

## 고추에서 분리된 담배 모자이크 바이러스 외피단백질 유전자의 cDNA 클로닝 및 염기서열 분석

이영기 · 이철호 · 강신웅 · 박은경\*  
한국인삼연초연구원

### Complementary DNA Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of Coat Protein Gene from TMV Pepper Strain

Yung Gi Lee, Cheong Ho Lee, Shin Woong Kang and Eun Kyung Park\*  
Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

**ABSTRACT :** Tobacco mosaic virus (TMV) pepper strain was isolated from *Capsicum annuum* L. in Korea. The virion was purified by density gradient centrifugation, and viral total RNA was isolated from the purified particles. Coat protein (CP) cDNA of the virus was synthesized by RT-PCR and purified cDNA fragment was subcloned to pBluescript II SK-. We sequenced 691 nucleotides from the insert of clone p1561 and p1562 which contain complete codons of the viral coat protein gene (477 nucleotides) and 3' untranslated region. The nucleotides of coat protein-encoding cDNA of the strain were less by 3 nucleotides than that of TMV common strain isolated from tobacco in Korea. The CP gene showed 69% maximum homology with that of the common strain in the nucleotide level and 81% maximum homology in amino acid level.

**Key words :** TMV pepper strain, coat protein cDNA, tobacco.

기존의 바이러스 동정체계는 크기, 외피의 모양이나 구조 등을 중심으로 현미경으로 볼 수 있는 형태와 기주범위 및 병징에 따라 분류되었다. 그러나 최근에 급속도로 발전한 생화학, 면역학, 분자생물학적 실험 방법들에 의해 바이러스의 분리 동정은 분자적 수준에서 많이 이루어지고 있다. 유전정보를 함유하는 핵산(DNA와 RNA)의 서열에서 나타내는 차이와 이로부터 발현되는 단백질의 아미노산 서열 차이 등이 바이러스의 종류 및 계통 분류에 많이 이용되고 있다. 국내의 고추에서 일반적으로 분리되는 TMV pepper 계통의 경우도 이미 발표된 다른 계통의 TMV들과 물리화학적 차이를 보인다(2). 특히 연구자들이 담배와 고추에서 분리한 TMV는 여러 기주식물체에 대한 반응성 검토 실험에서 집중엽의 병징과 전신적인 병징에서의 차이를 발견하였고, 또한 각각의 계통으로부터 순화한 외피단백질에 대한 물리화학적 차이를 발견하였다(5).

따라서 이 연구는 고추에서 분리한 TMV pepper 계

통을 이용하여 외피단백질 유전자에 대한 염기서열을 잎담배 계통인 TMV common 계통과 비교 분석함으로써 분자적 접근에 의한 바이러스 분류체계를 확립하고, 이를 기반으로 식물체 내에서 감염성 바이러스를 보다 빠르게 동정 및 진단하고, 최근에 관심이 집중되고 있는 유전자 도입 기술에 의한(1, 6) 저항성 고추 품종 육성을 위한 기초자료를 얻고자 수행하였다.

### 재료 및 방법

바이러스의 증식 및 순화. TMV pepper 계통은 국내 고추에서 분리된 것을 공시 바이러스로 하였으며(5), 담배(*Nicotiana tabacum* cv. Samsun-nn) 또는 고추 California Wonder 품종에 접종하여 3주 후 이병엽을 채취하여 바이러스의 순화 재료로 사용하였다. TMV common 계통은 *Nicotiana tabacum* cv. NC82에서 분리한 것을 동일 품종의 담배에 접종하고 3주 후 이병엽을 채취하여 순화 재료로 사용하였다. 바이러스의 정제를 위한 완충용액으로는 0.5 M phosphate buffer (pH 7.2)를 사용하였으며 1% mercaptoethanol 용액이

\*Corresponding author.

