

## *Tomato spotted wilt virus*를 위한 간편한 식물바이러스 핵산진단법: Virion Captured/RT-PCR (VC/RT-PCR)

조점덕 · 김정수\* · 김현란 · 정봉남 · 류기현<sup>1</sup>

농촌진흥청 원예연구소, <sup>1</sup>서울여자대학교

### Convenient Nucleic Acid Detection for *Tomato spotted wilt virus*: Virion Captured/RT-PCR (VC/RT-PCR)

Jeom-Deog Cho, Jeong-Soo Kim\*, Hyun-Ran Kim, Bong-Nam Chung and Ki-Hyun Ryu<sup>1</sup>

National Horticultural Research Institute, Rural Development Administration, Suwon 441-440, Korea

<sup>1</sup>Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

(Received on February 20, 2006)

Virion captured reverse transcription polymerase chain reaction (VC/RT-PCR) could detect plant virus quickly and accurately. In the VC/RT-PCR, no antibody is needed unlike immuno-captured RT-PCR (IC/RT-PCR) which had been improved method of RT-PCR for plant viruses, and virus nucleic acids can be obtained easily within 30minutes by property of polypropylene PCR tube which is hold and immobilized viral particles on its surface. For the virion capture of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), the extraction buffer was tested. The optimum macerating buffer for TSWV was 0.01M potassium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.5% sodium sulfite. The viral crude sap was incubated for 30 min at 4°C. The virions in the PCR tubes were washed two times with 0.01M PBS containing 0.05% Tween-20. The washed virions were treated at 95°C immediately for 1 min containing RNase free water and chilled quickly in the ice. Disclosed virions' RNAs by heat treatment were used for RT-PCR. Dilution end point of 10<sup>-5</sup> from plant's crude sap infected with TSWV showed relatively higher detection sensitivity for VC/RT-PCR. During multiple detection using two or more primers, interference was arisen by interactions between primer-primer and plant species. The result of multiplex RT-PCR was influenced by combinations of primers and the kind of plant, and the optimum extraction buffer for the multiplex detection by VC/RT-PCR should be developed.

**Keywords** : Extraction buffer, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), Virion captured (VC)/RT-PCR

포장 시료로부터 바이러스를 진단하는 방법은 여러 가지 방법을 사용하여야 하는데 가장 기본이 되는 지표식물을 이용한 생물 검정에 의한 생물학적 방법이 있으며 또한 형태학적 방법으로는 식물체 조즙액을 이용하여 전자 현미경으로 빠른 시간 내에 바이러스의 형태를 관찰하는 Dip 방법과 특정 처리를 통해 식물 조직 내 바이러스의 형태와 세포 미세구조적 특성을 관찰하는 플라스틱 포매법이 있다. 또한 면역학적 방법으로 항혈청을 이용한 면역전자현미경법과 Rapid Immuno filter Paper Assay (RIPA) 그리고 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

(ELISA)가 있다. 최근에 가장 일반적으로 빠르게 식물바이러스를 진단하는 분자생물학적 방법 중 주요 방법은 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)이다. RT-PCR의 일반적인 방법은 식물의 total RNA를 분리해 이용하는 것인데 식물 조직으로부터 핵산을 추출하는 과정은 시간과 노동력 그리고 경비가 많이 소요된다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 간단하고 빠르게 식물 바이러스를 감지하는 기술에 대한 연구가 계속되어 왔다(Li와 Mock, 2005; Osman과 Rowhani, 2005; Singh 등, 2005). 이러한 연구 중 Suehiro 등의 SDT-RT-PCR법은 매우 간편한 방법이나 여러 종류의 바이러스를 동시에 진단할 경우 primer간의 간섭 현상 및 식물체 종류에 따라 진단 효율에 차이를 극복하기 위한 방법 개발이 필

