

RT-PCR을 이용한 수박 Cucumber Green Mottle Mosaic Virus의 효율적인 진단 및 외피단백질 유전자의 클로닝

양덕춘* · 이진숙 · 김두욱¹ · 임용표² · 민병훈³

한국인삼연구소 연구원 유전생리부, ¹중앙종묘(주), ²충남대학교 원예학과, ³배재대학교 원예학과

Efficient Diagnosis of Cucumber Green Mottle Mosaic Virus in Watermelon Using RT-PCR and Cloning of Coat Protein Gene

YANG, Deok Chun* · LEE, Jin Suk · KIM, Doo Wook¹ · LIM, Yong Pyo² · MIN, Byung Hoon³

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taedok Science Town, Taejeon, 305-345, Korea; Osan Breeding Institute, Choong Ang Seed Co., LTD., Hwasung, 445-810, Korea; ¹Department of Horticulture, Chungnam Nation University, Taejeon, 305-764, Korea; and ²Department of Horticulture, Paichai University, Taejeon, 302-735, Korea; *Corresponding author

A simple and reliable method to diagnose cucumber green mottle mosaic virus of watermelon in Korea (CGMMV-WK) was determined by RT-PCR, and coat protein gene for CGMMV-WK was cloned. Comparing to a method reported by Lee et al. (1996), the method developed here showed a better RT-PCR reaction. RT-PCR was possible by one step in the PCR reaction mixture that contains 20 pmol of primer, reverse transcriptase (30 unit), RNasin (5 unit) using the crude RNA solution. RT-PCR condition for specifically diagnosing CGMMV-WK was that cDNA was synthesized at 42° C for 45 min followed by pre-denaturation at 95° C for 2 min, and then PCR reaction was carried out with a programmed condition that consisted of 36 sequential cycles at 96° C for 30 sec, 60° C for 30 sec, and 72° C for 1 min. A gene encoding the coat protein of CGMMV-WK was cloned and characterized. Nucleotide sequence of coat protein gene of CGMMV-WK shared 98.77% and 99.38% of sequence identity with those of CGMMV-W and CGMMV-SH, respectively, however, all of amino acid sequences were same.

Key words: CGMMV-WK, RT-PCR condition, identity, sequencing

수박에서 발생하는 바이러스는 주로 오이 모자이크바이러스(CMV), 수박 모자이크바이러스(WMV), 오이 녹반 모자이크바이러스-수박계 (CGMMV-W) 등이 알려져 있으며, 이중에서도 CGMMV-W에 의한 피해가 가장 큰 것으로 보고 되어있다(Choi et al., 1995). 박과 작물에 쉽게 감염되는 CGMMV-W는 수박의 육묘기때부터 잎모자이크 증상을 나타내지만 대부분 정식후에 나타나며 과일에서는 꼭지부분에 갈색줄무늬현상을 나타내고, 씨앗의 주변이 적자색을 띠며 황색섬유상의 줄이 생기면서 연화되어 수박의 품질을

저하시킨다(Choi et al., 1995). 그 동안 식물바이러스는 농작물의 품질에 지대한 악영향을 미쳐왔기 때문에 바이러스병을 조기에 진단하여 접종원을 박멸하거나 무병종묘등의 선발 혹은 무병영양변식체의 증식을 도모하여 왔으며, 바이러스의 외피단백질유전자등을 클로닝하여 식물세포에 도입 발현시켜 새로운 바이러스내성 식물체(Fang and Grumet, 1993; Harrison et al., 1987)를 육종함으로써 농작물의 피해를 최소화하기 위한 노력이 계속되어 왔다. 바이러스 진단방법으로는 바이러스의 입자의 형태를 나누어 구분할

