

최 중
완결 보고서

팽이버섯 바이러스 진단시약 및
무바이러스 종균개발

Production of *Flammulina velutipes* virus
diagnosis kit and virus-free spawn

경상대학교 생명과학연구원

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “팽이버섯 바이러스 진단시약 및 무 바이러스 종균개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 5 월 20 일

주관연구기관명 : 경상대학교

총괄연구책임자 : 이 현숙

세부연구책임자 : 이 창원

연 구 원 : 유 지윤

연 구 원 : 이 경희

연 구 원 : ○ ○ ○

협동연구기관명 : 경상남도

농업기술원

협동연구책임자 : 류 재산

협동연구기관명 : ○ ○ ○

협동연구책임자 : ○ ○ ○

요 약 문

I. 제 목

팽이버섯 바이러스 진단시약 및 무 바이러스 종균개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

가) 연구개발의 필요성

- 최근 팽이버섯 농가에서 원인 불명의 기형버섯이 자주 발생함. 이들 기형버섯에서 바이러스가 검출됨. 팽이버섯을 수출할 때 문제가 됨.
- 버섯 바이러스를 퇴치하기 위한 유일한 방법은 바이러스 무병주로 종균을 만들어 사용하는 것임.
- 이에 팽이 바이러스 진단법을 개발하여 무바이러스 균주를 선발 할 수 있어야 함.
- 또한 바이러스 이병품종에서 바이러스퇴치방법을 개발하여 무바이러스 균주를 개발 할 수 있어야 함.

나) 연구개발의 목적

- 팽이 바이러스 진단시약 (PCR 검정용 특이 primer개발, 바이러스에 대한 단클론 과 복클론 항체를 이용한 TAS-ELISA 및 단클론 항체를 이용한 간편 키트) 을 개발하여 쉽게 바이러스를 진단할 수 있게 함.
- 바이러스 무병주 팽이버섯 균주를 선발, 보급하여 팽이버섯농가의 수익 증대.
- 팽이버섯 바이러스 이병주에서 바이러스를 퇴치하여 무바이러스 종균을 생산하여 팽이농가에 보급함

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2004~2005)	<ul style="list-style-type: none"> -팬이버섯 농가의 바이러스병 발생 실태조사(전국) -바이러스 순수분리 -바이러스 유전체, coat protein 순수분리 -바이러스 무병주 개발 -바이러스 항체 Monoclonal 및 Polyclonal antibody 합성 	<ul style="list-style-type: none"> -전국적인 팬이 농가 대상 -병징별버섯수집 -감염세포대량증식 -전자현미경 검경 -바이러스 유전체(ssRNA순수분리) -coat protein분리 -cDNA 합성 -바이러스 유전체 sequencing -cAMP 및 Ribavirin 등 RDRP 억제제 처리 -Balb/c Mouse에 immunization -토끼에 virus immunization
2차 년도 (2005~2006)	<ul style="list-style-type: none"> -단클론 항체를 이용한 간편 키트 개발 -바이러스 유전자 sequencing -바이러스 무병주 개발 -바이러스 무병주 실증 실험 	<ul style="list-style-type: none"> -전년도에 합성한 단클론 및 복클론 이용한 팬이바이러스 진단 kit 개발 -PCR용 primer 제작 -cAMP 및 Ribavirin 등 RDRP 억제제 처리 -TAS-ELISA 및 특이 primer를 이용한 screening -경남농업기술원(소규모재배) -5개 팬이농장(대규모재배) -팬이농장에 무바이러스 종균 보급

Ⅳ. 연구개발 결과, 및 활용에 대한 건의

- 팬이버섯 바이러스 진단 키트 합성
- 팬이버섯 바이러스 진단 PCR용 primer 제작

- 바이러스에 이병된 팽이 버섯에서 바이러스 퇴치에 성공함
- 팽이버섯 무바이러스 clone을 확보하여 팽이버섯 연합회에서 대량 실증 재배 실험 중임
- 팽이버섯 바이러스 진단키트 및 무바이러스 종균을 팽이버섯연합회를 통하여 농가에 보급 할 것임
- 팽이버섯 바이러스 진단키트 특허 신청 예정임

SUMMARY

(영문요약문)

Natural viral epidemic was observed in *Flammulina velutipes* mushroom farms in Korea. The disease was always accompanied by the presence of spherical RNA viruses. All isolates obtained from different geographic farms characterized by the formation of abnormal fruiting bodies contained the RNA viruses. A novel mycovirus was isolated from the diseased *Flammulina velutipes* using a purification procedure involving PEG-NaCl precipitation, differential centrifugation, and equilibrium centrifugation in CsCl gradient (1.585g/ml). The virion encapsidated two single-stranded RNAs of 4 and 1.5kb by a coat protein of about 60kDa. The new mycovirus named *Flammulina velutipes* Spherical Virus (FvSV).

We developed FvSV detection system using ELISA and PCR. For ELISA, three monoclonal antibodies in mouse and polyclonal antibodies in rabbit against FvSV were made. The monoclonal and polyclonal antibodies against FvSV could not cross-react with the other mycoviruses. To detect FvSV in the mushroom, we constructed a triple antibody sandwich-ELISA (TAS-ELISA) and immunochromatography rapid kit using anti-FvSV mouse monoclonal and anti-FvSV rabbit polyclonal antibodies. The TAS-ELISA and immunochromatography rapid kit system was sensitive enough to allow detection of FvSV in *F. velutipes* with the naked eye.

The cDNA of genomic ssRNA of FvSV was made. Partial sequences of RNA1 and RNA2 showed that they have same sequence homology at 3'end. FeSV genomic RNA could be polyadenylated at 3'end. The specific primers were made for PCR detection of FvSV.

The mycovirus could not be transmitted by mechanical contact, vector, air, etc., but could only by cell fusion, anastomosis. The origin of the viral disease on mushroom farm could be caused by virus harbored spawn. The only way to eliminate the FvSV from *F. velutipes* mushroom is planting virus-free, healthy spawn. The viral diseases in general could not be cured by chemical treatment. We have succeeded to cure FvSV by culturing virus-infested mycelia on cAMP plate containing 1% glucose, 2% L-asparagine anhydrous, 2% agar, 1mM cAMP, 75 μ g/ml rifamycine. The mycelia were grown on cAMP plate 6 times successively. Each successive passage was tested by triple-antibody sandwich ELISA (TAS-ELISA) and RT-PCR using anti-FvSV monoclonal and polyclonal antibodies and FeSV specific primer, respectively. Viral content inside the mycelial cells significantly decreased with the increase of passage number on cAMP plate. After successive 5th passage on cAMP plate, the viruses were disappeared from the cell. It could be a successful way to cure mycoviruses for treating mycelium on cAMP plate.

We made spawn with the virus-cured and virus-infested *F. velutipes* mycelia to have mass production of mushrooms. As disease symptom of FeSv in *F. velutipes* was not severe in controlled culture houses, virus-cured spawn produced fruiting

bodies 2~3 days earlier and slightly more(279g per 1,100ml bottle) than virus-infested spawn(270g per 1,100ml bottle). Here we report that it could be a successful way to cure mycovirus, FeSV, from *F. velutipes* mycelium culturing on cAMP plate.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Summary	· · · · ·	4
Chapter 1 : Introduction	· · · · ·	9
Purpose of the project	· · · · ·	10
Scope of the project	· · · · ·	11
Chapter 2 : Historical back ground of the project	· ·	12
Chapter 3 : Material and Method and Result	· · ·	14
Material and Method	· · · · ·	14
Result	· · · · ·	26
Chapter 4 : Objective and Contribution of this result to Mushroom Industry	· · · · ·	54
Chapter 5 : Practical application of the result	· · ·	56
Chapter 6 : International information of mycovirus study		57
Chapter 7 : Reference	· · · · ·	58

목 차

제출문	1
요약문	2
Summary	5
제 1 장 연구개발 과제의 개요	11
가) 연구개발의 필요성	11
나) 연구개발의 목적	13
다) 연구내용	13
제 2 장 국내외 기술개발의 현황	15
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	17
제1절 연구수행 방법	17
가) 사용균주 및 세포	17
나) 시약	17
다) 바이러스 순수분리	17
라) 전자 현미경 검경	18
마) cDNA synthesis	18
바) RT-PCR	20
사) 바이러스단클론 항체(monoclonal antibody) 합성	21
아) 폴리클론 항체(polyclonal antibody) 합성	25
자) Triple Antibody Sandwich ELISA(TAS-ELISA)	27
차) 단클론 항체를 이용한 팽이버섯 바이러스, FvSV, 진단용 Rapid kit 합성	29
카) 무바이러스 종균 개발	31
제2절 연구내용 및 결과	35
가) 바이러스 순수분리	35
나) cDNA synthesis	43

다) 단클론항체(monoclonal antibody)	53
라) 폴리클론항체(polyclonal antibody)합성	55
마) Triple Antibody Sandwich ELASA(TAS-ELISA)Kit 합성	58
바) 단클론 항체를 이용한 팽이버섯 바이러스, FvSV, 진단용 Rapid kit합성	58
사) 바이러스에 이병된 팽이 균사로부터 FvSV 퇴치 .	61
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	71
제 5 장 연구개발결과 활용계획	73
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	74
제 7 장 참고문헌	75

제 1 장 연구개발과제의 개요

가. 연구개발의 필요성

1) 기술적 측면

한국 버섯산업의 현재 위치는 일반적으로 일본의 기업적 버섯산업과 중국의 값싼 노동력을 이용한 대량재배 사이에 위치해 있다. 종균과 재배기술 연구 분야는 일본에 뒤지고 생산성과 원가 부분은 중국보다 비싸게 생산하고 있는 현실이다. 그러나 버섯은 균의 특성을 이용할 수 있는 기술집약적인 산업이므로 버섯에 대한 종합적인 연구개발과 투자가 이루어질 때 버섯산업은 살아날 수 있으며 경쟁력을 확보할 수 있는 산업으로 도약할 수 있다.

팽이의 경우 우리나라가 액체종균 사용과 대구경 병의 사용으로 일본보다 기술적 우위를 점하고 있으며 기자재도 저렴하게 제조하고 있다. 또한 시설재배 버섯으로 중국과의 경쟁력에서 우위를 점하고 있으며 계속 우위를 점할 수 있는 품종이다. 현재 이런 기술력과 제조력을 바탕으로 대량생산기술과 기자재를 일본 및 중국에 플랜트 수출하고 있는 실정이다.

이러한 기술 우위에도 불구하고 팽이버섯 산업의 취약점은 우리나라는 팽이버섯의 씨앗인 종균에 문제가 많다는 점이다. 특히 우리나라는 우리나라가 개발한 고유의 품종이 없다. 우리나라가 2000년 UPOV(국제종자협약)에 가입하였으므로 2009년 모든 종자가 UPOV에 적용되는 때부터 외국품종의 무단 사용은 국제적인 문제가 될 것이며 팽이 등 수출은 물론이고 국내재배도 제재를 받게 될 것이다. 종균 품종 개발에는 장기간의 연구와 투자가 필요함으로 지금부터라도 고유종균개발에 신경을 써야 할 것이다.

또한 최근 대부분의 품종에서 기형 버섯이 발생하고 기형버섯에서 바이러스가 검출됨으로써 수출시장에서 문제가 발생하고 있어 바이러스 퇴치가 필요하다. 최근 대부분의 팽이버섯 농장에서 도 기형버섯이 생기며 이 기형버섯에서 바이러스가 다량 검출되었다. 이 바이러스는 곰팡이에서는 거의 보고된 바가 없는 ssRNA바이러스이다. 본 연구실에서 느타리의 ssRNA바이러스가 병을 발생시킴을 보고한 바 있다. 새로운 병이 발생하면 첫째, 그 병의 원인균을 찾아내고 둘째, 병의 진단방법을 정립하며 셋째, 병의 퇴치방법을 알아내어야 한다. 바이러스병은 곰팡이나 세균병과 달리 사람의 눈이나 현미경으로 검사하거나 생화학적 반응으로 그 진단이 불가능 하다. 바이러스의 진단은 현대 분자생물학의 첨단기술이 필요하다.

버섯의 바이러스 병은 그 특성상 감염원이 종균일 수 밖에 없고 한번 감염되면 퇴치하기도 어려우며, 박테리아나 곰팡이 병과 달리 감염여부를 초기에 알기 어렵다.

이와 같이 한번 감염되면 속수무책인 바이러스를 근본적으로 퇴치하려면 종균의 바이러스 감염여부를 알아야 하며 재배사에서 초기에 감염을 알 수 있는 방법이 개발되어야 한다. 본 연구에서는 팽이버섯에서 새로운 바이러스를 발견하여 순수분리하고, 이 새로운 바이러스(FvSV)에 대한 단클론 항체와 폴리클론 항체를 만들어 이 바이러스를 쉽게 검정할 수 있는 검정키트를 개발하였으며, 더불어 PCR을 이용하여 바이러스를 검정하기 위하여 바이러스의 cDNA를 만들어 FvSV-specific primers를 제작하였다. 곰팡이 바이러스는 엄밀한 의미에서 감염이 되지 않는다. 곰팡이 바이러스는 anastomosis 등 cell-fusion에 의해서만 다른 세포로 전이된다. 그러므로 버섯도 곰팡이이므로 바이러스가 공기전염 등이 되지 않아 바이러스 퇴치는 버섯 종균에서만 바이러스가 존재하지 않으면 바이러스 문제는 해결 될 수 있다. 이에 본 연구에서는 팽이버섯 종균에서 바이러스를 퇴치하는 일을 할 것이다. 이때 개발한 바이러스 진단법을 바이러스 screening 방법으로 사용하여 팽이버섯 무바이러스 균주를 개발 할 것이다.

2) 경제 · 산업적 측면

팽이버섯 재배는 초기 투자가 많이 드는 (평균 10억/농가) 자본집약적 산업이다. 그러나 수확 cycle이 3개월로써 수익성이 큰 농업이라기보다 중소기업업종이다. 팽이버섯은 1990년대 100g당 시장가격이 1200원~900원 호가 하던 것이 1998년 IMF 사태 이후 100g당 60원~80원으로 폭락하여 그 당시 우리나라 5대 팽이버섯 농가(그린피스 I, II농장, 남덕유산 버섯 연구소, 도래미 영농 조합 법인, 화성버섯 영농 조합 법인)가 팽이버섯 연합회를 조직하여 수출시장을 개척 하였다. 이는 시중 팽이 물량을 조절하여 100g당 200원~250원(손익 분기점 130~150원)으로 가격 안정을 시키기 위함이었다. 그러므로 팽이버섯의 수출이 막히면 우리나라 팽이버섯 농가(약 100농가)는 내수기반이 무너져 모두 도산할 것이다.

우리나라 팽이버섯 생산량은 보고된 것만 계산하면 약 23,362 ton (2002년)으로 시장가격은 약 600억원이다. 그중 팽이버섯 연합회 5개사에서 생산하는 팽이량은 약 50%인 11,681 ton이다. 2002년 팽이버섯 연합회에서는 300ton을 Kg당 2.4\$에 수출하여 약 72만\$를 벌어들였다. 최근 수출대상국도 10개국으로 증가하고 수출 물량도 증가하고, 가격도 높아져(24¢/100g) 수출 물량이 모자라는 형편이나 2003년 중국의 덤핑(18¢/100g)관계로 수출대상국 중 싱가포르 시장을 중국에 빼앗긴 경험이 있다. 그러나 중국은 버섯재배가 자연 재배로 물량 공급이 일정치 않고 그 품질이 우리와는 비교할 수 없을 정도로 낮아 조만간 싱가포르에 수출 재개가 가능하리라 사료된다.

팽이버섯 연합회에서는 5개년 계획으로 수출 시장을 확대하여 10,000ton까지 수출할 계획으로 시설을 늘이고 있으나 최근 많은 품종에 바이러스가 감염되어 기형버섯이 속출하고 있어 수출에 차질을 빚을 수 있다. 이에 팽이버섯 연합회에서는 이 문제를 해결하여야 장차 수출이 순조로울 것이라고 생각하고 있다.

3) 사회 · 문화적 측면

팽이버섯 재배는 기술집약적 , 노동집약적 산업이다. 2003년 12월 화재로 메스컴에서 크게 보도된 팽이 농장(대흥)만 하여도 연간 150억 외형에 매일 240명씩의 고용효과가 있었다. 이는 어느 중소기업보다 수익성이 있는 산업이며 고용효과가 높은 산업이다. 그러므로 팽이농장(공장)이 있는 지역의 고용증대 및 소득증대에 기여하는 바가 크다.

팽이 재배산업이 지속적인 국제경쟁력을 가져야 지역의 경제에 도움을 줄 수 있다. 그러므로 팽이 재배산업에 가장 취약점인 종균의 개발, 종균 유통질서 확립, 바이러스병 퇴치가 중요하다.

나) 연구개발의 목적

1) 팽이 바이러스 진단시약을 개발하여 팽이 종균 및 버섯에서 바이러스 검정을 용이하게 하며 팽이 농가에서 팽이 바이러스의 확산을 봉쇄한다.

2) 바이러스 무병주 팽이 종균을 선발 보급하여 팽이 농가에서 바이러스병을 근원적으로 퇴치한다.

3) 바이러스 이병주에서 바이러스를 퇴치하여 건전한 팽이 종균 생산법을 확립하고 무바이러스 종균생산 system을 확립한다.

