

RT-PCR 기법을 이용한 Lily Symptomless Virus의 검정

정영희 · 전재홍 · 최경화 · 김현순 · 정 혁*
한국과학기술연구원 생명공학연구소 식물조직배양R.U.

Detection of Lily Symptomless Virus Using RT-PCR Technique

Young Hee Joung, Jae Heung Jeon, Kyung Hwa Choi, Hyun Soon Kim and Hyouk Joung*
Plant Tissue Culture Research Unit, KRIBB, KIST, Taejon 305-333, Korea

ABSTRACT : We isolated total RNA from lily tissue and carried out RT-PCR with two specific primers designed to amplify the 551 bp of lily symptomless virus (LSV) partial coat protein gene. As a result, we obtained 551 bp PCR product amplified from all of the four *Lilium oriental* hybrid cvs. Miani, Casablanca, Marco Polo, and Le Reve. We could prove that the 551 bp PCR fragment was indeed the LSV partial coat protein gene by sequence analysis. In conclusion, by using RT-PCR technique, we could find out that all tested samples of lily were infected with LSV.

Key words : coat protein gene, lily symptomless virus, RT-PCR.

최근 들어 화훼 구근류의 구근 수입이 급증하고 있는데 구근으로 번식하는 백합의 경우 치명적인 바이러스에 감염된 종자가 대량 유입될 가능성이 있으며, 실제로 국내에서 유통되는 대부분의 구근들은 거의 바이러스에 감염되어 있다고 추정되는 심각한 상황에 처해 있다. 바이러스에 감염된 백합은 상품성이 현저히 저하되므로 바이러스 방제를 위해서는 바이러스의 감염 여부를 진단하여 바이러스가 없는 종자를 선별하여 보급하는 일이 무엇보다도 중요하다. 그러나 현재 가장 많이 사용되고 있는 바이러스 검정방법인 면역형침법은 판별의 정확도 측면이나 기술적인 측면에서 문제점이 많이 제기되고 있는 실정(1)이어서 (2) 보다 확실하고 민감한 바이러스 검정방법을 필요로 하고 있다. 최근 특정 염기서열의 유전자만을 증폭시킬 수 있는 polymerase chain reaction(PCR) 방법이 개발되어 유전자가 극소량으로 존재하더라도 검정할 수 있게 됨에 따라 여러 분야에서 이런 PCR 방법이 사용되고 있고 있는데 (4, 5), 특히 특정 유전자 단편을 증폭시켜 그 염기서열을 상호 비교함으로써 동식물의 품종이나 특수한 질병을 정확하게 판별해 내고자 하는 기술이 최근 몇 년 사이에 급속도로 개발되고 있다(1, 8). 따라서 본 실험에서는 특정 RNA 바이러스 유전자만을 증폭시킬 수 있는 RT-PCR 방법으로 바이러스의 감염

여부를 진단하고자 하였다.

Lily symptomless virus(LSV)는 single strand RNA와 외피단백질로 구성된 carlavirus로서 RNA 계놈에는 6개의 open reading frame이 있고 3' 말단 부위에 32 kDa의 외피단백질 유전자가 coding되어 있다(6, 7). 본 실험은 이 외피단백질 유전자의 일부를 증폭시킬 수 있는 primer를 합성하여 RT-PCR 방법으로 네덜란드에서 수입한 백합과 국내에서 재배 중인 백합 품종에서의 LSV의 감염 여부를 진단하고자 하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용한 재료로는 국내에서 재배 중인 *Lilium oriental* hybrid cv. Miani의 잎과, 네덜란드에서 수입한 *Lilium oriental* hybrid cvs. Marco Polo, Casablanca, Le Reve 품종의 구근을 이용하였고 LSV 무감염 백합으로는 미국 농무성에서 분양 받은 *Lilium EL 3X4C*를 사용하였다. 식물 조직에서의 total RNA 분리는 50~100 mg의 식물 조직을 액체질소에 얼려서 파쇄한 다음 Qiagen사의 plant total RNA isolation kit를 사용하거나 Elise 등(3)의 방법을 변형시킨 간단한 phenol extraction 방법을 사용하였다. Phenol extraction은 파쇄한 식물 조직에 400 µl phenol과 400 µl extraction buffer를 넣고 70°C에서 5분간 방치한 후 원심 분리하여 2~3회 phenol을 처리한 다음 ethanol로

*Corresponding author.