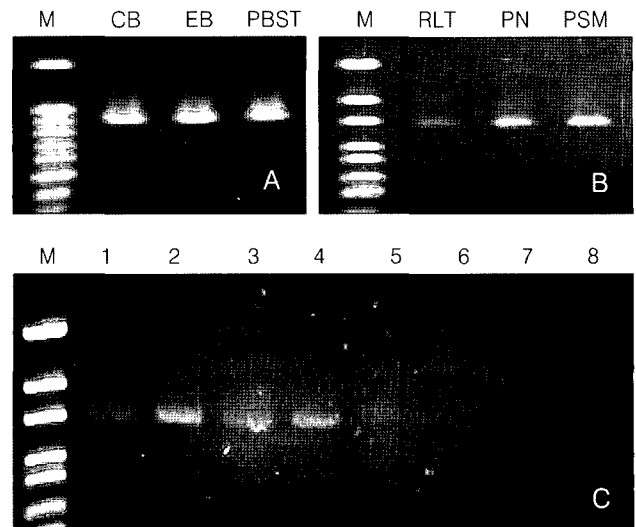
\*Corresponding author

Phone)+82-31-290-6234, Fax)+82-31-290-6259

E-mail) kimjsoo@rda.go.kr

요하였다. 면역학적 방법을 겸한 Immuno-captured/RT-PCR (IC/RT-PCR)은 바이러스 핵산을 따로 분리할 필요가 없고 항체에 결합되지 않는 불순물을 제거할 수 있을 뿐 더러 total RNA를 이용한 바이러스 핵산진단법에 비해 진단비용이 크게 감소하였고 진단의 정확도를 한층 높여 식물바이러스 진단에 큰 역할을 하였다(Nolasco 등, 1993). 그러나 IC/RT-PCR은 항체가 반드시 필요하며 항체 처리와 반응을 기다리는데 시간이 필요하다는 단점이 있다. 이러한 모든 단점을 극복하기 위해 항체가 필요 없고 간단하며 빠르게 식물로부터 핵산을 추출할 수 있는 다양한 방법이 개발되고 있다(James, 1999; Suehiro 등, 2005). 본 연구는 PCR 튜브가 갖는 재질적 특성을 이용하여 항체가 필요 없고 간단히 감염주로부터 바이러스 핵산을 빠르고 정확하게 바이러스를 진단하는 방법(Virion Captured/RT-PCR; VC/RT-PCR)을 개발하는 것을 목적으로 하였다. 최근에 여러 바이러스의 프라이머를 조합하여 한번에 여러 바이러스를 동시에 진단하는 다중 진단법이 많이 개발되고 있다(Sharman 등, 2000). VC/RT-PCR은 식물체 조직액속의 대부분의 단백질을 이용할 수 있으므로 복합 감염된 식물로부터 여러 바이러스를 동시에 빠르게 진단할 수 있는 장점이 있다. 따라서 바이러스 핵산을 안정적이면서도 빠르게 분리해 낼 수 있는 방법을 정립하여 다중 진단법을 적용하고자 하였다. 이용된 바이러스는 최근 우리나라에서 안양 지역의 토마토, 고추, 감자, 상추, 치커리 등 다수의 채소류와 당진 지역의 고추, 참깨 등에 급격히 발생하여 큰 피해를 주고 있는 *Tomato spotted wilt virus*(TSWV)이다(조 등, 2005). TSWV를 VC/RT-PCR로 진단하기 위해 이 바이러스가 안정적인 최적의 완충액을 개발하고 감염기주의 바이러스 농도에 따른 진단감도를 시험하였다. TSWV는 세계적으로 위험도가 매우 높은 바이러스로서 매개충 또한 방제가 까다로운 총채벌레이므로 TSWV의 빠른 진단으로 감염 및 확산을 최대한 억제하는 것은 매우 중요하다(조 등, 2005). 매우 불안정한 TSWV의 핵산을 최대한 안정적으로 추출해 낼 수 있는 완충액을 개발하여 보다 정확한 바이러스 진단을 위한 방법을 정립하였다.

