

Peach rosette mosaic virus 검출을 위한 신속한 등온증폭법 개발

이시원¹, 이진영², 김진호³, 노재영^{2*}

¹국립환경과학원 환경기반연구

²단국대학교 자연과학대학 미생물학과

³단국대학교 자연과학대학 화학과

Received: September 12, 2016 / Accepted: November 1, 2016

Development of a Rapid Assay for Peach Rosette Mosaic Virus Using Loop-mediated Isothermal Amplification

Siwon Lee¹, Jin-Young Lee², Jin-Ho Kim³, and Jae-Young Rho^{2*}

¹Environmental Infrastructure Research Department, National Institute of Environmental Research, Incheon 22689, Republic of Korea

²Department of Microbiology, College of Natural Sciences, ³Department of Chemistry, College of Natural Science, Dankook University, Cheonan 31116, Republic of Korea

Peach rosette mosaic virus (PRMV) is a plant virus that was first reported in 1933 by Peach. It can infect hosts including peach, grape, blueberry, dandelion, plum, cherry tree, and weeds. PRMV is non-reportable in Korea, but it is designated as a controlled virus requiring plant quarantine. In this study, for the rapid and specific detection of PRMV, we developed an assay using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Comparison between conventional polymerase chain reaction (PCR) methods (real time-PCR and nested PCR) and LAMP for the detection of PRMV revealed an equivalent level of sensitivity by all the tested methods. For the LAMP assay, outer primer sets were used to amplify a 264-bp PCR product, which was then digested using the restriction enzyme Pvu II (CAG/CTG), and the visualization of two digestion fragments (207 + 57 bp) indicated a positive reaction. The developed LAMP assay for PRMV is expected to enable the rapid monitoring of PRMV in plants.

Keywords: LAMP, Loop-mediated isothermal amplification, *Peach rosette mosaic virus*, PRMV, rapid detection

Peach rosette mosaic virus (PRMV)는 group IV positive-sense ssRNA viruses, *Nepovirus*로 분류되며[9], 1933년 복숭아에서 최초로 발생이 보고되었다[4]. 이 후 Crop Protection Compendium과 Energy Policy and Planning Office의 Quarantine Pests Data Sheets에 의하면, 포도(*Vitis labrusca*, *V. vinifera* 및 프랑스-미국의 hybrids *Vitis* spp.), 복숭아(*Prunus persica*), 북부 하이부시 블루베리(*Vaccinium corymbosum*), 복사나무, 자두나무, 블루베리, 민들레 뿐만 아니라 몇몇의 잡초(*Rumex crispus*, *Solanum carolinense* and *Taraxacum officinale*)에서도 발생이 보고되고 있다[3, 7]. PRMV가 감염된 식물은 마름병, 노쇠 및 rosetting이 나타나고, 감염된 과실 및 꼬투리에서는 기형과 변색이 발생하

며, 잎과 줄기에서는 기형 등 비정상적 성장이 나타난다[9]. 이러한 증상으로 복숭아의 경우 수확량이 60% 이상 감소한 사례가 있었으며, 민감한 포도 중 몇몇 품종은 PRMV에 쉽게 감염되어 피해 보고 사례가 있었다[13]. 또한 PRMV는 검역병으로도 지정되면서 포도나무(*Vitis vinifera*), 포도나무속(*Vitis* spp.), 벚나무속(*Prunus* spp.), 양벚(*P. avium*, *P. serotina*), 블루베리속(*Vaccinium* spp.) 및 서양민들레(*Taraxacum officinale*) 등의 수입 작물들에서도 검사되고 있다[12]. 한편, 현재 PRMV를 검사하는 표준 분석 방법으로는 reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR)과 nested PCR이 활용되고 있다[10]. 그러나, RT-PCR과 nested PCR 방법은 핵산추출 이후 양성의 정성적 판정에만 약 10시간 이상이 소요되는 단점이 있어 현장활용이 불편하였다[11]. 따라서, 이번 연구에서는 단일 조건으로 진단할 수 있는 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)를 적용하여 관련된 식물에서 PRMV를 신속하게 검출할 수

*Corresponding author

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

E-mail: jyrho@dankook.ac.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

있는 검사법을 개발하였다.

