

Nested PCR을 이용한 *Cowpea chlorotic mottle virus* 정밀 진단 시스템 개발

민병대¹ · 김영석² · 이시원^{1*} · 이수현³

¹국립환경과학원 환경기반연구부, ²국립환경과학원 영산강물환경연구소, ³경북대학교 응용생명과학부

Development and of Diagnostic System for Detection of *Cowpea chlorotic mottle virus* using by Nested PCR

Byung-Dae Min¹, Young-Suk Kim², Siwon Lee^{1*}, Su-Heon Lee³

¹Environmental Infrastructure Research Department, National Institute of Environmental Research, Incheon 440-170, Korea

²Yeongsan River Environment Research Center, National Institute of Environmental Research, Gwangju 500-480, Korea

³School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Received on 4 September 2014, revised on 16 December 2014, accepted on 31 December 2014

Abstract : *Cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV) is the 'controlled' quarantine virus as plant pathogenic virus that are classed as group VI (+) ssRNA virus that belongs to the genus *Bromovirus* and family *Bromoviridae*. When plants that are *Phaseolus vulgaris*, *Clitoria ternatea*, *Nicotiana tabacum*, *Glycine max*, *Vigna unguiculata* and *Vigna siensis*, and *Arachis hypogaea* is imported in domestic. In this study, inspection system is implemented to analyze CCMV accurately and rapidly by developing RT-PCR, nested PCR, and gene insertion positive control. It is expected that the method developed in this study will contribute to the plant quarantine to be consistently utilized in the field.

Key words : *Cowpea chlorotic mottle virus*, CCMV, Nested PCR, Quarantine

I. 서론

Cowpea chlorotic mottle virus (CCMV)는 Group IV positive sense single strand RNA virus, Bromoviridae 과, Bromovirus속으로 분류하는 식물병원성 바이러스로, Bancroft 등(1967)에 의해 처음으로 보고되었다. CCMV는 약 30 nm 크기의 20면체 외피단백질 내부에 3개의 RNA를 핵산으로 가지고 있다. 미국 국립생물정보센터에 의하면, CCMV의 핵산은 RNA1 (3.17 Kb), RNA2 (2.77, Kb) 및 RNA3 (2.17 Kb)로 구분되며, RNA1은 1a protein, RNA2는 2a protein 및 RNA3은 movement protein과 coat protein을 각각 암호화한다. 한편, CCMV는 강낭콩(*Phaseolus vulgaris*), 나비완두(*Clitoria ternatea*), 담배(*Nicotiana tabacum*), 대두(*Glycine max*), 동부(*Vigna unguiculata*,

Vigna siensis) 및 땅콩(*Arachis hypogaea*)이 국내로 수입될 경우, 검사를 수행하는 관리급 검역바이러스이다 (Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, 2013; Lee et al., 2013c). 2006년까지 CCMV는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법을 사용해왔으나(Stein et al., 1979), 낮은 검출감도와 거짓 양성반응 등으로(Caruso et al., 2003; Priou et al., 2006) 정밀진단과 검역처분에 어려움이 발생할 가능성이 있다(Lee, 2013). 반면에 RT-PCR은 최근 진단의 대부분을 차지하고 있는 안정성 높은 검사방법으로 많은 연구가 보고되고 있으며(Kim et al., 2000, 2005; Park and Kim, 2004; Lee et al., 2011a; Lee et al., 2011b), 검출감도를 향상 시키고 RT-PCR 결과를 검증하는 수단으로, nested PCR이 개발되어 보고되고 있다(Lee et al., 2013a; Lee et al., 2013b; Lee et al., 2013c). 또한, 실험실 오염에서 기원하는 거짓 양성반응을 탐지할 수 있는 PCR 양성대조구

*Corresponding author: Tel: +82-32-560-8354

E-mail address: siwonlee@korea.kr

가 개발되어(Lee and Shin, 2014), 식물병원체 진단을 위한 RT-PCR 및 nested PCR 정밀검정 시스템이 이루어지고 있다. 그러나, 아직 현장에서 활용 가능한 CCMV에 대한 정밀진단 시스템은 보고되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 현장에서 CCMV를 신속, 정확하게 진단할 수 있는 RT-PCR, nested PCR 및 양성대조구(유전자 삽입)를 개발하여 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 시료수집

