

## *Cowpea mild mottle virus* 특이유전자 검출을 위한 검역진단시스템 개발

이시원<sup>1†</sup>, 이진영<sup>2</sup>, 문보영<sup>3</sup>, 김창수<sup>1</sup>, 신용길<sup>4†</sup>, 노재영<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>국립환경과학원 상하수도연구과

<sup>2</sup>단국대학교 자연과학대학 미생물학과

<sup>3</sup>농림축산검역본부 호남지역본부 시험분석과

<sup>4</sup>농림축산검역본부 인천공항지역본부 시험분석과

Received: July 20, 2015 / Revised: August 20, 2015 / Accepted: August 29, 2015

### Development of a Diagnostic System for the Detection of the *Cowpea mild mottle virus* Specific Gene in Quarantine

Siwon Lee<sup>1†</sup>, Jin-Young Lee<sup>2</sup>, Bo Yeong Moon<sup>3</sup>, Chang Soo Kim<sup>1</sup>, Yong-Gil Shin<sup>4†</sup>, and Jae-Young Rho<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Water Supply & Sewerage Research Division, National Institute of Environmental Research, Incheon 440-170, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Dankook University, Cheonan 330-714, Republic of Korea

<sup>3</sup>Experiment & Analysis Division, Honam Regional Office, Animal and Plant Quarantine Agency, Gunsan 573-370, Republic of Korea

<sup>4</sup>Experiment & Analysis Division, Incheon International Airport Regional Office, Animal and Plant Quarantine Agency, Incheon 400-044, Republic of Korea

*Cowpea mild mottle virus* (CPMMV) has a wide range of hosts, such as the pea family and tomato. CPMMV is a non-reported virus in Korea, and is domestically designated as a controlled virus associated with plant quarantine. In this study, a rapid diagnostic method for the detection of CPMMV at quarantine sites was developed. For the development of a user-based system, the PCR compositions and conditions use existing methods of quarantine for the viruses. Two sets of RT-PCR and nested PCR were developed in this study that could be amplified from 579 → 298 bp and 638 → 252 bp, respectively. Furthermore, a sequence inserted positive control plasmid was developed, which is able to identify false-positives resulting from laboratory contamination. The findings of this study are important for the diagnosis of CPMMV in imported crops held in plant quarantine.

**Keywords:** *Cowpea mild mottle virus*, CPMMV, quarantine

*Cowpea mild mottle virus* (CPMMV)는 약 650 nm×13 nm의 크기의 [2] 넓은 숙주 범위를 가지는 식물병원성 바이러스로, 담배가루이, 기체 및 종자 등으로 전염된다 [5]. CPMMV에 감염 시 백화(얼룩, 고리 및 반점), 괴사 병반(부분 또는 잎맥), 반점 및 기형 등이 작물과 계절에 따라 다양한 형태로 나타날 수 있어 [3, 13], 이에 따라 수확량의 손실로 농가에 피해를 입힐 수 있다. 또한 관련 작물의 수출에 영

향을 미치는 등 국가적 피해를 야기할 수 있다. 유럽 지중해 식물 보호단체에 따르면, CPMMV는 브라질, 이집트, 피지, 가나, 인도, 인도네시아, 이스라엘, 케냐, 말레이시아, 나이지리아, 솔로몬제도, 탄자니아, 타이 및 예멘에서 보고된 사례가 있었으나 아직 국내에서 보고된 사례는 없었다.

한편, CPMMV는 병해충 위험도 평가를 통해, 국내 관리급 바이러스로 지정되어 있다 [1]. 검역현장에서는 CPMMV 등 식물바이러스 검역을 위해 오랜기간 동안 효소면역측정법을 진단방법으로 사용하였으나 [14, 15], 낮은 검출감도와 거짓양성 반응 등의 문제점 [4]이 제기되어 역전사(reverse transcription; RT) 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)이 제안되었다. 그러나 여러 연구자들에 의해

#### \*Corresponding author

Tel: +82-41-550-3475, Fax: +82-41-558-3861

E-mail: jyrho@dankook.ac.kr

†These authors are equally contributed to this work.

