

## In Vitro 전사 RNA Probe를 이용한 식물 바이러스병의 진단

최장경\* · 이종희 · 합영일<sup>1</sup>  
강원대학교 농생물학과, <sup>1</sup>고령지농업시험장

## Detection of Plant RNA Viruses by Hybridization Using In Vitro Transcribed RNA Probes

Jang Kyung Choi\*, Jong Hee Lee and Young Il Hahn<sup>1</sup>

Department of Agricultural Biology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea  
<sup>1</sup>Alpine Agricultural Experiment Station, Daekwallyong 232-950, Korea

**ABSTRACT :** The cDNAs derived from the coat protein (CP) genes of six plant RNA viruses, tobacco mosaic virus-pepper strain (TMV-P) and -ordinary strain (TMV-OM), potato virus Y (PVY), turnip mosaic virus (TuMV), cucumber mosaic virus (CMV) and potato leafroll virus (PLRV), were subcloned into the transcription vector, pSPT18, containing SP6 and T7 promoters. The digoxigenin (DIG)-labeled RNA probes of all clones were synthesized by *in vitro* transcription with SP6 or T7 RNA polymerase after linearization of the cloned pSPTs with *Xba*I or *Sac*I, and were tested for their sensitivities for the detection of the six viruses. In slot-blot hybridization, dilution end points for the detection of TMV-P and TMV-OM were  $10^{-4}$ , while those of PVY, TuMV and CMV were  $10^{-3}$ . PLRV was detected at the dilution of  $10^{-2}$ . When each RNA probe was applied for the detection of the viruses in the preparations from the leaf disks (8 mm in diameter, and 12 to 15 mg in weight) of infected natural host plants, TMV-P, TMV-OM and TuMV could be detected from one disk, while PVY from 1 or 2 disks. CMV was detected in the preparation from two disks, and PLRV from three disks. With DIG-labeled RNA probe, PVY was detected at 5 days after inoculation, but with ELISA the virus was detected at 8 days after inoculation to tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc) plants on which symptoms appeared at 9 days after inoculation. No difference was observed in cross reaction between the RNA probes for the detection of TMV-P and TMV-OM.

**Key words :** DIG-labeled RNA probe, hybridization detection, plant RNA virus.

일반적으로 식물 바이러스병의 진단에는 지표식물 검정, 혈청반응, 전자현미경 관찰 등의 방법이 이용되고 있다. 이들 방법은 대개 복합적으로 활용되고 있으나, 각 바이러스의 특이적 항체를 이용한 혈청학적 방법이 가장 일반적이며, 그중에서도 특히 효소결합항체법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) (12)은 다량의 시료를 검출하는데 민감성과 편리성이 인정되어 널리 활용되고 있다. 그러나 ELISA는 이 병 식물체에 바이러스 농도가 낮거나 국부적으로 존재할 경우에는 검출이 어렵고, 때로는 건전 식물체로부터 비특이적 반응을 나타내기 때문에 진단에 오류를 범하는 단점을 지니고 있다(23).

최근 분자생물학이 발전하고 바이러스의 계놈 분석이 많이 이루어지면서, 식물 바이러스에 있어서도 이를 이용한 여러 종류의 혁신 분자교잡법이 시도되어 왔다(1, 2, 13, 19). 그러나 분자교잡에 이용되는 혁신의 종류와 probe의 표지물질에 따라 바이러스의 검출에 큰 영향을 미치고 있다(2, 24, 25). 특히 식물 바이러스의 대부분은 RNA를 계놈으로 가지고 있기 때문에 분자교잡을 이용한 바이러스의 검출에는 계놈 RNA의 cDNA를 probe로 사용하고 있는데, DNA-RNA의 분자교잡 효율이 낮아서 유전자진단법의 활용에 제약요인으로 지적되고 있다(24).

우리들은 순무 모자이크 바이러스(turnip mosaic virus, TuMV)의 3' 말단 부분에 대응하는 약 2,000 bp의 cDNA를 합성한 후, 이 cDNA를 *in vitro*에서 전사

\*Corresponding author.

