

생명공학을 이용한 식물병진단법의 현황

권오유, 권태영¹, 이준탁²

충남대학교 의과대학 해부학교실, ¹경상북도 농촌진흥원, ²경북대학교 농생물학과

서 언

식물병의 진단은 식물에 병을 일으키는 병원체(Fungi, Bacteria, Virus, Viroid, Phytoplasma)를 확인하기 위하여 예전부터 식물병리학분야에서 중요한 부분으로 발전되어 왔다. 넓은 의미에서 식물병의 진단은 식물체에 병징이 나타난 뒤에 진단하는 field diagnosis와 plant diagnosis을 말하고 있지만, 진정한 진단이라고 보기는 어렵다. 이것은 병원체의 존재유무를 확인하였다고 하는것이 타당하다. 어디까지나 진단이라는 것은 현저한 병징이 육안으로 식별되기 전에 대상식물로부터 병원체를 확인할 수 있어서 방제대책을 세울 수가 있어야 한다. 이같은 진단은 식물검역소에서 잠재적으로 위험한 병원체가 국내로 유입되는 것을 방지하기 위해서 각국에서 실시되고 있다. 식물병원체는 직접적으로 수확량의 현저한 감소 뿐만 아니라 간접적으로는 농산물의 수출을 불가능하게 하는 경우도 있다. 농업생산국으로 유명한 네덜란드의 경우는 Geneal Inspection Services라는 기관에서 총괄하고 있는데, 수입 농산물은 이곳의 엄격한 검사결과, 그 확인서가 있어야만 국내에 유입이 가능하다. 최근에는 공인된 기관에 의뢰하여 생명공학적인 방법으로 많은 식물의 진단이 이루어지고 있으며, 많은 나라에서도 이와 같은 형식을 취하고 있는 나라가 늘고 있다. 육종분야의 경우도 병원체의 진단은 중요하다. 종자전염, 꽃가루전염이 이루어지는 병원체, 특히 바이러스와 바이로이드를 완전히 제거하는 것이 무엇보다도 중요하다.

고전적인 진단법은, Koch의 원칙을 성립시키기 위하여서는, 대상식물로부터 병원체를 분리, 정제하여야 하고 지표식물을 비싼 비용과 오랜시간 동안 온실에서 항상 키워야만 접종실험을 할수 있다. 이 경우에도 식물과 병원체의 상호관계와 병원체 자체만을 고려 하지 않으면 않되는 불편함과 전문적인 기술이 요구된다. 이런 모든것이 충족된다 하여도 지표식물의 생리에 따라서 결과가 조금씩 차이를 보일 수 있고, 많은 시간을 소비한 뒤 진단이 끝났을 때에는 병이 전파되어 수확량이 현저히 줄거나 대상식물의 신선도가 떨어지거나 부패하여 상품가치가 떨어지는 경우도 있다.

따라서, 병원체의 빠른 확산을 저지하기 위한 초기진단과 이병식물을 영양번식의 재료로 이용하는 것을 막아 피해를 줄이고 대량의 대상식물을 신속하게 신뢰할 수 있는 진단법이 요구되고 있다. 이런 진단법을 행함에 있어서 비용이 싸게 드는것이 반드시 전제조건일 수는 없지만 대상 농산물의 비용을 비싸게하는 것은 곤란하다. 즉, 적은 비용으로 대량으로 신속, 정확하게 진단할 수 있는 방법이 최상이다. 그래서 세계각국에서는 최근에 급속하게 발달되고 있는 생명공학기법을 이용하여 새로운 진

단법을 개발하고 있다. 본 총설에서는 병원체별로 생명공학기법을 이용한 진단법을 소개한다.

본 론

1. 바이로이드(Viroid)

