

RT-PCR 기법을 이용한 효과적인 감자바이러스 Y의 검정

정영희 · 전재홍 · 최경화 · 김현순 · 이홍섭 · 정 혁*
생명공학연구소 식물조직배양 연구 Unit

An Effective Detection of Potato Virus Y Using RT-PCR Technique

Young Hee Joung, Jae Heung Jeon, Kyung Hwa Choi, Hyun Soon Kim,
Yong Sub Yi and Hyouk Joung*

Plant Tissue Culture Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience &
Biotechnology (KRIBB), P.O. Box 115, Yusong, Taejeon, 305-600, Korea

ABSTRACT: A RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) diagnostic method for potato virus Y (PVY) was developed using primer pair derived from conserved region of coat protein genes of several PVY strains. A 764 bp PCR product was detected from several lines of potato cv. Atlantic. We could prove that the 764 bp DNA fragment was indeed the PVY gene by sequencing analysis. PVY detection method using RT-PCR technique was about 1,000 times more sensitive than enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) in shoot and tuber tissue.

Key words: coat protein gene, ELISA, Potato virus Y (PVY), RT-PCR

감자바이러스 Y(PVY)는 즙액으로 감염되거나 진딧물에 의해 전염되는 바이러스로서 전세계적으로 가장 많이 퍼져있는 바이러스 중에 하나이며, 생산량의 80% 정도까지도 감소시킬 수 있는 바이러스이다. 특히 potato virus S, X 등 다른 감자바이러스와의 복합감염으로 심각한 병징을 일으키기도 한다(1). PVY는 *Nicotina tabacum*, *Physalis floridana*, *Solanum tuberosum* cv. Duke of York 등에 나타나는 증상에 의해 PVY⁰, PVY^N, PVY^C 등의 여러 계통으로 구분되는데 PVY⁰는 common strain으로 감자에 crinkle rugosity, leafdrop streak 등의 심각한 증상을 일으키고, PVY^N은 담배에서 잎맥괴저 등의 증상을 유발시키고 감자에서는 mild mottling 증상을 유발시킨다. 또 PVY^C는 mild mosaic과 stipple-streak 등의 병징을 유발시키는 strain이다(5).

영양번식 작물인 감자에 있어서 여러 가지 감자바이러스에 의한 씨감자의 감염은 수확량에 치명적인 영향을 미치기 때문에 각국에서는 씨감자의 생산과 수출입시 이들의 검정을 필수적인 사항으로 정하여 엄격히 통제하고 있다. 그러므로 이들의 검정 방법들이 오래 전부터 개발되었는데, 특히 각각의 바이러스들의 외피단백질에 대한 항체를 만들어 ELISA로 검

정하는 방법이 일반적으로 사용되고 있다(3). 하지만 시간이 오래 걸리고 감염정도가 미약한 경우 감염여부를 판정하기가 어려울 뿐만 아니라 PVY 같이 계통간의 외피단백질의 변이가 심한 경우 monoclonal antibody로는 모든 계통에 적용하여 PVY를 검정하기가 어려운 경우도 있다(8). 이런 문제점들을 해결하기 위하여 최근에는 특정 유전자만을 증폭시킬 수 있는 PCR을 이용한 바이러스 검정법 등이 개발되고 있는데 식물바이러스의 경우 DNA 바이러스의 검정뿐 아니라 reverse transcriptase를 이용한 RNA 바이러스에 대한 검정도 활발하게 연구되고 있다(6, 7, 9, 14).

본 연구에서는 이미 밝혀진 여러 계통의 PVY 외피단백질 염기서열중 상동성이 가장 큰 부위에서 primer를 합성하여 RT-PCR에 의해 모든 계통의 PVY를 검정할 수 있는 방법을 개발하고자 하였으며 또한 기존의 일반적인 감자바이러스 검정방법인 ELISA 방법과 그 민감도를 비교하여 보았다.