시키는 방법으로 digoxigenin(DIG) 표지 RNA probe를 작성하여 TuMV-RNA를 검출하였을 때 매우 민감한 반응을 얻은 바 있다(7). 이 연구는 이와 같이 *in vitro*에서 전사시킨 RNA probe를 이용하는 방법을 몇 종의 식물 RNA 바이러스에 적용시켜 이들 바이러스의 진단에도 활용성이 있는지를 검토하기 위하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

**공시바이러스 및 cDNA 클론.** 바이러스는 담배 모자이크 바이러스(tobacco mosaic virus, TMV)의 고추계(TMV-P)(8)와 보통계(TMV-OM)(11), 감자 Y 바이러스(potato virus Y, PVY)의 보통계(PVY-OK)(5), TuMV의 cqs계(6), 오이 모자이크 바이러스(cucumber mosaic virus, CMV)의 As계(9) 및 감자 잎말립 바이러스(potato leafroll virus, PLRV)(16) 등 6종을 공시하였다. 이들 바이러스의 계놈 RNA에 대한 cDNA는 모두 외피단백질유전자(coat protein gene, CP 유전자)를 포함하는 클론을 공시하였다(4, 7, 10, 18, 21).

**In vitro** 전사 벡터의 작성. 공시한 각 바이러스의 CP cDNA로부터 *in vitro* 전사 RNA probe를 만들기 위하여 SP6 및 T7 프로모터(promoter)가 삽입된 전사 벡터(transcription vector) pSPT18에 서브클로닝하였다. 각 바이러스의 CP cDNA를 포함하고 있는 클론들로부터 재조합 플라스미드를 정제한 다음, TMV-P, TMV-OM, PVY, CMV 및 PLRV는 *Xba*I과 *Sac*I으로, TuMV는 *Pst*I으로 절단하여 각 바이러스의 CP cDNA를 추출하였다. 이들 각 cDNA는 T4 DNA ligase(5 U)를 이용하여 16°C에서 3시간 동안 반응시킨 다음, cDNA의 절단에 이용한 효소로 처리한 pSPT 18에 삽입시켰다. 이렇게 cDNA가 삽입된 각 바이러스 CP cDNA-pSPT18은 *Escherichia coli* JM109를  $\text{CaCl}_2$ 로 처리하여 제작한 competent cell에 heat-shock 방법(22)으로 형질전환시켰다. 형질전환된 세균은 앰피실린(ampicillin, 50 µg/ml)<sup>o</sup> 포함된 Luria-Bertani (LB) 배지에서 16시간 동안 배양하였다. 여기서 형성된 콜로니들로부터 alkaline lysis 방법(3)으로 플라스미드를 추출하여 CP cDNA의 삽입여부를 확인하였다. 또한 각 바이러스로부터 CP cDNA의 삽입이 확인된 플라스미드는 *Xba*I과 *Sac*I을 이용하여 절단한 후 전기영동하여 cDNA를 검정하였다. 클로닝된 플라스미드나 cDNA의 확인은 1% agarose gel을 이용하였다.

**RNA probe 제작.** *In vitro*에서 전사시키는 방법으로 DIG 표지 RNA probe를 제작하기 위하여 각 바이

러스의 CP cDNA의 삽입이 확인된 클론 1개씩을 선발하여 플라스미드를 추출한 후, 각 CP cDNA의 삽입 방향에 따라 *Xba*I 또는 *Sac*I 중 1종의 제한효소를 처리하여 플라스미드를 linear form으로 만들었다. DIG 표지 RNA probe의 합성은 DIG-RNA labeling kit (Boehringer Mannheim)와 SP6 또는 T7 RNA polymerase를 사용하였다. 즉 제한효소로 절단한 각 바이러스의 CP cDNA를 포함하는 플라스미드는 3.5 mM DIG-UTP, 10 mM dNTP, SP6 또는 T7 RNA polymerase(20 U) 및 RNase inhibitor(20 U)와 혼합하여 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 다음, 0.2 M EDTA를 처리하여 반응을 정지시켰다. 이 반응을 통하여 전사된 각 바이러스의 DIG 표지 RNA probe는 에탄올 침전 후 0.1% dimethyldicarbonate로 처리한 멸균수에 용해시켜 -20°C에 보관하면서 필요시 probe로 사용하였다.

