

토마토에서 분리된 담배 모자이크 바이러스 외피단백질 유전자의 cDNA 클로닝 및 염기서열 분석

이철호 · 이영기 · 강신웅 · 박은경*
한국인삼연초연구원
(1996년 11월 1일 접수)

Complementary DNA Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of Coat Protein Gene from TMV Tomato Strain

Cheong Ho Lee, Yung Gi Lee, Shin Woong Kang and Eun Kyung Park*
Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea
(Received Nov. 1, 1996)

Abstract : Tobacco mosaic virus (TMV) tomato strain was isolated from tomato "Seo-Kwang" in Korea. The virion was purified by density gradient centrifugation, and total viral RNA was isolated from the purified particles. Coat protein (CP) cDNA of the virus was synthesized by RT-PCR, and the purified cDNA fragment was subcloned to pBluescript II SK-. The analysis of nucleotide sequence showed that this cDNA was 693 nucleotides long from the insert of clone p1571 and p1572 which contain complete codons of the viral coat protein gene (474 nucleotides) and 3' untranslated region. The nucleotides of coat protein encoding cDNA of the strain were 6 nucleotides less than that of TMV common strain isolated from tobacco plant in Korea. The CP gene showed 70% maximum homology with that of the common strain in the nucleotide level and 86% maximum homology in amino acid level.

Key words : tobacco mosaic virus, coat protein, strain, sequence.

* 연락처자 : 305-345, 대전광역시 유성구 신성동 302, 한국인삼연초연구원

* Corresponding author : *Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, 302 Sinseong-Dong, Yuseong-Ku, Taejon 305-345, Korea*

기존의 바이러스 동정체계는 크기, 외피의 모양이나 구조 등을 중심으로 현미경으로 볼 수 있는 형태와 기주범위 및 병징에 따라 분류되었다. 그러나 최근에 급속도로 발전한 생화학, 면역학, 분자생물학적 실험방법들에 의해 바이러스의 분리 동정은 분자적 수준에서 많이 이루어지고 있다. 유전정보를 함유하는 핵산(DNA와 RNA)의 서열에서 나타내는 차이와 이로부터 발현되는 단백질의 아미노산 서열차이 등이 바이러스의 종류 및 계통 분류에 많이 이용되고 있다. 국내의 토마토에서 일반적으로 분리되는 TMV tomato 계통의 경우도 이미 발표된 다른 계통의 TMV들과 물리·화학적 인 차이를 보인다(Choi 등, 1989). 특히 연구자들이 담배와 토마토에서 분리한 TMV는 여러 기주식물체에 대한 반응성 검토실험에서 접종엽의 병징과 전신적인 병징에서의 차이를 발견하였고, 또한 각각의 계통으로부터 순화된 외피단백질에 대한 물리·화학적 차이를 발견하였다(박 등, 1993).

따라서 이 연구는 토마토로부터 분리한 TMV tomato 계통을 이용하여 외피단백질 유전자에 대한 염기서열을 잎담배 계통인 TMV common 계통과 비교분석함으로써 분자적 접근에 의한 바이러스 분류체계를 확립하고, 이를 기반으로 식물체 내에서 감염성 바이러스를 보다 빠르게 동정 및 진단하고, 최근에 관심이 집중되고 있는 유전자 도입 기술을 이용한(Beachy 등, 1990 ; Powell 등, 1986) 바이러스 저항성 식물체 품종을 육성하기 위한 기초자료를 얻고자 수행하였다.

재료 및 방법

바이러스의 증식 및 순화 : TMV tomato 계통은 국내 토마토에서 분리된 것을 공시 바이러스로 하였으며(박 등, 1993), 토마토 “서광토마토” 품종에 접종하여 3주 후 이병엽을 채취하여 바이러스의 순화 재료로 사용하였다. TMV common 계통은 *Nicotiana tabacum* cv. NC82에서 분리한 것을 동일 품종의 담배에 접종하고 3주 후 이병엽을 채취하여 순화 재료로 사용하였다. 바이러스의 정제를

위한 완충용액으로는 0.5M phosphate buffer (pH 7.2)를 사용하였으며 1% mercaptoethanol 용액이 포함된 완충용액에서 조직을 마쇄하고 0.8% buthanol로 정화하였다. 이를 4%의 PEG(polyethylene glycol) 8000용액에서 2회 원심분리하여 바이러스 침전물을 획득하고 38%의 cesium chloride용액에서 density gradient centrifugation을 실시하여 순수한 바이러스를 분리하였다(이 등, 1996).