식물병의 진단에는 polyclonal과 monoclonal 항체가 *in vitro*에서 병원체를 잘 검출하기 때문에 오래전부터 가장 보편적으로 사용되고 있다. 바이로이드의 genome은 원형으로 된 나출 ssRNA이며 RNA 자체의 염기 결합에 의하여 tRNA와 비슷한 2차구조를 가진다. 그래서 항체생산이 어려워서 혈청학적인 방법을 쓰는 것은 곤란하다. 세계적으로 식물검역에서 가장 중요한 바이로이드는 potato spindle tuber viroid(PSTV)이다. 많은 종류의 PSTV strain은 감자와 다른식물에 아주 약한 병징을 나타내기 때문에 바이로이드의 존재를 확인하기 위하여 효율이 좋은 생화학적, 생리적인 검색방법이 필요하다. 대상식물로 부터 total DNA을 분리하여 ssRNA를 polyacrylamide gel영동 후 toluidine blue로 염색하는 방법이 가장 먼저 사용되었다. 그러나, 이 방법은 염색반응이 약하고 바이로이드 genome이 많이 필요하므로 이용에 어려움이 많았다. 그래서 고안된 하나의 방법으로 total DNA extract을 조직배양 중인 토마토에 접종하여 수주일동안 계속 빛을 비추어주면서 28°C로 처리하여 두면 바이로이드가 증식된다. 이 토마토를 분석함으로써 바이로이드의 유무를 확인할 수 있다. 그러나 toluidine blue의 약한 염색능력은 여전히 문제점으로 남아있다.

1980년에 접어들면서 molecular hybridization에 의한 방법이 개발되었다. PSTV genome에 대응하는 full length cDNA를 reverse transcriptase를 사용하여 만든 다음에 ampicillin 저항성 유전자를 가지고 있는 plasmid에 clone화하여 정상 세균에 도입하여 정상배지에서 배양시킨 다음에 ampicillin과 X-gal이 함유된 배지에서 색으로 선별한다. 외래 DNA(PSTV genome의 단편)가 insert된 plasmid와 그렇지 못한 plasmid를 가진 세균은 배지상에서 서로 다른색을 나타냄으로 쉽게 구별할 수 있다. 이렇게 분리된 cDNA는 molecular probe로 사용할 수 있다. 즉, 식물체로 부터 얻어진 total DNA을 nitrocellulose에 spot한 뒤에 cDNA를 방사성동위원소로 labeling하여 hybridization결과 얻어지는 signal은 autoradiogram에 의해서 확인할 수 있다. 이 방법은 종전의 방법에 비하여 훨씬 높은 감도를 가지고 시료의 준비 시간을 단축 할 수 있다. 단점으로는 방사성동위원소를 사용하는 것과 대량의 시료 검색이 어려운점 이었으나, 최근에는 방사성동위원소 대신으로 개발된 고감도의 비방사성화학물질이 사용되고 있고 dot-hybridization 등의 방법이 개발되어 대량의 시료를 동시에 검색할 수 있다.

Toluidine blue를 사용한 염색법 보다 감도가 더욱 좋은 방법(bi-directional electrophoresis)이 최근에 개발되었다. AgNO₃를 사용하여 염색하는 방법으로, 먼저 native gel에 식물체로부터 추출한 total DNA(바이로이드 genome이 포함 되어있음)을 native gel에 전기영동한 후에 바이로이드 genome을 포함하고있는 band를 잘라내어 새로운 denature gel(high temperature 혹은 low salt concentration)에 전기영동한 뒤에 AgNO₃로 염색하면 바이로이드 genome이 background가 많이 없어진 상태로 관찰된다. 그 이유로서 denature gel에 바이로이드 genome이 전기영동될 때에 염기

결합되어 있던 바이로이드 분자의 2차구조가 풀리면서 cotaminating 핵산(denature gel의 영향을 받지않음)들 보다 천천히 이동하기 때문이다. 이 방법으로는 5 ng의 바이로이드를 검출할 수 있고 molecular hybridization만큼 정확하게 바이로이드 genome을 확인할 수 있어서 지금까지의 방법 중에서 가장 빠르고 정확한 방법으로 생각된다.

2. 바이러스(Virus)

