

**Indian citrus ringspot virus의 ELISA 진단 시스템 구축**

신명주 · 권영철 · 노현수 · 이현숙\*

경상대학교 미생물학과

**Construction of ELISA System for the Detection of *Indian citrus ringspot virus***

Myeung Ju Shin, Young Chul Kwon, Hyeon-Su Ro and Hyun-Sook Lee\*

Department of Microbiology and Research Institute for Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

(Received on March 12, 2012; Revised on June 26, 2012; Accepted on June 30, 2012)

*Indian citrus ring spot virus* (ICRSV) is known to cause a serious disease to citrus, especially to Kinnow mandarin, the popular cultivated citrus species in India. In this study, we developed diagnostic systems based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In order to generate antibodies against ICRSV coat protein, we overexpressed the coat protein in *Escherichia coli* using the pET15b expression vector containing an optimized ICRSV coat protein gene. The recombinant ICRSV coat protein was overexpressed as soluble form at 37°C upon IPTG induction. The protein was purified to 95% in purity by Ni-NTA column chromatography. The purified protein was immunized to rabbit for the generation of polyclonal antibody (PAb). The PAb showed a specific immunoreaction to recombinant ICRSV coat protein in western blot analysis and ELISA. Diluted rabbit antisera (10,000 fold) could detect less than 10 ng and 5 ng of the target protein in western blot and ELISA analysis, respectively.

**Keywords :** Diagnosis, ELISA, *Indian citrus ringspot virus*, Polyclonal antibody

**서 론**

귤, 오렌지, 레몬, 자몽 등을 포함하는 citrus는 연간 100,000톤 이상이 수입되는 인기 작물이다. 이러한 citrus에 진균류, 바이러스, 박테리아, 기생충 등이 감염되어 과수의 상품성과 수확량을 감소시켜 심각한 경제적 피해를 야기하고 있다. 1993년 인도 New Delhi의 Kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour × *C. deliciosa* Tenora) 농장에서 이전에 보고된 적 없는 새로운 바이러스가 발견되었다(Byadgi 등, 1993). 인도 감귤 원형 반점 바이러스(Indian citrus ring spot virus(ICRSV))라 명명된 이 바이러스는 현재 세계 각지에서 발견되고 있으며 특히 인도에서 높은 발병빈도를 보인다. Flexiviridae과 mandarivirus 속으로 분류된 이들은 650 nm의 주름무늬(zipper-like structure)의 사상형 바이러

스 입자를 가지며 유전체는 7.5 Kb의 하나의 ssRNA로 구성되어있다(Adams 등, 2004; Rustici 등, 2000a; 2000b; Sharma 등, 2007). 총 6개의 ORF가 존재하며 이들은 각각 187.3, 25, 12, 6.4, 34, 23 kDa의 단백질을 생성한다. ORF 1은 replicase를 포함하는 polypeptide를 암호화하며, ORF 2-4는 triple-gene block를 구성하고, ORF5는 34 kDa의 외피단백질을 형성하며, ORF6는 아직 그 역할이 규명되지 않았다(Rustici 등, 2002).

접목전염(graft transmission)에 의하여 감염된다고 알려진 ICRSV는 주로 접목시킨 후 2-4달 후 그 증상을 나타낸다(Byadgi 등, 1993). 기생식물, 토양, 씨앗, 선충 등에 의한 감염은 아직까지 보고되지 않았다(Pant 등 1998; Thind 등, 1999). 이들에 감염되면 잎에 전형적인 퇴록 원형 반점(chlorotic ring), 반점(spot), 원형 반점(ringspot) 등이 형성되고 잎이 점차 말라가는 증상을 나타낸다. 이후 시간이 지날수록 과일의 수, 무게, 크기가 줄 뿐 아니라 과수 내 acid, Vitamin C, sugar 등이 감소하여 상품성 및 생산량이 줄어들다 결국 나무가 죽게 된다. 또한 병증을 나타

\*Corresponding author

Phone) +82-55-772-1321, Fax) +82-55-759-5199

Email) hslee@gnu.ac.kr

내지 않는 감염된 나무는 수년 후 20–98%의 수확량 감소를 보인다. 즉, ICRSV가 감염되면 농장에 막대한 경제적 손실을 초래한다(Rustici 등, 2000b; Singh 등, 2008; Thind 등, 2005).