바이러스 total RNA 분리 : 약 100 µg의 순화된 각각의 바이러스 100 µl에 동일 부피의 acid phenol을 첨가하고 잘 섞은 다음, 다시 100 µl의 24:1 chloroform/isoamyl alcohol을 첨가한 후 흔들어 섞어주고 이를 얼음에서 15분 동안 정치하였다. 이 시료를 4°C, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취한 뒤 동일 부피의 isopropyl alcohol을 첨가한 다음 -20°C에서 2시간 동안 방치하였다. 이를 4°C, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 침전물을 취한 다음 80% ethyl alcohol로 다시 부유시킨 후 이를 원심분리하여 상층액을 제거하고 speed vacuum에서 말린 다음 약 5 µg의 viral RNA를 50 µl의 RNase inhibitor(0.1% diethyl pyrocarbonate)가 처리된 증류수에 녹여서 다음 실험에 사용하였다.

RT-PCR에 의한 외피단백질 cDNA 합성 : 바이러스 total RNA에 대한 상보적인 가닥의 합성은 cDNA synthesis kit (Boehringer Mannheim)를 이용하여 수행하였다(Sambrook 등, 1989). 각 바이러스 total RNA 1 µg에 4 µl의 buffer를 첨가하고 25 unit의 RNase inhibitor, 각각 10 nM인 dNTP mixture, 5 pM의 cp2 primer (⁵GGATCCTGCAGCCTGGGCCCCCTA³) 그리고 20 unit의 AMV reverse transcriptase를 첨가하여 전체 부피가 20 µl가 되게 한 후 42°C에서 1시간 동안 반응하였다. 반응이 끝난 후 이 반응액에 10X Taq. buffer 10 µl, 100 µM의 dNTP, 2 unit의 Taq. polymerase, cp1 primer (⁵CAGCTGCAGTTTTAAATAIGTCTTA³) 그리고 cp2 primer 10 pM씩을 첨가한 다음 polymerase chain

증폭반응을 수행하였다. 이때 preheating은 95°C 에서 15분간 행하고 95°C denaturation 반응 1분, 45°C annealing 반응 2분, 68°C extension 반응 3분의 반복된 과정을 35회 반복하여 수행하였다.

외피단백질 cDNA의 클로닝 및 염기서열 분석 :
증폭된 외피단백질 cDNA를 glass powder를 이용하여 순화한 다음(Vogelstein 등, 1979), 제한효소 *Pst*I으로 처리하여 이를 다시 순화하였다. 순화된 외피단백질의 cDNA는 재조합 벡터 pBluescript II SK-의 *Pst*I 위치에 T₄ DNA ligase를 이용하여 재조합하였고(Sambrook 등 1989), 제한효소를 이용하여 방향성을 결정하였으며, southern hybridization법(Brent 등, 1987)에 의해 cDNA 유전자의 삽입을 확인하였다. 확인된 재조합 clone을 T7 sequencing kit(Parmacia)를 이용한 dideoxy chain termination법에 의해(Hattori 등 1986 ; Sanger 등, 1977) 염기서열을 분석하였으며, 염기서열이 결정된 TMV tomato 계통의 외피단백질 cDNA는 대조구인 TMV common 계통의 외피단백질 cDNA 염기서열과 비교하였으며 유추된 아미노산 서열도 비교하였다.

결과 및 고찰

바이러스의 증식 및 순화 : TMV tomato 계통과 common 계통에 대해 병징이 나타난 기주 식물체의 잎으로부터 순화를 실행하였다. 각각의 순화된 바이러스의 양은 이병엽 100 g당 TMV common 계통은 172 mg이었으며 tomato 계통의 경우 토마토에서 증식하였을 때 189 mg을 얻었다.