다) 연구 내용

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2004~2005)	<ul style="list-style-type: none"> -팽이버섯 농가의 바이러스병 발생 실태조사(전국) -바이러스 순수분리 -바이러스 유전체, coat protein 순수분리 -바이러스 무병주 개발 -바이러스 항체 Monoclonal 및 Polyclonal antibody 합성 	<ul style="list-style-type: none"> -전국적인 팽이 농가 대상 -병징별버섯수집 -감염세포대량증식 -전자현미경 검경 -바이러스 유전체(ssRNA순수분리) -coat protein분리 -cDNA 합성 -바이러스 유전체 sequencing -cAMP 및 Ribavirin등 RDRP억제제처리 -Balb/c Mouse에 immunization -토끼에 virus immunization
2차 년도 (2005~2006)	<ul style="list-style-type: none"> -단클론 항체를 이용한 간편 키트 개발 -바이러스 유전자 sequencing -바이러스 무병주 개발 -바이러스 무병주 실증 실험 	<ul style="list-style-type: none"> -전년도에 합성한 단클론 및 복클론 이용한 팽이버섯 바이러스 진단 kit개발 -PCR용 primer제작 -cAMP 및 Ribavirin등 RDRP억제제처리 -TAS-ELISA 및 특이 primer를 이용한 screening -경남농업기술원(소규모재배) -5개 팽이농장(대규모재배) -팽이농장에 무바이러스 종균 보급

제 2장. 국내 · 외 기술개발의 현황

버섯에서 발생하는 바이러스 병은 1948년 미국에서 최초로 *Agaricus bisporus*(양송이)에서 발견되었으나 그 병원체를 발견하지 못하여 die-back disease 라고 불리어지다가 1960년 Sinden과 Hauser가 그 당시 병이 최초로 발견된 농가의 이름을 따서 "La France Disease" 라고 처음 명명하였다(Sinden and Hauser, 1950). 그리고 이와 같은 병징을 나타내는 양송이버섯에서 1977년 virus like particle(VLP)이 발견되어 보고되었으며(Moyer and Smith, 1977) 그 이후 비슷한 병징을 나타내는 버섯의 바이러스 병을 "La France Disease" 혹은 "Die back disease"라고 부른다(Hollings, 1962, 1978). Virus like particle 이라 함은 세포 내에서 virus particle이 증식하나 바이러스의 전파 경로가 plasmid처럼 cell fusion 만으로 다른 세포로 전파됨을 말하는 것이다. 즉. 일반적인 바이러스의 감염 경로인 접촉, 공기, 상처 등을 통해 전파되지 않는 virus particle을 말하는 것이다(Van Zaayen, 1979). 버섯에서 발견되는 La France Disease의 전형적인 특징들을 살펴보면 버섯 자실체의 형성이 늦어지고 왜소하며 대의 길이가 짧고 갓의 모양이 기형이 되면서 얇아지는 것을 볼 수 있는데, 심한 경우에는 버섯의 분화(development)가 거의 이루어 지지 않는다(Harmsen, 1990;Harvey et al, 1982;Schisler et al., 1967). 그리고 균사 생장에도 영향을 미치는데, 균사 생장이 늦어지고 균사 밀도도 낮아지는 것을 볼 수 있었다(Hicks and Haughton, 1986;Koons et al., 1989). 이들 *Agaricus bisporus* 에 발생한 La France disease의 원인은 25nm와 34-35nm의 구형 바이러스 입자임이 밝혀졌다. 구형의 바이러스 입자 La France isomeric virus(LIV)는 그 유전체로 3.8kb에서 0.8kb 사이의 9가지 크기의 dsRNA를 가지고 있으며 그 중 2.8kb는 병증이 나타나지 않은 건전한 버섯에서도 발견되었다(Koons et al., 1989;Goodin et al, 1992;Harmsen et al, 1989). 바이러스의 유전자와 host인 *A. bisporus* 의 유전자 codon usage를 조사한 결과, 바이러스가 host내에서 활발한 replication을 하는 것이 바이러스 병의 직접적인 원인이라고 하였다(van der Vlugt et al., 1993). 바이러스가 host 내에서 replication하는 동안 viral mRNA의 translation 과정이 *A.bisporus*의 mRNA translation에 필요한 amino acyl tRNAs의 농도를 더 낮아지게 할 수 있다. 그래서 자실체 형성이나 substrate colonization 에 많은 양이 필요한 hydrophobin 등의 *A. bisporus* protein 합성이 저해됨으로써 La France Disease 의 병징인 자실체의 기형현상이 발현된다고 생각되었다(Harmsen et

al., 1991; Van der Lende et al., 1994). *A. bisporus* 에 발생한 바이러스 병의 감염경로는 버섯의 균사 접합 과정 중에 전이되는 것으로 알려져 있다, 버섯 재배사 내에서 공기 중에 비산되는 포자 (basidiospore) 중에서 바이러스에 감염된 포자가 존재하면 포자에 의한 병의 전파가 가능 할 수 있다. 이와 같은 바이러스에 의한 병으로 인해 유럽에서 버섯의 전체적인 생산량에 막대한 피해를 보았다(Marino et al., 1976; Morris and Dodds, 1979).

우리나라에서 바이러스에 대한 연구는 최근에야 이루어지기 시작했다. 1992년 느타리버섯에서 최초로 발견하여 보고된 바이러스는 크기가 30nm인 구형의 바이러스였는데 간혹 24nm의 바이러스도 같이 발견 되었다(Go et al., 1992). 그 당시는 병 피해가 적었던 탓에 더 이상 이 바이러스에 대한 연구는 진행되지 않았다. 그 뒤 1999년에 기존에 보고된 것과는 다른 4 종류의 바이러스를 본 연구실에서 분리를 하였다. 이들 4종의 바이러스를 Oyster Mushroom Spherical Virus (OMSV; Yu et al. 2003), Oyster Mushroom Isometric Virus I (OMIV-I), Oyster Mushroom Isometric Virus II (OMIV-II), 및 Oyster Mushroom Isometric Virus III (OMIV-III) 라고 명명 하였다(Yu et al. in press). 이들 바이러스에 의한 대표적인 병징으로는 버섯대가 짧아지고 버섯갓이 찌그러지고 색이 열리는 등 기형의 버섯이 생기는 것이다. 팽이버섯 역시 대표적인 병징으로 버섯대가 납작해지고 버섯갓이 찌그러지며 성장이 불규칙적인 기형버섯이 나타난다. 본 연구팀은 느타리버섯 바이러스 4종에 대한 진단시약을 개발하여 특허를 획득하였으며 TAS-ELISA kit는 기술이전을 하였다. 또한 정밀 검사를 위한 PCR용 특이 primer를 개발하여 사용하고 있다.

최근에는 무분별한 종균의 도입으로 인하여 기존에 알려지지 않았던 버섯의 바이러스로 인한 피해가 급증하고 있고 팽이버섯에서도 바이러스가 검출되어 버섯생산에 막대한 지장이 생기고 있다. 따라서 바이러스에 대한 연구가 시급한 실정이다.

곰팡이에서 바이러스 퇴치 방법을 개발한 연구는 지금까지 국내외에서 보고된 바가 없으나 본 연구팀은 느타리버섯에서 성공적으로 바이러스를 퇴치하는 방법을 개발한 바가 있다.(무바이러스 종균 판매중) 이에 본 연구에서 팽이버섯 생산자들이 요구하는 팽이버섯 무바이러스 종균을 생산하는 방법을 개발할 것이다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1절 연구 수행방법

가) 사용균주 및 세포

팽이버섯(*Flammulina velutipes*)은 팽이버섯 연합회에서 재배하고 있는 품종 중 기형버섯을 사용하였다(Fig.1). 단클론 항체 합성에서 세포융합에 필요한 형질 세포종 세포는 mouse myeloma 세포인 P3X63Ag8.V653를 사용하였다.

바이러스 유전체 cDNA 합성후 cloning vector로는 pUC19을 사용하였으며 이를 *E. coli* JM83과 XL1- blue에 transformation 하였다.

나) 시약

단클론항체와 폴리클론항체 합성시에 필요한 모든 시약은 Sigma사에서 구입하였다. DNA size marker는 Takara사에서, protein marker는 Bio-Rad사에서 합성한 것을 사용하였다. 항체확인을 위해 사용한 phosphatase conjugated second antibody(goat anti-mouse IgG, donkey anti-rabbit IgG)는 Promega사에서 구입하였다. Peroxidase conjugated second antibody(goat anti-mouse antibody, goat anti-rabbit antibody)는 Sigma사에서 구입하여 사용하였다. *E. coli*를 배양하기 위한 배지 성분으로 사용된 yeast extract, tryptone agar 등은 BBL사 제품을 사용하였다. Selective marker로 사용된 ampicillin, X-gal, IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactoside)등은 Sigma에서 구입하였다. Random primer를 이용한 cDNA 합성은 Takara사의 cDNA synthesis kit를 이용했으며, ligation을 위한 효소등도 Takara사의 DNA ligation kit ver.2를 사용하였다. 기타 시약들은 특급 이상의 분석용이나 분자생물학용 시약을 사용하였다.

다) 바이러스 순수분리

1) 바이러스 입자 순수분리

30초씩 6회 Waring blender로 homogenization 시킨 뒤, 6000xg, 4℃ 에서 22분 동안 원심분리 하였다. 상등액은 10% PEG (polyethylene glycol 6000) 와 0.6M NaCl

에서 2시간 교반하고 6000xg, 4°C에서 22분 동안 원심분리 하였다. 침전물을 pH7.5의 TE buffer로 현탁하여 10,000xg, 4°C 에서 25분 동안 원심분리 하고 상등액은 100,000xg 에서 1시간 30분 동안 초원심분리 하여 바이러스 입자의 침전물을 얻었다. 이 침전물을 pH7.5의 TE buffer로 overnight으로 현탁하였고, 바이러스 입자들을 50% CsCl (1.583g/cm³)에서 15시간동안 130,000xg 에서 equilibrium ultracentrifugation 하여 0.75ml씩 분획하였다. 바이러스가 포함된 fraction을 pH7.5의 TE buffer로 dilution한 뒤 100,000xg에서 1시간 30분 동안 다시 초원심분리 하고 이렇게 하여 얻어진 침전물을 pH7.5의 TE buffer로 현탁하여 바이러스를 순수분리 하였다.

바이러스를 순수분리 한 뒤 100 μ l pH7.5의 TE buffer에 녹인 뒤, 이 중 10 μ l를 들어 내어 50mM Tris-Cl, pH 6.8, 100mM dithiothreitol, 2% SDS, 10% glycerol 그리고 0.1% bromophenol을 첨가시키고 95°C에서5분간 가열시켜 denaturation 시켰다. 12% polyacrylamide gel 에서 40분 동안 electrophoresis하고 Coomssie Brilliant Blue R-250으로 30분간 염색한 후 50% Methanol, 10% Glacial Acetic Acid와 7% Methanol, 5% Glacial Acetic Acid로 탈색하여 단백질 band를 확인하였다.

2) 바이러스 핵산확인

순수분리된 바이러스를 phenol과 PCI (phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1, v/v/v)) 처리로 단백질을 제거한 후 부피의 2배인 ethanol과 1/10배의 3M sodium acetate용액을 첨가한 뒤 20°C에서 1시간동안 방치하였다. 10,000xg에서 30분간 원심 분리 하여 얻은 pellet을 70% ethanol로 세척하고 건조시킨 뒤 DEPC를 처리한 멸균수로 녹였다. 이렇게 하여 얻어진 핵산을 DNase I (5unit)과 10mM MgCl₂첨가하거나 저농도염 (0.05M NaCl) 과 고농도염 (0.5M NaCl) 에서 RNase A (10 μ g/ml)를 각각 처리하여 37°C에서 30분 동안 반응하였다. PCI extraction 하여 ethanol 침전으로 얻어진 핵산을 DEPC를 처리한 멸균수로 녹이고 1% agarose gel 에서 전기영동하였다. 그런뒤 ethidium bromide로 염색하여 증류수에서 세척하고 254nm 자외선 조명하에서 관찰하였다.

라) 전자현미경검정

순수분리한 바이러스 용액을 formbar-coated 400 mesh gride에서 2% (w/v) uranyl acetate, pH 4.5로 염색하여 JEOL model 200 transmission electronmicroscope(TEM) 로 관찰하였다.

마) cDNAsynthesis

1) 바이러스 유전체 RNA 추출

분리된 바이러스 입자를 PCI처리와 Ethanol 침전을 통해 핵산을 정제한 후 1% agarose gel에서 전기영동하였다. ethidium bromide로 염색하여 증류수에서 세척하고 254nm 자외선 조명하에서 관찰하였다. cDNA를 합성하기 위한 바이러스 유전체 RNA는 agarose gel elution을 통해 RNA1 및 RNA2를 각각 분리하여 추출하였다. 추출은 dialysis bag으로 elution하는 방법을 사용하였다. RT-PCR로 cDNA 합성 할 것은 RNA1과 RNA2 각각의 segment를 전기영동하여 gel에서 각각 elution하여 추출하였다.

2) random primer를 이용한 cDNA 합성

cDNA synthesis kit (Takara)를 이용하였으며 사용법이 지시하는 대로 수행하였다. 이를 간단히 설명하면 다음과 같다.

정제된 바이러스 ssRNA(5 μ g 이상)를 65 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 가열하고 얼음속에서 급 냉시킨 뒤 Random nonamer를 primer로 해서 reverse transcriptase를 이용하여 first strand cDNA를 합성하였다. RNase H를 처리하여 cDNA와 hybrid되어 있는 RNA를 분해시키고 *E.coli* Polymerase I으로 second strand DNA를 합성한 뒤 T4 DNA Polymerase로 cDNA를 blunt end로 만들었다.

3) Adaptor and Vector ligation

EcoRI-NotI-BamHI adaptor(10pmol)와 합성된 cDNA를 ligation을 하였으며 이것을 *EcoRI*으로 처리한 plasmid pUC19 의 *EcoRI* site에 ligation하였다. DNA ligation kit ver.2 (Takara)를 이용하였다.

4) Competent cell의 조제

LB agar배지에 보존된 *E. coli* XL-1 blue와 JM83 세포의 single colony를 3ml LB 배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 배양한 배양액을 500ml LB배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 진탕배양하였다. 600nm에서 흡광도가 0.5-0.6이 되었을 때 배양액을 10분 정도 얼음에서 냉각시키고 4 $^{\circ}$ C, 3,000xg에서 20분동안 원심분리하였다. 침전된 cell pellet를 냉각된 멸균수로 조심스럽게 현탁시키고 4 $^{\circ}$ C, 3,000xg 에서 20분 동안 원심분리(2회 반복)하였다. 얻어진 cell pellet을 냉각된 10% glycerol 로 현탁시켜 4 $^{\circ}$ C, 3,000xg 에서 10분 동안 원심분리하여 균체를 모은 후, 1ml 10% glycerol로 현탁시키

고 80 μ l씩 분주하여 -70 $^{\circ}$ C에 보관하여 electroporation에 이용하였다.

5) Electroporation

XL1-blue와 JM83 cell 80 μ l를 ligation mixture와 혼합하고 자외선에서 15분 동안 방치하여 미리 냉각시켜둔 0.2cm 간격의 Pluser cuvette에 옮겨 1분동안 방치하였다. *E.coli* Pluser apparatus (Bio-rad)를 사용해 2.5kV로 electroporation한 뒤 재빨리 1ml SOC배지에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분 배양하였다. 배양액을 적당하게 희석하여 Ampicillin (5 μ g/ml)이 첨가된 Macconkey agar 배지와 LB agar (X-gal ; 40 μ g/ml, IPTG ; 0.5mM)에 도말하였다.

6) Plasmid 분리

LB 배지에서 16시간 배양한 *E.coli* 배양액을 3ml을 1분간 원심분리하여 균체를 모으고, solution I (50mM glucose , 25mM Tris-HCl, 10mM EDTA) 100 μ l에 현탁시키고, solution II (1% SDS, 0.2N NaOH) 200 μ l를 넣고 5회 inversion 하였다. Solution III (60ml 5M potassium acetate, 11.5ml glacial acetic acid, 28.5ml H₂O) 150 μ l를 넣고 10회 inversion하고, 10,000xg에서 10분간 원심분리하였다. 상등액은 PCI(phenol/chloroform/isoamylalcohol, 25:24:1 ,v/v/v) extraction으로 단백질을 제거하고, 10%의 3M sodium acetate와 2배의 ethanol을 첨가하여 실온에서 2분 이상 방치한 후 10,000xg에서 5분간 원심분리 하였다. 침전물은 70% ethanol로 세척하여 건조 시킨 후 적당량의 멸균수에 녹였다.

바) RT-PCR

1) RT-PCR

RT-PCR은 oligo(dT)-primer와 oligonucleotide를 이용해서 수행하였고 (Table 1,2), enzyme은 AMV reverse transcriptase(9U/ μ l ; Promega)와 Superscript reverse transcriptase II(200U/ μ l ; Invitrogen)두가지를 이용하였다. 정제된 ssRNA를 primer와 함께 65 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 가열하고 얼음속에서 3분간 급냉시키고 centrifuge로 침전 시킨 뒤 AMV reverse transcriptase(9U/ μ l ; Promega) 1 μ l, 2.5mM dNTP mixture 2.5 μ l, AMV reverse transcriptase 5x buffer 5 μ l를 첨가한 뒤 DEPC-treated 멸균수로 25 μ l까지 채우고 42 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응하여 합성된 cDNA을 PCR (Polymerase Chain Reaction) 로 증폭시켰다. Superscript II reverse transcriptase(200U/ μ l ; Invitrogen)사용시에는 Superscript II reverse transcriptase

(200U/ μ l ; Invitrogen)1 μ l, 2.5mM dNTP mixture 2.5 μ l, 0.1M DTT 2 μ l, Superscript II reverse transcriptase 5x buffer 5 μ l 첨가한 뒤 DEPC-treated 멸균수로 25 μ l까지 채우고 역시 42 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응하여 PCR (Polymerase Chain Reaction)로 증폭시켰다. PCR은 100 μ l의 부피를 기준으로 하였으며, dNTP mixture 2.5mM과 5U Taq DNA polymerase, 10X Taq buffer 그리고 template DNA 와 primer로 부피를 100 μ l로 맞춘 뒤 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하고 95 $^{\circ}$ C 30초, 58 $^{\circ}$ C 20초, 72 $^{\circ}$ C 15초로 35 cycles 수행하고 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응하였다. 반응이 끝난 후 PCR products를 2% agarose gel에서 전기영동을 하여 확인 하였다.

