

## 간이 조즙액 추출법을 이용한 RT-PCR 방법에 의한 오이 모자이크 바이러스의 검정

이상용\* · 홍진성<sup>1</sup> · 이진상<sup>1</sup> · 최장경<sup>1</sup>  
강원대학교 삼림자원보호학과, <sup>1</sup>강원대학교 농생물학과

### Detection of Cucumber Mosaic Virus by RT-PCR Using a Simple and Rapid Crude Sap Extraction Method

Sang Yong Lee\*, Jin Sung Hong<sup>1</sup>, Jin Sang Lee<sup>1</sup> and Jang Kyung Choi<sup>1</sup>

Department of Forest Resources Protection, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea  
<sup>1</sup>Department of Agricultural Biology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

**ABSTRACT :** Reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) assays and restriction enzyme analysis were used to detect seven cucumber mosaic virus (CMV) isolates propagated in tobacco plants (*Nicotiana glutinosa*). A simple and rapid crude sap extraction of viral nucleic acid for RT-PCR was developed. An RT-PCR assay with a set of 20-mer primers designed in a conserved region of the CMV coat protein gene amplified about 490-bp DNA fragments from the crude sap of infected plants. Restriction enzyme analysis of RT-PCR products using *EcoRI* and *MspI* showed that all isolates were identified as CMV subgroup I. Each antigen of the isolates produced a single band of precipitate when tested against CMV-Y antiserum in Ouchterlony's agar gel double diffusion tests.

**Key words :** cucumber mosaic virus (CMV), coat protein gene, primer, RT-PCR, restriction enzyme analysis.

오이 모자이크 바이러스(cucumber mosaic virus, CMV)는 3종의 구형 입자에 3종의 계놈 RNA와 1종의 서브계놈 RNA로 구성된 다입자성 바이러스이며(7, 8), 계통에 따라서 이들 계놈 RNA 이외에 위성 RNA를 갖고 있는 것도 있다(29). 또한 최근에는 CMV RNA 2의 서브계놈 RNA로서 RNA 4A를 갖고 있는 계통도 존재함이 밝혀졌다(5). CMV는 67과 480여종 이상의 각종 식물체에 감염되는 것으로 알려져 있으며 주요 전염경로는 약 75종의 진딧물에 의하여 비영속적으로 매개되지만 종자전염, 접목 및 새삼류에 의한 전염도 보고되어 있다(2, 8, 15, 19). 현재 CMV 계통은 혈청학적 특성에 따라서 subgroup I(또는 DTL) 및 subgroup II(또는 ToRS)로 분류되고 있다(4, 17). CMV의 분류는 혈청학적 검정(4, 9), 외피단백질의 1차구조 비교(6) 및 유전자교잡(10, 17) 등의 방법에 의하여 검정되어 왔으나, 이와 같은 방법들은 비교적

복잡한 실험 과정과 많은 시간이 소요되는 단점이 지적되고 있다(2, 23).

최근 개발된 RT-PCR(reverse transcription and polymerase chain reaction) 방법은 CMV를 포함한 다수의 식물 바이러스의 검정에도 이용되고 있는데 기존의 방법보다 실험 과정이 간단하고 적은 시간이 소요되며 정확성이 뛰어나다고 하는 사실이 입증되었다(12, 13, 21, 24, 25, 28). 또한, Rizos 등(23)과 Singh 등(26)은 CMV subgroup I과 II의 주요 계통을 대상으로 외피단백질 관련 유전자의 염기배열을 비교 분석한 결과, CMV의 외피단백질 유전자를 RT-PCR에 의하여 증폭시킨 후 제한효소 *EcoRI* 및 *MspI* 등의 인식부위의 차이를 확인함으로써 CMV 계통의 분류가 가능하다는 사실을 보고하였다.

이 연구의 목적은 RT-PCR을 이용하여 보다 간단하고 용이하게 CMV를 검정할 수 있는 방법을 수립하기 위하여 실시하였으며, 특히 RT-PCR을 위한 간이 조즙액 추출법의 개발 및 제한효소를 이용한 CMV sub-

\*Corresponding author.

group의 동정에 중점을 두었다.

