한국식물병리학회지 13(4) : 205-209(1997)
Korean J. Plant Pathol. 13(4) : 205-209(1997)

RT-PCR 기법을 이용한 감자 갈쭉 바이로이드 (Potato Spindle Tuber Viroid)의 검정

정영희 · 전재흥 · 최경화 · 김현순 · 정 혁*
생명공학연구소 식물조직배양연구 Unit

Detection of Potato Spindle Tuber Viroid Using RT-PCR Technique

Young Hee Joung, Jae Heung Jeon, Kyung Hwa Choi, Hyun Soon Kim and Hyouk Joung*
Plant Tissue Culture Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology(KRIBB), P.O. Box 115, Yusong, Taejon, Korea, 305-600

ABSTRACT: Potato spindle tuber viroid(PSTVd) RNAs were isolated from PSTVd-inoculated potato cv. Superior and carried out RT-PCR with reverse transcriptase and PSTVd specific primer pair desigened to amplify the 356 nucleotides of PSTVd genome. As a result, 356 nucleotides PCR products were amplified from PSTVd-inoculated potato cv. Superior. The 356 nucleotides DNA fragment was indeed the PSTVd gene by sequencing analysis. PSTVd could be successfully detected from infected leaf and tuber tissue of potato by using RT-PCR technique. Especially PSTVd was more effectively detected when both downstream and upstream primer were used than only downstream primer was used in RT reaction.

Key words: **potato spindle tuber viroid(PSTVd), reverse transcriptase, RT-PCR**

영양 번식작물인 감자에 여러 가지의 감자 바이러스나 바이로이드에 의한 감염은 수확량에 치명적인 영향을 미치기 때문에 각국에서는 씨감자의 생산과 수출입시 이들의 검정을 필수적인 사항으로 정하여 엄격히 통제하고 있다. 특히 감자 갈쭉 바이로이드 (potato spindle tuber viroid: PSTVd)는 356-360 nucleotides로 구성된 single-stranded RNA로 open reading frame은 없고 3개의 hairpin loop로 구성되어 있으며 숙주의 enzyme system을 이용하여 복제나 병징을 일으키는 것으로 보인다(5). PSTVd는 병징에 따라 mild strain, intermediatd strain, severe strain까지 여러 종류의 strain으로 구분되는데 PSTVd의 대표적인 병징으로는 괴경이 뾰족하게 돌출하는 현상을 들 수 있다. Mild strain이 감염된 경우 육안으로 구별이 안될 정도로 병징이 미약하나 15~20% 정도의 생산량이 감소되며, severe strain이 감염된 경우 잎의 크기가 적어지고 윤기가 없어 회색으로 보이며 생산량이 65% 정도가 감소되는 심각한 현상이 나타난다(2). 특히 PSTVd가 이미 감염된 것으로 밝혀진 지역에서는 씨감자의 생산, 판매 행위가 국내외적으로 엄격히 금지되고 있기 때문에 씨감자의 반출입시 PSTVd의 감염여부 확인은 여러 측면에서 필수적인 절차로 여겨지고 있다.

이런 PSTVd를 검정하기 위하여 많은 방법들이 개발되어었으나 핵산만으로 이루어져 있어서 항체를 이용한 ELISA방법으로는 검정이 불가능하므로 RNA 전기영동법(11, 12)이나 방사선 동위원소 probe를 사용한 nucleic acid spot hybridization(NASH) 방법(14) 등이 사용되고 있다. 하지만 RNA 전기영동법은 RNA의 순도가 매우 높아야 하기 때문에 RNA의 분리에 많은 노력과 비용이 소요되며 또 PSTVd가 증폭이 잘되는 조건에서 킨운 식물체에서도 PSTVd를 확실히 검정하기 위해서는 적어도 0.5 g 이상의 시료가 필요한 점으로 미루어 보아 검정의 정확도가 떨어짐을 알 수 있었다(11). 기존의 NASH은 방법이 까다로우며 방사선 동위원소 사용에 대한 위험성이 내재되어 있는 여러 단점들을 갖고 있어서 새로운 검정 방법이 필요한 실정이다. 최근 유전자를 증폭시킬 수 있는 PCR 방법이 개발되어 여러 분야에서 응용되고 있으며, 특히 식물의 특정 유전자를 잎이나 뿌리의 절편으로부터 직접 증폭시켜 확인할 수 있게 되었고(3) 이런 장

*Corresponding author.