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

개발된 PCR 검사법들은 바이러스 별로 조성과 조건이 상이했으며, 양성대조구 시료는 모두 국내 미보고 검역 바이러스로 시료확보가 어려울 뿐 아니라 보관의 위험성이 함께 고려되어 많은 시료에서 다양한 병원체를 진단해야 하는 검역 현장에서 적용되기에는 한계가 있었다[6]. 이러한 검역 현장에서 요구되는 문제점을 보완하여, 최근 조성과 조건을 통일시킨 RT-PCR, nested PCR 및 유전자삽입-양성대조구 플라스미드가 개발되었다[6-12]. 바이러스 특이유전자 진단시스템은 2007년부터 검역 현장에서 표준 검사 방법으로 적용되면서 기존에 검출하지 못했던 병원체를 검출하는 등 검역 실적을 향상시켰다[12]. 현재까지 약 20여종의 검역 바이러스에 대한 특이유전자 진단시스템이 보고되고 있으나, CPMMV를 검사할 수 있는 진단시스템은 아직 보고되지 않았다.

따라서, 본 연구에서는 CPMMV의 특이 유전자를 검출할 수 있는 RT-PCR과 nested PCR 프라이머를 개발하였으며, 또한 실험실 오염을 검증할 수 있는 유전자삽입-양성대조구 플라스미드를 개발하여 CPMMV 검역 진단 시스템을 구축하였다.

CPMMV, 유연관계 참고바이러스주 3종[*Carlavirus*; *Garlic common latent virus* (GCLV), *Potato S virus* (PVS), *Shallot latent virus* (SLV)] 및 공통숙주 참고바이러스주 13종[*Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), *Beet mosaic virus* (BtMV), *Coupea chlorotic mottle virus* (CCMV), *Coupea severe mosaic virus* (CPSMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Ribgrass mosaic virus* (RMV), *Soybean mosaic virus* (SMV), *Tobacco rattle virus* (TRV) 및 *Tomato bushy stunt virus* (TBSV)]의 이병시료, RNA 또는 cDNA를 구매(Adgen, England; Bione, Korea) 및 유관기관의 협조를 받아 수집하였다.

CPMMV 특이적 프라이머 설계를 위하여, National Center for Biotechnology Information로부터 CPMMV와 참고바이러스주들에 대한 염기서열을 수집하였으며, DNAMAN software package version 6.0 (Lynnon Biosoft, Canada)을 사용하여 중 특이적 부위를 탐색하였다[8]. CPMMV 특이적 프라이머는 총 6개의 프라이머(정방향 및 역방향 각 3개)가 설계되었으며(Supplementary Table S1), 프라이머들을 조합하여 250-700 bp의 PCR 증폭이 가능한 9개의 조합을 구성하였다(Supplementary Table S2).

핵산추출, RT-PCR, nested PCR 및 전기영동은 모두 이전에 보고된 방법과 동일한 조성과 조건으로 수행하였다[6-12]. 중 특이적 RT-PCR 및 nested PCR 프라이머 선발은 최초 9개 조합을 대상으로 CPMMV 핵산에 특이적 반응을 검정하였다. 이후 특이적 반응이 검정된 RT-PCR 프라이머 조