2) Agarose gel electrophoresis와 DNA elution

전기영동 완충용액으로는 TAE완충용액 (40Mm Tris-acetate, pH8.0, 1Mm EDTA)을 사용하였으며 1%~2% agarose gel을 사용하여 시료의 1/6 배량의 6x gel loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 40% (w/v) sucrose in water)를 가한 DNA 용액을 100V 또는 120V에서 전기영동 하였다. 전기영동 후 0.5 μ g/ml의 ethidium bromide 용액에서 염색한 후 증류수로 세척하여 254nm 자외선 조명하에서 관찰하였다. Agarose gel로부터 DNA 단편의 회수는 Gene clean II kit (Bio 101)를 사용하였다.

3) Gene cloning

추출된 DNA를 제한효소(*EcoRI*) 처리를 하여 plasmid pUC19의 *EcoRI* ligation하였다(24,25). *E. coli* JM83 cell 과XL1-blue cell로 electroporation하여 plasmid를 증식시키고 이를 분리하여 sequencing하였다.

사) 바이러스 단클론 항체(monoclonal antibody) 합성

1) 면역

생후 6주된 암컷 BALB/c 마우스에 바이러스 (마리당 10~50 μ g)와 freund's complete adjuvant(Sigma)의 혼합액을 복강으로 면역하였다. 면역 3주후에 동량의 항원을 freund's complete adjuvant(Sigma)에 혼합하여 추가면역하고 다시 3주후에 생리식염수로 희석한 동량의 항원을 복강내로 주사하여 최종면역하였다.

2) 형질 세포종세포 준비

세포융합에 사용한 형질세포종세포는 mouse myeloma세포인 P3X63Ag8.V653 세포주를 사용하였다. 이 세포는 hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase(HGPRT)가 음성이어서 8-azaguanine에 내성이며 면역 글로블린을 생산하지 못한다. 이 세포주를 8-azaguanine(20g/ml)이 함유된 RPMI 1640배지에서 배양하여 2~4일에 한번씩 원심세척하여 새로운 배지로 갈아주면서 37°C, 4% CO₂ 에서 배양, 계대 하였다. 세포융합에 사용할 형질세포종 세포는 새로운 배지로 18시간 배양한 후 RPMI 1640 으로 3회 세척하고 세포 수를 1x10⁷/ml로 조정하여 사용하였다.

3) 비장세포 준비

최종면역 후 3일후 경과된 BALB/c 마우스로부터 비장을 적출하여 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 내에서 핀셋으로 비장세포를 분리하였다. 비장세포액을 실온에서 15분간 정치시켜 비장결합조직을 가라앉혀 제거하고 DMEM으로 원심 세척하였다. 비장세포액을 Fetal Bovine Serum (FBS) 에 중층하여 280Xg에서 5분간 원심분리 함으로써 비장세포액내의 혈소판을 제거하였다. DMEM으로 원심 세척한 다음 비장세포액을 red blood cell lysing buffer (Tris 20.6g/l , NH₄Cl 8.3g/l) 로 처리하여 적혈구를 용혈시켜 백혈구 성분을 분리하였다. 그런 다음 RPMI 1640 으로 3회 세척하여 세포 수를 1x10⁸/ml 로 조정하여 사용하였다.

4) 세포 융합

위에서 준비한 형질세포종세포 (P3X63Ag8.V653)와 비장세포를 1:10의 비율로 혼합한 후 DMEM으로 2회에 걸쳐 원심세척 하였다. 37°C로 보온 시킨 혼합 세포침전물에 50%(W/V) polyethylene glycol 1500(PEG 1500)1ml을 1분간 점적하여 세포를 융합시켰다. 점적 후 즉시 37°C의 DMEM 1ml 을 흔들면서 1분 동안 첨가하고 계속해서 DMEM 15ml을 15분간 첨가한 다음 원침하고 20% FBS , 10% NCTC 그리고 gentamycin (50ul)이 첨가된 DMEM에 세포를 부유시킨 다음 96well 배양 판에 well 당 50ul씩 분주하여 37°C, 6% CO₂에 배양하였다. 융합된 세포만을 선택하기 위하여 HAT (50Uμ hypoxanthine, 0.4uM aminopterin, 16uM thymidine) 배지를 세포 융합 후 1,3,5 및 7일에 well 당 50ul 씩 첨가하고 9일에는 150ul 의 배지를 덜어내고 동량의 배지를 첨가하면서 융합 후 13일까지 융합세포의 증식 유무를 역위상차 현미경으로 관찰하였다.

5) 융합세포의 선택과 단클론 배양 (cloning)

세포 융합 후 10일 내지 13일 사이에 세포가 well 바닥의 1/3이상 성장하였을 때 배양 상등액을 채취하여 효소면역측정법으로 바이러스에 대한 항체를 분비하는지의 여부를 검색하였다. 항체를 생산하는 세포가 들어있는 well을 24well에 나누어 옮겨 배양한 후 항체 역가가 계속 유지되고 세포의 증식이 활발한 hybrid를 선택하여 cloning을 실시하였다. Cloning은 McKearn의 무한대 희석법으로 실시하였다. 24-well에 성장하는 세포를 DMEM으로 희석하여 최종 10^3 cell/ml의 농도로 적정하여 well당 100 μ l씩 첨가하여 배양하였다. 이 때 사용한 배지는 aminopterin이 첨가되지 않은 배지를 이용하고 5일 배양 후 역위상차 현미경으로 1개의 세포 집락이 형성된 well을 선택하고 항체생산여부를 효소면역측정법으로 검색하였다. 효소면역측정법의 conjugated antibody로는 goat anti-mouse Ig(s) conjugated with peroxidase를 사용하였다. 항체의 역가가 높은 hybridoma cell(1×10^7 cell/0.2ml)을 BALB/c 암컷의 복강에 주사하고 약 일주일 후 쥐의 복강으로부터 복수를 얻어냄으로써 대량 분리하였다. 분리된 항체를 ammonium sulfate (40~50% saturation) precipitation으로 농축한 후 protein A column을 통과시켜 정제하였다.

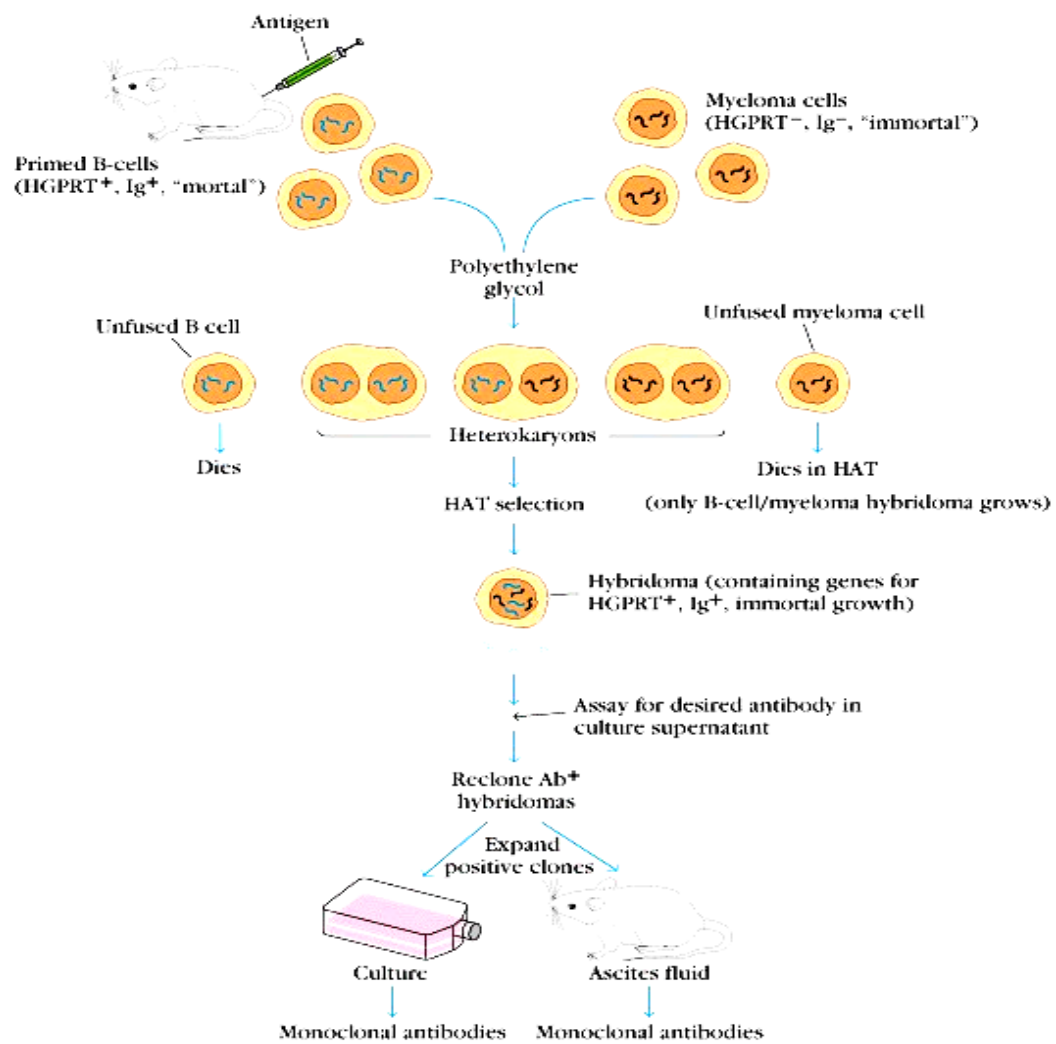


Fig.1. Scheme for monoclonal antibody production

6) 효소면역측정법 (Enzyme Linked Immuno-Solvent Assay)

융합세포에서 항체 생성세포를 선택하거나 선택된 단클론항체의 반응특성을 조사하기 위하여 다음과 같이 효소면역측정법을 실시하였다. 수용성 항원의 경우 96-well-polystyrene microplate에 0.05M carbonate 완충액 (pH9.6) 으로 10 μ g/ml의 농도로 희석한 항원을 well당 50 μ g씩 첨가하고 4°C에서 하룻밤 부착시켰다. 부착 후 Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.3) 0.05% Tween 20으로 한번 세척하고 3% bovine serum albumin (BSA) PBS 0.05% Tween 20 용액을 well당 150 μ g씩 첨가하여 37°에서 한시간 동안 처리하여 항원이 부착되지 않은 부위를 차단시켰다. 그 다음 PBS-Tween 20 용액으로 세 번 세척하고 검색할 배양액이나 희석한 혈청을 50 μ g/well 씩 첨가하고 37°에서 1시간동안 항원항체 반응을 진행시켰다. PBS-Tween 20으로 3분 간격으로 3번 세척하고 1:5000으로 희석된 peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG를 50 μ g/well 씩 첨가하여 37°에서 1시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 PBS-Tween 20 용액으로 5회 세척하고 발색제가 첨가된 기질 용액을 100 μ g/well 로 첨가하여 효소반응을 유도하였다. 기질용액은 0.1M phosphate citrate 완충액 (PCB) 10ml에 30% 과산화수소 20 μ l, 그리고 ortho phenylene diamine 4mg 을 넣어 만들었다. 실온에서 5분간 효소반응을유지시킨 후 동량의 2N 황산용액을 첨가하여 반응을 중단한 후 발색반응의 정도를Microplate Reader (Bio-Rad, model 550) 을 이용하여 492nm에서 측정하였다.

아) 폴리클론항체 (polyclonal antibody) 합성

(1) 일차 접종

3ml의 순수 분리한 바이러스 10mg 용액에 동량 (3ml)의 Freund's complete adjuvant (FCA)를 두개의 연결된 10ml Syringe에 넣어 20분간 mix하여 emulsion을 만든다. Emulsion이 완성되었음을 확인하기 위하여 증류수가 들어있는 비커에 한 방울 떨어뜨려 보았다. (이때 Ag 이 FCA에 둘러싸여 있으면 물위에 뜨게 됨.) emulsified 된 바이러스 용액을 토끼 한 마리 당 복강내에 1ml, 피하 등의 여러 곳) 1ml 을 주사하였다.

(2) 이차 접종

1차 접종 후 일개월 후 바이러스 용액에 동량의 Freund's Incomplete Adjuvant(FIA)를 처리하여 emulsion을 만들어 토끼의 복강과 피하에 각각 1ml씩을

주사하였다.

(3) 삼차 접종

2차 접종 후 2~3주 후 virus 용액만을 토끼의 복강과 피하에 각각 1ml씩을 주사하였다.

(4) 혈청 항체 역가 검정

3차 접종 4~5일 후 토끼의 귀 정맥에서 1ml의 피를 채혈하여 3000rpm에서 10분 동안 원심분리 하여 혈청을 얻었다.(이때 혈청은 0.7ml 정도 되었음) 혈청을 2배수로 dilution series를 만들어 역가 검정을 하였다. 역가 검정 방법은 1% agarose 혹은 noble agar gel precipitation (AGP) test 와 효소면역 측정법을 사용하였다. 효소면역 측정법의 conjugated antibody 로는 goat anti rabbit Ig (s) conjugated with peroxidase 를 사용하였다. 이 때 혈청을 $2^8 \sim 2^9$ 배정도까지 3차 접종 때와 마찬가지로 방법으로 한번 더 virus 용액을 접종하였다.

(5) Factor serum 의 제조

바이러스의 항체가 contaminant 와 cross-reaction 하는 것을 방지하기 위해서 cross-reaction이 일어날 가능성이 있는 물질(특히 버섯 추출물의 contaminant)을 항혈청과 혼합하여 실온 (혹은 37°C) 에서 1시간정도 방치 한 후 원심분리하여 상등액을 factor serum 으로 사용하였다.

(6) Western Blot Analysis

바이러스로 면역된 쥐에서 monoclonal antibody와 토끼에서 얻은 polyclonal antibody의 반응성을 조사하였다. 조사된 단백질들은 95°C 에서 5분간 끓인 뒤 Mini-protein kit (Bio-Rad, Richmond, Calif, USA) 를 사용하여 12% polyacrylamide gel, 25mA에서 한시간 전기영동 한 후 nitrocellulose membrane에 옮겼다. Tris buffered saline (10mM Tris-Cl, 150mM NaCl)-0.05% tween 20에 녹아있는 1% BSA (bovine serum albumin) 용액으로 실온에서 30분간 blocking 한 뒤, monoclonal antibody 의 경우 바이러스에 대한 일차 항체는 hybridoma 세포를 배양한 후 원심분리하여 얻은 상등액을 사용하였다. Polyclonal antibody의 경우 antibody 를 TBST buffer로 3분간 3회 세척하고 alkaline phosphatase conjugated second antibody를 30

분간 반응시키고BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate) / NBT (4-Nitro blue tetrazolium chloride) 를 발색반응의 기질로 사용하여 발색을 관찰하였다.

자) Triple Antibody Sandwich ELISA(TAS ELISA)

바이러스에 대한 monoclonal antibody 일정량을 0.05M carbonate 완충액 (pH9.6) 에 희석하여96well plate 에 coating 하였다. 4°C에서 하룻밤 부착시킨 후 남은 buffer 를 털어내고 PBST (0.14M NaCl, 2.7mM KCL, 1.5mM KH₂PO₄, 8.1mM Na₂HPO₄, 0.05% Tween 20) buffer에 녹아있는 3% BSA 용액 150ul를 첨가하고 37°C에서 2시간 동안 반응시킴으로써 blocking을 실시하였다. PBST buffer로 3회 세척하고 적당량의 바이러스 감염 버섯 또는 균사 즙액을 첨가하고 37°C에서 1시간 반응시켰다. PBST로 3회 세척 후 바이러스에 대한 polyclonal antibody 일정량을 첨가하고 다시 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 3회 세척 후, peroxidase conjugated second antibody (goat anti-rabbit Ig(s))를 37°C에서 1시간 반응시키고 발색제가 첨가된 기질로 발색을 유도 한 후 관찰하였다.