RNA를 침전시켜 total RNA를 분리하는 방법이다. 각 시료의 total RNA 0.5-1.0 µg을 reverse transcriptase와 Taq DNA polymerase를 사용하여 RT-PCR를 실시하였다. 이 때 사용한 primer는 Memelink 등(6)에 의해 보고된 염기서열을 바탕으로 하여 LSV 외피단백질 유전자 중 551 bp의 DNA 절편이 증폭되도록 sense primer로 5'-CACTGTTAGAGCAACGACTAACCC-3', antisense primer로 5'-GATGTCGAAGGTGTCAAAA-GCTGC-3'를 합성하여 사용하였다. RT-PCR은 42°C에서 15분간 반응시킨 RT 반응액을 94°C 5분, 64°C 1분, 72°C 3분간 1 cycle, 94°C 1분, 64°C 1분, 72°C 1분간 35 cycle의 조건으로 수행하였다. RT-PCR에서 얻은 551 bp DNA를 분리하여 pCR-Script SK 벡터에 cloning한 뒤 sequencing하여 LSV의 염기 서열을 확인하였다. LSV의 감염이 확인된 백합 조직 50 mg으로부터 RNA isolation kit와 phenol extraction 방법으로 total RNA를 분리하고 이것을 10배수로 희석하여 RT-PCR을 수행하여 바이러스 검정의 민감도를 알아 보았다.

결 과

품종별 검정. 온실에서 재배한 Miani 품종과 네덜란드에서 수입한 Marco Polo, Casablanca, Le Reve 품종에서 Qiagen사의 RNA isolation kit를 이용하여 total RNA를 분리하였고 LSV antisense, sense primer를 이용하여 RT-PCR를 수행한 결과 모든 품종에서 551

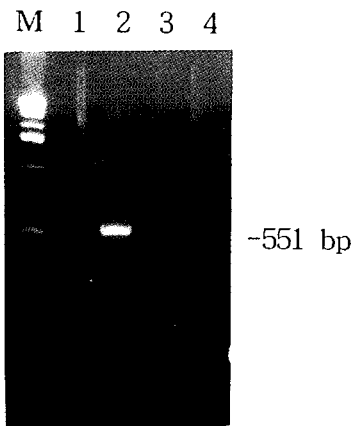


Fig. 1. RT-PCR amplification of lily symptomless virus RNA in total RNA extracted from lily. M : Size marker (1 kb ladder); 1 : *Lilium oriental* cv. Miani; 2 : *L. oriental* cv. Casablanca; 3 : *L. oriental* cv. Marco Polo; 4 : *L. oriental* cv. Le Reve.

bp의 DNA 절편이 합성된 것을 agarose gel 상에서 확인할 수 있었다. Casablanca 품종에서 band가 가장 뚜렷했고 Marco Polo, Le Reve에서는 약한 band를 보여 LSV의 감염 정도는 Casablanca가 가장 심함을 알 수 있었으며 나머지 품종도 경미하지만 LSV에 감염되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 1).

염기서열 분석. Casablanca와 Miani에서 RT-PCR하여 나온 각각의 551 bp DNA 절편을 agarose gel에서 분리한 다음 pCR-Script SK 벡터에 cloning하여 염기서열을 분석한 결과 LSV의 외피단백질 유전자의 일부임을 확인할 수 있었는데, 이 LSV 염기서열은 Memelink 등(6)에 의해 보고된 LSV 외피단백질 유전자의 염기서열과는 2곳이 다를 수 있었다. 외피단백질 유전자의 start codon으로부터 426 base 떨어진 곳에서 cytosine(C)이 thymine(T)로 치환되었고, 471 base 떨어진 곳에서 T가 C로 치환되어 있었으나 amino acid 서열은 변화가 없음을 알 수 있었다(Fig. 2). LSV strain중 LSV 32 kDa의 염기서열과 비교해 homology가 86% 정도인 경우도 보고된 바 있으므로 (9) Casablanca에서 분리한 LSV는 외피단백질 유전자