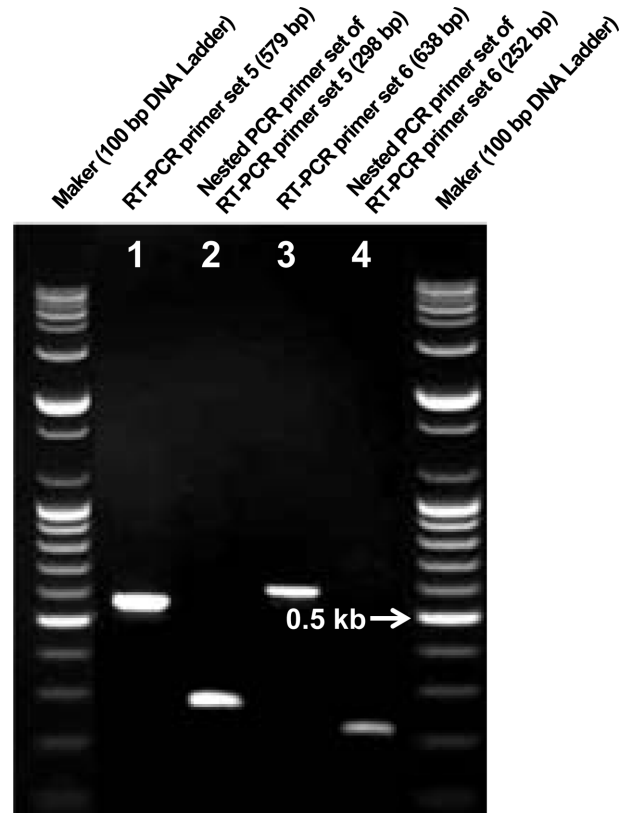


Fig. 1. RT-PCR and nested PCR for the detection of CPMMV.

합을 대상으로 참고바이러스주(유연관계 및 공통숙주 바이러스)의 핵산에 비특이적 반응을 분석하여 RT-PCR 프라이머 조합을 선발하였다. 또한 각각의 nested PCR 프라이머를 설계하였으며, 각각의 RT-PCR 증폭산물을 주형으로 특이적 반응을 분석하였다.

총 9개의 RT-PCR 프라이머 조합을 대상으로 CPMMV의 특이적 반응을 검정한 결과 4개 조합(조합 5, 6, 8 및 9)에서 특이적 밴드가 형성되었다(Supplementary Fig. S1). CPMMV 특이 밴드가 분석된 4개의 RT-PCR 프라이머 조합을 대상으로 참고바이러스주들에 대한 비특이적 반응을 분석한 결과 조합 8과 9에서 많은 비특이적 밴드가 형성된 반면 조합 5와 6은 비특이적 밴드가 분석되지 않았다(data not shown). 선발한 RT-PCR 조합 5와 6에 대하여 검출감도를 분석하기 위해 CPMMV가 포함된 total RNA를  $10^{-7}$ 까지 10배 단계 희석 하였다. 검출감도 분석결과 RT-PCR 조합 5와 6은  $10^{-2}$ - $10^{-3}$ 까지 특정 밴드가 형성되어(Supplementary Fig. S2) CPMMV 진단에 적합한 RT-PCR 프라이머 조합으로 분석되었다. 또한 RT-PCR 프라이머 조합 5와 6의 nested PCR 프라이머를 설계하였으며(Supplementary Table S3), RT-PCR 증폭산물을 100배 희석하여 nested PCR을 수행한 결과 조