재료 및 방법

식물재료. 실험의 공시 재료로는 감자 재배포장에서 수확한 *Solanum tuberosum* cv. 대서의 괴경을 사용하였으며 바이러스 무병한 전전 대조구로는 정(10)의

*Corresponding author.

방법에 의해 기내 배양되고 있는 *Solanum tuberosum* cv. Desiree를 사용하였다.

ELISA. ELISA를 이용한 감자바이러스 Y(PVY)의 검정은 PVY combination kit(Boehringer Mannheim, Cat No. 6647420)를 사용하였으며 이 제품의 사용방법에 따라 조직과 시료완충액의 혼합비를 1:20(W/V)으로 하여 마쇄한 다음 사용하였다.

RNA 분리. Elise 등(4)의 방법을 변형시킨 phenol extraction 방법을 사용하였는데, 먼저 약 100 mg 정도의 식물조직을 마쇄한 다음 400 μ l phenol과 400 μ l extraction buffer(1M Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS)를 넣고 70°C에서 5분간 방치한 후 원심분리하여 다시 phenol을 2회 처리한 다음 ethanol로 침전시켜 total RNA를 분리하였다.

Primer 합성. 기존에 밝혀진 23 strain의 PVY 외피 단백질 유전자들간의 상동성을 비교하여 strain간의 상동성이 가장 높은 부위에서 764 bp의 DNA 절편이 합성되도록 primer를 고안하였는데 upstream primer로는 5'-CTATCACGTCCAAAATGAGAATGCC-3', downstream primer로는 5'-CACCGTCCAACCCGAAAAGTCGAG-3'을 합성하여 사용하였다.

RT-PCR. RT-PCR은 GeneAmp RNA PCR kit (Perkin Elmer Cetus사, Cat No. 808-0017)을 구입하여 사용하였다. 먼저 16 μ l의 RT master mix(50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 10 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 1U RNase inhibitor, 2.5U reverse transcriptase)에 3 μ l RNA solution, 1 μ l downstream primer(50 pmol)를 넣고 42°C에서 15분, 99°C 5분, 5°C 5분 동안 반응시켜 PVY의 cDNA를 합성하였다. 이 RT 반응액 10 μ l을 40 μ l의 PCR mixture(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM upstream primer, 1.25U/50 μ l Amplitaq DNA polymerase)에 섞어 94°C 2분, 65°C 45초, 72°C 2분의 조건으로 1 cycle, 94°C 45초, 65°C 45초의 조건으로 33 cycle, 94°C 45초, 65°C 45초, 72°C 2분의 조건으로 1 cycle의 PCR 반응을 수행하였으며 이 RT-PCR 산물을 1% agarose gel에서 전기영동으로 확인하였다.

Cloning 및 sequencing. RT-PCR에서 얻은 764 bp의 cDNA를 분리하여 PCR-Script SK(+) 벡터에 cloning한 뒤 silver sequencing kit(Perkin Elmer Cetus사)를 사용하여 PVY의 염기서열을 확인하였다.

결 과

ELISA에 의한 PVY 검정. Granola 품종 1 line과

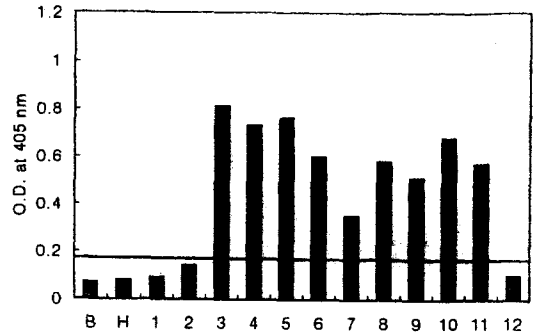


Fig. 1. PVY detection by ELISA. ELISA results, given as mean A405 of 3 replicate tests. B, buffer control; H, healthy potato(cv. Desiree) tuber; Bar 1, potato cv. Granola tuber; Bars 2-12, potato cv. Atlantic tuber. Horizontal line marks positive cutoff at 0.16 (twice healthy mean).

