

최 중
연구보고서

작물 바이러스 진단용 oligonucleotide chip 제작
기술 개발 및 실용화
(Development of DNA chip for the detection of
viruses in crops)

주관연구기관 : 한국생명공학연구원
협동연구기관 : 농업과학기술원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “작물 바이러스 진단용 oligonucleotide chip 제작 기술 개발 및 실용화” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 05 월 23 일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

총괄연구책임자 : 문 제 선

연 구 원 : 최 홍 수

연 구 원 : 이 수 현

연 구 원 : 남 문

연 구 원 : 김 정 규

연 구 원 : 이 재 봉

협동연구기관명 : 농업과학기술원

협동연구책임자 : 조 원 대

요 약 문

I. 제 목

작물 바이러스 진단용 올리고뉴클레오타이드 칩 제작 기술 개발 및 실용화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

PCR 또는 면역학적인 방법을 DNA chip을 이용한 방법으로 대체할 경우, 병 발생 원인 균을 손쉽게 검출할 수 있다. 이 기술을 확대 적용시키면 기존에 존재하는 중 이외에도 새롭게 나타나는 새로운 종의 출현을 신속하게 검출할 수 있고, 병해충의 지역별 분포, 검역대상 병해충 진단, 역학조사 및 survey에 의한 질병 발생의 예측 등에 사용할 수 있다. 최근 조류독감 및 광우병이 큰 사회적인 문제로 대두되고 이에 대한 국민의 관심이 급증하고 있다. 이에 반해 이들의 조기 진단과 체계적인 대비책이 미비한 것이 현실이고 이에 대한 소비자의 농산물에 대한 우려가 큰 상황이다.

농산물에 대한 불신을 해소하는 측면에서라도 작물 및 가축에 발생하는 질병의 발생현황 및 환경조건에 따른 발생 가능한 질병을 예측하여 이에 철저히 대비하는 것이 바람직한 것으로 사료된다. 안정적인 농산물 생산을 위해서 병해충 발생의 시간적, 지역적인 특성을 고려한 3차원적인 병해충의 예찰 및 방제는 필수적이며 DNA chip을 이용한 신속한 진단은 병해충에 의한 경제적 손실을 방지하는데 기여할 것이다. 결론적으로 기초연구에 chip의 활용, 현장에서 효율적인 병 진단에 적용, 질병의 억제에 위한 정책의 수립을 위한 기초 데이터 제공 등으로 크게 활용될 수 있기 때문에 병해충의 진단을 위한 DNA chip의 개발이 시급하다고 사료된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 국내에서 재배되는 주요 작물에 발생하는 30종의 바이러스의 시료 및 표준 균주의 확보
2. 병해충 진단용 oligonucleotide DNA chip의 제작 기반기술의 확립 및 바이오 마커의 확보
3. Oligonucleotide DNA chip의 제작 및 라벨링 원천기술 확보
4. 발생빈도 및 경제적으로 중요한 30 종의 바이러스 병 진단용 oligonucleotide DNA chip 제작

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 농산물개방시대 국가 대응전략의 핵심기술로 조속한 실용화로 식물검역 기관 및 농업 관련 국공립 연구기관으로 기술이전 및 기술 지도를 통하여 각각의 기능에 부합하는 DNA chip 제작에 활용
2. 하나의 칩으로 다중 진단이 가능하기 때문에 국내 농작물에 발생하는 바이러스 병 발생 양상을 모니터링 또는 조사에 투입하여 병 발생 예찰에 활용
3. 원천기술 및 바이러스 진단용 바이오마커의 산업재산권 획득으로 국내외에 특허 출원
4. 인체 및 가축 질병, 품종판별, GMO 검사 등에 요구되는 칩 제작에 연구개발 결과의 활용

SUMMARY

(영문 요약문)

Viruses have caused diseases in economically important crops and vegetables, resulting in yield loss and reducing the value of commodities. So far, viruses have been diagnosed by either ELISA or PCR. However, such diagnostic methods are limited to detect a single or a few target viruses. Furthermore, these detection methods frequently produce false-positive or -negative results. The development of oligonucleotide DNA chip is likely to assist efficient diagnosis of viruses.

To develop oligonucleotide DNA chip, approximately thirty different virus species are selected by the importance of host crops and the occurrence for last several years nationwide. Virus samples are obtained from the virus collections in National Institute of Agricultural Science and Technology and fields samples nationwide. Field samples are further purified by inoculating test plants or directly applied to oligonucleotide DNA chips due to the difficulties in mechanical inoculation. All samples are carefully examined by PCR and nucleotide sequencing of the products before total RNA extraction.

Genome information of target viruses is obtained from several public databases, such as NCBI or DPVWeb, and National Institute of Agricultural Science and Technology. Approximately five thousand oligonucleotides for thirty target viruses are designed by Array Designer 3.01. Among them, three hundred oligonucleotides are selected and screened. They are selected based on the transcription mechanism, titers of viruses in host plants, and copy number of target genomic or subgenomic RNA. Most of diagnostic chips contain a single species of target virus or strains derived from the target virus. However, oligonucleotide chip constructed in this project contains multiple species of target viruses. We overcome such technical problems by developing a unique labelling method to incorporate dye nonspecifically into all kind of RNAs.

When the diagnostic chip contains multiple targets or the sample contains low copy of target RNA/DNA, oligonucleotide DNA chip for the diagnosis of plant viruses developed in this project will suggest robust solutions with technical advances. Also it could be directly applied to the diagnosis of animal and human viral pathogens and the forecast of the occurrence of virus diseases.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Part 1. Introduction 6

Chapter 1. Necessity of the Project 6

 1. Technical Status 6

 2. Economical and Industrial Status 7

 3. Social and Cultural Status 7

Part 2. Domestic and International Status of Technical Development 8

Chapter 1. Related Technical Status and Issues 8

 1. Domestic Status 8

 2. International Status 8

 3. Technical Issues 8

Chapter 2. Future Perspectives 9

Part 3. Results and Discussions 10

Chapter 1. Selection of Target Viruses and Production of Pure Virus Samples 10

 1. Selection of Target Viruses 10

 2. Collections of Virus Samples and Diagnosis 12

 3. Production of Pure Virus Samples and Diagnosis 15

Chapter 2. Development of DNA chip for the detection of viruses in crops 26

 1. Design and Selection of Oligonucleotide 26

 2. Construction and Screening of DNA chip 31

Part 4. Achievements and Contributions in Related Fields 54

Part 5. Plan of Practical Application of Results 55

Part 6. Changes of International Trends in Related Fields 56

Part 7. References 57

목 차

제 1장	연구개발과제의 개요	6
1절.	연구개발의 필요성	6
1.	기술적 측면	6
2.	경제·산업적 측면	7
3.	사회·문화적 측면	7
제 2장	국내외 기술개발 현황	8
1절.	국내외 관련기술의 현황과 문제점	8
1.	국내현황	8
2.	국외현황	8
3.	문제점	8
2절.	앞으로의 전망	9
제 3장	연구개발수행 내용 및 결과	10
1절.	진단 대상 바이러스병 선정 및 바이러스 균주의 확보	10
1.	진단대상 바이러스병의 선정	10
2.	바이러스 분리주 수집 및 정밀진단	12
3.	진단대상 바이러스의 확보 및 검정	15
2절.	작물 바이러스 진단용 oligonucleotide chip 제작기술 개발 및 상용화	26
1.	oligonucleotide의 설계 및 제작	26
2.	pilot DNA chip 제작 및 검정	31
제 4장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	54
제 5장	연구개발결과의 활용계획	55
제 6장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	56
제 7장	참고문헌	57

제 1 장 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

가. 현재 작물에 발생하는 질병의 진단은 면역학적인 방법인 ELISA나 PCR 기술에 의존하여 주로 이루어지고 있으며 이러한 진단법으로는 병의 원인균에 대한 자세한 정보(strain 및 isolate의 판별 또는 신종의 출현 예찰 및 병해충 관리 등)를 얻기까지는 막대한 시간과 노동력의 투입이 요구된다. 따라서 적기에 병해충의 진단이 이루어지기 어려운 실정이다. 효율적인 병해충의 관리 및 국외에서 유입되는 검역 대상 병해충의 차단을 위해 유전자 칩의 개발은 매우 시급한 당면 과제인 것으로 사료된다.

나. DNA chip은 oligonucleotide 나 cDNA를 매우 작은 고정판에 고밀도 집적한 것을 말하며 이를 이용하여 수천 내지 수만개의 독립적인 유전자의 parallel한 유전자의 발현을 한꺼번에 분석하는 첨단 기법이다. 현재 DNA chip은 인간을 포함한 여러 생물체의 게놈 수준에서 유전자 발현을 monitoring 하는 중요한 tool로 이용되고 있으며 이를 응용해서 질환의 발생 가능성 예측 및 진단, 의약품 개발, 유전병의 진단 등에 널리 활용하려는 시도가 진행 중이다. 각 병원체를 특이적으로 검출할 수 있는 유전자 염기서열 정보를 확보해서 이를 이용하여 DNA chip을 제작, 이용하면 병원체의 유무뿐만 아니라 병원체의 종류까지를 단시간에 손쉽게 파악할 수 있다.

다. 따라서 기존의 면역학적인 방법을 DNA chip을 이용한 방법으로 대체할 경우, 병 발생 원 인균을 손쉽게 검출할 수 있다. 이 기술을 확대 적용시키면 기존에 존재하는 종 이외에도 새롭게 나타나는 새로운 종의 출현을 신속하게 검출할 수 있고, 병해충의 지역별 분포, 검역대상 병해충진단, 역학조사 및 survey에 의한 질병 발생의 예측 등에 사용할 수 있다. 결론적으로 기초연구에 chip의 활용, 현장에서 효율적인 병 진단에 적용, 질병의 역제를 위한 정책의 수립을 위한 기초 데이터 제공 등으로 크게 활용될 수 있기 때문에 병해충의 진단을 위한 DNA chip의 개발이 시급하다고 사료된다.

라. 병해충의 진단에 DNA chip 기술의 응용은 농업생명공학연구의 성공적인 현장 적용능력을 보여줄 수 있는 좋은 예가 될 수 있을 것이다. 선진국에서는 인간의 질병, 유전병의 진단 등 실제적 임상에 DNA chip 기술이 수 년 동안 적용되어 왔다. 우리나라의 농업 분야에서 질병의 진단을 위한 DNA chip 기술은 그 응용 범위가 무한함에도 불구하고 이 기술의 도입은 현재 이루어지고 있지 않다. 또한 기존의 진단방법은 data의 관리를 하기에 체계적이지 못하고 새로운 생명공학 기술에 의해 탄생한 신종 병해충에 적절히 대응하기 어려움이 있으므로 이에 대한 대책이 시급하다.

마. 우리나라 농업연구를 수행하는 국가 연구기관인 농촌진흥청 및 산하 연구소들의 우수한 연구진은 오랜 연구경험 및 결과를 축적하여 매우 풍부한 field data를 보유하고 있다. 한국생명공학연구원은 식물 분자병리학, 식물유전체, 유전체 정보학 등과 관련한 전문인력 및 연구집단을 보유하고 있으며 이미 수년간의 DNA chip제조를 위한 전문기술을 개발해 왔으며 이를 병해충의 진단을 위한 DNA chip을 개발하는데 응용하는데 활용될 수 있다. 따라서 농촌진흥청 및 한국생명공학연구원의 강점을 접목하여 본 과제를 성공적으로 수행할 수 있을 것으로 사료된다.

2. 경제·산업적 측면

가. 안정적인 농산물 생산을 위해서 병해충 발생의 시간적, 지역적인 특성을 고려한 3차원적인 병해충의 예찰 및 방제는 필수적이며 DNA chip을 이용한 신속한 진단은 병해충에 의한 경제적 손실을 방지하는데 기여할 것이다.

나. DNA chip을 이용한 병해충 검출 기술은 다양한 분야 축산물의 원산지 판별 (즉, 한우 또는 수입우 여부, 수산물 어종 판별, 우량 종돈의 선발 및 보존, 식품의 식중독균 오염 여부 판별, 식물, 수산물 및 축산물의 신속한 검역)에 응용될 수 있으며 이로 인한 경제적 과급효과와는 엄청나다. 뿐만 아니라 국민의 보건 향상에도 기여하며, 특히 농, 수, 축산물에 대한 국민의 불신을 해소하는데 큰 기여를 할 것이다.

다. 기존의 ELISA 또는 multiplex-PCR에 의한 진단법은 한 번에 최대 수 개 정도의 원인균 검출만이 가능하지만, DNA chip의 경우에는 한 번에 기존의 모든 병해충의 진단이 가능할 뿐 아니라 동시에 돌연변이체의 검출도 가능하다. 따라서 병해충 원인균 검정에 소요되는 노동력, 자금, 시간 등을 상당히 줄일 수 있다. 이에 따라 각각 특화된 여러 가지 진단 시장 분야가 하나의 산업분야로 태동될 수도 있을 것이다.

라. 안정적인 식량 확보, 고품질의 농산물 생산, 국외로부터의 병해충 유입 억제, 국민보건 향상, 농산물에 대한 불신 해소 등을 위해서 시급히 기존의 병해충 진단법을 DNA chip을 이용하여 대량으로 신속, 정확하게 검정하는 시스템으로 바꾸는 것이 바람직하다.

3. 사회·문화적 측면

가. 최근 조류독감 및 광우병이 큰 사회적인 문제로 대두되고 이에 대한 국민의 관심이 급증하고 있다. 이에 반해 이들의 조기진단과 체계적인 대비책이 미비한 것이 현실이고 이에 대한 소비자의 농산물에 대한 우려가 큰 상황이다. 따라서 농산물에 대한 불신을 해소하는 측면에서라도 작물 및 가축에 발생하는 질병의 발생현황 및 환경조건에 따른 발생 가능한 질병을 예측하여 이에 철저히 대비하는 것이 바람직한 것으로 사료된다.

나. 국외에서 수입되는 농축산물을 식별하고 이들을 통해 유입 될 수 있는 검역대상 질병들의 국내 유입을 조기 차단하여 이들의 효율적인 관리를 통하여 외래 질병의 도입에 의한 국민의 불신을 불식시킬 필요가 있다.

다. 안정적인 식량 확보, 고품질의 농산물 생산, 국외로부터의 병해충 유입 억제, 국민보건 향상, 농산물에 대한 불신 해소 등을 위해서 시급히 기존의 병해충 진단법을 DNA chip을 이용하여 대량으로 신속, 정확하게 검정하는 시스템으로 바꾸는 것이 바람직하며 이것이 현재 한국 농업이 처한 현실적인 어려움을 해결할 수 있는 한 방법이 될 것으로 사료된다.

라. 본 과제에서 제시되는 연구목표의 달성을 통하여 이러한 제반 문제를 해결할 수 있는 기술개발 능력을 함양하여 농림업 전반에 대한 첨단기술의 지원 및 사회·문화적 측면에서의 과급효과를 극대화할 예정이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1절. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

1. 국내 현황

가. DNA chip은 국내에서 연구용으로 제조되어 널리 사용되고 있다. 인간 유전체, 자생식물 및 작물분자유종 프론티어 사업등 대형 국책과제 등에서 유용 유전자의 발굴 및 유전자 발현 분석 등에 널리 활용되고 있다.

나. 최근 일부 기업을 중심으로 인간의 질병을 진단할 수 있는 DNA chip의 기술개발이 본격화되고 있으며 바이러스성 질환 및 유전병의 조기진단 등을 목적으로 한 DNA chip의 개발이 이루어지고 있다. 이러한 진단용 DNA chip의 개발은 주로 의료 분야에 집중되고 있으나 매우 단편적이고 하나의 target만을 진단할 수 있는 기초 단계이다. 따라서 사람을 대상으로 하기에는 아직 기술적인 문제점 (정확성 및 재현성)을 갖고 있기 때문에 산업화되기에는 이른 면이 있다.

다. DNA chip을 이용한 진단 분야의 연구가 극히 최근에 진행되는 까닭에 국내 농업 분야에서도 노력 여하에 따라 첨단기술의 선점이 가능성에도 불구하고 기술개발을 위한 시도를 찾아볼 수 없는 실정이다. 따라서 현재 자생식물 및 작물로부터 유용 유전자를 발굴하기 위하여 국내에서 개발, 연구 진행 중인 DNA chip 제조 및 응용기술을 병해충 진단 분야에 적극적으로 도입해야 할 것이다.

2. 국외 현황

가. DNA chip은 90년대 중반부터 최초로 개발되어 연구용으로 이용되어 왔으나 최근 들어서 질환의 진단, 환경 모니터링, 분자분류, GMO의 검출 등 다양한 분야에서 활용되고 있으며 계속 응용 분야를 확대하는 추세이다.

나. 최근 여러 유럽 국가들은 수백억원 규모의 대형연구과제에 consortium에 참여하여 농업의 첨단화를 꾀하고 있으며 이 과제의 핵심 기술은 육종, 진단 및 대량 고속 스크리닝을 위해 microarray 기술을 농업에 적용하는 것이다.

다. 효율적이며 경쟁력을 갖춘 농림업을 위하여 DNA chip 기술의 현장적용은 선진국에서 이미 활발하게 시도되고 있으므로 이에 대한 우리의 대비책이 시급한 실정이다.

3. 문제점

가. 현재 cDNA를 이용한 DNA chip이 주류를 이루고 있고 oligonucleotide chip의 활용은 미미한 실정이다. 따라서 chip 제작에 필수적인 specific한 oligonucleotide design 방법에 대한 know-how가 많지 않고, 식물 계통 정보가 충분치 않기 때문에 발생하는 어려움이 있으나, 여러 가지 실험적인 방법을 활용하여 기술적으로 극복할 수 있을 것이다.

나. chip 진단시 병해충 사이의 cross-hybridization은 방지할 수 있으나, 식물체로 발생하는 cross-cross-hybridization은 현재 대상 식물체의 계통 정보가 없기 때문에 방지하기 어려운 실정이다. 따라서 주어진 식물 EST 정보를 최대한 활용하여 specific 한 oligonucleotide를 제작하고, 다양한 validation 방법 및 hybridization stringency control을 동원해

cross-hybridization을 줄이는데 노력해야 할 것이다.

2절. 앞으로의 전망

1. DNA chip 기술의 개발은 유전자의 발현 양상 연구 및 유용 유전자의 발굴에 초점이 맞춰져 왔으나 최근에는 선진국을 중심으로 질환 및 유전자의 감식은 물론 분자분류 및 진단, drug target 발굴, marker를 이용한 생물군의 생태적인 동태 파악, 검역 등에 응용하고 있다.

2. 현재의 기술 수준을 비용 대비 효율성 측면에서 본다면, species 수준에서 진단하는 것이 가장 적합한 수준이나, 점차 SNP정보를 이용하고 기술 발달에 따른 고비용 문제가 없어지면 subspecies 뿐만 아니라 strain 까지 확인할 수 있는 oligo chip의 기술 개발이 주류를 이룰 것으로 전망된다. 또한 대량생산이 용이하고 이로 인한 단가 하락에 따라 oligo chip의 산업화가 매우 빠르게 촉진될 것이 확실하다.

3. 따라서 전 세계 DNA chip시장을 선점하기 위해 각 선진국은 oligo chip의 기술 개발에 역점을 두고 연구를 진행 중이나 연구 분야 자체가 최근에 개발된 기술 분야이기 때문에 국내에서도 빨리 연구가 진행되면 상당한 경쟁력을 가질 것으로 예상된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1절. 진단대상 바이러스병 선정 및 바이러스 균주의 확보

1. 진단대상 바이러스병의 선정

바이러스 진단용 올리고 칩의 진단대상 바이러스병은 우리나라 주요 작물에 흔히 발생하며 경제적으로 많은 피해를 주고 있는 바이러스를 위주로 하여 30종을 선정하였다. 각 작물별 바이러스병 발생생태는 한국식물병리학회에서 발간된 병목록⁽¹⁾, 농촌진흥청에서 출간된 각종 도감^(2, 3, 4, 5, 6), 최근 한국식물병리학회 등에서 발표된 논문 및 포스트, 그리고 전국적인 병 발생조사와 진단관련 민원서류들로부터 얻어진 자료를 종합하여 분석되었다. 주요 작물별로 진단대상 바이러스는 다음과 같다.

가. 박과 작물 : 박과 작물은 종자전염 등으로 인하여 특히 바이러스병에 많은 피해를 받고 있다. 박과작물에서는 우리나라에서 발생이 하고 있거나 수입식물체로부터 기록된 모든 바이러스를 진단대상으로 선정하였다. 올리고 칩 검정에 사용된 모든 시료는 박과 작물에 발생하는 모든 바이러스의 교차진단을 통하여 순수분리 상태를 확인하였다.

표 1. 박과작물에서의 진단대상 바이러스

대상바이러스	약칭	주요기주
<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i>	CGMMV	수박, 오이, 박, 참외
<i>Cucumber mosaic virus</i>	CMV	오이, 호박
<i>Kyuri green mottle mosaic virus</i>	KGMMV	호박, 오이, 박
<i>Melon necrotic spot virus</i>	MNSV	메론
<i>Papaya ringspot virus</i>	PRSV	오이, 호박
<i>Squash mosaic virus*</i>	SqMV	호박
<i>Watermelon mosaic virus 2</i>	WMV2	호박, 수박, 오이
<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	ZYMV	호박, 수박, 오이

* 수입된 식물체에서 검출(국내미분포)

나. 가지과 작물 : 가지과 작물중 생산량이 가장 많은 고추는 바이러스병에 굉장히 많은 피해를 받고 있으며, 생육후기에는 거의 대부분의 고추가 바이러스병에 감염되며 수종의 바이러스가 복합감염된다. 착색단고추는 수출작물로 중요한 위치를 차지하고 있으며, 바이러스병으로 인하여 고품질 농산물 생산에 제한요인이 되고 있다. 담배는 많은 종류의 바이러스에 감수성인 식물이며 포장에서 여러 가지 바이러스에 많은 피해를 받고 있다. 또한 감자를 포함한 다양한 가지과 작물에서 많은 종류의 바이러스병들이 알려져 있다. 이들 바이러스 중에서 현재 농업적으로 가장 문제가 되고 있는 주요 바이러스를 진단대상으로 선정하였다.