수 있는 전자현미경적 검정방법(Doane and Anderson, 1987), 바이러스의 희석도, 잠복기, 이동속도, 감염세포주에 의한 정량 등을 이용한 지표식물검정방법(Matthews, 1991), 칩강 반응법, 라텍스응집반응법, 환천겔 이중확산법, 형광항체법, 효소결합항체법, 면역전자현미경법, western blot, dot blot 등을 이용한 혈청학적 검정방법 등이 주로 사용되어왔다(Koenig et al., 1988; Sela et al., 1984; Yoon et al., 1991). 그러나 최근에는 분자생물학의 발달로 새로운 진단방법이 개발되었는데 역전사효소를 이용하여 바이러스 RNA로부터 cDNA를 만들어 cDNA:RNA 분자교잡법을 이용한 바이러스 진단방법이 있으며(Dawson et al., 1986; Scholthof et al., 1993) 본 연구에서 수행하고자 하는 역전사중합효소연쇄반응법(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)이 있다. RT-PCR 방법은 RNA로부터 cDNA를 만들기 위한 역전사반응과 DNA를 대량으로 증폭하기 위해서 개발된 PCR 방법을 함께 연결시켜 개발한 방법으로 바이러스의 상보적염기서열을 primer로 이용하기 때문에 특정 바이러스의 RNA에 대해서만 cDNA를 합성할 수 있어 primer의 종류와 위치에 따라서 요구한 바이러스를 진단할 수 있으며, 특정유전자를 클로닝할 수도 있다. 또한 기존의 바이러스 진단 방법보다 실험과정이 간단하고 적은 시간이 소요되며 특히 정확성이 뛰어나다고 보고 되어 있다(Navot et al., 1992; Nishiguchi et al., 1995; Roberson et al., 1991; Ryu et al., 1993). 지금까지 이미 많은 바이러스가 RT-PCR에 의해서 검정되었으며(Jeon et al., 1996; Ryu and Park), 또한 외피단백질 유전자가 클로닝 되었다(Lee et al., 1993; Takamatsu et al., 1994). 그러나 아직 수박의 CGMMV 대한 RT-PCR 진단방법은 보고되어 있지 않으며, 외국에서 나타난 CGMMV의 외피단백질유전자 염기서열은 보고되었으나(Meshi et al., 1983; Ugaki et al., 1991), 국내에서 발견된 CGMMV-W에 대한 염기서열은 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구는 국내의 수박에 감염되어 있는 CGMMV를 RT-PCR에 의해서 효과적으로 진단할 수 있는 방법을 개발하고, 아울러 외피단백질유전자를 클로닝하여 기존에 보고된 염기서열과 비교하고자 수행하였던바, 그 결과를 이에 보고한다.

재료 및 방법

RT-PCR에 의한 CGMMV의 검출 및 확인

포장에서 cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)로 증상을 보이는 수박을 채취하여 형태적 특성을 조사하였으며, 감염된 잎을 채취하여 Ultraspec™ II RNA isolation system (Biotecx Laboratories, INC, USA)를 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA부터 cDNA를 합성하기

위해서 reverse-transcriptase (MMLV-RT), RT-buffer, RNasin, DTT 및 random primer가 함유된 반응액을 42°C에서 45분간 반응시켰으며, 상기 합성된 cDNA반응액을 농도별로 희석하여 4 µL를 PreMix (Bioneer, Korea)에 혼합하여 PCR (Perkin Elmer, DNA thermal cycler)를 수행하였다. PCR은 95°C에서 2분간 post-denaturation 시킨 다음, 이어서 96°C에서 30초, 55°C에서 30초 72°C에서 1분간으로 36 cycle를 수행하였으며, 다시 72°C에서 10분간 post-extension를 시켰다. 이때 사용한 primer는 CGMMV의 염기서열을 기초로 sense primer 5'-CAC-AAG-GTA-CCG-CTT-TCC-AGA-3'와 antisense primer 5'-CAC-CAC-CAT-CAG-AAG-ACC-CTC-G-3'을 합성하여 반응을 위해서 각각 100 pmol을 사용하였다. PCR 반응이 끝난후 10 µL의 반응액을 1.0% agarose gel에서 50V로 1시간 전기영동한 후 EtBr를 이용하여 염색한 후 UV하에서 PCR product(450bp)를 확인하였다.