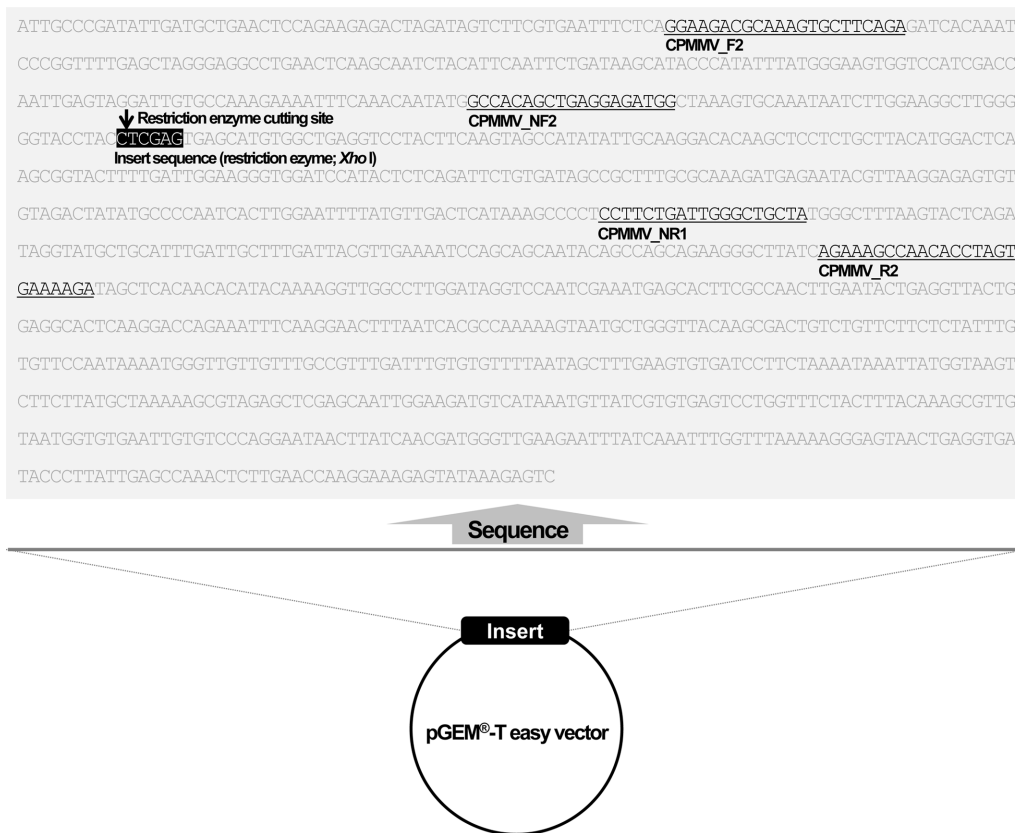


Fig. 2. Information of inserted positive control plasmid for using by CPMMV detection.

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

Set	Primer		Sequence	Length (bp)
	PCR type	Name		
5	RT	CPMMV_F2	GGAARACSCAAAGTGCYTCAGA	579
		CPMMV_R2	TCTTTTCRCTWGGWGTWGGCTTTCT	
	Nested	CPMMV_NF2	GCYACRGCYGARGAGATGG	298
		CPMMV_NR1	TWGCWGCCCAATCRGAAGG	
6	RT	CPMMV_F1	ATTGCCGATATTGATGCTGAA	638
		CPMMV_R2	TCTTTTCRCTWGGWGTWGGCTTTCT	
	Nested	CPMMV_NF1	TGGGKGTWCKKWCTGARCATG	252
		CPMMV_NR1	TWGCWGCCCAATCRGAAGG	

합 5 (579 → 298 bp)와 조합 6 (638 → 252 bp)에서 특이적 밴드가 증폭되었다(Fig. 2). 따라서 CPMMV 특이 유전자를 증폭할 수 있는 최종 선발된 RT-PCR 및 nested PCR 프라이머에 대한 정보는 Table 1과 같다.

본 연구에서는 CPMMV의 PCR 기반 진단시스템에 활용할 유전자삽입-양성대조구 플라스미드를 개발하였다. RT-PCR 프라이머 조합 5와 6의 증폭 영역을 포함하는 프라이

머 조합으로 1,135 bp PCR 산물을 증폭하였다(data not shown). 이것을 삽입 DNA로 pGEM®-T easy vector (Promega, USA)에 cloning 하였으며, RT-PCR 조합 5의 nested PCR 증폭영역 안쪽에 제한효소 *Xho* I이 반응할 수 있는 염기서열(CTCGAG)을 EZchange™ site-directed mutagenesis kit (Enzymomics, Korea)를 이용하여 삽입하였다[6]. RT-PCR 조합 5 특이 프라이머를 이용하여 증폭한 후 제한효소

*Xho* I 처리결과 361과 224 bp의 두 밴드가 분석되었으며 (Supplementary Fig. S3), 염기서열 분석을 통해 확인한 결과 6개의 염기서열 삽입이 분석되었다(Fig. 2). 본 연구에서 개발한 유전자변형-양성대조구로부터 오염이 발생하여 거짓 양성반응이 일어날 경우 제한효소 처리 또는 염기서열 분석으로 검증이 가능할 것이다.