표 2. 가지과 작물에서의 진단대상 바이러스

대상바이러스	약칭	주요기주
<i>Broad bean wilt virus 2</i>	BBWV2	고추, 착색단고추
<i>Cucumber mosaic virus</i>	CMV	고추, 착색단고추, 담배, 토마토
<i>Pepper mild mottle virus</i>	PMMoV	고추, 착색단고추
<i>Pepper mottle virus</i>	PepMoV	고추, 착색단고추, 토마토
<i>Potato leaf roll virus</i>	PLRV	감자
<i>Potato virus X</i>	PVX	감자, 담배
<i>Potato virus Y</i>	PVY	감자, 담배, 토마토
<i>Tobacco mild green mosaic virus</i>	TMGMV	담배, 고추
<i>Tobacco mosaic virus</i>	TMV	담배
<i>Tobacco rattle virus*</i>	TRV	감자
<i>Tomato mosaic virus</i>	ToMV	토마토, 고추

* 수입된 식물체에서 검출(국내미분포)

다. 콩과 작물 : 콩은 벼 대체작물로써 최근 중요성이 크게 부각되고 있는 작물이며, 바이러스 병의 종자전염 등으로 인한 많은 피해를 받고 있다. 콩과 작물에서는 바이러스병의 연구가 미진하여 아직까지 알려지지 않은 많은 바이러스병이 존재하고 있는 것으로 판단된다. 본 과제에서는 과거에 기록된 3종의 바이러스를 진단대상 바이러스로 선정하였다.

표 3. 콩과 작물에서의 진단대상 바이러스

대상바이러스	약칭	주요기주
<i>Alfalfa mosaic virus</i>	AMV	콩
<i>Cucumber mosaic virus</i>	CMV	콩, 동부, 팥, 야생콩
<i>Soybean mosaic virus</i>	SMV	콩

라. 화본과 작물 : 화본과 작물은 식량작물로써 가장 중요한 위치를 차지하고 있으며 경제적으로 피해를 주는 여러 종류의 바이러스가 알려져 있다. 화본과 작물에 발생하는 많은 바이러스는 즙액집중이 되지 않으며, 포장상태에서 다른 바이러스들과 복합감염되어 있어 바이러스의 순수분리가 현실적으로 매우 힘든 경우가 많다. 본 과제에서는 벼, 보리, 옥수수 등에 발생하는 주요 바이러스를 진단대상 바이러스로 선정하였다.

표 4. 화분과 작물에서의 진단대상 바이러스

대상바이러스	약칭	주요기주
<i>Barley mild mosaic virus</i>	BaMMV	보리
<i>Barley yellow mosaic virus</i>	BaYMV	보리
<i>Rice black-streaked dwarf virus</i>	RBSDV	벼, 옥수수, 피
<i>Rice stripe virus</i>	RSV	벼, 피

마. 십자화과 작물 : 십자화과 작물은 김장채소류를 공급하는 중요한 작물이며, 가끔씩 바이러스병이 대발생하여 큰 피해를 받고 있는 작물이다. 십자화과 작물에서는 무, 배추를 중심으로 국내에 보고된 3종의 바이러스를 진단대상 바이러스로 선정하였다.

표 5. 십자화과 작물에서의 진단대상 바이러스

대상바이러스	약칭	주요기주
<i>Cucumber mosaic virus</i>	CMV	배추
<i>Ribgrass mosaic virus</i>	RMV	무, 배추
<i>Turnip mosaic virus</i>	TuMV	무, 배추

바. 기타 작물 : 기타 작물로는 바이러스병에 심각한 피해를 받고 있는 *Allium* 속 작물(마늘, 양파 등)에서 흔히 감염되어 있는 2종의 바이러스, 관상용 작물인 난류에서 가장 많은 피해를 주는 1종의 바이러스, 그리고 고구마에서 가장 문제되는 1종의 바이러스를 진단대상으로 선정하였다.

표 6. 기타 작물에서의 진단대상 바이러스

대상바이러스	약칭	주요기주
<i>Onion yellow dwarf virus</i>	OYDV	마늘, 양파
<i>Shallot latent virus</i>	SLV	마늘, 양파
<i>Odontoglossum ringspot virus</i>	ORSV	난류
<i>Sweet potato feathery mottle virus</i>	SPFMV	고구마

2. 바이러스 분리주 수집 및 정밀진단

바이러스 분리주 수집은 각 바이러스의 자연기주를 채집하여 진단용 특이 프라이머를 이용하여 RT-PCR 방법으로 진단하였다. 진단대상 바이러스 30종을 분리한 자연기주는 표 7과 같으며, 각각의 바이러스에 대한 진단용 특이 프라이머는 표 8에 기술하였다.

표 7. 확보한 진단대상 바이러스 30종의 자연기주

번호	진단대상 바이러스	기주	번호	진단대상 바이러스	기주
1	<i>Alfalfa mosaic virus</i>	콩	16	<i>Potato virus Y</i>	감자
2	<i>Barley mild mosaic virus</i>	보리	17	<i>Ribgrass mosaic virus</i>	배추
3	<i>Barley yellow mosaic virus</i>	보리	18	<i>Rice black-streaked dwarf virus</i>	벼
4	<i>Broad bean wilt virus 2</i>	고추	19	<i>Rice stripe virus</i>	벼
5	<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i>	수박	20	<i>Shallot latent virus</i>	마늘
6	<i>Cucumber mosaic virus</i>	고추	21	<i>Soybean mosaic virus</i>	콩
7	<i>Kyuri green mottle mosaic virus</i>	오이	22	<i>Squash mosaic virus</i>	호박
8	<i>Melon necrotic spot virus</i>	멜론	23	<i>Sweet potato feathery mottle virus</i>	고구마
9	<i>Odontoglossum ringspot virus</i>	난	24	<i>Tobacco mild green mosaic virus</i>	고추
10	<i>Onion yellow dwarf virus</i>	마늘	25	<i>Tobacco mosaic virus</i>	담배
11	<i>Papaya ringspot virus</i>	호박	26	<i>Tobacco rattle virus</i>	감자
12	<i>Pepper mild mottle virus</i>	고추	27	<i>Tomato mosaic virus</i>	토마토
13	<i>Pepper mottle virus</i>	고추	28	<i>Turnip mosaic virus</i>	배추
14	<i>Potato leaf roll virus</i>	감자	29	<i>Watermelon mosaic virus 2</i>	호박
15	<i>Potato virus X</i>	감자	30	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	호박

표 8. 진단대상 바이러스 30종의 정밀진단에 사용한 종 특이 프라이머

대상바이러스	프라이머	염기서열	산물(bp)
AMV	AM-C10	CGCATGGGTAGGAGCTGTGAAGAC	440
	AM-N50	CTGGTGGGAAAGCTGGTAAAC	
BaMMV	BaMM-R1-C10	ACAAAGTGCCACCCATAAGGAT	630
	BaMM-R1-N10	CGCAACGTAGGAAATGGGAAGAGAC	
BaYMV	BaYM-R1-C20	AATTGCTATCACATCTAATCCATAG	501
	BaYM-R1-N10	ACAAAGCTTGTGTGGACACCA	
BBWV2	BBW2-C40	GCTAGGTCCAGGCAAATTGTA	579
	BBW2-N30	GTTGGTGCATGTCAGG	
CGMMV	CGMM-C60	AATTAAGTAAAGTCCTGACG	609
	CGMM-N30	ATGGAACGTACCGGAATC	
CMV	CMR3-C30	CCACACGGTAGAATCAAAT	850
	CMR3-N40	GCTCGCCTGTTGAAGTCGCA	
KGMMV	KGMM-C20	CTTACGCCAGCATGTCGTCACA	403
	KGMM-N60	AGTCGCGCATTGCTGCTTTGAT	
MNSV	MNS-C05	AAA-(이하생략: 특허출원관련)	229
	MNS-N55	GAG-(이하생략: 특허출원관련)	
ORSV	ORS-N1	TAGTGTGTAGATGATATTGTGGT	691
	ORS-C1	ACCTACATATCCGCAGTGAAA	
OYDV	OYD-C08	TAT-(이하생략: 특허출원관련)	297
	OYD-N20	GGG-(이하생략: 특허출원관련)	
PRSV	PRS-C10	AGACTCAGAGAACTCGAAT	881
	PRS-N50	AAACTGGAGAGAGATAG	
PMMoV	PMMo-C20	GTCCACTCGCGCTCTCGAACAGAGC	501
	PMMo-N50	ATTGGGCAGAACTCGGAGTCATCGG	
PepMoV	PepMo-C40	TATCGTGGCATGTATGGTTCTTG	338
	PepMo-N40	GAATACAAACCAAGCCAAGT	
PLRV	PLRVCP3	AGATTTTCCATTTCCCTTCC	566
	PLRVCP5	GAGTACGGTTCGTGGTTAAAG	
PVX	PVX3	AGACGTAGTTATGGTGGTGG	432
	PVX5	AATGATAGATACGGGTCCCT	
PVY	PVYCP3	GGTGGTGTGCCTCTCTGTGTTCT	759
	PVYCP5	ATGACACAATTGATGCAGGAGGAA	
RMV	RM-C20	CGTTAACAGGTGATCCAGGAAATA	669
	RM-N40	TACGCCGGTCCCTGATTTCG	
RBSDV	RBSD-S10-C40	AATCAAAAACAAGGTACAGCCAAAGA	235
	RBSD-S10-N40	CGTCGAAACGAATTAGAAGAGAAAA	
RSV	RS-R4-C10	AGTTGATAATAAGAATAGGAAATC	571
	RS-R4-N30	CATCACAGTGTCACTGGTCTTCAT	
SLV	SL-C10	CGT-(이하생략: 특허출원관련)	204
	SL-N30	TAT-(이하생략: 특허출원관련)	
SMV	SM-C20	TGCCTATACCCTCAACAT	492
	SM-N40	CATATCAGTTTGTGGGCA	

(계속)

대상바이러스 프라이머	염기서열	산물(bp)	
SqMV	SqM-C20	CCA-(이하생략: 특허출원관련)	480
	SqM-N40	GAT-(이하생략: 특허출원관련)	
SPFMV	SPFMV 2-R	GGAATGGTTGCGGGTTGC	347
	SPFMV 2-F	GGACCAAGCCCCATACAA	
TMGMV	TMGM-C2	TGGGCCGCTACCGGCGGTTAGGGGA	501
	TMGM-N1	AATGTAAGTGATGACGAGTCTATCG	
TMV	TM-C2	AACCAGAAGAGCTCTCGAAAGAGCT	
	TM-N1	ATCGATGATGATTCGGAGGCTACTG	
TRV	TRVCP5	CAGACGGTATGTACGATGAGG	599
	TRVCP3	GCAGGAACCCACCTAGTGTT	
ToMV	ToM-C50	GACGGTGCTCTGAGGGAAA	515
	ToM-N30	CTACTGCCCTTTGTTCATTAGAA	
TuMV	TuM-C10	TCACCACATGCGCTAACACCAA	461
	TuM-N60	ACATTGAAAAGCGTAACCA	
WMV2	WM2-C20	CTTATAACGACCCGAAATGCTA	321
	WM2-N50	AGTCCGTATATGCCTAGAT	
ZYMV	ZYM-C10	AGGCTTGCAAACGGAGTCTAAT	510
	ZYM-N50	TATATAGAGATGAGAAATGCAGA	

3. 진단대상 바이러스의 확보 및 검정

대상 바이러스로 선정된 30종의 바이러스는 대부분 자연상태에서 발병한 시료를 채집하거나 또는 연구실에 냉동보관 중인 시료를 재접종하여 확보하였다. 확보한 이들 바이러스는 종 특이적인 프라이머를 이용하여 RT-PCR 방법으로 진단하였으나, 올리고 칩 결과의 정밀한 분석을 위하여 다른 바이러스의 복합감염여부까지 세밀히 조사하였다. 또한 진단용 프라이머 또는 기주 유전자에 의한 비특이적 반응으로 인한 오진단을 방지하기 위하여 각각 바이러스의 관련 RT-PCR 산물의 염기서열을 분석하였다. 확인된 바이러스는 즙액접종을 통하여 지표식물에 증식하였다. 즙액접종이 안되는 바이러스는 채집한 자연기주를 정밀진단한 다음 칩 분석에 사용하였다. 아래는 순수분리 또는 정밀진단후 칩 분석에 사용한 바이러스별 시료의 사진자료와 염기서열 분석을 통한 시료의 검정 결과를 첨부하였다.

1. *Alfalfa mosaic virus* (AMV)



강낭콩

```
ACCTACTAAACGTTCTCAGAACTATGCTGCTCTACGCAAAGCTCAACT
GCCGAAGCCTCCGGCGTTGAAAGTCCCGGTTGCGAAACCGACGAATAC
TATACTGCCACAGACGGGCTGCGTGTGGCAAAGCCTCGGGACCCCTCT
GAGTCTGAGCTCTTCAAATGGGCTCGGTGCGAGATTCCTCTACAGTTT
TCTGAAGGATTTTCGTAGCACCTCGAATCCTCGAAGAGGATTTGATTTT
CAGGATGGTGTCTTATAACACCGTCCCATGCCGGCTCTTTTTGTCT
CACTGATGACGTGACGACTGAGGATGGTAGGGCCGTTGCGCATGGTAA
TCCCATGCAAGAATTTCTCATGGCGTTTTCCACGCTAATGAGAAGTT
CGGGTTTGAGT (395 bp)
```

염기서열 분석 : AF015716 1235 - 1629 (98% 일치)
그림 1. *Alfalfa mosaic virus*

2. *Barley mild mosaic virus* (BaMMV)



보리

```
TCCGCCCTTTTGTGTGTCAGGGCTAAAAAGATCTCCACACTGCGCAGGATC
TTTCGCTGTTACTCCATTGAGACGAACTAATGTTTCGTGAAGCTGAGGCG
CGTGCCGCAATGGGCCATAAAGCACGGGTGCCTTGATGAAATCGTCTTCG
ATTTTCATGATCCCAGATCAGTTCACTTCCAGAACCGCACTCGAGACACTG
AAGCAGACCAAGCTTGCCGCCATTGGTGTGGCACAAGCAATTCTCTCCT
CACCTCCGAGCAGACGAACATGAGAACCCTGAAACCCGAAGGCGCAACG
ACTATGATGGTCACGAGGCGTCTCCGGTAGGTATCTCATGCAGTTCCA
TTTCCTTCTCAGCAGTGCATTTAAATACGCTTTTAAATCACATCAAGCGCC
AAGAGTTGTTCCCGCTTGCAGCGAATCCTTATGGGGTGGC (440 bp)
```

염기서열 분석 : AF536942 6603 - 7042 (96% 일치)

그림 2. *Barley mild mosaic virus*

3. *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV)



보리

```
AACAGCCAAGGTTATTATCAAAGATACGAAGGGAAGTGGCACCACATGGA
TATTTTCACAGCATGATCCAGACCACCTAAAGCAGAATGGGTCCGGCAAAT
TGGATATCCAGAACACCGGGGGCAGTTTCGACAGGAAGGATCTGCCAAAAC
GACGGATTACGATCTTGGAGCTGAGTTTGGCACCGACACCGATGACATCAC
GCTCGAAGCCTCTACTGGGATATTATTGTCACAAGTTGGGGTGCAGCTCGC
AACCCGAGTTGGAAGAAATTTGCATGGGCACCTTCAACATGAACTGTTACTT
CTACAACGACTGGATTCTGGTTCCGGGACACCTGCAAGACAGATCCGGCAA
CGTGACAATTCAATTTCCCGACCAAACAGTGCAAACCACAACCTGATGCACT
CAACGCAAATGGTGTGAAACGATTCTATGGATTA (442 bp)
```

염기서열 분석 : AF536958 4047 - 4488 (96% 일치)

그림 3. *Barley yellow mosaic virus*

4. *Broad bean wilt virus 2* (BBWV2)



고추

```
GGCGATAACCAGTTGTGGAAAAGTACACTGAAGAAGTGGCAGATGACAGAC
TGCCAGACAAGGTGCGTGCTAAAGCTGATCAGATAATGGTAGCAGCTATT
GAGTTGGTGGCGGATGGTTTTGCCTCAGTCAATTCGGACGTTACCATGGC
TGGTGCCTTTACGACAAGCGCCACAAGACTATTGCAAGTTCTTTCAAAG
GAGCTTTTGCATCTCGGGCAAGTGGAGTCCCTTCACATGTAATTTACTTT
CCAATGCATAGAGTTCCATGCATGTGATGATCCAAATACAACGTTGGAGCT
TTCAATGGTAAGTCGAGATTCAGACTTTGATGAGGGCTACACATTGGCCA
ACATATCAGCTCGCACTCTTTATGTTTCGTGCAAAAAGGACCTGAAAAAGTG
ACTGAAACAAGGCATCTTTTGAAGGCCAAAAGTGGAGGATGTGGTCAAAGC
GCGCCAATTTGCTAGTGAAGCACAGGTTGTTTTTCGTACGCCCGATTAT
TCCCTGAAGTGAATTGGGACAATTACAATTTG (532 bp)
```

염기서열 분석 : AJ132844 854 - 1385 (94% 일치)

그림 4. *Broad bean wilt virus 2*

5. *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV)



ATGGCTTACAATCCGATCACACCTAGCAAACCTTATTGCGTTTTAGTGCTTC
TTATGTTCCCGTCAGGACTTTACTTAATTTTCTAGTTGCTTCACAAGGTA
CCGCTTTCCAGACTCAAGCGGGAAGAGATTCTTTCCGCGAGTCCCTGTCT
GCGTTACCCTCGTCTGTCTGATAGATAATTAATTCTAGATTCCCAGATGCGGG
TTTTTACGCTTTCCTCAACGGTCCCTGTGTTGAGGCCTATCTTCGTTTCGC
TTCTCAGCTCCACGGATACGCGTAATAGGGTCATTGAGGTTGTAGATCCT
AGCAATCCTACGACTGCTGAGTCGCTTAACGCTGTAAAGCGTACTGATGA
CGCGTCTACAGCCGCTAGGGCTGAGATAGATAATTTAATAGAGTCTATTT
CTAAGGGTTTTGATGTTTACGATAGGGCTTCATTTGAAGCCGCGTTTTCCG
GTAGTCTGGTCAGAGGCTACCACCTCGAAAAGCTTAG (486bp)

오이

염기서열 분석 : AF417243 5763 - 6248 (99% 일치)

그림 5. *Cucumber green mottle mosaic virus*

6. *Cucumber mosaic virus* (CMV)



TTCGCAGTATCTGTAAACGAATGCGAAGATTAATCAGAATGCGCGCAGT
GAGTCCGAGGAATTAATGTTGAGAGCCCTCCCGCCGCAATCGGGAGTT
CTTCCGCGTCCCGCTCCGAAGCCTTCAGACCGCAGGTGGTTAACGGTCT
TTAGCACTTTGGTGCGTATTAGTATATAAGTATTTGTGAGTCTGTACAT
AATACTATATCTATAGTGTCTGTGTGAGTTGATACAGTAGACATCTGT
GACGCGATGCCGTGTTGAGAAGGGAACACATCTGGTTTTAGTAAGCCTA
CATCATAGTTTTGAGGTTCAATTCCTCTTACTCCCTGTTGAGCCCCCTTA
CTTTCTCATGGATGCTTCTCCGCGAGATTGCGTTATTGTCTACTGACTA
TATAGAGAGTGTGTTGTGCTGTGTTTTCTCTTTTGTGTCGTAGAATTGAG
TCGAGTCATGGACAAATCTGAATCAACCAGTGTGGTCGTAACCGTCCGA
CGTCGTCCGCGTGTGGTTCCCGCTCCGCCCCCTCCTCCGCGGATGCCA
ACTTTAGAGTCTGGTCGCAGCAGCTTTCGCGACTT (574 bp)

오이

염기서열 분석 : D10538 809-1382 (98% 일치)

그림 6. *Cucumber mosaic virus*

7. *Kyuri green mottle mosaic virus* (KGMMV)



ATGCCTTACTCTACCAGCGGTATTCGTTTCGCTTCCCTGCTTTTTCTAAGTC
TTTTTTCCCTTATTTGGAGTTGTATAATTTATTAATAACAAATCAAGGGG
CGGCTCTGCAGACGCAAAATGGTAAAGACATTTTTCGCGTGTGCTCGTCTGTT
GGTTTGTGTCTTCTGTTGCGTCAACCACTTCACAGTTTTCCTCCGGTGT
GTTTTATGTGTGGTCTCGTGAGTCGCGCATTGCTGCTTTGATCGATTCTC
TCTTCGGTGCTTTGGATTCAAGAAATAGGGCTATTGAAGTTGAAAACCCT
TCTAATCCATCGACTGGCGAAGCTTTGAACGCTGTTAAGCGCAATGACGA
CGCGTCTACAGCCGCTCACAACGACATTCTCAGATTTTATCTGCTCTGA
ATGAAGGTGCGGGCGTTTTTGTATAGAGCGTCTTTTGAATCTGCTTTTGGT
CTCGTGTGGACCGCAGGTTTCGCTCTACCTCGTCTTGA (486bp)