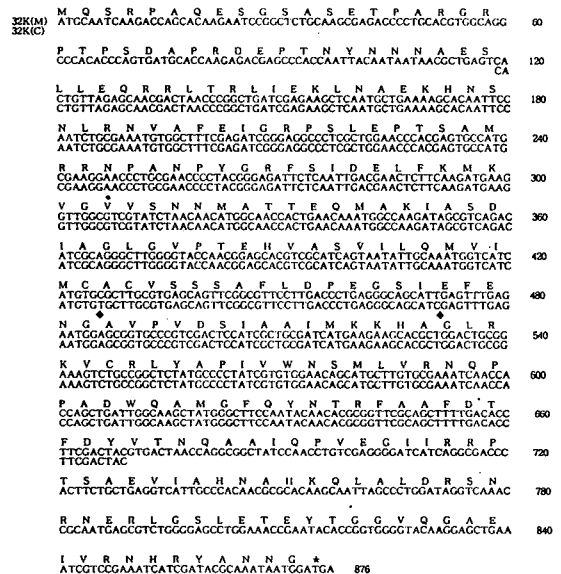


Fig. 2. Nucleotide sequence similarity between 32 K (M) and 32 K (C). 32 K (M) : Nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of the LSV 32 kDa open reading frame (6), 32 K (C) : Nucleotide sequence of 551 bp LSV CP gene fragment from *Lilium oriental* hybrid cvs. Casablanca and Miani. TGA codon is stop codon (★) and ◆ is a different nucleotide sequence site between 32 K (M) and 32 K (C).

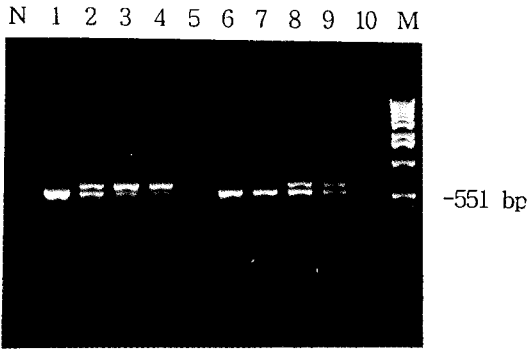


Fig. 3. Detection of LSV RNA by RT-PCR in LSV-infected leaf of *Lilium oriental* cv. Miani. RNA was extracted with Qiagen RNA isolation kit (lanes 1~5) and with phenol extraction (lanes 6~10). N: *Lilium* EL3X4C (healthy control); M: Size marker (1 kb ladder); Lanes 1~5, 6~10: Undiluted total RNA and serial ten-fold dilutions ($1, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$), respectively.

의 염기서열의 유사성으로 볼 때 Memelink 등(6)에 의해 밝혀진 LSV와 유사한 strain인 것으로 사료된다.

부위별 검정 및 방법별 비교. LSV 감염이 확인된 Miani 품종의 잎 조직과 Casablanca 품종의 구근 조직 50 mg에서 RNA isolation kit와 phenol extraction 방법으로 각각 total RNA를 분리한 다음 50 μ l 멸균증류수에 녹이고 10배수로 희석하여 RT-PCR를 수행하였다. 그 결과 Miani에서는 RNA isolation kit를 사용할 때와 phenol extraction 방법을 사용한 경우에서 모두 10^{-3} 으로 희석할 때까지 LSV가 검정되었고(Fig. 3), Casablanca에서는 kit를 사용할 경우 10^{-4} 까지 phenol extraction 방법을 사용한 경우에는 10^{-5} 까지 희석하여도 LSV band가 강하게 나타났다(Fig. 4).

고 찰

실험 재료로 백합의 잎 조직을 사용할 경우 RNA isolation kit 방법이나 phenol extraction 방법에서 각각의 방법에 따른 detection 민감도가 유사하였으나, 구근을 재료로 사용할 때는 kit를 사용하기보다는 간단한 phenol 처리를 하는 것이 검정의 민감도가 더 높았다. 이는 구근에 있는 저장성 starch와 기타 다른 저장성 물질 때문인 것으로 사료된다. 따라서 민감도도 높게 나타나고 비용도 저렴할 뿐 아니라 방법도 간단한 phenol 처리 방법을 이용하여 RNA를 분리하는 것이 백합에서의 LSV 검정에 더욱 효과적인 것으로 사료된다. 백합의 잎 조직을 사용하여 RT-PCR를 실시한

