

발간등록번호

11-1543000-001504-01

기후변화 대응 토마토 바이러스 진단용 바이오큐브 결합 PCR/RT-PCR 패키지 개발

최종보고서

2016. 12. 26.

주관연구기관 / 안동대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “기후변화 대응 토마토 바이러스 진단용 바이오큐브 결합 PCR/RT-PCR 패키지 개발” (개발기간 : 2014. 9. 25. ~ 2016. 09. 24) 과제
의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 12. 26

주관연구기관명 : 안동대학교 산학협력단 (대표자) 권순태 (인)

위탁연구기관명 : 주식회사 바이오큐브시스템 (대표자) 신준성 (인)

주관연구책임자 : 김 정 수

위탁연구책임자 : 신 준 성

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라
보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	114069-02-2-WT011	해 당 단 계 연 구 기 간	2014.09.25.~ 2016.09.24	단 계 구 분	2 (해당단계)/ 2 (총 단 계)
연구사업명	중 사업명	기후변화예측 및 영향평가			
	세부 사업명	농림식품 환경생태			
연구과제명	대 과제명	기후변화 대응 토마토 바이러스 진단용 바이오큐브 결합 PCR/RT-PCR 패키지 개발			
	세부 과제명				
연구책임자	김 정 수	해당단계 참 여 연구원 수	총: 6명 내부: 4명 외부: 2명	해당단계 연 구 개 발 비	정부: 100,000천원 민간: 천원 계: 100,000 천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 12명 내부: 8명 외부: 4명	총 연구개발비	정부: 200,000천원 민간: 천원 계: 200,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	안동대학교			참여기업명	
위탁연구	주식회사 바이오큐브시스템			연구책임자: 신 준 성	
요약:				보고서 74쪽	
<p>토마토 바이러스 진단용 단독 및 다중 one step PCR/RT-PCR 패키지 제품 개발 및 사업화를 위하여 기주 유전자를 분석하여 토마토 감염 바이러스별 특이 유전자 프라이머를 개발하고 진단 조건을 확립하여 Biocube 매체 동결 건조 시제품 제작 및 상용 제품을 생산하였음. 식물 바이러스 유전자 진단을 위한 전체 핵산분리 과정을 생략하고 유전자 진단을 할 수 있는 바이오큐브 폴더를 제품화하였음. 폴더 사이에 감염 있을 넣고 살짝 누르면 바이러스 핵산이 즉시 포획되어 유전자 진단을 간편하게 할 수 있음. 바이오큐브 단일 및 다중 PCR/RT-PCR one step premix 제작 및 3차 시제품을 생산하고, 국립농업과학원 및 전국 도 농업기술원에 분양하여 국가 및 지방 연구기관의 제품 성능 검정을 거쳐서 총12종의 단일 바이러스 검정용 one step PCR/RT-PCR 제품 개발 및 사업화하였고, 총 32종의 다중 바이러스 검정용 one step PCR/RT-PCR 제품 개발 및 사업화하였음.</p>					