오이

염기서열 분석 : AF239212 481 - 966 (100% 일치)

그림 7. *Kyuri green mottle mosaic virus*

8. *Melon necrotic spot virus* (MNSV)



```
CAACATTTTCGTACACTGAGGGCGCTAAGCCAGGTGCAATATCCGCTCCA  
GTTGCCATTAGTAGGCGGGTGGCGGGTATGAAGCCTAGGTTTGTTCGAT  
CCGAAGGATCTGTGAAGATAGTTTCATAGGGAGTTTATTGCCTCTGTTCT  
TCCGTCGGATGATCTCACCGTGAATAATGGTGATGTCAATATCGGTAAG  
TATAGGGTCAATCCTAGTAATAACGC (222 bp)
```

메론

염기서열 분석 : D12536 2990 - 3211 (90% 일치)

그림 8. *Melon necrotic spot virus*

9. *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV)



```
TTACACTATTACAGACCCGTCTAAGCTGGCTTATTTAAGCTCGGCTTGG  
GCTGACCCCAATTCACATAATCAACCTTTGTACCAATTCTCTGGGTAATC  
AGTTCCAAACACAACAAGCTCGAACAACACTGTTCAACAGCAGTTTGCCTGA  
TGTTTGGCAGCCGGTTTCTACTTTGACCAGTAGGTTCCCTGCAGGCGCT  
GGTTACTTCAGAGTTTATCGCTATGATCCTATATTAGATCCTTTAATAA  
CTTTCTTAATGGGTACTTTTGATACTCGTAATAGAATAATCGAGGTAGA  
AAATCCGCAGAATCCGACAACACTACGGAAACATTAGATGCAACTCGTAGA  
TTTGATGATGCAACTGTAGCAATAAGATCTGCAATAAATAATCTATTAA  
ATGAGTTAGTTAGGGGAACCTGGTATGTACAATCAAGTCTCATTTGAGAC  
GATGTCTGGACTTACTTGGACCTCTTCCTAATC (474 bp)
```

난

염기서열 분석 : AY571290 5727 - 6200 (98% 일치)

그림 9. *Odontoglossum ringspot virus*

10. *Onion yellow dwarf virus* (OYDV)



```
GCTTTTAGAACAAGCTCCATACAATGTGATAGCTCAGAATGGAAAGGCA  
CCTACATAGCGCAAACAGCCCTGAAAAAGTTATTACCAACATTGATGC  
GAGTGAAGTGGAACTGGAGAAATATTACGAAGTATATATGAATCCTTGAA  
AACGAAGAAGTAATCCCTAAGAAGGTTTCGCTACCAGGCGGGAGAAGGAG  
ATGCAGCAGCGGTACGTCAACAGGTCACAACAGG (230 bp)
```

마늘

염기서열 분석 : AJ510223 9373 - 9565 (87%)

그림 10. *Onion yellow dwarf virus*

11. *Papaya ring spot virus* (PRSV)



TCCAAAAACGAAGCTGTGGATGCTGGTCTGAATGAGAAGCTCAAAGAAAAAG
AAAAACAGAAAGAAAAAGAAAAAGATGAACAAAAAGATAAAGACAATGATGG
AGCTAGTGACGGAAATGATGTGTCAACTAGCACAAAAACTGGAGAGAGGGGAT
AGAGACGTCAATGCCGGAAGTGTGGAACCTTCACTGTTCCGAGGATAAAGT
CATTACTGATAAGATGATTTTACCAAGAATTAAGGAAAAACTGTCCTTAA
TTTAAATCATCTTCTCAGTATAATCCGCAACAAATTGACATCTCAAACACT
CGTACCCTCAATCTCAATTTGAGAAGTGGTATGAGGGAGTGAGAAATGATT
ATGGCCTTAATGATAACGAAATGCAAGTGATGTTAAATGGTTTGATGGTTTG
GTGTATCGAAAATGGTACATCTCCAGACATATCTGGTGTCTGGGTGATGATG
GATGGGGAGACTCAAGTTGATTATCCTATTAAACCTTTGATTGAACACGCAA
CTCCTTCATTTAGGCAATCATGGCTCACTTCAAGTAACGCGGCAGAGGCATA
CATTGCAAAGAGGAACGCAACTGACAGGTACATGCCGCGATATGGAATTAAG
AGAAATTTGACTGACATTAGTCTCGCTAGATATGCTTTTCGATTTCTATGAGG
TGAATTCGAAAACACCTGATAGGGCTCGTGAAGCTCATATGCAGATGAAGGC
TGCAGCGCTACGCAATACTAATCGCAGAATGTTTGGAAATGGACGGCAGTGTG
AGTAACAAGGAAGAAAACACGAGAGACACACAGTAGAAGATGTCAACAGAG
ACATGCACTCTCTCCTGGGTATGCGCAACTGA (864bp)

호박

염기서열 분석 : DQ340771 9352 - 10116 (97% 일치)

그림 11. *Papaya ring spot virus*

12. *Pepper mild mottle virus* (PMMoV)



ATTGGGCAGAACTCGGAGTCATCGGACGCCGAGTCTTCTTCGTTTTAACTA
TGGCTTACACAGTTTCCAGTGCCAATCAATTAGTGTATTTAGGTTCTGTAT
GGGCCGATCCATTAGAGTTACAAAATCTATGTACTTCGGCGTTAGGTAATC
AGTTTCAAACACAGCAGGCTAGAACTACGGTTCAACAGCAGTTCTCTGATG
TGTGGAAGACCATACCGACCGCTACAGTTAGATTTCTGCTACTGGTTTTCA
AAGTTTTTTCGATATAATGCCGTGCTAGATTCTCTAGTGTGCGCACTTCTCG
GAGCCTTTGATACTAGGAATAGGATAATAGAAGTAGAAAAATCCGCAAAATC
CTACAACCTGCCGAGACGCTTGTATGCGACGAGGCGGGTAGATGATGCGACGG
TGGCCATTAGGGCCAGTATAAGTAACCTCATGAATGAGTTAGTTTGTGGCA
CGGGAATGTACAATCAAGCTCTGTTTCGAGAGCGCGAGTGGAC (501bp)

고추

염기서열 분석 : AB254821 5635 - 6135 (99% 일치)

그림 12. *Pepper mild mottle virus*

13. *Pepper mottle virus* (PepMoV)



GAATACAAACCAAGCCAAGTCGACATATCGAATACTCGTTCAACCCAGGC
ACTATTTGACAATTGGTATAGTGAAGTTATGAAAGCATAACGATTTACAAG
AGGAGGCTATGGGTACAGTGATGAATGGCTTAATGGTTTGGTGCATTGAA
AATGGCACGTCCCCAAACATTAGTGGAAACATGGACCATGATGGATGGAGA
CGAACAGGTGGAATTTCCATTAAAGCCCGTGATAGAGTATGCTAAGCCGA
CTTTTCGGCAGATAATGGCGCATTTTCTGATGTGGCTGAGGCATATATA
GAAATGCGCAATAAGCAAGAACCATACATGCCACGATA (338 bp)

고추

염기서열 분석 : M96425 8784 - 9121 (96% 일치)

그림 13. *Pepper mottle virus*

14. *Potato leaf roll virus* (PLRV)



GGTGGTGTACAACAACCAAGAAGGCGAAGAAGGCAATCCCTTCGCAGGCGC
ACTAACAGAGTTCAGCCAGTGGTTATGGTCACGGCCCTGGGCAACCCAGG
CGCCGAAGACGCAGAAGAGGAGGCAATCGCCGCTCAAGAAGAAGTGGAGTT
CCCCGAGGACGAGGCTCAAGCGAGACATTCGTGTTTACAAGGACAACCTC
GTGGGCAACTCCCAAGGAAGTTTCACCTTCGGGCCGAGTCTATCAGACTGT
CCGGCATTCAAGGATGGAATACTCAAGGCCTACCATGAGTATAAGATCACA
AGCATCTTACTTCAGTTCGTTCAGCGAGGCCTCTCCACCTCCTCCGGTTCC
ATCGCTTATGAGTTGGACCCCCATTGCAAAGTATCATCCCTCCAGTCCCTAC
GTCAACAAGTTCCAAATFACGAAGGGCGGCGCCAAAACCTTATCAAGCGCGG
ATGATAAACGGGGTAGAATGGCAGGATTCCTTCTGAGGATAAGTG (503bp)

감자

염기서열 분석 : D13954 3622 - 4124 (99% 일치)

그림 14. *Potato leaf roll virus*

15. *Potato virus X* (PVX)



TATTCCAACGGTATCAGCAGAGCTAGGCTGGCAGCAGCAATTAAAGAGGTGTG
CACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTAGTATGGAAGTGGATGT
TAACTAACACAGTCCACCTGCTAACTGGCAGCACAAGGTTTCAAGCCTGAG
CACAAATTCGCTGCATTTCGACTTCTTCAATGGAGTCACTAACCAGCTGCCAT
CATGCCCAAAGAGGGGCTTATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTG
CCCAAAGTGTGCCTTTGTGAAGATTACGAAGGCCAGGGCACAATCCAACGAC
TTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGGTCGTATCACTGGAACAACAAC
CGCTGAGGCTGTTGTCACTCTCCACCACCATAACTAC (409 bp)

감자

염기서열 분석 : M95516 5959 - 6367 (98% 일치)

그림 15. *Potato virus X*

16. *Potato virus Y* (PVY)



AAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAA
AAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAAGTCACTACTGTGCCACGAATTA
AAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGT
ACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTATGCTCCACAGCAAATTGACATC
TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGTATGATGCTGTTATGAAGCAG
TACAACCTGCATACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAA
TGGGCTTATGGTTTGGTGCATNGAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAAC
GGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTCGAATACCCATTGA
AACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATGGCACA
TTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGGAATGCGCCACAAAAGGAA
CCATATATGCCACGATA (507 bp)

감자

염기서열 분석 : AJ890346 8616 - 9122 (99% 일치)

그림 16. *Potato virus Y*

17. *Ribgrass mosaic virus* (RMV)



ATGTCTTACAACATTACGAACTCGAATCAGTACCAGTTTTTCGCAGCGG
TATGGGCGGAGCCCATAGCAATGCTTAACCAGTGCGTATCTGCGTTGTC
ACAGTCGTATCAGACACAAGCTGCGAGAGATACTGTCAGACAGCAATTC
TCGAACTTGTAAAGTGCGATTGTGACACCGAACCAGCGGTTCCAGAAA
CAGGATACCGGGTGTATGTTAATTCAGCAGTTCTAAAACCGTTGTACGA
GGCTCTTATGAAGTCTTTTTGATACTAGAAATAGGATCATTGAGACCGAA
GAAGAGTCGCGTCTTTCGGCTTCCGAAGTAGCCAATGCAACACAACGTG
TTGACGATGCGACCGTGGCCATCAGGAGTCAAATTCAGCTTTTGCTGAG
TGAGCTTTCCAGTGGACATGGTCTTATGAACAGGGCAGAGTTTGAGGTT
TTAATACCTTGGGCTACTGCGCCGGCTAAATAG (474bp)

감자

염기서열 분석 : AF103781 50 - 523 (90% 일치)

그림 17. *Ribgrass mosaic virus*

18. *Rice black-streaked dwarf virus* (RBSDV)



CGTCGAAACGAATTAGAAGAGAAAAGTGCCAGTAACACTTCAACCACAGT
AAAGAAGGTTAAAATTCATTTCTCTGTTCAATATTTTGACGAATTTAAAG
TTAATGGACACGAAAAAGCATTGTAGTTCAAACCTATAAAGGTGAAATG
ACACTAGATTATTACCGTAAAAATTGGCGAAGTATTAAGTGCGATTTGGAA
ACGCGGTAAATCTTTGGCTGTACCTTGTT (229 bp)

벼

염기서열 분석 : AF459813 1087 - 1315 (97% 일치)

그림 18. *Rice black-streaked dwarf virus*

19. *Rice stripe virus* (RSV)



TCACAGTGTCACTGGTCTTCATGGACACTGGCAGATCAGTCCTTTCAAT
CCCCAGAACCAAAGAGTTCTAGAGATGACACAGTTCTGCACTGAGCTG
TCATCAACAGATACGGACACTTGAAGATTATGCTTATCCTCCAAAGCCA
GAAAATTCGCTAGAGAACC CAAGACAGCAAAATTCCTGCTAATTGGGTA
GCGAACCTCTACCTCAACTTGATCTGAGGAGTTCACATAGGACTTGTCT
ATTATGCGGAGGGTAGTTATTCCACTAGCTCTACCCTTGATTCCAATCC
AGACCATAGCAAAAAGTTGCCACTCTAAAGAATGGATAATGGGTGAGAGG
TTGATGAAACCAATATGGATCAACAAGTATGTTGAAAGTTGCTCTCCTA
TGGGCCTTCACAGAATAGTCCTGTTTGGCTATGAACATATCATACTTGT
TCACCTTGACATCTGAGAAGCTGAAGGGTTCCAATCCAAGCATTGTGGC
AGCTTGGTCAATCGTAAACCCTACCCTGATTGAGAGGCTCTTGGAGAGA
GCTAAAGATATCCTATCCTTATTATCAAC (571bp)

벼

염기서열 분석 : AY97329 216 - 783 (99% 일치)

그림 19. *Rice stripe virus*

20. Shallot latent virus (SLV)



TATGGCTAACGAAGAAGAAGAACTCAACAACGTTAAGAAGCTTGCCGACT
CGCGATCCTGGGACCATCCCAGAGCATGAGACGCAGTAAAGCAGTGAAT
GACGTCGGTGTTATGGAGCGTGAGGGTTTTCGAAGCCGTGCTCCGAAGGA
GCGAAAACAGATTCAACAAACTTAAGGAGAAGTGCATGTCTGAATTGTC
TAGCGTGAAC (206bp)

마늘

염기서열 분석 : Z68502 7084 - 7285 ((91% 일치)

그림 20. *Shallot latent virus*

21. Soybean mosaic virus (SMV)



AGCAGCAAAGATGTAAATGTTGGATCAAAAGGAAAGGTGGTTCCGCGTTTTG
CAGAAGATTACAAGGAAGATGAATCTTCCAATGGTTGAAGGGAAGATCATT
CTCAGTTTGGACCACTTGCTTGAGTACAAACCTAATCAGGTTGATTTATTC
AACTCTCGAGCAACAAGAACACAGTTTGAAGCGTGGTACAATGCAGTTAAA
GATGAATATGAGCTTGACGATGAGCAGATGGGTGTGGTCATGAATGGTTTTC
ATGGTATGGTGCATTGACAATGGCACATCTCCAGATGCCAATGGCGTGTGG
GTGATGATGGATGGAGAGGAACAGATTGAATATCCGCTGAAACCCATTGTC
GAAAATGCAAACCAACTTTGAGACAAATCATGCACCATTTTTTCAGATGCA
GCAGAAGCTTACATTGAGATGAGAAATTCGAAAGTCCGTATATGCCTAGA
TATGGACTACTGAGGAATTTGAGAGATAGAGAGCTAGCTCGCTATGCTTTTT
GATTTCTATGAGGTTACTTCTAAAACACCAAACAGGGCAAGGGAAGCAATA
GCGCAGATGAAGGCTGCAGCTCTCTCGGGAGTTAAACAACAAG (603bp)

콩

염기서열 분석 : DQ517428 82 - 684 (98% 일치)

그림 21. *Soybean mosaic virus*

22. Squash mosaic virus (SqMV)



AGCCCCACAACATTTTTGCGAGTTTTACTGCTGATTTGATGGAATCCACA
GTGAGTGGGGATTCTACTGGAAATTGGAATATTACAGCTTATCCGAGTC
CTATATCCAATTTGTTGAAAGTGGCTGCTTGGGAAGAAGGGGACAATAAG
ATTCCAACCTCATTTGCCGGGTGCTGCCGTTAAGCAATCCGATTGGGCT
GCGTCAGCCAGAATAGACTTGGTCAATAACCTCTCAAATAAAGCTTTAC
CTGCGCGCTCTTGGTATATTACTAAGCCACGAGGAGGTGATATCGAGTT
TGACTTTGAAATAGCGGGGCCAATAATGGTTTTTAAAATGGCCAATTCC
AGTTGGGCTTTCCAGACTACATGGTATTTGAAATTGCCATAGACAACC
CTAAGCAATTCCTCTTTTTCGAG (415 bp)

호박

염기서열 분석 : AF059532 2754 - 3168 (99% 일치)

그림 22. *Squash mosaic virus*

23. *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV)



GGACCAAGCCCCATACAATGAATTAGCACGAAGTGGAAAGGCACCATACATA
GCTGAAACTGCACTTAAAGCACTCTATACTGGTGTCCAACCTAGTGCTTCTG
AATTGAGTGCATATGCAAAAGTGCTTAAACGAAATGTATGATGATAGTGTGCT
TCAGGAGAATGAGTTAGAAGTGTACCATCAATCTAGTGAACGTAAGTGAATTC
AAAGACGCAGGAGCGAACCCCTCCAGCCCTAAGCCTAAGGATATCCCTCCAC
CACCCACAATAACTGAGGTTACTGATCCAGAAGACCCAAAGCAGGCAGCTTT
GAAAGCTGCACGAGCTAAGCAACCCGCAACCATTCC (348bp)

고구마

염기서열 분석 : D86371 9465 - 9812 (97% 일치)

그림 23. *Sweet potato feathery mottle virus*

24. *Tobacco mild green mottle virus* (TMGMV)



ATGCCTTATACAATCAACTCTCCGAGCCAATTTGTTTTACTTAAAGTTCCG
CTTATGCAGATCCTGTGCAGCTGATCAATCTGTGTACGAATGCATTGGG
TAACCAGTTTCAAACGCAACAAGCTAGGACAACAGTCCAACAGCAATTT
GCGGATGCCTGAAACCTGTGCCTAGCATAACAGTGAGATTTTCTGCAT
CGGATTTCTATGTTTTATAGATATAATTCGACGCTTGATCCGTTGATCAC
GGCGTTATTAAATAGCTTTGATACTAGAAATAGAATAATAGAGGTTGAT
AATCAACCCGACCGAATACTACTGAAATCGTTAACGCGACTCAGAGGG
TAGACGATGCGACTGTAGCTATAAGGGCTTCAATCAATAATTTGGCTAA
TGAAGTGGTTTCGTGGAAGTGGCATGTTCAATCAAGCAGGCTTTGAGACT
GCTAGTGGACTTGTTTGGACCACAACCTCCGGCTACTTAG (480bp)

고추

염기서열 분석 : DQ821941 5667 - 6146 (99% 일치)

그림 24. *Tobacco mild green mottle virus*

25. *Tobacco mosaic virus* (TMV)



TGTCGCAGAATCGGATTCGTTTTAAATATGTCTTACAGTATCACTACTCCA
TCTCAGTTCGTGTTCTTGTGCATCAGCGTGGGCCGACCCAATAGAGTTAATT
AATTTCTGTACTAATGCCTTAGGAAATCAGTTTCAAACACAACAAGCTCGA
ACTGTTCGTTCAAAGACAATTCAGTGAGGTGTGGAAACCTTACCACAAGTA
ACTGTTAGGTTCCCTGACAGTGACTTTAAGGTGTACAGGTACAATGCGGTA
TTAGACCCGCTAGTCACAGCACTGTTAGGTGCATTCGACACTAGAAATAGA
ATAATAGAAGTTGAAAATCAGGCGAACCCACGACTGCCGAAACGTTAGAT
GCTACTCGTAGAGTAGACGACGCAACCGTGGCCATAAGGAGCGCGATAAAT
AATTTAATAGTAGAATTGATCAGAGGAACCGGATC (443 bp)

담배

염기서열 분석 : A68110 5685 - 6127 (99% 일치)

그림 25. *Tobacco mosaic virus*

26. *Tobacco rattle virus* (TRV)



AGTTGTTGGCTCAAACCTTTGCTGGTGAAGGAACAAGTGGCGAGACCTGTCA
TGAGGGAGTTGCGTGAGGCAATTCTGACTGAAACGAAACCTATCACGTCAT
TGACTGACGTGCTAGGTTTAATATCAAGAAAACCTGTGAAACAGTTTGCTA
ACAAGATTGCAGTCGGCGGATTTGTTGGTATGGTTGGTACTCTAATTGGAT
TCTATCCAAGGAAGGTATTGACTTGGGCGAAGGACACAACAAATGGTCCAG
AACTGAGTTACGAGAACTCGCACAAAACCAAGGTGATAGTATTTTTGAGTG
TTGTGTATGCCATTGGAGGGATCACGCTTATGCGTCGAGACATCCGAGATG
GACTGGTGA AAAA ACTATGTGATATGTTTGATATTAAACGGGGGGCCCATG
TCTTAGATGTTGAGAAATCCGTGCCGCTATTACGAAATCAATGATTTCTTTA
GCAGTCTGTATTCCGCATCTGAGTCCGGTGAGACCGTTTTACCAGATTTAT
CCGAGGTAAAAGCCAAGTCTGATAAGCTATTGCAGCAGAAGAAAAGAAATCG
CTGATGAGTTTCTTAGTGCAAAATTTTCTAACTATTCTGGCAGTTCAGTGA
GAACTTCCCCGCCATCGGTGGTTCGTTTCATCTAGAAGCGGACTGGGTTTGC
TGTTGGAAGACAGTAACGTACTAACCCAAGCTAGAGTTGGAGTTTCAAGAA
AAGTAGACGATGAGGAGATCATGGAGCAGTTTCTGAGTGGTCTTATTGACA
CTGAAGTGGAGATTGACGAGATTGTTTCGGC (796 bp)