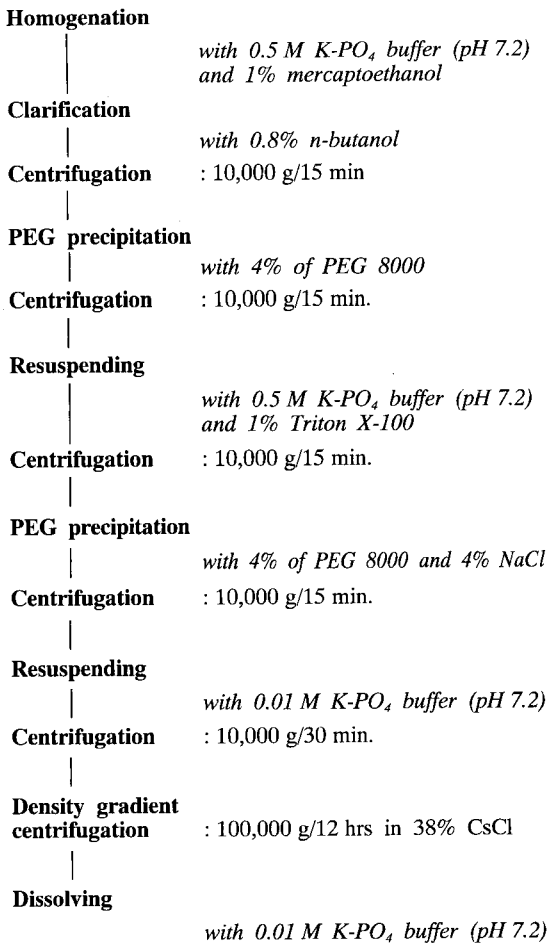


Fig. 1. Procedure for purification of TMV.

포함된 완충용액에서 조직을 마쇄하고 0.8% butanol로 정화하였다. 이를 4%의 PEG(polyethylene glycol) 8000 용액에서 2번 원심분리하여 바이러스 침전물을 획득하고 38%의 cesium chloride 용액에서 density gradient centrifugation을 실시하여 순수한 바이러스를 분리하였다(Fig. 1).

바이러스 total RNA 분리. 약 100 µg의 순화된 각각의 바이러스 100 µl에 동일 부피의 acid phenol을 첨가하고 잘 섞은 다음 다시 100 µl의 24 : 1 chloroform/isoamyl alcohol을 첨가한 후 흔들어 섞어주고 이를 얼음에서 15분 동안 방치하였다. 이 시료를 4°C, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취한 뒤 동일 부피의 isopropyl alcohol을 첨가한 다음 -20°C에서 2시간 동안 방치하였다. 이를 4°C, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 침전물을 취한 다음 80% ethyl alcohol로 다시 부유시킨 후 이를 원심분리하여 상층

액을 제거하고 speed vacuum에서 말린 다음 약 5 µg의 viral RNA를 50 µl의 RNase inhibitor(0.1% diethyl pyrocarbonate)가 처리된 증류수에 녹여서 다음 실험에 사용하였다.

RT-PCR에 의한 외피단백질 cDNA 합성. 바이러스 total RNA에 대한 상보적인 가닥의 합성은 cDNA synthesis kit(Boehringer Mannheim)를 이용하여 수행하였다(8). 각 바이러스 total RNA 1 µg에 4 µl의 buffer를 첨가하고 25 unit의 RNase inhibitor, 각각 10 nM인 dNTP mixture, 5 pM의 cp2 primer(5'-GGATCCTGCAGCCTGGGCCCTA-3') 그리고 20 unit의 AMV reverse transcriptase를 첨가하여 전체 부피가 20 µl가 되게 한 후 42°C에서 1시간 동안 반응하였다. 반응이 끝난 후 이 반응액에 10X Taq. buffer 10 µl, 100 µM의 dNTP, 2 unit의 Taq. polymerase, cp1 primer(5'-CAGCTGCAGTTTTAAATATGTCTTA-3') 그리고 cp2 primer 10 pM씩을 첨가한 다음 polymerase chain 증폭반응을 수행하였다. 이때 preheating은 95°C에서 15분간 행하고 95°C denaturation 반응 1분, 40°C annealing 반응 2분, 67°C extension 반응 3분의 반복된 과정을 35회 반복하여 수행하였다.