국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 토마토 바이러스 진단용 one step PCR/RT-PCR 패키지 제품 개발 및 사업화(7점) <ul style="list-style-type: none"> - 바이러스 자원 확보 및 증식, primer set 선발 - RT/PCR 검출 조건 확립 및 시제품 생산 - 시제품의 현장 적용성 검토 및 사업화 ○ 토마토 바이러스 진단용 다중 one step PCR/RT-PCR 패키지 제품 개발 및 사업화(3점 이상) <ul style="list-style-type: none"> - multiplex PCR/RT-PCR 검정 조건 확립 및 시제품 생산 - RT/PCR 검출 조건 확립 및 시제품 생산 - 시제품의 현장 적용성 검토 및 사업화 					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> - 토마토에 발생하는 주요 바이러스 자원 확보 및 증식함(7종) - 토마토와 토마토 바이러스 유전체 분석을 통한 primer set 선발함(9종) - 토마토 바이러스에 대한 RT/PCR 검출 조건 확립함 - 바이오큐브용 RT/PCR premix 제작 및 1~3차 시제품 생산함 - 토마토 바이러스 진단용 동결 건조 3차 시제품의 현장 적용성 검토함 - 기술 이전을 통한 one step PCR/RT-PCR 패키지 제품 개발 및 사업화함(12종) - 토마토 바이러스에 대한 다중 PCR/RT-PCR 검정 조건을 확립함 - 바이오큐브용 다중 PCR /RT-PCR one step premix 제작 및 1~3차 시제품을 생산함 - 토마토 바이러스 진단용 동결 건조 3차 시제품의 현장 적용성 검토를 위해 시제품 분양함 - 다중 one step PCR/RT-PCR 패키지 제품 개발 및 사업화함(32종) 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 토마토 바이러스 진단을 위한 일일 작업 속도 향상(20배) ○ 사용자의 편의성 향상 (비전문가도 쉽게 토마토 바이러스 진단 가능) ○ 환경친화성 향상(Biocube 사용으로 폐액 및 폐자재 발생률 50% 이상 감축) ○ 지구온난화로 인한 돌발병 발생시 신속하게 대처 가능 ○ 핵산추출법 간소화로 PCR/RT-PCR premix 시장 확대 					
중심어 (5개 이내)	검출	바이러스	역전사	피씨알	바이오큐브	

< SUMMARY >

		코드번호	D-02			
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development of one step PCR/RT-PCR package for tomato virus detection and its commercialization (7 products) <ul style="list-style-type: none"> - Collection and propagation of viruses, and selection of primer sets - Optimization of RT/PCR conditions and prototype production of PCR/RT-PCR premix - Test of field application possibility and commercialization of products ○ Development and commercialization of one step multiplex PCR/RT-PCR package for tomato viruses (over 3 products) <ul style="list-style-type: none"> - Optimization of RT/PCR conditions and prototype production of PCR/RT-PCR package - Test of field application possibility and commercialization of products 					
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Seven major viruses in tomato were collected and propagated in its hosts ○ Nine primer sets specific to the targeted tomato viruses were finally selected from fifty-three candidates of primer on its specificity (no non-specific amplicon) ○ After optimization of RT/PCR conditions for the virus detection, RT/PCR premix for Biocube and its prototypes were produced three times ○ On the field application results and technology transfer, one step PCR/RT-PCR packages (12 products) were commercialized by a Biocube system ○ After optimization of multiplex PCR/RT-PCR conditions for the virus detection, PCR/RT-PCR premix for Biocube and its prototypes were produced three times ○ The prototype were provided to RDA and two companies for field application possibility ○ Total thirty-two multiplex PCR/RT-PCR packages were finally commercialized by a Biocube system 					
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Enhancement of day-to-day operation pace for tomato virus detection (a twenty fold increase) ○ Enhancement of user friendliness (an amateur can easily detect tomato virus with the product developed in this project) ○ Enhancement of eco friendliness (a more than 50% reduction in waste materials by using Biocube) ○ Providing rapid response for urgent viral disease due to global warming ○ Market expansion of PCR/RT-PCR premix for simplifying viral template preparation 					
Keywords	Detection	Virus	RT	PCR	Biocube	

Contents

1. Overview of research and development project	7
2. Development status of Korea and overseas	10
3. Results and their contents	17
4. Achievements and contribution in plant virus diagnosis	67
5. Applying of results	70
6. Overseas information related with this project	71
7. Security of results from this project	71
8. Research facilities registered during this project	71
9. Performance of safety during this project	71
10. Representative research results	72
11. Others	72
12. References	73

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	7
2. 국내외 기술개발 현황	10
3. 연구수행 내용 및 결과	17
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	67
5. 연구결과의 활용계획 등	70
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	71
7. 연구개발성과의 보안등급	71
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설장비현황	71
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	71
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	72
11. 기타사항	72
12. 참고문헌	73