## 재료 및 방법

**공시 CMV.** 본 실험에 사용한 CMV는 춘천 근교에서 수집한 모자이크 증상의 페튜니아(*Petunia hybrida*), 팥(*Phaseolus angularis*), 장구채(*Melandryum firmum*) 및 오이(*Cucumber sativus*)로부터 분리한 것으로 각각 CMV-Pe, Ph, Me 및 Cu로 명명하였다. 본 연구자 등에 의하여 보고된 바 있는 CMV-As 및 Co도 공시하였으며(1, 20), CMV subgroup I에 속하는 CMV-Y는 일본의 Takanami 박사(Japan Tobacco Inc.)로부터 제공받아 대조 바이러스로서 사용하였다. 이상의 7종의 CMV 계통은 담배(*Nicotiana glutinosa*)에 즙액 접종하여 증식시켰으며, 모자이크 병징의 담배 잎 조직을 실험에 사용하였다.

**조즙액 추출.** RT-PCR을 위한 조즙액의 추출은 모자이크 병징의 담배잎 조직으로부터 Eppendorf tube (1.5 ml)의 덮개를 이용하여 직경 약 1 cm의 절편 2매(약 0.1 g)를 직접 Eppendorf tube내로 채취한 후, 500  $\mu$ l의 추출용 완충액(10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM KCl, 1% SDS, 14 mM  $\beta$ -mercaptoethanol)을 첨가하여 유리막대로 마쇄하였다. 그 다음 마쇄액을 마이크로 원심분리기에서 12,000 rpm, 10분간 원심하여 상층액을 얻었으며 이것을 RT-PCR용 조즙액으로 사용하였다.

**Primer 제작.** RT-PCR용 primer는 이미 보고된 CMV subgroup I과 II의 RNA 3'의 공통된 외피단백질 유전자 일부분의 염기배열을 기초로 하여 작성하였다(11, 14, 18, 22, 27). 즉, CMV subgroup I인 CMV-Y RNA 3'의 1556~1575의 염기배열에 해당되고, subgroup II인 CMV-Q RNA 3'의 1513~1532의 염기배열에 해당되는 5'-TGATAAGAAGCTTGTTCGCG-3'를 upstream primer로 사용하였으며, CMV-Y RNA 3'의 2023~2042의 염기배열에 해당되고, CMV-Q RNA 3'의 1992~2011의 염기배열에 해당되는 5'-TTAGCCG-TAAGCTGGATGGA-3'를 downstream primer로 사용하였다. 위의 primer는 한국생공(주)에 주문 제조하여 사용하였다.

**RT-PCR.** RT-PCR은 Perkin Elmer Cetus사의 GeneAmp RNA PCR kit를 사용하여 실행하였다. 역전사 반응은 master mix 7.6  $\mu$ l, downstream primer 100 pmol 및 상술한 바와 같이 추출한 RT-PCR 용 조즙액 1  $\mu$ l를 혼합한 총 20  $\mu$ l의 반응액을 42°C에서 30분, 95°C에서 5분 및 5°C에서 1분간 처리하였다. PCR은 역전사반응액 20  $\mu$ l에 10X PCR buffer 10  $\mu$ l, upstream

primer 100 pmol, dNTPs 0.2 mM 및 *Taq* DNA polymerase 5 unit를 첨가한 총 100  $\mu$ l의 반응액을 94°C에서 2분간 처리한 후, DNA Thermal Cycler(Perkin Elmer Cetus)를 이용하여 35회(94°C 1분~53°C 2분~72°C 2분, 단 최종회는 72°C 10분) 증폭시켰다. RT-PCR 산물(8  $\mu$ l)은 2%의 agarose gel(5X TBE buffer)에서 전기영동에 의하여 분석하였다.

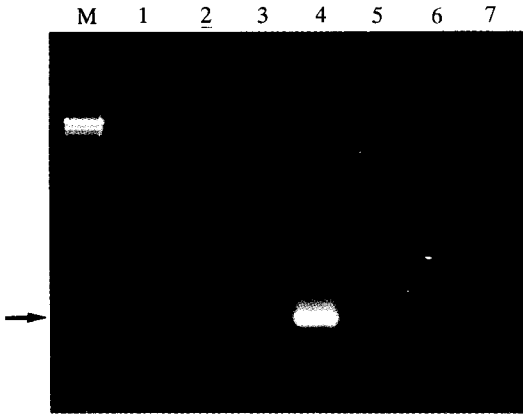
**제한효소 처리.** RT-PCR 산물의 분석은 제한효소 *EcoRI* 및 *MspI*(Boehringer Mannheim)을 이용하였다. 즉, RT-PCR에 의하여 증폭된 산물 17  $\mu$ l에 *EcoRI* 또는 *MspI* 1  $\mu$ l(10 unit) 및 10X buffer 2  $\mu$ l를 첨가한 총 20  $\mu$ l의 반응액을 37°C에서 2시간 처리한 후, 2%의 agarose gel(5X TBE buffer)에서 전기영동하였다.