**TSWV감염주 즙액 추출 완충액.** 일반적으로 ELISA와 IC/RT-PCR에서 사용하는 즙액 추출 완충액(EB: 0.05% Tween-20과 2% polyvinylpyrrolidone 그리고 0.2% bovine serum albumin(BSA)을 포함한 0.01M Phosphate buffer), 코팅 완충액(CB: 0.02% sodium azide를 포함한 0.05M sodium carbonate, pH9.6), 그리고 세척 완충액(PBST: 0.01M Phosphate buffer containing 0.05% Tween-20, pH 7.0)을 이용하여 실험하였다(Fig. 1A). 또한 total RNA분



**Fig. 1.** Optimal extraction buffer for TSWV was selected for VC/RT-PCR. **A:** Products of TSWV-NSm, 940 bp with red pepper infected with TSWV-DRP using ELISA buffers. CB, Coating Buffer; EB, Extraction buffer; **PBST**, 1x PBS containing 0.05% Tween-20 for washing; M, Maker (1.5/1.0/0.9/0.8/0.7/0.6/0.5/0.4 kb), **B:** Products of TSWV-NCP (777 bp) with TSWV-ARP. RLT, Extraction buffer of QIAGEN RNeasy Mini Kit for total RNA extraction; PN, 0.01M potassium phosphate buffer (PPBS) containing 0.2M sodium acetate, pH 7.0; PSM, 0.01M PPBS containing 0.2% sodium sulfite ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) and 0.01M 2-mercaptoethanol, pH7.0; M, Maker (1.5/1.0/0.8/0.6/0.5/0.4 kb), **C:** VC/RT-PCR products (TSWV-NCP, 777 bp) from red peppers infected with TSWV-ARP. Extraction buffers were inoculation buffers of TSWV, which showed different sensitivity depending on buffers 0.01M PPBS containing (1) 0.2% sodium sulfite, pH7.0, (2) 0.5% sodium sulfite, pH7.0, (3) 1.0% sodium sulfite, pH7.0, (4) 0.2% sodium sulfite and 0.01M 2-mercaptoethanol, pH7.0, (5) 0.2% sodium sulfite, pH7.6, (6) 0.5% sodium sulfite, pH7.9, (7) 1.0% sodium sulfite, pH8.2, (8) 0.2% sodium sulfite and 0.01M 2-mercaptoethanol, pH8.2. M, Marker (1.5/1.0/0.8/0.6/0.5/0.4 kb).

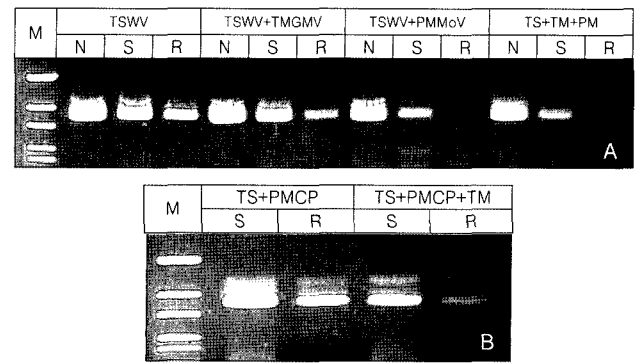
리에 쓰이는 QIAGEN RNeasy Mini Kit의 즙액 추출 완충액인 RLT와 0.2M sodium acetate를 포함한 0.01M potassium phosphate buffer, pH7.0, 그리고 TSWV 접종용 완충액으로 쓰이는 0.2% sodium sulfite와 0.01M 2-mercaptoethanol을 포함한 0.01M potassium phosphate buffer, pH7.0(Mandal 등, 2001)으로 VC/RT-PCR을 수행한 결과 TSWV-DRP가 감염된 고추잎은 대부분의 모든 종류의 완충액에서 비교적 검출이 잘 되었다(Fig. 1B). TSWV-DRP와 달리 검출 효율이 낮은 TSWV-ARP가 감염된 고추잎의 경우를 위해 좀 더 안정적인 완충액을 개발하기 위해 0.2%, 0.5%, 1.0% sodium sulfite( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )를 각각 포함한 0.01M potassium phosphate buffer를 시험한 결과 0.5% 이상을 넣은 완충액에서 밴드가 뚜렷하였으며 산도는 7.0, 7.6, 7.9, 8.2로 바꾸어 보았을 때 7.0에서 진

단 결과가 가장 좋았다. 따라서 TSWV가 가장 안정적으로 진단이 가능한 원충액은 0.5%의 sodium sulfite ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )를 포함한 0.01M potassium phosphate buffer, pH7.0이 최적이었다(Fig. 1C).