점을 이용하여 PCR방법으로 식물바이러스를 검정하는 연구가 활발하게 이루어지고 있다(6, 9, 16).

본 연구에서는 PSTVd 특이적인 primer, reverse transcriptase와 DNA polymerase를 이용한 RT-PCR 방법으로 PSTVd를 효과적으로 검정하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 Viroid 접종. 실험의 공시재료로는 기내배양되고 있는 viroid-free한 *Solanum tuberosum* L. cv. Superior의 잎에 ATCC(American type culture collection)로부터 분양받은 mild strain인 PSTVd(ATCC#: PV86)를 inoculation buffer(0.05 M glycine, 0.3 M K_2HPO_4, pH 9.2) 2 ml에 녹이고 이것을 멸균된 솜과 celite 200 mg에 묻혀서 기계적 방법으로 접종시켰다(13). 접종시킨 감자 식물체는 정(8)의 방법으로 기내에서 유지시켰으며 3주 후부터 감염여부를 확인하였다. 실험의 대조구로는 PSTVd를 접종시키지 않은 Superior와 Desiree 품종을 이용하였다.

RNA 분리. 변형된 Morris 등(11)의 방법을 이용하여 식물체에서 PSTVd RNA를 분리하였다. 먼저 약 200 mg 정도의 식물조직을 액체질소에 넣고 마쇄한 다음 여기에 0.2 ml extraction buffer(0.2 M glycine, 0.1 M Na_2HPO_4, 0.6 M NaCl, 1.0% Sodium lauryl sulfate, 0.1 M β-mercaptoethanol, pH 9.5)와 1.6 ml phenol-choloform-isoamylalchol(25 : 24 : 1)를 넣고 잘 섞어서 12,000 rpm, 4℃에서 15분간 원심분리한 후 수용액층을 취하여 여기에 1/5 vol의 10 M LiCl를 첨가하고 얼음에 2시간 동안 방치한 후 12,000 rpm, 4℃에서 다시 원심분리한다. 이때 얻어진 용액에 다시 한 번 페놀을 처리한 후 원심분리하고 ethanol 침전을 하여 RNA를 분리한 다음 50 μl의 DEPC(diethly pyrocarbonate)를 처리한 멸균 증류수에 녹였다.

Primer 합성. Herold 등(7)에 의해 밝혀진 PSTVd의 핵산염기서열을 바탕으로 하여 총 359 nucleotides 중 356 nucleotides가 증폭되도록 upstream primer로는 5'-TGTGGTTCACACCTGACCTC-3'와 downstream primer로는 5'-ACCACGAGTTTAGTTCCGAG-3'를 합성하여 사용하였다.

RT-PCR. RT-PCR은 GeneAmp RNA PCR kit(Perkin Elmer cetus사)을 구입하여 사용하였다. 3 μl RNA solution에 1 μl downstream primer(50 pmol)를 넣어 75 ℃에서 5분간 가열하여 RNA의 2차 구조를 denature 시킨 다음 여기에 16 μl의 RT master mix(50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 10 mM DTT, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM dNTP, 1U RNase inhibitor, 2.5U reverse transcriptase)를 넣어 42℃에서 20분 동안 반응시켜 PSTVd의 cDNA를 합성한 후, reverse transcriptase를 불활성화시키기 위해 99℃에서 5분간 가열한 후, 5℃에서 5분 동안 반응액을 식혔다. 이 반응액 10 μl를 40 μl의 PCR mixture(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM upstream primer, 1.25 U/50 μl *Amplitaq* DNA pelymerase)에 섞어 94℃에서 2분간 가열 후 94℃ 45초, 57℃ 45초, 72℃의 조건으로 35 cycle의 PCR을 수행하였다.