RT-PCR에 의한 외피단백질 cDNA 합성 및 클로닝 : 순화된 TMV common 계통과 TMV tomato 계통으로부터 각각 total RNA를 순수분리하고 cDNA를 합성한 후 이를 target DNA로 하여, TMV 외피단백질 유전자를 합성하기 위하여 구상된 2개의 primer (TMV cp1 : ^{5'}CAGCTGCAGTTTTAAATATGCTCTA^{3'}, TMV cp2 : ^{5'}GGATCCTGCAGCCTGGGCCCTA^{3'})를 사용하여 PCR을 실시한 후 0.8% agarose

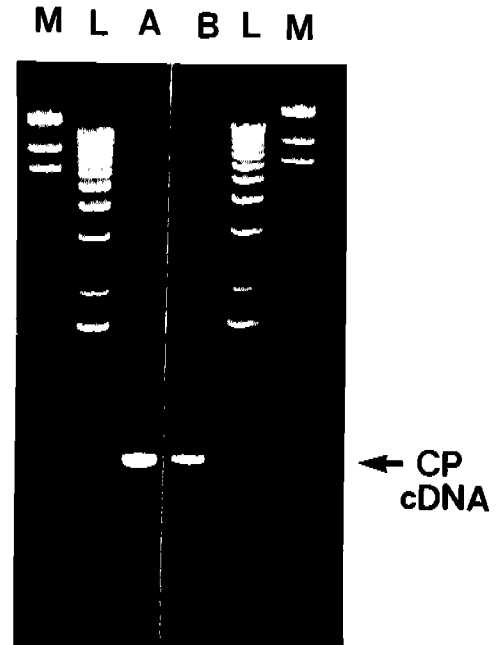


Fig. 1. Electrophoregram of the TMV CP cDNA fragments synthesized by RT-PCR.

Lane M : λ / Hind III marker.

Lane L : 1 kbp ladder.

Lane A : PCR product of TMV-common CP cDNA.

Lane B : PCR product of TMV-tomato CP cDNA.

gel에서 전기영동을 한 결과 TMV 외피단백질 관련유전자를 포함하는 약 700 bp 정도의 DNA 가닥이 합성되었음을 확인하였다(Fig. 1). TMV tomato 계통의 경우 common 계통과 달리 약 300 bp의 DNA 절편이 동시에 증폭되었으며 이는 TMV tomato 계통의 full sequence중에 primer에 대한 homology가 비교적 높은 염기서열이 존재하고 있음을 알수 있었다. Agarose gel로부터 순수분리한 각 계통별 외피단백질 cDNA를 포함하고 있는 DNA 가닥을 pBluescript II SK-의 *Pst*I 위치에 삽입시켰으며, 외피단백질 cDNA 가닥이 삽입된 클론 중, *E. coli*의 *lacZ* promoter의 방향에 대하여 정방향 또는 역방향으로 삽입된 클론들을 선발하였다. TMV common 계통의 경우 정방향으로 삽입

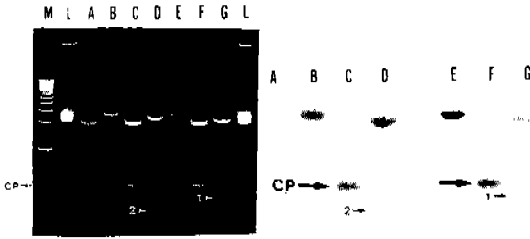


Fig. 2. Restriction enzyme band patterns and Southern hybridization of p1521 and p1522 - TMV common strain

M : 1 Kbp ladder, L : 100 bp ladder, A : pBSII SK-*Hind*III cut, B : p1521 *Hind*III cut, C : p1521 *Pst*I cut, D : p1521 *Sac*I cut, E : p1522 *Hind*III cut, F : p1522 *Pst*I cut, G : p1522 *Sac*I cut. CP indicates the coat protein gene fragment of TMV-common strain; Fragment 1 indicates *Sac*I fragment of p1522 plasmid; forward insertion of CP cDNA fragment against the *lacZ* promoter; Fragment 2 indicates *Sac*I fragment of p1521 plasmid; reverse insertion of CP cDNA fragment against the *lacZ* promoter.

된 클론을 p1522로 명명하였고 역방향으로 삽입된 클론은 p1521로 명명하였으며 TMV tomato 계통의 경우에도 p1571, p1572를 각각 정,역방향으로 삽입된 클론으로 명명하였다. 이때 삽입된 각계통에 해당하는 외피단백질 cDNA의 방향성 및 올바른 삽입을 제한효소반응과 Southern hybridization에 의하여 확인하였다(Fig. 2, Fig. 3).

