

RT-PCR 방법을 이용한 효과적인 감자 잎말림 바이러스의 검정

전재홍* · 정영희 · 최경화 · 김현순 · 오현우¹ · 박세원² · 정 혁

한국과학기술연구원 생명공학연구소 식물조직배양연구실

¹한국과학기술연구원 생명공학연구소 생물분석실, ²호남대학교 환경원예학과

An Effective Method of Diagnosis of Potato Leafroll Virus by RT-PCR

Jae Heung Jeon*, Young Hee Joung, Kyung Hwa Choi, Hyun Soon Kim,

Hyun Woo Oh¹, Se Won Park² and Hyouk Joung

Plant Tissue Culture R. U., ¹Bioanalysis Lab., KRIBB, KIST, Taejon 305-333, Korea

²Department of Environment Horticulture, Honam University, Kwangju 506-090, Korea

ABSTRACT : A reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect potato leafroll virus (PLRV) in infected potato tissues cultured *in vitro*. The total RNA isolated from infected potato tissue was reverse transcribed and amplified by PCR with two specific primers designed to amplify the 465 bp of the partial coat protein gene of PLRV. We could prove that the 465 bp PCR fragment was indeed the partial coat protein gene of PLRV by sequence analysis. The sensitivity of the RT-PCR assay compared with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was tested. The results suggested that PLRV can be more precisely and effectively detected from PLRV-infected potato tissues by RT-PCR than ELISA.

Key words : coat protein gene, potato leafroll virus, RT-PCR.

영양번식작물인 감자의 생산에 있어서 여러 가지의 감자바이러스들은 수확량에 치명적인 영향을 미치기 때문에 각국에서는 씨감자의 생산과 수출입시 이들의 검정을 필수적인 사항으로 정하여 엄격히 통제하고 있다. 그러므로 오래전부터 이들의 검정 방법들이 개발되어져 있는데(2, 3), 특히 각각의 감자바이러스들의 외피단백질에 대한 항체를 이용한 ELISA 방법이 현재 상품화되어 일반적으로 널리 사용되고 있지만 가격이 비싸고 시간이 많이 걸리며 감염정도가 미약한 경우 감염여부를 확실하게 판정하기에 어려움이 따른다는 단점을 갖고 있다. 비교적 정확한 방법으로는 전자현미경을 사용하여 직접 바이러스 입자를 관찰 확인하는 방법이 있으나 고가의 전자현미경 장비를 갖추어야 하는 문제점이 있다.

최근 측정 불가능한 정도의 극소량으로 존재하는 특정 DNA 서열의 유전자만을 증폭시킬 수 있는 PCR 방법이 개발되어 여러 분야에서 응용이 되고 있다(6). 특히 식물의 특정 유전자를 잎이나 뿌리의 절편으로부터

직접 증폭시켜 확인을 할 수 있게 되었다(1). PCR에 의한 식물바이러스의 검정은 DNA 바이러스인 rice tungro bacilliform virus에서 Takahashi 등(17)에 의해 보고되었고, 최근 들어 식물 RNA 바이러스들의 RT-PCR 검정에 관한 연구들이 활발히 이루어지고 있다(4, 5, 12, 14, 16).

본 연구에서는 기내배양중인 감자품종들과 이들로부터 바이러스 퇴치를 위한 여러 항바이러스제의 처리후에, 100% 바이러스가 없는 품종을 선별, 확인하기 위한 방법으로 민감도가 높은 RT-PCR 방법에 의한 감자 잎말림 바이러스의 정확한 검정에 관해 연구하고자 하였으며 또한 기존의 일반적인 감자 바이러스 검정 방법인 ELISA 방법과 그 민감도를 비교하여 보고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 바이러스 확인. 실험의 공시재료로는 본 실험실에서 정(8)의 방법에 의해 기내배양되고 있는 45종류의 상업적으로 유명한 감자품종들을 사용하

*Corresponding author.