식물 바이러스의 90%가 ssRNA를 genome으로 하고, 나머지 4%가 dsRNA를, 6%가 DNA를 genome으로 하여 1-2종류의 피막단백질로 싸여있다. 피막단백질에 대한 항체는 혈청학적인 방법으로 바이러스를 탐색할 때에 아주 효과적으로 사용되며, 핵산들은 비특이적인 항체를 만들어서 혈청학적인 방법에는 부적합하지만 molecular hybridization방법에는 효과적인 molecular probe로서 사용된다. 1938년에 꽃봉오리에 감염된 바이러스를 찾기 위하여 혈청학적인 방법이 처음으로 사용되기 시작하였고, 그 이후로 지금까지 바이러스의 탐색을 위해서는 혈청학적인 방법이 가장 많이 보편적으로 사용되고 있는데 그 이유로서는 순도 높은 항원(바이러스)을 분리하는 기술과 함께 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)와 같이 항체를 사용하여 검출하는 방법이 크게 발달하였기 때문이다. 혈청학적인 방법에는 polyclonal 항체와 monoclonal 항체가 모두 사용되고 있다. Polyclonal 항체는 항원(바이러스)를 순화하여 척추동물(주로 토끼, 쥐, 닭)에 주사하고 일정시간이 지난 다음 혈청(antiserum)을 모으면 그 속에 바이러스를 인식하는 항체가 형성되어 있다. 이것은 뒤에 설명하는 monoclonal 항체에 비해서 효능이 떨어질수도 있지만 식물바이러스인 경우는 여러실험에 사용할 수 있는 것이 만들어지는 경우가 많다. Monoclonal 항체는 면역기능을 가진 spleen의 B형 세포와 암세포와의 융합으로 얻어진 hybridoma를 배양함으로써 얻을 수 있다. 이 방법은 hybridoma가 배양되는 한 양질의 항체를 대량으로 얻을 수 있는 장점이 있다.

전통적인 침전법은 항원과 항체를 순차적으로 희석하여 특이적인 반응에 의해서 생기는 침전물로 판단하는 방법이다. 이 방법으로는 항원과 항체의 반응이 가장 빠르게 일어나는 최적조건에서 항원의 end-point를 구함으로써 항원의 농도를 계산할 수 있다. 침전법의 원리에 기초를 둔 방법으로는 시험관에 항체를 미리 넣어 놓고 거기에 항원을 섞어서 생기는 침전물을 관찰하는 시험관침전법, 시험관 대신에 모세관을 이용 하여 침전물을 확인하는 ring interface precipitation, agar gel에 항원과 항체를 확산시켜서 형성되는 band를 관찰하는 agar gel diffusion test 등이 있다. Gel diffusion test가 일반적으로 가장 많이 사용되고 있는데, 항원과 항체의 확산방향에 따라 single diffusion test와 double diffusion test가 있고, single diffusion test는 시험관내에 항체를 포함하고 있는 agar를 먼저 넣은 다음에 항원 현탁액을 확산시켜서 spur band를 관찰하여 진단하는데 이 방법을 조금 변형한 radical diffusion test, 즉, 항체를 포함하고 있는 한천으로 평판을 만든 다음에 평판에 구멍을 만들고 그속에 항원현탁액을 주입하여 형성되는 band를 관찰하는 방법도 사용되고 있다. Double diffusion test에는 일반적으로 Ouchterlony가 개발한 방법을 가장 많이 사용하는데, 한천 배지의 중앙에 구멍을 만들어 항체를 넣고 주위에 구멍을 만들어 항원을 넣어서 항체와 항원의 확산에 의해서 형성된 spur band를 관찰하여 바이러스를 동정하는 방법이다. 위에서 설명한 방법으로

바이러스를 확인할 때에 주의 해야 할 점으로는 300 nm보다 큰 바이러스입자는 gel을 통과할 수 없기 때문에 물리적(초음파, 마쇄)으로 작게 만들거나, 화학적(SDS, pyrrolidine, acetic acid, ethanolamine 등)으로 soluble protein을 만들 필요가 있다.

Agglutination test는 latex, bentonite, hemoglobin 등에 항원을 결합시킨 다음에 항체를 넣어서 항체가 항원에 교차 결합된 침전물을 관찰하는 방법으로 정확도가 뒤에서 설명하는 ELISA와 동일할 만큼 효율적이다. 물론, 항원이 없으면 agglutination이 일어날 수가 없다. 이 방법은 잎 뿐만 아니라 종자, 구근, 괴경 그리고 나무껍질에도 적용이 가능하며, 일부 국가에서는 자동화하여 대량 검정도 하고 있다. 최근에는 bio-products를 생산하는 많은 회사에서 새로운 latex(protein A, C 등)를 개발하여 보다 효율적인 agglutination이 가능하게 하여 바이러스의 검색뿐만 아니라 capsid의 folding과 assemble와 같은 생화학실험도 가능해졌다.

항체에 직접 형광색소를 붙여서 항원과 반응시켜 형광현미경으로 직접 대상식물에 존재하는 바이러스를 관찰할 수 있는 형광 항체방법이 있다. 이 방법은 바이러스의 검색과 함께 대상식물체내의 바이러스 존재부위를 알 수 있다는 장점을 가지고 있다. 바이러스를 직접 관찰하는 방법으로는 전자현미경을 사용하는 immunoelectron microscopy(IEM)법도 이용되고 있다.