PRMV를 검출할 수 있는 특이적 LAMP primers를 제작하기 위하여 현재 활용되고 있는 RT-PCR 및 nested PCR에서 target 하는 RNA1 polyprotein gene (AF016626)을 사용하였다. 또한, 핵산 또는 기주와 관련된 참고바이러스 [*American plum line pattern virus* (NC_001409), *Apple mosaic virus* (NC_003464, NC_003465, NC_003480), *Arabidopsis mosaic virus* (NC_006057, NC_006056), *Cherry leaf roll virus* (CLR; NC_015414, NC_015415), *Grapevine Bulgarian latent virus* (NC_015492, NC_015493), *Grapevine chrome mosaic virus* (NC_003622, NC_003621), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV; NC_003615, NC_003623), *Plum pox virus* (NC_001445), *Prunus necrotic ringspot virus* (NC_004362, NC_004363, NC_004364), *Prune dwarf virus* (PDV; NC_008039, NC_008037, NC_008038), *Raspberry ringspot virus* (RpRSV; NC_005266, NC_005267), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV; NC_006964, NC_006965), *Tobacco ringspot virus* (TRSV; NC_003840, NC_003839, NC_005097, NC_005096) 및 *Tomato black ring virus* (TBRV; NC_004439, NC_004440)]의 염기서열을 National Center for Biotechnology Information (NCBI)로부터 수집하였다. 수집한 염기서열들을 기초로 LAMP primer designing software인 PrimerExplorer를 사용하여 PRMV의 특이적 프라이머를 제작하였다(Table 1).

PRMV 및 핵산 또는 기주와 관계된 참고바이러스 9종 [CLR, GFLV, PDV, RpRSV, SLRSV, TBRV, ToRSV, TRSV 및 *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)]의 RNA 또는 cDNA를 유관기관, 식물바이러스은행 및 구매를 통해 확보하였으며, ReverTra Ace- α -[®] (Toyobo, Japan)로 cDNA 합성을 수행하였다.

LAMP 증폭을 위한 조성은 주형 cDNA 1.5 μ l, LAMP primer [F3과 B3 (10 pmole) 각각 0.6 μ l, FIP와 BIP (10 pmole) 각각 1.4 μ l], Bst-polymerase (8 unit/ μ l) 1.5 μ l, dNTP (10 mM) 2 μ l 및 10X buffer 2 μ l로 총 11 μ l로 반응하였다. LAMP 증폭 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 10분, 4 $^{\circ}$ C 1분 이후, 62 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응하였다.

LAMP primer의 특이적 검정 결과, PRMV에 특이적 밴드인 laddering이 나타났으며 참고바이러스 9종에서는 특이적 반응이 나타나지 않아, PRMV만을 특이적으로 증폭할 수 있는 LAMP primer 조합으로 추론되었다(Fig. 1). 또한 현재 활용되고 있는 RT-PCR 및 nested PCR 검사법과 비교하기 위하여, PRMV cDNA를 10⁻⁹까지 단계 희석하였다. 희석한 cDNA를 주형으로 현재 PRMV를 진단하는 방법인 RT-PCR과 nested PCR [11]을 사용하여 조성과 조건을 동일하게 수행하였다. 그 결과 RT-PCR에서는 원액에서만 밴드가 형성되었으며(Data not shown), nested PCR 분석 결과 10⁻²에서 흐리게 밴드를 형성하였다(Fig. 1). 이번 연구에서 개발한 LAMP 분석법 역시 10⁻²까지 밴드를 형성하여 기존의 nested PCR와 동일한 검출 감도가 나타났다(Fig. 1). 그러나, LAMP 분석법은 RNA 추출 이후 약 10시간 이상[RT-PCR (4H), 전기영동(1.5H), nested PCR (3H) 및 전기영동(1.5H)] 소요되던 시간을 약 3시간[cDNA 합성(\geq 30 min) 및 LAMP (70 min) 및 전기영동(1.5H)]으로 단축시킬 수 있으며, SYBR 또는 hydroxynaphthol blue를 사용[2, 6, 8, 14]하면 약 1시간 40분까지로 단축시킬 수 있다. LAMP 프라이머는 6개의 부위를 특이적으로 어닐링 하므로 기존의 conventional PCR 보다 더욱 특이적으로 해당 병원체만을 검출할 수 있다[1, 5].

최종적으로 PRMV에 대한 반응을 검증하기 위하여, 최초 LAMP 증폭 산물의 염기서열 안쪽에 포함되어 있는 제한효소 *Pvu* II (CAG/CTG) 부위를 확인하였다. PRMV 주형

Table 1. Information of specific primers for the detection of Peach rosette mosaic virus using the LAMP and conventional PCR amplification.

Amplification type	Primer	Sequences (5' → 3')	Length (bp)	Product size (bp)	Remark		
LAMP	F3	GGCAAATTCATGAGTTG	19	Laddering ^a	This study		
	B3	GCATTGTCCGAATCATTGAG	21				
	FIP	CACTAAAGCCCAAATGGCATAAAG-CTTGTGGAGTAAGGCTCAC	43				
	BIP	AGGCTCCCATGGTATTATTCTCT-CAACGGTAAAGATAGTGAATCC	45				
Conventional PCR	RT-PCR	PRMVN10	CCAAACAACCTTCACAGGG	18	967	Lee et al., 2016 [10]	
		PRMVC70	TACGAGGATGTCAGGTAGCG	20			
	Nested PCR	PRMVN20	TCTGTGGGATTTGGGAGT	18			419
		PRMVC80	TAAACGCACACCTCCGTAT	19			

^aAmplification size of outer primers is 264 bp.