**바이러스 프라이머와 VC/RT-PCR 조건.** TSWV진단에 사용한 프라이머는 777 bp를 증폭하는 TSWV-NCP, TSNCPS (5'-ATG TCT AAG GTT AAG CTC AC-3')와 TSNCPR (5'-TCA AGC AAG TTC TGC GAG TT-3') 그리고 940 bp를 증폭하는 TSWV-NSm, TSNSmS (5'-ATG TTG ACT CTT TTC GGT AA-3')와 TSNSmR (5'-CTA TAT TTC ATC AAA GGA TA-3')이다. 다중 진단시 프라이머 사이의 간섭 효과를 보기 위해 이용한 프라이머는 *Pepper mild mottle virus* (PMMoV)의 317 bp를 증폭하는 PMF (5'-ACA GTT TCC AGT GCC AAT CA-3')와 PMR (5'-AAG CGT CTC GGC AGT TG-3') 그리고 395 bp의 크기를 증폭하는 PMCPS (5'-GTG TAC TTC TGC GTT AGG-3')와 PMCPR (5'-TTA AGG AGT TGT AGC CCA CG-3')을 이용하였다. 또한 *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV)의 524 bp를 증폭하는 CPTMGS (5'-TCG AGT ACG TTT TAA TCA AT-3')와 CPTMGR (5'-ATT TTA GGA AAT CTC ACA AC-3')가 이용되었다. 증폭을 위한 PCR 설정은 48°C:45분→94°C:2분→[94°C:30초→50°C:30초→72°C→1분 30초]35회→72°C, 7분→4°C로 하였다. 증폭된 생산물을 1.2% agarose gel에서 100 V 전압으로 40분 이동시킨 후 EtBr 염색으로 관찰하였다(Kim, 2005; 조 등, 2005).

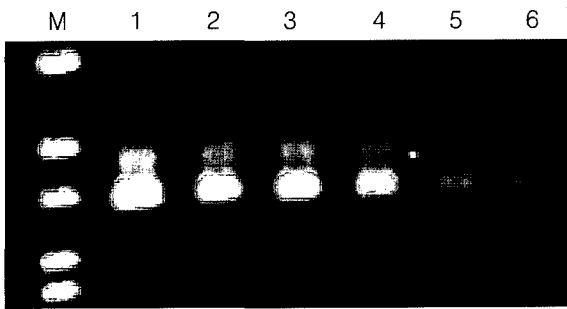
**TSWV를 위한 VC/RT-PCR.** TSWV는 불안정한 바이러스 이므로 모든 처리 과정을 얼음 위에서 진행시켰다. 바이러스에 감염된 기주 식물의 무게와 동일한 부피의 즙액 추출 완충액을 넣고 갈아 조즙액을 만들었다. PCR 튜브(0.5 ml, polypropylene)에 50 u/의 마쇄된 감염주 조즙액을 넣고 4°C에서 30분 처리한 후 0.05%Tween-20를 함유한 0.01M Phosphate buffer, pH7.0로 두번 세척하였다. 50 u/의 RNase-free water를 넣고 즉시 95°C에서 1분 처리한 직후 얼음에 넣어 바이러스 핵산액을 만들었다. Promega의 AccessQuick™ RT-PCR System을 이용하여 Mastermixture 10 u/, distilled water 3 u/, AMV-RTase 0.4 u/를 넣고 primer는 10 pmol짜리 3번 말단 쪽과 5번 말단 쪽을 각각 1 u/씩 넣은 후 감염주로부터 추출된 바이러스 핵산액을 5 u/ 넣어 최종 부피를 20 u/로 하였다.

**다중 진단을 위한 바이러스 프라이머 조합.** 다중 진단의 결과는 VC/RT-PCR과 total RNA를 이용한 결과가 동일하였으며 여기서는 QIAGEN의 RNeasy Mini Kit을 이용하여 분리한 total RNA를 이용한 결과를 제시하였다.



**Fig. 2.** Multiplex detection using total RNA from different plants. Interaction between primer-primer and plant resulted in obstruction of detection of the virus. **A:** TSWV, TSWV-NSm primer (940 bp); TMGMV, TMGMV primer (TM, 524 bp); PMMoV, PMMoV primer (PM, 317 bp); Total RNA of *Nicotiana rustica* (N), sesame (S), and red pepper (R) infected with TSWV; M, Maker (1.5/1.0/0.8/0.6/0.5 kb), **B:** TSWV, TSWV-NSm primer (940 bp), PMCP, PMMoV-PMCP primer (395 bp); TM, TMGMV primer (524 bp); Total RNA of sesame (S), and red pepper (R) infected with TSWV; M, Maker (1.5/1.0/0.8/0.6/0.5 kb).

