

# *Andean potato latent virus* 검출을 위한 PCR 기반 진단시스템 개발

이진영<sup>1</sup> · 김진호<sup>2</sup> · 김은실<sup>3</sup> · 이시원<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>농림축산검역본부 인천공항지역본부, <sup>2</sup>단국대학교 화학과, <sup>3</sup>단국대학교 식량생명공학과, <sup>4</sup>국립환경과학원 환경기반연구부

## Development of PCR-base Diagnostic System for the Detection of *Andean potato latent virus*

Jin-Young Lee<sup>1</sup>, Jin-Ho Kim<sup>2</sup>, Eunsil Kim<sup>3</sup>, Siwon Lee<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Incheon International Airport Regional Office, Animal and Plant Quarantine Agency, Incheon 400-044, Korea

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

<sup>3</sup>Department of Crop Science & Biotechnology, Dankook University, Cheonan, 330-714, Korea

<sup>4</sup>Environmental Infrastructure Research Department, National Institute of Environmental Research, Incheon 440-170, Korea

Received on 7 March 2015, revised on 9 June 2015, accepted on 17 June 2015

**Abstract :** *Andean potato latent virus* (APLV) is a phytopathogenic virus that belongs to the Group IV (+) sense ssRNA viruses of the genus *Tymovirus*. It mainly infects potatoes and is specified as a controlled quarantine virus in Korea. In this study, two primer sets of RT-PCR and nested PCR [set 2 (404 → 259 bp) and set 23 (501 → 349 bp)], were selected, which can rapidly and accurately diagnose APLV in quarantine sites. In addition, a modified-positive control plasmid is development, can possible verification of laboratory contamination in diagnosis of APLV detection. The PCR-base system developed in this study is expected to diagnose APLV and contribute to the plant quarantine in Korea.

**Key words :** *Andean potato latent virus*, APLV, Nested PCR, Quarantine

## I. 서론

*Andean potato latent virus* (APLV)는 Group IV (+) sense ssRNA viruses, *Tymovirus*속으로 분류되며 1966년 최초로 보고되었다(Gibbs et al., 1966). APLV는 약 28 nm 지름의 정방형으로 딱정벌레(*Epitrix* spp.) 및 종자전염을 하고(Jones et al., 1977; Fribourg et al., 1977), 핵산은 3개의 단백질을 암호화하며 총 염기서열의 길이는 약 6.4 kb이다(Koenig and Lesemann, 1981; Bernal et al., 2000). APLV는 파파리자, 비름과, 명아주과, 박과 및 가지과에서 감염 보고사례(Gibbs and Harrison, 1969; Koenig and Bode, 1978)가 있으며, APLV 감염증상은 주로 괴사반점, 오그라짐, 잎 끝의 괴사 및 모자이크가 나타날 수 있다. APLV는 유럽식물보호연맹의 검역목록에 올라 있는 non-European potato viruses로 감자에 대한 위험

병원체로 분류되며, 우리나라에서도 감자(*Solanum tuberosum*)와 파파리자(*Ullucus tuberosus*) 수입 시 검사를 수행하는 관리급 검역바이러스로 지정되어있다(Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, 2013). 최근 검역현장에서는 많은 검사량과 검사인력 부족 등 현장의 특성을 고려한 중합효소연쇄반응(PCR) 기초의 검사 방법들과 유전자변형-양성대조구가 개발 및 현장적용(Lee et al., 2013a; Lee et al., 2013c; Lee and Shin, 2014; Lee et al., 2014a; Lee et al., 2015)되어 바이러스 검역실적이 증가하였으나(Shin, 2009; Lee et al., 2013b), APLV를 검출하기 위한 진단방법은 아직 보고되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 검역현장에서 APLV를 정밀진단 할 수 있는 역전사(RT)-PCR, nested PCR 및 유전자변형 양성대조구를 개발하였다.