였다. 일차적으로 이들 시료들을 ELISA 방법으로 진단하여 감자 잎말림 바이러스의 감염여부가 밝혀진 세 가지 품종을 RT-PCR 진단시 감염된 대조 시료로 사용하였다. 이들 감자 잎말림 바이러스에 감염된 품종들은 모두 국내의 포장에서 재배되고 있던 감자의 싹으로부터 유래한 품종들이었다. ELISA 진단은 독일의 Boehringer Mannheim사의 감자 잎말림 바이러스 combination kit를 사용하였으며 그 제품의 사용방법에 따라 조직과 시료완충액의 혼합비를 1:6(w/v)으로 하여 막자사발로 마쇄한 다음 바이러스 분석을 위한 시료용액으로 사용하였다.

전자현미경 관찰. 바이러스 입자의 분리는 Lane (10)의 방법을 사용하여 다음과 같이 분리하였다. 바이러스의 감염이 확인된 식물체 10 g을 10 ml의 0.5 M Na acetate, 0.8 M acetic acid 추출용액으로 마쇄한 후 2 ml의 chloroform을 넣어 섞은 후 5000 g에서 10분간 원심분리하여 침전물을 제거하여 여과지로 여과하였다. 그 후 30% PEG를 1/2부피로 30분간 섞어준 후 원심분리하여 침전물을 다시 2 ml의 증류수에 넣어 녹인 후 다시 0.8 ml chloroform을 넣어 섞은 후 5000 g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 다시 30% PEG를 1/2부피, 1/20부피의 5 M NaCl을 넣어 30분간 섞어준 후 10분간 원심분리하여 침전시켰다. 이를 기본시료로하여 Philips model CM20 전자현미경(TEM)으로 1% phosphotungstic acid(PTA)용액으로 negative 염색하여 바이러스입자를 관찰하였다.

바이러스의 분리 및 viral RNA 추출. 바이러스의 감염이 확인된 식물체로부터 Tavantzis(18)의 방법을 변형하여 사용하였다. 1 g의 시료에 추출용액(0.1% sodium sulfite를 함유한 0.165 M disodium phosphate, 0.018 M trisodium citrate buffer, pH 9) 4 ml를 넣고 마쇄한 후 10,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 그 후 PEG 6000을 6%(w/v)로 가하고 2.5시간 동안 흔들며 15,000 rpm에서 25분간 원심분리하여 바이러스 입자를 침전시켰다. 그 후에 SDS-phosphate disruption buffer를 사용하여 바이러스입자를 부수고 phenol 처리를 한 후에 에탄올 처리를 하여 바이러스 RNA를 분리하였다.

Primer design. 이미 보고된 감자 잎말림 바이러스(9)의 외피단백질 유전자에 해당하는 염기서열중 일부를 선택하여 465 bp의 PCR 산물을 증폭시키도록 두개의 primer를 고안하였다. Sense primer로는 감자 잎말림 바이러스 23 K ORF의 54~73 bp 서열위치를 기초로 5'-AGGAAATGCAATGGTGGT-3'로 하였고 antisense primer로는 499~518 bp위치를 기초로 5'-

TGATAAGTTTTGGCGCCGCC-3' 하여 한국생공에 의뢰하여 합성하여 사용하였다.

RT-PCR 반응. RT-PCR은 GeneAmp RNA PCR kit(Perkin Elmer Cetus사)을 구입하여 사용하였다. 처음 감자 잎말림 바이러스 cDNA 합성은 master mix 17 μ l와 template 2 μ l에 antisense primer 1 μ l를 넣고 75°C에서 5분간 가열하고 42°C에서 30분간 합성한 후 99°C에서 5분 그리고 5°C에서 1분간 냉각하였다. PCR 반응은 PCR master mix 79 μ l에 sense primer 1 μ l를 넣고 위에서 cDNA를 합성한 역전사효소 반응액 20 μ l를 넣어 95°C에서 2분간 끓인 후 mineral oil을 넣고 첫 cycle은 94°C에서 5분, 55°C에서 2분, 72°C에서 3분을 하고 그 다음 35 cycle을 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분을 하였고 마지막으로 94°C에서 1분, 55°C에서 2분, 72°C에서 10분의 일반적인 PCR 반응을 수행하였다. 그 후 PCR 산물을 1.2% agarose 겔 상에서 전기영동하여 확인하였다.

Cloning 및 sequencing. RT-PCR에서 얻은 465 bp cDNA를 분리하여 pCR-Script SK 벡터에 cloning 한 뒤 silver sequencing kit를 사용하여 감자 잎말림 바이러스의 염기 서열을 확인하였다.