이병시료, RNA 또는 cDNA시료 수집을 위하여, 농림축산검역본부의 금지품 수입허가 절차를 수행한 후 구매하거나(Adgen, England; Bione, Korea), 농촌진흥청 농업과학원 등의 유관기관에서 협조받아 수집하였으며, 목록은 다음과 같다; 검사법개발 대상 바이러스 *Cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV) 및 참고바이러스주[*Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), *Beet mosaic virus* (BtMV), *Broad bean wilt virus* (BBWV), *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV), *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Pepper vein mottle virus* (PVMV), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Ribgrass mosaic virus* (RMV), *Soybean mosaic virus* (SMV), *Tobacco necrosis virus* (TNV), *Tobacco streak virus* (TSV), *Tomato black ring virus* (TBRV), *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) 및 *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)].

2. 프라이머 설계

CCMV 진단용 프라이머 설계는 바이러스의 이동과 외피 단백질이 암호화된 RNA3을 대상으로 수행하였다. 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information)에서 RNA3을 암호화하는 CCMV 염기서열을 수집(AF325741, AF325738, AF428092 및 M28818)하였으며, 분류학적으로 유사한 Bromoviridae 4종의 바이러스 염기서열[Broad bean mottle virus (M60291), Brome mosaic virus (AB183261), Cacao yellow mosaic virus

(AB194808) 및 Spring beauty latent virus (AB080600)]과 비교하여, DNAMAN software package version 6.0으로 종 특이적인 서열을 탐색하였다(Pan et al., 2000; Lee, 2013; Lee et al., 2014).

3. 핵산 추출, RT-PCR 및 검출감도

이병시료에서 total RNA 추출, cDNA 합성 및 RT-PCR의 kit, 조성 및 조건 모두 이전에 수행한 진단시스템 개발 방법과 동일하게 수행하였다(Lee et al., 2013a). 또한 CCMV 주형 RNA를 10^{-1} - 10^{-8} 까지 희석하여 RT-PCR의 검출감도를 분석하였다. 이후, PCR 산물은 1.2% agarose (Sigma aldrich, USA) gel 150 ml에 TopRed nucleic acid gel stain (Biopure, United Kingdom) 4 μ l을 넣어 80분간 전기영동 하였으며, UV 하에서 형성한 밴드를 확인하였다.

4. RT-PCR 프라이머 선발

CCMV 진단을 위한 RT-PCR 프라이머를 조합하여, PCR 증폭이 가능한 조합들을 구성하였다. 우선, 조합한 RT-PCR 프라이머 조합을 대상으로 특이적 밴드를 형성하며 비 특이적인 밴드가 나타나지 않는 조합을 분석하였고, CCMV 종 특이적 프라이머 조합으로 추정하였다. 추정된 RT-PCR 조합들을 대상으로, 참고바이러스주 18종과의 비 특이적인 반응을 분석하였으며, 최종적으로 산물의 크기를 고려하여 2개의 RT-PCR 프라이머 조합을 선발하였다.

5. Nested PCR 및 양성대조구 개발

Nested PCR 프라이머는 RT-PCR 증폭산물의 안쪽을 재증폭 할 수 있는 specific primers를 설계하여 사용하였다. RT-PCR 산물의 밴드가 강하게 형성한 경우에는 10^{-2} 으로, 약하게 형성된 경우는 10^{-1} 으로 희석하였고, 밴드를 형성하지 않은 경우에는 산물의 원액을 사용하는 것을 원칙으로 하였다. Nested PCR은 Fast PCR PreMixture (Plutos, Korea) 2X type을 사용하여, 역전사 반응을 제외한 RT-PCR과 같은 조건으로 수행하였으며, RT-PCR에 대한 각각의 nested PCR 프라이머 조합을 선발하였다.

한편, 양성대조구 제작을 위하여, 선발한 2개 조합의 RT-PCR 영역을 포함하는 CCMV_N01/C10 (1,726 bp)를

증폭하였으며, 제한효소 *Xho* I이 반응할 수 있는 염기서열 ‘CTCGAG’ (6 bp)를 Site-Directed Mutagenesis Kit를 이용하여 삽입하였다(Nelson and McClelland, 1992).