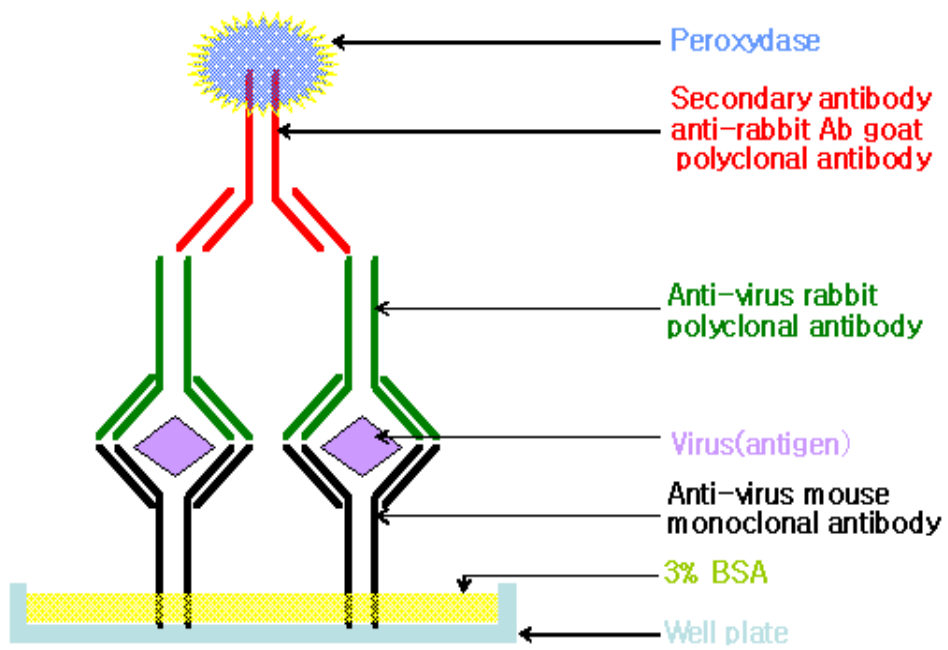


Fig.2. Scheme of Triple antibody sandwich-ELISA

차) 단클론 항체를 이용한 팽이버섯 바이러스, FvSV, 진단용 Rapid kit 합성

사)에서 합성한 anti-FvSV monoclonal antibody를 nitrocellulose membrane에 binding 시켜 immunocrmatography 방법으로 FvSV 간이 검정 키트를 만든다 (Fig.3).

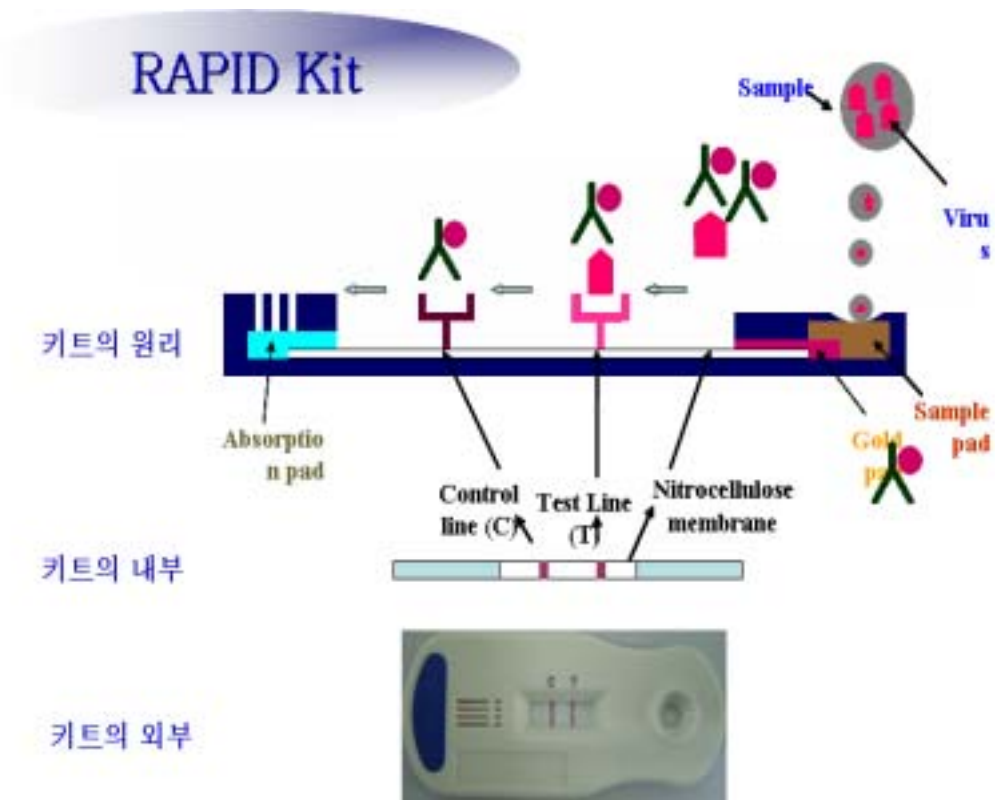


Fig3. Immunochromatography method to detect FvSV in 20 min. using anti-FvSV monoclonal antibody

카) 무바이러스종균개발

1) 바이러스 퇴치용 고체 배지 배양

PDA 고체 배지에 접종되어 25℃에서 12일간 자란 균사 끝을 직경 1cm의 disc로 잘라서 cAMP plate(Table.1)에 접종하여 빛을 차단하여 25℃ 항온실에서 배양하였다. 이것을 cAMP 1차 계대 배양이라 표시하고, 균사가 배지 가장자리까지 자라 나오면 또 다시 1cm의 disc로 잘라서 cAMP plate에 접종하여 빛을 차단한 상태로 25℃ 항온실에서 배양하였다. 이것을 cAMP 2차 계대 배양이라고 표시하였다. 이러한 식으로 균사가 자라나는 속도에 맞춰서 cAMP 6차 계대 배양까지 실시 하였다. 1차에서 6차까지 cAMP plate에서 각각 계대 배양한 균사의 disc를 PD 및 PDA 배지에 접종하여 증식한 균사를 파쇄하여 세포액을 원심분리로 얻어 TAS-ELISA와 RT-PCR을 이용하여 바이러스 검사를 하는데 이용하였다.

Table 1.

Composition of cAMP plate to cure mycoviruses

Chemical	Concentration
Glucose	1%
L-Asparagine anhydrous	2%
Agar	2%
cAMP	1mM
Rifamycine	75 μ g/ml

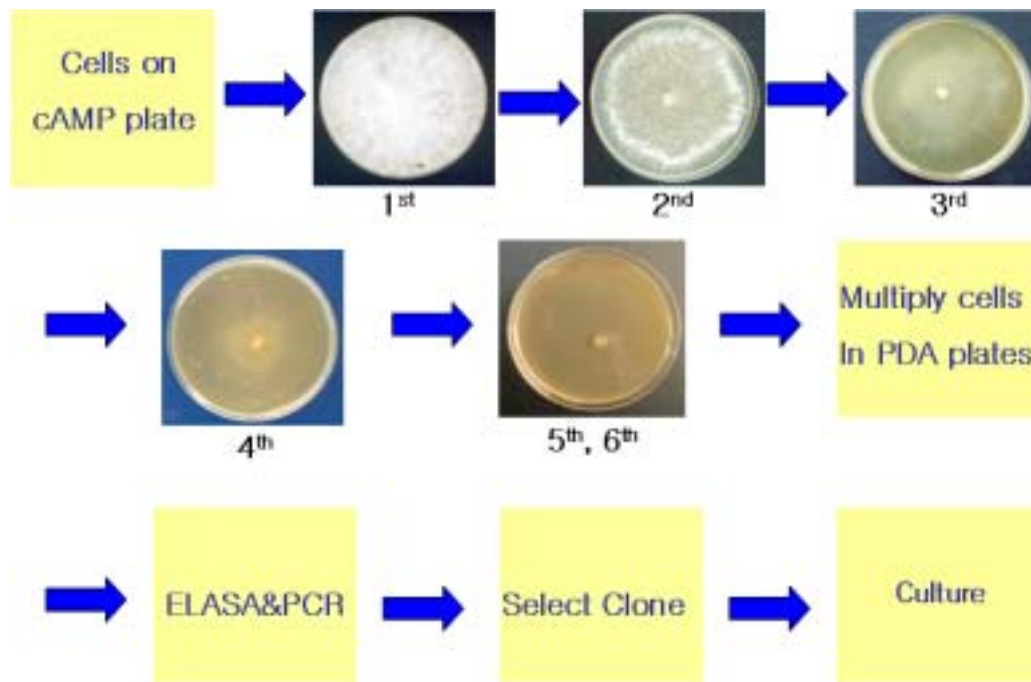


Fig.4. Sceme of virus curing

The mushroom hyphae were grown on the cAMP plates to cure viruses. The cAMP plates (1% Glucose, 2% L-Asparagine anhydrous, 2% Agar, 1mM cAMP and 75 μ g/ml Rifamycine) were used. Full growth of mycelium took 23days at the first passage while the mycelium in the last passage took more than 35days for full growth.

2) cAMP 배지에서 키운 균사체에서의 바이러스 유전체 분리

TAS-ELISA를 실험하기 위해 분리한 바이러스 입자를 포함하는 상등액을 이용하여 바이러스 유전체를 분리하였다. 세포를 파쇄하여 얻은 바이러스 입자를 포함하는 상등액에 동량의 saturated phenol을 처리하여 phenol extraction을 1회 하여 상등액을 얻었다. 이 상등액에 다시 동량의 phenol/chloroform/ isoamylalcohol (25:24:1/v:v:v) extraction을 1회 실시하여 바이러스 genome을 정제하였다. 여기에 sodium acetate를 0.1M되게 첨가한 다음 2.5배 부피의 100% ethanol로 genome fiber을 -20°C에서 overnight로 침전하여 핵산을 얻었다. 원심분리하여 genome pellet을 얻은 후 70% ethanol로 세척 한후 건조하였다. 건조된 pellet을 적당량의 DEPC 처리 3차 증류수에 녹여서 바로 RT-PCR에 이용하였다.

3) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

바이러스에 감염된 *F.velutipes*와 cAMP plate에서 계대후 PDA 배지에 증식한 *F.velutipes* 균사체에서 *F.velutipes* 유전체 및 바이러스의 유전체를 확보하였다. 이 유전체를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 이때 사용한 primer는 Table 2의 clone1 primer를 사용하였다.

100pmol의 reverse primer와 sample을 섞어서 65°C에서 그리고 OMIV-II는 100°C에서 각각 10분간 반응시켰다. 10분의 반응이 끝나면 얼음에 꽂아서 tube를 급랭시켜 reverse primer가 제 위치에 붙게 하였다. DNTP를 0.25mM되게 넣고 5× reaction buffer(250 mM Tris-HCl, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 1mM DTT를 넣고 SuperscriptTM II RNase H⁻ Reverse Transcriptase 200U를 첨가하여 50°C에서 한 시간 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA, 제작된 primer와 dNTP(0.25mM), 10× buffer(100mM Tris-HCl, 500mM KCl, 150 mM MgCl₂)를 넣고 TAKARA사의 Ex taq polymerase(5U)를 넣어 섞은 다음 PCR 반응을 실시하였다. PCR 반응의 조건으로는 95°C 5분 동안 1회 반응하고 95°C 15초, 56°C 45초, 72°C 1분의 조건에서 15회 반응 뒤 72°C에서 5분 동안 1회 반응하였다.

생성된 PCR product는 1% agarose gel 상에서 100V로 전기영동 하여 ethidium bromide solution(0.5µg/ml)에 염색하여 254nm 자외선 조명하에서 형성된 product를 확인 하였다.

4) 28s Ribosomal RNA gene의 PCR

각 시료의 virus curing test에서 virus의 양이 줄어드는 것을 확인함에 있어서 시료세포의 양이 동일한 조건에서 수행 되어져야 한다. 이에 시료세포의 양이 동일함을 알아보기 위하여 각 시료에서 동일량의 세포를 분쇄하여 genome을 분리하고 28s ribosomal RNA gene을 증폭하여서 그 양을 비교하였다.

먼저 각각의 원균과 각 계대별균사 그리고 negative control로 사용한 균주의 균사를 0.2g씩 모았다. 이 균사를 액체 질소를 이용하여 조직을 파쇄한 후 Qiagen사의 DNeasy Plant Mini kit를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다.

분리한 genomic DNA를 이용하여 *F.velutipes*의 특정 부위를 증폭하였다. 증폭할 특정 부위는 NCBI homepage의 Genbank reserch를 통해 28s ribosomal RNA gene을 선택하였다. (gene bank locus AY207200)

이 부위는 전체 bp로 구성되어 있으며, 3' 끝의 20bp(5'-AAAATGGCCCACTAGAAACT-3'; Reverse primer)와 5' 끝의 21bp(5'-AGGATTCCCCTAGTAACTGCG-3' ; Forward primer)를 제작하였다. Template와 primer (100pmole/ml), dNTP(0.25mM) 그리고 buffer(10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 15mM MgCl₂)를 첨가하여 TAKARA사의 Ex Taq Polymerase(5 Unit)를 넣고 PCR반응을 시켰다. 반응 조건으로는 95°C에서 5분간 1회 반응 후, 95°C 30초, 48°C 30초, 72°C 2분을 25회 반응 후, 72°C 10분으로 반응을 마무리 하였다. 생성된 PCR product(1076 bp)는 1% agarose gel상에서 확인하였다.

제 2절 연구내용 및 결과

가) 바이러스 순수분리

1) 바이러스 입자와 coat protein 분리

정상적으로 잘 자라지 못하는 팽이버섯(*Flammulina velutipes*)으로부터 바이러스를 분리하였다(Fig.5). 50% cesium chloride (CsCl : 1.585g/cm³) 용액에서 초원심분리 한 뒤 750 μ l씩 16개의 fraction을 받았다. 이 fraction을 다시 초원심분리 한 뒤 pH7.5의 TE buffer로 현탁해 바이러스를 순수 분리 할 수 있었다. 바이러스의 coat protein의 polypeptide 정보를 알기 위하여 SDS-PAGE를 하였다. 이 결과 10 - 15 fraction에서 polypeptide가 확인 되었다. 이 결과 바이러스의 coat protein은 분자량이 60kDa인 polypeptide임을 알 수 있었다(Fig.6).

전자현미경에서 검경한 결과 이 바이러스는 구형으로 그 크기는 약 20nm이었다 (Fig.7)

2) Virus genome의 분리

50% cesiumchloride (CsCl : 1.585g/cm³) 용액에서 초원심분리 한 뒤 750 μ l씩 16개의 fraction을 받았다. 각각의 fraction의 용액을 phenolextraction하고 agarose gel electrophoresis를 통해서 핵산을 확인 하였다(Fig.8). 바이러스의 핵산은 SDS-PAGE를 하여 coat protein이 확인된 10 - 15 fraction에서 나타났다. 확인된 핵산이 RNA인지 DNA인지 알아 보기 위해 DNaseI와 RNase A를 처리하였다. 이 핵산에 DNaseI을 처리했을 때는 어떠한 분해도 일어나지 않았으며 RNase A를 처리했을 때는 저염농도 조건 (low saltcondition : 0.05M NaCl), 고염농도 조건 (high salt condtion : 0.05M NaCl) 에서 모두 핵산이 분해 되었다. 이 결과는 바이러스의 유전체는 ssRNA로 되어 있음을 보여준다고 하겠다. 또한 이 바이러스는 4.0과 1.5kb 2개의 각기 다른 크기의 ssRNA를 encapsidation하고 있었다(Fig.9). 우리는 이 바이러스를 FvSV(*Flammulinavelutipes Spherical Virus*)라고 명명하였다.

이 바이러스가 특정 팽이버섯에서만 존재하는지를 알아보기 위해 일반시중에서 유통되고 있는 팽이버섯을 생산회사별로 구입하여 위와 동일하게 핵산실험을 하였다. 그 결과 동일한 size의 ssRNA bands가 확인되었다.(Fig.10) 하지만 다른 size의 ssRNA bands도 나타났는데 이는 한 바이러스가 변종된 것인지 다른 바이러스와 co-infection된 것인지를 알아볼 필요가 있었다. 하지만 이 논문에서는 알아보지 못했고 major

bands로 실험을 진행하였다.