담배

염기서열 분석 : AF314165 1500 - 2292 (95% 일치)

그림 26. *Tobacco rattle virus*

27. *Tomato mosaic virus* (ToMV)



ATGTCTTACTCAATCACTTCTCCATCGCAATTTGTGTTTTTGTGCATCTG
TATGGGCTGACCCTATAGAATTGTTAAACGTTTTGTACAAATTCGTTAGG
TAACCAGTTTCAAACACAGCAAGCAAGAACTACTGTTCAACAGCAGTTC
AGCGAGGTGTGAAACCTTTCCCTCAGAGCACCGTCAGATTTCCCTGGCG
ATGTTTATAAGGTGTACAGGTACAATGCAGTTTTAGATCCTCTAATTAC
TGCGTTGCTGGGGTCTTTTCGATACTAGGAATAGAATAATCGAAGTAGAA
AACCAGCAGAATCCGACAACAGCTGAAACGTTAGATGCTACCCGCAGGG
TAGACGACGCTACGGTTGCAATTCGGTCTGCTATAAATAATTTAGTTAA
TGAAGTAGTAAGAGGTACTGGACTGTACAATCAAATACTTTTGAAAGT
ATGTCTGGGTTGGTCTGGACCTCTGCACCTGCATCTTAA (480bp)

담배

염기서열 분석 : DQ873692 5703 - 6182 (99% 일치)

그림 27. *Tomato mosaic virus*

28. *Turnip mosaic virus* (TuMV)



CCGACCATACATGCCACGATATGGTCTTCAGCGCAATTTAACCGACATG
 AGCTTAGCTCGGTACGCATTTGATTTCTATGAAATGACTTCTAGAACTC
 CAATACGTGCGAGAGAGGCACACATCCAGATGAAAGCAGCAGCACTGCCG
 TGGCGCAAATAATAATTTGTTTCGGCTTGGATGGTAACGTCGGCACAACG
 GTAGAGAACACGGAAAGGCATACGACCCGAGGACGTTAATCGGAACATGC
 ATAACCTTACTTGGCGTTAAGGGGTTATGAAGTTGTATGCTAGTAGACTA
 TAAGTAGTTAAGTTTACTCGTTAGTATTCTCGCTTATGGGAAATATGTA
 AGTTTGTAAAGCAGCCAGTGTGACTTCGTCATGTGTGTTGTTGTTACT
 TTCTATATTTTTCGCCGAACATTTTATTGGTG (423 bp)

무

염기서열 분석 : AB252125 9316 - 9738 (99% 일치)

그림 28. *Turnip mosaic virus*

29. *Watermelon mosaic virus 2* (WMV2)



TAGATACGGATTACTATGAAATTTGAGAGACAGGGAATTAGCACGCTAT
 GCTTTTACTTCTATGAGGTTACTTCCAAAACACCAAACAGGGCAAGAG
 AAGCAATAGCACAGATGAAGGCCGCAGCTCTCGCGGAATTAACAGCAG
 GTTATTTGGACTTGATGGCAATATCTCGACCAATTCGGAAAATACTGAG
 AGGCACACTGCAAGGGACGTTAATCAGAACATGCATACTCTGTTGGGTA
 TGGGTCCACCGCAGTAAAGGCTAGGTAA (273 bp)

오이

염기서열 분석 : DQ399708 9525 - 9797 (98% 일치)

그림 29. *Watermelon mosaic virus 2*

30. *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV)



TGGTGTGCTTCGAAACTTACGGGATGGGAGTGTAGCCCGATATGCCTTC
 GACTTCTACGAAGTCAATTCTAAAACCTCTGAAAGAGCCCGTGAAGCTG
 TTGCGCAGATGAAAGCAGCGGCTCTTAGCAATGTTTCTCAAGGTTGTT
 TGGCCTTGATGGAAATGTTGCCACCACTAGCGAAGACACTGAACGGCAC
 ACTGCACGTGATGTTAAGAGAAACATGCACACCTTGCTGGGTGTGAACA
 CAATGCAGTAAAGGGTAGGTCGCCTACCTAGGTTATCGTTTCGCTGCCG
 ATGTAATTCTAATATTTACCGCTTTATGTGATGTCTTTAGATTTCCCGA
 GTGGGCTTCCCACCTTTAAAGCGTAAAGTTTATGTTAGTTGTCCAGGAA
 TGCCGTAGTCTGTGCGGAAGCTTTAGTGTGAGCCTCTCA (431 bp)

호박

염기서열 분석 : AY278998 9127 - 9557 (98% 일치)

그림 30. *Zucchini yellow mosaic virus*

2절 : 작물 바이러스 진단용 oligonucleotide chip 제작 기술 개발 및 실용화

1. oligonucleotide의 설계 및 제작

가. 바이러스 유전정보의 확보

국내에서 발생하는 바이러스의 염기서열은 농업과학기술원 바이러스 연구실이 보유한 자료를 활용하였으며 NCBI, EMBL 등의 database를 mining하여 지금까지 보고된 모든 작물 바이러스 유래의 염기서열을 확보하여 oligonucleotide 설계 및 제작에 사용하였으며, 바이러스의 전체 게놈의 염기서열이 아닌 단편 서열의 경우에 분석에서 제외되었다. Pilot chip 제작을 위해 요구되는 15종의 바이러스 유래의 염기서열을 우선적으로 분석하였다. 본 과제에서 수행되는 연구내용인 oligonucleotide chip의 제작은 기존의 1-2종의 target을 진단하는 것이 아니라 수십종의 target을 대상으로 하기 때문에 바이러스의 균주 확보의 용이성 및 여러 가지 isolate가 알려진 바이러스에 대한 oligonucleotide를 설계하기 위하여 수집된 유전정보들 가운데 이들을 우선적으로 분석하였다. 1차 년도에 확보된 바이러스 유래의 유전정보들 가운데 바이러스의 전체 게놈의 염기서열이 아닌 부분적인 염기서열로 등재된 정보들은 추후 실제 chip의 hybridization 과정에서 나타나는 cross-hybridization에 의한 false negative 또는 false positive가 발생할 경우 reference로 사용하거나 새로운 oligonucleotide의 제작에 사용될 예정이다.

전년도 연구에 지속성을 가지고 추가된 바이러스의 target들에 대한 유전정보를 추가로 확보하고 마찬가지로 국내에서 발생하는 바이러스 균주의 RNA 게놈 서열은 농업과학기술원 바이러스 연구실이 보유한 자료를 활용하였으며 pilot chip 제작을 위해 요구되는 15종의 바이러스 유래의 염기서열을 포함하여 당해연도 연구내용에 추가로 선정된 10종의 바이러스 유래 염기서열을 합하여 총 25종의 바이러스 유래 염기서열이 oligonucleotide를 설계하기 위하여 분석되었다. 농업과학기술원 식물병리과에서 제시한 진단 대상 바이러스는 발생 빈도, 기주 작물의 범위, 피해의 규모, 순수한 균주의 확보 용이성 및 group의 상이성에 기준을 두고 최종적으로 25종의 진단 대상 바이러스가 선정되었다. 이들이 피해를 입히는 작물은 감자, 고추, 토마토 등의 가지과(*Solanaceae*), 오이, 수박 등의 박과(*Cucurbitaceae*), 배추, 무우 등의 십자화과(*Cruciferae*), 대두, 동부 등의 콩과(*Leguminosae*), 벼, 보리 등의 화본과(*Gramineae*), 마늘 등의 백합과(*Allium*), 고구마 등의 메꽃과(*Convolvulaceae*) 작물에 심각한 피해를 끼치는 바이러스들로 선정되었다. 선정된 25종의 바이러스 가운데 약 50% 정도는 식물 바이러스의 group 가운데 대부분을 차지하는 Tobamo 및 Potyvirus group이 차지하고 있으며 나머지는 약 60 여 group의 식물 바이러스 가운데 11개 group에 속한 바이러스들로 구성되어 있다.

표 1. 1차 년도에 선정된 진단 대상 바이러스.

Group	Virus species	Acronym	Acc. No.
Tobamovirus	<i>Cucumber Green Mottle Mosaic Virus</i>	CGMMV	D12505, AB015146,
	<i>Kyuri Green Mottle Mosaic Virus</i>	KGMMV	AB015145, AF417243
	<i>Pepper Mild Mottle Virus</i>	PMMoV	AF417242, AJ295948
	<i>Tobacco Mild Green Mosaic Virus</i>	TMGMV	AB069853, AB000709
	<i>Tomato Mosaic Virus</i>	TomV	AJ308228, M81413
	<i>Ribgrass Mosaic Virus</i>	RMV	AB078435, M34077 AF254924와 17종류의 서열
Potyvirus	<i>Watermelon Mosaic Virus 2</i>	WMV2	D13913, M96425
	<i>Zucchini Yellow Mosaic Virus</i>	ZYMV	AF501591, AJ310200
	<i>Pepper Mottle Virus</i>	PepMoV	AB100442, AB194787
	<i>Turnip Mosaic Virus</i>	TuMV	AB194788, AF014811
	<i>Soybean Mosaic Virus</i>	SMV	AB098081와 28종류의 서열
Cucumovirus	<i>Cucumber Mosaic Virus</i>	CMV	D10538의 13종류의 서열
Carmovirus	<i>Melon Necrotic Spot Virus</i>	MNSV	M29671와 5종류의 서열
Fabavirus	<i>Broad Bean Wilt Virus</i>	BBWV	AB023484와 5종류의 서열
Alfamovirus	<i>Alfalfa Mosaic Virus</i>	AMV	K02703와 4종류의 서열

농업과학기술원 식물병리과에서 제시한 진단대상 바이러스는 발생 빈도, 기주 작물의 범위, 피해의 규모, 순수한 균주의 확보 용이성 및 group의 상이성에 기준을 두고 선정되었다. 이들이 피해를 입히는 작물은 고추, 토마토 등의 가지과(*Solanaceae*), 오이, 수박 등의 박과(*Cucurbitaceae*), 배추, 무우 등의 십자화과(*Cruciferae*), 대두, 동부 등의 콩과(*Leguminosae*) 작물에 심각한 피해를 끼치는 바이러스들로 선정되었다. 용이하게 균주를 증식하고 유지 관리를 위해 화본과에 발생하는 주요 바이러스는 2차 년도에 선정되어 진단 대상에 포함시킬 예정이다.

나. 기주의 유전정보와의 비교분석

선발 제작된 oligonucleotide와 현재 알려진 기주작물의 모든 유전정보를 비교하여 실제 chip hybridization 과정에서 cross-hybridization의 가능성이 높은 oligonucleotide는 제외되었다. 그러나 바이러스의 유전정보와 달리 현재까지 알려진 작물의 유전정보는 expression sequence tag(EST)을 포함하더라도 극히 제한되어 있어 최종적으로 제작되는 oligonucleotide chip을 이용하여 실험적으로 false positive 또는 false negative를 확인하는 방법에 의존 할 수 밖에 없는 실정이다. 그러나 pilot chip의 제작 및 검증 과정에서 여러 형태의 challenging oligonucleotide를 제작하여 다양한 기주작물에서 나타날 가능성이 있는 background를 최소화 할 예정이다.

전년도에 이어서 추가로 선정된 진단 대상 바이러스의 기주 작물의 유전정보를 확보하여 설계된 oligonucleotide와 현재 알려진 기주작물의 모든 유전정보를 비교하여 실제 chip hybridization 과정에서 cross-hybridization의 가능성이 높은 oligonucleotide는 제외되었다. 당해 년도에 추가된 진단 대상 바이러스의 기주 작물의 경우에 알려진 유전정보가 가지과 화본과 등의 작물에 상대적으로 제한되어 있어 oligonucleotide의 선발은 이들 oligonucleotide가 가지고 있는 quality에 의존하여 선발되었다. 따라서 당해 년도 연구기간 동안 제작되는 oligonucleotide chip을 이용하여 실험에 의해 나타나는 false positive 또는 false negative를 확인하는 방법에 의존 할 수 밖에 없는 실정이다.

다. oligonucleotide 설계 및 제작

우선적으로 국내에서 발생이 많고 피해가 큰 15종의 바이러스 및 isolate에 대한 oligonucleotide를 제작하기 위하여 130개의 바이러스 유래 sequences에 포함된 총 864 kb의 염기서열을 분석하여 약 1,900 여개의 oligonucleotide를 설계하였다. 이들 가운데 GC content, melting temperature, hairpin dG, hairpin bond, self dimer 및 self bond의 정도에 따라 100개의 가장 적절한 oligonucleotide를 선발하였다. 바이러스 유래 염기서열에 빈번하게 나타나고 복제 또는 전사의 중요 요소로 기능을 하는 hairpin 또는 palindromic 등과 같은 2차 구조의 형성 지역은 가급적 배제 하였다.

우선적으로 국내에서 발생이 많고 피해가 큰 25종의 바이러스 및 isolate에 대한 oligonucleotide를 제작하기 위하여 2,500개의 바이러스 유래 sequences에 포함된 총 12,000 kb의 염기서열을 분석하여 약 4,300 여개의 oligonucleotide를 설계하였다. 이들 가운데 GC content, melting temperature, hairpin dG, hairpin bond, self dimer 및 self bond의 정도에 따라 70여개의 가장 적절한 oligonucleotide를 선발하였다. 바이러스 유래 염기서열에 빈번하게 나타나고 복제 또는 전사의 중요 요소로 기능을 하는 hairpin 또는 palindromic 등과 같은 2차 구조의 형성 지역은 가급적 배제 하였다.

Probe Sequence	Position	GC%	Melting Temperature	Hairpin dG	Hairpin Bond	Self Dimer	Self Bond
81 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
72 CCGTTCACGCTAAATGAGAAATTCGGGTTAGTTCGCTCTT	1,886	49	70.1	45	-1.8	-1.8	3
70 CATTGGGAAGATTAATGACAGAGAAACAGATCCCTGGAAAG	788	42	70.1	49.2	-1.3	-1.3	4
68 CTGGGAAAGATTCGAGTTCGGGCTGATGATGAAATAG	673	49	70.6	47.6	-1.1	-1.3	4
88 CCGCCATCTACGCTCGATTCACGCTCCCTCCATCCCTCAACACT	601	49	70.2	42.4	-1.4	-1.4	3
83 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
82 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
84 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
85 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
86 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
87 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
89 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
90 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
91 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
92 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
93 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
94 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
95 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
96 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
97 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
98 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
99 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
100 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
101 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
102 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
103 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
104 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
105 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
106 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
107 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
108 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
109 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
110 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
111 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
112 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
113 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
114 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
115 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
116 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
117 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
118 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
119 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
120 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
121 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
122 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
123 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
124 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
125 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
126 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
127 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
128 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
129 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
130 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
131 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
132 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
133 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
134 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
135 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
136 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
137 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
138 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
139 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
140 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
141 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
142 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
143 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
144 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
145 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
146 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
147 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
148 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
149 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
150 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3
151 GGTGGATTAAAGTCAGAGTATAGAAATCCCTATCGCTCCGTCGAT	1,910	42	69.7	49.2	-1.3	-1.3	3

그림 1. 표 1에 제시된 진단 대상 바이러스의 complete genome sequence를 사용하여 Premier Biosoft International의 “Array Designer 3.01”을 이용하여 설계된 1,948개의 oligonucleotide.

Quality	Rating	Probe Sequence	Position	Length	Tm	GC%	Hairpin	Hairpir	Self D	Self C	Run/Repeat	Length
CMV R3 01		TGGTCGTATTGCTCTCTTCTTTAAAGTCTGGATATGATGTTGGTGAATTGT	1,910	50	69.7	45.2	-1.3	3	-1.3	3	2	
CMV R3 02	Best	ATTTGATCTACCGTGTGGGTGACAGTCCGTAAGTTCCTGCCTCCTCGG	589	50	70.5	50	-1.4	3	-2.2	4	2	
CMV R3 03	Best	CATAACCATGATCTCCCGCTTTAGTGTCTTCCAACCCGACGTATGATTG	1,596	50	70.1	45	-1.9	3	-1.9	3	3	
CMV R3 04	Good	AACATTAAACCACCCACCTTTGAGGAGTGAACGCTGTAACCTGGT	863	50	70.1	40.9	-1.9	4	-1.9	4	3	
CMV R3 05	Good	GAGTCGAGTCATGGACAATCTGAATCAACCACTGCTGGTCTGAACCGTC	768	50	70.1	45.2	-1.3	3	-3	4	3	
CGMMV 01	Good	ATGGATGTAACGAAGATATGGAGGATATAGTGTGATGGCGGACAAGAG	348	50	70.1	44.2	-1.7	3	-3	4	3	
CGMMV 02	Good	CCTACGGCTCACCTTTGTATGACATCGCGGTAACATACCCAGCACTTG	673	50	70.8	47.5	-1.1	3	-3.3	4	3	

AMV02	Best	83.4	CTTTTTAATGAAGCTACAGGAGAGTTAGTGGATGTTGACACCCACCATGA	790	50	71.6	52.5	-1.2	3	-1.2	3	2
AMV03	Best	83.2	TACCCCGGAGTATTCTGGCGAAGATGCAGCGAAAGGACACGACTTAAA	2,131	50	71.2	47.5	-0.8	3	-0.8	3	3
AMV04	Best	83.2	TGGTGTGTCTAATGGAGCAGCGCCAGTAGTTTTAAGCCTTGTGCAAG	1,345	50	69.9	40	-1.3	3	-2.4	6	3
AMV05	Best	83.2	CTGGGAAGATGAGTTAAGCAAGACAGATCCTCGAAAGGGGTCCGAGATT	5,010	50	69.1	40.9	-0.7	3	-1	4	3

그림 2. 1,948개의 설계된 oligonucleotide 가운데 15종의 진단대상 바이러스 특이적인 oligonucleotide.

표 2. 1-2차 연도 진단 대상 바이러스의 목록.

Group	Virus species	Acronym	Acc. No.
Tobamovirus	Cucumber green mottle mosaic virus	CGMMV	NC_001801 , AF417243 , AF417242 외 51개 (320 kb)
	Kyuri green mottle mosaic virus	KGMMV	NC003610, AB162006 외 9개 (57 kb)
	Ribgrass mosaic virus	RMV	NC002792, AF254924 외 5개 (25 kb)
	Tobacco mild green mosaic virus	TMGMV	NC_001556 , AB078435 , M34077 외 104개 (600 kb)
	Tomato mosaic virus	ToMV	AJ417701 , AB083196 , NC_002692 외 44개 (220kb)
	Pepper mild mottle virus	PMMoV	NC_003630 외 28개 (157kb)
	Odontoglossum ringspot virus	ORSV	NC_001728 외 41개 (233kb)
Potyvirus	Watermelon mosaic virus 2	WMV2	NC_006262 외 28개 (250kb)
	Zucchini yellow mosaic virus	ZYMV	NC_003224 외 204개 (1500kb)
	Soybean mosaic virus	SMV	NC_002634 외 174개 (1300kb)
	Pepper mottle virus	PepMoV	NC_001517 , AF501591 , M96425 외 12개 (130kb)
	Turnip mosaic virus	TuMV	NC_002509 외 283개 (1700kb)
	Potato virus Y	PVY	NC_001616 외 171개 (840kb)
	Sweet potato feathery mottle virus	SPFMV	NC_001841, D86371 외 96개 (900kb)
Onion yellow dwarf virus	OYDV	NC_005029 외 41개 (336kb)	
Cucumovirus	Cucumber mosaic virus	CMV: 박과	NC_002035 , NC_002034 외 445개 (1180kb)
	Cucumber mosaic virus	CMV: 가지과	NC_001440 , AY429437 외 189개 (240kb)
Carmovirus	Melon necrotic spot virus	MNSV	AY122286 외 21개 (75kb)
Potexvirus	Potato virus X	PVX	NC_001455 외 49개 (270kb)
Tobravirus	Tobacco rattle virus	TRV	X06172 , NC_003811 , D00155 외 48개 (280kb)
Luteovirus	Potato leaf roll virus	PLRV	D13954, AY138970 , AF453390 외 62개 (350kb)
Fijivirus	Rice black-streaked dwarf virus	RBSDV	NC_003733 , NC_003731 외 55개 (90kb)
Bymovirus	Barley yellow mosaic virus	BaYMV	NC_002990 , NC_002991 외 88개 (390kb)
Tenuivirus	Rice stripe virus	RSV	NC003776 , NC003755 , NC003754 외 276개 (520kb)
Carlavirus	Shallot latent virus	SLV	AB004802 , AB004803 외 3개 (6kb)
11 groups	25 species	2,500여 sequences, 12,000 kb	