외피단백질 cDNA의 클로닝 및 염기서열 분석. 증폭된 외피단백질 cDNA를 glass powder를 이용하여 순화한 다음, 제한효소 *Pst*I로 처리하여 이를 다시 순화하였다. 순화된 외피단백질의 cDNA는 재조합 벡터 pBluescript II SK-의 *Pst*I 위치에 T4 DNA ligase를 이용하여 재조합하였고(7), T7 sequencing kit(Parmacia)를 이용한 dideoxy chain termination법에 의해 (4, 9) 염기서열을 분석하였다. 염기서열이 결정된 TMV pepper 계통의 외피단백질 cDNA는 대조구인 TMV common 계통의 외피단백질 cDNA 염기서열과 비교하였으며 유추된 아미노산 서열도 비교하였다.

## 결과 및 고찰

바이러스의 증식 및 순화. TMV pepper 계통과 common 계통에 대해 병징이 나타난 기주 식물체의 잎으로부터 순화를 실행하였다. 각 계통의 정제를 위한 완충액은 0.5 M phosphate buffer(pH 7.2)를 사용하였으며 이 중 TMV pepper 계통의 38% CsCl density gradient centrifugation pattern과 순수 분리된 바이러스의 순화도 및 단위부피당 농도를 알아보기 위한 UV spectrophotometry 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 각각의 순화된 바이러스량은 이병엽 100 g 당 TMV common 계통은 172 mg이었으며 pepper 계통의 경우 고추에서

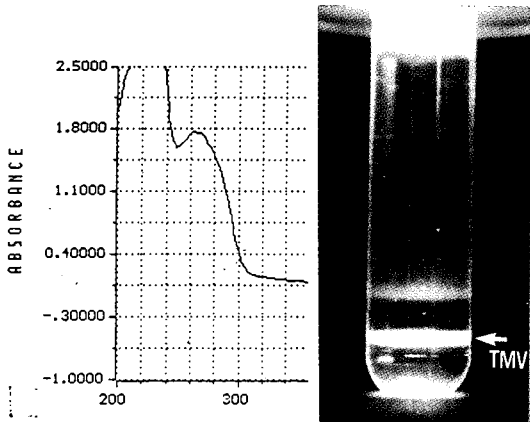


Fig. 2. Density gradient pattern and spectrophotogram of purified TMV. Arrow indicates the viral band.

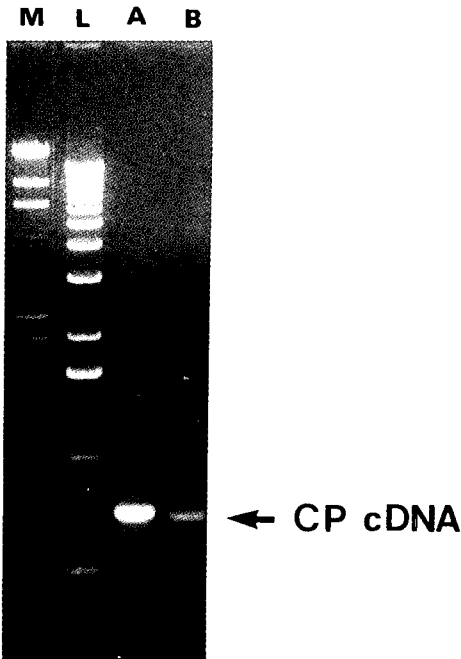


Fig. 3. Electrophoregram of the TMV CP cDNA fragments synthesized by RT-PCR. Lane M :  $\lambda$ HindIII marker; Lane L : 1 kbp ladder; Lane A : PCR product of TMV-common CP cDNA; Lane B : PCR product of TMV-pepper CP cDNA.

증식했을 때 32 mg을 얻었다.

RT-PCR에 의한 외피단백질 cDNA 합성 및 클로닝. 순화된 TMV common 계통과 TMV pepper 계통으로부터 각각 total RNA를 순수분리하고 cDNA를 합성한 후 이를 target DNA로 하여 TMV 외피단백질 유