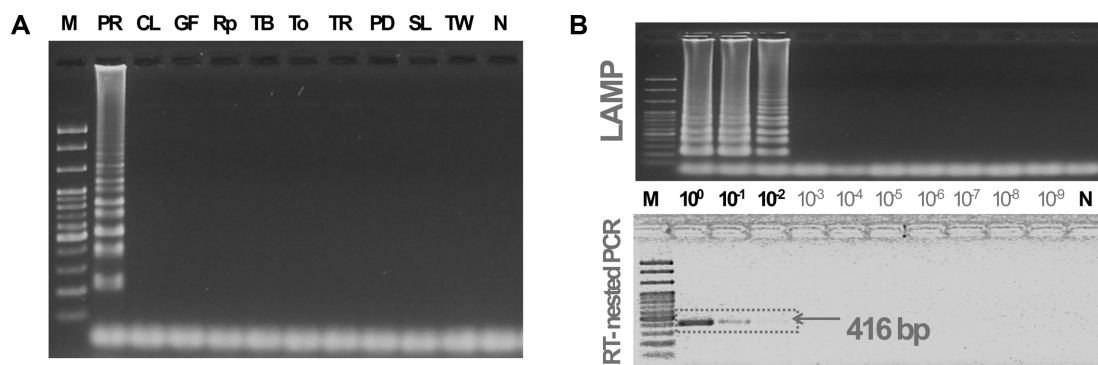


Fig. 1. Specificity and sensitivity tests of Loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Peach rosette mosaic virus*. Panel (A), Specific and non-specific test of LAMP primer set using the cDNA of *Peach rosette mosaic virus* and related reference viruses. Lane M, 100 bp step DNA Ladder marker (Genepia, Korea); PR, *Peach rosette mosaic virus*; CL, *Cherry leaf roll virus*; GF, *Grapevine chrome mosaic virus*; Rp, *Raspberry ringspot virus*; TB, *Tomato black ring virus*; To, *Tomato ringspot virus*; TR, *Tobacco ringspot virus*; PD, *Prune dwarf virus*; SL, *Strawberry latent ringspot virus*; TS, *Tomato spotted wilt virus*; N, negative control. Panel (B), comparison of sensitivity between LAMP and RT-nested PCR assay. Lane M, 100 bp step DNA Ladder marker (Genepia); lane number, dilution value of PRMV cDNA; N, negative control.

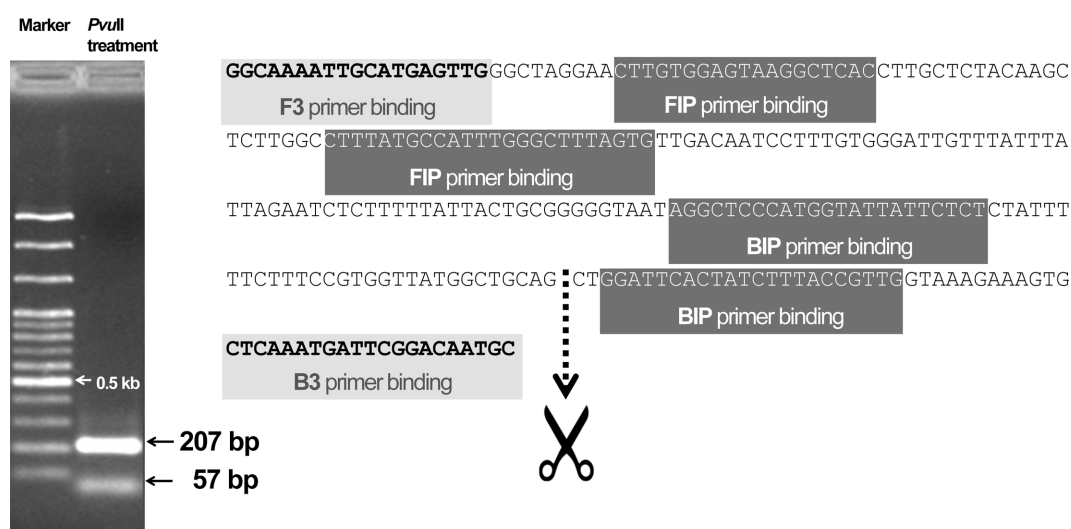


Fig. 2. *PvuII* digested DNA fragments of LAMP amplified product from *Peach rosette mosaic virus* cDNA.