Cloning 및 sequencing. RT-PCR에서 얻은 356 nucleotides의 cDNA를 pCR-Script SK(+) 벡터에 cloning 한 뒤 *E. coli* DH5α에 transformation시켜 ampicilin이 첨가된 선택배지에서 transformant를 선별하였다. 선별된 transformant에서 plasmid를 분리한 후 silver sequencing kit(Perkin Elmer Cetus사)를 사용하여 PSTVd의 염기서열을 확인하였다.

결 과

조직별 RT-PCR 검정. PSTVd를 접종시킨 Superior와 건전한 Superior, Desiree 품종의 잎과 기내에서 수확한 괴경조직 200 mg에서 각각 RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하였다. 이 RT-PCR product 10 μl를 1% agrose gel에서 전기영동하여 확인한 결과 PSTVd를 감염시킨 Superior 품종의 잎과 괴경에서만 356 nucleotides 정도의 DNA 절편이 증폭됨이 관찰되었다. 하지만 대조구로 사용한 Superior와 Desiree에서는 아무런 band도 확인되지 않았다(Fig. 1a, b). 또 이때 괴경에서 보다는 잎에서 증폭된 DNA band가 뚜렷하게 나타났다.

염기서열 확인. PSTVd가 감염된 Superior 품종의 잎에서 증폭된 356 nucleotides의 DNA 절편을 벡터에 cloning시킨 후 transformant를 선별하였다. 이 transformant에서 plasmid DNA를 분리하여 *Bam*HI과 *Sac*I 제한효소를 처리한 결과 356 nucleotides의 절편이 삽입된 것으로 추정되는 네 개의 클론을 얻을 수 있었다(Fig. 2). 이 네 클론의 플라스미드에 삽입된 DNA 부분을 sequencing한 결과 모두 접종시킨 PSTVd의 염기서열임이 확인되었다.

반응별 민감도 비교. PSTVd의 복제 특성상 식물체내에서 PSTVd (+) strand와 (-) strand가 동시에 존재할 가능성이 있음으로 RT 반응시 50 pmol의 downstream primer만 사용하여 PSTVd (+) strand만을 검정할 경우와 25 pmol downstream primer와 25 pmol up-

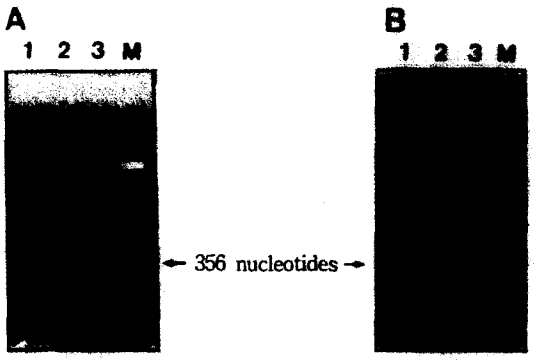

Fig. 1. Detection of PSTVd by RT-PCR. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products produced using RNA templates isolated from leaf (A) and tuber (B) of various potato cultivars. M, 100 bp DNA ladder; Lane 1-3, template RNA was isolated from healthy potato cv. Desiree, Superior and PSTVd infected potato cv. Superior, respectively.

stream primer를 동시에 사용하여 PSTVd (+) strand와 (-) strand를 동시에 검정할 경우를 비교하여 두 실험 방법에 있어서의 PSTVd 검정의 민감도를 비교해 보았다. 실험 재료로는 PSTVd가 감염된 Superior 품종의 잎에서 추출한 RNA 용액을 사용하였으며 PCR은 94℃에서 2분간 가열 후 94℃ 45초, 57℃ 45초, 72℃ 45초, 25 cycle의 조건으로 수행하였다. PSTVd를 검정할 때 RT 반응시 downstream primer만 사용할 경우보다는 downstream primer와 upstream primer를 동시에 사용할 경우가 PSTVd 검정에 더 효과적임을 알 수