이처럼 ICRSV에 감염되면 심각한 경제적 피해가 발생되지만 바이러스의 생물학적 특성상 억제방제가 거의 불가능해 바이러스를 조기에 신속, 정확하게 진단하고 대책을 수립하는 것이 비용과 시간을 절약하는 가장 바람직한 방법이다. 국내에서 ICRSV 감염 사례가 보고되지 않았으므로 이후 국내 생태계 보호 및 굴 산업에 피해를 입지 않도록 해외로부터 유입되는 과일과 묘목에 대한 엄격한 검역이 요구된다. 현재 외국에서는 ICRSV를 진단하는 방법에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으나 국내에서는 그 연구가 미미하여 정밀 검사법을 갖추지 못해 감염된 식물체의 국내 유입을 막는데 많은 어려움을 겪고 있다.

본 연구는 한국 식물검역원의 의뢰를 받아 ICRSV 외피 단백질에 대한 복클론 항체를 제작하여 ELISA를 통한 면역학적 검역 시스템으로 ICRSV를 보다 빠르고 정확하게 진단하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**ICRSV 외피단백질 유전자 서열의 Optimization과 재조합 플라스미드 제조.** ICRSV 외피단백질 유전자의 염기 서열 중 *Indian citrus ringspot virus*의 약 23 kDa nucleic acid binding protein gene(GenBank ID: AAO72988.1)를 토대로 *E. coli*의 codon usage에 맞게 유전자를 합성하였다(Gene script, USA). 이후 N-terminal에 Histidine이 tagging 되어 발현되도록 ICRSV 유전자를 발현백터인 pET15b에 클로닝하고 이를 발현 균주인 *E. coli* BL21(DE3)에 형질 전환시켰다.

**재조합 ICRSV 외피단백질 발현 및 정제.** pET15b/ICRSV 재조합 플라스미드가 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3) 균주를 LB/ampicillin 5 ml에 접종하여 37°C에서 배양하였다. 이를 LB/amp 1 l에 첨가하여 OD<sub>600</sub>가 0.6이 될 때까지 배양한 후, 최종 농도가 1 mM이 되도록 IPTG를 첨가하고 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 균체를 5000 rpm으로 10분 원심 분리하여 침전물을 얻고 buffer A(50 mM Tris-HCl pH 8.0/100 mM NaCl)로 현탁한 뒤 균체를 파쇄하여 35,000 rpm으로 1시간 초원심 분리하여 상등액과 침전물을 각각 분리하였다. IPTG 처리 전후의 세포, 세포 파쇄 후 상등액과 침전물을 SDS-PAGE하여 재조합 ICRSV 외피단백질의 발현양상을 확인하였다. 세포 파쇄 후 얻은 상등액을 Ni-NTA column에 흘려보내고 buffer A로 세척

하였다. 이후 40, 80, 160, 320, 500 mM imidazole이 포함된 buffer A를 순차적으로 흘려보내 단백질을 용출한 후 30,000 MW centrifugal filter로 다시 정제·농축하여 SDS-PAGE로 확인하였다.

**복클론 항체 제작.** 정제한 재조합 ICRSV 외피단백질 200 µg과 동량의 Freund's complete adjuvant와 혼합하여 토끼에 접종하고 3주 간격으로 동량의 재조합 ICRSV 외피단백질과 동량의 Freund's incomplete adjuvant를 혼합하여 2회 보강접종을 실시하였다. 3차 접종 4일 후 귀의 정맥으로부터 채혈하여 항체가 생산되었는지 ELISA로 확인한 뒤 3주 뒤에 정제한 재조합 ICRSV 외피단백질 50 µg을 최종 접종하여 4일 후 토끼의 경동맥에서 채혈하고 혈청을 분리하였다.