외피단백질 cDNA의 염기서열 분석. 기존의 TMV *vulgare* 계통과 거의 동일한 염기서열을 지니고 있으며, 외피단백질을 구성하고 있는 유전자의 염기서열에서는 동일한 염기서열을 지니고 있는 것으로 알려진 바 있는(Koh 등, 1992) TMV common 계통(p1521, p1522)과 비교하여 TMV tomato 계통(p1571, p1572)에 대한 외피단백질 cDNA의 유전자의 구성상의 동질성 여부를 알아보고자 염기서열을 분석하였다(Fig 4). 그 결과 분석된 TMV 외피단백질 유전자(cDNA) 부위는 TMV common 계통의 경우 3' non-coding region을 포함하여 693bp였으며 외피단백질 부위에 해당하는 유전자의 길이는 480bp였다. 반면에 TMV tomato 계통의 경우는

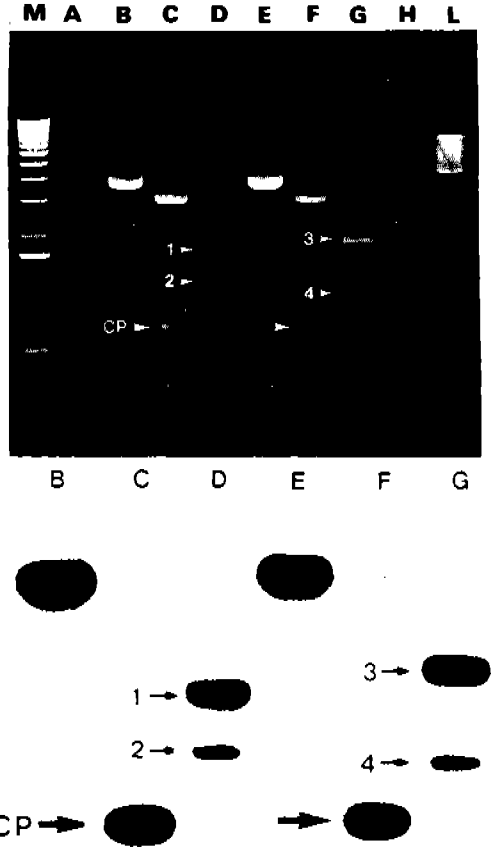


Fig. 3. Restriction enzyme band patterns and Southern hybridization of p1571 and p1572 - TMV tomato strain

M : 1 Kbp ladder, L : 100 bp ladder, A : pBSII SK-*Hind*III cut, B : p1561 *Xho*I cut, C : p1571 *Pst*I cut, D : p1571 *Dra*I cut, E : p1572 *Xho*I cut, F : p1572 *Pst*I cut, G : p1572 *Dra*I cut. White arrow and CP (lane C&F) indicate the coat protein gene fragments of TMV-tomato strain; Fragments 1 & 2 (lane D) indicate *Dra*I fragments of p1571 plasmid, forward insertion of CP cDNA fragment against the *lacZ* promoter; Fragments 3 & 4 (lane G) indicate *Dra*I fragments of p1572 plasmid, reverse insertion of CP cDNA fragment against the *lacZ* promoter.

3' non-coding region을 포함하여 681bp였고 외피단백질을 구성하는 open reading frame(ORF) 부위에 해당하는 유전자의 길이는 474bp로 6개의 염기가

토마토에서 분리된 담배 모자이크 바이러스 외피단백질 유전자의 cDNA 클로닝 및 염기서열 분석

CAGATGCAGGTTTAAATATTCTCTTA (CP1 primer)