**항혈청 검정.** 항혈청 검정은 Ouchterlony 한천젤 이중확산법을 이용하였다(16). 한천젤은 0.8% agarose, 0.2% sodium azide, 0.85% sodium chloride 및 0.01 M phosphate buffer(pH 7.0)로 조성하였고, 부분 순화한 7종의 공시 CMV를 항원으로 사용하였다. 항혈청은 한국인삼연초연구소 박은경 박사로부터 제공받은 CMV-Y의 항혈청을 이용하였다.

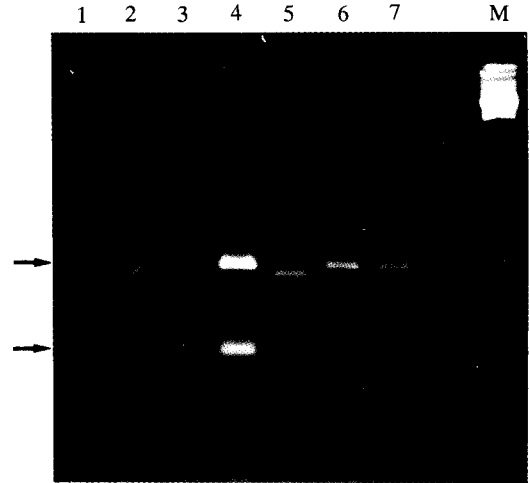
## 결 과

RT-PCR에 의한 조즙액으로부터 CMV의 검정. 공시한 7종의 CMV 조즙액을 RT-PCR법에 의하여 반응시킨 후, 그 산물을 2%의 agarose gel(5X TBE buffer)에서 전기영동하였다. 그 결과 7종의 CMV 조즙액으로부터 공히 약 490 염기쌍의 DNA 단편이 검출되었다(Fig. 1). 본 실험에 사용한 primer에 의하면 subgroup I의 CMV-Y는 487 염기쌍의 DNA 단편이, 그리고 subgroup II의 CMV-Q는 499 염기쌍의 DNA 단편이 증폭될 것으로 예상되는 바, 위의 RT-PCR에 의하여 검출된 약 490 염기쌍의 DNA 단편들은 이에 상응하는 것으로 추정되었다. 한편, Takamatsu 등의 방법(28) 및 Robertson 등의 방법(24)에 의하여 조즙액을 제조하여 RT-PCR을 실시하였으나, 반응산물은 검출할 수 없었다(그림 생략).

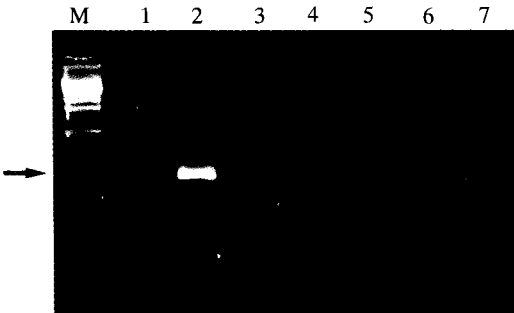
***EcoRI* 및 *MspI*를 이용한 RT-PCR 산물의 분석.** 공시한 CMV 계통들의 subgroup의 확인을 위하여 RT-PCR에 의하여 증폭된 DNA를 *EcoRI*으로 처리하여 2% agarose gel에서 전기영동한 결과, 7종 모두 약 490 염기쌍의 처리 전과 동일한 크기의 단편만을 나타내었다(Fig. 2). 한편, *MspI*으로 처리하였을 경우에는 7종 모두 약 340 및 150 염기쌍의 단편이 관찰되어 한 곳의 인식부위가 존재함을 확인할 수 있었다(Fig. 3).



**Fig. 1.** Analysis of RT-PCR-amplified CMV products from tobacco plants: Lanes 1 to 3, CMV-Y, As and Co as control; Lanes 4 to 7, CMV-Pe (*Petunia hybrida*), Ph (*Phaseolus angularis*), Me (*Melandryum firmum*), and Cu (*Cucumber sativus*), respectively; M,  $\lambda$ -DNA/*Hind*III as size marker. Arrow indicates the expected size of DNA fragment amplified by RT-PCR.