60여 group의 식물 바이러스 가운데 11개 group에 속하는 25종의 바이러스가 진단대상으로 선정되었음. 분석에 사용된 2500여개의 개별 염기서열이 사용되었으며 각 바이러스당 평균 100개의 서열 data와 총 12 Mb의 염기서열이 분석되었음.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	
1	Accession	Sequence	Quality	Rating	Probe	Seq. Position	Length	Tm	GCS	Haipen	dt	Haipen	dt	Self	Clamp	Self	Clamp
2	+0	12595	Fragment	200	Good	95.1 AAKACAA	83	49	71.5	36.7	-1.5	4	-0.5	9	3		
3	+0	12595	Fragment	200	Good	76 CTTCGGCC	107	46	71.9	46.7	-0.5	3	-0.5	6	5		
4	+0	12595	Fragment	200	Good	67 TCCGACG	41	45	71.6	44.4	-1.3	3	-0.7	6	3		
5	+0	12595	Fragment	200	Good	82.2 CTTCATAGG	112	47	70.2	49.4	-2	4	-3.3	4	3		
6	+0	12595	Fragment	200	Good	59.6 ATAGTTAG	93	49	70.8	39.6	-1.9	4	-1.9	4	3		
7	+0	12595	Fragment	200	Good	85.4 CGCAAGGT	129	47	72.1	44.7	-2.4	4	-3	4	3		
8	+0	12595	Fragment	200	Good	64.6 GAGAAAT	65	49	70.3	39.6	-1.4	3	-3.3	4	3		
9	+0	12595	Fragment	200	Good	80.4 AATCTCCG	97	45	71.5	46.7	-1.5	4	-1.5	4	2		
10	+0	12595	Fragment	200	Good	85.6 AGTCTCTC	64	49	72.4	44.4	-0.9	3	-4.2	4	2		
11	+0	12595	Fragment	200	Good	83.5 GAGATGTA	123	49	71.1	42.9	-1	3	-1	3	2		
12	+0	12595	Fragment	200	Good	64 CGAGGCC	147	49	71.7	40.6	-2.9	5	-2.9	5	3		
13	+0	12595	Fragment	200	Good	76.9 AGGAAATC	190	45	72.8	48.9	-1.4	4	-1.9	4	2		
14	+0	12595	Fragment	200	Good	86.6 GGTTCGCG	51	45	71.2	44.4	-2.5	4	-2.5	4	3		
15	+0	12595	Fragment	200	Good	56.8 GGTTCGCA	35	45	72.1	48.9	-2.7	4	-2.4	4	3		
16	+0	12595	Fragment	200	Good	72.9 CAGGTTG	38	45	72.5	48.9	-1.2	4	-2.6	4	3		
17	+0	12595	Fragment	200	Good	67.8 GCTGCGC	94	47	71.9	44.7	-1	3	-0.7	6	3		
18	+0	12595	Fragment	200	Good	86.8 GAAAGTG	52	45	72	48.7	-1.4	4	-3.3	4	3		
19	+0	12595	Fragment	200	Good	86.9 GATGCGGT	28	45	72.2	44.4	-2.5	4	-2.5	4	3		
20	+0	12595	Fragment	200	Good	54.7 AGGAGGCT	110	47	72	44.7	-1.5	3	-0.7	6	4		
21	+0	12595	Fragment	200	Good	86.9 GATGCGGT	28	45	72.2	44.4	-2.5	4	-2.5	4	3		
22	+0	12595	Fragment	200	Good	86.9 GATGCGGT	28	45	72.2	44.4	-2.5	4	-2.5	4	3		
23	+0	12595	Fragment	200	Good	86.9 GATGCGGT	28	45	72.2	44.4	-2.5	4	-2.5	4	3		
24	+0	12595	Fragment	200	Good	85.5 TGATAGCG	64	49	71.9	42.9	-2.5	4	-3	4	3		
25	+0	12595	Fragment	200	Good	86.9 GATGCGGT	190	46	72	43.8	-2.2	4	-2.4	3	3		
26	+0	12595	Fragment	200	Good	88.5 CGGAGTAA	58	48	71.6	42.9	-2.3	4	-2.3	4	3		
27	+0	12595	Fragment	200	Good	86.2 GCGGATAA	108	46	72	45.7	-2.2	3	-2.4	3	3		
28	+0	12595	Fragment	200	Good	67.6 TCTCTCTC	31	47	71	49.4	-1.4	3	-0.3	4	3		
29	+0	12595	Fragment	200	Good	88.8 TATGATCC	141	46	73.3	46.7	-1.9	4	-1.9	4	2		

4281	-HC	-003	Fragment	200	Good	86.1 GCTAAATG	95	49	70.7	40.9	-1.8	3	-2.9	4	3	
4282	-HC	-003	Fragment	200	Good	75.4 TCGAGGCT	117	49	71	45.9	-1.6	4	-1.6	4	3	
4283	-HC	-003	Fragment	200	Good	71.3 AAGACAA	153	46	72	43.5	-1.1	3	-0.9	4	3	
4284	-HC	-003	Fragment	200	Good	74.8 ACATCAAC	60	49	71.8	42.9	-1.7	4	-2.9	4	3	
4285	-HC	-003	Fragment	200	Good	70 AGACGATG	4	48	71.3	41.7	-2	4	-2	4	3	
4286	-HC	-003	Fragment	200	Good	64.9 AGGATGGA	17	49	70.7	40.8	-2.1	4	-4.3	5	4	
4287	-HC	-003	Fragment	200	Good	66.6 AGGTCAGT	139	49	70	36.8	-1.2	3	-2.3	4	3	
4288	-HC	-003	Fragment	200	Good	73.6 CCTTGACT	163	45	71.9	46.9	-2.4	4	-2.4	4	2	
4289	-HC	-003	Fragment	200	Good	64.8 CCACATAC	15	49	71.9	44.9	-2.7	4	-2.9	4	3	
4290	-HC	-003	Fragment	200	Good	67.9 ACCTGTC	211	48	72	43.8	-3.2	5	-4.1	6	3	
4291	-HC	-003	Fragment	200	Good	67.2 GTGCAAGT	102	48	72	43.8	-1.9	3	-3.3	4	3	
4292	-HC	-003	Fragment	200	Good	75.5 AACTAAT	58	49	72	43.8	-1.1	3	-1.9	4	3	
4293	-HC	-003	Fragment	200	Good	62 TGAATGCA	60	49	71.1	40.8	-0.8	3	-3.3	4	4	
4294	-HC	-003	Fragment	200	Good	84.9 TCTTCAG	82	47	71.9	42.6	-2.8	4	-3.3	4	3	
4295	-HC	-003	Fragment	200	Good	61.9 GCACGAC	140	48	70.7	41.7	-1.7	4	-2.2	4	4	
4296	-HC	-003	Fragment	200	Good	65.9 ACCCACTG	66	49	69.7	36.7	-1.4	3	-1.4	3	3	
4297	-HC	-003	Fragment	200	Good	75.9 TTCCGATC	62	47	71	42.6	-0.6	3	-0.6	3	3	
4298	-HC	-003	Fragment	200	Good	72.9 CGAGGCTC	149	45	71.5	42.9	-1.7	3	-1.7	3	3	
4299	-HC	-003	Fragment	200	Good	72.8 ACACATC	119	47	72	44.7	-2.4	4	-2.4	4	2	
4300	-HC	-003	Fragment	200	Good	72.3 ACACGATG	34	49	71.3	40.8	-2.2	4	-2.8	6	2	
4301	-HC	-003	Fragment	200	Good	72 AGATGTTA	93	49	70.3	36.8	-1	3	-1	3	3	
4302	-HC	-003	Fragment	200	Good	63.8 GCTCAGTA	119	48	72.1	43.8	-2	4	-3	4	4	

그림 3. 표 1에 제시된 진단 대상 바이러스의 complete genome sequence를 사용하여 Premier Biosoft International의 “Array Designer 4.0”을 이용하여 설계된 4,300여개의 oligonucleotide probes. 각각의 염기서열은 기본적으로 200nt를 하나의 단위로하여 oligonucleotide probes가 설계되었음.

	A	B	C	D	E
46	PVX 01	Fragment from 401 of Accession NO : NC_001455	ATAATT	48	
47	PVX 04	Fragment from 6001 of Accession NO : NC_001455	GTATGG	45	
48	PVX 05	Fragment from 5401 of Accession NO : NC_001455	CCCTAG	48	
49					
50	PVY 01	Fragment from 401 of Accession NO : NC_001616	CATCAA	46	
51	PVY 04	Fragment from 6401 of Accession NO : NC_001616	TACACA	46	
52	PVY 06	Fragment from 8401 of Accession NO : NC_001616	ATGGCA	47	
53					
54	RBSDV 02	Fragment from 2201 of Accession NO : NC_003737	CCCAAC	48	
55	RBSDV 05	Fragment from 1601 of Accession NO : NC_003733	TAGTTC	46	
56	RBSDV 06	Fragment from 201 of Accession NO : NC_003730	AAGATG	46	
57					
58	RMV 01	Ribgrass mosaic virus complete genome.	TGCCAA	50	
59	RMV 03	Ribgrass mosaic virus complete genome.	AGCTGG	50	
60	RMV 04	Ribgrass mosaic virus complete genome.	GTTCAT	50	
61					
62	RSV 01	Fragment from 1 of Accession NO : NC_003753	GCCTAG	49	
63	RSV 05	Fragment from 2201 of Accession NO : NC_003776	CCAGTG	45	
64	RSV 06	Fragment from 2401 of Accession NO : NC_003754	GCCTTC	46	
65					
66	SLV 03	Fragment from 601 of Accession NO : AB004802	ATGGTG	45	
67	SLV 04	Fragment from 1 of Accession NO : AB004544	ATATTA	47	
68	SLV 06	Fragment from 401 of Accession NO : AB004544	TGTTCT	45	
69					
70	SMV 01	Soybean mosaic virus genomic RNA, complete genome, isolate Aa.	GTGAAT	50	
71	SMV 02	Soybean mosaic virus N genomic RNA, complete genome.	GGAGGA	50	
72	SMV 06	Soybean mosaic virus strain 07H, complete genome.	TGATTT	50	
73					
74	SPFMV 02	Fragment from 9401 of Accession NO : NC_001041	TCTATA	46	
75	SPFMV 03	Fragment from 10401 of Accession NO : NC_001041	CGCAAG	45	
76	SPFMV 04	Fragment from 3601 of Accession NO : D86371	CTCTTA	47	
77					

그림 4. 4,300여개의 설계된 oligonucleotide 가운데 25종의 진단대상 바이러스 특이적인 oligonucleotide probes.

2. pilot DNA chip 제작 및 검증

가. Oligonucleotide의 spiking 효율 검증

1). Oligonucleotide의 적정 농도

합성된 oligonucleotide를 최종적으로 200 pmol의 농도가 될 수 있도록 ddH₂O를 첨가하여 희석하였다. 5 ul의 oligonucleotide를 취하여 5 ul의 DMSO를 첨가하여 oligonucleotide가 50 %의 DMSO 용액에 희석되도록 하였다. cDNA chip과 달리 oligonucleotide chip의 경우에 나타나는 signal의 강도가 상대적으로 약할 것으로 예상되기 때문에 최소 200 pmol/ul가 될 수 있도록 조건을 확립하였다.

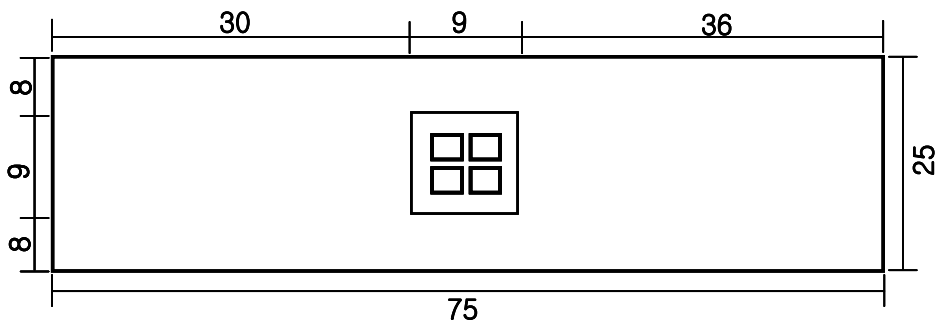


그림 5. 시험용 oligonucleotide chip의 형태 및 사양 (단위 mm). Single format으로 2 by 2 meta-array로 제작되었다. Quadruple 형태의 block은 12 by 4 spot, spot의 직경은 100-140 um, spot간 거리는 330 um, block간 거리는 4.5 mm이다.

2) Slide의 선택 및 spotting 조건 확립

Oligonucleotide의 spotting을 위한 slide glass는 변형 oligonucleotide의 제작 비용을 고려하여 Corning Inc.사에서 판매되는 UltraGASP를 선택하였음. Cartesian spotter를 사용하여 spotting한 결과 spot의 형태가 도넛 형태로 나타나는 것과 spot들 사이에 intensity의 편차가 다소 나타나는 것으로 확인 되었다. Spotting 조건은 23℃, 55% 습도에서 수행되었으며 spot의 형태는 진단 결과에 거의 영향을 끼치지 않기 때문에 intensity의 차이를 극복하기 위하여 미세한 온도 및 습도의 조절이 용이한 MicroGrid II를 이용하여 chip을 제작하였으나 일부 oligonucleotide의 경우에 이러한 편차를 줄이지 못하였다. 이 결과를 분석해 보면 제작된 oligonucleotide의 불량 또는 DMSO에 의한 oligonucleotide의 aggregation이 일어났을 가능성이 높기 때문에 oligonucleotide의 최종 농도를 반복하여 확인 하였다.

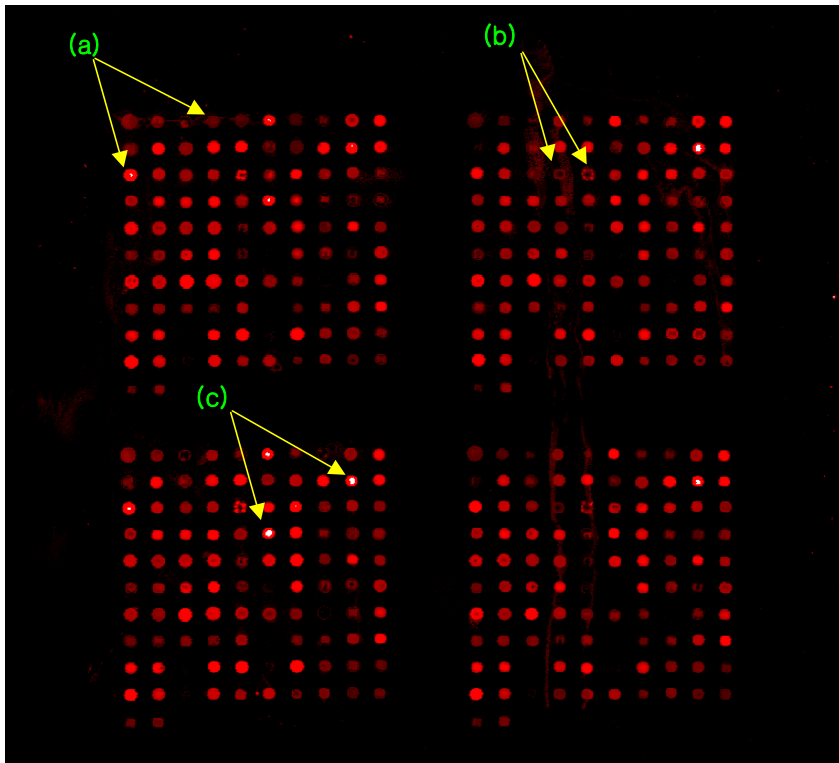


그림 6. Syto 61에 의해 염색된 시험용 oligonucleotide chip. Slide 상에 나타나는 spot의 homogeneity, intensity 및 shape을 확인하기 위하여 oligonucleotide를 염색한 결과 일부 oligonucleotide에서 문제점이 발견됨. (a) Spot간 oligonucleotide의 농도 차이로 인하여 intensity의 차이가 발견됨. (b) 도넛 형태의 spot이 나타났으며 추후 진단 결과에 영향을 끼치지 않으나 chip의 질적인 개선을 위하여 해결되어야 함. (c) Oligonucleotide 농도의 비 균질성에 의해 나타나는 현상으로 (a)의 경우와 반대로 spot의 가운데에 높은 농도의 oligonucleotide가 존재하는 것으로 확인되었음.

3) 다양한 chip hybridization 조건 확립

최소 0.5-1.0 kb 정도의 크기를 가지는 DNA가 spotting된 cDNA chip과 달리 oligonucleotide chip의 경우는 검출 한계가 상대적으로 낮을 것으로 예상되기 때문에 dye에 의한 background를

최소화 하는 것이 매우 중요하다. 또한 본 과제에서 목표로하는 수십종의 target을 동시에 진단하기 위하여 hybridization 조건을 최적화 하는 것이 우선 선행되어야 한다. 여러 가지 실험 조건에서 나타날 수 있는 이러한 background를 확인하기 위하여 여러가지 target이 포함된 시료에 의한 chip의 hybridization의 경우에 나타날 수 있는 실험을 당해 년도에 수행하였다. 실험실에서 일반적으로 사용되는 waterbath내 에서의 agitation 조건과 surface acoustic wave agitation이 가능한 slide hybridization system을 보유한 Advalytix사의 slidebooster SB400내 에서의 background를 확인하기 위하여 mild wash condition을 적용하여 시험한 결과 dye에 의한 background가 다소 나타났다. 그러나 stringent wash condition을 적용하여 시험한 결과 그 차이를 확인 할 수 없었다. 당해 년도에 수행한 여러 가지 target을 포함한 시료를 동시에 처리하여 chip hybridization 조건 확립을 위한 실험 결과를 종합해 보면 stringent wash condition을 적용하여 시험한 결과 그 차이를 확인 할 수 없었다. 그러나 stringent wash가 이루어 질 경우 나타날 수 있는 signal 감소의 정량적인 정도는 차기 년도에 다시 확인 되어져야 하며 signal을 최대화하고 multi-target 진단 chip에서 빈번하게 나타나는 cross-hybridization에 의한 background 이외의 chip processing 과정에서 발생하는 제반 문제를 해결하기 위한 표준 protocol 작성을 위한 실험이 진행 하고 있다.

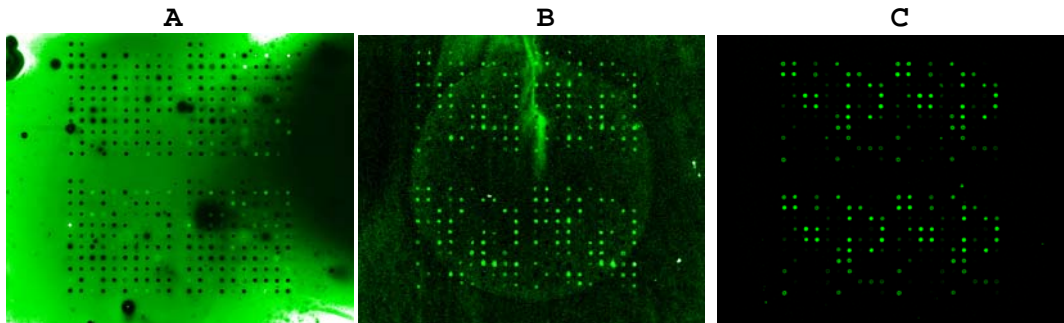
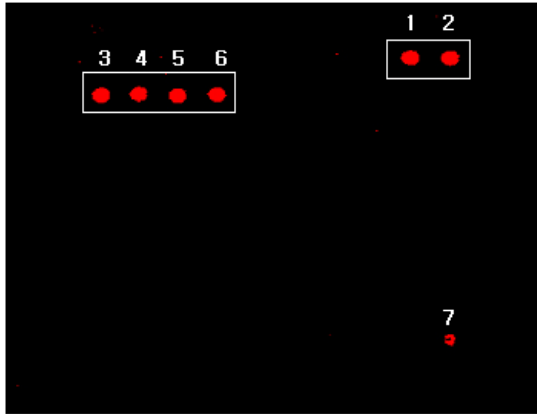


그림 7. 여러 가지 wash 조건 및 hybridization 환경에 따라 나타나는 dye에 의한 background. (A) 42°C, 16 hr, 25 rpm shaking, waterbath에서 hybridization이후 mild wash condition에서 Cy3 dye에 의해 나타나는 background. Dye에 의해 검출되어야 할 signal이 masking되어 진단이 거의 불가능 한 상태임. 따라서 기존에 수행되어진 cDNA chip 또는 single target oligonucleotide chip에 가해지는 wash의 stringency가 적용되어야 할 것으로 예상 됨. (B) 42°C, 16 hr, Advalytix사의 slidebooster SB400에서의 hybridization이후 (A)의 방법에 의한 wash. Waterbath에서 나타나는 background 보다 개선되어 보이나 시료의 처리에 의한 dry marker 및 dye에 의한 background는 제거 되지 못하였음. 따라서 검출되는 signal을 최적화 하기 위하여 slidebooster와 같은 고가 장비를 사용하는 방법이 background의 감소에 다소간의 도움이 될 수 있으나 표준 protocol의 작성을 위한 실제 실험에 의한 조건 확립이 바람직한 것으로 예상됨. (C). 42°C, 16 hr, 25 rpm shaking, waterbath에서 hybridization이후 stringent wash condition에 의한 background. Cy3 dye에 의한 background가 거의 보이지 않으며 동일조건에서 slidebooster에 의해 동일한 결과가 나타났음. 따라서 당해 년도에 확립된 조건에서 나타날 수 있는 signal의 정량적인 감소를 최소화 하기 위한 실험이 수행될 예정임.