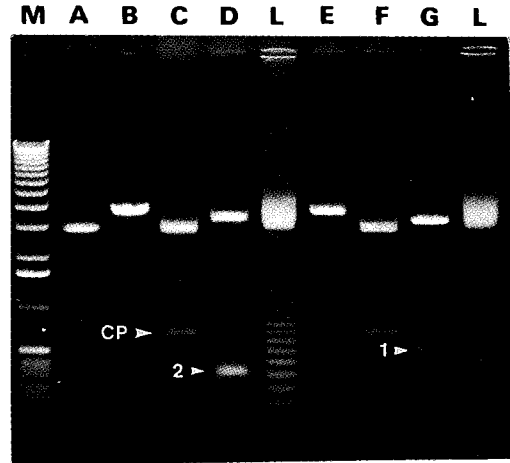
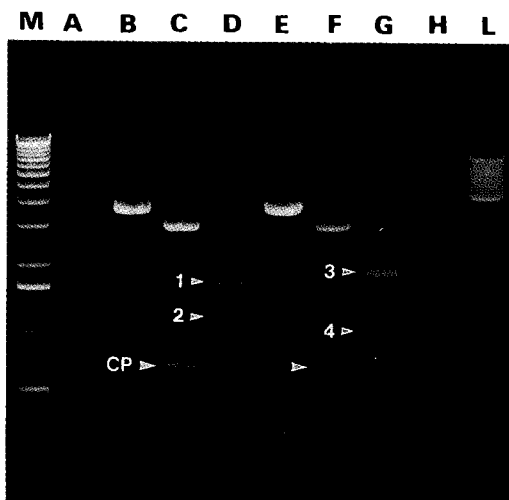


Fig. 4. Restriction enzyme band patterns of CP cDNA of TMV common strain. M : 1 kbp ladder; L : 100 bp ladder; A : pBSII SK-HindIII cut; B : p1521 HindIII cut; C : p1521 PstI cut; F : p1522 PstI cut; G : p1522 SacI cut; CP indicates the coat protein gene fragment of TMV common strain; Fragment 1 indicates SacI fragment of p1522 plasmid; forward insertion of CP cDNA fragment against the lacZ promoter; Fragment 2 indicates SacI fragment of p1521 plasmid; reverse insertion of CP cDNA fragment against the lacZ promoter.

전자를 합성하기 위하여 구상된 2개의 primer(TMV cp1 : 5' -CAGCTGCAGTTTTAAATATGTCTTA-3', TMV cp2 : 5' -GGATCCTGCAGCCTGGGCCCTA-3')를 사용하여 PCR을 실시한 후 0.8% agarose gel에서 전기영동을 한 결과 TMV 외피단백질 관련 유전자를 포함하는 약 700 bp 정도의 DNA 가닥이 합성되었음을 확인하였다(Fig. 3). TMV pepper 계통의 경우 common 계통에 비해 증폭이 덜된 것은 이후에 실시한 염기서열 분석을 토대로 볼 때(Fig. 6), 각 바이러스 계통의 주형 cDNA에 대한 primer의 상보성이 동일한 것으로 보아 RT-PCR 과정에서 pepper 계통의 주형 cDNA 농도가 common 계통에 비해 상대적으로 낮았기 때문으로 사료된다. Agarose gel로부터 순수분리한 각 계통별 외피단백질 cDNA를 포함하고 있는 DNA 가닥을 pBluescript II SK-의 PstI 위치에 삽입시켰으며, 외피단백질 cDNA 가닥이 삽입된 클론 중, E. coli의 lacZ promoter의 방향에 대하여 정방향 또는 역방향으로 삽입된 클론들을 선발하였다. TMV common 계통의 경우 정방향으로 삽입된 클론을 p1522로 명명하였고 역방향으로 삽입된 클론은 p1521로 명명하였으며 TMV pepper 계통의 경우에도 p1561, p1562를 각각 정, 역방향으로 삽입된 클론으로 명명하였다. 이



**Fig. 5.** Restriction enzyme band pattern of CP cDNA p 1561 and p1562 TMV peppepr strain. M : 1 kbp ladder; L : 100 bp ladder; A : pBSII SK-*Hind*III cut, B : p1561 *Xho*I cut; C : p1561 *Pst*I cut; D : p1561 *Dra*I cut; E : p 1562 *Xho*I cut; F : p1562 *Pst*I cut; G : p1562 *Dra*I cut; White arrow and CP (lane C & F) indicate the coat protein gene fragments of TMV-pepper strain; Fragments 1 & 2 (lane D) indicate *Dra*I fragments of p1561 plasmid, forward insertion of CP cDNA fragment against the *lacZ* promoter; Fragments 3 & 4 (lane G) indicate *Dra*I fragments of p1562 plasmid, reverse insertion of CP cCND fragment against the *lacZ* promoter.