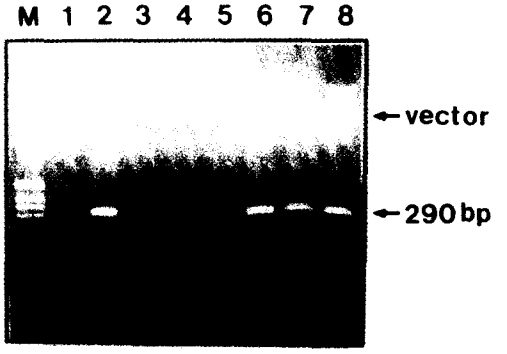

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of recombinant pCR-Script SK(+) vector digested with *Bam*HI/*Sac*I for the identification of 356 nucleotides of PSTVd cDNA insertion. M, 1 kb DNA ladder; Lane 2, 6, 7, 8, cDNA of PSTVd inserted clones; Lane 1, 3, 4, 5, nontransformed clones.

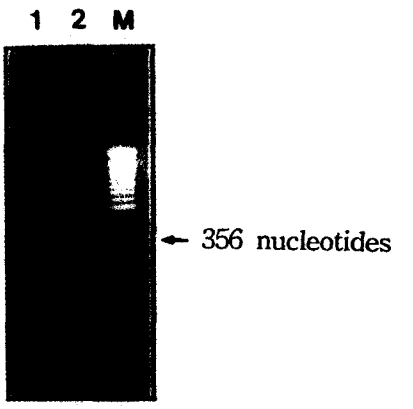

Fig. 3. Comparision of PSTVd detection sensitivity between using only downstream primer and using downstream and upstream primer in RT reaction. Template RNA was isolated from leaf of PSTVd infected potato cv. Superior. M, 100 bp DNA ladder; Lane 1, downstream primer was used in RT reaction; Lane 2, both downstream and upstream primer were used in RT reaction.

있었다(Fig. 3).

고 찰

실험재료로 잎과 괴경을 사용할 때 모두 PSTVd의 검정이 가능하였고, 특히 PCR에 의해 증폭된 DNA 양으로 미루어 보아 괴경보다는 잎에서 더 많은 양의 DNA가 증폭되었음을 알 수 있는데 이는 PSTVd가 괴경보다는 잎에서 더 높은 농도로 존재하기 때문인 것으로 사료된다.

PSTVd의 RT-PCR 검정을 위해 PSTVd의 hairpin II region에서 primer를 고안하여 사용할 경우 여러 가지의 false band들이 합성되었는데(결과 미제시) 이 band들을 분리하여 염기서열을 조사한 다음 NCBI BLAST(1) network service에 의뢰한 결과 chloroplast의 23S rRNA와 mitochondria의 coxI(cytochrome oxidase) 유전자의 일부임을 확인할 수 있었다. 이런 현상은 PSTVd의 특이한 구조와 염기서열 때문에 일어나는 것으로 생각되는데, PSTVd의 hairpin loop 구조와 염기서열은 숙주의 특정 염기서열과 유사하여 숙주의 시스템을 이용하여 복제를 하고 병징을 일으키는 것으로 보인다는 보고 등(10, 15)으로 미루어 볼 때 이런 hairpin 부위를 피하여 primer를 고안하여 사용하는 것이 PSTVd 검정에 효과적일 것으로 사료된다. 또 PSTVd에는 다양한 strain이 있는데 Fig. 4에서 보듯이 strain간에 변이가 심한 부위와 염기서열이 일정한 부