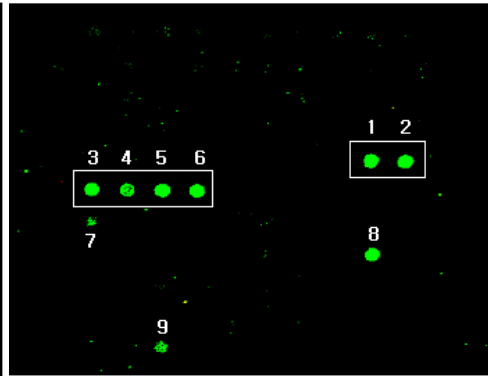
4) Pilot DNA chip 제작 및 검정

Host : Cucumber
 Target virus : CMV
 Dye : A single dye (Cy5)



1 through 6 : CMV specific probes
 7 : ZYMV specific probes

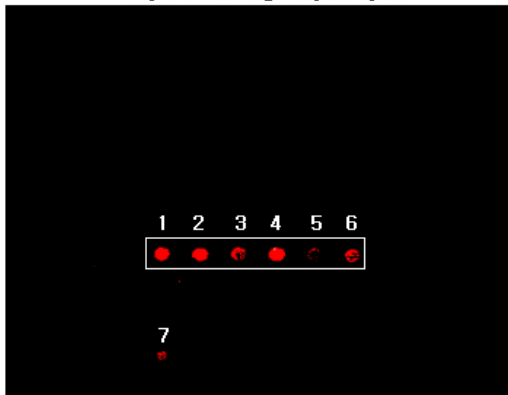
Host : Pepper
 Target virus : PMMoV
 Dye : A single dye (Cy3)



1 through 6 : PMMoV specific probes
 7 : RMV specific probes
 8 : TMV specific probes
 9 : Mixture of all probes

그림 8. Dye의 종류에 따른 oligonucleotide chip의 scanning 결과. 두 종류의 dye에 의하여 labelling된 이병 시료를 이용하여 “GenePix4000B” scanner (Axon Instrument)에서 reading 결과 두 dye의 차이를 확인 할 수 없었음. PMMoV에 감염된 고추 시료를 보면 동일 group의 바이러스인 RMV와 TMV에 특이적인 oligonucleotide probe와 hybridization이 일어나는 것을 볼 수 있었음. CMV에 감염된 오이의 경우 매우 미약하더라도 타 group의 바이러스인 ZYMV에 특이적인 oligonucleotide probe와 hybridization이 일어나는 것을 볼 수 있었음.

Host : Pepper
 Target virus : TMGMV
 Dye : A single dye (Cy5)



1 through 6 : TMGMV specific probes
 7 : Mixture of all probes

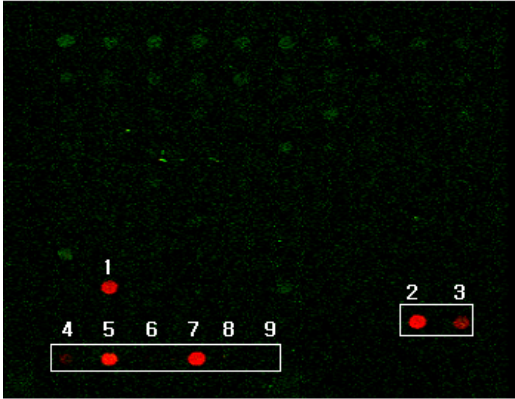
Host : Tobacco
 Target virus : RMV
 Dye : Dye swapping



1 through 6 : RMV specific probes

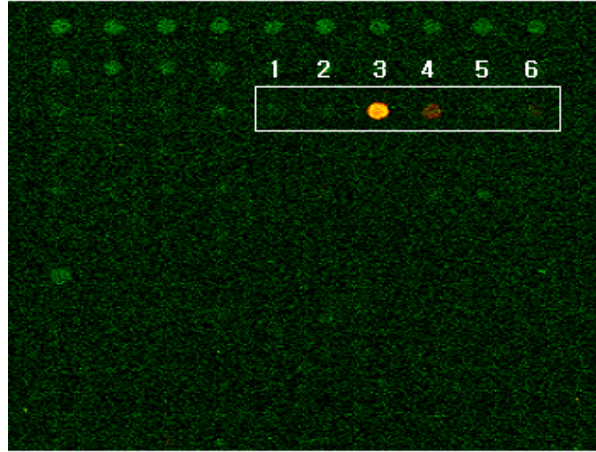
그림 9. Dye swapping에 의한 oligonucleotide chip의 scanning 결과. 두 경우 모두 기주 작물 유래의 유전자가 바이러스 특이적인 oligonucleotide probe와 hybridization이 일어나지 않는 것으로 보여짐. 그러나 각 바이러스에 대해 특이적인 6개의 oligonucleotide probe와 hybridization의 특이성은 서로 다르게 나타났으며 이의 원인이 hybridization strength에 의해 발생하는지 아니면 probe의 spotting의 variation에 의한 결과인지는 확인되지 않았음.

Host : Pumkin
 Target virus : WMV 2
 Dye : Dye swapping



1 : TMV specific probes
 2, 3 : TuMV specific probes
 4 through 9 : WMV 2 specific probes

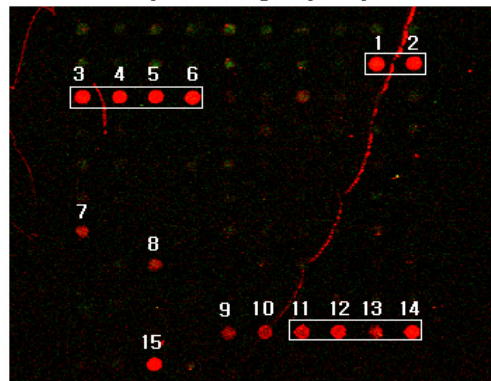
Host : Pumkin
 Target virus : KGMMV
 Dye : Dye swapping



1 through 6 : KGMMV specific probes

그림 10. Dye swapping의 경우에 나타나는 문제점. WMV 2에 감염된 호박 시료를 사용하여 dye swapping을 실시하였을때 single dye의 경우에 나타나는 비특이적인 반응이 그대로 재현되었으나 기주 작물 유래의 유전자가 나타내는 비 특이적인 반응은 나타나지 않았음. 그러나 KGMMV에 감염된 동일한 작물 시료를 사용하여 dye swapping을 실시 하였을때 기주 작물 유래의 유전자에 의한 비 특이적인 반응이 나타났으며 또한 바이러스 특이적인 oligonucleotide probe와 hybridization이 일어나지 않는 것으로 나타났음. 이러한 현상은 dye labelling 과정에서 혼하게 발생하는 현상으로 labelling substrate의 건전성에 따라 결정되기 때문에 실험시 고도의 주의가 요구된다.

Host : Pumkin
 Target virus : CMV and ZYMV
 Dye : A single dye (Cy5)



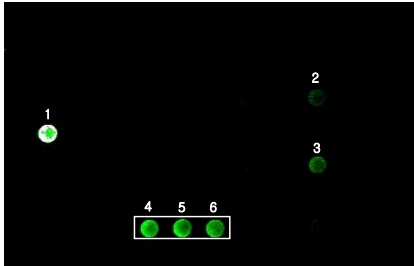
1 through 6 : CMV specific probes
 7 : RMV specific probes
 8 : TMGMV specific probes
 9, 10 : WMV 2 specific probes
 11 through 14 : ZYMV specific probes
 15 : Mixture of all probes

그림 11. 복합 감염된 이병시료를 처리한 결과. 두 종류 이상의 복합 감염된 시료의 경우에 칩에 의해 감염된 모든 바이러스의 검출 가능성을 시도하였음. 서로 다른 group의 바이러스인 CMV 및 ZYMV가 복합 감염된 시료를 칩에 처리한 결과, 복합 감염된 바이러스 모두 진단이 가능한 것으로 나타났음. 대각선으로 나타나는 background는 slide의 coverglass에 의해 종종 발생하는 것으로 실험의 결과를 판독하는데 지장을 초래하지는 않음.

나. 다양한 chip hybridization 조건 확립

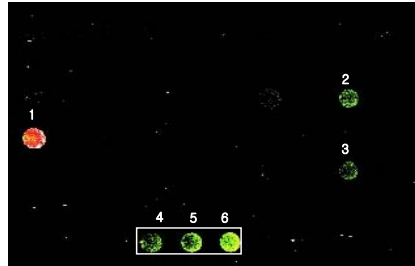
1) Dye swapping에 의한 chip 검정

Host : Pumpkin
 Target virus : WMV2
 Dye : A single dye (Cy3)



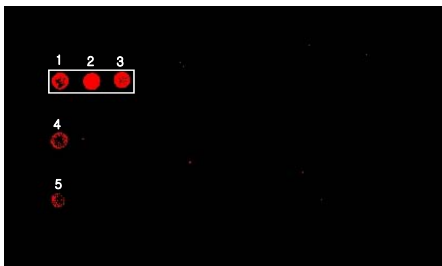
- 1 : RMV specific probes
- 2 : TMGMV specific probes
- 3 : SMV specific probes
- 4 Through 6 : WMV2 specific probes

Host : Pumpkin
 Target virus : WMV2
 Dye : Dye swapping (virus > cy3)



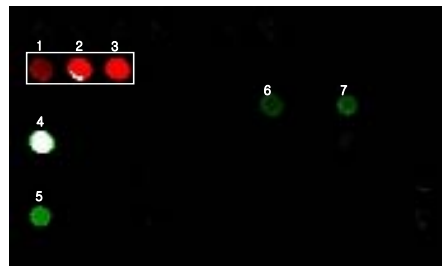
- 1 : RMV specific probes (cy3,cy5)
- 2 : TMGMV specific probes (cy3)
- 3 : SMV specific probes (cy3)
- 4 Through 6 : WMV2 specific probes

Host : Pepper
 Target virus : PepMoV
 Dye : A single dye (Cy5)



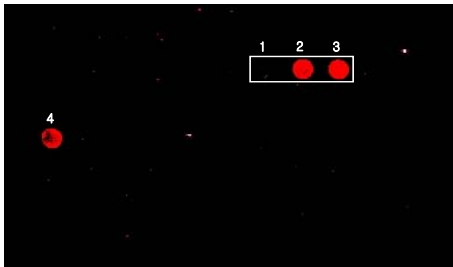
- 1 Through 3 : PepMoV specific probes
- 4 : RMV specific probes
- 5 : KGMMV specific probes

Host : Pepper
 Target virus : PepMoV
 Dye : Dye swapping (virus > cy5)



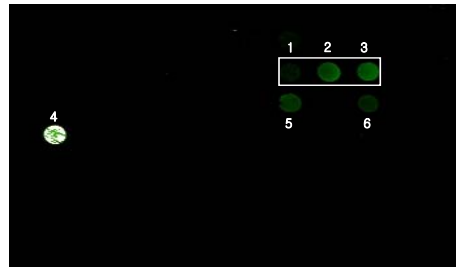
- 1 Through 3 : PepMoV specific probes
- 4 : RMV specific probes (cy3,cy5)
- 5 : KGMMV specific probes (cy3)
- 6 , 7 : TMGMV specific probes (cy3)

Host : Radish
Target virus : TuMV
Dye : A single dye (Cy5)



1 Through 3 : TuMV specific probes
4 : RMV specific probes

Host : Radish
Target virus : TuMV
Dye : Dye swapping (virus > cy3)



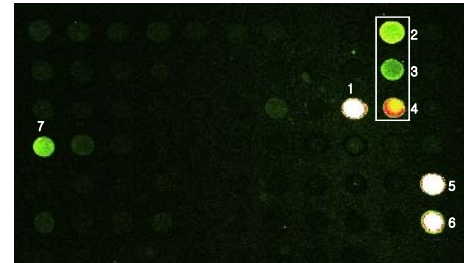
1 Through 3 : TuMV specific probes
4 : RMV specific probes (cy3,cy5)
5 , 6 : TMGMV specific probes (cy3)

Host : Cucumber
Target virus : CGMMV
Dye : A single dye (Cy5)



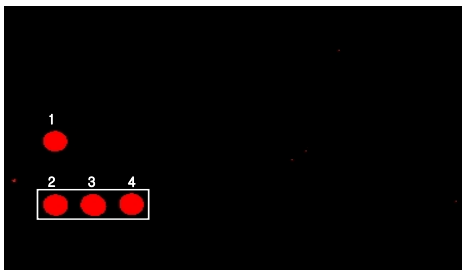
1 : TMGMV specific probes
2 Through 4 : CGMMV specific probes
5 , 6 : BMMV specific probes

Host : Cucumber
Target virus : CGMMV
Dye : Dye swapping (virus > cy3)



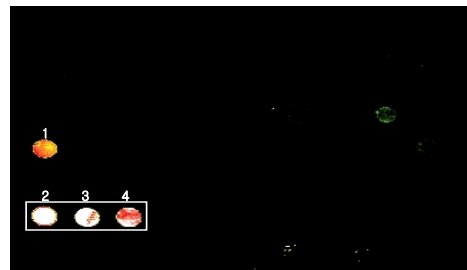
1 : TMGMV specific probes (cy3)
2 Through 4 : CGMMV specific probes
5 , 6 : BMMV specific probes (cy3)
7 : RMV specific probes (cy3,cy5)

Host : Pumpkin
Target virus : KGMMV
Dye : A single dye (Cy5)



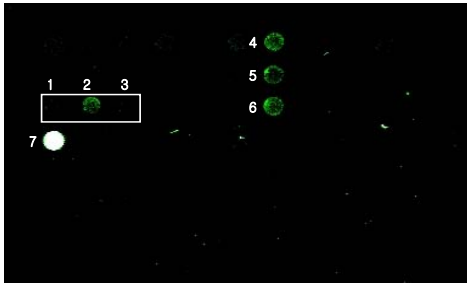
1 : RMV specific probes
2 Through 4 : KGMMV specific probes

Host : Pumpkin
Target virus : KGMMV
Dye : Dye swapping (virus > cy5)



1 : RMV specific probes (cy5,cy3)
2 Through 4 : KGMMV specific probes

Host : Tobacco
 Target virus : ToMV
 Dye : A single dye (Cy3)



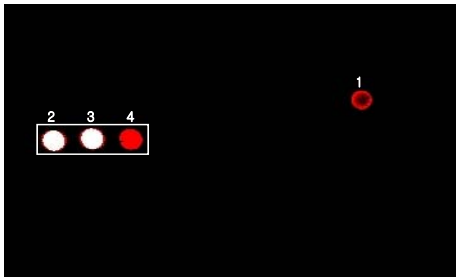
- 1 Through 3 : ToMV specific probes
- 4 : PLRV specific probes
- 5 : TuMV specific probes
- 6 : TMGMV specific probes
- 7 : RMV specific probes

Host : Tobacco
 Target virus : ToMV
 Dye : Dye swapping (virus > cy3)



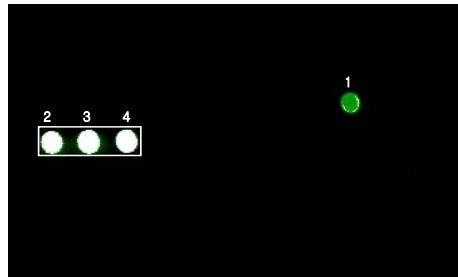
- 1 Through 3 : ToMV specific probes
- 4 : RMV specific probes (cy3,cy5)

Host : Tobacco
 Target virus : RMV
 Dye : A single dye (Cy5)



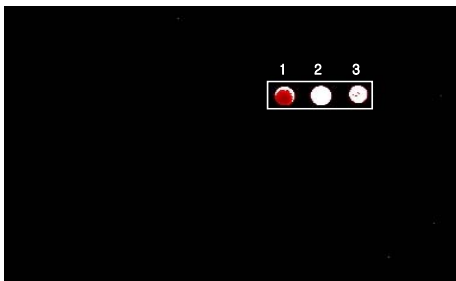
- 1 : TMGMV specific probes
- 2 Through 4 : RMV specific probes

Host : Tobacco
 Target virus : RMV
 Dye : Dye swapping (virus > cy3)



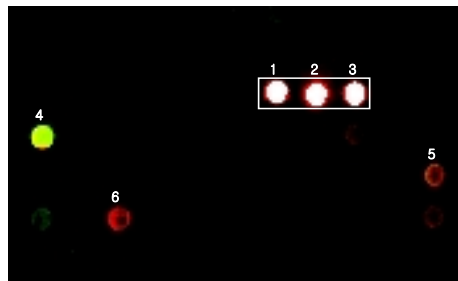
- 1 : TMGMV specific probes (cy3)
- 2 Through 4 : RMV specific probes

Host : Pepper
 Target virus : TMGMV
 Dye : A single dye (Cy5)



- 1 Through 3 : TMGMV specific probes

Host : Pepper
 Target virus : TMGMV
 Dye : Dye swapping (virus > cy5)

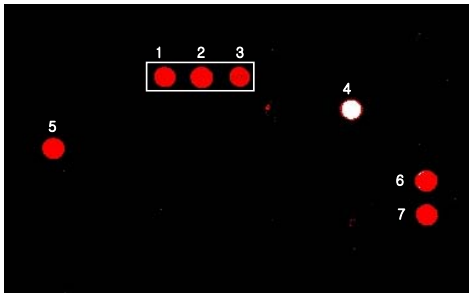


- 1 Through 3 : TMGMV specific probes
- 4 : RMV specific probes (cy5,cy3)
- 5 : BMMV specific probes (cy5)
- 6 : KGMMV specific probes (cy5)

Host : Pepper

Target virus : PMMoV

Dye : A single dye (Cy5)

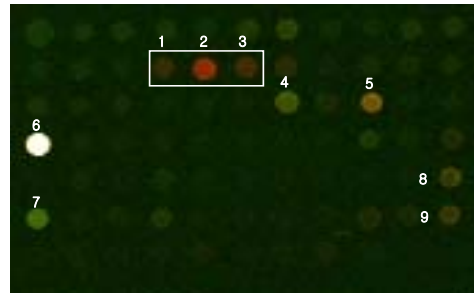


- 1 Through 3 : PMMoV specific probes
- 4 : TMGMV specific probes
- 5 : RMV specific probes
- 6 , 7 : BMMV specific probes

Host : Pepper

Target virus : PMMoV

Dye : Dye swapping (virus > cy5)

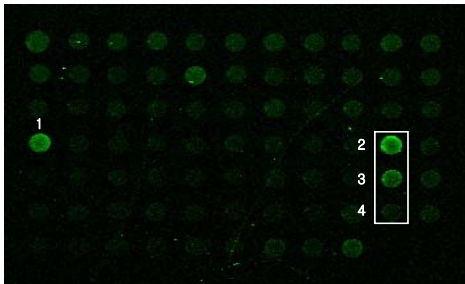


- 1 Through 3 : PMMoV specific probes
- 4 , 5 : TMGMV specific probes (cy5,cy3)
- 6 : RMV specific probes (cy3,cy5)
- 7 : KGMMV specific probes (cy3,cy5)
- 8 , 9 : BMMV specific probes (cy3,cy5)

Host : Cucumber

Target virus : CMV

Dye : A single dye (Cy3)

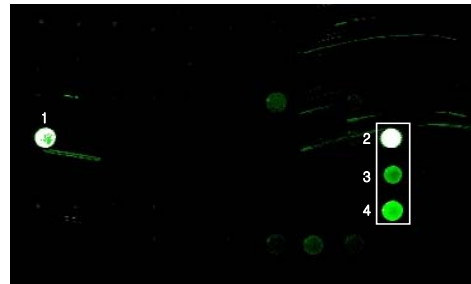


- 1 : RMV specific probes
- 2 Through 4 : CMV specific probes

Host : Cucumber

Target virus : CMV

Dye : Dye swapping (virus > cy3)



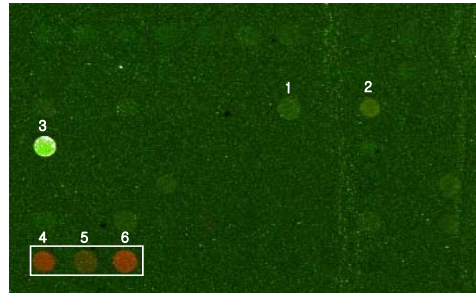
- 1 : RMV specific probes (cy3,cy5)
- 2 Through 4 : CMV specific probes

Host : Melon
 Target virus : MNSV
 Dye : A single dye (Cy3)



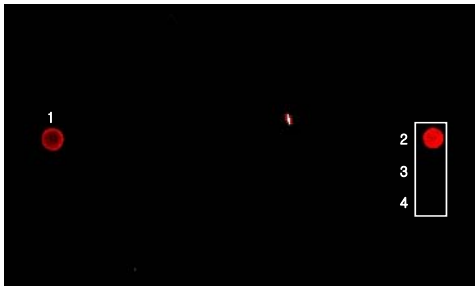
1 : TMGMV specific probes
 2 : RMV specific probes
 3 Through 5 : MNSV specific probes

Host : Melon
 Target virus : MNSV
 Dye : Dye swapping (virus > cy5)



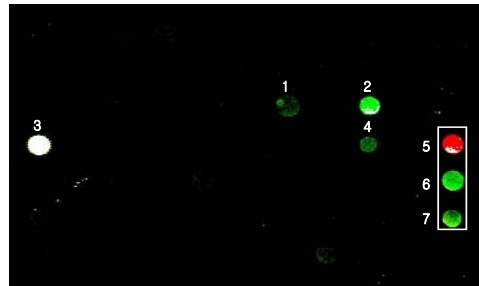
1 , 2 : TMGMV specific probes (cy5,cy3)
 3 : RMV specific probes (cy5,cy3)
 4 Through 6 : MNSV specific probes

Host : Barley
 Target virus : BMMV
 Dye : A single dye (Cy5)



1 : RMV specific probes
 2 Through 4 : BMMV specific probes

Host : Barley
 Target virus : BMMV
 Dye : Dye swapping (virus > cy5)