**시료의 제작과 blotting.** 각 바이러스의 검출을 위한 바이러스 RNA의 제작은 2가지 방법을 택하였다. 우선 합성된 RNA probe의 민감성을 검정하기 위하여, 공시한 TMV-P와 TMV-OM은 *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, PVY-OK는 *N. tabacum* cv. Xanthi nc, TuMV-cqs는 순무, CMV는 *N. glutinosa*에 각각 즙액 접종하여 증식시킨 후 바이러스의 순화 재료로 사용하였으며, PLRV는 포장에서 자연 발생된 감자의 이병증을 채취하여 ELISA 검정을 통하여 PLRV의 감염이 확인된 시료를 순화에 이용하였다. 이들 각 이병식물로부터 바이러스는 0.5 M sodium citrate buffer (pH 7.0) / chloroform(1 : 1 : 1)에서 마쇄 → 저속원심분리(8,000 rpm, 10분) → polyethylene glycol(4%, PEG 6000) 처리 → 저속원심분리(8,000 rpm, 20분) → 분획원심분리(37,000 rpm, 90분~8,000 rpm, 10분)의 과정을 거쳐 부분순화하였다. 부분순화된 각 바이러스로부터 SDS/proteinase K/phenol 방법(14)으로 RNA를 정제하고, 멸균수 / 20 X SSC / formaldehyde(5:3:2) 용액을 첨가하여 65°C에서 10분간 처리하여 시료로 공시하였다. 한편 DIG-RNA probe의 활용성을 검정하기 위하여, 포장에서 각 바이러스의 병징이 가장 뚜렷하게 발현된 이병식물의 정단엽으로부터 직경 8 mm의 puncher를 사용하여 잎디스크(leaf disk, 1 disk=12~15 mg)를 만들었고, 이를 디스크로부터 phenol / chloroform(1 : 1)과 RNA 추출완충액(7)을 1 : 1로 혼합하여 마쇄한 즙액에 포함된 RNA를 시료로 이용하였다. 이 때 blotting 직전에 RNA를 변성시키는 과정에서 일반적으로 이용되고 있는 formamide(15)와 formaldehyde(23)의 효과를 비교 검정하여 분자교잡의 효율이 높은

것을 선택하였다.

각 바이러스 RNA 시료의 blotting은 10 X SSC용액으로 침지시킨 나일론막(nylon membrane, Hybond N<sup>+</sup>, Amersham)을 dot-blot(96 wells, Bio-Rad) 또는 slot-blot(48 wells, Hoefer Scientific)장치에 고정시킨 후 제조된 시료를 20~50 μl씩 blotting하여 흡착시킨 다음, UV램프(302 nm)에 3분간 노출하여 고정시켰다.

분자교잡 검정. 각 바이러스의 RNA 시료를 흡착시킨 나일론막은 Choi 등의 방법(7)에 따라 prehybridization 및 DIG-RNA probe와 반응시키는 hybridization 과정을 68°C에서 12~16시간 동안 실시한 후 세척을 하고, chemiluminescent detection kit(Boehringer Mannheim)를 이용하여 분자교잡된 RNA를 검출하였다.

ELISA 검정. PVY를 접종한 후 바이러스가 최초로 검출되는 시기를 접종 후 새롭게 나오는 정단엽의 잎디스크 5매씩을 이용하여 분자교잡법으로 검정하였는데, 이때 ELISA 검정의 효과와 비교하였다. ELISA 검정은 분자교잡에서 검정한 것과 같은 위치의 잎을 이용하여 direct double-sandwich 방법(12)에 따라 실시하였으며, PVY-O의 IgG와 alkaline phosphatase-conjugate PVY IgG(Agdia)는 400배 희석액, 검정용시료는 10배 희석액을 이용하였다.

## 결 과

각 바이러스 CP 유전자에 대한 pSPT 클론의 선발.

*In vitro* 전사 벡터인 pSPT18에 공시한 바이러스들의 CP cDNA를 삽입하여 클로닝시킨 다음, 각 클론들로부터 플라스미드를 추출하여 전기영동한 결과, 각 바이러스별로 pSPT 보다 큰 분자크기의 플라스미드들이 검출되어 cDNA의 삽입이 인정되었다(Fig. 1a). 이를 플라스미드를 각 바이러스별로 1종씩 선발하여 제한효소 *Xba*I과 *Sac*I으로 처리한 후 전기영동한 결과 각 바이러스의 CP cDNA가 확인되었다(Fig. 1b).