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

E-mail address: siwonlee@korea.kr

## II. 재료 및 방법

### 1. 프라이머 설계 및 재료수집

APLV와 함께 14종(유사염기서열 및 동일 기주에 감염될 가능성을 가진 바이러스)의 염기서열(GenBank accession No. NC\_020470, NC\_020471, NC\_007609, NC\_001480, NC\_001977, NC\_001746, NC\_009532, S97776, NC\_011539, NC\_002164, NC\_001747, NC\_011062, NC\_011537, NC\_004063 및 AF035633)을 수집하였다. 수집한 염기서열들은 multiple alignment 후 Primer3를 사용하여 중 특이적 프라이머를 탐색하였다(data not shown). APLV-특이적 프라이머 설계 후 RT-PCR 증폭 산물이 가장 많이 조합되는 부분을 대상으로 Bioneer (Korea)에 의뢰하여 유전자 합성을 수행하였으며, 합성한 유전자는 1 ng/μl로 조절하였다(Lee et al., 2014). 한편 APLV, *Poinsettia mosaic virus* (PnMV), *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV), *Potato X virus* (PVX), *Potato Y virus* (PVY) 및 *Potato T virus* (PVT)의 감염기주, RNA 또는 cDNA를 구매(Adgen, England; Bione, Korea) 또는 유관기관의 협조로 수집하였다. 또한 APLV가 감자에 발생될 가능성이 제기됨에 따라 진단시스템 개발에 활용하기 위하여 병에 걸리지 않은 건강한 감자를 구매하였다.

### 2. 핵산추출 및 RT-PCR 프라이머 선발

이병시료의 RNA추출 RNeasy<sup>®</sup> Plant mini kit (Qiagen, Netherlands)를 사용하였고, 감자 genomic DNA는 DNeasy<sup>®</sup> Plant mini kit (Qiagen, Netherlands)를 사용하여 프로토콜에 따라 핵산을 추출하였다(Lee et al., 2014b). RT-PCR 프라이머 선발은 기존에 보고된 검역현장 방법을 적용(Lee et al., 2013b)하여 다음과 같이 수행하였다; i) 합성한 plasmid를 주형으로 특이적 밴드를 형성하는 프라이머 조합을 1차로 선발하였고, ii) 1차 선발된 프라이머 조합들을 대상으로 참고바이러스주 5종들과 반응하여 비 특이적 밴드를 형성하는 조합을 제외하는 2차 선발을 수행하였다. iii) 2차 선발된 프라이머 조합들을 대상으로 건강한 감자의 genomic DNA에 비 특이적인 밴드를 형성하는 조합을 제외하는 3차 선발을 수행하였다. iv) 프라이머 조합의 위치와 반응강도를 고려하여 2개의 RT-PCR 프라이머 조합을 최종 선발하

였고 검출한계 실험을 수행하였다.