RT-PCR에 의한 CGMMV의 진단 조건의 구명

바이러스 RNA를 간단히 추출하기 위해서 Lee 등(1996)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 먼저 수박의 잎을 eppendorf tube의 뚜껑을 이용하여 2개의 disk를 절취한 후, RT-buffer(Lee et al., 1996)를 넣고 drill tip을 이용하여 마쇄하고, 완전히 썩여지도록 vortex를 한다. 이어 동량의 phenol : chloroform : isoamylalcohol를 넣고 현탁한 후 원심분리를 10분간하여 상등액을 새 tube에 넣어 바이러스 RNA용액으로 사용하였다. RT-PCR은 one step reaction을 위해서 상기 RT-Mix를 모두 혼합하여 사용하였으며, 다만 cDNA 합성을 위해서 random primer를 사용하지 않고 CGMMV primer를 바로 사용하였다. CGMMV primer는 추후 염기서열분석을 위해서 상기 primer와 ATG가 함유된 sense primer 5'-TTGAAGATGGCTTACAATCCG-3'을 사용하였으며 antisense primer는 그대로 사용하였다(PCR product 517bp). CGMMV의 진단을 위한 최적 RNA의 농도와 primer의 농도를 조사하기 위해서는 총 핵산 추출액을 3, 4, 5µL에 각각 primer를 20, 30, 50 pmol를 넣고 RT-PCR를 수행하였다. 또한 최적의 cDNA 합성조건을 조사하기 위해서 RT의 농도를 20, 30, 40 unit로 하고 RNasin의 농도를 2, 5, 10 unit로 하여 RT-PCR을 수행하였다. 또한 PCR에 최적조건을 구명하기 위해서 annealing의 온도를 55°C와 60°C로 나누어 PCR를 수행하였다.

CGMMV 외피단백질유전자의 클로닝

RT-PCR에 의하여 확인된 PCR product를 gene clean kit (Bio 101 II)를 이용하여 정제한 후 pCR script vector(Stratagene)에 재조합하였다. 재조합된 vector를 *E. coli*에 도입하여 kanamycin이 함유된 배지에서 overnight 배

양한 후 다시 plasmid를 추출하여 재조합 및 조합방향등을 조사하기 위해서 제한효소 *Hind*III로 절단하였다. 재조합이 확인된 vector는 Top™ DNA sequencing kit (Bioneer, Korea)을 이용하여 바이러스 cDNA를 증폭하여 silver staining에 의해서 sequencing을 수행하였다.

결과 및 고찰

RT-PCR에 의한 CGMMV의 진단 및 확인

포장에서 획득한 CGMMV가 감염된 것으로 생각된 수박은 잎진체가 약간 연한 황색을 띠고 있었으며 잎의 가장자리가 위로 말려 올라갔고 정상잎에 비해 크기가 작으며 가늘어진 경향을 보였다(Figure 1A). 또한 수박의 내부에는 씨앗의 주변이 적자색을 띠고 곳곳에 황색 섬유상의 줄이 생긴 것을 관찰할 수 있었다(Figure 1B, arrow). 이런 현상은 Choi 등(1995)에 의하여 보고된 내용과 유사하지만 다만 육안으로 판단한 것이기 때문에 다른 바이러스에 의하여 일어난 현상일 가능성을 전혀 배제할 수 없다. 따라서 RT-PCR에 의한 CGMMV 바이러스의 진단을 위해서 우선 감염잎과 정상잎을 채취하여 Ultraspec™ II RNA isolation system을 이용해서 RNA를 추출한 후, 1/10, 1/25, 1/50, 1/100 농도별로 희석하여 random primer로 RT-PCR을 수행하였던 바, Figure 1C와 같이 450 bp 위치에서 RNA의 농

도에 관계없이, 바이러스가 감염된 것으로 판단된 잎에서 PCR product가 형성되었다. 그러나 정상 잎에서는 전혀 아무 밴드로 형성되지 않았다. 따라서 형성된 450 bp는 CGMMV의 외피단백질 유전자의 일부(Meshi et al., 1983; Ugaki et al., 1991)가 증폭될 수 있도록 만든 specific primer이기 때문에 요구한 위치에 밴드가 형성된 것으로 보아 CGMMV가 감염된 것으로 확인할 수 있었다. 그러나 형성된 밴드가 명확하지 못해서 더욱 좋은 RT-PCR 조건이 요구되었다.