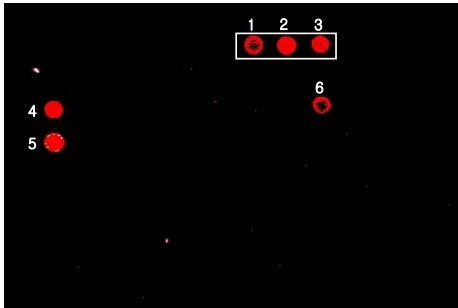


1 , 2 : TMGMV specific probes (cy3)
 3 : RMV specific probes (cy3,cy5)
 4 : RSV specific probes (cy3,cy5)
 5 Through 7 : BMMV specific probes

Host : Potato

Target virus : PLRV

Dye : A single dye (Cy5)

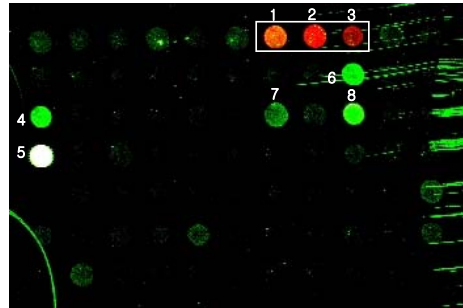


- 1 Through 3 : PLRV specific probes**
- 4 : ToMV specific probes**
- 5 : RMV specific probes**
- 6 : TMGMV specific probes**

Host : Potato

Target virus : PLRV

Dye : Dye swapping (virus > cy5)

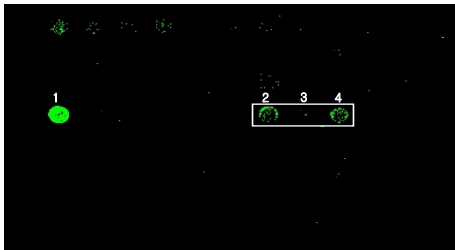


- 1 Through 3 : PLRV specific probes**
- 4 : ToMV specific probes (cy5,cy3)**
- 5 : RMV specific probes (cy5,cy3)**
- 6 : TuMV specific probes (cy3)**
- 7 , 8 : TMGMV specific probes (cy5,cy3)**

Host : Rice

Target virus : RSV

Dye : A single dye (Cy3)

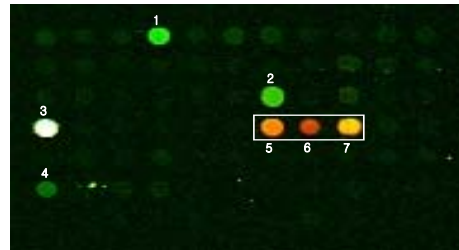


- 1 : RMV specific probes**
- 2 Through 4 : RSV specific probes**

Host : Rice

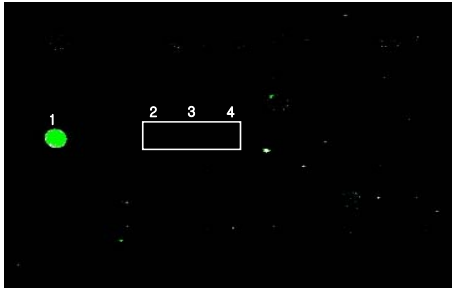
Target virus : RSV

Dye : Dye swapping (virus > cy5)



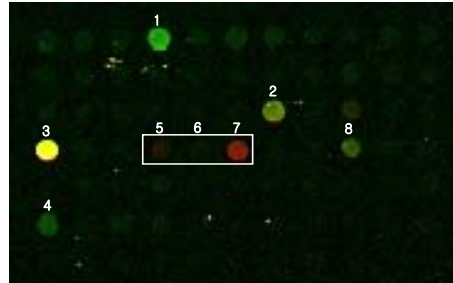
- 1 : PVY specific probes (cy3)**
- 2 : TMGMV specific probes (cy5,cy3)**
- 3 : RMV specific probes (cy5,cy3)**
- 4 : KGMMV specific probes (cy3)**
- 5 Through 7 : RSV specific probes**

Host : Rice
 Target virus : RBSDV
 Dye : A single dye (Cy3)



1 : RMV specific probes
 2 Through 4 : RBSDV specific probes

Host : Rice
 Target virus : RBSDV
 Dye : Dye swapping (virus > cy5)

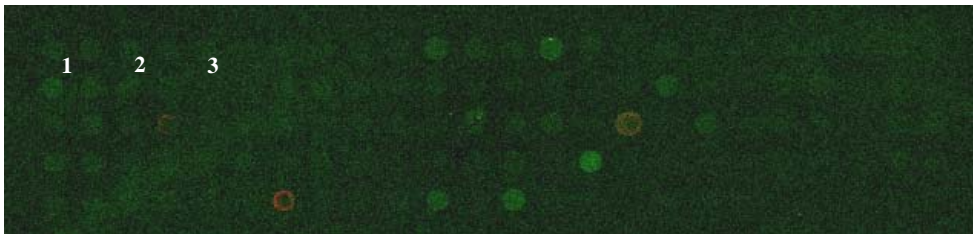


1 : PVY specific probes (cy3)
 2 : TMGMV specific probes (cy5,cy3)
 3 : RMV specific probes (cy5,cy3)
 4 : KGMMV specific probes (cy3)
 5 Through 7 : RBSDV specific probes
 8 : RSV specific probes (cy5,cy3)

그림 12. Single dye 및 dye swapping에 의한 pilot chip의 검정. 적정 chip manual의 개발 및 바이러스 특이적인 oligomer의 cross hybridization을 확인하기 위하여 건진 기주와 이병 기주를 동시에 chip에 처리하여 반응을 확인 하고 있음. 몇몇 바이러스에 대하여 실험이 진행되고 있으며 3차년도 진단대상 바이러스가 확보되면 이들을 진단할 수 있는 oligomer를 포함한 chip을 사용하여 각각의 oligomer의 특성을 파악하여 실용화가 가능한 chip을 제작할 예정이다.

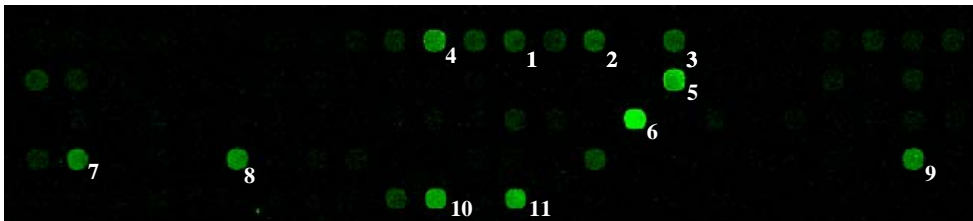
2) 30종 virus 진단용 올리고 chip의 제작 및 검증

Host : Peanut
 Target virus : Alfalfa mosaic alfamovirus (AMV)
 Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)



1, 2, 3 : AMV specific probes

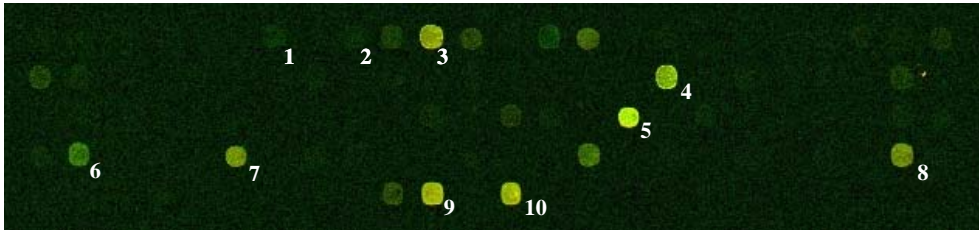
Host : Barley
 Target virus : Barley mild mosaic carmovirus (BaMMV)
 Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)



1, 2, 3 : BaMMV specific probes, 4 : BaYMV specific probes

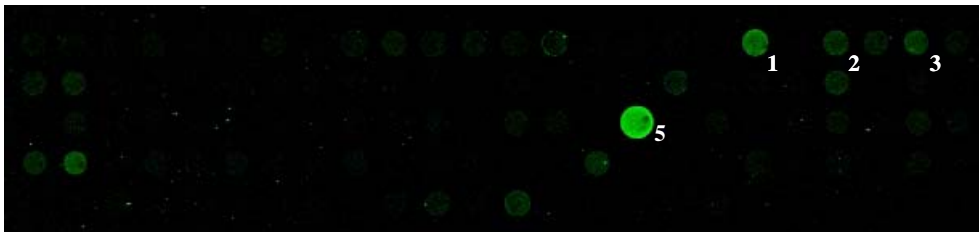
5 : ORSV specific probes, 6 : RMV specific probes,
7, 8, 9 : TMGMV specific probes, 10, 11 : ToMV specific probes

Host : Barley
Target virus : Barley yellow mosaic bymovirus (BaYMV)
Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)



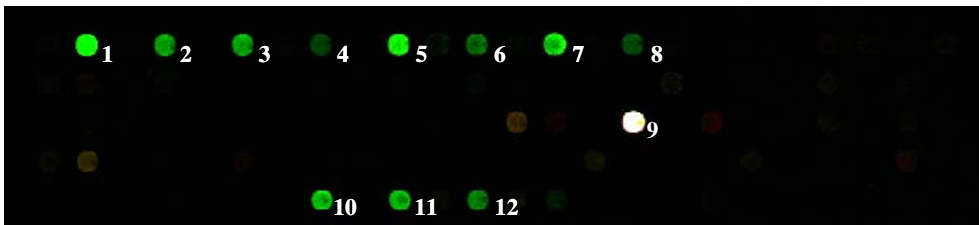
1, 2, 3 : BaYMV specific probes,
4 : ORSV specific probes, 5 : RMV specific probes,
6, 7, 8 : TMGMV specific probes, 9, 10 : ToMV specific probes

Host : 패췁니아
Target virus : Broad bean wilt virus 2 (BBWV2)
Dye : Sample-Cy3 (green)



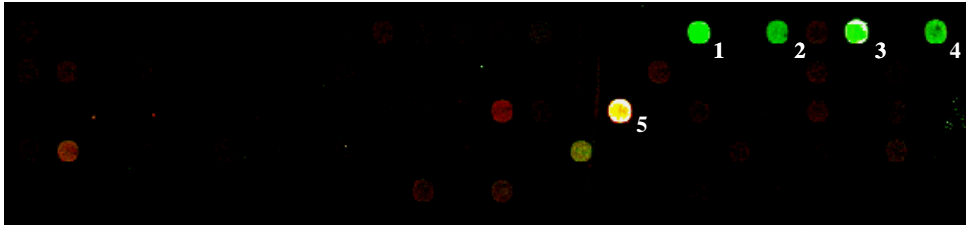
1, 2, 3 : BBWV2 specific probes,
4: RMV specific probes

Host : Cucumber
Target virus : Cucumber mosaic cucumovirus (CMV)
Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)



1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 : CMV specific probes, 9 : RMV specific probes,
10, 11, 12 : ZYMV specific probes

Host : Cucumber
Target virus : Cucumber green mottle mosaic tobamovirus (CGMMV)
Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)

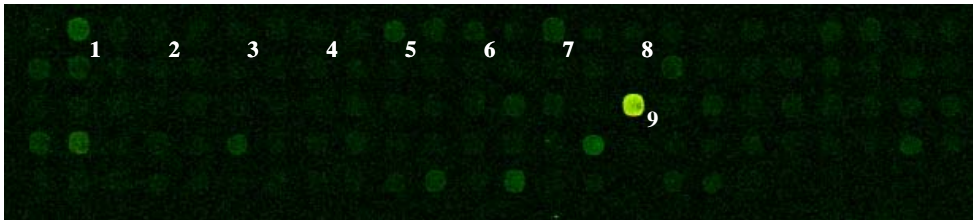


1, 2, 3 : CGMMV specific probes, 4 : KGMMV specific probes,
5 : RMV specific probes

Host : Tobacco

Target virus : Cucumber mosaic cucumovirus (CMV)

Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)



1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 : CMV specific probes
9 : RMV specific probes

Host : Cucumber

Target virus : Kyruui green mosaic tobamovirus (KGMMV)

Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)

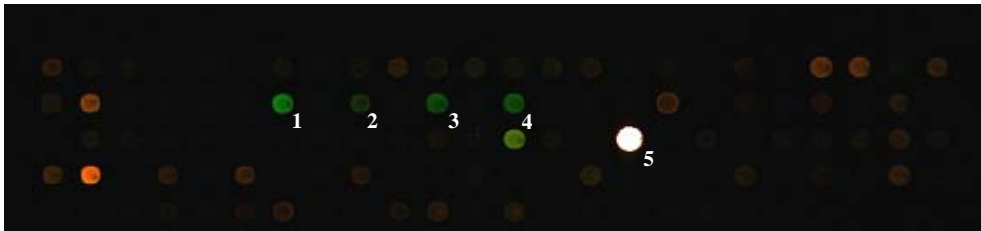


1, 2, 3 : KGMMV specific probes,
4, 5 : RMV specific probes

Host : Melon

Target virus : Melon necrotic spot carmovirus (MNSV)

Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)



1, 2, 3, 4 : MNSV specific probes
5 : RMV specific probes

Host : Orchid

Target virus : Odontoglossum ringspot tobamovirus (ORSV)

Dye : Sample-Cy3 (green)



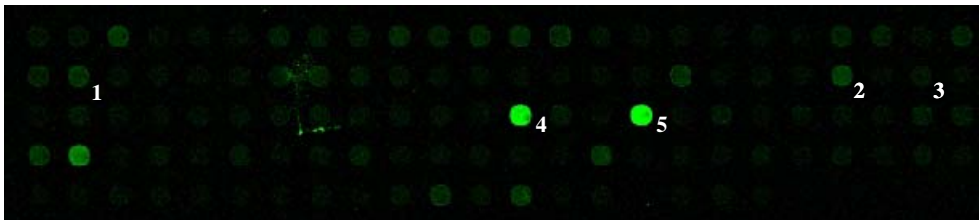
1, 2, 3 : ORSV specific probes

4 : RMV specific probes

Host : garlic

Target virus : Onion yellow dwarf potyvirus (OYDV)

Dye : Sample-Cy3 (green)



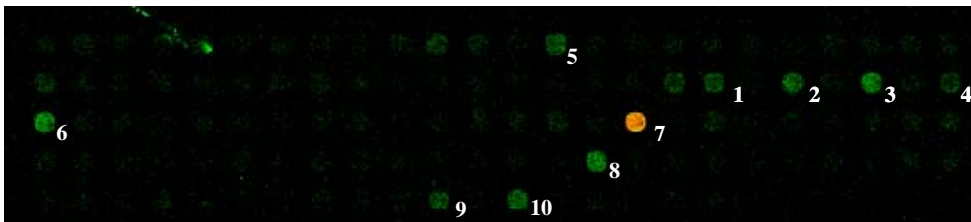
1, 2, 3 : OYDV specific probes,

4 : PVX specific probes, 5: RMV specific probes

Host : Tobacco

Target virus : Pepper mottle potyvirus (PepMoV)

Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)



1, 2, 3, 4 : **PepMoV specific probes**, 5, CMV specific probes,

6 : SLV specific probes, 7 : RMV specific probes

8 : SqMV specific probes, 9, 10 : ToMV specific probes

Host : Potato

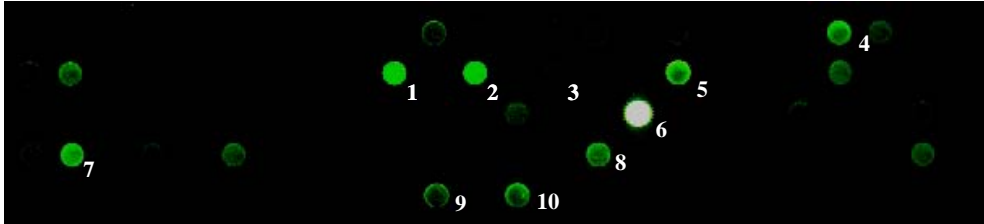
Target virus : Potato leaf roll luteovirus (PLRV)

Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)



1, 2, 3 : PLRV specific probes,
4 : PVX specific probes, 5 : RMV specific probes

Host : Pepper
Target virus : Pepper mild mottle tobamovirus (PMMoV)
Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)



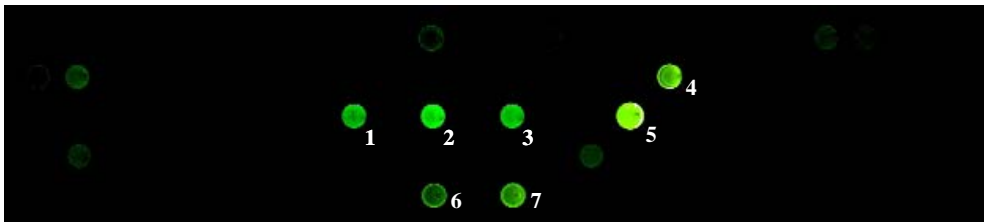
1, 2, 3 : PMMoV specific probes, 4 : BBWV2 specific probes
5 : ORSV specific probes, 6 : RMV specific probes
7 : TMGMV specific probes, 8 : SqMV specific probes,
9, 10 : ToMV specific probes

Host : Pumpkin
Target virus : Papaya ringspot potyvirus (PRSV)
Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)



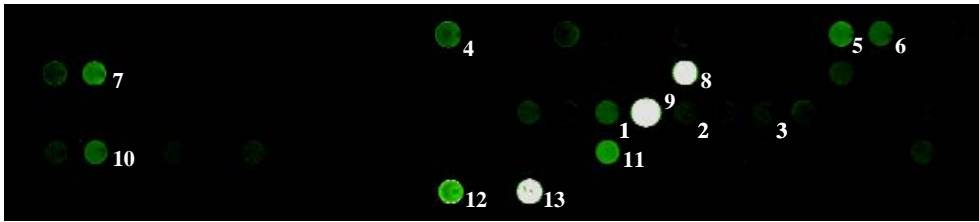
1, 2, 3 : PRSV specific probes
4 : RMV specific probes,

Host : 감자
Target virus : Potato potexvirus X (PVX)
Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)



1, 2, 3 : PVX specific probes, 4 : ORSV specific probes,
5 : RMV specific probes, 6, 7 : ToMV specific probes

Host : 감자
Target virus : Potato potyvirus Y (PVY)
Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)

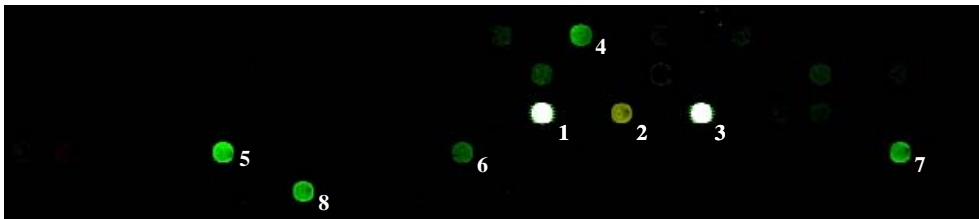


1, 2, 3 : PVY specific probes, 4 : BaYMV specific probes,
 5 : BBWV2 specific probes, 6 : CGMMV specific probes,
 7 : OYDV specific probes, 8: ORSV specific probes, 9 : RMV specific probes,
 10 : TMGMV specific probes, 12, 13 : ToMV specific probes

Host : Tobacco

Target virus : Ribgrass mosaic tobamovirus (RMV)

Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)

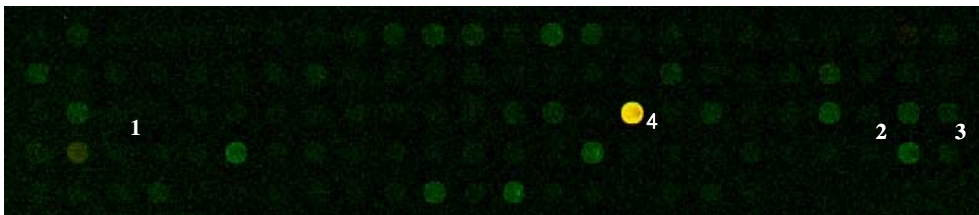


1, 2, 3 : **RMV specific probes**, 4 : BaMMV specific probes
 5, 6, 7 : TMGMV specific probes, 8 : ZYMV specific probes

Host : Rice

Target virus : Rice black-streaked dwarf fijivirus (RBSDV)

Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)

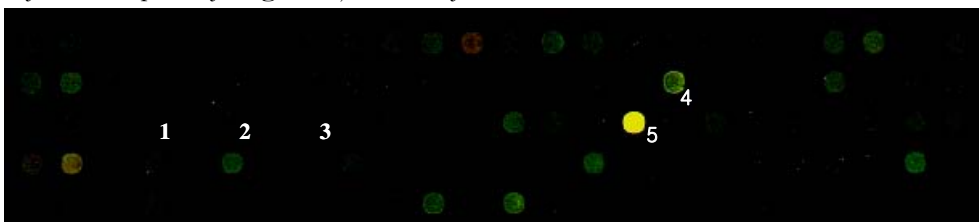


1, 2, 3 : **RBSDV specific probes**,
 4 : RMV specific probes

Host : Rice

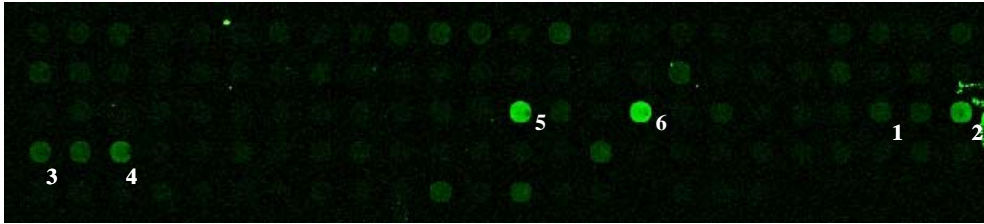
Target virus : Rice stripe tenuivirus (RSV)

Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)