CM 1 GTTTTAAATATTCTCTACAG TATCACTACT CCATCTCAGT TCGTGTCTT
 TM 1 GTTTTAAATATTCTCTACAG AGTTTCCAGT GCCAATCAAT TAGTGTATTT

51 GTCATCAGG TGGGCCGACC CAATAGAGTT AATTAATTTA TGTACTAATG
 51 AGGTTCTGT TGGGCCGATC CATTAGAGTT ACAAATCTA TGTACTTCGG

101 CCTAGGAAA TCAGTTTCAA ACACAACAAG CTCGAACCTG CGTTCAAAGA
 101 CGTTAGGTA TCAAGTTTCAA ACACAGCAGG CTAGAAGTAC GGTTCACAG

151 CAATTCAGTG AGGTGTGGAA ACCTTCACCA CAAGTAACTG TTAGGTTCCG
 151 CAGTCTCTG ATGTGTGGAA GACCATACCG ACCCTACAG TTAGATTTCC

201 TGACAGTGAC TTTAAGGTGT ACAGGTACAA TGCCGTATTA GACCCGCTAG
 201 TGCTACTGGT TTCAAAGTGT TTGATATAA TGCCGTGCTA GATTTCTTAG

251 TCACAGCACT GTTAGGTGCA TTCGACTATA GAAATAGAAT AATAGAAGTT
 251 TGTCGGCACT TCTCGGAGCC TTGATAGTA GGAATAGGAT AATAGAAGTA

301 GAAAATCAGG CGAACCOCAC GACTGCCGAA ACGTTAGATG CTAAGCTGAG
 301 GAAAATCCGC AAAATCCTAC AACTGCCGAG ACGCTTGATG CGACCGAGCG

351 AGTAGACGAC GCAACGGTGG CCATAAGGAG CGGATAAAT AATTTAATAG
 351 GGTAGATGAT CGGACGGTGG CCATTAGGGC CAGTATAAGT AACCTCATGA

401 TAGAATTGAT CAGAGGAACC GGATCTTATA ATCCGAGCTC TTTCCGAGGC
 401 ATGAGTTAGT TCGTGGCAGC GGAATGTACA ATCAGGCTCT GTTCCGAGGC

451 TCTTCTGGTT TGGTTTGGAC CTCTGGTCTT GCAACTTGGG GTAGTCAAGA
 451 GCGAGTGGAC TCACCTGGGC TACAACCTCT TAGAGATGAT GGTGTAATA

501 TGCAATAATA ATAACGGATT GTGTCCGATA TCACACGTGG TCGTACGAT
 501 AGTTGAGCGA ACGTTAAACG TCCGTGGCGA GTACGATAAC TCGTAGTGT

551 AACGCATAGT GTTTTTCCTT CCACITAAAT CGAAGGGTGG TGTCTTGAT
 551 TTTCCCTCCA CTTAATGGA AAGGGTGTTC GTTAGGATGG AACCCAAITTA

601 CGCGCGGGTC AAATGTATAT GGTTCATATA CATCCGCAGG CAGGTAATAA
 601 AATACATGTG TGACGTGTAT TTGCGAAGCA CGTAATTATT TTCAGGGGTT

651 AGCGAGGGGT TCGAATCCGC CGTGTACCCG CGGTAGGGGC CCA 693(100%)
 651 CGAATCCGC CGAACCGGGG GTAGGGGCC A 681(70%)
 ATCCCGGGG TCCGACGTCTAGG (CP2 primer)

Fig. 4. DNA sequences of coat protein genes of TMV-common and TMV-tomato strain and 3' untranslated regions.

CM: TMV-common strain ; TM: TMV-tomato strain. Shadowed ATG codons are starting codons and underlined TGA codons are termination codons.

		5	10	15	20	25	30
CM	1	MSYSITTPSQFVFLSSAWADPIELINLCTN					
TM	1	MSYTVSSANQLVYLGSVWADPLELQNLCTS					
	31	ALGNAFQTQARTVVQRQFSEVWKPSQVTT					
	31	ALGNQFQTQARTTVQQQFSDVWVKTIPTAT					
	61	VRFPDSDFKVYRYNAVLDPVLTALLGAFDT					
	61	VRFPATGFKVRYNAVLDSLVSALLGAFDS					
	91	RNRIIEVENQANPTTAETLDRRVDATV					
	91	RNRIIEVENPQNPTTAETLDRRVDATV					
	121	AIRSAINNLIVELIRGTGSYNRSSFESSSG					
	121	AIRASISNLMNELVRGTGMYNQALFESASG					
	151	LVWTSGPAT* (100%) MW 17,623					
	151	LTWATTP* (86%) MW 17,242					

Fig. 5. Expected amino acid sequence analysis of the TMV coat proteins derived from cDNA sequencing data.

