹病葉 340g을 pH6.5, 0.5M, citrate buffer 340ml 0.1%의 thioglycolic acid, pH6.5, 0.01M, Na-EDTA (ethylenediaminetetra acetic acid, 1.48g)을 添加하여 3分間 Waring Blendor에서 磨碎搾汁한後 chloroform을 汁液의 30% 程度 添加하여 1分間 Blendor에서 저온후 9,000G에 20分間 遠心分離하여 淨化하였다. 上澄液에 PEG 6,000 (polyethylene glycol, M.W. 6,000)을 添加 10% 溶液을 만들어 30分間 서서히 저어서 30分間 4°C 冷蔵庫에 定置한後 9,000G에 20分間 遠心分離하였다. 沈澱物을 pH 8.8, 0.005M borate buffer로 비프론 透釋器에서 透釋하여 75,000G에 150分間 高速遠心分離한後 그 沈澱物을 3.5ml의 borate buffer로 透釋하였다. 이렇게 部分純化된것을 10~40%의 Sucrose를 濃度別로 넣은 遠心管에 넣어 Swinging bucket rotor에서 70,000G에 180分間 Sucrose density gradient centrifugation을 하였다.¹⁾

바이러스를 含有한 白色의 層을 注射器로 뽑아내어 110,000G에서 60分間 遠心分離한後 3ml의 borate buffer를 넣어 冷蔵庫에서 하룻밤 동안 透釋하였다. 이렇게 純化된 CMV를 吸光分析機에서 OD(optical density)를

*農村振興廳 農技研 病理科

(Dept. of plant Pathology, Institute of Agricultural Sciences, ORD, Suweon, Korea.)

測定하여 바이러스 수량을 조사하고 10% Formalin液, 純化된 바이러스, PTA(phosphotungstic acid)를 각각 1:1:1로 하여 電子顯微鏡에서 바이러스 粒子를 觀察하였다.

純化된 바이러스와 Complete adjuvant를 1:1로 섞어서 2ml씩 3마리의 토끼에 10日 間隔으로 2回 筋肉注射하였다. 두번째 注射 12日後에 部分採血(耳靜脈 注射器 採血)하여 室溫에서 1~2時間 靜置하고 冷蔵庫에서 24時間 靜置한 다음 8,000G에 20時間 遠心分離하였으며 部分採血 5日後에 全採血하였다.

製造된 抗血清의 力價는 部分純化된 供試 CMV를 抗原으로 하여 寒天內擴散法(agar gell-diffusion test)에 依하여 檢定되었다. 寒天組成은 pH7.0~7.2, 1%의 粉末寒天, 0.02M phosphate buffer, 0.85% NaCl, 0.0025M Na-EDTA, 0.02% Sodium azide로 하였다. 正常血清과 健全葉의 汁液을 對照區로 하였다.

結果 및 考察

指標植物에 接種한 CMV의 病徵은 명아주에서는 黃白色의 작은 局部病斑, *N. glutinosa*에서는 上葉에 모자익, *V. sesquipedalis*와 *V. sinensis*에서는 赤色の 局部病斑이 形成되었다.⁷⁾ Tomlinson¹⁴⁾等과 Scott¹²⁾는 *V. sinensis*를 利用하여 他바이러스의 汚染을 檢定했다고 報告하였다.

바이러스 增殖植物로서는 *N. tabacum*, KY-57을 使用하였는데 이것은 Takanami¹³⁾等도 *N. tabacum*, (KY-57)이 病徵이 빨리 發現하고 바이러스 濃度も 높다고 報告하였다. 또한 Tomlinson¹⁴⁾等은 *N. tabacum*, (Havana 425)에서 3日間, Scott¹²⁾는 *N. tabacum* (Samsun)에서 7日間, Francki⁵⁾等은 오이(*C. sativus*)에서 7~12日間 增殖하여 純化하였다고 하였다.