**Indirect ELISA 검정.** 96 well plate well에 정제된 재조합 ICRSV 외피단백질을 Coating buffer(0.2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)와 섞어 20 µg/ml 농도로 100 µl씩 4°C에서 밤새 부착하였다. PBS-T(PBS, 0.1% Tween 20, pH7.4)로 항체를 세척한 후, 3% bovine serum albumin(BSA)으로 37°C에서 3시간 blocking하였다. PBS-T로 3회 세척하고, 혈청을 10배씩 단계적으로 희석하여 37°C에서 1시간 면역반응을 진행하였다. PBS-T로 3회 세척하고, 1:5,000으로 희석된 HRP conjugated Goat anti-Rabbit IgG를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. PBS-T로 5회 세척하고, PCB(0.05 M C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 3 ml, o-phenylenediamine dihydrochloride(OPD) 2 mg, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 8 µl를 첨가하여 well에 분주하였다. 실온에서 20분간 효소반응을 시키고 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하여 효소반응을 중단시켰다. 발색반응의 정도는 Microplate Reader를 이용하여 490 nm에서 측정하였다. 또한 재조합 ICRSV 외피단백질의 농도에 따른 검출 정도를 알아보기 위해 혈청을 농도 별로 각 well에 첨가하여 1 × 10<sup>-4</sup>으로 희석한 혈청으로 동일하게 수행하였다.

**Western blotting.** 정제한 재조합 ICRSV 외피단백질을 12% polyacrylamide gel에 전기영동한 후 단백질을 PVDF membrane으로 옮겼다. 1% BSA가 포함된 TBS-T(TBS, 0.1% Tween 20)에 넣고 37°C에서 30분 반응시켰다. TBS-T로 3회 세척하고, TBS-T에 항체를 10,000배 희석한 것을 1차 항체로 사용하여 37°C에서 45분 반응시켰다. TBS-T로 3회 세척하고, alkaline phosphatase(AP)가 결합된 Goat anti-Rabbit IgG를 5,000배 희석하여 37°C에서 30분 반응시켰다. TBS-T로 3회 세척하고, AP buffer(100 mM Tris-HCl(pH9.5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>)에 NBT/BCIP를 1:7500으로 첨가하여 발색시킨 후 멸균 증류수를 이용하여 발색을 정지시켰다.

### 결과 및 고찰

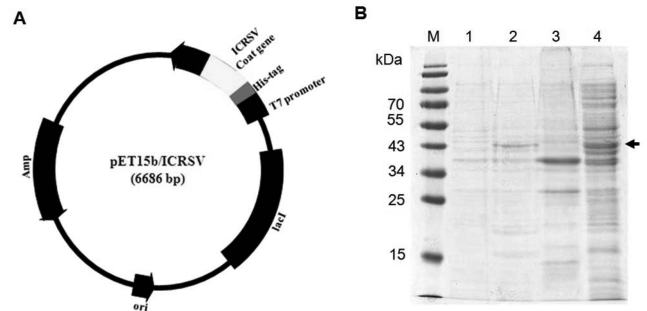
**ICRSV 외피단백질 재조합 플라스미드 제조.** ICRSV의 진단법 개발을 위해 ICRSV가 감염된 시료를 확보하려 했으나, 국내 바이러스 균주 은행에도 보관된 시료가 없으며, 국내 생태계를 파괴시킬 위험이 매우 높아 감염된 시료를 해외로부터 유입하는 것도 현실적으로 불가능하였다. 이에 이미 밝혀진 외피유전자 염기서열을 이용하여 대장균 내에서 발현시켜 ICRSV의 외피단백질 유전자에 대한 복클론 항체를 제작하고자 하였다. 먼저 재조합 ICRSV 외피단백질을 대장균에서 발현시키기 위해, ICRSV 외피유전자의 codon 중 대장균에서 잘 사용되지 않는 codon을 대장균 codon usage에 맞게 최적화하였다. 이에 따라 Gly, Ile, Leu, Pro, Arg 등의 codon을 Table 1과 같이 최적화하였다. 예로 ICRSV 외피유전자에서 Glycine의 경우 GGA, GGG codon이 4회 사용되고 있으나, 대장균에서는 rare codon이므로 대장균에서 해당 anti-codon을 가진 tRNA 농도가 높은 GGC로 전환시켰다. 최적화된 ICRSV 외피유전자(978 bp)는 5'- 및 3'-말단에 각각 *Nde* I 과 *Bam*H I site를 첨가하여 유전자 합성법으로 합성하였다. 합성된 유전자를 해당 제한효소를 처리한 후, 대장균 발현벡터인 pET15b 벡터에 삽입하였다. 단백질의 정제를 위하여 재조합 ICRSV 외피단백질의 N-terminal에 His-tag이 결합되어 발현되도록 하였다(Fig. 1A).