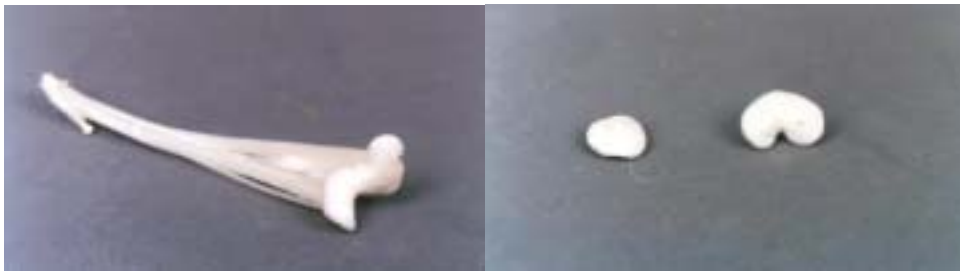


Fig.5. Possible viral diseasesymptoms of *Flammulina velutipes*

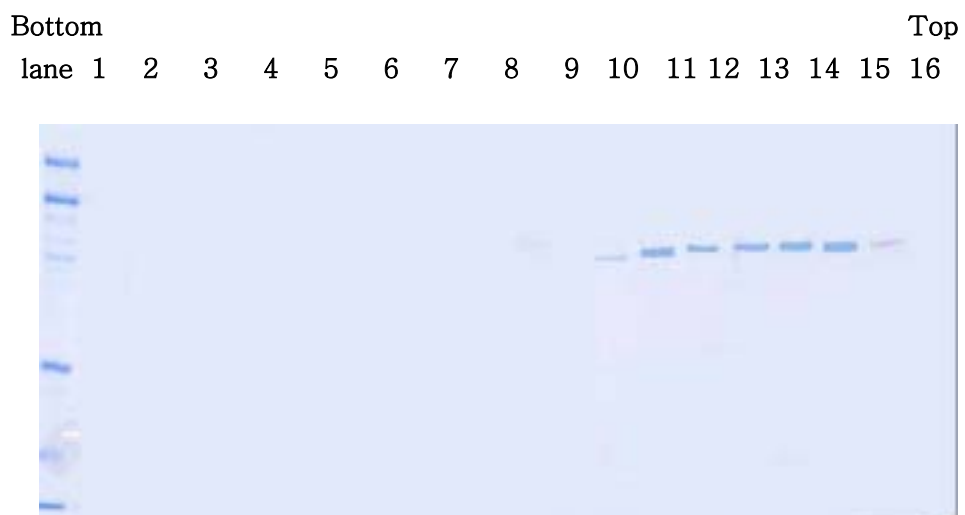


Fig.6. Polypeptide of viral coat protein in SDS-PAGE. Analysis showing the distribution of the viral coat protein following equilibrium centrifugation in 50%(1.585g/cm³) cesium chloride. Viral coat protein were denatured for 5 min at 95°C in 50Mm Tris-Cl, pH 6.8, 100mM dithiothreitol, 2% SDS, 10% glycerol, and 0.1% bromophenol. Denatured proteins were separated by 12% polyacrylamide gel electrophoresis. Gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

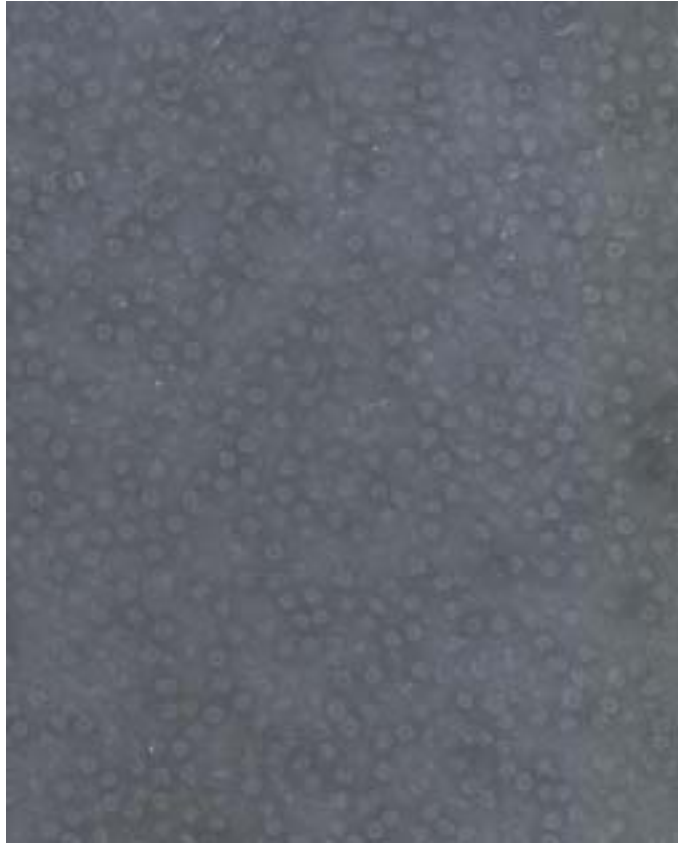


Fig.7. Electron micrography of *Flammuline velutips* Spherical Virus(FvSV).

FvSV is a isometric aqueous uranyl acetate pH4.5

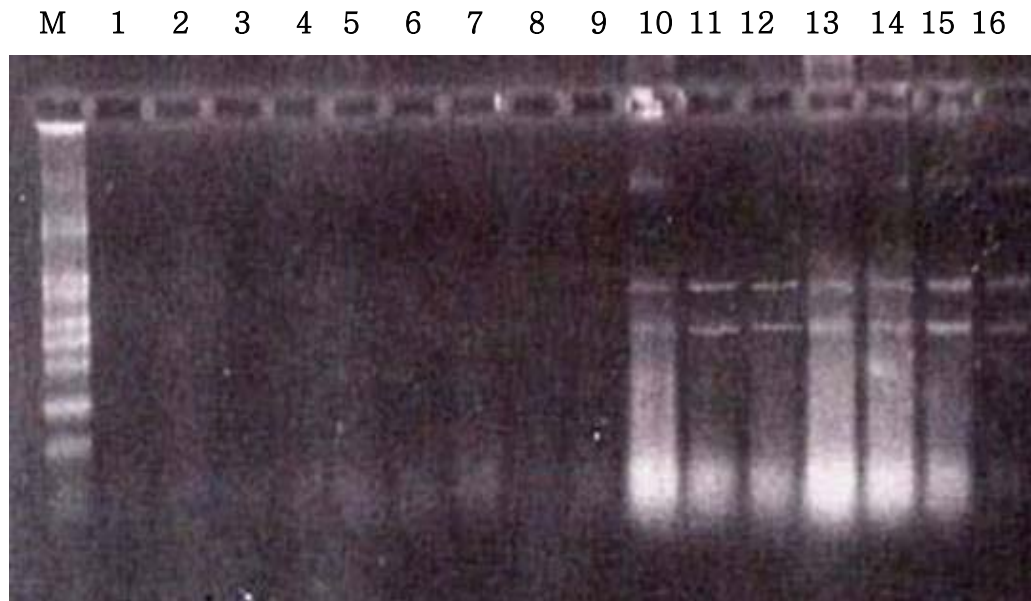


Fig.8. The viral nucleic acids on 1% agarose gel electropforesis. The viral nucleic acids were extracted by phenol from the fraction prepared by CsCl ($1.585\text{g}/\text{cm}^3$) equilibrium ultracentrifugation and precipitated with ethanol. M ; Perfect RNA ladder(Takara).

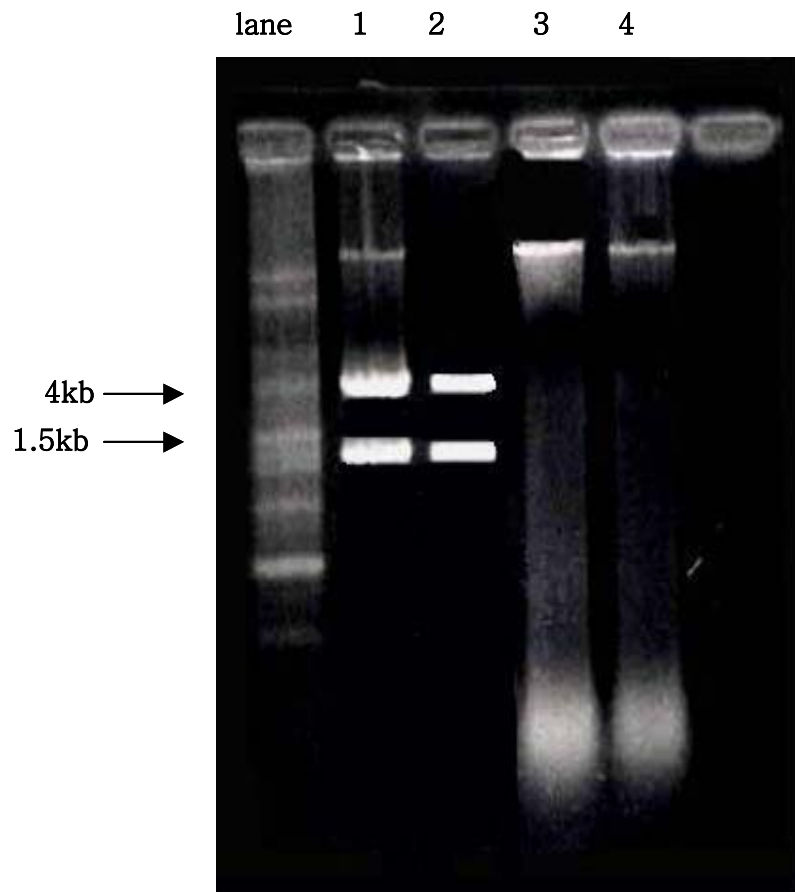


Fig.9. Ionic strength-dependent sensitivity of purified viral nucleic acids to hydrolysis by RNase A and DNase I. Viral nucleic acids were incubated without nuclease (lane 1), with DNase I (10U/ml ; lane 2) in 10mM MgCl₂, with RNase A (10 g/ml) in 0.5M NaCl (lane 3) or 0.05M NaCl (lane 4) for 30min at 37°C. M ; Perfect RNA ladder (Takara).

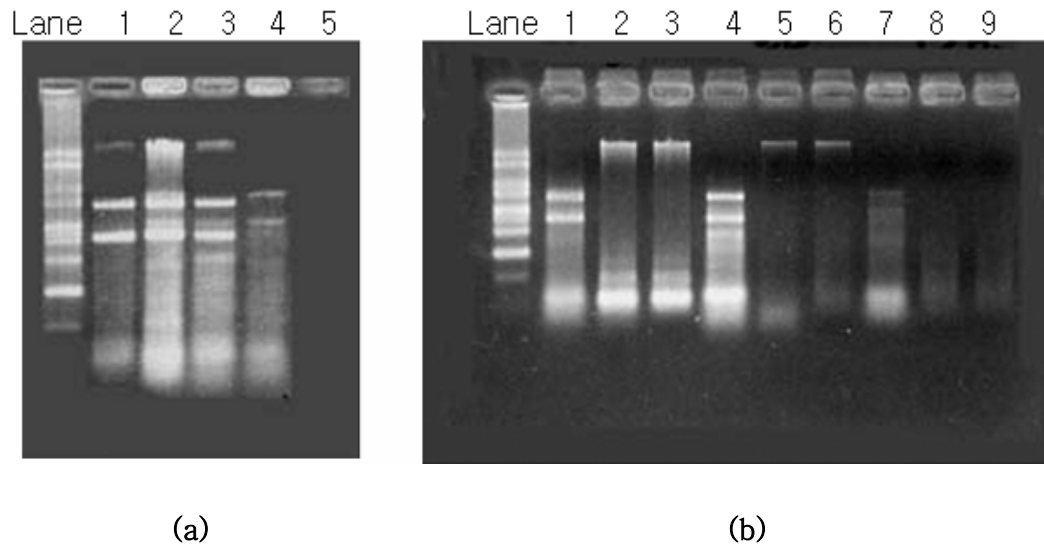


Fig.10. Ionic strength-dependent sensitivity of purified viral nucleic acids to hydrolysis by RNase A and DNase I.

(a) Lanes:1,2,3,4,5; nucleic acids of FvSV extracted from diseased *Flammulina velutipes* collected from Green peace Co. , Daeheung Co. , Paldo Co., Honam Co., and Mulebanga co. respectively. M ; Perfect RNA ladder(Takara).

(b) Lanes:1,4,7; viral nucleic acids were incubated, with DNase I (10U/ml) in 10Mm MgCl₂, 2,5,8; with RNase A (10 g/ml) in 0.5M NaCl and 3,6,9; with RNase A (10 g/ml) in 0.05M NaCl for 30min at 37°C. M ; Perfect RNA ladder (Takara). Samples collected from different commercial componies.

(Lanes: 1,2,3; Daeheung Co., 4,5,6 Paldo Co. and 7,8,9; Honam Co.)

나) cDNAsynthesis

1) FvSV genome ssRNA(4 및 1.5kb) cDNA 합성 및 sequencing

cDNA synthesis kit (Takara)를 사용하여 cDNA 합성을 하였다. Radom nonamer를 primer로 해서 reverse transecriptase를 이용하여 first strand cDNA를 합성하고 *E.coli* Polymerase I으로 second strand DNA를 합성한 뒤 T4 DNA Polymerase로 cDNA를 평활말단화하였다 (Fig. 11). 합성된 cDNA를 *EcoRI* adaptor와 ligation하여 plasmid pUC19으로 cloning하였다. 이것을 *E.coli* cell (JM83 혹은 XL1-blue)로 electroporation하여 plasmid를 증식시키고 분리하였다. 이렇게 하여 많은 clones를 얻을 수 있었다. 그 중 RNA1, RNA2 모두에 해당하는 두개의 clones(Fig.12)을 얻을 수 있었다. clone 1과 clone 2를 이용하여 더 큰 조각의 cDNA를 얻기 위하여 clone1의 sequence에서 5' -GCCGGAATTCAAACCTCTATTCTGTGCGTAGCTC-3' 를forward primer로, clone2의 sequence 5' - GCCGGAATTCCAAGCCTTTGCTCAAGAAGCTTTT-3' 를 reverse primer로 사용하여 RNA1 및 RNA2를 PCR하여 더 큰 조각의, 약 700bp의 cDNA를 확보할수 있었다(Fig.13). RNA1, RNA2 모두에서 동일한 product를 얻었고 이 결과를 통해 RNA2가 subgenomic RNA의 가능성이 높음을 알 수가 있었다. 이 primer로 시중의 버섯을 수집하여 RT-PCR로 진단한 결과 병든 팽이에서는 모두 700bp의 band가 나타났으며 건전한 팽이에서는 이들 band 가 나타나지 않아(Fig.14) 이상에서 사용한 primer가 FvSV의 진단에 사용할 수 있는 적절한 primer로 생각된다. 이 700bp cDNA 조각을 nucleotide sequencing 하고 있으며 이는 clone1과 clone2사이에 약 100bp가 존재함을 보여준다고 하겠다(Fig.15).

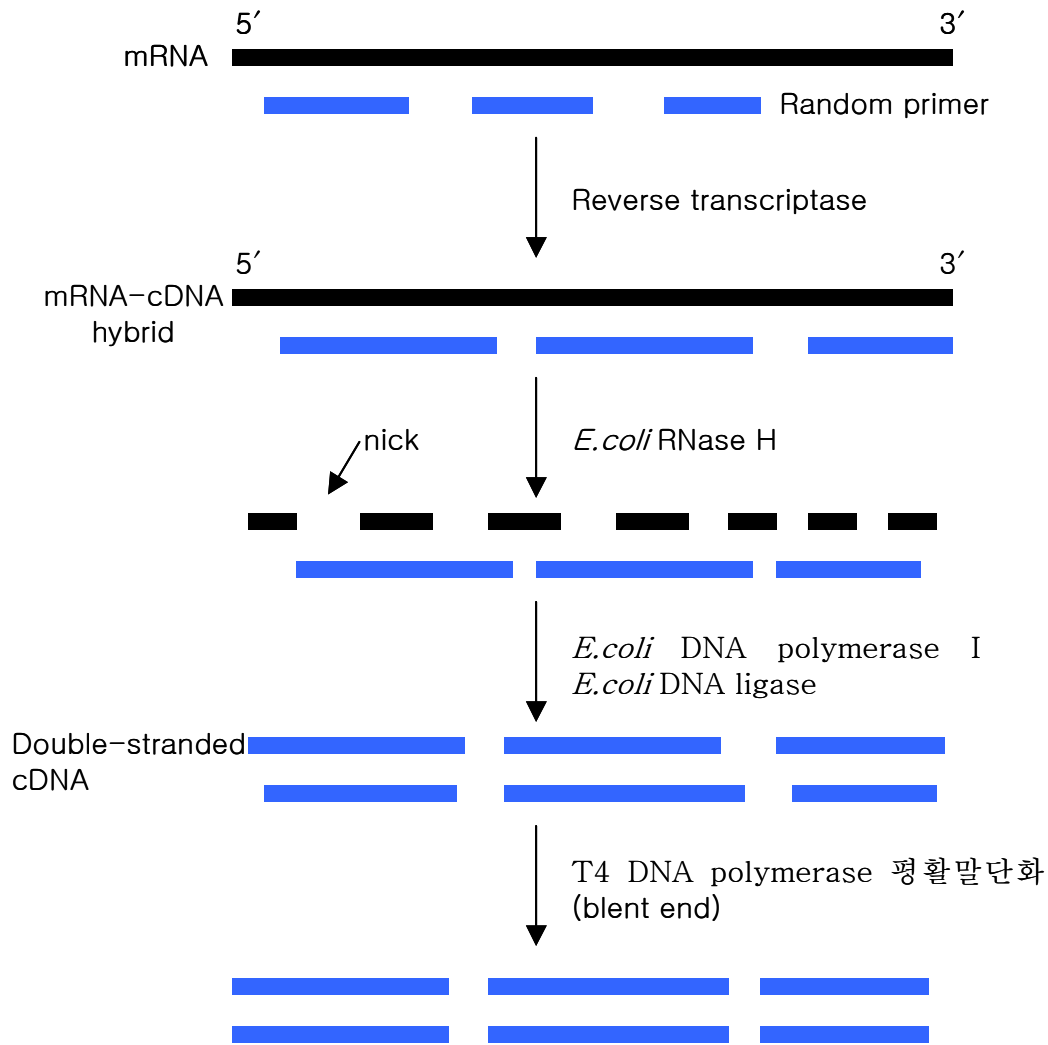


Fig.11. Strategy for random primer cDNA cloning of FvSV genomic ssRNA.

Clone1:

CACGTACCCAAACCTCTATTCTGTGCGTAGCTCTATTTTCCTCT
ACTCGTGACAATCCACTCCACCCCAATCTAACCGCCATATCTA
GCCCAGCCTGTCCACGAGCGTTACGCAGAGAAACCCGCAATGT
CGACCATCATCCCAATACTGCCAGGCCGATGCCCCACCAATC
AAGCGGTCCTCATCGCATTCTCCAAGGCCACTTGAACGTAAGC
TCGAAGGTAACCTTTGCCGCATCCAGTGTTTAATCAATCAAC
TGAACCTTCATAGAGTTGGAACAAAATTCTATGTCGCCCGTG
ACTGCGACCTGCAACACAGCCAACATGTGGCAGAGCCACACTA
CTCGGCAATGCCGAGTTGGCTAGCGTGACGTC

Clone2:

CTTCAAGCCTTTGCTCAAGAAGCTTTTTGAGCTGTTTCGGGC
GGGGTTGCGTGTTTCGGACCAGCATGTTGATGCGATGGAGTG
GGTTGGTGAATTTGGGTTGACTGGGTATGAGCCGGCTGATTG
GGGGATTAGGCGCAAGGCGCGGGAGGCTCGGTTGAAGAGCGG
GGAGTGG

Fig. 12 . RT-PCR sequences of clones from RNA1 and RNA2.