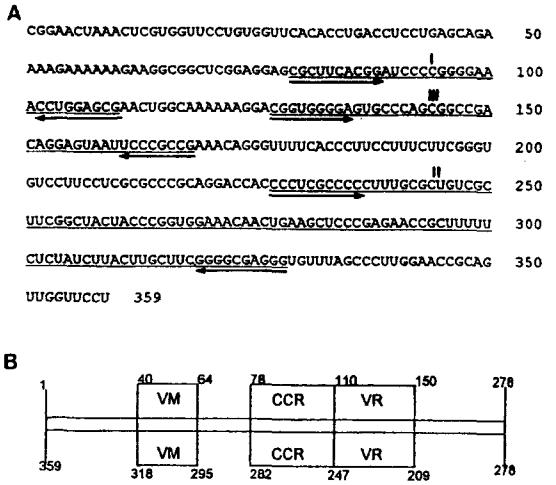

Fig. 4. The nucleotide sequence (A) and secondary structure of PSTVd (B). VM, virulence modulating region; CCR, conserved central region; VR, variable region of PSTVd strains. Hairpin I, II, III are underlined and those hairpin stem regions are marked by arrows.

위로 나뉘어 있고 염기서열이 일정한 부위도 mitochondrial RNA의 intron group I과 높은 상동성이 있음으로(7, 17), 이런 부위를 피하여 primer를 고안하는 것이 효과적일 것으로 사료된다.

RT-PCR의 방법별 비교로서 RT 반응시 downstream primer만을 사용할 경우와 downstream, upstream primer를 동시에 사용할 경우를 비교해 보면 두 primer를 동시에 사용하는 경우가 더 효과적인 것으로 나타났는데 이는 circular viroid (+) strand를 주형으로 하여 oligomeric (-) strand PSTVd RNA가 만들어지고 이것을 주형으로 하여 monomer의 PSTVd (+) strand가 합성되는 PSTVd의 복제과정에 의해 식물체 내에 PSTVd (+) strand와 (-) strand가 동시에 존재함으로써 기인한 것으로 두 primer를 이용하여 (+)와 (-) strand를 모두 검정할 수 있어서 생기는 현상으로 사료된다(4).

현재 시판되는 PSTVd의 검정 kit로는 dioxigenin-labeled probe를 이용한 Nucleic acid hybridization assay for Potato Spindle Tuber Viroid kit(Agdia inc.)가 있는데 시료 준비과정이 RT-PCR 방법과 비슷하며 가격면에서는 RT-PCR 방법보다 비싸기 때문에 효율적인 검정 방법이라고는 할 수 없는 실정이다.

본 실험에서 사용한 RNA 분리방법은 RT-PCR에 의한 바이러스나 바이로이드의 검정에 이용하기에는 약간 복잡하므로 앞으로 효과적인 PSTVd의 검정을 위해서는 PSTVd의 RNA 분리 과정을 더 신속하고 간단하게 줄일 필요가 있다. 이는 과정이 복잡할수록 외부에서 다른 DNA나 RNA등이 오염될 확률이 높아져서 정확한 검증이 어렵고 또 RNA 분리 과정이 길면 바이러스나 바이로이드의 RNA가 분해될 확률도 커져서 식물체내에 바이러스나 바이로이드가 낮은 농도로 존재할 때는 이로 인하여 검정의 민감도나 신뢰도가 떨어질 수 있기 때문이다. 하지만 RT-PCR에 이용할 RNA의 순도가 너무 낮아도 검정에 문제가 있으므로 효율적인 검정을 위해서는 실험의 용이함과 경제성, 검정의 민감도 등을 종합적으로 고려하여 가장 효율적인 RNA 분리 방법을 개발하여야 할 것으로 사료된다. 앞으로 PSTVd의 분리 방법을 좀더 효율적으로 개발하고 한 튜브에서 RT 반응과 PCR을 동시에 하는 등의 좀더 간편한 RT-PCR 조건의 확립에 이은 진단제품화에 관한 연구가 진행된다면 RT-PCR은 바이러스나 바이로이드 검정에 일반적으로 널리 쓰일 수 있는 효과적인 방법이 될 것으로 사료된다.