때 삽입된 각 계통에 해당하는 외피단백질 cDNA의 존재여부 및 방향성을 제한효소 반응에 의하여 확인하였다(Fig. 4, 5).

외피단백질 cDNA의 염기서열 분석. 기존의 TMV *vulgare* 계통과 거의 동일한 염기서열을 지니고 있으며, 외피단백질을 구성하고 있는 유전자의 염기서열에서는 동일한 염기서열을 지니고 있는 것으로 알려진 바 있는(3) TMV common 계통(p1521, p1522)과 비교하여 TMV pepper 계통(p1561, p1562)에 대한 외피단백질 cDNA의 유전자의 구성상의 동질성 여부를 알아보고자 염기서열을 분석하였다. 그 결과 분석된 TMV 외피단백질 유전자(cDNA) 부위는 TMV common 계통의 경우 3' non-coding region을 포함하여 706 bp였으며 외피단백질 부위에 해당하는 유전자의 길이는 480 bp였다. 반면에 TMV pepper 계통의 경우는 3' non-coding region을 포함하여 691 bp였고 외피단백질 부위에 해당하는 유전자의 길이는 477 bp로 3개의 염기가 적은 것으로 판명되었다. 이 두 계통간의 DNA 염기서열 최대 유사도를 조사한 결과 69%를

CAGTCGAGGTTTAAATA TGTCCTA (CP1 primer)	
CM 1 GTTTTAAATA TGTCCTACAG TATCACTACT	50
PP 1 GTTTTAAATA TGTCCTACAG AGTTTCCAGT	50
51 GTCATCAGCG TGGGCCGACC CAATAGAGTT	100
51 AGGTTCCTGA TGGGCCGATC CATTAGAGTT	100
101 CCTTAGGAAA TCAGTTTCAA ACACAACAAG	150
101 CGTTAGGTAA TCAGTTTCAA ACACAGCAGG	150
151 CAATTCAGTG AGGTGTGGAA ACCTTCACCA	200
151 CAGTTCCTG ATGTGTGGAA GACCATACCG	200
201 TGACAGTGAC TTTAAGTGT ACAGGTAGAA	250
201 TGCTACTGTT TTCAAAGTTT TTGCATATA	250
251 TCACAGCAGT GTTAGGTGCA TTCCGACTA	300
251 TGTCGGGACT TCTCGGAGCC TTTGACTA	300
301 GAAAATCAGG CGAACCCAC GACTGCCGAA	350
301 GAAAATCCG AATCCTAC AACTGCCGAG	350
351 AGTAGACGAC GCAACGCTGG CCATAAGGAG	400
351 GGTAGATGAT GCGACGCTGG CCATTAGGGC	400
401 TAGAATTGAT CAGAGGAACC GCATCTTATA	450
401 ATGAGTTAGT TCGTGGCAGG GAAATGTACA	450
451 TCCTTCGGIT TGGTTTGGAC CTCTGGTCTC	500
451 GCAGTGACTC ACCTGGGCTA CAACTCCTTA	500
501 TGCATATAA ATAACGGATT TGTCCTGATA	550
501 TGGACGAAAG TTAACGCTCC GTGGCGAGTA	550
551 AACCGATAGT GTTTTCCTT CCACTTAAAT	600
551 CCGTCCACTT AAATCGAAGG GTGTGCTGTA	600
601 CCGCGGGGTC AAATGTATAT GCTTCATATA	650
601 CATGTGTGAC GTGTATTGTC GAACGACGTA	650
651 AGCGAGGGGT TCGAATCCCC CCGTTACCCC	693 (100%)
651 TCCGCCCCGA ACCGGCGGTA GGGGCCCA	678 (99%)
AT CCGCGGTTCCGACCTCTAGG (CP2 primer)	

**Fig. 6.** DNA sequences of coat protein genes of TMV common and TMV pepper strains and 3' untranslated regions. CM : TMV common strain; PP : TMV pepper strain. Shadowed ATG codons are starting codons and underlined TGA codons are termination codons.