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

1-1. 연구개발 목적

- 토마토는 우리나라를 비롯하여 세계적으로 중요한 과채류 작물의 하나이며, 세계적으로 토마토에 감염하여 피해를 입히는 바이러스의 종류는 100여종이고, 우리나라에서는 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV) 등 7종이 전국적으로 매년 보편적으로 발생하여 피해를 주고 있다.
- 우리나라에서 토마토 바이러스의 유전자 진단기술은 바이러스의 특이 유전자 프라이머를 이용한 단일 바이러스 진단기술이 개발되어 활용되고 있으나, 기주식물인 토마토의 유전자와 반응하여 바이러스 특이 유전자의 증폭 등에서 비 특이반응으로 인하여 유전자 진단의 문제점으로 제기되고 있다.
- 따라서 본 과제에서 토마토 기주의 유전자와 상이한 토마토 바이러스만이 갖는 특이 유전자를 선별하고 신제품인 바이오큐브 매체를 이용한 단일 바이러스 및 다중 바이러스 진단용 one step PCR/RT-PCR 패키지 제품을 개발하며 제품의 성능 검정을 통하여 사업화함으로써 국가와 지방 연구기관, 농업현장에서 활용함으로써 국가사회 경제적 피해 발생을 예방하고자 함.

1-2. 연구개발의 필요성

- 식물바이러스 발생과 진단
 - 저항성 작물을 육성하거나 조기 진단을 통한 예방은 식물바이러스에 의한 피해를 최소화할 수 있는 효율적인 방법으로, 시료를 대량으로 검사할 수 있고 검사 비용이 저렴하기 때문에 혈청학적 진단법은 바이러스 진단에 널리 이용되어 왔다.
 - 그러나 지구온난화로 새로운 바이러스가 출현하여 국내에 확산 또는 정착됨으로써 방제비용이 기하급수적으로 증가하고 있다. 긴급, 정밀, 조기진단과 방제가 필수적임에도 불구하고 특이 항체 구매나 생산이 어렵기 때문에 혈청학적 진단법의 초기 대응력은 떨어지게 현실이다.
 - PCR이나 Chip을 이용한 진단법은 바이러스 검출 특이도와 감도와 매우 높고, 특이 특이 항체 대신 합성이 간단한 primer를 사용하기 때문에 조기 진단이 가능하다.
 - 그러나 핵산분리에 필요한 실험절차가 복잡하고 시간과 비용이 많이 들어 경제 효율성이 떨어지는데, 대부분 핵산이 RNA핵산로 구성된 바이러스는 시료 준비와 진단을 위해 숙련된 작업자가 필요할 뿐만 아니라 진단에 이용되는 PCR 반응액과 조건이 실험자마다 달라 진단결과를 개관적으로 비교하기 힘든 상황이다.
- 바이오큐브(Biocube)
 - 바이오큐브는 국내의 바이오관련 신생회사인 주식회사 바이오큐브시스템에서 세계 최초로

개발한 모양과 크기 조절이 가능한 다공성 세라믹 큐브로, 바이오큐브를 단순히 식물잎에 찢러줌으로써 3~10초 이내에 RT/PCR 반응용 주형(핵산 또는 병원체 입자)을 손쉽게 획득 가능하다(그림 I).

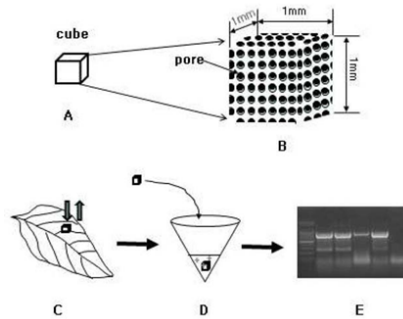


그림 I. 바이오큐브를 이용한 핵산분리 절차 개념도.

○ Biocube와 RT/PCR premix를 이용한 바이러스 진단 패키지 제품 개발

- Biocube는 식물바이러스 분자진단에 널리 사용될 수 있는 충분한 가능성을 가지고 있는데, 바이오큐브와 RT/PCR premix가 결합된 제품(그림 II)이 개발된다면 식물바이러스 조기 진단뿐만 진단 결과의 신뢰성을 확보 및 실용화에 많이 도움이 될 것으로 판단된다.