한편 전사벡터 pSPT18에 삽입된 각 바이러스 CP cDNA의 방향성을 검정하기 위하여 각 cDNA의 염기서열을 참조하여 선정한 제한효소로 절단한 결과, TMV-P, PVY, TuMV 및 CMV의 cDNA는 SP6 promoter의 하류에 sense 방향으로 삽입되었고, TMV-OM과 PLRV는 antisense 방향으로 삽입된 것이 확인되었다. 이러한 결과로부터 각 바이러스의 cDNA가 삽입된 pSPT 벡터에서 *Xba*I 또는 *Sac*I를 이용하여 linear form으로 작성한 후, RNA probe를 전사시킬 때 사용될 수 있는 프로모터와 RNA polymerase의 종류

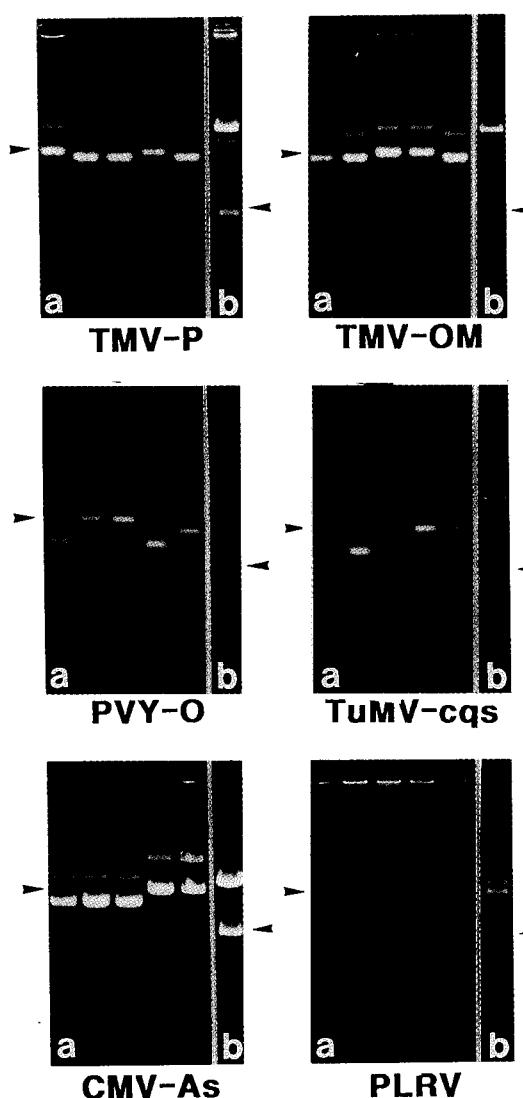


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of transcription vector, pSPT18, inserted with coat protein gene cDNAs of six plant viruses (a), and patterns digested with *Xba*I and *Sac*I (b). Arrows indicate the inserted pSPTs and digested cDNAs of coat protein gene.

를 결정하였다. 즉 TMV-P, PVY, TuMV 및 CMV에서는 *Xba*I으로 절단한 후 SP6 프로모터를, TMV-OM과 PLRV에서는 *Sac*I으로 절단 후 T7 프로모터를 사용할 수 있다는 것이 확인되었다.

*In vitro* 전사 RNA probe의 민감성. 각 바이러스의 선발된 CP cDNA-pSPT 벡터로부터 전사된 RNA probe의 민감성을 검정하기 위하여 순화 바이러스에서 추출한 게놈 RNA를 단계별로 희석하여 나일론막

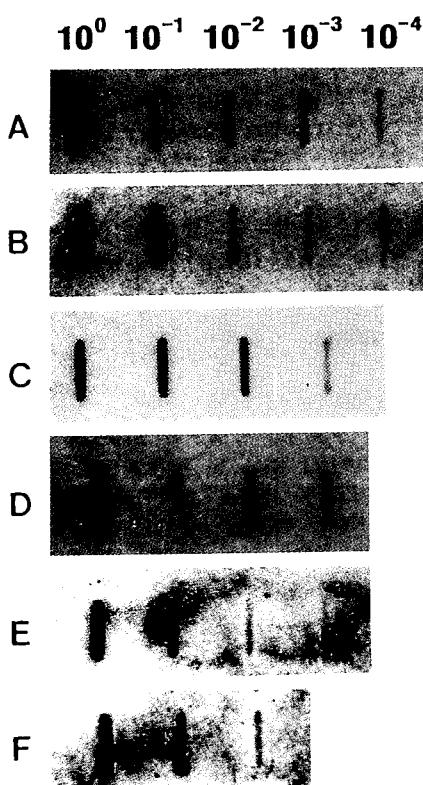


Fig. 2. Comparison of the dilution end points for the detection of six viral RNAs by slot-blot hybridization using their DIG-labeled RNA probes. A : TMV-P, B : TMV-OM, C : PVY-OK, D : TuMV-cqs, E : CMV-As, and F : PLRV.