RT-PCR에 의한 CGMMV의 진단 조건의 구명

상기 실험에 의해서 일단 CGMMV의 바이러스가 감염되었음을 확인하였으므로 CGMMV의 간편하고 더욱 효율적인 진단방법을 구명하기 위해서 여러 가지의 조건을 조사하였다. 상기 방법에서 가장 문제가 되는 것은 RNA를 추출하는 방법인데 매우 복잡하며 고가이기 때문에 간편하고 간단한 진단방법을 위해서는 적합하지 못한 것으로 생각된다. 따라서 RT-PCR에 바이러스의 진단을 실용화하기 위해서 간편한 방법이 요구되어 본 실험에서는 Lee 등(1996)이 사용한 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 즉 Lee 등이 RT-buffer로 추출된 조즙액 용액을 한번 더 phenol : chloroform : isoamylalcohol(25:24:1)이 혼합된 용액을 동량 넣어 원심분리하여 상등액을 취함으로써 추출액에 들어있는 색소, 단백질 등을 제거하여 Lee 등(1996)의 방법보다 다소 정제된 RNA를 사용하였다. 또한 앞의 실험에서는 cDNA합성과 PCR를 각각 따로 수행하였으나 간편한 진단을 위해서 cDNA반응액과 PCR반응액을 동시에 넣고 총 50 μ L로 조절한 다음 one step reaction을 하여 RT-PCR를 수행하였던 바, 성공적으로 RT-PCR이 되었으며 정상식물에서는 전혀 밴드가 형성되지 않았지만(Figure 2A, lanes 1, 2) 감염잎에서는 동일한 위치(450 bp)에 밴드가 형성되었다(Figure 2A, lanes 3, 4). 따라서 바이러스의 효과적인 진단방법은 추출방법에 있어 기존에 순수한 RNA만 추출하여 RT-PCR를 수행한 방법을 사용하지 않고도 조즙액을 추출한 방법(Lee, 1996)에 phenol : chloroform : isoamylalcohol에 한번 더 정제한 후 RT-PCR를 수행하여도 RT-PCR에는 전혀 지장이 없음을 확인할 수 있어 많은 량을 진단하고자 할 때는 이 방법을 사용하는 것이 효과적일 것으로 생각된다. 또한 cDNA합성과 PCR 반응을 따로 수행한 two step reaction을 단 한번에 모든 반응액을 혼합하여 PCR을 수행하여도 선명한 밴드가 형성되어 본 방법이 매우 효과적인 것을 알 수 있다. 특히 사용된 primer는 two step reaction의 경우에는 처음 step에서는(cDNA합성) hexamer인 random primer를 사용하고 다음 step에서는(PCR 반응) CGMMV primer를 사용하였는데 본 방법에서는 처음부터 random primer는 사용하지 않고 모든 step에 공히 CGMMV primer

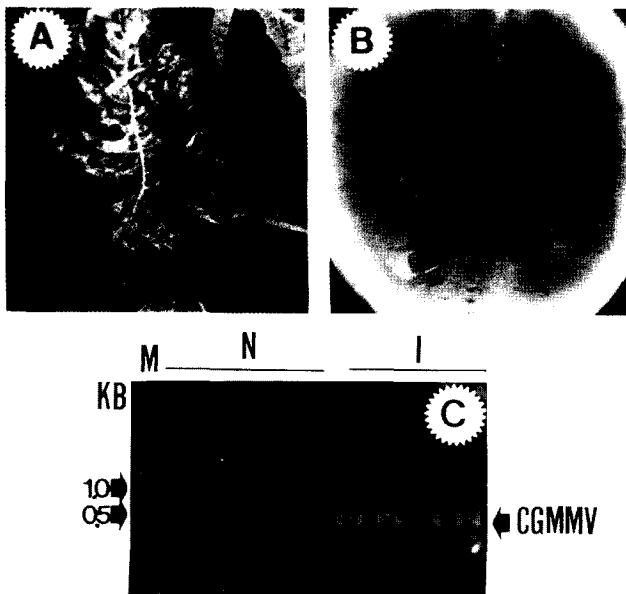


Figure 1. Phenotype of watermelon leaf(A) and fruit(B) infected by CGMMV. RT-PCR products (C) of CGMMV coat protein gene (450bp) isolated from normal (N, lanes 1-4) and infected (I, 5-8) leaves. cDNA was synthesized by random primer, and then PCR was performed.