한편, 국내 병해충 위험도평가를 통해 검역대상으로 지정된 바이러스는 총 100종이며[1], 금지급, 관리급 및 규제비 검역 등으로 구분된다. CPMMV는 관리급 바이러스로, 농림축산검역본부 예규에 따르면 동부, 땅콩, 강낭콩, 날개콩, 대두, 리마콩, 작두콩, 잠두 및 토마토 등의 작물들에 대해 검사를 수행해야 한다. CPMMV 관련 작물을 포함하여 검역현장에서는 많은 수입작물들에 대해 검사를 수행해야한다. 이러한 대량 및 많은 건수의 수입 시료들에서 잠재적 위해성이 높은 바이러스에 대한 검사방법은 정밀, 편의, 신속 및 특이성을 가져야하며, 무엇보다 동일한 검사방법의 사용으로 표준화 되는 것이 중요하다. 또한 검사결과에 대한 검역처분으로 국가적 관계 등에도 영향을 미칠 수 있어 과학적이고 객관적인 결과가 검증되어야 한다[7].

따라서 본 연구에서 개발한 진단시스템은 향후 검역현장에서 관련된 수입 작물로부터 CPMMV 검역에 기여할 것이라고 기대된다.

## 요 약

*Cowpea mild mottle virus* (CPMMV)는 국내 미보고 바이러스로, 넓은 숙주범위를 가지며, 국내 관리급 검역바이러스로 지정되어 있다. 본 연구에서는 검역현장에서 신속하게 CPMMV를 진단할 수 있는 방법을 개발하였다. 이번 연구는 사용자를 위한 검사방법 개발을 위하여, 기존의 검역현장에서 활용하는 PCR 조성과 조건을 활용하였다. 본 연구에서는 CPMMV를 특이적으로 진단할 수 있는 2개의 RT-PCR 프라이머를 개발하였으며 각각 579와 638 bp를 증폭할 수 있다. 최종적으로 증폭되는 nested PCR 산물의 크기는 (579 → 298 bp)과 (638 → 252 bp)로 CPMMV의 특이 유전자를 진단할 수 있다. 또한, 제한효소 *Xho* I이 반응할 수 있는 염기서열을 삽입하여 양성대조구 플라스미드를 개발하였다. 이것은 실험실 오염으로부터 거짓양성을 검증할 수 있게 하였다. 본 연구는 CPMMV와 관련된 수입 작물로부터 검역진단에 기여할 것이라고 사료된다.

## Acknowledgments

The present research was conducted by the Research Fund of Animal and Plant Quarantine Agency in 2006–2008 and by a grant from the Animal and Plant Quarantine Agency (QIA), Ministry of

Agriculture, Republic of Korea.

## References

1. 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.
2. Brunt AA, Kenten RH. 1973. Cowpea mild mottle, a newly recognized virus infecting cowpea (*Vigna unguiculata*) in Ghana. *Ann. Appl. Biol.* **74**: 67–74.
3. Brunt AA, Phillips S. 1981. "Fuzzy vein", a disease of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in western Nigeria induced by *Cowpea mild mottle virus*. *Tropical Agriculture* **58**: 177–180.
4. 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.
5. Jeyanandarajah P, Brunt AA. 1993. The natural occurrence, transmission, properties and possible affinities of *Cowpea mild mottle virus*. *J. Phytopathol.* **137**: 148–156.
6. 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.
7. Lee S, Kang EH, Chu YM, Shin YG, Ahn TY. 2013. Development of PCR diagnosis system for plant quarantine seed-borne *Wheat streak mosaic virus*. *Korean J. Microbiol.* **49**: 112–117.
8. Lee S, Kang EH, Heo NY, Kim SM, Kim YJ, Shin YG. 2013. Detection of *Carnation necrotic fleck virus* and *Carnation ring-spot virus* using RT-PCR. *Res. Plant Dis.* **19**: 36–44.
9. Lee S, Kang EH, Shin YG, Lee SH. 2013. Development of RT-PCR and nested PCR for detection of four quarantine plant viruses belonging to *Nepovirus*. *Res. Plant Dis.* **19**: 220–225.
10. 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. *J. Bacteriol. Virol.* **45**: 54–61.
11. Lee S, Rho JY. 2015. Development of a PCR diagnostic system for detecting *Andean potato mottle virus* associated with potato quarantine in Korea. *Am. J. Potato Res.* In press.
12. 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.
13. Mink GI, Keswani CL. 1987. First report of *Cowpea mild mottle virus* on bean and mung bean in Tanzania. *Plant Dis.* **71**: 557.
14. 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.
15. Stein A, Loebensten 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.