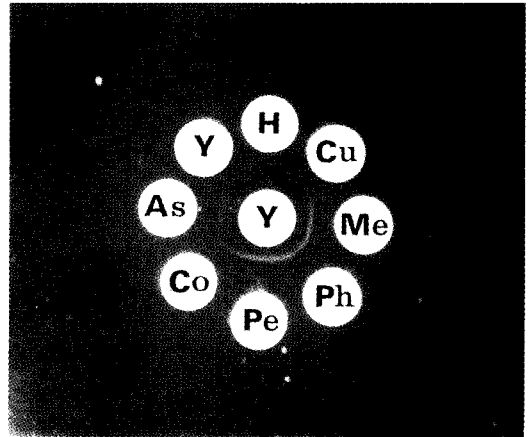
**Fig. 3.** *Msp*I restriction enzyme analysis of RT-PCR-amplified CMV products: Lanes 1 to 7, CMV-Y, As, Co, Pe, Ph, Me and Cu, respectively; M,  $\lambda$ -DNA/*Eco*T14I as a size marker. Arrows indicate the expected size of DNA fragments digested with *Msp*I.



**Fig. 2.** *Eco*RI restriction enzyme analysis of RT-PCR-amplified CMV products: Lanes 1 to 7, CMV-Y, As, Co, Pe, Ph, Me and Cu, respectively; M,  $\lambda$ -DNA/*Eco*T14I as a size marker. Arrow indicates the expected size of DNA fragment which doesn't contain *Eco*RI restriction site.

본 실험에 사용한 primer에 의하여 증폭된 DNA 단편이 CMV subgroup I일 경우에는 *Eco*RI의 인식부위는 존재하지 않고 *Msp*I의 인식부위는 한 곳이 존재하는 반면, subgroup II일 경우에는 *Eco*RI의 인식부위가 한 곳 및 *Msp*I의 인식부위는 세 곳이 존재하기 때문에 (23, 26), 공시한 7종의 바이러스는 모두 CMV subgroup I임이 인정되었다.

항혈청 검정. 7종의 공시바이러스와 CMV subgroup I간의 혈청학적 유연관계를 추정하기 위하여 Ouchterlony 한천젤 이중확산법 및 CMV-Y의 항혈청을 이용하여 항혈청 검정을 실시하였다. 그 결과



**Fig. 4.** Serological reaction in Ouchterlony agar gel double diffusion test. Outer wells contain partially purified viruses of CMV-Y, As, Co, Pe, Ph, Me, Cu, and crude sap from healthy plants (H), respectively. Center well contains CMV-Y antiserum.

7종의 공시바이러스와 CMV-Y의 항혈청 간에 명확한 단일 침강선을 형성하여 혈청학적으로도 동일한 성질의 바이러스임이 확인되었다(Fig. 4).

### 고 찰

3종의 기 보고된 CMV 계통과 춘천근교의 초본류로

부터 분리한 4종의 미보고 CMV를 공시하여 RT-PCR에 의한 효율적인 바이러스 검정방법을 소개하였다. 현재까지 각종 식물바이러스의 검정에 RT-PCR이 이용되고 있으나 식물의 종류나 부위에 따라서는 종종 RT-PCR용 조즙액의 추출의 문제점이 지적되고 있다(3, 26). 즉, Nishiguchi 등(13)은 감자잎으로부터 에탄올 침전에 의하여 조즙액을 추출하여 RT-PCR법으로 sweet potato feathery mottle virus(SPFMV)를 검정하였으나 반응 산물을 검출할 수 없었는데 그 이유는 RT-PCR 반응을 저해하는 다당류 때문일 것으로 추정하였으며, 이러한 문제점은 조즙액을 희석시킴으로써 해결할 수 있다고 하였다.

본 실험에서도 에탄올 침전 과정이 포함된 Takamatsu 등의 방법(28) 및 Robertson 등의 방법(24)을 사용하여 조즙액을 제조하였으나 RT-PCR 산물은 검출할 수 없었다. 한편, 본 실험에서 사용한 CMV 검정용 조즙액 추출법은 시료의 채집 및 조즙액의 추출과정이 하나의 Eppendorf tube에서 완료될 수 있으며 조즙액의 희석 등과 같은 작업이 불필요한 간편하고 효율적인 방법으로 인정되었다.