CM	I M S Y S I T T P S Q F V F L S S A W A D P I E L I N L C T N
PP	I M S Y T V S S A N Q L V Y L G S V W A D P L E L Q N L C T S
31	A N G N Q F Q T Q Q A R T T V Q R Q F S E V W K P S P Q V T
31	A L G N Q F Q T Q Q A R T T V Q Q Q F S D V W K T I P T A T
61	V R F P D S D F K V Y R Y N A V L D P L V T A L L G A F D T
61	V R F P A T G F K V F R Y N A V L D S L V S A L L G A F D T
91	R N R I E V E N Q A N P T T A E T L D A T R R V D D A T V
91	R N R I E V E N P Q N P T T A E T L D A T R R V D D A T V
121	A I R S A I N N L I V E L I R G T G S Y N R S S F E S S G
121	A I R A S I S N L M N E L V R G T G M Y N Q A L F R S A V T
151	L V W T S G P A T * (100%) MW 17,623
151	H L G Y N S L T * (81%) MW 17,455

**Fig. 7.** Expected amino acid sequence analysis of the TMV coat proteins derived from cDNA sequencing data. CM : TMV common strain; PP : TMV pepper strain. The underlined M is the methionine, a starting amino acid.

나타났으며(Fig. 6), PROSIS를 통한 외피단백질의 크기를 비교분석한 결과, TMV common 계통의 경우는

160개의 아미노산으로 구성되어 있으며 그 분자량은 약 17.62 kDa, TMV pepper 계통은 159개의 아미노산으로 구성되어 있고 약 17.45 kDa의 분자량을 나타내는 것으로 추정되었다. 이들에 대한 아미노산 구성의 최대 유사도는 81%로 나타났다(Fig. 7). 현재 TMV pepper 계통의 경우 염기서열의 분석 결과는 Gen-Bank에 L35073으로 등록하였다.

## 요 약

국내에서 재배되고 있는 고추(*Capsicum annum* L.)로부터 분리된 TMV pepper 계통을 density gradient centrifugation을 이용하여 순화하였다. 이로부터 바이러스의 total RNA를 분리하였고 RT-PCR에 의하여 TMV pepper 계통의 외피단백질 cDNA를 합성, 증폭하였으며 이를 pBluescript II SK- 벡터에 재조합하였다. 본 실험에서 바이러스 외피단백질과 3' non-coding region을 포함하는 재조합 클론 p1561과 p1562로부터 염기서열을 분석하였고 그 결과로 477 염기의 외피단백질 유전자를 포함하는 691 염기가 합성되었음을 확인하였으며 이것과 TMV common 계통으로부터 합성된 외피단백질 cDNA와의 최대 유사도는 69%였다. 또한 유추된 아미노산 서열에서 이들 두 계통간의 최대 유사도는 81%였다.

## 참고문헌

1. Beachy, R. N., Loesch-Fries, S. and Turner, N. E. 1990. Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28 : 451-474.
2. Choi, J. K., Park, Y. S., Kim, J. O. and Park, E. K. 1989. Biological characterization of a strain of tobacco mosaic virus isolated from hot pepper. *Korean J. Plant Pathol.* 5 : 331-336.
3. Koh, H. G., Song, E. K., Lee, S. Y., Park, Y. I. and Park, W. M. 1992. Nucleotide sequence of cDNA of the tobacco mosaic virus RNA isolated in Korea. *Nucleic Acids Research* 20 : 5474.
4. Hattori, M. and Sakaki, Y. 1986. Dideoxy DNA sequencing method using denatured plasmid templates. *Anal. Biochem.* 152 : 232-238
5. 박은경, 김남원, 박성원, 이철호, 이영기, 이기원. 1993. 바이러스 방제 및 항균 살충 생물제어기술 개발. 담배연구보고서(연초경작 육종 및 환경편), pp. 59-144. 한국인삼연초연구원.
6. Powell Abel, P. A., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley R. T. and Beachy, R. N. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232 : 728-743.
7. Sambrook, J., Fritsh E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., pp. 1.63-1.73. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
8. Sambrook, J., Fritsh E. F. and Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., pp. 8.11-8.13, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
9. Sanger, F., Nicker, S. and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 : 5463-5467.

1. Beachy, R. N., Loesch-Fries, S. and Turner, N. E.