**재조합 ICRSV 외피단백질의 발현 및 정제.** 재조합 ICRSV 외피단백질의 발현양상을 확인하기 위해 pET15b/ICRSV 플라스미드가 형질 전환된 *E. coli* BL21(DE3) 세

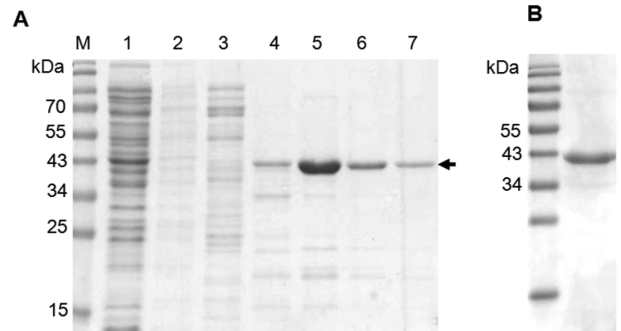
**Table 1.** Optimization of the ICRSV coat gene sequence for *Escherichia coli* expression

Amino acid	Original codon	Frequency	Optimized codon
Gly	GGA	3	GGC
	GGG	1	
Ile	ATA	2	ATC
	CTA	3	
Leu	CTT	2	CTG
	CTC	8	
	CCA	13	
Pro	CCT	9	CCG
	CCC	11	
	AGA	1	
CGA	5		
Arg	AGG	1	CGC
	CGG	1	

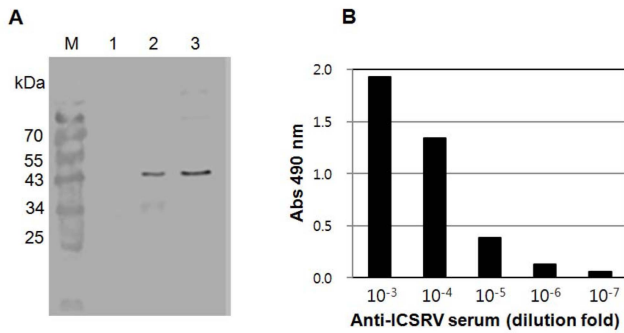
포의 배양액을 SDS-PAGE로 확인한 결과, IPTG를 처리하지 않은 세포에서는 소량 발현되던 약 42 kDa의 재조합 ICRSV 외피단백질이 IPTG를 처리한 세포에서 과발현됨을 확인하였다(Fig. 1B, lane 2). 이후 induction한 세포의 파쇄액을 원심 분리하여 침전물과 상층액을 얻어 분석한 결과, 재조합 ICRSV 외피단백질이 수용성 단백질로 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 1B). 재조합 ICRSV 외피단백질만을 정제하기 위하여 상층액을 Ni-NTA column에 통과시킨 후, imidazole의 농도를 점차 높여가며 용출액을 분리해 이를 SDS-PAGE로 분석하였다(Fig. 2A). 40–80 mM imidazole에서는 ICRSV 외피단백질의 용출이 소량 이루어졌지만 대부분 대장균 유래 단백질이 용출되었다. 반면, 160 mM 이상의 농도에서는 고순도의 ICRSV 외피단백질이 용출되었다. 160 mM 이상 imidazole에서 용



**Fig. 1.** Cloning and expression of ICRSV coat gene in *Escherichia coli*. (A) Construction of the expression vector pET15b/ICRSV coat protein. (B) Expression of expression of ICRSV coat gene. The overexpression was induced by 1 mM IPTG. Lane 1: uninduced cell lysate, lane 2: induced cell lysate, lane 3: pellet after sonication, lane 4: supernatant after sonication. Arrow indicates the ICRSV coat protein.



**Fig. 2.** Purification of the ICRSV coat protein. (A) Purification of the ICRSV coat protein by Ni-NTA column chromatography. Lane 1: flow-through, lane 2: eluate by buffer A, Lane 3, 4, 5, 6, and 7: eluates by 40, 80, 160, 320 and 500 mM imidazole, respectively. (B) Removal of small contaminating proteins by ultrafiltration. The eluate solutions from 160–500 mM imidazole were combined and further purified by ultrafiltration with a centrifugal filter membrane (cutoff size 30 kDa).