바이러스 검색에 있어서 가장 효율적이고, 일반적으로 많이 사용되는 방법으로는 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)가 있다. 항체를 ELISA용 microplate well에 코팅시킨 다음, 항원현탁액을 첨가하여 항원-항체반응을 시킨뒤, 다시 alkaline phosphatase로 표지시킨 항체를 넣어 이중 항체 sandwich를 만든다. 여기에 paranitrophenyl phosphoric acid를 넣음으로써 paranitrophenyl이 유리되면서 만드는 색을 관찰할 수 있다. 이 방법의 대부분은 자동화되어 있어서 간편하게 대량의 대상식물체로부터 바이러스의 검색이 가능하다. ELISA의 약식으로 nitrocellulose membrane을 이용하여 발색반응을 관찰하는 dot immunobinding assay도 행해지고 있다. 네델란드에서는 1년 동안에 무려 100만회 이상으로 ELISA를 이용하여 농업현장과 검역소에서 바이러스를 검색하고 있다. 일본과 이스라엘의 경우는 준정부연구소에서, 미리 여러종류의 항체를 만들어 놓고 농민이 의뢰한 대상식물로부터 바이러스검색을 ELISA로 대행 하고 있다.

Molecular hybridization에 의한 바이러스검출은 기본적으로 앞의 바이로이드 검출법에서 서술한 것과 동일하다. 그러나, 바이러스에 관한 기초적인 분자 생물학이 급속하게 발전되어 바이러스 genome(ssRNA, dsRNA)을 template로 하는 cDNA작성(RT-PCR)의 간편화와 많은 capsid와 그것들의 sequence가 밝혀져서 쉽게 molecular probe를 인위적으로 실험관내에서 만들 수 있다. 최근에는 바이러스 RNA를 직접 항원으로 하여 항체를 만들려는 시도가 행해지고 있다.

3. 세균(Bacteria)

세균의 검색에서는 병원성인 세균의 수에 비하여, 부생 세균(대상 세균의 성장을 방해한다든지, 혹은 성장 촉진시킴)이 월등하게 많이 존재하여 분리도 어렵고 혈청학적인 방법을 사용할 때에 low, slow cross reactivity의 원인이 되기 때문에 큰 장애요인이다. 그래서, 혈청학적인 방법의 사용에 있어서는 saprophytes/target 세균(S/T)의 비율이 아주 중요하다. 세균의 분리, 동정은 각각의

target 세균에 적합한 배지가 사용될 경우 균총의 형태적, 생화학적 특성으로 거의 100% 가까이 가능하다. 그러나, 각종의 target 세균에 특이한 배지가 아직은 충분하게 개발되지 않아서 분리, 동정이 그리 쉬운 편이 아니다. 최근에 세균의 동정에는 세포벽의 elution pattern을 high-performance liquid chromatography(HPLC)를 이용한 화학적 분류법이 이용되고 있으나 값 비싼 기기의 사용과 함께 축적된 경험과 기술을 필요로 한다. 이런 이유와 함께 식물병원균 중 세균이 차지하는 비율이 다른것에 비하여 상대적으로 낮아서 충분한 연구가 이루어지지 않아 아직 자동화와 large-scale test는 어려운 현실이다.

세균에 대한 항체의 생산은 세균의 세포, 막단백질과 lipopolysaccharides와 같은 세포벽 구성 성분, pectatelyase 등의 효소류를 척추동물에 주사함으로써 얻을 수 있다. 세포벽 구성 성분을 사용하였을 경우는 다른것을 항원으로 사용하였을 때 보다 특이성이 떨어지는 경향을 보인다. ELISA법을 사용하여 세균을 검색하기 위하여서는 반드시 가용성 항원을 사용하기 때문에, ELISA의 세척 과정에서 세균을 잘 세척하여야 한다. 그러나, 바이러스를 사용하였을 때 보다는 만족한 결과를 얻을 수 없다. 한편, 전체 세포를 항원으로서 사용하여 얻은 항체는 ELISA로 세균을 검색하는데는 아직 정확도가 떨어져 실용화를 위해서는 많은 문제가 선결 되어야 한다. 항체를 고체물질에 먼저 붙여 놓은 다음에 혼합물로부터 세균을 침진시키고 나머지 contaminating 세균을 제거시키는 방법으로도 세균의 분리가 가능하다. 최근에는 이 방법의 발달된 형태로 고체물질로서 magnet bead를 사용하여 항원-magnet complex를 항체가 인식하여 결합한 것을 강력한 magnet를 사용하여 분리할 수 있는 방법이 사용되고 있다.