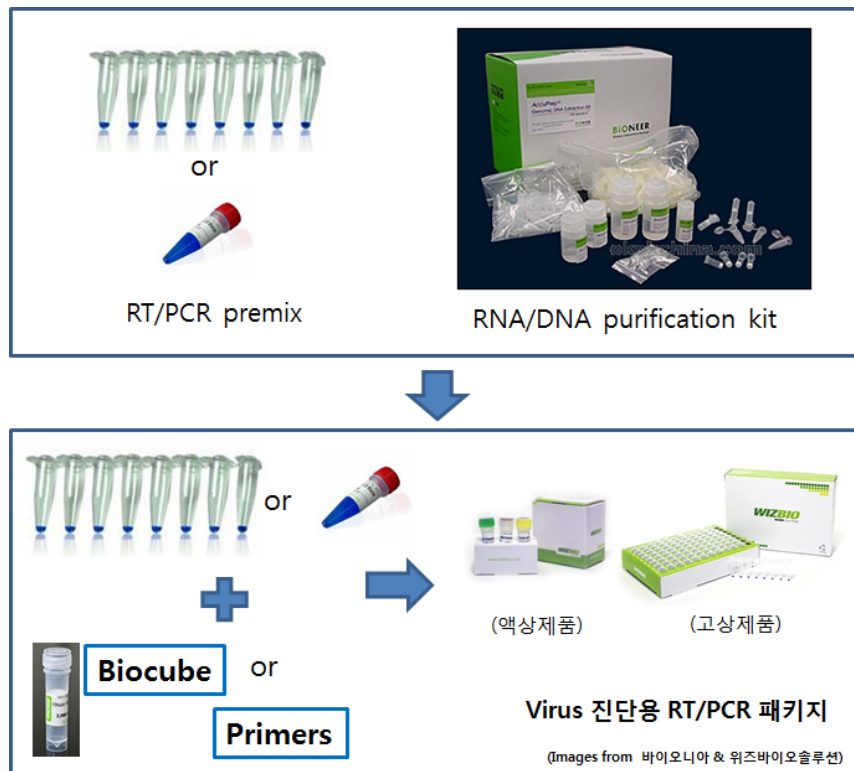


그림 II. RT/PCR/Biocube package 제품 개념도.

- 따라서 위 상품을 본격적으로 개발하기에 앞서 주요 채소작물인 토마토와 고추에 발생하

는 주요 바이러스를 대상으로 바이오큐브를 이용한 진단조건 확립과 기술개발이 필요하다.