요 약

PSTVd를 접종시킨 감자의 Superior 품종으로부터 PSTVd RNA를 분리하여 역전사효소와 PSTVd genome 중 356 nucleotides를 증폭할 수 있는 PSTVd 특이적인 primer 쌍을 사용하여 RT-PCR를 수행한 결과 356 nucleotides의 DNA 절편이 증폭되었고 이 절편을 sequencing한 결과 PSTVd의 유전자임을 확인하였다. 감염된 잎과 괴경에서 모두 RT-PCR 기법을 이용한 PSTVd의 검정이 가능하였고 특히 RT 반응시 downstream primer만을 이용할 때보다 downstream과 upstream primer를 동시에 사용할 때가 PSTVd의 검정에 더 효과적이었다.

감사의 말씀

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

참고문헌

1. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Limpman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215-403.
2. Beemster, A. B. R. and de Bokx, A. J. 1987. Survey of properties and symptomes. In: *Virus of potatoes and seed-potato production. Ed 2.* ed. by de Bokx, A. J. and van der Want, J. P. H., pp. 109-111. Pu-

doc, Wageningen, Netherlands.

3. Berthomieu, P. and Meyer, C. 1991. Direct amplification of plant genomic DNA from leaf and root pieces using PCR. *Plant Mol. Biol.* 17 : 555-557.
4. Brench, A. D., Benefeld, B. J. and Robertson, H. D. 1988. Evidence for a rolling circle in the replication of potato spindle tuber viroid. *Proc. Nat. Acad. Sci.* USA 85 : 9128-9132.
5. Diener, T. O. 1987. The viroid. In: *The viruses II.* ed. by Freankel-Conrat, H. and Wagner, R. R., pp. 71-98. CRC Press, Boca Raton, FL.
6. French, R. and Robertson, N. L. 1994. Simplified sample preparation for detection of wheat streak mosaic virus and barley yellow dwarf virus by PCR. *J. Virol. Methods* 49 : 93-100.
7. Herold, T., Haas, B., Singh, R. P., Boucher, A. and Sanger, H. L. 1992. Sequence analysis of five new isolates demonstrates that the chain length of potato spindle tuber viroid(PSTVd) is not strictly conserved but as variable in other viroids. *Plant Mol. Biol.* 19 : 329-333.
8. Joung, H. 1989. Mass production of potato microtuber by tissue culture technique and its application. In: *'89 Agricultural Biotechnology Symposium.* pp. 100-124. Seoul National Univ., Korea.
9. Joung, Y. H., Jeon, J. H., Choi, K. H., Kim, S. H. and Joung, H. 1996. Detection of lily Symptomless virus using RT-PCR technique. *J. Kor. Plant Pathol.* 12 : 187-190.
10. Loss, P., Schmiti, M., Steger, G. and Riesner, D. 1991. Formation of a thermodynamically metastable structure containing hairpinII is critical for infectivity of potato spindle tuber viroid RNA. *EMBO.* 10 : 719-727.
11. Morris, T. J. and Smith, E. M. 1977. Potato spindle tuber viroid disease: Procedures for the detection of viroid RNA and certification of disease free potato tubers. *Phytopathology* 67 : 145-150.
12. Morris, T. J. and Wright, N. S. 1975. Detection of polyacrylamide gel of a diagnostic nucleic acid from tissue infected with potato spindle tuber viroid. *Am. Potato J.* 52 : 57-63.
13. Raymer, W. B. and O'Brien, M. J. 1962. Transmission of potato spindle tuber viroid to tomato. *Am. Potato J.* 39 : 401-408.
14. Salazar, L. F., Balbo, I. and Owens, R. A. 1988. Comparison of four radiactive probes for the diagnosis of potato spindle tuber viroid by nucleic acid spot hybridization. *Potato Research* 31 : 431-442.
15. Tabler, M., Tzortzakaki, S. and Tsagris, M. 1992. Processing of linear longer-than-unit length potato spindle tuber viroid RNAs into infectious monomeric circular molecules by a G-specific endoribonuclease. *Virology* 190 : 746-753.
16. Takahashi, Y., Tiongco, E. R., Cabauataen, 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.
17. Wolf, K. 1986. Homology between the splice-point region of mitocondrial group I intron and the viroid central conserved region. *Nucleic Acid Res.* 14 : 10119.

(Received May 13, 1997)