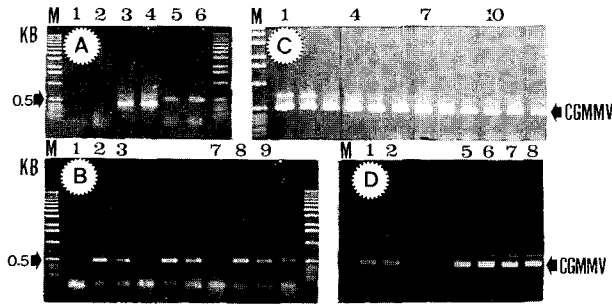


Figure 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products of coat protein gene isolated from CGMMV-WK based on the following RT-PCR condition: control(A-lanes 1, 2) ; primers for diagnosis(A-lanes 3, 4) and cloning(A-lanes 5, 6), concentration of primer(B-lanes 2, 5, 8, with 20 pmol ; 3, 6, 9, with 30 pmol ; 4, 7, 10, with 50 pmol) and nucleic acid concentration (B-lanes 2, 3, 4, with 150 ng ; 5, 6, 7, with 200 ng ; 8, 9, 10, with 250 ng), concentration of reverse transcriptase(C-lanes 1, 2, 3, with 40 unit ; 4, 5, 6, with 30 unit ; 7, 8, 9, with 20 unit) and RNasin(C-lanes 1, 4, 7, with 2 unit ; 2, 5, 8, with 5 unit ; 3, 6, 9, with 10 unit) and annealing temperature(D-lanes 1, 2, at 60°C ; lanes 5, 6, 7, 8, at 55°C).

를 사용함으로써 그 효율을 더욱 높일 수 있었던 것으로 생각되며 본 실험에 사용한 CGMMV 외피단백질 유전자를 증폭할 수 있는 primer (450 bp)는 진단용으로 매우 양호한 primer로 생각된다. 그러나 추후 CGMMV 외피단백질 유전자의 전체 염기서열분석을 위해서 ATG start codon이 함유된 sense primer와 종결codon까지 증폭할 수 있는 anti-sense primer를 이용하여 동일한 방법에 의해서 RT-PCR를 수행하였던 바, 517 bp위치에 선명한 밴드를 확인할 수 있었다 (Figure 2A, lanes 5, 6). 상기 PCR product (517 bp)는 요구한 위치에 밴드가 형성된 것으로 보아 일차적으로 CGMMV의 외피단백질 유전자가 모두 함유되어 있는 밴드로 생각된다. 한편 바이러스의 진단을 위한 RT-PCR 최적 조건을 구명코자 우선 최적 RNA의 농도와 primer의 농도를 조사하기 위해서 추출한 총 핵산(50 ng/ μ L) 추출액을 3, 4, 5 μ L, 그리고 primer를 각각 20, 30, 50 pmol을 넣고 총 20 μ L로 반응액을 감하여 조절한 다음 annealing의 온도를 55°C로 하여 RT-PCR를 수행하였던 바, 핵산의 함량에는 커다란 차이는 없었으나 낮은 농도에서 다소 선명한 밴드가 517 bp위치에 나타나는 경향을 보였으며(Figure 2B), primer의 농도간에는 상당한 차이가 있었는데 20 pmol에서 가장 선명한 밴드가 형성되었고(Figure 2B, lanes 2, 5, 8), 오히려 50 pmol을 사용할 때에는 밴드가 더 불량한 경향을 보였다 (Figure 2B, lanes 4, 7, 10). 상기 실험결과로 RT-PCR 반응액을 총 50 μ L에서 20 μ L로 감해서 수행해도 밴드의 형성에 이상이 없었으며 primer의 농도는 20 pmol이 가장 적당한 것으로 나타났다. 그러나 총 핵산의 양에는 커다란 차이가 나지 않아 추출액의 4 μ L를 일률적으로 사용하여도 무방할 것으로 사료된다. RT-PCR에 의해서 바이러스 진단하