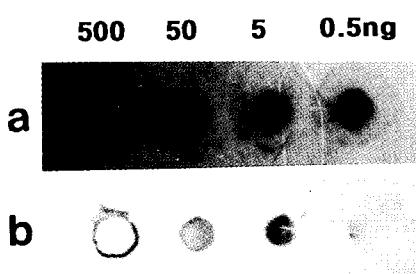


Fig. 3. Effects of formaldehyde (a) and formamide (b) treatments as denaturants in CMV-RNA extraction process. Leaf disk extracts were detected by dot-blot hybridization using DIG-labeled RNA probe of CMV-As.

에 slot-blot시킨 시료와 분자교잡을 실시하였다. 그 결과 TMV-P, TMV-OM에서는  $10^{-4}$ , TuMV, CMV 및 PVY는  $10^{-3}$ , 그리고 PLRV는  $10^{-2}$ 의 희석액까지 검출이 가능하였다(Fig. 2).

Table 1. Number of leaf disks required for the detection of six RNA viruses by hybridization using DIG-labeled RNA probes in infected host plants

Virus	No. of leaf disks <sup>a</sup>	Host plant
TMV-P	1	<i>Capsicum annuum</i> cv. Kumtap
TMV-OM	1	<i>Capsicum annuum</i> cv. Kumtap
PVY-OK	1~2	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Superior
TuMV-cqs	1	<i>Brassica pekinensis</i> cv. Konaengjiyorum
CMV-As	2	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Burley 21
PLRV	3	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Superior

<sup>a</sup> Weight of a leaf disk (8 mm in diameter) of a host plant infected with each virus was ranged from 12 to 15 mg.

이 병 식물체로부터 바이러스 RNA의 검출. 분자교잡 반응에 이용할 시료로부터 RNA를 추출하여 나일론막에 blotting하기 전에 일반적으로 이용되고 있는 formamide와 formaldehyde의 변성과정을 비교하였을 때, formaldehyde의 변성처리에서 분자교잡 반응의 민감도가 높게 나타났다(Fig. 3).

각 바이러스에 감염된 식물의 잎에서 절취한 디스크로부터 RNA를 추출하여 blotting시킨 후 전사 RNA probe와 교접시켰을 때, 바이러스에 따라 반응의 감도에는 차이가 있었으나, 모든 바이러스를 검출하는데 충분한 반응을 나타냈다. 이때 각 바이러스의 증식에 사용한 전전 식물체의 잎디스크로부터 추출한 RNA는 모든 바이러스의 RNA probe에서 교접반응이 나타나지 않았다. 한편 각 바이러스의 DIG 표지 CP RNA probe를 이용하여 자연계에 감염된 각 바이러스의 이 병식물에서 검정할 수 있는 시료의 최소 양을 검정하였다. 즉 각 바이러스의 이 병식물로부터 잎디스크를 제작하여 디스크의 매수별로 RNA를 추출한 다음 분자교잡을 실시한 결과, TMV-P, TMV-OM 및 TuMV-cqs에서는 1매, PVY-OK에서는 1~2매, CMV-As는 2매, PLRV는 3매의 디스크로부터 검출이 가능하였다(Table 1).

PVY를 담배에 접종한 후 일수의 경과에 따른 바이러스의 검출 정도를 정단엽의 잎디스크를 이용하여 검정한 결과, 분자교잡 반응은 접종 5일 후의 시료에서부터 나타나기 시작하여 9~12일의 시료에서 강한 반응을 보였다(Table 2). 또한 같은 식물의 정단엽으로부터 즙액을 이용하여 ELISA 검정으로 바이러스를 검출하였을 때에는 접종 후 8일째의 시료부터 바이러스의 검출이 가능하였다. 이때 이들 식물에서 발현되는 병징을 육안으로 관찰한 결과 접종 후 9일째부터

**Table 2.** Comparisons of PVY detection by hybridization using DIG-labeled RNA probe and ELISA after PVY-OK inoculation

	Days after inoculation											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Intensity of hybridization <sup>a</sup>	-	-	-	-	±	+	++	++	+++	+++	+++	+++
ELISA <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++
Expression of symptoms <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	-	-	VC	VC	mM	mM	mM

<sup>a</sup> Five leaf disks (8 mm in diameter) of terminal leaves of Xanthi nc infected with PVY-OK were used for hybridization. Symbols indicate : (-) not detected, (±) indefinite reaction, and (+ to +++) increasing amounts of reaction.