대서 품종 11 line, 건전 대조구인 Desiree 품종의 괴경을 사용하여 ELISA 방법으로 PVY를 검정한 결과 9개의 대서 line에서 PVY가 검정되었고 나머지 대서 2 line과 Granola에서는 PVY가 검정되지 않았다(Fig. 1). 이때 이병판정기준은 Mumford 등(11)의 방법에 따라 405 nm의 흡광도 수치가 건전 대조구의 2배 이상인 식물체를 감염되었다고 판별하였다.

RT-PCR에 의한 PVY 검정. 100 mg의 괴경조직에서 분리한 RNA를 50 μ l의 DEPC(diethyl pyrocarbonate)를 처리한 증류수에 녹인 다음 이 용액 3 μ l을 RT-PCR에 이용한 결과 ELISA에 의해 감염이 확인된 9개의 line 뿐만 아니라 PVY가 감염되지 않은 것으로 판정된 2 line의 대서 품종에서도 PVY 유전자라고 여겨지는 764 bp의 DNA 절편이 합성되었다. 하지만 Granola 품종과 건전 대조구로 사용한 Desiree에서는

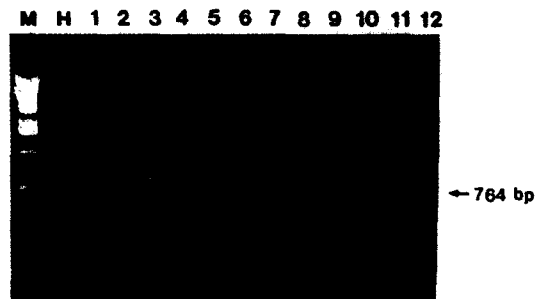


Fig. 2. Detection of PVY by RT-PCR. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products produced using RNA templates isolated from tuber of various potato cultivars. M, 100 bp DNA ladder; H, healthy potato cv. Desiree; Lane 1, potato cv. Granola; Lanes 2-12, potato cv. Atlantic.

764 bp의 DNA 절편이 합성되지 않았다. 그리고 이때의 결과를 비교해 보면 DNA band의 농도와 ELISA의 405 nm 흡광도가 비례하는 것으로 나타났다(Fig. 2).

염기서열 확인. Fig. 2의 lane 4와 12에서 PVY의 cDNA라고 추정되는 764 bp의 PCR 산물을 pCR-Script SK(+) 벡터에 cloning시킨 후 *E. coli* DH5 α 에 transformation시킨 다음 764 bp의 DNA 절편이 삽입된 클론의 plasmid DNA만을 분리하여 sequencing하

거나, 764 bp의 PCR 산물을 정제하여 바로 sequencing하여 정확한 염기서열을 알아본 결과 모두 PVY의 염기서열이 확인되었는데 lane 4와 12에서 분리한 바이러스는 1992년 Makoto Hidaka에 의해 GenBank에 등록된 PVY-T(accession No. D12570)의 염기서열과 일치하였다(Fig. 3).

반응별 민감도 비교. RT-PCR과 ELISA에 의한 검정의 민감도를 비교하기 위해 PVY가 감염된 line(Fig.