또한, 세균 분리기술의 장점과 혈청학적인 방법의 장점을 합친 혈청학적 균총염색법이 사용되고 있다. 먼저, 항체를 사용하여 분리한 세균의 현탁액을 선택 배지상에 배양시킨 뒤에, 그 배지를 건조시켜 형광색소가 결합된 항체와 배양시켜 현광현미경으로 관찰하는 것이다. 물론, 배지의 건조단계 전에 세균의 replicate를 만들어 다른 배지에 계속 배양하여 두면 UV관찰 후에도 필요로 하는 세균을 이용할 수 있다. 이 방법의 장점으로는 부생 세균의 숫자를 크게 줄여서 모든 반응후에 육안 검색이 용이한 점과 더불어, target-세균의 생육에 크게 지장이 없다는 것이다. 그러나, 이 방법의 신뢰도는 선택배지와 사용된 항체의 특이성에 크게 좌우된다.

식물병원성 세균으로부터의 molecular probe로 사용할 수 있는 DNA단편의 clone화는 일단, 단일 균총이 얻어진 뒤에는 바이로이드와 바이러스로부터 준비하기 보다는 용이하다. 얻어진 molecular probe을 사용하여 molecular hybridization법으로 세균을 검색하는 것은 위에서 설명한 것과 동일하며, 동일한 장단점을 가지고 있다. 세균의 검색을 위해서는 혈청학적 균총염색법이 가장 효율적이므로 이 방법과 다른 방법을 조합시키는 것과 함께 선택배지의 지속적인 개발과 컴퓨터와 연결된 image analyzer의 개발로 자동화시키는 것이 요구되고 있다.

4. 진균(Fungi)

가장 일반적인 진균류의 분리, 동정은 배지상에서 배양한 후 각종 생화학적 기법과 형태학적인 분류로서 행해지고 있다. 그러나, 식물병원성 진균의 진단시 신속하고 신뢰할 수 있는 방법이 요구되

고 있다. 최근에는, 곰팡이의 균사 혹은 포자로부터 세포벽 구성 성분, 막 단백질, 세포내 물질을 항원으로 사용하여서 효율이 좋은, 많은 종류의 monoclonal 항체(*Fusarium*, *Armillaria*, *Tilletia* 등 수십종)가 생산되어 주목을 받고 있다. 그러나, 이렇게 만들어지는 항체도 genus-specific, isolate-specific한 것이 일반적이다. 곰팡이의 성분을 전기영동법으로 분리하는 방법이 발전되고 있다. 앞으로, 위의 두 방법은 앞으로 더욱 발전 될 것이다.

곰팡이의 immunoassay에는 monoclonal 항체를 ELISA에 사용하는 방법이 알려지고 있다. 항원 현탁액을 polystyrene well에 coating시킨 후, 실온에서 건조시킨다. 여기에 1차 항체(대상 곰팡이를 항원으로 사용하여 만든 것) 반응시킨 다음에, horse radish peroxidase가 붙어있는 2차 항체(1차 항체와 다른 동물에서 만들어진 것)를 결합시킨 것에 peroxidase의 기질을 넣어 반응시킨 것을 450nm에서 ELISA plate의 흡광도를 읽는다. 이 방법의 변형으로 dot-blot assay와 dip-stick immunodiagnostic assay가 있는데 이는 육안으로 결과를 직접 볼 수 있다는 장점이 있다. 먼저, nitrocellulose membrane을 100% 메탄올로 처리하여 증류수로 잘 세척한 다음, 그 위에 항원현탁액을 spot한다. Eppendorf tube을 사용할 경우에는 위와 같이 처리한 membrane을 넣고 항원을 결합시킨다. 여기에 1차 항체를 반응 시킨 후, gold particles과 결합된 2차 항체로 1차 항체를 인식시킨 것에 silver enhancer와 initiator용액을 넣어서 나타나는 색깔의 정도를 관찰한다. Immunofluorescence assay는 먼저, 페트리 접시내에 teflon으로 coating된 multiwell slide를 중앙에 넣고 멸균소독한 뒤에 녹인 agar gel을 multiwell slide가 잠기도록 부어서 medium plate를 만든다. 굳은 배지에 구멍(multiwell 위에)을 만든 후에 곰팡이의 포자현탁액을 부어서 곰팡이가 페트리 접시 전면을 덮을 때까지 배양한 다음, 곰팡이를 화학적으로 고정시켜서 완전히 건조시킨 것을 항체현탁액과 배양시킨 것에 fluorescein isothiocyanate를 처리하여 UV을 비추어 관찰한다. 한편, 곰팡이가 생산하는 독소에 대한 항체를 이용한 항혈청 법도 개발중에 있다.