### 3. Nested PCR 프라이머 선발 및 유전자변형-양성대조구 제작

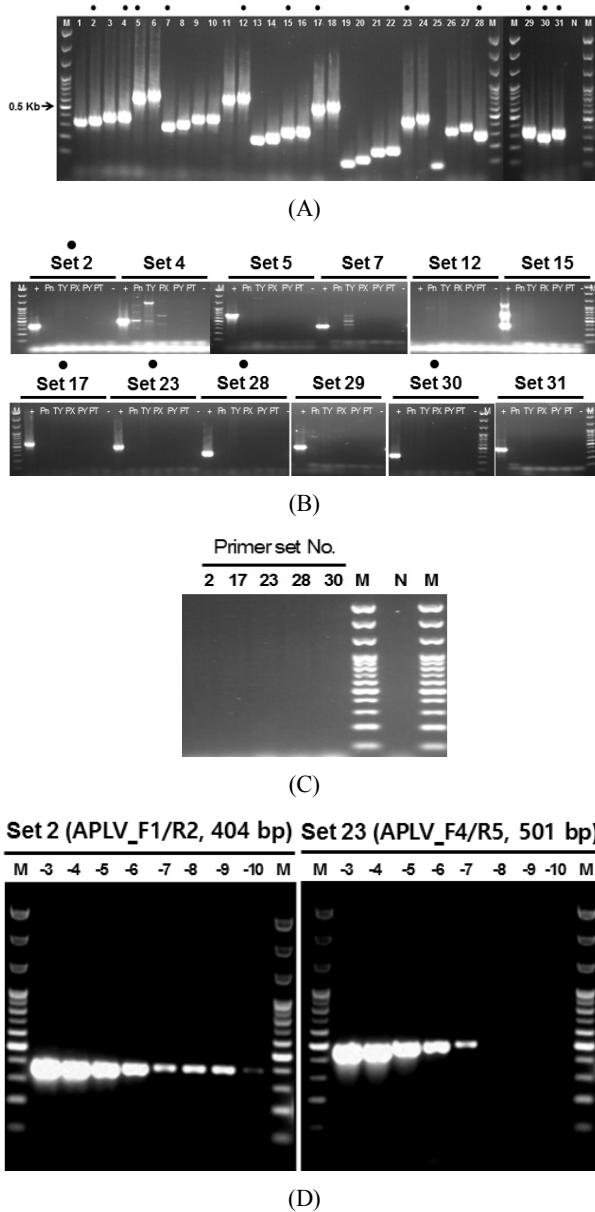
Nested PCR 프라이머 선발을 위하여 최종 선발한 2개의 RT-PCR 산물의 안쪽 영역을 증폭할 수 있는 프라이머 조합을 설계하고, 100배 희석 RT-PCR 산물을 주형으로 반응하였다. 밴드의 강도 및 RT-PCR 산물 크기의 차이를 고려하여 PCR 반응을 하였으며, 조건과 조성은 이전에 보고된 검역현장 바이러스 검출법과 동일하게 수행하였다(Lee et al., 2015). 한편 APLV 진단에 사용할 유전자변형 양성대조구 플라스미드를 제작하였다. 최초 제작한 800 bp 플라스미드를 대상으로 최종 선발한 nested PCR 증폭산물 영역에 *Xho* I이 반응할 수 있는 염기서열을 Site-Directed Mutagenesis Kit (Enzynomics, Korea)를 이용하여 삽입하였다(Nelson and McClelland, 1992). 최종적으로 유전자의 삽입은 염기서열 분석을 통해 확인하였다.

### 4. APLV 진단시스템 검증

APLV 이병시료에서 추출한 RNA를 대상으로 본 연구에서 개발한 진단시스템을 적용하였다. RT-PCR과 nested PCR은 동일하게 수행하였으며, 전기영동은 HT DNA LabChip<sup>®</sup> Kit ver. 2 (Caliper Life Sciences, USA)를 사용하여 APLV-특이적 밴드를 분석하였다.

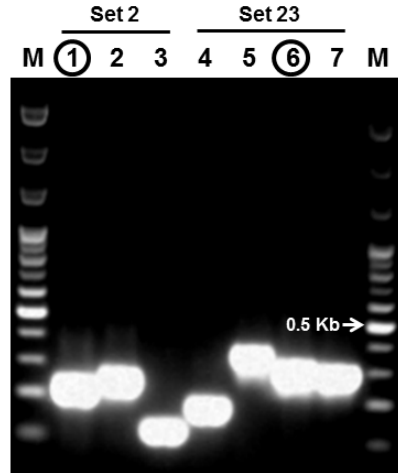
## III. 결과 및 고찰

APLV 특이적 프라이머 13개(정방향 7개 및 역방향 6개)가 설계되었으며, 83-781 bp의 PCR 증폭이 가능한 31개 조합을 구성하였다(data not shown). 최초 31개의 조합을 대상으로 APLV 특이적 유전자 선발을 수행한 결과 모든 조합이 밴드를 형성하였으나, 이 중 300-800 bp의 PCR 산물을 형성한 12개의 RT-PCR 프라이머 조합을 선발하였다(Fig. 1A). APLV에 특이적 밴드를 형성한 12개의 RT-PCR 프라이머 조합을 대상으로 참고바이러스주 5종과 비 특이적인 분석을 수행한 결과, 7개의 조합에서 비 특이적 밴드가 증폭된 반면 RT-PCR 프라이머 조합 2, 17, 23, 28 및 30에서는 비 특이적 현상이 분석되지 않았다



**Fig. 1.** Selection of specific RT-PCR and nested PCR primer sets for detecting APLV  
 First (A), second (B) and third (C) selection of APLV-specific RT-PCR primer sets. Lane M, 100 bp step DNA Ladder maker (Genepia, Korea); lane number, RT-PCR primer sets; dot, selected RT-PCR primer set. +, positive control; - or N, negative control; Pn, Poinsettia mosaic tymovirus; TY, Turnip yellow mosaic tymovirus; PX, Potato X potyvirus; PY, Potato Y potyvirus; PT, Potato T trichovirus. Panel D, sensitivity of RT-PCR primer set 2 and 23. Lane number, diluted values.