TSWV가 감염된 담배(*Nicotiana rustica*)와 고추, 참깨 기주로부터 total RNA를 분리하고 이것을 이용하여 두가지 이상의 바이러스 프라이머를 섞어 다중 진단할 때 RT-PCR 생산물에 대한 진단 효과를 시험하였다. 담배, 고추, 참깨로부터 분리한 total RNA를 이용하여 duplex (TSWV+TMGMV, TSWV+PMMoV-PM)와 triplex (TSWV+TMGMV+PMMoV-PM)를 실시한 결과(Fig. 2A) TSWV 단독 프라이머 결과와 달리 TSWV+TMGMV에서는 고추에서 감도가 크게 떨어졌으며 TSWV+PMMoV-PM에서는 고추는 진단이 되지 않았고 들깨의 진단 감도가 크게 낮아졌다. 또한 triplex 진단에서는 TSWV+PMMoV-PM에서 보다 더 진단 감도가 낮게 나타났다. 따라서 프라이머 종류에 의한 차이인지 알아보기 위해 PMMoV의 다른 프라이머인 PMMoV-PMCP를 이용해 duplex(TSWV+PMCP)와 triplex(TSWV+TMGMV+PMCP)로 진단해 본 결과(Fig. 2B) duplex에서는 PMCP를 이용한 결과가 PMMoV-PM을 이용한 것과 다르게 TSWV의 진단을 저해하는 현상이 발생하지 않았으나 triplex에서는 고추에서 감도가 크게 낮아졌다. 따라서 여러 개의 프라이머를 동시에 이용하여 진단하는 다중 진단 PCR을 정확히 하려면 프라이머 사이의 간섭 효과가 신중히 고려되어야 하며 또한 어떤 식물을 이용하여 진단하느냐에 따라 진단의 감도가 다르므로 프라이머의 선정은 식물의 특성을 잘 파악한 후 하여야 할 것이다. 특히 polyphenols과 polysaccharides가 다량 함유된 점성이 높은 식물체의 경우 핵산분리가 매



**Fig. 3.** Dilution end point test of the plant extraction crude sap for VC/RT-PCR. The products (TSWV-NCP, 777 bp) showed high sensitivity of detection using *Datura stramonium* infected with TSWV-DRP. The original crude sap (1) was diluted with  $10^{-2}$  (2),  $10^{-3}$  (3),  $10^{-4}$  (4),  $10^{-5}$  (5), and  $10^{-6}$  (6) with extraction buffer for TSWV (PPBS-SS).

우 어려워 다양한 방법이 개발되고 있다(Zeng과 Yang, 2002). 이러한 식물에 대해서는 VC/RT-PCR을 위한 특별한 즙액 추출 완충액이 개발되어야 할 것이다.

**감염주 핵산 추출액 희석 한계 시험.** 이병주 조즙액의 희석 한계 농도를 알아보기 위해 TSWV-DPR에 감염된 독말풀(*Datura stramonium*)을 이용하였다. 최적의 완충액으로 선택된 0.5%의 sodium sulfite( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )를 포함한 0.01M potassium phosphate buffer(PPBS-SS)를 이용하여 식물체 조즙액을 만들고 이러한 완충액에 동일한 완충액으로  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  농도로 희석하여 정립된 VC/RT-PCR 과정을 통해 진단하였다. 그 결과 이병주 조즙액의  $10^{-5}$  농도까지 가시적인 진단이 가능하므로써 VC/RT-PCR 방법의 감도가 매우 높아 바이러스 농도가 낮은 식물로부터도 정확히 진단이 가능하다는 것을 알 수 있었다(Fig. 3).

## 요 약

VC/RT-PCR은 바이러스의 단백질과 PCR 튜브의 재질적 특성을 이용하여 바이러스 이병주의 즙액으로부터 핵산을 지니고 있는 바이러스를 polypropylene에 부착시키고 그 외 PCR활성을 저해하는 식물 즙액은 PBST로 제거해 주므로써 정확하고 깨끗한 바이러스 진단이 가능하다.