결 과

ELISA 및 전자현미경 확인. 기내배양중인 45개 품종을 시료로 하여 ELISA 방법으로 감자 잎말림 바이러스의 감염여부를 진단한 결과 감자 잎말림 바이러스에 감염된 세 가지의 식물체들을 선별할 수 있었다. 이 중에서 감자 잎말림 바이러스에 감염된 품종으로부터 바이러스입자를 분리하여 전자현미경으로 관찰한 결과 전형적인 약 24 nm 크기의 isometric한 감자 잎말림 바이러스 입자를 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

RT-PCR 검정 및 염기서열 확인. 감자 잎말림 바이러스의 ELISA 검정을 수행하여 감자 잎말림 바이러스에 양성반응을 보임으로써 감자 잎말림 바이러스 감염이 확인된 3개의 품종과 바이러스가 전혀 없는 품종을 대상으로 하여 RT-PCR 반응을 수행하였다. 또한 감자 X 바이러스와 감자 Y 바이러스에 감염되었지만 감자 잎말림 바이러스에는 감염이 안된 품종도 각각 RT-PCR을 수행하여 Fig. 2의 결과를 얻었다. ELISA에 의해 감자 잎말림 바이러스에 감염이 확인된 세 품종에서 똑같이 465 bp의 감자 잎말림 바이러스 외피단백질이 증폭된 PCR산물을 얻을 수 있었다. 그러나 ELISA 음성이거나 감자 X 바이러스와 감자 Y 바이러스에만 감염된 대조구의 경우에는 RT-PCR에

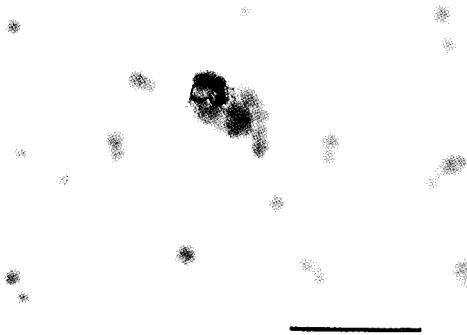


Fig. 1. Electron micrograph of a partially purified PLRV particles. Virions of PLRV stained with 1% phosphotungstic acid, pH 6.0. The bar represents 250 nm.

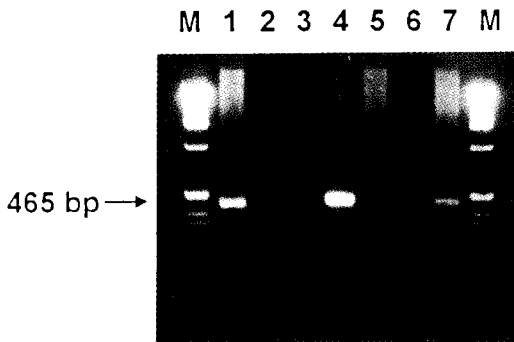


Fig. 2. Detection of PLRV from potato shoots cultured *in vitro* by RT-PCR. Ethidium bromide-stained 1.2% agarose gels of RT-PCR products produced using various templates. Lanes 1, 4, and 7, total RNA from PLRV-infected; Lane 2, total RNA from PVX-infected; Lane 3, total RNA from PVY-infected ; Lane 5-6, total RNA from healthy potato shoots. M, 1 kb ladder (BRL).

의해서도 증폭이 되지 않았다. 그러므로 RT-PCR에 의해 효과적으로 감자 잎말림 바이러스에 감염된 품종만을 확인할 수 있었다. 국내 일반 포장에서 감자 잎말림 바이러스에 감염된 러셋버뱅크 품종으로부터 RT-PCR하여 나온 465 bp DNA 절편을 agarose gel에서 분리한 다음 pCR-Script SK 벡터에 클로닝하여 염기서열을 분석한 결과 감자 잎말림 바이러스의 외피 단백질 유전자의 일부임을 확인할 수 있었는데, 이 감자 잎말림 바이러스 염기서열은 Jolly 등(7)에 의해 보고된 PLRV-30 외피단백질 유전자의 염기서열과 동일하였다. Kawchuk 등(9)에 의해 보고된 23 K 외피단백