<sup>b</sup> Assay was conducted by direct ELISA using anti-PVY-O-conjugate ( $\times 400$ ). Value indicates the  $A_{405\text{nm}}$  : (-) 0.01~0.15, (+) 0.16~0.50, and (++) 0.51~1.22. Absorption value of healthy plant sap was ranged from 0.01 to 0.09.

<sup>c</sup> Symptoms indicate : vein clearing (VC), and mild mosaic (mM).

정단엽에 엽백투화 현상이 나타나기 시작하여 11일째에 짙은 모자이크를 형성하였다.

한편 TMV-P와 TMV-OM의 probe를 교차로 이용하여 바이러스 계통간 검출의 차이를 검정하였을 때, 이들 두 바이러스의 분자교집에 차이를 보이지 않았다. 따라서 CP cDNA의 RNA probe를 이용한 실험에서 TMV의 P와 OM계통의 구분은 되지 않았다.

## 고 찰

핵산의 분자교집 방법은 그 민감성과 특이성이 높기 때문에 유전자분석 과정에서 많이 활용되고 있다. 따라서 식물 바이러스병과 같이 검출이 어려운 경우에 있어서는 바이러스병의 진단을 위한 방법으로 개발 가능성이 높다. 특히 핵산 분자교집법은 현재 일반적으로 사용되고 있는 ELISA 검정보다 25~250배 이상의 민감성이 plum pox virus(PPV), TuMV, PLRV, potato virus X(PVX) 등(7, 19, 23, 25)에서 보고되어 있으며 바이러스병의 조기 정밀진단법으로의 활용성이 기대되고 있다. 그러나 지금까지 바이러스병의 진단에 본격적으로 활용되지 못하고 있는 이유는 바이러스의 검출용 probe를 표지하는데 있어서  $^{32}\text{P}$ 와 같은 방사선 동위원소를 사용하는 안정성과 제약성의 문제가 있었고, 또한 RNA 바이러스와 같은 경우는 계놈에 대응하는 cDNA의 제작이 필요하기 때문에 널리 활용되지 못하였다. 반면에 최근 핵산 probe의 표지물질로 biotin, horseradish peroxidase, DIG 등 비방사선물질이 개발되어 이의 활용성이 높아 평가되고 있다(17, 19, 20). 또한 식물 바이러스에 있어서도 여러 종류의 바이러스에 대한 유전자의 분석이 이루어져 있고, cDNA의 합성이나 클로닝이 일반적인 실험 수준에서 이루어질 수 있으므로 바이러스병의 유전자진단법은

금후 널리 활용될 수 있는 계기가 마련되었다고 판단된다.

우리는 이미 TuMV 계놈 RNA의 3' 말단부에 대한 cDNA를 이용, DIG-RNA probe를 제작하여 TuMV-RNA의 검출이 매우 민감하고 특이적으로 이루어진다는 사실을 보고한 바 있다(7). 이 연구는 형태적으로 다른 6종의 RNA 바이러스를 공시하여 *in vitro* 전사 RNA probe를 이용한 분자교집 실험을 실시함으로써 여러 종류의 식물 바이러스병에 대한 유전자진단법으로서의 활용성을 검토하였다. 그 결과 PLRV와 같이 식물체내에 국부적으로 존재하는 바이러스에서는 약간 차이를 보이기는 하였지만, 대부분의 RNA 바이러스를 민감하게 검출할 수 있다는 것이 인정되었다. 특히 적은 양의 시료로부터 검출이 가능한 점은 각 바이러스를 감염초기에 조기 진단할 수 있는 가능성을 나타냈다. 그러나 TMV-P와 TMV-OM 계통을 이용하여 바이러스 계통간 반응의 차이를 검정하였을 때, 계통간 차이는 구별되지 않았다. 이는 이들 바이러스 RNA의 검출에 이용한 probe의 염기서열에 있어서 상동성이 높기 때문에 나타난 결과로 생각된다. 따라서 바이러스의 계통을 구별하는 방법으로 활용하기 위해서는 계놈 RNA의 염기서열중에서 계통간 구별이 가능한 부위를 선택하여 probe로 작성하는 것이 중요할 것으로 생각된다. 실제로 Querci 등(19)은 potato virus X(PVX)-RNA의 중간부위에 대응하는 2종류의  $^{32}\text{P}$  표지 cDNA probe를 이용하였을 때, 1종의 probe는 혈청 형이 서로 다른 PVX의 계통을 구분하는데 효과적이었다는 것을 보고하고 있다.