(Fig. 1B). 또한 참고바이러스주에 반응을 하지 않은 5개의 RT-PCR 프라이머 조합을 대상으로 감자 genomic DNA에 비 특이적인 반응을 분석하였으나 밴드를 형성하지 않았다 (Fig. 1C). 이에 따라 증폭산물의 위치와 반응강도를 고려



**Fig. 2.** Selection of nested PCR primer sets for APLV detection  
 Lane M, 100 bp step DNA Ladder maker; lane 1-3, nested PCR products of RT-PCR primer set 2; lane 4-7, nested PCR products of RT-PCR primer set 23; circle, final selection of nested PCR primer set for detection of APLV.

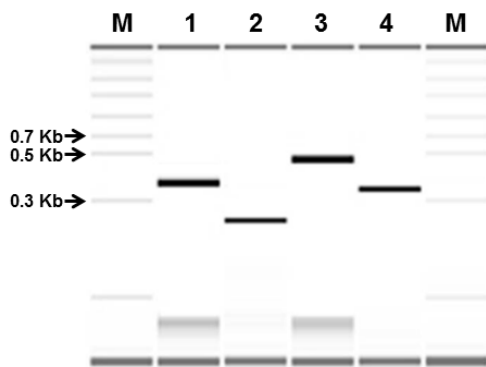
하여 RT-PCR 프라이머 조합 2와 23을 선정하였으며, 조합 2는  $10^{-10}$  및 조합 23은  $10^{-7}$ 로 검출감도가 분석(Fig. 1D) 되어 APLV 진단에 적합한 RT-PCR 프라이머 조합으로 최종 선발되었다.

RT-PCR을 재검증할 수 있으며 더욱 높은 검출감도의 증폭을 하기위하여 nested PCR 프라이머 조합을 설계하였다. RT-PCR 프라이머 조합 2의 nested PCR 프라이머 조합은 3개 조합[APLV\_F3/R1 (259 bp), APLV\_F3/R2 (298 bp) 및 APLV\_F4/R2 (147 bp)]이었으며, 조합 23은 4개 조합[APLV\_F4/R4 (212 bp), APLV\_F5/R5 (389 bp), APLV\_F6/R5 (349 bp) 및 APLV\_F7/R5 (334 bp)]이었다. Nested PCR 결과 모든 조합에서 APLV 특이적 밴드를 형성하였으나, 염기서열 분석을 위한 증폭 크기 및 RT-PCR과의 차이를 고려하여 각각 1개씩의 nested PCR 조합을 선발하였다. 따라서 RT-PCR 프라이머 조합 2는 APLV\_F3/R1 (259 bp) 및 조합 23은 APLV\_F6/R5 (349 bp)가 가장 적합한 nested PCR 조합으로 선발되었다(Fig. 2). 이에 따라 RT-PCR 조합 2 (nested PCR 증폭산물 259 bp)와 조합 23 (nested PCR 증폭산물 349 bp)이 검역현장에서 APLV를 진단하는 최종 RT-PCR 및 nested PCR 프라이머 조합으로 선발되었다 (Table 1).