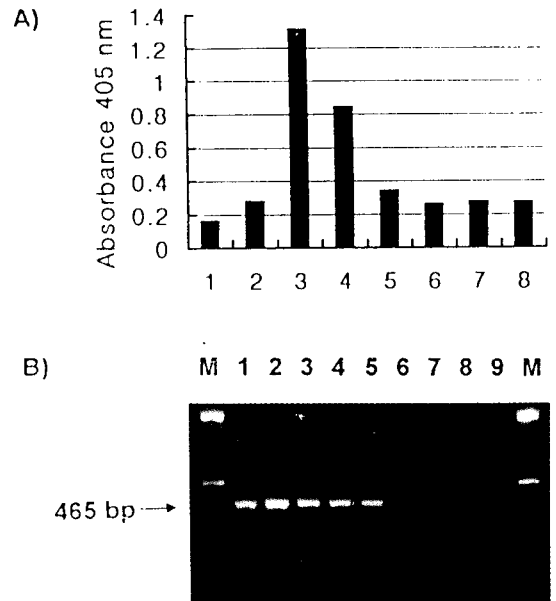


Fig. 3. Comparison of sensitivity between RT-PCR and ELISA. A), ELISA results, given as mean A405 of 2 replicate tests. Bar 1, buffer control; Bar 2, healthy potato shoot control; Bar 3-8, PLRV infected potato shoot extracts in a eight-fold dilution series (1, 1/8, 1/64, 1/512, 1/4096, 1/32768). B), RT-PCR results for dilution series made from total RNA from PLRV infected potato shoot tissue. Lane 1, undiluted RNA; Lanes 2-8, ten-fold RNA dilution series (1/10 to 1/10⁷, respectively); Lane 9, healthy potato shoot control; Lane M, 100bp DNA ladder (BRL).

질 유전자와의 비교에서는 start codon으로부터 238 base 떨어진 곳에서 adenine(A)이 guanine(G)로 치환되었고 해당 위치의 amino acid M(methionine)이 V(valine)로 변화가 있음을 알 수 있었다(자료는 제시하지 않았음).

RT-PCR 검정의 민감도 비교. 검정의 민감도를 조사하기 위하여 RT-PCR반응의 경우 감염된 품종으로부터 분리한 RNA를 10배수로 희석하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 Fig. 3b에서 보여주듯이 10⁻⁷으로 희석한 경우에서까지 희미한 밴드를 보임으로 높은 검정의 민감도를 나타내었다. 한편 기존의 널리 사용되고 있는 ELISA방법으로 바이러스분석을 위한 추출 용액을 8배수로 희석하여 그 민감도를 조사하였는데 그 결과는 Fig. 3a와 같다. 완충용액과 바이러스 감염이 안된 품종의 경우 405 nm에서 흡광도가 각각 0.164와 0.277이었는데 감염된 품종의 경우 1.311로 높은 수치를 보였다. 감염된 품종으로부터 8⁻¹로 희석

하였을 경우에는 0.842의 수치를 유지하여 정확히 감염되어 있음을 확인할 수 있었으나 8^{-2} 로 희석하였을 경우에는 0.341로 감염여부의 판정이 어려웠으며 8^{-3} , 8^{-4} 와 8^{-5} 로 희석하였을 경우에는 바이러스감염이 되지 않은 대조구의 품종과 같은 수치로 나타났다. 그러므로 RT-PCR방법이 ELISA보다 10^3 배 이상 정확히 바이러스의 감염여부를 검정할 수 있는 효과적인 방법임을 알 수 있었다.

고 찰

기내배양중인 45개 품종을 시료로 하여 ELISA방법으로 감자 잎말림 바이러스의 감염여부를 진단한 결과 감자 잎말림 바이러스에 감염된 세 가지 품종의 감자식물체들을 선별할 수 있었다. 판정의 기준은 감염이 안된 품종의 405 nm에서의 흡광도 수치를 기준으로 두 배가 넘는 흡광도를 보인 품종을 바이러스에 감염이 되었다고 정하였으며 위의 세 가지 품종들에서는 최소한 세배가 넘는 수치를 보였다. 이 감자 잎말림 바이러스에 감염된 품종으로부터 바이러스입자를 분리하여 전자현미경으로 관찰한 결과 전형적인 약 24 nm 크기의 isometric한 감자 잎말림 바이러스 입자를 관찰할 수 있었다.