PVY에서 검정한 바이러스 접종 후 최초로 바이러스 RNA가 검출되는 시기를 검정한 결과는 접종 5일 후로 나타났다. 그러나 이러한 사실은 이 실험에서 시료의 채취를 바이러스를 접종한 식물체의 정단엽으로

한정시켰기 때문에 일어난 결과로 분석되며, 시료의 채취부위에 따라서는 검출시기가 달라질 수 있을 것으로 생각된다.

바이러스 RNA probe를 이용한 유전자진단 방법은 공시한 6종의 RNA 바이러스에서 모두 민감하게 검출 할 수 있다는 것이 인정되었다. 다만 이 방법이 실용화되기 위해서는 대상 바이러스의 계놈 RNA에 대한 염기분석이 부분적으로는 이루어져야 하고, 실험방법이 복잡하고 시간과 비용이 많이 드는 점 등의 문제점에 대한 보완이 필요하다. 이러한 문제점들이 해결될 경우 RNA probe의 유전자진단법은 매우 유용하게 식물 바이러스병의 진단에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

담배 모자이크 바이러스의 고추계(TMV-P)와 보통계(TMV-OM), 감자 Y 바이러스(PVY), 순무 모자이크 바이러스(TuMV), 오이 모자이크 바이러스(CMV) 및 감자 잎말립 바이러스(PLRV) 등 6종의 식물 RNA 바이러스를 공시하여 각 계놈 RNA의 외피단백질유전자(coat protein gene, CP 유전자)에 대응하는 cDNA를 *in vitro* 전사 벡터 pSPT18에 서브클로닝 시켰다. 각 바이러스의 클론들로부터 추출한 플라스미드를 이용하여 digoxigenin(DIG) 표지 RNA probe를 합성하고, 이를 probe의 민감성을 검정하기 위하여 각 바이러스 RNA의 단계별 회석액과 slot-blot 분자교잡을 실시한 결과, TMV-P, TMV-OM에서는  $10^{-4}$ , TuMV, CMV 및 PVY는  $10^{-3}$ , 그리고 PLRV는  $10^{-2}$  회석의 검출한계를 나타냈다. 각 바이러스의 이병식물로부터 잎디스크(직경 8 mm, 무게 12~15 mg)를 제작하여 실시한 분자교잡에서는 TMV-P, TMV-OM 및 TuMV에서는 1매, PVY는 1~2매, CMV는 2매, PLRV는 3매의 디스크로 부터 각 바이러스를 검출할 수 있었다. PVY를 접종한 후 바이러스가 최초로 검출되는 시기를 검정한 결과 DIG-RNA probe에 의해서는 접종 5일째부터 바이러스의 검출이 되었으나, ELISA에 의해서는 8일째의 시료에서 가능하였고, 병징은 9일째부터 발현되었다. TMV-P와 OM의 CP 유전자의 DIG-RNA probe를 교차로 이용한 계통간 분자교잡반응의 차이는 구분되지 않았다.

## 감사의 말씀

이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제

연구비에 의하여 연구되었습니다.