또한, PCR 등 분자생물학적 진단시스템에는 양성대조구 개발이 반드시 포함되어야 한다. 대량으로 수입하는 시료에 대한 검역검사법의 개발은 정밀성과, 편의성, 신속성 및

**Table 1.** Final selected RT-PCR and nested PCR primer sets for detecting APLV from quarantine sites.

Set	Primer		Sequence	Length (mer)	Band size (bp)
	PCR	Name			
2	RT	APLV_F1	GCCAGAGAGTTGCTAATC	18	404
		APLV_R2	GACGAGTTGATGGTGATA	19	
	Nested	APLV_F3	GACTCCTGCCGTTTCTAA	18	
		APLV_R1	CCAAGTAGGTGGGAGTAA	18	
23	RT	APLV_F4	AGTCTCTCTCTTCCACCGT	20	501
		APLV_R5	GATTGGACCTTTGTGTGCTA	20	
	Nested	APLV_F6	AAAGCCCAGCGAGATACTC	19	
		APLV_R5	GATTGGACCTTTGTGTGCTA	20	



**Fig. 3.** The result of RT-PCR and nested PCR for detecting APLV RNA sample using HT DNA LabChip® Kit ver. 2. Lane M, HT DNA 5K maker (Caliper Co.); lane 1, APLV RT-PCR primer set 2; lane 2 (404 bp), nested PCR primer set of RT-PCR primer set 2 (259 bp); lane 3, APLV RT-PCR primer set 23 (501 bp); lane 4, nested PCR primer set of RT-PCR primer set 23 (349 bp).

특이성을 가져야 하며, 검사법이 표준화 되는 것이 매우 중요하다. 또한 검사결과에 대한 오염여부와 거짓양성을 검증할 수 있는 방법이 개발되어, 안정성과 함께 보다 과학적인 검역을 지원해야 한다(Lee et al., 2013a). 그러나 검역바이러스는 국내 미보고 바이러스로 국내 유입시 농가에 직접적 및 경제적 피해가 예상되며, 나아가서는 관련 작물의 수출제한 등 국가적 피해가 따를 수 있어 시료의 활용이 제한된다(Shin, 2009). 이에 따라 본 연구에서는 플라스미드를 이용한 양성대조구 개발을 수행하였다. APLV 특이적 RT-PCR 프라이머 조합 2를 선택하여 이들의 nested PCR 증폭부위 안쪽으로 염기서열을 삽입한 결과 CTCGAG 삽입이 확인되었다(data not shown). 플라스미드로 만들어진 양성대조구는 작물로 감염 우려가 없고, 세포로 보존되어 있어 언제든지 plasmid prep.으로 쉽게 활용이 가능하며,

유전자의 삽입으로 실험실 오염에 대한 검증이 가능하다. 본 연구에서 개발한 양성대조구로부터 실험실 오염이 일어날 경우 다음의 2가지 증상이 나타날 것이다; i) RT-PCR 프라이머 조합 2의 nested PCR 산물을 대상으로 제한 효소 *Xho* I가 반응하여 두 개의 밴드가 관찰되거나, ii) nested PCR 산물의 염기서열 분석 시 인위적으로 삽입한 6개의 염기서열 부위가 분석될 것이다(Lee et al., 2013a).

한편, 검역병원체는 식물을 자연기주로, 국내에 분포하지 않는 병원체 중 검역적 위험도가 높은 병원체를 매년 병해충 위험도 평가(Pest Risk Analysis)를 거쳐 ‘금지급’, ‘관리급’ 및 ‘규제비검역’으로 구분한다(Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, 2013; Lee, 2013). 금지급은 병원체의 위험도가 높아 병원체와 관련된 식물의 수입을 금지하며, 관리급 또는 규제비검역은 수입검사에서 발견될 경우 폐기 또는 반송 처분을 하고 있다(Lee, 2013). 지금까지 보고된 RT-PCR 및 nested PCR 진단시스템들(Shin, 2009; Lee, 2013; Shin and Rho, 2014; Lee et al., 2015)은 기존의 진단시스템인 효소 결합면역흡착측정법으로 검출하지 못한 *Cherry leaf roll virus* 및 감자갈쭉병 등 새로운 바이러스들을 검출하면서 바이러스 검출실적이 증가하였다(Shin, 2009). 또한 동일한 조성과 조건을 사용하는 RT-PCR 및 nested PCR 진단 시스템은 현장에서 활용이 매우 편리하였으며 1년 이상의 충분한 점검기간 및 모니터링 기간을 통해 식물검역에 기여하고 있다(Lee, 2013). 따라서 이번 연구에서 개발한 진단시스템은 향후 감자 등 수입작물에서 APLV 검역에 기여할 것이라고 기대된다.