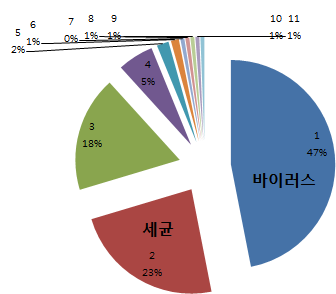
1-3. 연구개발 범위

- 토마토에 발생하는 주요 바이러스 자원 확보 및 증식
 - 농촌진흥청 국립농업과학원의 식물바이러스 유전자원 센터인 식물바이러스연구실로부터 우리나라에 가장 피해를 많이 입히는 토마토 바이러스 7종을 분양 받아 증식함.
 - ☞ 토마토황화잎말림바이러스(*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV), 토마토반점위조바이러스(*Tomato spotted wilt virus*, TSWV), 토마토퇴록바이러스(*Tomato chlorosis virus*, ToCV), 토마토덤불위축바이러스(*Tomato bushy stunt virus*, TBSV), 오이모자이크바이러스(*Cucumber mosaic virus*, CMV), 고추 얼룩무늬바이러스(*Pepper mottle virus*, PepMoV), 토마토모자이크바이러스(*Tomato mosaic virus*, ToMV)
- 토마토 유전체 분석을 통한 토마토 바이러스 진단용 primer set 선발
 - 검출 감도 및 특이도 비교를 통한 primer 선발 및 농도 결정
- 토마토 바이러스에 대한 RT/PCR 검출 조건 확립
 - Kit 제작에 적합한 RT, PCR, RT-PCR 용 후보 premix 조합 선발
 - 진단에 적합한 Biocube 선발 및 one step PCR/RT-PCR 조건 확립(위탁)
 - 진단 kit 품질 확인을 위한 바이러스별 표준 주형 제작(위탁)
- 바이오큐브용 RT/PCR premix 제작 및 1~3차 시제품 생산
 - 선발 Biocube에 적합한 1차 one step PCR 및 RT-PCR premix 제작(위탁)
 - 1차 시제품의 적용 효율성 검토 및 개선점 탐색
 - 식물체 조직별 바이러스 검출 효율 비교를 통한 Biocube에 적합한 주형 채취 부위 조사
 - 1차 시제품 활용 자료 분석을 통한 2차 시제품(액상 premix) 생산
 - 토마토 바이러스 primer 포함시 액상 premix의 검출감도 및 특이도 비교
 - 시제품용 Internal control 선발(위탁)
 - 우수 조합 선발 후 동결건조형 3차 시제품 생산(위탁)
- 토마토 바이러스 진단용 동결 건조 3차 시제품의 현장 적용성 검토
 - 농촌진흥청 농과원 식물바이러스실과 전북도원에 3차 시제품 제공
 - 현장 적용시 실무자의견 수렴 및 3차 시제품 보완
- 토마토 바이러스에 대한 multiplex PCR/RT-PCR 검출 조건 확립
 - 다중(multiplex)검정에 적합한 common primer 설계 및 제작
 - 토마토 바이러스 조합별 2중, 3중, 다중 primer 제작

- 최적 primer 농도 및 최적 조합 선발 및 kit 제작에 적합한 최적 premix 조합 선발
- 다중 검출 kit에 적합한 Biocube 선발
- 다중 검출용 one step PCR과 RT-PCR 조건 확립(위탁)
- 진단 kit 품질 확인을 위한 바이러스별 표준 주형 제작(위탁)

2. 국내외 기술개발 현황

					코드번호	D-04
2-1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교						
개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고	
		우리나라	연구신청팀			
바이오큐브 결합 PCR/RT-PCR 패키지 개발	우리나라	30	30	100	바이오큐브를 이용한 PCR/RT-PCR용 주형 준비법은 세계최초로 개발된 독자 기술임.	
2-2. 특허분석						
가. 특허분석 범위 : 특허정보넷 키프리스(http://www.kipris.or.kr/khome/main.jsp)						
○ 국내 특허 현황						
- 검색어 PCR*premix 사용시 총 611건, PCR*premix*purification 사용시 87건이 최종적으로 검색되었음. 이들 가운데 본 제품과 연관 가능성 있는 것으로 추정된 2건의 특허를 조사한 결과 핵산 정제 장치 및 정제 방법(출원번호:1020090031950)은 이온투과성 멤브레인을 이용하여 연속적으로 핵산을 자동 추출하는 핵산 정제 장치 및 방법에 관한 것이었고, B형 간염 바이러스의 게놈 DNA의 효율적인 분리 방법(출원번호: 1020100128984)은 원심분리를 이용하여 바이러스 DNA 분리하는 방법으로 본 제품과 연관성이 전혀 없었다.						
- 프라이머 관련 특허 건수는 수 총 162건으로 이 가운데 식물바이러스와 세균 진단과 관련된 특허가 각각 76과 38건으로 전체 특허 건수의 70%를 차지하고 있음(출처: 2012.10 농촌진흥청유전자 및 균주 특허 분석 자료).						
- 이들 가운데 가능성은 낮지만 본 사업에서 제품개발을 목표로 하는 것과 중복성이 될 수 있는 기존 특허는 1건 확인됨.						



<농촌진흥청 유전자 특허 분석 중에서 특이 프라이머 관련특허 건수>

바이러스 진단(1),세균 검출(2), 품종판별(3),GMO 판별(4),한우 판별(5),곰팡이 검출(6),곤충병 판별(7),동물병 판별(8),암수판별(9),응성불임 (10),자가 불화합성(11).