이 방법은 바이러스에 대한 항혈청이 전혀 필요 없으며 포장 시료를 직접 이용해 30분 이내에 바이러스 핵산을 획득할 수 있어 바이러스 진단이 빠르고 간편하며 경제적이고 감도 높은 실용적인 방법이다. TSWV에 대한 VC/RT-PCR을 위해 다양한 마쇄 완충액을 시험한 결과 0.5%의 Sodium sulphite를 포함한 0.01M Potassium phosphate (pH 7.0)가 가장 안정적이었으며 VC/RT-PCR을

이용하여 TSWV에 대한 최적의 처리 과정을 확립하였다. TSWV에 최적인 완충액에 마쇄한 바이러스 감염 잎의 조즙액을 이용한 한계 희석 농도는  $10^{-5}$ 으로 높은 감도를 보여 낮은 농도의 바이러스를 보유한 기주로부터 정확하게 바이러스를 감지해 낼 수 있게 되었다. 두가지 이상의 바이러스에 감염된 기주로부터 두 가지 이상의 프라이머를 이용해 바이러스를 감지해 내는 다중 진단을 위한 실험 중 식물체의 종류와 바이러스의 Primer의 종류가 진단 결과의 정확도에 큰 영향을 미치며 이러한 결과는 식물체 즙액을 바로 이용하는 VC/RT-PCR 방법은 물론 식물체로부터 Total RNA를 따로 분리하여 RT-PCR을 이용한 결과에서도 동일하게 나타났다. 따라서 편리하고 실용적인 VC/RT-PCR법의 정확성을 최대화시키기 위해서는 다중 진단을 저해하는 식물체적 원인과 Primer 사이의 간섭 현상에 대한 연구가 더 진행될 것이며 이러한 원인을 충분히 제거해 줄 수 있는 마쇄 완충액을 개발하고 프라이머 제작을 더욱 신중히 해야 할 것이다.

## 감사의 글

이 논문은 농촌진흥청 바이오그린21 사업으로 수행하였으며 이에 감사를 표합니다.

## 참고문헌

- 조점덕, 김정수, 김진영, 김재현, 이신호, 최국선, 김현란, 정봉남. 2005. 채소류의 토마토 반점 위조 바이러스 발생과 병징(1). 식물병연구 11: 213-216.
- James, D. 1999. A simple and reliable protocol for the detection of apple stem grooving virus by RT-PCR and in a multiplex PCR assay. *J. Virol. Meth.* 83: 1-9.
- Kim, J. H: 2005. Identification of six viruses infecting peppers in Korea and their biological and molecular characteristics. A Thesis for the degree of Philosophy of Science, Kangwon National University.
- Li, R. and Mock, R. 2005. An improved reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay for the detection of two cherry flexiviruses in *Prunus* spp. *J. Virol. Meth.* 129: 162-169.
- Mandal, B., Pappu, H. R. and Culbreath, A. K. 2001. Factors affecting mechanical transmission of *Tomato spotted wilt virus* to peanut (*Arachis hypogaea*). *Plant Dis.* 85: 1259-1263.
- Nolasco, G., deBlas, C., Torres, V. and Ponz, F. 1993. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *J. Viro. Methods* 45: 201-218.
- Osman, F. and Rowhani, A. 2005. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in

- woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *J. Virol. Meth.* (In press).
- Sharman, M., Thomas, J. E. and Dietzgen, R. G. 2000. Development of a multiplex immunocapture PCR with colourimetric detection for viruses of banana. *J. Virol. Methods* 89: 75-88.
- Singh, R. P., Dilworth, A. D., Singh, M. and Babcock, K. M. 2005. An alkaline solution simplifies nucleic acid preparation for RT-PCR and infectivity assays of viroids from crude sap and spotted membrane. *J. Virol. Meth.* (In press).
- Suehiro, N., Matsuda, K., Okuda, S. and Natsuaki, T. 2005. A simplified method for obtaining plant viral RNA for RT-PCR. *J. Virol. Methods* 125: 67-73.
- Zeng, Y. and Yang, T. 2002. RNA Isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 417a-417e.