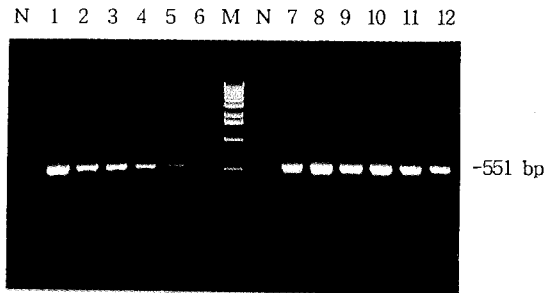


Fig. 4. Detection of LSV RNA by RT-PCR in LSV infected bulb of *Lilium oriental* cv. Casablanca. RNA was extracted with Qiagen RNA isolation kit (lanes 1~6) and with phenol extraction (lanes 7~12). N: *Lilium* EL3X4C (healthy control); M: Size marker (1 kb ladder); Lanes 1~6, 7~12: Undiluted total RNA and serial ten-fold dilutions ($1, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$), respectively.

결과 551 bp의 LSV band 이외에 650 bp의 band가 나타났다는데 이를 cloning하고 염기서열을 분석하여 Genebank에 의뢰한 결과 light inducible gene의 mRNA와 유사함을 알 수 있었다. 이런 현상이 구근을 실험 재료로 사용할 시에는 나타나지 않았음을 생각할 때 아마도 LSV 검정에 사용한 primer가 잎의 엽록체에서 발현하는 gene과 염기서열이 유사하여 이런 현상이 나타나는 것으로 사료된다.

본 실험으로 네덜란드에서 수입된 구근 상태의 Marco Polo, Casablanca, Le Reve 품종과 국내에서 재배 중인 Miani 품종 모두 LSV에 감염되어 있음을 알 수 있었는데 앞으로 종자 수입시 바이러스 감염 여부를 철저히 검역하지 않는다면 여러 종류의 바이러스가 무분별하게 국내로 유입되어 심각한 문제를 야기할 것으로 생각된다. 또 생장점 배양 등을 통해 100% 무병의 식물체를 검증, 확보하고자 할 때는 기존의 면역혈청법보다 민감도가 뛰어난 RT-PCR 방법으로 바이러스 감염 여부를 확인하는 것이 더 좋은 방법이라고 사료된다.

요 약

백합으로부터 total RNA를 분리하여 LSV 외피단백질 유전자의 551 bp에 해당하는 특정 염기서열을 증폭할 수 있는 primer로 RT-PCR를 수행하였다. 그 결과 *Lilium oriental* hybrid cvs. Miani, Marco Polo, Casablanca, Le Reve 품종에서 551 bp의 DNA 절편이 증폭되었고 이 절편의 염기서열을 분석한 결과 LSV

외피단백질 유전자의 일부임을 확인할 수 있었다. 그러므로 RT-PCR 방법으로, 실험에 사용한 4품종 모두 LSV에 감염되어 있음을 알 수 있었다.

감사의 말씀

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

참고문헌

1. Chen, K. H., Guo, J. R., Wu, X. Y., Loi, N., Carraro, L., Guo, Y. H., Chen, Y. D., Osler, R., Pearson, R. and Chen, T. A. 1993. Comparison of monoclonal antibodies, DNA probes, and PCR for the detection of the grapevine yellows disease agent. *Phytopathology* 83 : 915-922.
2. 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.
3. 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.
4. Gelfand, D. H. 1989. Principles and applications for DNA amplification. In : *PCR Technology*, ed. by A. H. Erlich, pp. 17-22. Stockton Press, New York.
5. Rotbart, H. A. 1990. A guide to methods and applications. In : *PCR Protocols*, ed. by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, pp. 3-12. Academic Press, San Diego, CA.
6. Memelink, J., Vander Vlugt, C. I. M., Lintherst, H. J. M., Derks, A. F. L. M., Sjes, C. J. A., Lemmers, M. E. C. and Bol, J. F. 1990. Homologies between the genomes of a carlavirus (lily symptomless virus) and potexvirus (lily virus X) from lily plants. *J. Gen. Virol.* 71 : 917-924.
7. Brunt, A. A. 1995. Carlavirus. In : *Virus Taxonomy*, ed. by F. A. Murpy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo and M.D. Summers, pp. 475-478. Springer-Verlag Wien. New York.
8. 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.
9. Takamatsu, S., Lin B. N., Furuta, H. and Makara, K. 1994. RT-PCR mediated cloning and sequence analysis of lily symptomless virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 60 : 487-490.