PVY-T	GGAAATGACCAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAAGATGCAAAACAAGAGC AAGGTAGCATTCACCAAAAT	75
PVY-O	*****A**AC*****T*****C*****C*****C**GTT***	
PVY-N	*****T*****AC*****C*****G*****C**GTT***	
PVY-M	*****T*****A**AT**G*****C**G*****C**A**G*****T**C**G*****A	
PVY-V	*****T*****A**AT**G*****C**G*****C**A**G*****T**C**G*****A	
PVY-C	*****G**GC*****G**CA*****G**C**A*****C**G*****	
PVY-T	CTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACTCAGACTGTGACACGAATTAAGCTATC	150
PVY-O	*CG*****A**G***A**T*****T*****C***T*****G**A**T*****C**GA*****C**G*****	
PVY-N	<u>CTG*****G*****C*****T*****CA**T*****G**A**T*****G**A**C**G**A*****T**G*****</u>	
PVY-V	*CT*****T*****C**A*****CC**T*****A**T**G**A**C**A**G**A**G*****T	
PVY-C	*CT*****G*****C*****T*****G**A**T*****C**GA*****A*****	
PVY-T	ACGTCCAAAATGAGAATGCCAAGAGTAAGGGTGCACACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTATGCTCCA	225
PVY-O	*****A**C*****A**C**G*****C**A*****C**A*****T*****	
PVY-N	<u>*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****</u>	
PVY-V	*****A*****T**A**C**A**A**A**G**G**C**G**G*****A**C*****G*****C*****C**	
PVY-C	*****A*****C**A**C**A**A**A**G**G**C**G**G*****A**C*****G*****C*****C**	
PVY-T	CAGCAAATTGACATCTCAAATCTCGACCAACACAAATCACAGTTTGATACATGGTATGAAGCAGTACAACCTGCA	300
PVY-O	**A*****T**T*****G*****G*****G*****G*****G**G**A**G*****	
PVY-N	**A*****T**T*****G*****G*****G*****G*****G**G**A**G*****	
PVY-M	**A**G**A**T**T**C**G*****G*****G*****G*****G**G**A**G*****	
PVY-V	**A**G**A**T**T**C**G*****G*****G*****G*****G**G**A**G*****	
PVY-C	*****G*****T*****C*****G*****G*****G*****G*****G**G**A**G*****	
PVY-T	TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTGGTGCATTGAAAATGGAACTCG	375
PVY-O	*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****	
PVY-N	*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****	
PVY-M	*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****	
PVY-V	*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****	
PVY-C	*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****	
PVY-T	CCAAATATCAATGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAG	450
PVY-O	*****G**C*****A*****G**A*****T**G*****G**T*****G*****	
PVY-N	*****G**C*****A*****G**A*****T**G*****G**T*****G*****	
PVY-M	*****C*****C*****A*****G**A*****T**G*****G**T*****G*****	
PVY-V	*****C*****C*****A*****G**A*****T**G*****G**T*****G*****	
PVY-C	*****C*****C*****A*****G**A*****T**G*****G**T*****G*****	
PVY-T	AATGCAAACCAACACTTAGGCAAATCAATGGCACATTCTCAGATATTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAAC	525
PVY-O	*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****	
PVY-N	*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****	
PVY-M	*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****	
PVY-V	*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****	
PVY-C	*****G*****C*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****	
PVY-T	AAGAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTAGTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT	600
PVY-O	**A*****TGG*****A**G*****T*****C**	
PVY-N	**A*****TGG*****A**G*****T*****C**	
PVY-M	**A*****G**C**A*****G**C**A*****G**T*****C**	
PVY-V	**A*****G**C**A*****G**C**A*****G**T*****C**	
PVY-C	**A*****A*****A*****A*****A*****A*****A*****A*****A*****A*****C	
PVY-T	GACTTTTATGAAGTTACATCACGGACACCACTGAGGGCTAGAGAGGCACACATTCAAATGAAGCCCGCAGCTTTA	675
PVY-O	*****G**C*****A*****G**A*****G*****A*****G*****A*****G*****	
PVY-N	*****G**C*****A*****G**A*****G*****A*****G*****A*****G*****	
PVY-M	*****G**C*****A*****G**A*****G*****A*****G*****A*****G*****	
PVY-V	*****G**C*****A*****G**A*****G*****A*****G*****A*****G*****	
PVY-C	**T**C*****G**C*****A*****C**G**A**G**T**C*****A*****G**A**G*****	
PVY-T	AAATCAGCTCAATCTCGACTTTTCGGATTGGATGGTGGCATTAGTACACAGAGGAAAACACAGAGGGCACACC	750
PVY-O	*****C**C*****G*****C*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****	
PVY-N	<u>*****C*****C*****G*****C*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****</u>	
PVY-M	*****C*****C*****G*****C*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****	
PVY-V	*****C*****C*****G*****C*****G*****G*****G*****G*****G*****G*****	
PVY-C	**G*****C*****G*****C*****C*****C*****G*****G*****G*****G*****	
PVY-T	ACCGAGGATGTTTCTCCAAGTATGCATACTCTACTGGAGTGAAGAACATGTGA	804
PVY-O	*****G*****C*****A*****	
PVY-N	*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****	
PVY-M	*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****	
PVY-V	*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****	
PVY-C	*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****C*****	