Rizos 등(23)은 기보고된 10종의 CMV 계통의 외피 단백질 유전자의 염기배열을 비교 분석하여, 20종의 미분류 CMV 계통들을 RT-PCR에 의한 외피단백질 유전자 DNA 단편들의 *MspI* 인식부위의 차이에 의하여 subgroup I 및 subgroup II로 동정이 가능함을 보고하였다. 또한, Singh 등(26)은 *EcoRI* 및 *MspI*의 인식부위의 차이를 이용하여 바나나에 감염된 CMV를 subgroup I으로 동정하였다. 한편, Park 등(21)은 동일한 subgroup에 속하는 CMV 계통간의 외피단백질 유전자의 변이성도 특정 제한효소에 의하여 검정할 수 있음을 보고하였다. 본 실험에서 공시한 7종의 CMV의 RT-PCR 산물을 *EcoRI* 및 *MspI*으로 절단하여 전기영동에 의하여 분석한 결과, 기 보고된 내용과 동일한 양상의 결과를 얻을 수 있었으며, 공시한 7종 모두가 CMV subgroup I에 속하는 것으로 확인되었다. 이상의 결과, 본 연구에서 사용한 RT-PCR법은 종래의 방법들 보다 비교적 간단하고 신속하게 바이러스 조즙액을 추출하여 담배로부터 CMV를 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 특정 제한효소를 사용하면 subgroup의 동정도 가능한 효율적인 방법으로 인정되었다.

## 요 약

역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 이용하여 담배(*Nicotiana glutinosa*)에 증식시킨 7종의 오이 모자이

크 바이러스(CMV)를 검정하였다. RT-PCR을 위한 간단하고 신속한 바이러스 핵산의 조즙액 추출법이 개발되었으며, CMV 외피단백질 유전자 부위를 기초로 하여 제작한 20개의 염기로 구성된 primer를 사용하여 RT-PCR을 실시한 결과, 약 490 염기쌍의 DNA 단편들이 이병식물의 조즙액으로부터 증폭되었다. *EcoRI* 및 *MspI*을 이용한 RT-PCR 산물의 분석에 의하여, 공시한 7종의 바이러스는 모두 CMV subgroup I으로 동정되었다. Ouchterlony 한천젤 이중 확산법을 이용한 항혈청 검정에서도 7종의 바이러스 모두 CMV-Y의 항혈청과 단일의 침강선을 형성하였다.

## 감사의 말씀

이 논문은 1995년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었습니다.

## 참고문헌

1. Choi, J. K., Kwon, S. B. Lee, S. Y. and Park, W. M. 1990. Some properties of two isolates of cucumber mosaic virus isolated from *Aster yomena* Makino and *Commelina communis* L. *Korean J. Plant Pathol.* 6 : 138-143.
2. Davis, C. and Symons, R. H. 1988. Further implications for the evolutionary relationships between tripartite plant viruses based on cucumber mosaic virus RNA 3. *Virology* 165 : 216-224.
3. De Blas, C., Borja, M. J., Saiz, M. and Romero, J. 1994. Broad spectrum detection of cucumber mosaic virus (CMV) using the polymerase chain reaction. *J. Phytopathol.* 141 : 323-329.
4. Devergne, J. C. and Cardin, L. 1973. Contribution a l'etude du virus de la mosaïque du concombre (CMV) IV. Essai de classification de plusieurs isolats sur la base de leur structure antigenique. *Ann. Phytopathol.* 5 : 409-430.
5. Ding, S., Li, W. and Symons, R. H. 1995. A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *EMBO J.* 14 : 5762-5772.
6. Edwards, M. C. and Gonsalves, D. 1983. Grouping of seven biologically defined isolates of cucumber mosaic virus by peptide mapping. *Phytopathology* 73 : 1117-1120.
7. Franki, R. I. B. 1985. *The Plant Viruses*, Vol. 1. Polyhedral virions with tripartite genome. Plenum, New York and London.
8. Franki, R. I. B., Mossop, D. W. and Hatta, T. 1979. Cucumber mosaic virus. *CMV/AAB Descriptions of*