Table 2. The primers were used for RT-PCR (RNA 1, 2). Viral RNA was primed with specific oligonucleotides complimentary to internal regions of viral genomic RNA.

Clones	primers
RT-PCR clones 1	5'-GCCGGAATTCAAACCTCTATTCTGTGCGTAGCTC-3' 5'-GCCGGAATTCAGCCAACTCGGCATTGCCGAGTAG-3'
RT-PCR clone 2	5'-GCCGGAATTCACTCCCCGCTCTTCAACCGAGCCT-3' 5'-GCCGGAATTCCAAGCCTTTGCTCAAGAAGCTTTT-3'
RT-PCR clone	5'-GCCGGAATTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' 5'-GCCGGAATTCACTCCCCGCTCTTCAACCGAGCCT-3'

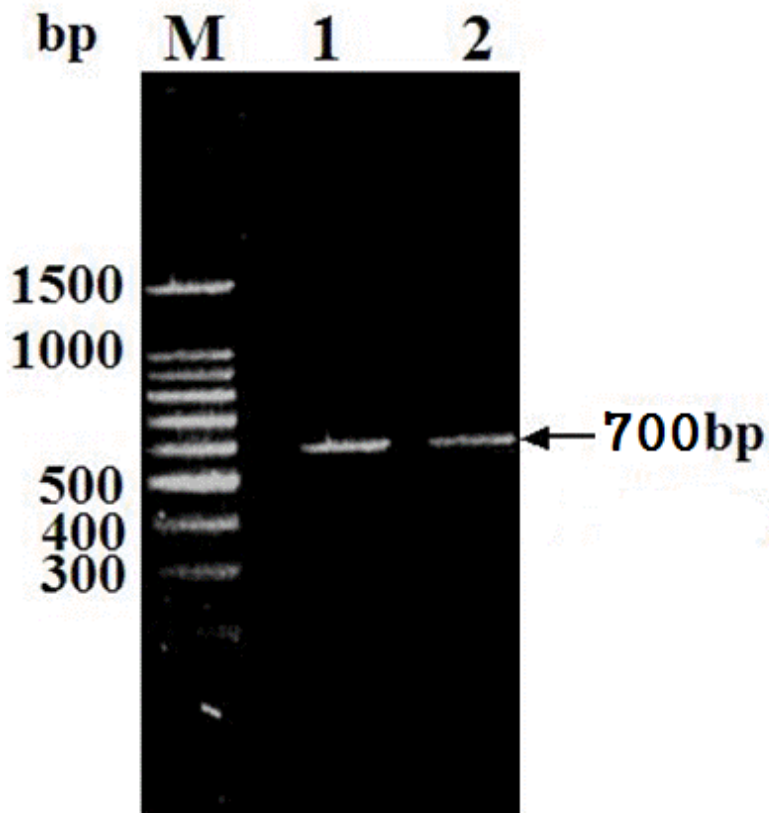


Fig.13. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product of FvSV genomic RNA1 AND 2. RT-PCR products analyzed on 2% agarose gel and stained with ethidium bromide.

M ; 100bp DNA ladder

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

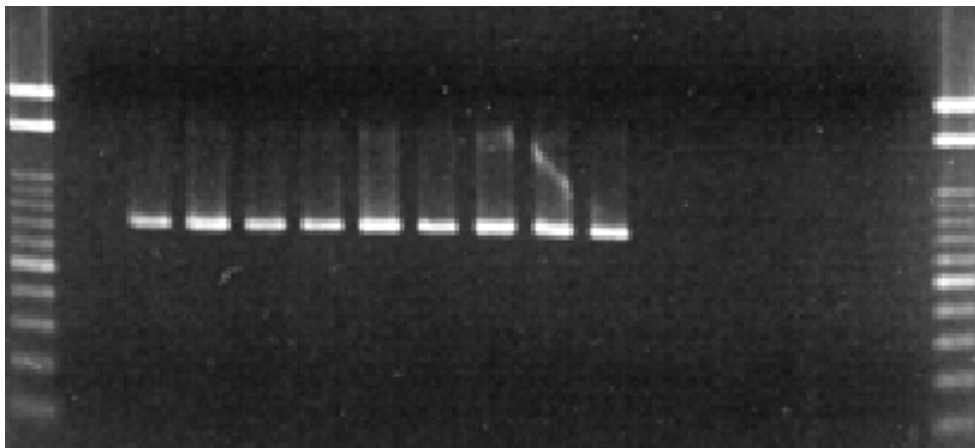


Fig.14. Identification of FvSV infection of *F.velutips* by RT-PCR using specific for FvSV.

Lane M ; 100bp DNA ladder(TOYOBO), 1 ; healthy isolate, 2 ; purified FvSV, 3 to 10; diseased isolates.

2) 3' RT-PCR clones

그리고 3' 끝부분도 RT-PCR로 증폭시켰다(Fig.16). Random primer를 통해 얻어진 clones중 sequence에 stop codon이 있는 조각이 있어 이를 3'쪽이라 생각했고 그 조각으로 3'끝에 poly(A)유무를 확인하는데 사용 할 수 있었다.

3' 끝에 poly(A)가있는지 없는지 알아보기 위해 3' 끝에 polyadenylation을 하지 않고 RT-PCR을 해보았다. *EcoRI* 제한효소 site를 넣어 제작한oligo(dT)primer로는

5' -GCCGGAATTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT- 3'

와 viral genomic RNA와 상보적인 specific primer인

5' -GCCGGAATTCCTCCCGCTCTTCAACCGAGCCT-3'를 이용하여 cDNA를 합성하였다.

RNA1과 RNA2 각각을 elution하여 RT-PCR을 하였고 동일한 products를 얻었다(Fig.17). 이렇게 증폭된cDNAs를 cloning하였다.

이 결과로 FvSV의 RNA1과 RNA2의 3'에 poly(A)가 존재할 가능성이 높다고 사료된다. 이는 3'end의 sequencing이 끝나면 밝혀질 것이다.

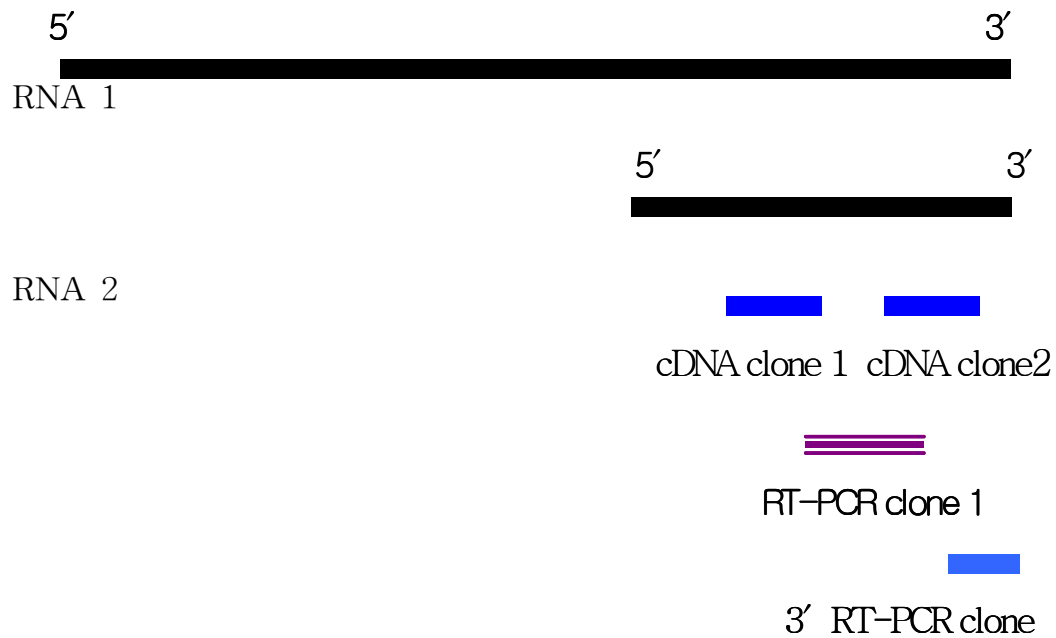


Fig.15. Alignment of the cDNA clones used to characterize FvSV RNAs. Viral RNA was primed with random nanomer or with specific oligonucleotides (Table 1)complimentary to internal regions of viral genomic RNA and oligo(dT). 3' end of FvSV RNAs were polyadenylated.

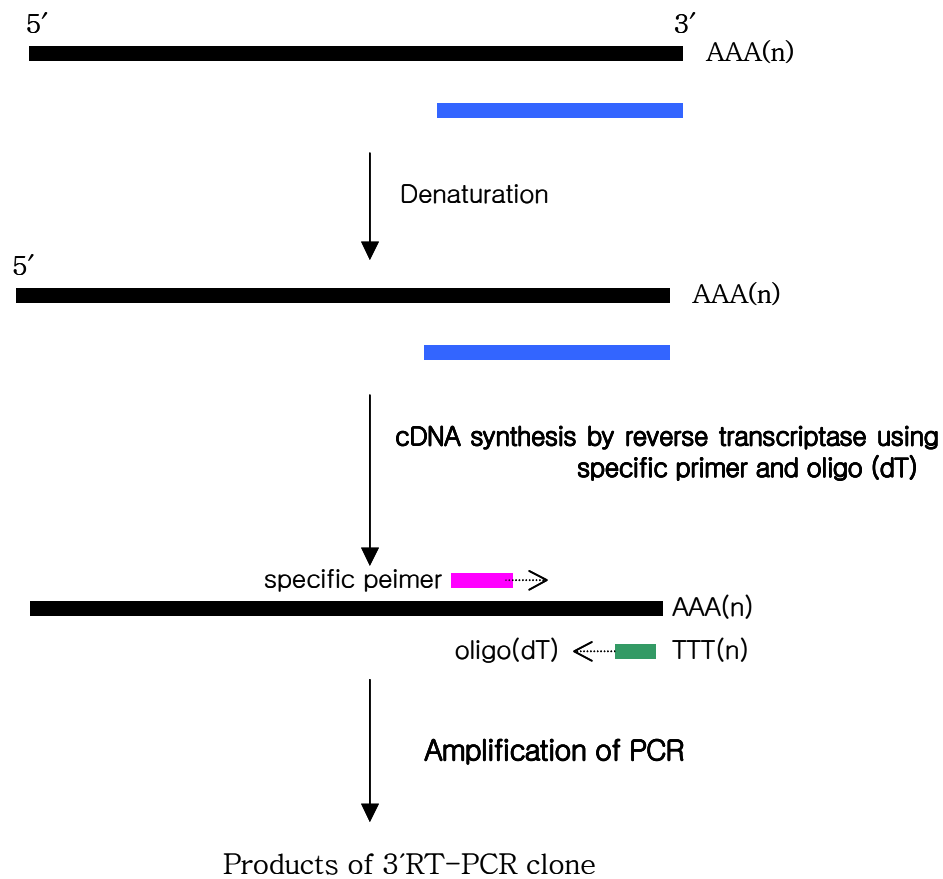


Fig.16. Strategy for 3' RT-PCR clones.

Oligo(dT) and specific primers are contained *EcoRI* restriction enzyme site. Viral RNA was primed with specific oligonucleotides (Table 1) complementary to internal regions of viral genomic RNA and oligo(dT). RT-PCR products were produced using specific primer and oligo(dT).

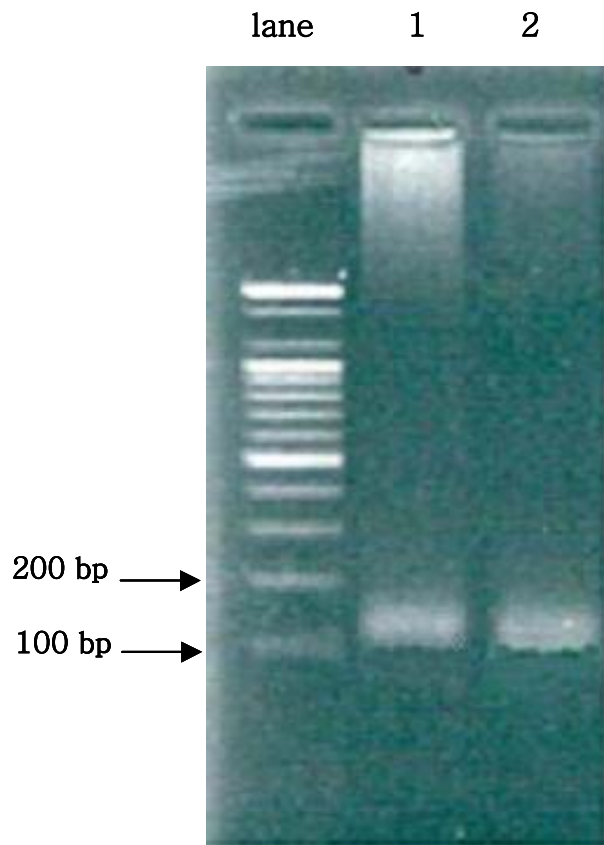


Fig.17. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of the 3' ends of FvSV RNA1 (lane1) and 2 (lane2) .

RT-PCR products analyzed on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. 100bp DNAladder was used as a DNA size marker (Takara).

다) 단클론 항체(monoclonal antibody) 합성

새롭게 바이러스가 분리되어진 것을 확인하고 FvSV의 coat protein으로 FvSV에 대한 단클론 항체를 합성 하였다. FvSV에 대한 단클론 항체를 여러 개 얻을 수 있었는데 이 중 ELISA test를 실시하여 490nm에서 OD값을 측정한 결과 OD값이 0.4이상 되는 항체 3개를 골라냈다. 각각의 클론을 ELISA와 western blot analysis를 하여 그 특이성을 조사하였다. 그 결과 3개의 클론(#1, #2, #3)이 ELISA와 western blot analysis에서 FvSV 반응이 나타남을 확인하였다. Control로 이미 만들어진 다른 바이러스들의 monoclonal Ab를 사용하였다(Fig.18). 결과 OMIV-II에서 약간의 발색이 나타나는 것을 확인하였고 OD값으로도 측정되었다. 이는 FvSV coat protein이 OMIV-II의 coat protein과 어떤 연관성이 있을 것이라 추측이 되며 이는 FvSV coat protein의 amino acid sequencing을 통해 확실히 알 수 있을 것이다. 이들 각 클론들의 특이성을 확인한 후 3개의 단클론이 cloning된 hybridoma cell(1×10^7)을 BALB/c 암컷의 복강에 주사하여 약 일주일 후 쥐의 복강으로부터 복수를 얻어냄으로 대량 분리하였다.

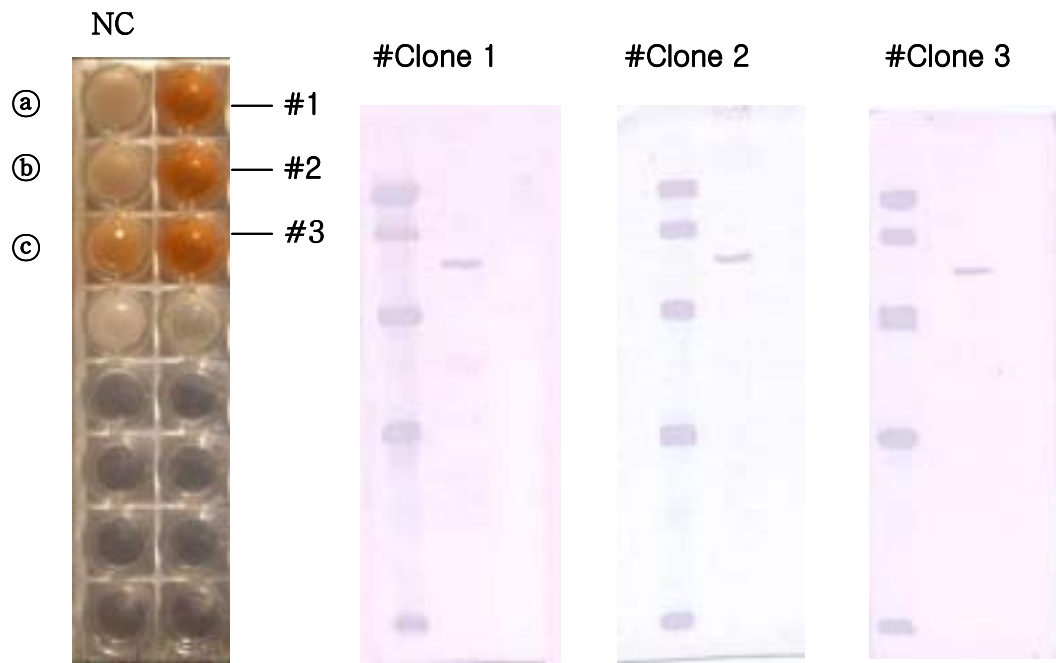


Fig.18. ELISA (a) and Western blot analysis(b) using three monoclonal antibodies against FvSV. Monoclonal antibodies of clone #1, #2, and #3 react with FvSV in both ELISA and western blot analysis.

NC : Monoclonal antibodies against oyster mushroom spherical virus(OMSV); (a), oyster mushroom isometric virus- I (OMIV- I); (b), oyster mushroom isometric virus- II (OMIV- II); (c).