구분	출원번호 (출원일)	등록번호 (등록일)	국가	출원인	명칭
등록	10-2002-0075493 (2002.11.29)	10-0496012 (2005.06.09)	대한민국	농촌진흥청장	오이 모자이크 바이러스 진단용 특이 프라이머

○ 해외 특허 현황

- 검색어로 PCR*premix 조사한 결과 6354건이 검색되었고 ((pcr)*premix)*purification, virus 에서는 3532건, (((pcr)*premix)*purification)*virus)*ceramic 339건이 검색되었다. 본 제품과 관련 가능성이 보이는 339건을 대상으로 정밀 조사한 결과, 3건의 특허가 최종적으로 확인되었다. High efficiency method for isolating target substances using a multisample separation device(USA 05646263)는 시험 배지로부터 목표 입자를 원심분리 등을 이용해 분리하는 방법이고, METHODS AND SYSTEMS FOR PURIFYING, TRANSFERRING, AND/OR MANIPULATING NUCLEIC ACIDS (USA 20110287951)는 Southern blotting방법에 관한 것, Universal Sample Preparation System And Use In An Integrated Analysis System(USA 20130053255)은 전기영동 장치 개발에 관한 것으로 본 제품과 실제로 연관성 있는 특허는 1건도 검색되지 않았음.
- 또한 진단키트와 관련하여 검색으로 virus를 사용해 검색할 경우 총 356,772건, virus*primer는 129,075 건, virus*primer*apple*pepper*grape*orchid는 178건이었다. 여기에 detection으로 검색한 결과 총 162건이 검색되었지만 이들 가운데 식물바이러스 primer를 이용한 진단관련 특허는 1건도 없었음.
- 그러나 2012년에 발간된 “식물바이러스병 진단키트 개발 및 식물 바이러스 분리주 연구 특허동향 보고서”에 따르면, 중국은 바이러스 진단 키트 기술 분야 출원이 집중되어 있고, 식물 바이러스병 진단/검출 기술에 대해서는 농촌진흥청, 코넬대학, 운난농업대학순으로 출원이 이루어지고 있다고 기술하고 있다. 또한 코넬대학의 경우 Rupestris stem pitting associated virus 진단방법(US2000-574141), grapevine leafroll virus 진단방법 (US2000-613486, US2001-039112)를 출원하였고, 유럽에서는 grapevine leafroll virus 진단방법(EP1998-923568) 1건이 출원되었으며, CMV, CGMMV, PMMoV 관련 특허가 가장 많은 출원된 것으로 기술하고 있다.
- 한편, 특허 심사 과정에서 아래 2건이 추가로 발견되었는데, 특허1. 임의의 복잡한 출발물 질로부터 핵산을 분리하기 위한 배합물과 방법 그리고 복잡한 유전자 분석법(등록특허공

보 제10-0623184호, 2006.09.11.), 특허2. Stable protein storage and stable nucleic acid storage in recoverable form(미국 특허출원공개공보 US2010/0178210호, 2010.07.15)

- 특허1은 카오토로픽 이온(Na, Mg 등)이 아닌 항카오토로픽 용매를 활용해 물질 분리하는 방법에 관한 것이고, 특허2는 다공성 물질에 혈청 단백질을 보관했을 때 보존기간이 1년 이후 핵산 추출할 경우 핵산 추출이 가능하다는 내용을 포함, 다공성 물질의 생물재료 보존력이 우수함을 보여준 특허임. 바이오큐브시스템에서 출원한 생물학적 시료로부터 핵산 증폭 반응용 생물학적 분자를 신속하게 분리하기 위한 다공성 고체상 및 이의 용도 (PCT/KR2013/007469, 2013.08.20)는 특허 1 & 2와 구별성이 있고, 진보성이 있는 것은 판단 됨.

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

- 바이오큐브 결합 유전자 진단기술은 본 과제에서 세계에서 처음 수행하였기 때문에 관련 검색은 없음

2-3. 논문분석

가. 논문분석 범위

- 바이오큐브 매체를 이용한 유전자 진단은 본 과제에서 세계 처음으로 수행

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

- 바이오큐브 결합 유전자 진단기술은 본 과제에서 세계 처음으로 수행하였기 때문에 관련 논문 및 관련성은 없음.