는데 있어서 가장 많은 경비가 소요된 것은 RT와 RNasin의 구입비라고 할 수 있다. 따라서 최소의 RT 및 RNasin의 농도로 최적의 양호한 밴드형성을 위해서 RT농도를 20-40 unit, RNasin의 농도를 2-10 unit로 조절하여 RT-PCR를 수행하였던 바, 상기 농도에서는 커다란 차이를 보이지 않았지만 RT의 경우 20 unit에서는 다소 밴드의 크기가 적어지는 경향이었으며 RNasin의 농도는 거의 차이가 없었다 (Figure 2C). 따라서 RT의 경우에는 30 unit와 RNasin의 경우에는 5 unit가 적당할 것으로 사료되었다. 그러나 RT의 농도가 높을 경우 밴드가 이중으로 형성되는 경향을 보여 annealing의 온도를 55°C와 60°C로 나누어 PCR를 수행하였다(Figure 2D). Figure 2D에서 보는 바와 같이 55°C에서는 다소 희미한 2 중밴드가 형성되었으나(Figure 2D, lanes 5-7), 60°C에선 매우 선명한 밴드를 확인할 수 있었다(Figure 2D, lanes 1, 2). 따라서 RT-PCR조건은 42°C에서 45 분간 이어 95°C에서 2 분간 pre-denaturation 후에 다시 96°C에서 30 초간 denaturation, 60°C에서 30 초간 annealing, 72°C에서 1 분간 extension하여 36 cycle를 돌린 후에 최종적으로 72°C에서 10 분간 post-extension함으로써 가장 좋은 PCR를 할 수 있을 것으로 사료된다.

CGMMV 외피단백질유전자의 클로닝

상기 방법에 의해서 CGMMV 외피단백질유전자를 진단을 위해 RT-PCR를 수행하였던 바, Figure 3A와 같은 매우 선명한 PCR 밴드를 획득할 수 있으며, 이 PCR product가 확실한 CGMMV 외피단백질유전자인지를 확인하기 위해서 염기서열을 분석하고자 하였다. 우선 vector에 ligation시키기 위해서 gene clean kit를 사용하여 정제한 후에 pCR script vector에 ligation시켰다. Ligation이 된 vector는 다시 *E. coli*에 도입하여 배양한 후에 X-gal이 함유된 배지에서 백색의 colony만을 선발하여 plasmid를 추출하였다. CGMMV 외피단백질유전자(Meshi et al., 1983; Ugaki et al., 1991)는 총 517 bp중에서 start codon (ATG)로부터 약 490 bp down-stream쪽에 *Hind*III site를 가지고 있고, 또한 사용한 pCR script vector (2,961bp)도 *Hind*III 절단부위가 있어 추출한 CGMMV 외피단백질 product도 동일하게 *Hind*III로 절단하여 ligation의 여부와 ligation의 방향(정상방향 및 반대방향여부)을 확인하였다. *Hind*III 위치가 거의 stop codon(TAG) 위치에 존재함으로써 절단 후에는 2개의 밴드가 나올 수 있는데 (Figure 3B), 정상방향의 경우 (Figure 3B-forward)에는 약 2.5 kb와 0.5 kb, 그리고 반대방향의 경우 (Figure 3B-reverse)에는 거의 3.4 kb 이상의 크기와 100 bp 미만의 밴드를 확인할 수 있다. 추출된 plasmid를 *Hind*III로 절단한 결과는 Figure 3C와 같이 밴드가 형성되어 모두 ligation이 되었음을 확인할 수 있었다. 또한 Lane 2, 4번은 2.5 kb와 0.5 kb의 밴드가 나타나 정상적인 방향으로 ligation

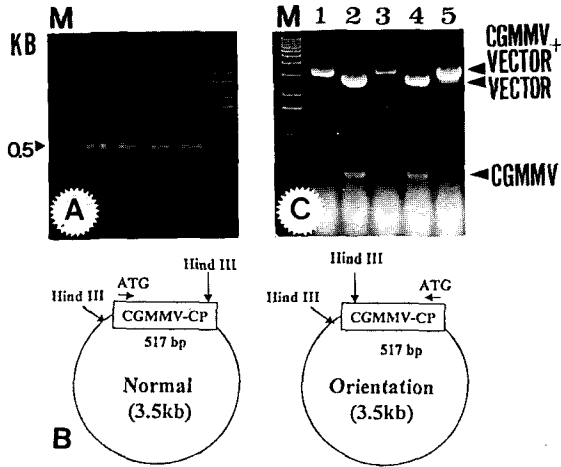


Figure 3. Cloning strategy of CGMMV-WK coat protein gene amplified by RT-PCR. A, RT-PCR products (517 bp) of CGMMV-WK CP gene using an optimum condition (primer 20 pmol, total nucleic acid 200 ng, reverse transcriptase 30 unit, RNasin 5 unit, and annealing temperature 60°C for 30 sec) for virus diagnosis. B, maps of PCR script vector containing CGMMV-WK CP gene with either directions. C, Identification of CGMMV-WK CP gene inserted into PCR script vector by restriction digestions.