Fig. 3. The nucleotide sequence of coat protein gene of five PVY strains compared with the PVT-T strain. Identical nucleotides are marked by asterisk. Primer regions are underlined. PVY-T (necrotic strain, unpublished); PVY-C (13); PVY-N (PVY^N strain (12)); PVY-V (vein necrotic strain (2)); PVY-O (PVY^O strain (13)); PVY-M (MsNr strain (13)).

1, Fig. 2 lane 3)의 싹과 괴경에서 각각 RT-PCR과 ELISA를 실시하였다. PVY가 감염된 괴경과 이 괴경에서 1 cm 정도로 발아한 싹에서 각각 RNA를 추출한 후 10배수로 희석하여 RT-PCR를 수행하였고 ELISA 실험에서도 괴경과 싹 조직을 5% 농도로 완충용액에 갈아서 10배수로 희석하여 사용하였다. 싹 조직에서의 RT-PCR 검정에서는 Fig. 4b에서 보여주듯이 10^5 으로 희석한 경우에서까지 희미한 band를 보임으로써 높은 검정의 민감도를 나타내었다. 한편 싹 조직에서 ELISA방법으로 바이러스를 검정한 결과 Fig. 4a에서 보듯이 건전 대조구는 405 nm 흡광도가 0.08였고, 건전 대조구 수치의 2배 이상, 즉 수치가 0.16 이상일때에 감염되었다고 판정하였다. 감염된 품종의 경우 1.06

로 높은 수치를 보였으며 감염된 품종으로부터 10^2 까지 희석하여 ELISA를 실시한 경우 405 nm 흡광도가 0.43의 수치를 나타내어 정확히 감염되어 있음을 확인할 수 있었으나 10^3 로 희석하였을 경우에는 0.17로 감염여부의 판정이 어려웠으며 10^4 - 10^6 으로 희석하였을 경우에는 건전 대조구에서와 비슷한 흡광도를 보였다. 그러므로 싹에서의 민감도는 RT-PCR이 ELISA보다 10^3 배 정도 높음을 알 수 있었다. 괴경에서의 민감도 비교에서도 Fig. 5b에서 보여주듯이 RT-PCR 검정시 10^5 으로 희석한 경우에서까지 희미한 band를 보임으로써 높은 검정의 민감도를 나타낸 반면 ELISA 검정시 감염된 품종의 경우 0.78이었다. 10^1 로 희석한