2-4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

- 1) 국내외 제품생산 및 시장 현황
 - 해당사항 없음

<분자진단의 사업성>

- Illumina의 HiSeq 2000 system이나 Life Technology의 Soid4와 같은 차세대 염기서열분석 기술의 발달로 동식물의 전체 유전체 염기서열 분석 속도가 급속히 향상됨. 아래 그림III 처럼 분석비용 또한 지속적으로 떨어지고 있으며, 분자진단 시장의 규모도 급속히 증가하고 있다.

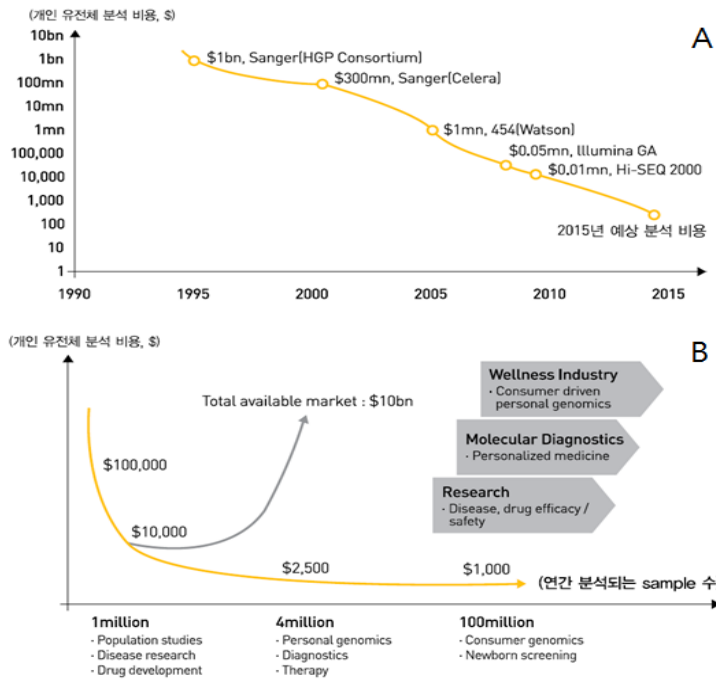


그림 III. 유전체 해독 비용 감소 추세(A)와 유전체 해독 기술 발달에 따른 비용 및 시장 크기 변화(B). 자료: 바이오산업분석, 2012. 우리투자증권 리서치센터 이승호.

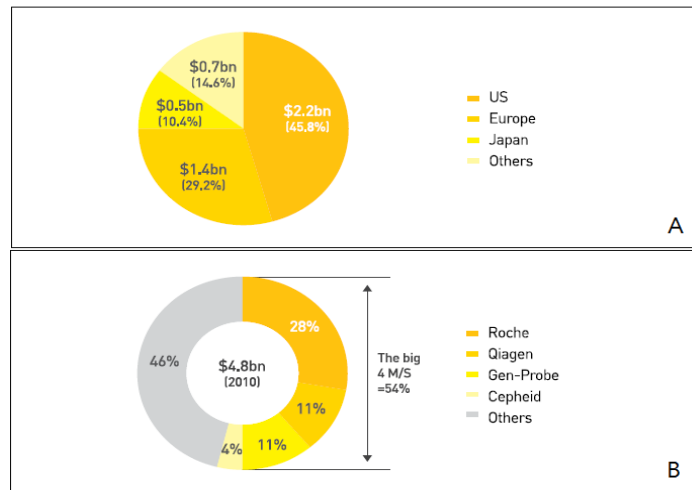
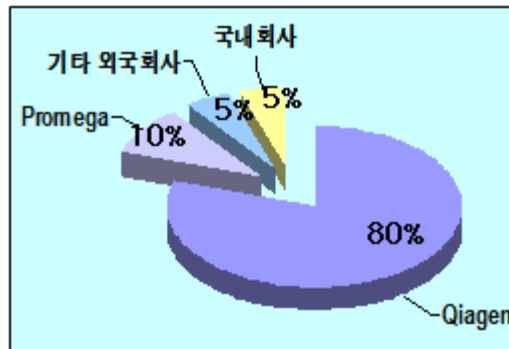