라) 폴리클론 항체(polyclonal antibody) 합성

FvSV 바이러스로 면역된 토끼에서 얻은 serum으로 polyclonal antibody에 대한 반응성을 조사하였다. 반응성은 ELISA로 test하였는데, 만들어진 serum을 2배씩 희석하여 실험하였다. 그 결과 그림에서 보는 바와 같이 만들어진 폴리클론 항체 역가(titer)는 16400배 이상임을 알 수 있었다(Fig.19). 만들어진 단클론 3개 중 역가가 가장 높은 하나의 클론에서 만든 antibody로 western blot으로 특이성을 실험한 결과 FvSV에 반응하여 그 특이성을 확인 할 수 있었다. 3개중 하나의 클론은 OMIV-II와 cross reaction이 일어나서 ELISA kit를 만드는데 적합하지 않았으며 나머지 두개의 클론은 cross reaction이 일어나지 않아 ELISA kit제조용으로 사용 할 수 있었다. 또한 만들어진 polyclonal antibody는 FvSV에 Ag-Ab(항원-항체)반응을 보였고, 다른 바이러스(OMSV, OMIV-I ,OMIV-II ,OMIV-III)에 cross-reaction이 일어나지 않음을 확인하였다(Fig.20). 결론적으로 FvSV의 단클론, 폴리클론항체가 만들어졌음을 알 수 있었으며 이를 이용하여 TAS-ELISA kit를 제조하였다.



Fig.19. Titeration of polyclonal antibody against FvSV by ELISA. Rabbit anti-serum was diluted by two times. 16400 times diluted serum(→) can be detected FvSV

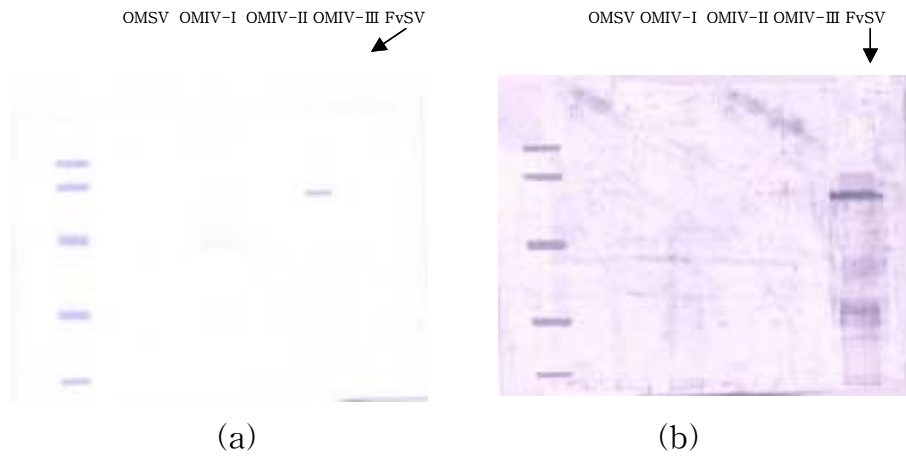


Fig.20. Western blot analysis of monoclonal(a) and polyclonal antibody (b) against FvSV. Viral coat proteins were separated in 12%SDS-polyacrylamide gel and second antibody were used alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG(a) and donkey anti-rabbit IgG(b).

마) Triple Antibody Sandwich ELASA(TAS-ELISA) Kit 합성

Fig.2 에서 보여준 방법으로 anti-FvSV monoclonal 및 polyclonal antibodies 를 이용하여 TAS-ELASA Kit를 합성하였다(Fig.21). 이 합성한 TAS-ELASA Kit로 다음의 무바이러스 균사 선발에 사용하였다.

바) 단클론 항체를 이용한 팽이버섯 바이러스 ,FvSV, 진단용 Rapid kit 합성

본 실험실에서 합성한 3종의 anti-FvSV monoclonal antibody를 이용하여 벤처기업인 Anigen에서 간이 진단키트 sample을 합성하였다. 바이러스에 감염된 팽이세포 1g의 과쇄액을 3ml의 TE buffer에 혼합하여 Microfuse에서 2분 centrifuse하여 상등액을 kit의 입구에 pasteur pipet으로 3-5방울 떨어뜨리면 5~20분후 2개의 line이 나타난다. 바이러스에 감염되지 않은 세포의 과쇄액은 line 1개 나타나 팽이 공장에서 쉽게 사용할 수 있을 것이라고 생각된다(Fig. 22).

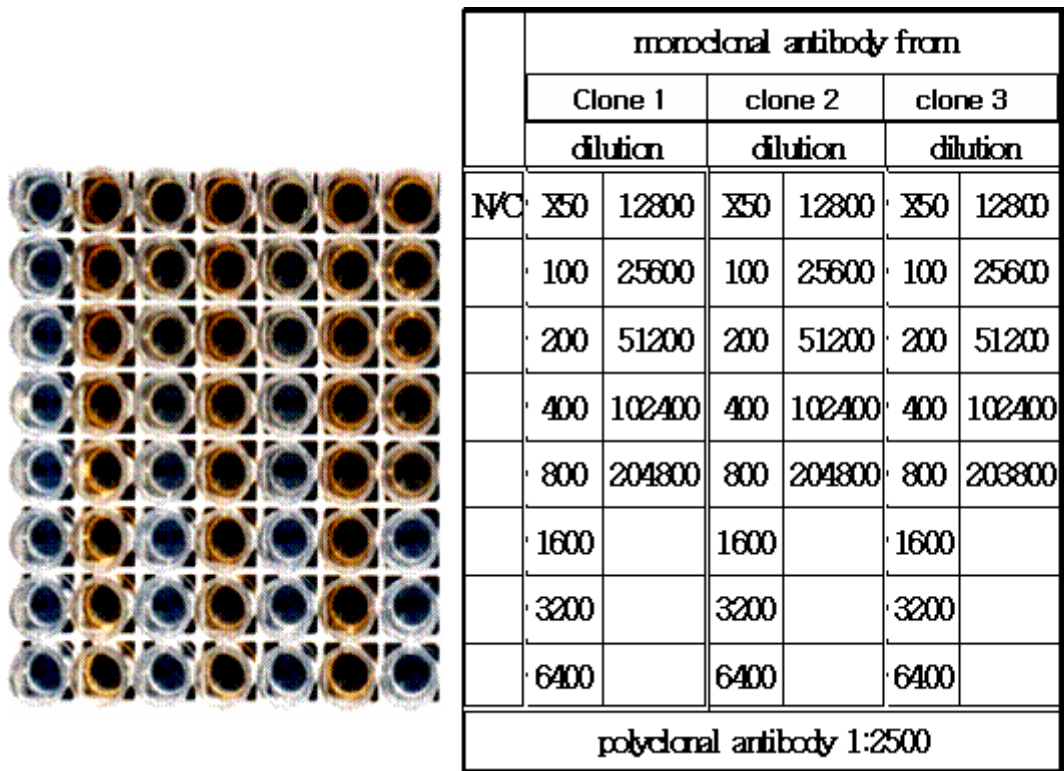


Fig.21. Sensitivity of triple antibody sandwich-ELISA(TAS-ELISA) to detect FeSV.

Monoclonal and polyclonal antibodies against FvSV and peroxidase conjugated goat antibody were used. Sensitivity of TAS-ELISA was tested with purified virus solution. Monoclonal antibodies of clone 1, 2, 3 were diluted initially by 50 times and subsequently by two times. Polyclonal antibody used 1:2,500 dilution.

N/C : negative control

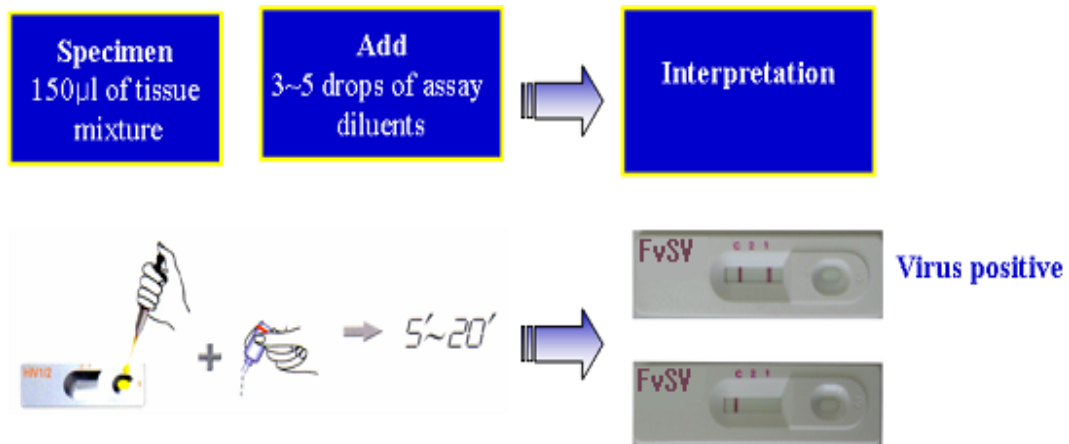


Fig.22. Immunochromatography rapid kit for FvSV diagnosis

사) 바이러스에 이병된 팽이 균사로부터 FvSV 퇴치

1) cAMP plate에서의 균사 성장

버섯에서 조직을 떼어내어서 PDA 배지에 접종하여 얻은 균사를 바이러스의 성장을 억제 한다고 알려진 cAMP plate(Table. 1) 에서 배양하였다. cAMP plate 상에서 균사는 전체적으로 자라는 속도가 매우 느려졌다. 균사가 9cm plate의 가장자리까지 자라 나오는데 걸리는 시간이 1차 계대 배양시에는 23일정도 소요되던 것이 5차,6차 계대 배양에서는 35일이상이 걸려야 균사가 가장 자리에 까지 자람을 확인할 수 있었다. 또한 처음에는 균사가 일반적인 PDA 배지에서 자라는 것과 비슷한 밀도로 자라다가 계대가 계속됨에 따라 균사의 밀도는 아주 낮아졌다. PDA 배지에서는 균사가 배지 표면에 붙어서 자라는 것이 일반적이었지만 cAMP plate에서는 계대가 계속되면 균사가 배지 표면에 붙는다고 보다는 아주 적은 밀도의 균사가 공중에 부양되어 있는 것처럼 보였다(Fig23.). 각 계대별로 cAMP plate에서 균사가 확인되면 가장 자리의 균사를 1cm의 disc로 잘라서 PD(potato dextros) 및 PDA(potato dextrose agar) 배지에 접종하였다. cAMP plate에서 잘 자라지 못하고 낮은 밀도로 느리게 자라던 균사들이 PDA배지에서는 원래의 균사와 별 차이 없이 자라는 것을 확인하였다(Fig.24). 이 plate에서 균사를 회수하여TAS-ELISA와 RT-PCR을 이용하여 바이러스 검사를 하는데 이용하였다.

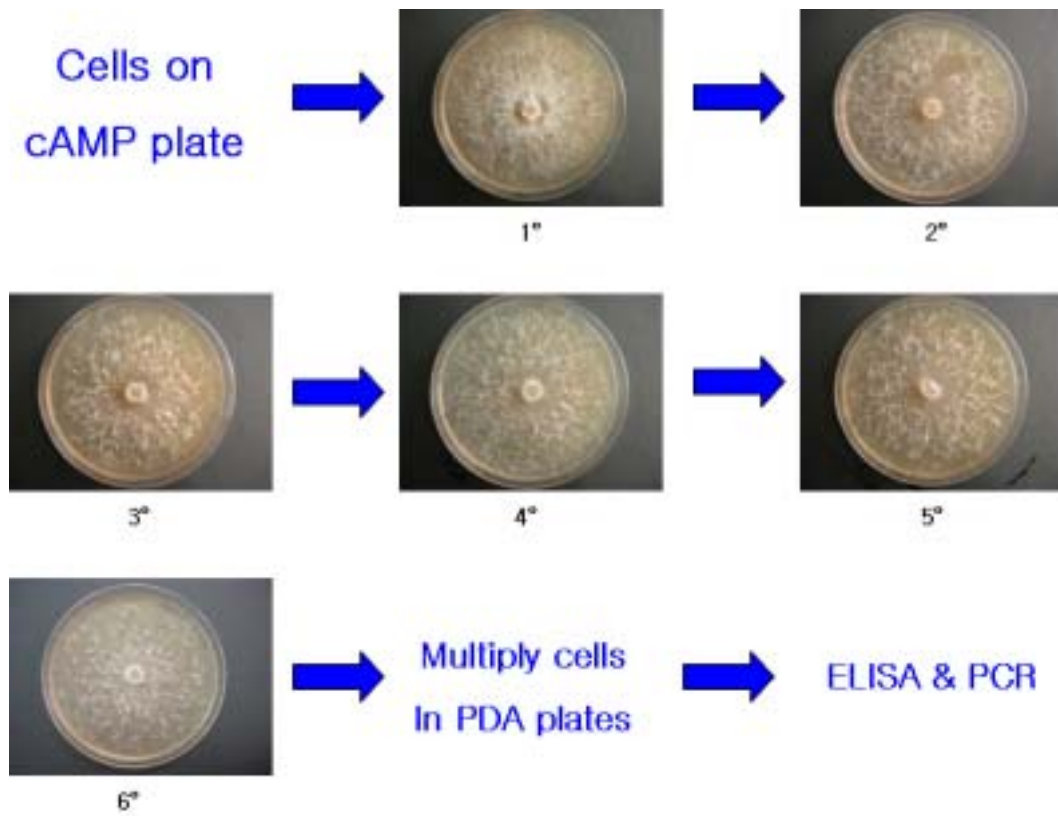


Fig.23. *F.velutipes* mycelial culture on cAMP plates.

1°,2°,3°,4°,5°,6° ; *F.velutipes* mycelial plugs were successively cultured on cAMP plate from One to Six times, respectively.

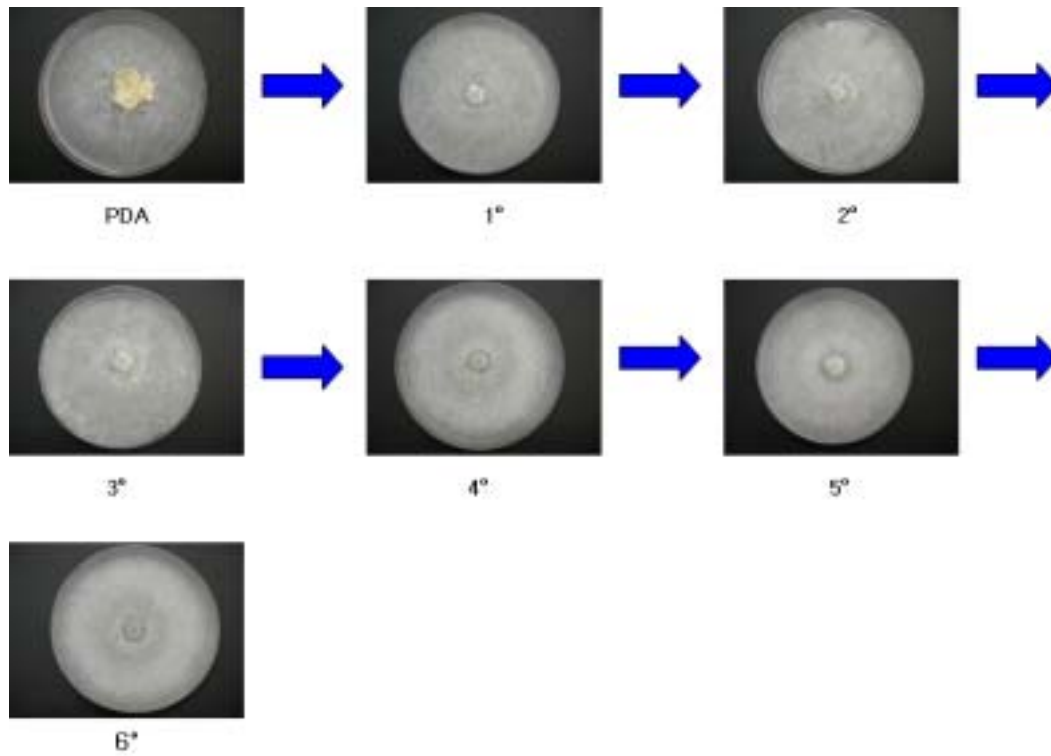


Fig.24. *F. velutips* mycelia on PDA after growing on cAMP plates. 1°,2°,3°,4°,5°,6° ; *F.velutips* mycelia were successively transferred on cAMP from 1 to 6 times, respectively, and finally on PDA

2) TAS-ELISA Test 및 RT-PCR로 무바이러스 균주 선발

CAMP plate에서 계대 배양하여 바이러스를 curing 한 후 PDA 배지에 증식한 균사를 파쇄하여 세포용액을 얻었다. 본 실험실에서 제조한 바이러스 검증 키트를 이용하여 바이러스 검사를 하였다. 1차에서 6차에 걸쳐 cAMP plate에서 계대 배양횟수가 증가 할 수록 팽이 균사내의 바이러스 량이 줄어들음을 ELISA-Reader로 값을 측정하여 확인할 수 있었으며(Fig.25) 본 연구에서 개발 한 FeSV 특이 primer 를 이용한 RT-PCR에서도 확인할 수 있었다(Fig.26). 이 결과로 cAMP plate에서 팽이 균사를 5대이상 계대 배양 할 경우 팽이 균주 내의 FeSV를 퇴치할수 있음을 알 수 있었다.









P/C		0.609
N/C		0.091
1°		0.875
2°		0.520
3°		0.372
4°		0.202
5°		0.079
6°		0.089

Fig.25. Triple antibody sandwich-ELISA(TAS-ELISA) test to detect mycoviruses *F. velutips* spherical virus(FvSV)

The well lanes were coated with FvSV monoclonal antibody.

P/C ; samples not treated with cAMP(positive control). N/C ; mushroom not infested by FvSV. Numbers 1°, 2°, 3°, 4°, 5° and 6° ; numbers of successive passages of virus infested *F. velutips* hypae on cAMP plates .