純化過程에서 CMV罹病葉 磨碎用 buffer의 組成은 pH6.5, 0.5M citrate buffer, 0.1%의 thioglycolic acid, 0.01M Na-EDTA로 하였고 沈澱物 透釋用 buffer의 組成은 pH8.8 0.005M borate buffer와 0.005M Na-EDTA로 하였다. Murant¹¹⁾는 葉磨碎用을 pH 7.5, 0.5M phosphate buffer와 0.1%의 thioglycolic acid, 透釋用을 pH7.5, 0.06M phosphate buffer를 利用하였고 Takanami¹³⁾等은 CMV 純化過程中 바이러스의 凝結을 防止하는데 EDTA를 使用하는것이 效果的이라고 報告하였다. 바이러스 保管用 buffer는 Francki⁵⁾等의 試驗에서와 같이 borate buffer를 利用하였다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 純化된 CMV는 吸光分析機에서 最高點이 260nm, 最低點이 245nm이었고 最

高와 最低의 比는 1.15이었다. 바이러스의 含量은 OD₂₆₀=5일 때 1mg/ml이므로 750倍로 稀釋한 것이 OD₂₆₀=0.485이었으므로 24.25mg/ml이었다.³⁾ Murant¹¹⁾의 純化方法에서는 바이러스 含量이 5mg/ml이었다. 우리나라에서는 정²⁾(1974)等이 CMV純化를 試圖한바 있었다. 純化된 바이러스를 電子顯微鏡에서 檢鏡한 結果約 30nm의 球形 粒子가 觀察되었다.^{12,14)}

Complete adjuvant와 純化된 바이러스를 1:1로 잘 섞어서 2ml씩 2回 筋肉注射하여 力價 1/1280인 良質의 抗血清이 製造되었다. Tomlinson¹⁴⁾等은 部分純化한 CMV를 토끼 마리당 4ml씩 4~5日 間隔으로 6回 靜脈注射을 하였다고 報告하였다. 우리나라에서는 李^{8,9,10)}等에 依하여 벼 오갈병(RDV), 감자바이러스 X(PVX) 감자바이러스 S(PVS)의 抗血清을 製造한 바 있으나 CMV의 抗血清 製造는 本 試驗이 처음이다.

製造된 抗血清의 力價 檢定은 寒天內擴散法에 依해서 1/1280로 나타났다(Fig. 3). 이것은 微量沈降法에 依한 方法으로 檢定 한다면 더욱 높은 力價를 나타낼 것으로 思料된다.^{9,14)}

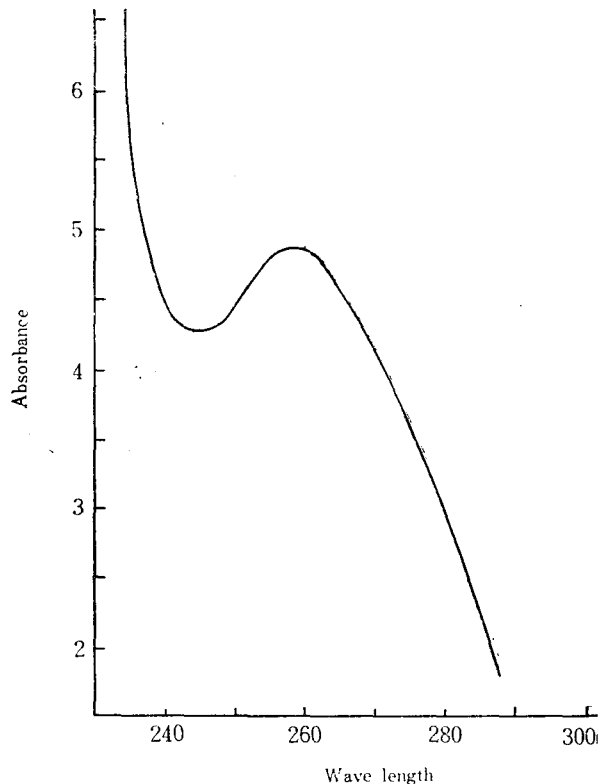


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectra of purified CMV (250 fold diluted in 0.005M borate buffer, pH8.8)

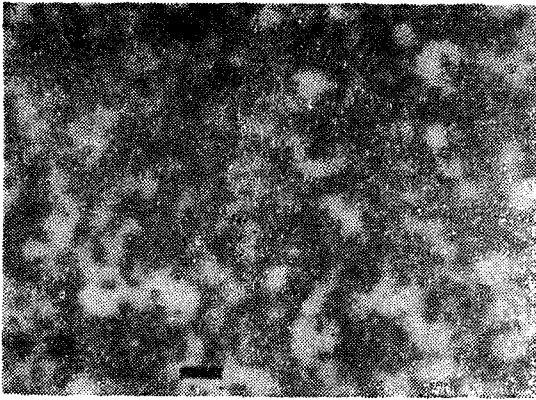


Fig. 2. Purified CMV negatively stained with phosphotungstic acid. (30 fold diluted). Bar represents 300nm.