III. 결과 및 고찰

CCMV를 진단하기 위한 RT-PCR 중 특이적 프라이머는 총 23개(정방향 11, 역방향 12)가 설계 되었고(Fig. 1), PCR 증폭을 위한 프라이머는 총 61개가 조합되었으며, 산물은 188-1,012 bp를 증폭할 수 있다(data not shown).

CCMV의 중 특이적 RT-PCR 프라이머 선별을 위한 분석에서, 61개의 조합 중, 밴드의 반응강도가 뛰어나고, 진단에 장애가 되는 비 특이적 반응이 보이지 않은 10개의 조합(조합4, 9, 19, 25, 34, 44, 48, 52, 56 및 61)을 선별하였다. 선별한 10개의 조합을 대상으로, 참고바이러스주 (CCMV와 분류학적 유사바이러스인 Bromoviridae과 및 감염기주 중 콩에 감염할 수 있는 바이러스) 18종과의 비 특이적분석 결과, 2개의 RT-PCR 프라이머 조합인 52 (967 bp)와 56 (824 bp)을 적합 RT-PCR 프라이머 조합으로 선별하였으며, 검출감도 분석결과 모두 10^{-6} 까지 특정 밴드가 형성됨에 따라, CCMV를 검출하기 위한 적합한 RT-PCR primer set로 판단하였다. 최종 선정된 RT-PCR 프라이머 조합52와 56을 기초로 nested PCR 프라이머를 설계하여 분석한 결과, 조합52는 CCMV_N07/C53 (436 bp), 조합56은 CCMV_N05/C60 (395 bp)를 nested PCR 프라이머로 선정하였다(Fig. 2 and Table 1).

양성대조구 제작을 위하여 선별한 RT-PCR 프라이머의 증폭 영역을 모두 포괄하는 CCMV_N01/C10 (1,726 bp)를

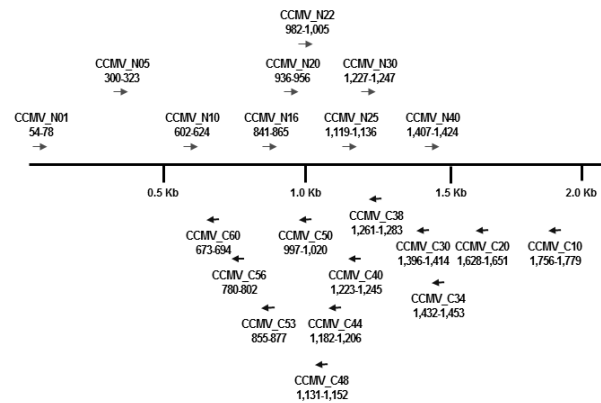


Fig. 1. Map of specific primers design for detection of *Cowpea chlorotic mottle virus*.

증폭하였다. 증폭한 산물을 insert DNA로 클로닝하였으며, 이것을 기초로 유전자를 삽입한 양성대조구를 제작하였다. PCR 실험에서 실험실 오염을 검증하기 위하여 RT-PCR 조합52의 nested PCR 조합이 반응하는 산물의 안쪽에 제한효소 *Xho* I site를 삽입한 결과(Lee, 2013), 6개의 염기서열 ‘CTCGAG’의 삽입을 확인하였다(Fig. 3).

검사현장에서는 CCMV RT-PCR 프라이머 조합52와 56을 사용하여 진단을 실시하며, RT-PCR 산물을 주형으로 nested PCR을 수행하였다. 검사 시, 제작한 유전자 일부를 삽입한 양성대조구를 컨트롤로 사용하였다. Nested PCR 검사결과 양성이 판정된다면, 실험실 오염여부를 검정해야만 한다. 만약 실험실 오염이 이루어져, 거짓 양성반응이 나타난다면, 다음의 두 가지 방법으로 검정이 가능하다. 우선, nested PCR 산물을 제한효소 *Xho* I에 반응시키면 양성대조구에 삽입한 site (CTCGAG)가 반응하여 산물이 2개의 밴드로 나뉘게 된다. 또한, nested PCR 산물을 염기서열 분석하여 양성대조구와 multiple sequence alignment 해보면, 삽입한 CTCGAG 부분이 분석되면 거짓양성으로 판정할 수 있다(Lee, 2013).