CGMMV-WK	atgacctaac atccgataac acctagaaa cttaattgct ttagtcttc ttatgttcc	60
CGMMV-W	
CGMMV-SH	
CGMMV-WK	gtcaggactt tacttaattt tctagtgtct tcaaaagta ccgctttcca gactcaagcg	120
CGMMV-W	
CGMMV-SH	
CGMMV-WK	gtagagatt ctctccgaga gtccctgtct gcattaccct cgtctctcgt agatattaat	180
CGMMV-W	
CGMMV-SH	
CGMMV-WK	tctagattcc cagatggagg ttittacgct ttcccaacg gtccctggtt gtagcctacc	240
CGMMV-W	
CGMMV-SH	
CGMMV-WK	ctcgtttcgc tctctcgc caaggtacg cgttaatagg tcaatgaggt tgtagacct	300
CGMMV-W	
CGMMV-SH	
CGMMV-WK	agcaactcta cgaclgctga gtcgcttaac gcgttaaac gcactgatga cgcgctcaag	360
CGMMV-W	
CGMMV-SH	
CGMMV-WK	gcccctaggc ctgagataga taatttaata aggtctatit ctaagggtt tgaigtattc	420
CGMMV-W	
CGMMV-SH	
CGMMV-WK	gtagggctt cattgaagc cgcgctttcg gtatctggtt cagaagctac caactgaaa	480
CGMMV-W	
CGMMV-SH	
CGMMV-WK	gcttag	484
CGMMV-W	
CGMMV-SH	

Figure 4. Nucleotide sequence identity of coat protein genes among CGMMV-WK (isolated from watermelon in Korea, this study), CGMMV-W (isolated from watermelon by Meshi, 1983) and CGMMV-SH (isolated from CGMMV SH strain by Ugaki, 1991). Identical nucleotides are indicated by bars, and different nucleotides are marked in letters.

된 것으로 판단되며 1, 3, 5번에서는 약 3 kb에서 밴드가 형성된 것으로 보아 반대방향으로 재조합된 것으로 생각된다. 따라서 추후 CGMMV 외피단백질유전자를 이용하여 바이러스 저항성 품종을 만들고자 할 때 2, 4번을 활용할 수 있을 것으로 사료된다. 본 실험에서는 2번을 대상으로 염기서열을 분석하였던 바(Figure 4), Meshi 등(1983)이 보고한 CGMMV 외피단백질유전자와는 98.77% 상동성을 가지고 있었으며, Ugaki 등(1991)이 보고한 바이러스 유전자와는 99.38%의 상동성을 가지고 있었다. 또한 본 염기서열에 따른 아미노산 서열은 공히 100%의 상동성을 가지고 있었다. 따라서 3종의 CGMMV 바이러스의 외피단백질은 동일함을 알 수 있었다.

적 요

한국산 수박 녹반 모자이크 바이러스 (CGMMV-WK)를 RT-PCR 기술에 의해서 간편하고 확실한 진단방법을 구명하고 아울러 CGMMV의 외피단백질 유전자를 클로닝 하였다. 바이러스의 추출은 Lee 등 (1996)의 간이 조즙액추출법을 변형하여 정제된 핵산 추출액을 사용하여도 RT-PCR이 양호하였으며, 20 pmol의 primer, reverse transcriptase (30 unit), RNasin (5 unit)이 첨가된 PCR 반응액에서 one step reaction으로 RT-PCR이 가능하였다. CGMMV의 진단을 위한 RT-PCR 조건으로는 42°C에서 45분간 cDNA를 합성하고 이어서 95°C에서 2분간 pre-denaturation하고, 96°C에서 30초, 60°C에서 30초 그리고 72°C에서 1분간으로 36 cycle을 반응을 수행함으로써 간편하고 확실하게 CGMMV를 진단할 수 있었다. 또한 추출된 CGMMV의 외피단백질의 염기서열분석 한 결과 CGMMV-W와는 98.77 %, CGMMV-SH와는 99.38%의 상동성을 가지고 있었으며 아미노산 서열은 모두 100%의 상동성을 가지고 있었다.

사사-본 연구는 1996년 농촌진흥청의 대형공동 연구사업의 연구결과의 일부이다.