## 참고문헌

1. Abad, J. A. and Moyer, J. W. 1992. Detection and distribution of sweet potato feathery mottle virus in sweet potato by *in vitro*-transcribed RNA probes (riboprobe), membrane immunobinding assay, and direct blotting. *Phytopathology* 82 : 300-305.
2. Baulcombe, D. C. and Fernandez-Northcote, E. N. 1988. Detection of strains of potato virus X and of a broad spectrum of potato virus Y isolates by nucleic acid spot hybridization (NASH). *Plant Dis.* 72 : 307-309.
3. Birnboim, H. C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 : 1513.
4. Cheong, S. Y., Choi, J. K., Yoshida, K. and Lee, B. Y. 1995. Complementary DNA cloning and sequence of the coat protein gene of potato virus Y-ordinary Korean strain. *Korean J. Plant Pathol.* 11 : 73-79.
5. Cheong, S. R., Goto, T., Hahm, Y. I. and Choi, J. K. 1992. A strain of potato virus Y (PVY) isolated from potato plants in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 8 : 209-212.
6. Choi, G. S. and Choi, J. K. 1992. Biological properties of two isolates of turnip mosaic virus isolated from Chinese cabbage and radish in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 8 : 276-280.
7. Choi, G. S., Choi, J. K. and Choi, J. G. 1993. Detection of turnip mosaic virus with a DIG-labeled RNA probe. *Korean J. Plant Pathol.* 9 : 263-268.
8. Choi, J. K., Kwon, S. B., Kim, J. O. and Park, E. K. 1989. Biological characterization of a strain of tobacco mosaic virus isolated from red pepper. *Korean J. Plant Pathol.* 5 : 331-336.
9. Choi, J. K., Kwon, S. B., Lee, S. Y. and Park, W. M. 1990. Some properties of two isolates of cucumber mosaic virus isolated from *Aster yomena* Makino and *Commelina communis* L. *Korean J. Plant Pathol.* 6 : 138-143.
10. Choi, J. K., Lee, J. H. and Hahm, Y. I. 1992. Hybridization detection of potato leafroll virus using enhanced chemiluminescence. *J. Agric. Sci. Kangwon Natl. Univ.* 4 : 1-5.
11. Choi, J. K. and Lee, Y. W. 1982. Tobacco mosaic virus isolated from Korean cigarettes. *Res. Bull. Kangwon Natl. Univ.* 16 : 85-88.
12. 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.
13. Czosnek, H., Ber, R., Navot, N., Zamir, D., Antignus, Y. and Cohen, S. 1988. Detection of tomato yellow leaf curl virus in lysates of plants and insects by hybridization with a viral DNA probe. *Plant Dis.* 72 : 949-951.
  14. Favaloro, J., Treisman, R. and Kamen, R. 1980. Transcription maps of polyoma virus-specific RNA: Analysis by two-dimensional nuclease S1 gel mapping. *Meth. Enzymol.* 65 : 718.
  15. Garger, S. J., Turpen, T., Carrington, J. C., Morris, T. J., Dodds, J. A., Jordan, R. L. and Grill, L. K. 1983. Rapid detection of plant RNA viruses by dot blot hybridization. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1 : 21-25.
  16. Hahm, Y. I., Park, C. S., Kim, J. G. and Choi, J. K. 1990. Inoculum source and reinfection of potato leafroll virus on potato seed stocks in Daekwallyeong area. *Korean J. Plant Pathol.* 6 : 497-503.
  17. Harper, K. and Creamer, R. 1995. Hybridization detection of insect-transmitted plant viruses with digoxigenin-labeled probes. *Plant Dis.* 79 : 563-567.
  18. Lee, J. Y., Jung, D. S., Chang, M. U. and Choi, J. K. 1993. Effective cloning of coat protein gene isolated from tobacco mosaic virus pepper (TMV-P) strain. *Korean J. Plant Pathol.* 9 : 136-138.
  19. Querci, M., Salazar, L. F. and Fernandez-Northcote, E. N. 1993. Detection of Andean potato virus X isolates by radioactive and nonradioactive nucleic acid spot hybridization tests. *Phytopathology* 83 : 171-176.
  20. Reisfeld, A., Rothenberg, J. M., Bayer, E. A. and Wilchek, M. 1987. Nonradioactive hybridization probes prepared by the reaction of biotin hybridize with DNA. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 142 : 519-526.
  21. Ryu, K. H. and Park, W. M. 1995. Construction of a plant expression vector for the coat protein gene of cucumber mosaic virus-As strain for plant transformation. *Korean J. Plant Pathol.* 11 : 66-72.
  22. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual* (2nd ed.). pp. 7.12-7.17. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
  23. Smith, O. P., Damsteegt, V. D., Keller, C. J. and Beck, R. J. 1993. Detection of potato leafroll virus in leaf and aphid extracts by dot-blot hybridization. *Plant Dis.* 77 : 1098-1102.
  24. Varveri, C., Candresse, T., Cugusi, M., Ravelonandro, M. and Dunez, J. 1988. Use of a <sup>32</sup>P-labeled transcribed RNA probe for dot blot hybridization detection of plum pox virus. *Phytopathology* 78 : 1280-1283.
  25. Varveri, C., Ravelonandro, M. and Dunez, J. 1987. Construction and use of a cloned cDNA probe for the detection of plum pox virus in plants. *Phytopathology* 77 : 1221-1224.