## IV. 적 요

*Andean potato latent virus* (APLV)는 Group IV (+) sense ssRNA viruses, *Tymovirus*속으로 분류되는 식물 병원성 바이러스로, 주로 감자에 감염되며 국내 관리급 검역바이러스로 지정되어 있다. 본 연구에서는 검역현장에서 APLV를 신속·정확하게 진단할 수 있는 2개의 RT-PCR 프라이머 조합[조합 2 (404 bp)와 23 (501 bp)]과 각각의 nested PCR 조합(404 → 259 bp 및 501 → 349 bp)을 선발하였다. 또한, 진단에 양성대조군으로 활용할 수 있는 유전자변형 양성대조구를 개발하여 실험실 오염에 대한 검증이 가능하도록 하였다. 본 연구에서 개발한 PCR 기반 진단 시스템은 향후 검역 현장에서 APLV를 검출하여 우리나라 식물검역에 기여할 것이라고 기대된다.

## 감사의 글

본 원고 수정에 도움을 주신 편집위원장과 심사위원님들께 감사드립니다.

## 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. *Research in Plant Disease* 19:67-75.
- Bernal JJ, Jiménez I, Moreno M, Hord M, Rivera C, Koenig R, Rodríguez-Cerezo E. 2000. Chayote mosaic virus, a new Tymovirus infecting Cucurbitaceae. *Phytopathology* 90: 1198-1104.
- Fribourg CE, Jones RAC, Koenig R. 1977. Host plant reactions, physical properties and serology of three isolates of Andean potato latent virus from Peru. *Annals of Applied Biology* 86:373-380.
- Gibbs AJ, Harrison BD. 1969. Eggplant mosaic virus, and its relationship to Andean potato latent virus. *Annals of Applied Biology* 64:225-231.
- Gibbs AJ, Hecht-Poinar E, McKee RK. 1966 Some properties of three related viruses: Andean potato latent, *Dulcamara mottle* and *Ononis yellow mosaic*. *Journal of General Microbiology* 44:177-193.
- Jones RAC, Fribourg CE. 1977. Beetle, contact and potato true seed transmission of Andean potato latent virus. *Annals of Applied Biology* 86:123-128.
- Koenig R, Bode O. 1978. Sensitive detection of Andean potato latent and Andean potato mottle viruses in potato tubers with the serological latex test. *Phytopathologische Zeitschrift*, 92:275-280.
- Koenig R, Lesemann DE. 1981. Tymoviruses. Pages 33-60 in: *Handbook of Plant Virus Infections*. E. Kurstak, ed. Elsevier Science Publishing Co., Holland.
- 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. 2014a. Development of nucleotide primers for diagnostic RT-PCR and nested PCR detection of three seed-transmitted viruses (CRLV, SpLV and WCIMV) in quarantine. *Journal of Agriculture & Life Science* 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 Journal of Microbiology* 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. *Research in Plant Disease* 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*. *Research in Plant Disease* 19:220-225.
- Lee S, Kim CS, Lee J, Min BD, Kim YS, Kim TW, Kim J, Shin YG, Rho JY. 2014b. Development of nucleotide primers for diagnostic RT-PCR and nested PCR detection of *Pelargonium zonate spot virus* in quarantine. *Journal of Agriculture & Life Science* 48:65-74.
- Lee S, Lee JY, Shin YG, Lee SH, Ahn TY. 2015. Development and verification of nested PCR assay for detection of *Tobacco rattle virus* in plant quarantine. *Journal of Bacteriology and Virology* 54-61.
- Lee S, Shin YG. 2014. Development and practical use of RT-PCR for seed-transmitted *Prune dwarf virus* in quarantine. *Plant Pathology Journal* 30:178-182.
- Nelson M, McClelland M. 1992. Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes. *Methods in Enzymology* 216:279-303.
- Shin YG. 2009. An advanced quarantine system for the inspection of seed-borne viruses in Korea. Ph.D. Thesis, Kyungpook National University, Daegu, Gyeongsangbuk-do, Korea.
- Shin YG, Rho JY. 2014. Development of a PCR diagnostic system for *Iris yellow spot tospovirus* in quarantine. *Plant Pathology Journal* 30:440-444.