Molecular hybridization에 의한 곰팡이의 검출은 아직 보편화 되어 있는것은 아니나 기본적인 방법은 위(바이로이드, 바이러스, 세균)에서 설명한것과 원리상으로 동일하다. 실제로, 검역소와 농업연구기관에서 이루어지고 있는 곰팡이의 검출은 전통적인 방법으로, 대상식물체, 종자 등을 표면 살균한 다음에 포자 혹은 균사를 분리배양하는 것이 사용되고 있으나, 이렇게 분리배양된 균의 동정을 위하여 molecular hybridization법의 기법을 응용하는 것이 현재 이루어지고 있다. 그 대표적인 것으로는, restriction fragment length polymorphism(RFLP)이 있는데 특정한 molecular probe를 방사성동위원소로 표지시킨 것을 준비한 다음, 대상균으로부터 분리된 genomic DNA을 제한 효소로 완전히 끊어 gel에 영동한 뒤 nitrocellulose membrane에 전이한다. 미리 준비된 molecular probe와 genomic DNA가 붙어있는 membrane을 배양한 뒤 나타나는 band의 차이를 기초로 하여 미지의 균을 동정하는 방법이다. 최근에는 RFLP방법을 개선한 random amplified polymorphic DNA(RAPD)법, 즉 10 mer의 random primer를 total genomic DNA를 template로 하여 PCR하여 얻어진 PCR산물을 gel상에서 분리하여 생긴 band들을 서로 비교하는 것으로 다른 방법에 비하여 간편하고, 방사성동위원소를 사용하지 않는 장점이 있어서 많이 이용되고 있다.

5. Phytoplasma(Mycoplasma-Like Organism)

Phytoplasma는 기내배양이 불가능하다. 그래서, 대상식물의 조직에서 직접 관찰하는 방법이 일반적으로 사용되고 있다. 이병식물이 발육시기가 아닐 때에는 phytoplasma가 식물체내에 낮은 농도로 존재하며 불균일하게 분포되어 있고 시료의 선택이 어려운 관계로 전자현미경적인 검색은 효과적인 방법은 아니다. 현광현미경을 사용하여 관찰할 경우는 DNA fluorochromes Hoechst 33258과 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)과 같은 염색약을 사용하든가, 병든 조직을 얇게 잘라서 낙사형광현미경으로 관찰함으로써 phytoplasma의 확인이 가능하다.

최근에, 대상식물과 매개곤충으로부터 phytoplasma를 검색할 수 있는 polyclonal, monoclonal 항체가 만들어져서 혈청학적인 방법에 의하여 검출할 수 있는 길이 열렸다. 두 종류의 항체는 위에서 설명한 것과 동일한 방법으로 분리정제된 whole phytoplasma를 항원으로 하여 만들어진다. 분리정제된 phytoplasma는 일반적으로 미량이라서 항체의 생산이 어렵다, 그래서 양질의 항체생산을 위하여 Freund's adjuvant(죽은 결핵균과 paraffin 및 lanoline을 혼합한 액)를 함께 주사한다.

Immunogold로 label된 항체를, 전자현미경용 시료로 만든 이병식물의 조직에 처리하여 전자현미경으로 관찰할 수 있다. UV-fluorescence microscopy법은 전자현미경법 보다는 간편하고 대량의 대상식물을 관찰할 수 있어서 많이 쓰이고 있다. Immunofluorescence microscopy법은 DAPI염색약을 사용하였을때 생기는 background를 없앨 수 있다. 즉, fluoresceinisothiocyanate (FITC)가 결합된 항체를 사용하여 대상식물과 조직에 처리한 후 현광현미경으로 관찰하는 것이다. Phytoplasma검색을 위한 ELISA의 사용은 바이러스검색을 할때와 동일하지만 바이러스와 같이 대량의 순수한 phytoplasma를 분리하기 힘들기 때문에 각 실험자는 예비실험을 충분히 하여 최적조건(항체의 사용량, 세척 방법과 시간)을 확립할 필요가 있다.