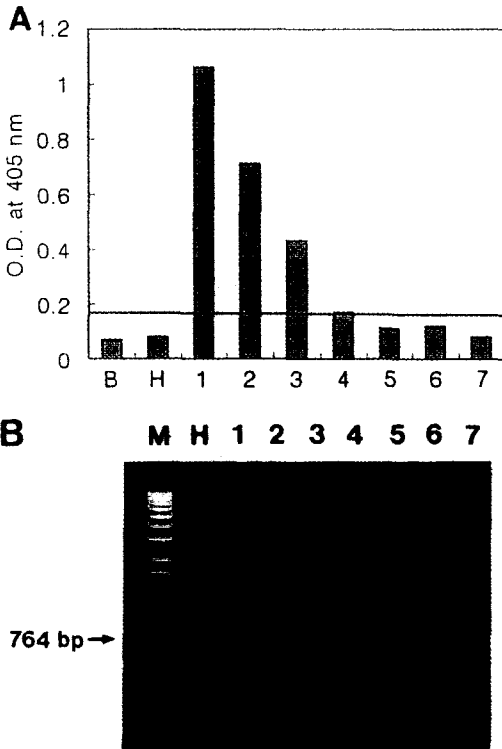


Fig. 4. Comparison of sensitivity between RT-PCR and ELISA in PVY-infected shoot. (A), ELISA results, given as mean A405 of 3 replicate tests. B, buffer control; H, healthy potato (cv. Desiree); Bars 1-7, PVY-infected shoot sap in a ten-fold dilution series (1 to 10^6 , respectively). Horizontal line marks positive cutoff at 0.16 (twice healthy mean). (B), RT-PCR results for dilution series made from total RNA from PVY-infected potato shoot. M, 100 bp DNA ladder; H, healthy potato cv. Desiree; Lanes 1-7, ten-fold RNA dilution series (1 to 10^6 , respectively).

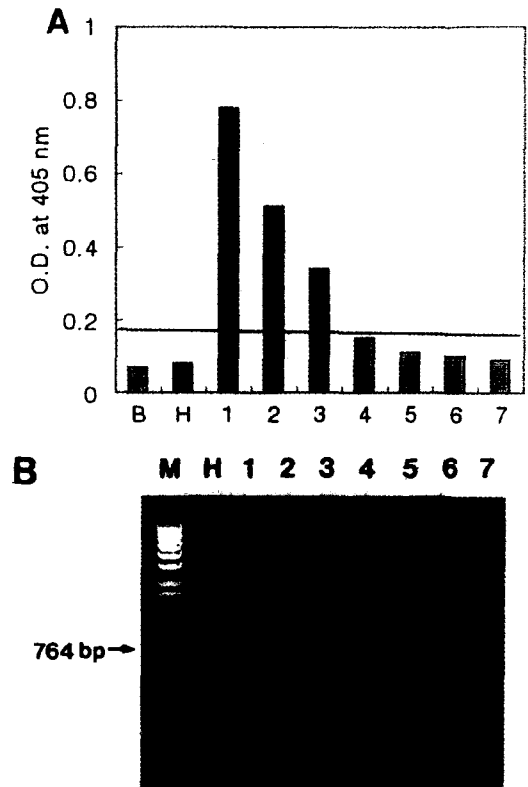


Fig. 5. Comparison of sensitivity between RT-PCR and ELISA in PVY-infected tuber. (A), ELISA results, given as mean A405 of 3 replicate tests. B, buffer control; H, healthy potato (cv. Desiree) tuber; Bars 1-7, PVY-infected tuber sap in a ten-fold dilution series (1 to 10^6 , respectively). Horizontal line marks positive cutoff at 0.16 (twice healthy mean). (B), RT-PCR results for dilution series made from total RNA from PVY-infected potato tuber. M, 100 bp DNA ladder; H, healthy potato cv. Desiree; Lanes 1-7, ten-fold RNA dilution series (1 to 10^6 , respectively).

경우 0.51이었으며 10^2 로 희석한 경우 0.34이어서 10^2 까지도 ELISA에 의한 PVY의 검정이 가능하였지만 10^3 로 희석하였을 경우에는 0.15로 감염여부의 판정이 어려웠으며 10^4 - 10^6 으로 희석할 경우 건전 대조구와 비슷한 수치를 보였다(Fig. 5a). 그러므로 괴경에서의 민감도도 싹에서와 마찬가지로 RT-PCR이 ELISA보다 10^3 배 정도 높음을 알 수 있었다.