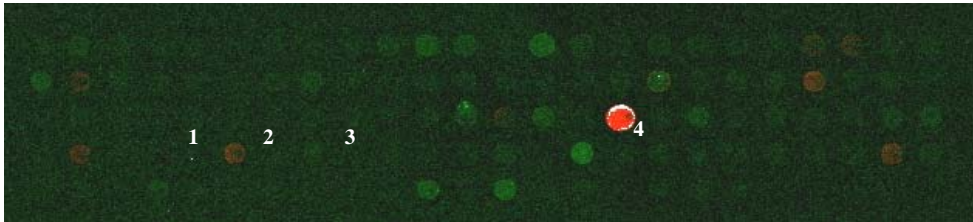
1, 2, 3 : **RSV specific probes**,
 4 : ORSV specific probes, 5 : RMV specific probes

Host : garlic
Target virus : Shallot latent carlavirus (SLV)
Dye : Sample-Cy3 (green)



1, 2, 3, 4 : SLV specific probes,
5 : PVX specific probes, 6 : RMV specific probes

Host : Soybean
Target virus : Soybean mosaic potyvirus (SMV)
Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)



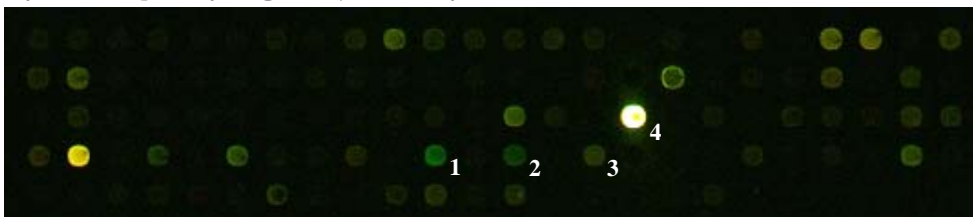
1, 2, 3 : SMV specific probes
4 : RMV specific probes

Host : Sweet potato
Target virus : Sweet potato feathery mottle potyvirus (SPFMV)
Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)



1, 2, 3 : SPFMV specific probes
4 : RMV specific probes, 5 : SLV specific probes

Host : Pumpkin
Target virus : Squash mosaic comovirus (SqMV)
Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)



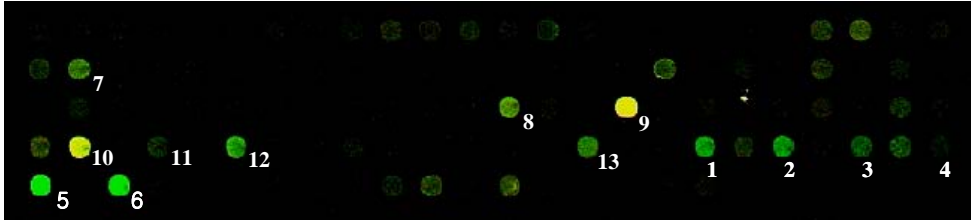
1, 2, 3 : SqMV specific probes

4 : RMV specific probes,

Host : Tobacco

Target virus : Tobacco mosaic virus (TMV)

Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)



1, 2, 3, 4, 5, 6 : TMV specific probes, 7 : ORSV specific probes,

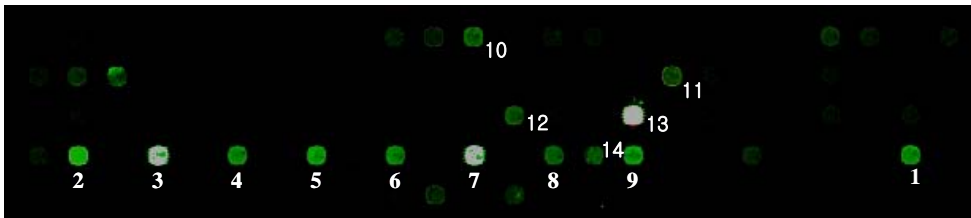
8 : PVX specific probes, 9 : RMV specific probes

10, 11, 12 : TMGMV specific probes

Host : Pepper

Target virus : Tobacco mild green mosaic tobamovirus (TMGMV)

Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)



1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 : TMGMV specific probes, 10 : CMV specific probes,

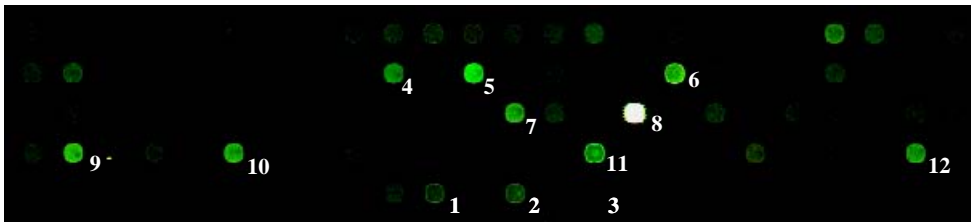
11 : ORSV specific probes, 12, 13 : RMV specific probes,

14 : SqMV specific probes

Host : Pepper

Target virus : Tomato mosaic tobamovirus (ToMV)

Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)



1, 2, 3 : ToMV specific probes, 4, 5 : PMMoV specific probes,

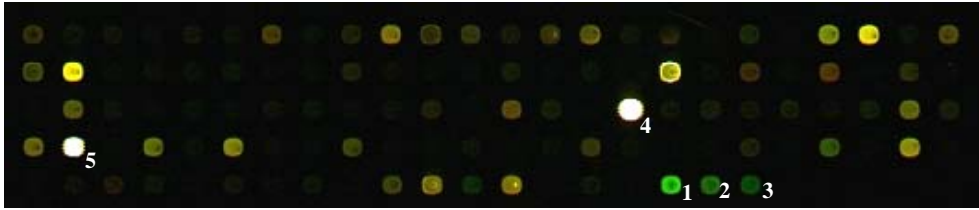
6 : ORSV specific probes, 7 : PVX specific probes, 8 : RMV specific probes

9, 10, 12 : TMGMV specific probes, 11 : SqMV specific probes, 12 :

Host : Lettuce

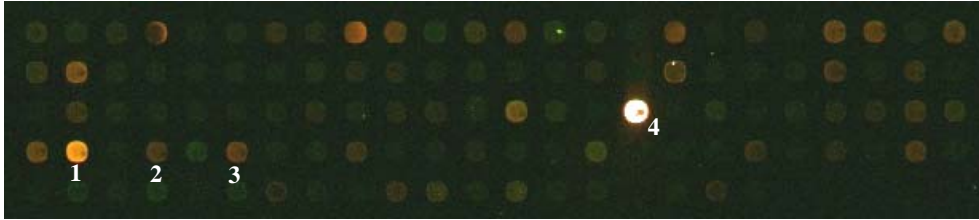
Target virus : Turnip mosaic potyvirus (TuMV)

Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)



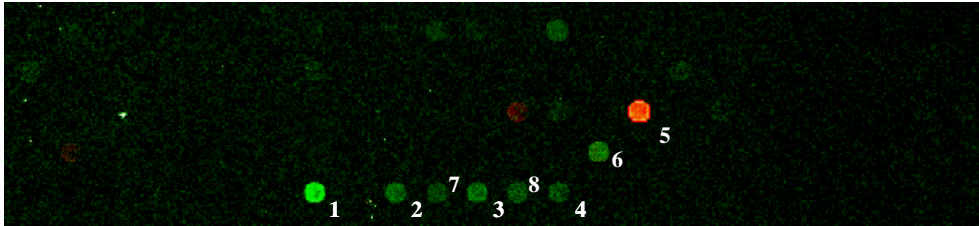
1, 2, 3 : TuMV specific probes
 4 : RMV specific probes, 5 : SLV specific probes

Host : Gourd
 Target virus : Watermelon mosaic potyvirus 2 (WMV2)
 Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)



1, 2, 3 : WMV2 specific probes
 4 : RMV specific probes,

Host : Cucumber
 Target virus : Zucchini yellow mosaic potyvirus (ZYMV)
 Dye : Sample-Cy3 (green), Host-Cy5 (red)



1, 2, 3, 4 : CGMMV specific probes, 5 : RMV specific probes
 6 : SqMV specific probes, 7, 8 : ToMV specific probes

그림 13. Single dye 및 dye swapping에 의한 30종 virus 진단용 올리고 chip의 제작 및 검증

Plant total RNA Extraction ; (viral RNA + plant RNA)

1. Harvest plant tissue and weight
 virus에 이병된 식물 조직과 건전 식물체 조직을 같은 무게로 나누어 담아 놓는다.
 냉동된 상태의 식물체일 경우 해동되지 않도록 주의하여 작업한다.
2. Grind plant tissue in mortal & pestle with liquid nitrogen

- 식물체를 곱게 갈아서 용액에 해리되는 면적을 넓힌다. 다시 해동 되지 않도록 주의하며, 갈아둔 식물체를 담은 용기나, 옮길 수저도 liquid nitrogen을 넣어 차갑게 해둔다.
3. Add **Trizol** 1ml and mixing.(trizol 1ml / tissue 0.1g)
nitrogen에 영향을 받지 않으므로 trizol을 nitrogen으로 얼린 tissue에 바로 넣는다.
vortexing 해주어서 고루 섞이도록 해준다. Plant tissue가 충분히 녹아들도록 해준다.
 4. Add 200ul **Chloroform**(1/5 of Trizol Vol.) and vortexing for 30sec.
 5. Stay on room temperature for 5min.
실온에 나누어 확연하게 층이 분리되는 것을 확인한다.
 6. Spin at 13000rpm for 5min. at 4°C and save supernatant
centrifugation을 이용하기 위해서 30~40분전에 temperature down을 해놓고 supernatant을 옮겨 담은 용기도 얼음에 꽂아둔다.
 7. Repeat step 4~6
supernatant을 옮길 때에는 pellet층이 따라 올라오지 않도록 주의 하여 옮기며, 혹 tissue가 요동을 쳐서 지지분한 상층액일 경우 필히 이 step을 행하여 다시 한번 거른다.
 8. Add 80%(vol. of final supernatant vol.) **Isopropanol** and inverting
RNA가 묻치는 단계이며, vortexing이 아닌 부드러운 mixing으로(invert) 작업한다.
알코올 성분에서는 RNA가 안정된 상태이므로 얼음에 꽂아서 작업하지 않아도 되지만, Isopropanol은 차게 해두어 사용하는 것도 좋다.
 9. Spin at 13000rpm for 15min. at 4°C, Decant solution carefully
nucleic acid는 alcohol에서 insoluble하여 안정하다.
용기의 바닥에 하얗게 침전된 것을 확인하고(RNA) 침전된 반대방향으로 용액을 따라낸다.
 10. Add 2ml **100% EtOH**, Spin at 13000rpm for 10min. at 4°C
washing과 RNA 침전을 목적으로 다음 80% EtOH을 넣기 전에 EtOH으로 가라앉힌다.
 11. Decant solution carefully and Add **80% EtOH** (2ml)
세게 섞지 않고 pellet이 보존되도록 부드럽게 돌려준다.
 12. Spin at 13000rpm for 15min. at 4°C
물에 불순물들이 용해되고 RNA는 washing된다.
 13. Dry pellet and Resuspension in **DW**.(RNA용 DDW.또는 DEPC water)
alcohol이 포함된 상태의 pellet을 실온의 공기 중에 누워서 말린다.
말린 pellet은 흰색이 희미해진다. pipet을 이용하여 Resuspend하며, DW에 용해된 RNA는 불안정한 상태이므로 찬 tube에 옮겨 담고 vortexing을 해서 완전하게 용해시킨 후에 spin down(30sec.)을 통해 혹 있을 불순물을 가라앉히고 상층을 다시 차고 깨끗한 tube에 옮겨 담는다.

cDNA synthesis

-> A single dye

1. 30ug이상의 sample total RNA에 primer를 넣은 RNA량의 1/10정도의 양으로 넣는다.
2. 70°C에서 10min정도 반응시킨다.
3. ice에서 놓아둔 후 충분히 온도가 내려간 후에 다음 작업을 행한다.
4. final 반응액의 1/5의 5X reaction buffer를 넣고 1/10의 10mM dNTPs를 넣어준다.
5. final 반응액의 1/10의 cy5 or cy3 dUTP dye를 넣고 37°C에서 5min정도 놔둔다.
(shaking해주면 좋다. vortex는 안됨.)
dye를 넣고는 광을 차단하며 실험에 임한다.
6. taping 후 spin down 하고 MuLV-RT enzyme을 2unit/30ul 정도 넣는다.
7. Incubation 42°C에서 2hr 반응한다.(광차단)
8. ice에 놓아 반응을 끝내고 spin down 해준다.
9. DNA clean kit를 이용하여 DNA concentration을 높여서 DEPC water로 elution행한다. (적어도 RT volume의 1/3이하로 한다.)
또는 DNA clean kit를 이용하여 chip에 handling할 양의 1/2에 맞춰서 DEPC water로 elution 하기도 한다.

-> Dye swapping

1. 30ug이상의 sample total RNA에 primer를 넣은 RNA량의 1/10정도의 양을 넣는다. 동량의 control RNA에도 primer를 넣은 sample RNA량의 1/10정도 넣는다.
2. 70°C에서 10min 정도 반응시킨 후 ice에서 놓아둔다.
3. final 반응액의 1/5의 5X reaction buffer를 넣고 1/10의 10mM dNTPs를 넣어준다.
4. final 반응액의 1/10정도의 양 cy5 dUTP dye를 sample에 넣고 동량의 cy3 dUTP dye를 control에 넣는다. (cy3가 감광이 더 좋으므로 control에 넣어주는 것이 적절하다.)
5. 37°C에서 5min정도 놔둔다.
6. taping 후 spin down 하고 MuLV-RT enzyme을 2unit/30ul 정도 넣는다.
7. Incubation 42°C에서 2hr 반응한다.(광차단)
8. ice에 놓아 반응을 끝내고 spin down 해준다.
9. DNA clean kit를 이용하여 DNA concentration을 높여서 DEPC water로 elution행한다. (적어도 RT volume의 1/3이하로 한다.)
또는 DNA clean kit를 이용하여 chip에 handling할 양의 1/4에 맞춰서 DEPC water로 elution 하기도 한다.

Hybridization

-> slide를 handling할 시에는 핀셋과 장갑 낀 손으로 지문과 오염에 주의한다.

pre-hybridization하기 위해 slide에 spot 된 영역을 Scratch하여 prehybridization buffer를 녹여서 20ul chip영역에 넣고 coverslip을 덮는다. (기포가 들어가지 않도록 한번에 덮어버린다.)

slide가 hybrid되는 사이 건조해지는 것을 방지하기 위해 준비된 Jar(coplin-Jar)의 4모서리에 2X SSC 80~100ul 넣고 slide를 올린다음, jar를 잘 조여서 42°C에서 30min정도 25rpm으로 prehybridization한다.

끝난 후에는 washing을 위해 바구니에 옮겨담아, 3차 증류수에서 coverslip을 조심스레 떼어내고 흔들어주며 buffer가 잘 씻겨나가도록 한다. spin machine으로 slide를 dry시켜서 먼지가 묻지 않도록 용기에 담아 보관한다. (Hybridization하기 바로 전에 처리해 놓을 수록 좋다.)

1. elution해 놓은 cDNA를 2X Hybridization buffer와 동량 섞는다.(two dye로 cDNA를 합성했을 시 sample cDNA와 control cDNA를 섞은 양을 2X Hybridization buffer와 동량 섞으면 된다.)

2. vortex한 후 spin down 하고 heating 95°C에서 5min정도 남겨진 모든 enzyme를 없앤다. (denaturing해주어 다음 반응에 유리하도록 해준다.)

3. slide의 oligo spot이 올려진 곳에 정량을 pipetting해 놓고, coverslip으로 기포가 들어가지 않도록 덮어준다.(많은 량의 액을 pipet 해놓을 경우 넘쳐서 잃어버릴 cDNA를 감안해야 함으로 될 수 있으면 넘치지도, 부족하지도 않는 량을 놓는 것이 좋다.)

4. jar의 4모서리에 2X SSC를 넣고 slide를 jar에 넣고 조인다.

5. 16hr정도 42°C의 water bath에서 Hybridization해준다.

Washing

1. Washing solution 1.(2X SSC, 0.1%SDS)을 washing에 들어가기 전에 42°C에서 pre-heating(30~40min)해놓는다.

2. Washing solution 1.에서 slide를 담귀서 coverslip을 떼어낸다. slide를 5min정도 shaking해준다.

(가장 washing이 많이 되는 단계이다. SDS의 농도를 더 진하게 하면 더 washing되는 효과가 있다.)

3. Washing solution 2.(0.1X SSC, 0.1% SDS)를 42°C에서 slide를 흔들어서 washing 한다.

4. Washing solution 2.를 tube에 담아 slide를 넣고 교반기로 돌려가며 washing 한다.

5. Washing solution 3.(0.1X SSC)를 여러 tube에 나누어 담아 slide를 넣고 교반기로 돌려가며 다음 tube로 옮겨가며 washing한다.(남아있는 SDS의 UV선의 교란을 막기 위해 씻어내는 단계.)

6. slide를 spin machine으로 dry 시킨 후 Scanner로 확인한다.

cy5 dUTP는 640nm에서 흡광시에 붉은 감광반응을 나타내고, cy3 dUTP는 540nm에서 녹색으로 감광한다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성도
1차 연도	2004-2005	국내에서 재배되는 작물에 발생하는 바이러스의 시료 확보	30 %	균주 및 field 시료의 확보 여부	100 %
		Oligonucleotide의 설계 및 제작	30 %	분석에 사용된 sequence의 범위	100 %
		Pilot DNA chip 제작 및 검정	40 %	Slide 선택 및 spotting 조건 확립 여부	100 %
2차 연도	2005-2006	국내에서 재배되는 작물에 발생하는 바이러스의 시료 확보	30 %	균주 및 field 시료의 확보 여부	100 %
		Oligonucleotide의 설계 및 제작	40 %	Host/non-target과의 교차반응	100 %
		Pilot DNA chip 제작 및 검정	30 %	진단의 최적화 조건 확립 여부	100 %
3차 연도	2006-2007	국내에서 보고된 바이러스 병의 조사	30 %	Chip 검증을 위한 시료의 quality	100 %
		Oligonucleotide의 설계 및 제작	40 %	반응의 감도 및 균질성 여부	100 %
		진단용 칩 제작	30 %	개발된 chip의 실제 적용 가능성	100 %
최종 평가	2007	칩의 실용화	50 %	Chip에 의한 주요 virus 검출 빈도	100 %
			50 %	Field 시료 바이러스 병 진단여부	100 %

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 농산물개방시대 국가 대응전략의 핵심기술로 조속한 실용화로 식물검역 기관 및 농업 관련 국공립 연구기관으로 기술이전 및 기술 지도를 통하여 각각의 기능에 부합하는 DNA chip 제작에 활용
2. 하나의 칩으로 다중 진단이 가능하기 때문에 국내 농작물에 발생하는 바이러스 병 발생 양상을 모니터링 또는 조사에 투입하여 병 발생 예찰에 활용
3. 원천기술 및 바이러스 진단용 바이오마커의 산업재산권 획득으로 국내외에 특허 출원
4. 인체 및 가축 질병, 품종판별, GMO 검사 등에 요구되는 칩 제작에 연구개발 결과의 활용

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항 없음 : 해외에서 개발된 칩 처리기술을 활용하여 칩을 분석하지 않고 본 과제에서 독자적으로 개발된 기술을 활용하였음.

제 7장 참고문헌

1. 한국식물병리학회. 2004. 한국식물병명목록. 제 4판. 779pp.
2. 채소병해 원색도감. 1997. 농촌진흥청 농업과학기술원. 447pp.
3. 화훼병해 원색도감. 1989. 농촌진흥청 농업기술연구소. 201pp.
4. 과수병해 원색도감. 1993. 농촌진흥청 농업기술연구소. 286pp.
5. 약용작물 병해도감. 1991. 농촌진흥청 농업기술연구소. 210pp.
6. 식량작물 병해충 잡초 진단과 방제. 2006. 농촌진흥청 농업과학기술원편. 농경과 원예. 435pp.
7. Tillib SV, Mirzabekov AD. Advances in the analysis of DNA sequence variations using oligonucleotide microchip technology. *Curr Opin Biotechnol.* 2001 Feb 12(1): 53-58
8. Timofeev E, Mirzabekov A. Binding specificity and stability of duplexes formed by modified oligonucleotides with a 4096-hexanucleotide microarray. *Nucleic Acids Res.* 2001 Jun 15;29(12):2626-34.
9. Vasiliskov VA, Prokopenko DV, Mirzabekov AD. Parallel multiplex thermodynamic analysis of coaxial base stacking in DNA duplexes by oligodeoxyribonucleotide microchips. *Nucleic Acids Res.* 2001 Jun 1;29(11):2303-2313.
10. Halliwell CM, Cass AE. A factorial analysis of silanization conditions for the immobilization of oligonucleotides on glass surfaces. *Anal Chem.* 2001 Jun 1;73(11):2476-83.
11. LeProust E, Zhang H, Yu P, Zhou X, Gao X. Characterization of oligodeoxyribonucleotide synthesis on glass plates. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 15;29(10):2171-2180.
12. Bavykin SG, Akowski JP, Zakhariev VM, Barsky VE, Perov AN, Mirzabekov AD. Portable System for Microbial Sample Preparation and Oligonucleotide Microarray Analysis. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Feb;67(2):922-928.
13. Sengupta R, Tompa M. Quality Control in Manufacturing Oligo Arrays: A Combinatorial Design Approach. *Pacific Symposium on Biocomputing* 2001; 6:348-359

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.