우리나라에서 생명공학기법을 이용한 phytoplasma의 검색은 별로 이용되지 않고 있으나 외국에서는 최근에 보편화 되고 있다. 그러나, 본 연구실에서는 PCR을 이용하여 감염 초기단계에 간편하게 phytoplasma를 검색하고 있다. 물론, molecular hybridization기법을 사용하는 것은 위에서 설명한것과 기본적으로 동일하다. 최근에, 몇몇 연구자들에 의해서 phytoplasma의 genomic DNA가 clone화 되고 있어서 더욱 발전 될 전망이다.

결 언

세계각국에서 생명공학의 발달과 더불어 식물병원체를 전통적인 방법에서 탈피하여 보다 정확, 신속하게 생명공학기법을 사용하여 검색하려는 노력이 이루어지고 있다. 특히, 세계농산물의 자유경쟁시장화, 지적소유권의 강화, 우리농산물의 보호 및 수출력강화등을 고려할때에 우리도 체계적이고 독창적인 식물병원체의 검색능력이 절실한 시기이다. 그래서, 모든분야의 기술은 아니지만 대표적이고 일반화된 방법들을 간략하게 병원체별로 기술하였다.

위의 설명에 대하여 조금 보충설명을 하자면, 어느 방법이나 가장 문제가 되는 것은 signal/noise ratio이다. 이는 너무 약한 signal 혹은 너무 강한 background의 직접적인 원인이되기 때문이다.

Signal을 향상 시키기 위해서는 앞에서 설명한 토마토에 바이로이드 extract를 접종하여 항원을 많이 뽑는 방법과 항체 생산시 Freund's adjuvant을 사용하는등 여러 가지 방법이 고려되고 있다. 특히, monoclonal 항체를 만들때에 주의할 점은 식물체에 함유된 sugar와 arabinose는 생산량을 아주 떨어지게 하므로 완전히 제거할 필요하다. Molecular probe을 작성할때에도 P33등과 함께 새로운 화학물질을 사용하는 방법들이 계속 개발중에 있다. Background을 낮추는 방법으로는 항체의 비특이적 반응을 줄이기 위하여 항원을 주입할때에 polyvinylpyrrolidone 혹은 skim milk을 혼용하는 방법이 쓰이고 있다. 세균의 경우는 선택 배지의 사용으로 부생세균의 감소가 가장 요구되고 있다.

최근에 보편화된 분자생물학기법 중 하나인 PCR은 모든 식물병원체의 검색을 위하여 아주 강력한 수단으로 발전되고 있다. 열에 극히 안전한 DNA polymerase와 두 종류의 primer를 사용하여 목표로 하는 DNA를 한번 반응마다 2n씩 증폭시키는 것이 가능하다. 위에서 설명한 것과 같이 본 실험실에서는 극 미량의 phytoplasma를 검색하고 있다. PCR의 변형으로서 RNA를 대상으로 증폭시키는 reverse transcription PCR(RT-PCR)이 개발되어서 ssRNA의 검색을 직접할 수 있게 되었다. 앞으로, PCR법이 자동화되고 대량의 대상식물을 한번에 검색하는 것이 가능해지면 항체를 사용하는 각종 항혈청방법을 대신하여 가장 보편화 될 전망이다.

위에서 설명한 방법들과는 전혀 다르면서 더욱 간편하고 신뢰도 높은 새로운 생물공학기법이 여러분을 기다리고 있으니 지금은 여러분의 idea가 요구되는 시기이다.

참고문헌

1. Duncan, J. M. and Torrance, L. 1992. Techniques for the rapid detection of plant pathogens. Blackwell Scientific Publications.
2. Fox, R. T. V. 1993. Principles of diagnostic techniques in plant pathology. Cab International.
3. Walkey, D. 1985. Applied plant virology. Chapman and Hall.
4. Herrington, C. S. and Mcgee, J. O'D. 1992. Diagnostic molecular pathology. IRL Press.
5. 日本植物病理學會. 1995. 植物病理學辭典. 養賢堂.
6. Firrao, G., Gobbi, E. and Locci, R. 1994. Rapid diagnosis of apple proliferation MLO using PCR. *Plant Pathology* 43 : 669-674.
7. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press.