CCMV는 농림축산검역본부에서 검역과 관련된 관리급 바이러스(Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, 2013)이다. 본 연구에서 개발한 검사법은 검역현장에서 강낭콩(*Phaseolus vulgaris*), 나비완

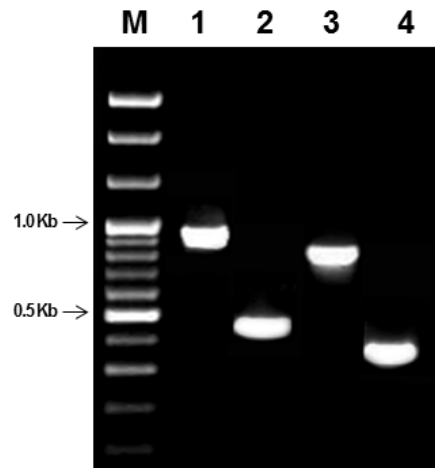


Fig. 2. Results of RT-PCR and nested PCR for detection of *Cowpea chlorotic mottle virus* Lane M, 100 bp step DNA Ladder maker (Genepia, Korea); lane 1, RT-PCR set 52 (CCMV_N01/CCMV_C50, 967 bp); lane 2, nested PCR of RT-PCR set 52 (CCMV_N07/CCMV_C53, 436 bp); lane 3, RT-PCR set 56 (CCMV_N01/CCMV_C53, 824 bp); lane 4, nested PCR of RT-PCR set 56 (CCMV_N05/CCMV_C60, 395 bp).

Table 1. Information of finally selected RT-PCR and nested PCR primer sets for detection of CCMV

Set	Primer		Sequence	Length (mer)	Band size (bp)
	PCR	Name			
52	RT	CCMV_N01	TCCCGTGAGCAGCGTTTACATTACT	25	967
		CCMV_C50	ATCTCTGGATCTTGCTCGTCAGTC	24	
	Nested	CCMV_C53	CTTATACATAGGTGCGTACTGCT	23	436
		CCMV_N07	CAAGAACACTGGTAGTAGAGCT	22	
56	RT	CCMV_C53	CTTATACATAGGTGCGTACTGCT	23	824
		CCMV_N01	TCCCGTGAGCAGCGTTTACATTACT	25	
	Nested	CCMV_C60	ACAAACGATAGCCGGAAGACTA	22	395
		CCMV_N05	AAGCCGGCGCCAGGATGATATGT	24	

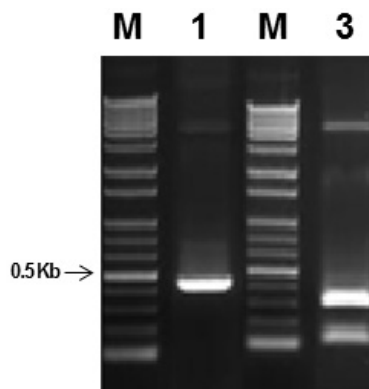


Fig. 3. Result of restriction enzyme (*Xho* I) cutting for development of modified-positive control Lane M, 100 bp DNA Ladder maker; lane 1, nested PCR product of RT-PCR set 52 (CCMV_N07/CCMV_C53, 436 bp); lane 2, after treatment of restriction enzyme *Xho* I.

두(*Clitoria ternatea*), 담배(*Nicotiana tabaccum*), 대두(*Glycine max*), 동부(*Vigna unguiculata*, *Vigna siensis*) 및 땅콩(*Arachis hypogaea*) 등의 작물에서 CCMV를 신속, 정확하게 진단하여 지속적으로 식물검역에 기여할 것이라고 기대된다.

IV. 적 요

Cowpea chlorotic mottle virus (CCMV)는 Group IV positive sense single strand RNA virus, Bromoviridae 과, Bromovirus속으로 분류하는 식물병원성 바이러스로, 강낭콩(*Phaseolus vulgaris*), 나비완두(*Clitoria ternatea*), 담배(*Nicotiana tabaccum*), 대두(*Glycine max*), 동부(*Vigna unguiculata*, *Vigna siensis*) 및 땅콩(*Arachis hypogaea*)이 국내로 수입될 경우, 검사를 수행하는 관리

급 검역바이러스이다. 본 연구에서는, RT-PCR, nested PCR 및 유전자-삽입 양성대조구를 개발하여, CCMV를 현장에서 신속, 정확하게 진단할 수 있는 정밀검정 시스템을 구현하였다. 본 연구에서 개발한 방법은 지속적으로 현장에서 활용되어 식물검역에 기여할 것이라고 기대된다.