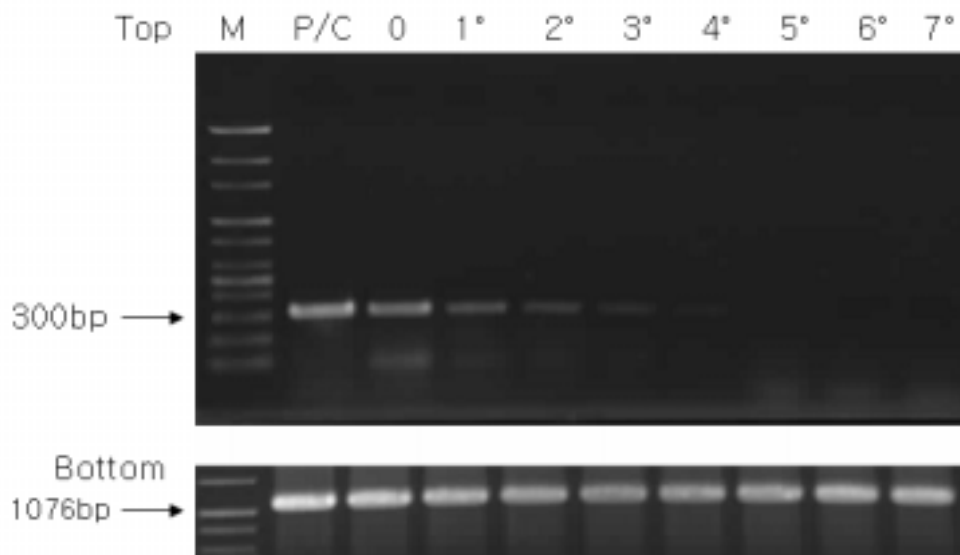


Fig.26 RT-PCR product analysis on 1% agarose gel electrophoresis

Top: RT-PCR product analysis to detect FeSV in *F. velutips* mycelia after successive passages on cAMP plate.

P/C ; purified virus

0 ; Original *F. velutips* cultivar. Gosa (virus-infested), not treated on cAMP plate

Number 1°, 2°, 3°, 4°, 5°, 6°, and 7°; Number of successive passages of virus-infested *F. velutips* c.v. Gosa mycelium on cAMP plates.

Bottom: Amplification of genomic DNA by PCR with 28S rRNA gene specific primer

3) 무 바이러스 종균 재배실험

위에서 언급한 cAMP plate에서 계대 배양하여 얻은 무바이러스 균사를 팽이버섯연합회 그린피스 3농장 실험실에서 종균으로 증식하여 실증재배실험을 하여 바이러스에 이병된 균사와 바이러스를 퇴치한 균사의 성장 상태를 관찰하였다. 이때 1,100ml의 배지가 들어가는 병에서 재배 하였으며, 2006년 5월 13일 종균집중, 2006년 6월 3일 균 굵기, 2006년 7월 1일 수확 (균굵기후 27일 재배) 한 팽이 버섯의 수확량 및 배양상태를 관찰하였다 (Table 3). 바이러스 퇴치용 종균이 279g, 바이러스가 이병된 종균이 270g의 수확을 할 수 있게 하여 그 수확량의 차이는 거의 없다고 하겠다. 그러나 바이러스가 퇴치된 종균은 그 버섯 자람이 2~3일 정도 빨라 (Fig. 27) 수확을 2~3일 정도 빠르게 할 수 있어 대량재배 농가에는 경제적으로 이익이 될 수 있다고 한다(팽이버섯 연합회 그린피스 연구소 이창윤 실장). 이는 팽이버섯 재배는 환경조절이 거의 완벽한 상태에서 함으로 팽이버섯은 환경에 민감한 바이러스병에 대한 피해가 크지 않음을 시사한다고 하겠다. 이때 수확한 바이러스 이병주(virus-infested)와 바이러스 퇴치주(virus-cured) 버섯으로 RT-PCR을 수행하여 버섯속의 바이러스함량을 측정 하였다. 바이러스 이병종균을 접종하여 얻은 버섯에서는 바이러스가 검출되었으며 바이러스 퇴치종균을 접종하여 얻은 버섯에서는 바이러스가 검출되지 않음을 알 수 있었다(Fig. 28).

이상의 실험결과를 종합하면 바이러스에 이병된(virus-infested) 팽이(*F. velutipes*) 균사를 cAMP 배지에 5회이상 계대배양하면 팽이바이러스(FeSV)를 퇴치할 수 있고, 이 바이러스를 퇴치한 균사(virus-cured)로 종균을 만들어 병 재배 할 경우 수확량에 있어서는 많은 차이가 나지 않으나 수확 일 수를 2~3일 단축 할 수 있고 수확한 버섯에서도 계속 바이러스가 검출 되지 않음을 알 수 있다.

Table. 3. : Harvest of virus - infested and virus - cured mushrooms.

	Virus-infested	Virus-cured
전체병수	32	32
평균수확량	270	279
흰곰팡이	0%	0%
검은병	0%	0%
물버섯	0%	0%
배양불량	0%	0%
세균병	0%	0%
기형버섯	0%	0%

참조:(2006년 5월 13일 접종, 06년 6월 3일 균긋기, 7월 1일 수확)

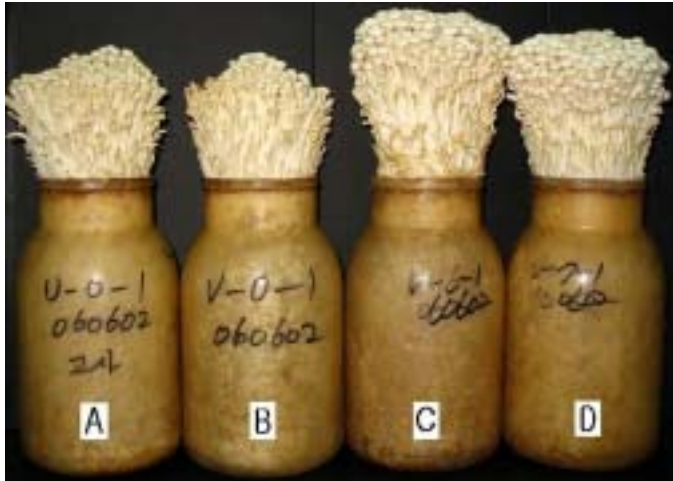


Fig.27. Mushroom production of virus-infested (A,B) and virus-cured(C,D) spawn. *Flammulina velutipes* spawns were inoculated in 1,100g sawdust-rice bran mediums. The spawns were inoculated in June 2nd, 2006, were scraped off in June 20th, 2006, and mushrooms were photographed in July 15th, 2006.

A; original spawns(cultivar. Gosa) from Green peace co., B; virus-infested Gosa, C; virus infested Gosa grown on cAMP plate 6 times successively, D; virus-infested Gosa grown on cAMP plate 7 times successively.

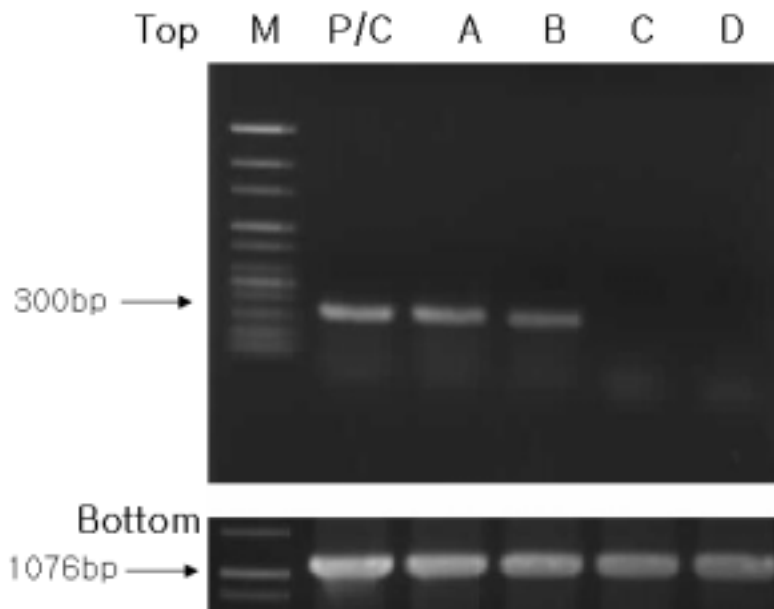


Fig.28.RT-PCR product analysis to detect FeSV in basidium after harvest of mushroom (from samples of Fig.27).

Top: RT-PCR product analysis using FeSV primer of mushroom

A ; produced by spawn of original *F. velutips* cultivar Gosa from GreenPeace Co.

B ; produced by spawn of virus-infested *F. velutips* c.v. Gosa, multiplied in our lab. not treated on cAMP plates.

C ; produced by spawn of virus-cured *F. velutips* c.v. Gosa made of 6times successive passages on cAMP plate.

D ; produced by spawn of virus-cured *F. velutips* c.v. Gosa made of 7times successive passages on cAMP plate.

P/C; Original spawn of *F. velutips* cultivar. Gosa (virus-infested), not treated on cAMP plate

Bottom: Amplification of genomic DNA by PCR with 28s rRNA gene specific primer

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	목표 달성도(%)
1차년도(2004)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 바이러스 유전체 cDNA 합성 ○ 바이러스 특성 규명 ○ cDNA nucleotide sequencing ○ Monoclonal Ab 생산 ○ Polyclonal Ab 생산 ○ 팽이종균 Rivavirin, cAMP 등 억제처리 	<ul style="list-style-type: none"> 100 100 100 100 100 100
2차년도(2005)	<ul style="list-style-type: none"> ○ cDNA nucleotide(계속) ○ 바이러스 유전체 organization 규명 ○ PCR용 특이 primer 제조 ○ TAS-ELISA KIT 제조 ○ 농가용 간편 바이러스 진단키트 합성 ○ 무바이러스 clone 선발 ○ 무바이러스 종균 증식 ○ 무바이러스 종균 실증실험 	<ul style="list-style-type: none"> 80 50 100 100 100 100 100 100
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 바이러스 진단용 TAS-ELISA 개발 ○ 바이러스 진단용 특이 primer 개발 및 유전체 규명 ○ 무바이러스 종균 개발 ○ 무바이러스 종균 실증실험 ○ 농가에 바이러스 진단용 간편 키트 공급 	<ul style="list-style-type: none"> 100 80 100 100 보급가능

가.연구계획대비 연구개발목표의 달성도

- .단클론 및 복클론 항체를 이용한 팽이버섯바이러스, FvSV, 의 TAS-ELISA 및 immurochromatography 를 이용한 간이 검정키트 완성.
- .FvSV 유전체 ssRNA의 cDNA 합성및 PCR 진단용 특이 primer 개발; 완료(그러나 FvSV genome의 full sequencing 이 되지않아 genome organigation 을 analysis 하기는 미흡함)
- .바이러스에 이병된 균사로부터 무바이러스 종균개발은 성공적으로 끝났으며 이의 재배실험을 팽이버섯 연합회그린피스 연구소에서 진행하였음

나) 관련분야의 기술발전예의 기여도

- 팽이버섯에서 최초로 구형의 ssRNA 바이러스를 순수분리하여 진단kit를 합성함.
- 바이러스에 이병된 버섯의 균사에서 최초로 바이러스를 퇴치함.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

● Immunochromatography 방법을 이용한 FvSV 진단용 rapid kit(간이진단 kit)는 벤처기업인 Anigen 회사에서 그 합성 특허를 가지고 있어 본 실험실에서 만든 anti-FvSV monoclonal antibody를 Anigen 회사에 공급하여 Anigen 회사가 만들어 팽이농가에 공급할 것임

● 본 실험실에서 개발한 TAS-ELISA 방법에 의한 FvSV 진단법은 눈으로(naked eye) 바이러스이병 여부를 알 수 있어 팽이버섯연합회의 연구소에서 ELISA reader가 없이도 사용할 수 있어 본 실험실에서 kit를 공급할 예정임. 대량 screening에 적합할 것으로 사료됨.

● FeSV 유전체의 부분 sequence를 이용하여 FeSV의 정밀진단이 가능할 수 있도록 특이 primer정보를 연구기관, 팽이버섯연합회 등에 제공한다.

● 무바이러스 종균개발방법은 비교적 간단함으로 팽이버섯연합회에 기술이전을 할 것임.

● CAMP plate를 이용한 무바이러스 종균개발방법은 다른 곰팡이 바이러스 퇴치에도 사용할 수 있음.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

● 버섯바이러스에 관한 연구는 영국이 가장 많이 연구하고 있음. 영국에서 지금 가장문제가 되고있는 양송이병은 바이러스X 에 의한 병임. 아직 뾰족한 대책이 없어 영국의 양송이 연구팀이 고민하고 있음.

●본인이 2005년 9월 영국 균학회에 발표하러 갔을때 본인이 발표한 cAMP plate를 이용한 virus-curing에 대하여 많은 관심을 표명하였고 특히 Warwick 대학의 버섯바이러스 연구팀이 우리 연구실과 공동연구를 하기를 원하고 있음. 국제공동연구 project를 과학재단에 신청하려고 함.

제 7 장 참고문헌

Go, S. J., D. Y. Cha and J. G. H Wessele. 1992. Symptoms of virus infected oyster mushrooms, *Pleurotus florid*. *Korean Mycol.* 20:229-233

Go, S. J., D. Y. Cha, and Shin, G. C. 1992. Virus particles from abnormal growing oyster mushroom. *Pleurotus ostreatus*. *Korean Mycol.* 20, 149-153

Go, S. J., Y. H. Park, G. C. Shin and J. G. H. Wessels. 1992. Molecular analysis of double-stranded RNA in abnormal growing oyster mushrooms, *Pleurotus florida* and *P. osteratus* due to virus infection. *Korean Mycol.* 20: 234-239

Goodin, M. M., B. Schlagnhauer, and C. P. Romaine. 1992. Encapsidation of the La France disease-specific double-stranded RNAs in 36nm isometric viruslike particles. *Phytopathology* 82:285-290

Harlow, Ed. And D. Lane. 1988. Immunizations. Pages in : Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory.

Harmsen, M. C., Van Griensven, L. J. L. D., and Wessels, J. G. H. 1989. Molecular analysis of *Agaricus bisporus* double stranded RNA. *J. Gen. Virol.* 79. 1613-1616.

Harmsen, M. C. 1990. "La France disease of Cultivated mushroom(*Agaricus bisporus*)," Ph. D. dissertation, Department of Plant Pathology, University of Groningen, The Netherlands.

Harmsen, M. C., Tolner. B., Kram, A., Go, S. J., De Haan, A., and Wessels, J. G. H. 1991. Sequence of three dsRNAs associated with La

France disease of the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*). *Curr. Genet.* 20. 137–144

Harvey CL, Wuest PJ, Schisle LC 1982. Disease, weed molds, indicator molds, and abnormalities of the commercial mushroom. In: Wuest PJ, Bengston DJ (eds) Penn state handbook for commercial mushroom growers. Pennsylvania State University, pp 19–33

Hicks, R. G. T. and K. L. Haughton. 1986. Detection of double stranded RNA in shake cultures of *Agaricus bisporus* affected by La France disease. *Trnas. Br. Mycol. Soc.* 86:579–584

Hollings, M. 1962. Viruses associated with die-back disease of cultivated mushrooms. *Nature (London)* 196: 962–965

Hollings, M. 1978. Mycoviruses: Viruses that infect fungi. *Adv. Virus. Res.* 22, 1–53.

Koons, K., B. Schlaghauser and C. P. Romaine. 1989. Double-stranded RNAs in mycelial cultures of *Agaricus bisporus* affected by La France disease. *Phytopathology* 79: 1272–1275.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680–685

Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. 2001. molecular cloning Third edi. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, New York.

Marino, R., K. N. Sakeena, M. Schuler, J. E. Mayfield and P. A. Lemke. 1976. Double stranded ribonucleic acid in *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 433–438

Morris, T. J., and Dodds, J. A. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* 69, 854–858

Moyer, W.J. and S.H.Smith. 1977. Purification and serological detection of mushroom virus-like particles. *Phytopathol.* 67,1207–1212

Schisler, L. C., J. W. Sinden and E. M. sigel. 1967. Etiology, symptomatology, and epidemiology of a virus disease of cultivated mushrooms. *Phytopathology* 57: 519–526.

Sinden, J. W. and E. Hauser. 1950. Report of two mushroom disease. *Mushroom Sci.* 1: 96–100

Van der Lende, T. R., M. C. Harmsen and J. G. H. Wessels. 1994. Double-stranded RNA and proteins associated with the 34nm virus particles of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Virol.* 75: 2533–2536.

van der Vlugt, R. A. A., Schaap, P. J., Muller, Y., Thurston, C. F., Sonnenberg, A. S. M., Visser, J., and Van Griensven, L. J. L. D. 1993. A codon usage table for *Agaricus bisporus*. *Cultiv. Mushroom Res. Newsl.* 1, 50–52

Van Zaayen, A. 1979. Mushroom viruses. Pages 239–324 in: *Viruses and Plasmid in fungi*. P. A. Lemke, ed. Marcel Dekker. Inc., New York

Yu H. J., D. B. Lim, and H. S. Lee. 2003, Characterization of a novel single stranded RNA mycovirus in *Pleurotus ostreatus*. *Virology.* 15;314(1):9–15

Yu, H. J., J. S. Lee, N. J. Lee, S. J. Ha, S. Y. Kim, E. J. Kang, D. S. Kang,

D. W. Bae, M. U. Chang, and H-S, Lee. 2006. Identification of there isometric viruses from *Pleurotus ostreatus*. *Mycobiology* (in press)