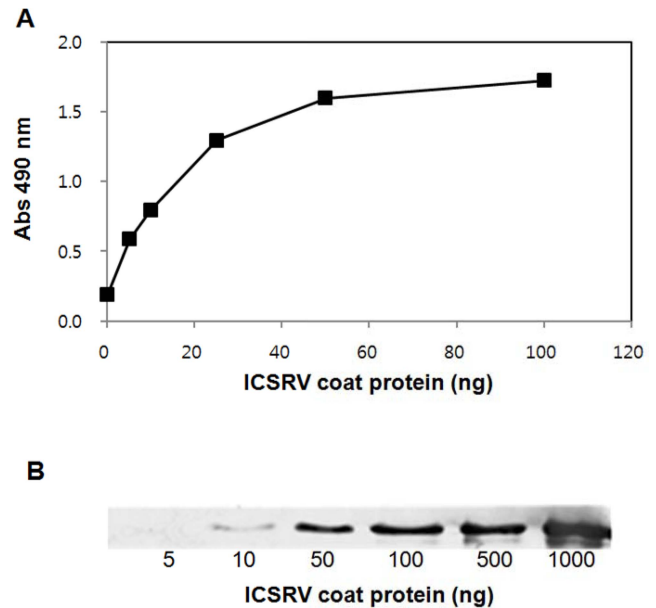


**Fig. 3.** Generation of polyclonal antibody against ICRSV coat protein. (A) Western blot analysis of anti-ICRSV coat protein serum on ICRSV coat protein. Lane 1: control *E. coli* cell lysate, lane 2: induced *E. coli* BL21/pET15b-ICRSV cell lysate, lane 3: purified ICRSV coat protein. (B) Titration of rabbit anti-ICRSV coat protein serum against purified ICRSV coat protein by ELISA. Absorbance at 490 nm was measured after ELISA reaction.

출된 단백질액에는 아직 소량의 저분자 단백질 불순물이 포함되어 있으므로, 이들을 MWCO 30,000의 centrifugal filter로 여과하여 제거하였다. 그 결과 95% 이상의 순수한 재조합 ICRSV 외피단백질을 정제할 수 있었다(Fig. 2B).

**항 ICRSV 외피단백질 항체의 제작 및 ELISA system 구축.** 정제된 재조합 ICRSV 외피단백질을 토끼에 주사하여 면역반응을 유도하였고, 그 결과 항ICRSV 외피단백질 복클론 항체를 제작하였다. 제작된 복클론 항체의 성능을 조사하기 위하여 토끼 혈청을 채취하여 ICRSV 외피단백질에 대한 항체의 특이성을 Western blot analysis를 통해 분석하였다. 복클론 항체는 음성 대조군인 pET15b 벡터만 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3) 세포배양액에 대해서는 특이한 반응을 보이지 않았고, ICRSV 외피단백질에 대해서만 특이적인 면역반응을 보여, 복클론 항체가 *E. coli* 유래 단백질이 아닌 재조합 ICRSV 외피단백질에 특이적인 항체로 제작되었음을 확인하였다(Fig. 3A). 이후 ELISA로 항체의 역가를 확인한 결과, 토끼의 항혈청을 10,000배까지 희석하여도 재조합 ICRSV 외피단백질에 강한 반응성을 나타내었다(Fig. 3B).

위 실험을 통하여 10,000배 희석한 복클론 항체가 ICRSV 외피단백질을 잘 검출할 수 있었으므로, 이 항체의 검출 한계를 조사하기 위하여 다양한 농도의 ICRSV 외피단백질 존재하에서 Western blot과 ELISA를 실시하였다. 그 결과 Western blot 분석으로는 최소 10 ng, ELISA로는 5 ng의 재조합 ICRSV 외피단백질의 검출이 가능하였다(Fig. 4). Rustici 등(2000)의 보고에 따르면 ICRSV가 감염된 citrus 나무의 leaf tissues 100 g에서 약 1.75 mg의 바이러스 입자가 검출되므로 제작된 복클론 항체를 이용할 경



**Fig. 4.** Sensitivity of rabbit polyclonal antibody to detect ICRSV coat protein. 10,000-fold diluted anti-ICRSV coat protein serum was applied to various amounts of ICRSV coat protein. (A) ELISA analysis. (B) Western blot analysis.

우 1 g의 식물 조직만으로도 바이러스의 유무를 확인하기 충분할 것으로 사료된다.