인 용 문 헌

Choi KM, Han MJ, Kim BS, Yoo SH, Jung SJ, Jung BY (1995) Disease protection and growth inhibition of vegetable in green house. pp 72-74. Korea Technology and Information Center of Horticulure. Press in Seoul Seed Corp

Dawson WO, Bubrnick P, Grantham GL (1986) Modification of the tobacco mosaic virus coat protein gene affects replication, movement and symptomatology. *Phytopathology* 78: 783-789

Doane FW, Anderson N (1987) Electron microscopy in diagnostic virology. A practical guide and Atlas. Cambridge university Press,

Cambridge

- Fang G, Grumet R** (1993) Genetic engineering of potyvirus resistance using constructs derived from zucchini yellow mosaic virus coat protein gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**: 358-367
- Harrison BD, Mayo MA, Baulcomb DC** (1987) Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus. *Nature* **328**: 799-805
- Jeon JH, Joung YH, Choi KH, Kim HS, Oh HW, Park SW, Joung H** (1996) An effective method of diagnosis of potato leafroll virus by RT-PCR. *Korean J Plant Pathol* **12**: 358-362
- Koenig R, An D, Lesmann DE, Burgermeister N** (1988) Isolation of carnation ringspot virus from canal near a sewage plant: cDNA hybridization analysis, serology and cytopathology. *Phytopathology* **121**: 346-356
- Lee SY, Hong JS, Lee JS, Choi JK** (1996) Detection of cucumber mosaic virus by RT-PCR using a simple and rapid crude sap extraction method. *Korean J Plant Pathol* **12**: 432-436
- Lee JY, Jung DS, Chang MU, Choi JK** (1993) Effective cloning of coat protein gene isolated from tobacco mosaic virus pepper (TMV-P) strain. *Korean J Plant Pathol* **9**: 136-138
- Meshi T, Kiyama R, Ohno T, Ikada Y** (1983) Nucleotide sequence of the coat protein cistron and the 3' noncoding region of cucumber green mottle mosaic virus (watermelon strain) RNA. *Virology* **127**: 54-64
- Matthews REF** (1991) *Plant virology : Methods for assay detection*. Academic Press, New York 835p
- Navot N, Zeidan M, Pichersky E, Zamir D, Czosnek H** (1992) Use of polymerase chain reaction to amplify tomato leaf curl virus DNA from infected plants and viruliferous whiteflies. *Phytopathology* **82**: 1199-1202
- Nishiguchi M, Mori M, Suzuki F, Nagata R, Morishita T, Sakai J, Hanada K, Usugi T** (1995) Specific detection of a severe strain of sweet potato feathery mottle virus by reverse transcription and polymerase chain reaction. *Ann Phytopathol Soc Japan* **61**: 119-122
- Roberson NL, French R, Gray SM** (1991) Use of group specific primers and polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. *J Gen Virol* **72**: 1473-1477
- Ryu KH, Park WM** (1995) Rapid detection and identification of odontoglossum ringspot virus by polymerase chain reaction amplification. *FEMS Microbiology Letters* **133**: 265-269
- Ryu KH, Park WM, Choi CW, Yoon EE, Lee SY** (1993) Detection of double-stranded ribonucleic acid from virus infected plants. *Korean J Plant Pathology* **9**: 112-117
- Scholthof HB, Morris TJ, Jackson AO** (1993) The capsid protein gene of tomato bushy stunt virus is dispensible for systemic movement and can be replaced for localized expression of foreign gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**: 309-322
- Sela I, Reichman M, Weissbach A** (1984) Comparison of dot molecular hybridization and enzyme linked immunosorbent assay for detection tobacco mosaic virus in plant tissues and protoplasts. *Phytopathology* **74**: 385-389
- Ugaki M, Tomiyama M, Kakutani T, Hidaka S, Kiguchi T** (1991) The complete nucleotide sequence of cucumber green mottle mosaic virus (SH strain) genomic RNA. *J Gen Virol* **72**: 1487-1495
- Yoon KE, Chung SY, Ryu KH, Park WM** (1991) Detection of odontoglossum ringspot virus by enzyme-linked immunosorbent assay in *Cymbidium* orchids. *J Korean Society Horticultural Science* **32**: 419-423

(1998년 10월 23일 접수)