감자의 잎말림 바이러스는 luteovirus 그룹에 속하는 RNA 바이러스로서(11) 바이러스입자는 28%의 ssRNA를 함유하며 RNA의 분자량은 2.0×10^6 이고 외피단백질의 분자량은 26.3 K이다(15). 감자 잎말림 바이러스는 ssRNA 바이러스이기에 PCR에 의해 증폭하기 위해서는 먼저 역전사효소를 이용한 바이러스 cDNA의 합성이 있어야 한다. RT-PCR을 위한 바이러스 RNA의 분리는 기존의 식물 RNA 분리법을 그대로 사용하거나 간단히 바이러스입자를 먼저 분리 후 SDS를 사용하여 입자를 깨뜨려 바이러스 RNA만을 분리할 수가 있다(4, 5, 12, 14, 16). 본 실험에서는 후자의 방법을 선택하여 바이러스 RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하여 비교적 깨끗한 밴드를 얻을 수 있었다(Fig. 2). 감자 잎말림 바이러스에 특이한 두 primer를 사용하여 55°C의 annealing 온도로 35 cycle 증폭을 함에 의해 agarose 겔상에서 충분히 바이러스 감염여부를 검진할 수 있었으며 감자 X와 Y 바이러스에 감염된 품종에서는 전혀 밴드가 나타나지 않아 특이하게 감자 잎말림 바이러스만을 검정할 수 있었다. 한편 좀 더 실용적인 측면에서 본다면 감자 유전자에는 없는 식물 바이러스들만의 특정유전자의 conserved region에서 공통의 primer를 고안한다면 여러

바이러스를 동시에 검진할 수 있는 방법도 개발되어 질 수 있을 것으로 사료된다.

무병의 인공씨감자를 대량생산하는데 있어서는 100%의 무병의 감자 식물체를 확보하는 것이 필수적인데 위의 ELISA나 전자현미경의 두 방법으로는 민감도가 낮기 때문에 바이러스의 감염정도가 미약할 때에는 정확한 검정이 불가능하였다. 실제로 항바이러스제인 ribavirin 처리에 의한 감자 S 바이러스의 퇴치실험에서, 한두 차례의 처리에 의해서도 그 수치를 크게 줄일 수 있게 되어 ELISA 결과로는 바이러스가 퇴치된 것으로 잘못 판단하게 되지만 그 후 처리를 중단했을 때 다시 수치가 올라가 다시 감염된 것으로 나타나는 경우가 발생한다. 그러므로 수 차례의 계대배양을 거치며 지속적인 항바이러스제의 처리에 의하여만 완전히 바이러스를 퇴치할 수 있었다고 박 등(13)이 보고한 바 있다. 이 경우에 RT-PCR에 의한 검정방법으로 정확히 바이러스의 완전퇴치여부를 판단할 수 있다고 보여진다. 그것은 위의 결과에서 나타났듯이(Fig. 3) RT-PCR방법이 ELISA보다 민감도에서 10^3 배 이상 예민하기 때문에 가능하다고 사료된다. 이러한 결과는 Takahashi 등(17)과 French와 Robertson(4)의 rice tungro bacilliform virus, barley yellow dwarf virus의 PCR에 의한 검정에 관한 보고와도 일치하는 결과이다.

앞으로 시료를 튜브에서 직접 갈아서 사용하거나 한 튜브에서 역전사와 PCR반응을 동시에 하는 등의 좀더 간편한 RNA의 분리방법과 RT-PCR조건의 확립에 이은 진단제품화에 관한 연구가 진행된다면 일반적으로 널리 쓰일 수 있는 간단하고 정확하게 바이러스의 감염여부를 검진할 수 있는 효과적인 방법이 될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