참 고 문 헌

- Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency. 2013. List of Plant Quarantine Viruses in Korea in Newly Revised in 2013. Res. Plant Dis. 19:67-75.
- Bancroft JB, Hiebert E. 1967. Formation of an infectious nucleoprotein from protein and nucleic acid isolated from a small spherical virus. Virology. 32:354-356.
- Caruso P, Bertolini E, Cambra M, López MM. 2003. A New and Sensitive Co-operational Polymerase Chain Reaction for Rapid Detection of *Ralstonia solanacearum* in Water. J. Microbiol. Methods 55:257-272.
- Kim D, Hyun J, Hwang H, Lee S. 2000. RT-PCR detection of *Citrus tristeza virus* from early satsuma mandarin and yuzu Cheju Island. Plant Pathol. J. 16:48-51.
- Kim YJ, Park S, Yie SW, Kim KH. 2005. RT-PCR detection of dsRNA Mycoviruses infecting *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus blazei* Murrill. Plant Pathol. J. 21:343-348.
- Lee JS, Cho WK, Choi HS, Kim KH. 2011a. RT-PCR Detection of Five Quarantine Plant RNA Viruses Belonging to *Poty* and *Tospoviruses*. Plant Pathol. J. 27:291-296.
- Lee JS, Cho WK, Lee SH, Choi HS, Kim KH. 2011b. Development of RT-PCR Based Method for Detecting Five Non-reported Quarantine Plant Viruses Infecting the Family *Cucurbitaceae* or *Solanaceae*. Plant Pathol. J. 27:93-97.
- Lee S. 2013. A Study of Molecular Biological Detection Methods for Seed-transmitted Viruses in Quarantine. Ph. D. thesis. Dankook University, Cheonan, Chungcheongnam-do, Korea.
- Lee S, Cha M, Kim SM, Heo NY, Shin YG, Lee SH. 2014.

- Development of Nucleotide Primers for Diagnostic RT-PCR and Nested PCR Detection of Three Seed-transmitted Viruses (CRLV, SpLV and WCIMV) in Quarantine. *J. Agric. & Life Sci.* 48:75-83.
- Lee S, Kang EH, Chu YM, Shin YG, Ahn TY. 2013a. Development of PCR Diagnosis System for Plant Quarantine Seed-borne *Wheat streak mosaic virus*. *Korean J. Microbiol.* 49:112-117.
- Lee S, Kang EH, Heo NY, Kim SM, Kim YJ, Shin YG 2013b. Detection of *Carnation necrotic fleck virus* and *Carnation ringspot virus* using RT-PCR. *Res. Plant Dis.* 19:36-44.
- Lee S, Kang EH, Shin YG, Lee SH. 2013c. Development of RT-PCR and Nested PCR for Detection of Four Quarantine Plant Viruses Belonging to *Nepovirus*. *Res. Plant Dis.* 19: 220-225.
- Lee S, Shin YG. 2014. Development and Practical Use of RT-PCR for Seed-transmitted *Prune dwarf virus* in Quarantine. *Plant Pathol. J.* 30:178-182.
- Nelson M, McClelland M. 1992. Use of DNA methyltransferase/endonuclease Enzyme Combinations for Megabase Mapping of Chromosomes. *Meth. Enzymol.* 216:279-303.
- Pan YB, Burner DM, Legendre BL. 2000. An Assessment of the Phylogenetic Relationship Among Sugarcane and Related Taxa Based on the Nucleotide Sequence of 5S rRNA Intergenic Spacers. *Genetica* 108:285-295.
- Park MR, Kim KH. 2004. RT-PCR Detection of Three Non-reported Fruit Tree Viruses Useful for Quarantine Purpose in Korea. *Plant Pathol. J.* 20:147-154.
- Priou S, Gutarra L, Aley P. 2006. An Improved Enrichment Broth for the Sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* (biovars 1 and 2A) in Soil Using DAS-ELISA. *Plant Pathol. J.* 55:36-45.
- Stein A, Loebenstein G, Koenig R. 1979. Detection of *Cucumber mosaic virus* and *Bean yellow mosaic virus* in gladiolus by enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) *Plant Dis. Rep.* 63: 185-188.