고 찰

감자 재배포장에서 수확한 괴경에서 ELISA와 RT-PCR을 이용하여 PVY를 검정한 결과 ELISA에서는 검정이 안된 개체에서도 RT-PCR 방법으로는 검정이 가능하였다. 또 이 두 방법으로 PVY 검정의 민감도를 비교해본 결과 식물 조직과는 무관하게 RT-PCR이 ELISA 보다 10^3 배 정도 민감도가 높았다. 이런 결과들에 의해 ELISA만으로는 검정의 결과를 신뢰할 수 없게 되었다. 특히 조직배양으로 인공씨감자와 같은 무병종자를 대량생산하고자 할 경우 완벽한 수준으로 바이러스 감염여부를 확인한 순수한 기본배양 식물체 확보가 필수적인데 위의 ELISA 방법만으로는 바이러스를 검정하기에는 역부족이므로 RT-PCR 등과 같이 정확한 검정 시스템의 확립이 필요한 실정이다. 또 DIG probe 등을 이용한 RT-PCR product의 hybridization을 실시한다면 검정의 민감도는 ELISA와는 비교가 안될 정도로 높아질 수 있을 것으로 사료된다. RT-PCR에 사용한 PVY 특이적인 primer는 기존에 밝혀진 23개의 PVY strain중 상동성이 90% 이상인 부위에서 PVY-O를 기준으로하여 합성하였는데(Fig. 3) 대서 품종에서 검정된 PVY-T strain의 경우 downstream primer의 염기서열이 2개가 틀린데도 검정의 민감도가 높게 나타났다. 그리고 염기서열의 상동성으로 유연관계를 알아보는 PC/Gene의 Clustal program(Intelli Genetics Inc., U. of Geneva, Switzerland)을 이용한 유연관계 조사 결과, 기존에 밝혀진 23개의 PVY strain은 PVY^N strain, PVY^O strain, PVY-T strain group 등 대략 6개의 그룹으로 나뉘는데 이들 그룹중 대표적인 PVY-N, -O, -T, -M, -V, -C strain의 염기서열을 비교해보면 PVY-T가 가장 상동성이 낮음을 알 수 있었다(Fig. 3). 위의 결과들을 종합하여 볼때 본 실험에서 사용한 primer는 모든 PVY strain의 검정에 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

ELISA에 의해 이병주로 판정된 감자 대서 품종에서는 ELISA 수치가 높은데도 불구하고 외관상으로는 아무런 병징도 나타나지 않았는데 이는 감염된 PVY

가 감자에서는 거의 병징을 나타내지 않는 PVY-T strain에 속하는 바이러스이기 때문으로 사료된다. 하지만 이 바이러스가 감염된 감자의 싹을 10 mM 인산 완충용액에 10%(W/V)의 농도로 갈아서 담배(*Nicotina tabacum* cv. Samsun NN)에 접종시킨 결과 접종 후 약 2주 후부터 잎에서 심한 mosaic 현상과 necrosis 현상 등이 나타났다.

감자 조직 100 mg에서 RNA를 분리하여 50 μ l의 멸균증류수에 녹여 RT-PCR를 수행한 결과 RNA 용액을 희석하지 않고 사용한 경우에는 Fig. 3b와 4b의 Lane 1에서 보여주듯이, 싹에서는 764 bp의 DNA 절편이 합성되지 않았고, 괴경에서는 10배로 희석했을 때보다 band가 희미하였다. 이는 RNA 용액을 희석하지 않고 바로 사용한 경우 RNA 농도가 너무 높고 희석했을 때보다 상대적으로 순도가 떨어져 RT-PCR 반응이 진행되지 않아서 생긴 현상인 것으로 생각된다. 이때 싹에서 추출한 RNA 용액의 농도가 약 4 μ g/ μ l이고 괴경에서 추출한 농도는 0.8 μ g/ μ l이었으며 순도는 A_{260}/A_{280} 이 1.6~1.8 정도였다. 그러므로 감자에서 RT-PCR을 이용하여 바이러스를 검정할 경우 RNA의 농도가 0.1~0.5 μ g/ μ l이 되게 희석하여 사용하는 것이 효율적일 것으로 사료된다.