cDNA 1 μ l, LAMP outer primers [F3 및 B3 (10 pmole)] 각각 1 μ l, HS Taq-polymerase (2.5 unit/ μ l, GeneAll, Korea) 0.1 μ l, dNTP (10 mM) 2 μ l, 10X buffer 2.5 μ l 및 멸균증류수 17.4 μ l로 총 25 μ l를 사용하였으며, 95 $^{\circ}$ C 10분, 35회 반복(95 $^{\circ}$ C 45초, 55 $^{\circ}$ C 1분 및 72 $^{\circ}$ C 1분) 후 72 $^{\circ}$ C 5분간 PCR 반응하여 264 bp의 밴드를 확인하였다(Data not shown). 증폭산물 10 μ l 및 *Pvu* II 10 unit을 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응하여 전기영동 한 결과, 두 단편(207 + 57 bp)으로 잘라졌으며(Fig. 2), 이 방법을 통하여 올바른 LAMP 증폭을 검증할 수 있었다.

이번 연구에서 개발한 검사법은 관련 식물에서 적용되어

사후관리를 위해 충분한 검토한 후, 관련 기관 등에서 PRMV를 신속하게 모니터링 하는데 활용될 수 있을 것이라고 기대된다.

요 약

Peach rosette mosaic virus (PRMV)는 1933년 복숭아에서 처음 보고되었으며, 복숭아, 자두, 블루베리, 민들레, 벚나무 등에 감염되는 식물바이러스이다. PRMV는 한국에서 보고된 적이 없으나, 식물검역에서 관리병(control viruses)으로 지정되어 있다. 이번 연구에서는 PRMV를 더욱 신속하

고 특이적으로 진단하기 위하여 Loop-mediated isothermal amplification 분석법을 적용한 진단법을 개발하였다. LAMP 방법은 기존의 PCR 방법(RT-PCR 및 nested PCR)과 같은 검출 강도를 가지고 있다. 또한 LAMP 반응을 확인하기 위해 PRMV cDNA을 outer primer sets (Product size 264 bp)로 PCR 한 뒤, Pvu II (CAG/CTG) 제한효소를 처리하였다. 제한효소 처리 결과 2개의 digestion fragments (207 + 57 bp)가 확인되었다. PRMV의 LAMP 진단 방법은 관련 식물로부터 더욱 신속한 모니터링이 가능할 것으로 기대된다.

References

- Ahn YC, Nam YH, Park SN, Cho MH, Seo JW, Yoon IK, et al. 2008. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Korean Chem. Soc.* **52**: 273-280.
- Anthony Johnson AM, Dasgupta I, Sai Gopal DV. 2014. Development of loop-mediated isothermal amplification and SYBR green real-time PCR methods for the detection of *Citrus yellow mosaic badnavirus* in citrus species. *J. Virol. Methods* **203**: 9-14.
- CABI. 2016. *Peach rosette mosaic virus*. In: Crop Protection Compendium. Wallingford, UK: CAB International. <http://www.cabi.org/cpc>. Accessed June 12, 2011.
- Cation D. 1933. An infectious rosette on peach trees. *Mich. Agric. Exp. Stn. Q. Bull.* **16**: 79-84.
- Cho MH, Jang WC, Choi JG. 2013. Detection for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in using bio-chip based loop mediated isothermal amplification assay. *J. Korean Chem. Soc.* **57**: 81-87.
- Das A, Babiuk S, McIntosh MT. 2012. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of capripoxviruses. *J. Clin. Microbiol.* **50**: 1613-1620.
- EPPO. 2016. *Peach rosette mosaic nepovirus*, Data Sheets on Quarantine Pests. EPPO, Paris.
- Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K. 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques* **46**: 167-172.
- Lee S. 2013. A study of molecular biological detection methods for seed-transmitted viruses in quarantine. Dankook University.
- Lee S, Kim CS, Shin YG, Kim JH, Kim YS, Jheong WH. 2016. Development of nested PCR-based specific markers for detection of *Peach rosette mosaic virus* in plant quarantine. *Indian J. Microbiol.* **56**: 108-111.
- Lee S, Kim JH, Choi JY, Jang WC. 2015. Loop-mediated isothermal amplification assay to rapidly detect *Wheat streak mosaic virus* in quarantined plants. *Plant Pathol. J.* **31**: 438-440.
- Ramsdell DC, Gillett JM, Bird GW. 1995. Susceptibility of american grapevine scion cultivars and french hybrid rootstock and scion cultivars to infection by *peach rosette mosaic nepovirus*. *Plant Dis.* **79**: 154-157.
- Shin YG. 2009. An advanced quarantine system for the inspection of seed-borne viruses in Korea. Kyungpook National University, Kyungpook, Korea.
- Tao ZY, Zhou HY, Xia H, Xu S, Zhu HW, Culleton RL, et al. 2011. Adaptation of a visualized loop-mediated isothermal amplification technique for field detection of *Plasmodium vivax* infection. *Parasit. Vectors.* **4**: 115.