## 요 약

본 연구는 citrus에 심각한 피해를 초래하는 바이러스인 ICRSV가 국내로 유입되는 것을 차단하여 그로 인한 피해를 방지하기 위해 이를 진단하는 시스템을 구축하고자 하였다. ICRSV가 감염된 시료를 구할 수 없어 외피단백질 유전자를 *E. coli*의 codon usage를 고려하여 optimization 한 뒤 *E. coli*에서 수용성 단백질로 과발현된 재조합 ICRSV 외피단백질을 정제하였다. 정제한 재조합 단백질을 이용해 제작한 복클론 항체는  $1 \times 10^{-4}$ 으로 희석하였을 때 western blot과 ELISA를 통해서 각각 10 ng, 5 ng의 재조합 ICRSV 외피단백질을 검출할 수 있었다. 이로써 제작된 항체를 이용하여 소량의 바이러스 입자만으로도 ICRSV를 검출할 수 있을 것이다.

## Acknowledgement

This research was supported by grants from the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology of Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (No. 309015-04).

## References

- Adams, M. J., Antoniw, J. F., Bar-Joseph, M., Brunt, A. A., Candresse, T., Foster, G. D., Martelli, G. P., Milne, R. G., Zavriev, S. K. and Fauquet, C. M. 2004. The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Arch Virol.* 149: 1045–1060.
- Byadgi, A. S., Ahlawat, Y. S., Chakraborty, N. K., Varma, A., Srivastava, M. and Milne, R. G. 1993. Characterization of a filamentous virus associated with citrus ringspot in India. In: Proc. 12th Conf. IOCV: 155–162.
- Pant, R. P. and Ahlawat, Y. S. 1998. Partial characterization of filamentous virus associated with ringspot disease of citrus. *Ind. Phytopathol.* 51: 225–232.
- Rustici, G., Accotto, G. P., Noris, E., Masenga, V., Luisoni, E. and Milne, R. G. 2000a. Indian citrus ringspot virus: a proposed new species with some affinities to potex-, carla-, fovea-, and allexiviruses. *Arch Virol.* 145: 1895–1908.
- Rustici, G., Milne, R. G. and Accotto, G. P. 2002. Nucleotide sequence, genome organisation and phylogenetic analysis of Indian citrus ringspot virus. *Arch Virol.* 147: 2215–2224.
- Rustici, G., Noris, E., Accotto, G. P., Luisoni, E., Milne, R. G., Pant, R. P. and Ahlawat, Y. S. 2000b. Further characterisation and detection of Indian citrus ringspot virus. In: da Graça J. V., Lee, R. F. and Yokomi, R. K. (eds), Proc. Fourteenth Conference of the International Organisation of Citrus Virologists IOCV: 360–362.
- Sharma, S., Singh, B., Rani, G., Zaidi, A. A., Hallan, V. K., Nagpal, A. and Virk, G. S. 2008. *In vitro* production of Indian citrus ringspot virus (ICRSV) free Kinnow plants employing thermotherapy coupled with shoot tip grafting. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 92: 85–92.
- Sharma, S., Singh, B., Rani, G., Zaidi, A. A., Thind, S. K., Virk, G. S. and Nagpal, A. 2007. Indian citrus ringspot virus a review. In: Emerging trends in plant and agriculture research, eds by Setia, R. C., Setia, N. and Nayar, H. K., pp. 236–246. Punjab Agriculture University, Ludhiana.
- Singh, B., Sharma, S., Rani, G., Hallan, V., Zaidi, A. A., Virk, G. S. and Nagpal, A. 2008. *In vitro* micrografting for production of Indian citrus ringspot virus (ICRSV)-free plants of kinnow mandarin (*Citrus nobilis* × Lour 3 *C. deliciosa* Tenora). *Plant Biotechnol Rep.* 2: 137–143.
- Thind, S. K., Arora, P. K. and Kaur, N. 2005. Impact of Citrus ringspot virus on biochemical alterations and fruit yield of kinnow mandarin. *Indian J. Virol.* 16: 17–18.
- Thind, S. K., Arora, P. K., Sharma, J. N. and Cheema, S. S. 1999. Transmission of Citrus ringspot virus through budwood, seed and insect vectors. *Indian J. Virol.* 15: 47–48.