RT-PCR 방법이 검정의 민감도가 높은데도 불구하고 ELISA에 비해 노력과 경비가 많이들기 때문에 대량의 시료를 검정해야 할 경우 RT-PCR 보다는 ELISA 방법을 이용하고 있는 실정이나 RT-PCR에 아주 소량의 RNA만이 필요해서 작물과 조직에 따라 다소 차이는 있지만 약 50 mg의 적은양의 시료에서 추출한 RNA로 200회 정도의 검정이 가능하므로 한번의 RNA 추출만으로도 그 작물에 감염되는 모든 RNA 바이러스를 검정할 수 있다는 장점이 있고, 또 앞으로 RT-PCR에 이용하는 RNA 추출방법을 더욱더 간단하게 개발하거나 one-step RT-PCR 방법 등을 개발한다면 RT-PCR 방법은 대량의 시료 검정에도 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

여러 계통의 PVY 외피단백질 유전자간에 상동성이 높은 부위에 위치한 primer 쌍을 이용하여 RT-PCR 방법으로 PVY 검정법을 개발하였는데 여러 line의 대서 품종으로부터 764 bp의 PCR 산물이 합성되었고 이 절편을 sequencing한 결과 PVY의 유전자임을 확인하였다. 싹과 괴경 조직에서 RT-PCR에 의한 PVY의 검정의 민감도는 ELISA 방법보다 약 1,000배정도 높았다.

감사의 말씀

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

참고문헌

1. Beemster, A. B. R. and de Bokx, A. J. 1987. Survey of properties and symptoms. In: *Virus of potatoes and seed-potato production*. Ed 2. ed. by de Bokx, A. J. and van der Want, J. P. H., pp. 109-111. Pudoc, Wageningen, Netherlands.
2. Cho, H., Jun, S., Kwon, S., Park, E., Paek, K. and Paek, K. 1994. Isolation and nucleotide sequence analysis of a partial cDNA clone for potato virus Y-VN (Korean isolate) genome. *Mol. Cells* 4:143-148
3. Clark, M. F. and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.
4. Elise, L. D., Derks, A. F. L. M., Sjes, C. J. A., Lemmers, M. E. C., Bol, J. F. and Langeveld, S. A. 1993. Characterization of potyviruses from tulip and lily which cause flower-breaking. *J. Gen. Virol.* 74: 881-887.
5. Fribourg, C. E. and Nakasima, A. 1984. Characterization of a new potyvirus from potato. *Phytopathology* 74:1363-1369.
6. 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.
7. 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 strawber-
ry mild yellow-edge luteovirus by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. *Plant Dis.* 77:595-601.
8. Hataya, T., Inoue, A. K., Ohshima, K., Shikata, E. 1994(a). Characterization and strain identification of a potato virus Y isolate non-reactive with monoclonal antibodies specific to the ordinary and necrotic strains. *Intervirology* 37:12-19.
9. Hataya, T., Inoue, A. K., Ohshima, K., Shikata, E. 1994(b). A PCR-microplate hybridization method for plant virus detection. *J. Virol. Methods* 46:223-236.
10. 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., Korea.
11. Mumford, R. A., Barker, I., Wood K. R. 1994. The detection of tomato spotted wilt virus using the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 46:303-311.
12. Robaglia, C., Durand-Tardif, M., Tronchet, M., Boudazin, G., Astier-Manificier, S. and Casse-Delbart, F. 1989. Nucleotide sequence of potato virus Y (N Strain) genomic RNA. *J. Gen. Virol.* 70:935-947.
13. Sudarsono, Woloshuk, S. L., Xiong, Z., Hellmann, G. M., Wernsman, E. A., Weissinger, A. K. and Lommel, S. A. 1993. Nucleotide sequence of the capsid protein cistrons from six potato virus Y (PVY) isolates infecting tobacco. *Arch. Virol.* 132:161-170.
14. Takahashi, Y., Tiongco, E. R., Cabauatan, P. Q., Kognanezawa, 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.

(Received May 13, 1997)