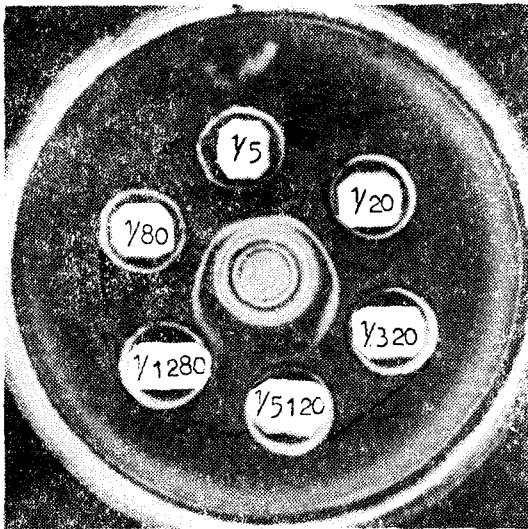


Fig. 3. Agar gel-diffusion plate with precipitin reaction between partially purified CMV and produced CMV antiserum. Peripheral wells were filled with diluted CMV antiserum. The center well was filled with partially purified CMV.

摘 要

純粹分離된 오이모자이크 바이러스(CMV)를 담배(KY-57)에서 증殖하여 改良된 純化方法으로 純化하였다.

純化된 바이러스를 Complete adjuvant와 1:1로 섞어 토끼에 10日 間隔으로 2回 筋肉注射하여 높은 力價의 CMV 抗血清을 製造하였다. 寒天內擴散法에 의한 抗血清의 力價는 1/1280이었다.

製造된 CMV 抗血清은 앞으로 菜蔬作物이나 그밖의 食糧作物에 罹病된 CMV를 分離同定하는데 利用될 것이다.

引用文獻

1. Brakke, M.K., 1967. Density gradient centrifugation. In K. Maramorosch and H. Koprowski. Methods in Virology II Academic Press New York, p.682.
2. 정봉조, 이순형, 조익규, 박해철, 1974. CMV 기주범위 및 순화분리에 관한 연구 농업기술연구소 시험연구 보고서 병해편 48-60
3. D. Nordam 1973. Identification of plant virus. Method and Experiments Center for Agricultural Publishing and Documentation Wagenigen p.95.
4. Doolittle. S.P. 1916 A new infectious mosaic disease of cucumber. Phytopathology. 6, 145-147.
5. Francki R.I.B., J.W. Randles, T.C. Chambers and S.B. Wilson 1966. Some properties of purified Cucumber Mosaic Virus (Q strain) Virology 28:729-741.
6. Jagger I.C. 1916. Experiments with the cucumber mosaic disease. Phytopathology. 6:148-151.
7. 小室康雄 1973. 野菜의 바이러스. 誠文堂新光社 83-116.
8. 李淳炯, 李起運, 鄭鳳朝, R.H. Halliwell 1977. 비오갈병의 純化와 抗血清 製造에 관한 研究. 韓國植物保護學會誌 16(1):65-67.
9. 李淳炯, 李起運, 鄭鳳朝 1977. 감자바이러스 X의 純化와 血清學的 研究. 韓國植物保護學會誌 16(2):101-104.
10. 李淳炯, 李起運, 鄭鳳朝 1977. 감자바이러스 S의 純化와 抗血清 製造. 韓國植物保護學會誌 16(3):145-148.
11. Murrant A.F. 1965. The morphology of cucumber mosaic. Virus. Virology 26:538-544.
12. Scott H. 1963, Purification of cucumber mosaic virus. Virology 20:103-106.
13. Takanami. Y, K. Tomary 1969. Effect of EDTA on cucumber mosaic virus and its application purification. Virology 37:293-295.
14. Tomlinson, J.A., Shepherd, R.J., and Walker J.C. 1959. Purification, properties, and serology of cucumber mosaic virus. Phytopathology 49:293-299.