감자 잎말림 바이러스를 검정하기 위하여 ELISA 및 전자현미경에 의해 바이러스 감염이 확인된 기내배양중인 감자의 줄기로부터 RT-PCR 분석을 수행하였다. 분리된 총 RNA들로부터 바이러스 cDNA를 합성하고 감자 잎말림 바이러스 외피단백질의 일부인 465 bp를 특이하게 증폭하도록 고안한 두 primer를 사용하여 PCR 반응을 하였다. 증폭된 465 bp의 DNA 절편의 염기서열을 분석한 결과 역시 감자 잎말림 바이러스임을 확인하였다. 바이러스 검정에 있어서 ELISA 방법과 RT-PCR 방법간의 민감도를 조사한 결과 RT-PCR 방법이 ELISA 방법보다 감자 잎말림 바이러

스 검정에 있어서보다 더 정확한 방법인 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술처의 UR 대응 과제(BSN81760) 개발사업비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Berthomieu, P. and Meyer, C. 1991. Direct amplification of plant genomic DNA from leaf and root pieces using PCR. *Plant Mol. Biol.* 17 : 555-557.
- Clark, M. F. 1981. Immunosorbent assay in plant pathology. *Ann. Rev. Phytopathol.* 19 : 83-106.
- Clarke, R. G., Converse, R. H. and Kojima, M. 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay to detect potato leafroll virus in potato tubers and viruliferous aphids. *Plant Dis.* 64 : 43-45.
- French, R. and Robertson, N. L. 1994. Simplified sample preparation for detection of wheat streak mosaic virus and barley yellow dwarf virus by PCR. *J. Virol. Methods* 49 : 93-100.
- Hadidi, A., Montasser, M. S., Levy, L., Goth, R. W., Converse, R. H., Madkour, M. A. and Skrzeczkowski, L. J. 1993. Detection of potato leafroll and strawberry mild yellow-edge luteovirus by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. *Plant Dis.* 77 : 595-601.
- Innis, M. A. and Gelfand, D. H. 1990. A guide to methods and applications. In: *PCR Protocols*, ed. by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Snisky, and T. J. White, pp. 3-12. Academic Press Inc., Sandiego, New York, London, Sydney Tokyo, Toronto.
- Jolly, C. A. and Mayo, M. A. 1994. Changes in the amino acid sequences of the coat protein read-through domain of potato leafroll luteovirus affect the formation of an epitope and aphid transmission. *Virology* 201 : 182-185.
- Joung, H. 1989. Mass production of potato microtuber by tissue culture technique and its application. In: *'89 Agricultural Biotechnology Symposium*, pp. 100-124. Seoul National Univ.
- Kawchuck, L. M., Martin, R. R., Rochon, D. M. and Mcpherson, J. 1989. Identification and characterization of the potato leafroll virus putative coat protein gene. *J. Gen. Virol.* 70 : 783-788.
- Lane, L. C. 1986. Propagation and purification of RNA plant viruses. *Methods in Enzymology* 118 : 687-696.
- Matthews, R. E. F. 1982. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* 17 : 1-199.
- Mumford, R. A., Barker, I. and Wood, K. R. 1994. The detection of tomato spotted wilt virus using the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 46 : 303-311.
- Park, S. W., Jeon, J. H., Kim, H. S. and Joung, H. 1994. Effects of antiviral chemical on eradication of potato virus S in potato shoot-tip culture. *J. Kor. Hort. Sci.* 35 : 32-35.
- Pearson, M. N., Thomas, J. E. and Randles, J. W. 1994. Detection of an unidentified potyvirus from *Roystonea regia* palm using the PCR and degenerate, potyvirus specific, primers and potential problems arising from the amplification of host plant DNA sequences. *J. Virol. Methods* 50 : 211-218.
- Rowhani, A. and Stace-Smith, R. 1979. Purification and characterization of potato leafroll virus. *Virology* 98 : 45-54.
- Singh, R. P., Kurz, J., Boiteau, G. and Bernard, G. 1995. Detection of potato leafroll virus in single aphid by the reverse transcription PCR and its potential epidemiological application. *J. Virol. Methods* 55 : 133-143.
- Takahashi, Y., Tiongo, E. R., Cabauatan, P. Q., Koganezawa, H., Hibino, H. and Omura, T. 1993. Detection of rice tungro bacilliform virus by polymerase chain reaction for assessing mild infection of plants and viruliferous vector leafhoppers. *Phytopathology* 83 : 655-659.
- Tavantzis, S. M. 1983. Improved purification of potato carlaviruses. *Phytopathology* 73 : 190-194.