CM: TMV common strain ; TM: TMV tomato strain. The underlined M is the methionine, a starting amino acid.

적은 것으로 판명되었다. 이 두 계통 간의 DNA 염기서열 최대 유사도를 조사한 결과 70%를 나타냈으며(Fig. 4), PROSIS를 통한 외피단백질의 크기를 비교분석한 결과, TMV common 계통의 경우는 160개의 아미노산으로 구성되어 있으며 그 분자량은 약 17.62 kDa, TMV tomato 계통은 2개의 아미노산이 줄어든 158개의 아미노산으로 구성되어 있고 약 17.26 kDa의 분자량을 나타내는 것으로 추정되었다. 이들에 대한 아미노산 구성의 최대 유사도는 86%로 나타났으며(Fig. 5), 이는 이들 두 계통에 대한 peptide mapping 결과의 차이를 뒷받침하고 있다(박 등, 1993). 따라서 비록 이들 두 계통간의 유사도가 비교적 높다 하여도 이러한 아미노산 수의 차이가 발현된 외피단백질에 대한 3차원적 형태의 차이를 나타냄으로써 병징 및 혈청학적 차이를 보인다고 생각할 수 있다. 현재 TMV

tomato 계통의 경우 염기서열의 분석 결과는 GenBank에 L35074으로 등록하였다.

결 론

국내에서 재배되고 있는 토마토 “서광토마토”로부터 분리된 TMV tomato 계통을 density gradient centrifugation을 이용하여 순화하였다. 이로부터 바이러스의 total RNA를 분리하였고 RT-PCR에 의하여 TMV tomato 계통의 외피단백질 cDNA를 합성, 증폭하였으며 이를 pBluescript II SK- 벡터에 재조합하였다. 본 실험에서 바이러스 외피단백질과 3' non-coding region을 포함하는 재조합 클론 p1571과 p1572로부터 염기서열을 분석하였고 그 결과로 474 염기의 외피단백질 유전자를 포함하는 681 염기가 합성되었음을 확인하였으며 이것과 TMV common 계통으로부터 합성된 외피단백질 cDNA와의 최대 유사도는 70%였다. 또한 유추된 아미노산 서열에서 이들 두 계통간의 최대 유사도는 86%였다.

참 고 문 헌

1. Beachy, R. N., Loesch-Fries, S. and Turner, N. E. (1990) Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28:451-474.
2. Brent, R., Ausubel, F. M., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. pp. 2.9.1-2.9.17. Wiley Interscience.
3. Choi, J. K., Park, Y. S., Kim, J. O. and Park, E. K. (1989) Biological characterization of a strain of tobacco mosaic virus isolated from hot tomato. *Korean J. Plant Pathol.* 5:331-336.
4. Koh, H. G., Song, E. K., Lee, S. Y., Park, Y. I. and Park, W. M. (1992) Nucleotide sequence of cDNA of the tobacco mosaic virus RNA isolated in Korea. *Nucleic Acids Research* 20:5474.
5. Hattori, M. and Sakaki, Y. (1986) Dideoxy DNA sequencing method using denatured plasmid templates. *Anal. Biochem.* 152:232-238
6. 이영기, 이청호, 강신용, 박은경 (1996) 고추에서 분리된 담배 모자이크 바이러스 외피단백질 유전자의 cDNA 클로닝 및 염기서열 분석. *한국식물병리학회지.* 12(2) : 182-186.
7. 박은경, 김남원, 박성원, 이청호, 이영기, 이기원 (1993) 바이러스 방제 및 항균 살충 생물제어 기술 개발. *담배연구보고서(연초경작 육종 및 환경편)*. pp. 59-144. 한국인삼연초연구원.
8. Powell Abel, P. A., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley R. T. and Beachy, R. N. (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232:728-743.
9. Sambrook, J., Fritsh E. F. and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed, pp. 1.63-1.73 Cold Spring Harbor Laboratory Press.
10. Sambrook, J., Fritsh E. F. and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed, pp. 8.11-8.13 Cold Spring Harbor Laboratory Press.
11. Sanger, F., Nicker, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
12. Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:615.