- Plant Viruses No. 213. In: *Description of Plant Viruses, Association of Applied Biologists*. Kew, Surrey, England.
9. Hasse, A., Richter, J. and Rabenstein, F. 1989. Monoclonal antibodies for detection and sero-typing of cucumber mosaic virus. *J. Phytopathol.* 127 : 129-136.
  10. Gonda, T. J. and Symons, R. H. 1978. The use of hybridization analysis with complementary DNA to determine the RNA sequence homology between strains of plant viruses: Its application to several strains of cucumoviruses. *Virology* 88 : 361- 370.
  11. Hayakawa, T., Nakajima, M. and Suzuki, M. 1989. Complete nucleotide sequence of RNA 3 from cucumber mosaic virus (CMV) strain O: comparative study of nucleotide sequences and amino acid sequences among strains O, Q, D and Y. *J. Gen. Virol.* 70 : 499-504.
  12. Navot, N., Zeidan, M., Pichersky, E., Zamir, D. and Czosnek, H. 1992. Use of polymerase chain reaction to amplify tomato leaf curl virus DNA from infected plants and viruliferous whiteflies. *Phytopathology* 82 : 1199-1202.
  13. Nishiguchi, M., Mori, M., Suzuki, F., Nagata, R., Morishita, T., Sakai, J., Hanada, K. and Usugi, T. 1995. Specific detection of a severe strain of sweet potato feathery mottle virus (SPFMV-S) by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* 61 : 119-122.
  14. Nitta, N., Masuta, C., Kuwata, S. and Takanami, Y. 1988. Comparative studies on the nucleotide sequence of cucumber mosaic virus RNA 3 between Y strain and Q strain. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 54 : 516-522.
  15. Normand, R. A. and Pirone, T. P. 1968. Differential transmission of strains of cucumber mosaic virus by aphids. *Virology* 36 : 538.
  16. Ouchterlony, O. 1962. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis In: *Allergy*, ed. by P. Kallos and B. H. Waksman, Vol. IV, pp. 30-154. Karger, Basel.
  17. Owen, J. and Palukaitis, P. 1988. Characterization of cucumber mosaic virus. I. Molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains. *Virology* 166 : 495-502.
  18. Owen, J., Shintaku, M., Aeschleman, P., Tahar, S. B. and Palukaitis, P. 1990. Nucleotide sequence and evolutionships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA 3. *J. Gen. Virol.* 71 : 2243-2249.
  19. Palukaitis, P., Roossinck, M. J., Dietzgen, R. G. and Franky, R. B. 1992. Cucumber mosaic virus. *Adv. Virus Res.* 41 : 281-348.
  20. Park, W. M., Ryu, K. H. and Choi, J. K. 1990. Properties and purification of cucumber mosaic virus As strain. *Korean J. Plant Pathol.* 6 : 393-401.
  21. Park, W. M., Ryu, K. H., Kim, S. J. and Choi, J. K. 1995. Rapid detection and identification of cucumber mosaic virus by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) and restriction analysis. *J. Plant Biol.* 38(3) : 267-274.
  22. Quemada, H., Kearney, C., Gonsalves, D. and Slightom, J. L. 1989. Nucleotide sequences of the coat protein genes and flanking regions of cucumber mosaic virus strain C and WL RNA 3. *J. Gen. Virol.* 70 : 1065-1073.
  23. Rizos, H., Gunn, L. V., Pares, R. D. and Gillings, M. R. 1992. Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.* 73 : 2099-2103.
  24. Roberson, N. L., French, R. and Gray, S. M. 1991. Use of group specific primers and polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. *J. Gen. Virol.* 72 : 1473-1477.
  25. Rybicki, E. and Hughes, F. L. 1990. Detection and typing of maize streak virus and other distantly related geminiviruses of grasses by polymerase chain reaction amplification of a conserved viral sequence. *J. Gen. Virol.* 71 : 2519-2526.
  26. Singh, Z., Jones, R. A. C. and Jones, M. G. K. 1995. Identification of cucumber mosaic virus subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR. *Plant Dis.* 79 : 713-716.
  27. Shintaku, M. 1991. Coat protein gene sequences of two cucumber mosaic virus strains reveal a single amino acid change correlating with chlorosis induction. *J. Gen. Virol.* 72 : 2587-2589.
  28. Takamatsu, S., Lin, B., Furuta, H. and Makara, K. 1994. RT-PCR mediated cloning and sequence analysis of lily symptomless virus coat protein gene. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* 60 : 487-490.
  29. Takanami, Y. 1981. Striking change in symptoms on cucumber mosaic virus infected plants induced by a satellite RNA. *Virology* 109 : 120-126.