그림 IV. 2010년 세계 분자진단 시장 지역별 현황(A)과 회사별 현황(B). 자료: 바이오산업분석, 2012. 우리투자증권 리서치센터 이승호

- 세계 분자진단 시장의 비중은 지역별로 미국>유럽>일본>기타 순이고, 회사별로는 Roche>Qiagen>, Gen-probe>,Cepheid 순으로 이들이 전체 분자진단 시장의 54% 비중을 차지하는 것으로 알려져 있다. 그림 IV. 미국 FDA 허가를 취득한 분자진단 제품별 비중은 세균 감염 진단> 바이러스 감염 진단>, 간질환 진단>, 암 진단>호흡기 진단>면역 및 염증 진단 순이고, 기술별로 PCR(PolymeraseChain Reaction), RT-PCR(Real Time

PCR), TMA (Transcription-Mediated Amplification), 기타 방법 순이다.

- 이처럼 분자진단 시장은 상업적으로 매우 매력적인 시장이기 때문에 대규모 진단업체를 중심으로 대량의 시료로부터 DNA와 RNA를 자동으로 정제할 수 있는 장비 개발이 한창이다. 이들 장비의 대부분은 사람을 대상으로 체외임상진단용으로 개발되었고, 일부는 동식물의 분자진단을 위해 활용되고 있다.
- 핵산 정제와 관련된 시장의 규모는 국내 생물화학 약 3,000억 중 DNA 추출관련 제품 약 150억이고 바이러스를 포함한 RNA 추출관련 제품은 약 300억 정도로 추정하고 있다. 이들 가운데 DNA 추출 제품의 생산 비중은 5% 이하(그림 v)이고 RNA 제품의 통계도 없는 실정이다.



(from (주)씨아이엔스월드닷컴즈 조영준)

그림 V. 해외 기업과 국내기업의 RNA 추출관련제품 점유율

- 핵산 정제 시장과 분자진단용 반응시약(PCR, RT, RT-PCR) 시장은 국내외적으로 제품간 차별성을 찾기가 힘들다. 이러한 주변 환경은 전혀 새로운 개념으로 누구나 쉽게 핵산을 정제할 수 있다는 Biocube의 차별성이 분자진단용 반응시약과 결합할 때 시장 진입과 확대 가능성이 훨씬 높아질 것으로 판단된다.
- 2012년 10월 농촌진흥청 유전자 및 균주 특허 분석 결과에 따르면, PCR premix를 구성하는 각 소포품의 시장 규모 및 예상 연평균복합성장률(CAGR)이 매년 증가하고 있으며(아래 표 I 참조), 이들 가운데 프라이머는 2010년 전 세계 시장규모가 \$210.2 million로 매년 9.0%의 CAGR을 보였다고 한다.

표 I. PCR 소포품 시장(\$ million)

제품	2008	2009	2010	2015	CGAR%, 2010-2015
효소	374.2	416.8	464.2	797.1	11.4
프라이머, 프로브	178.2	192.9	210.2	323.3	9.0
dNTP	142.6	156.9	173.0	281.1	10.2
버퍼와 첨가물	106.9	115.7	125.3	186.2	8.2
Template	89.1	96.4	104.5	156.2	8.4
합계	891.0	978.7	1,077.2	1,743.9	10.1

○ 식물병원체 진단의 사업성

- 농촌진흥청, 농업기술실용화재단, 국내종묘회사, 각 대학 등의 병리 전문가에게 자문해 본 결과 국내 식물바이러스와 세균 진단용 premix 소모품 시장은 평균적으로 10억 정도이고, PCR 주형(DNA와 RNA) 정제용 kit 시장도 7~8억 정도였다.
- 그러나 식물바이러스병 진단키트 개발 및 식물 바이러스 분리주 연구 특허동향 보고서(2012. 04)에 따르면, 다양한 분야에서 바이오진단 시스템에 대한 수요가 증가하고, 식물바이러스 진단을 위한 연구가 세계적으로 확산되는 추세라고 한다. (그림 VI)

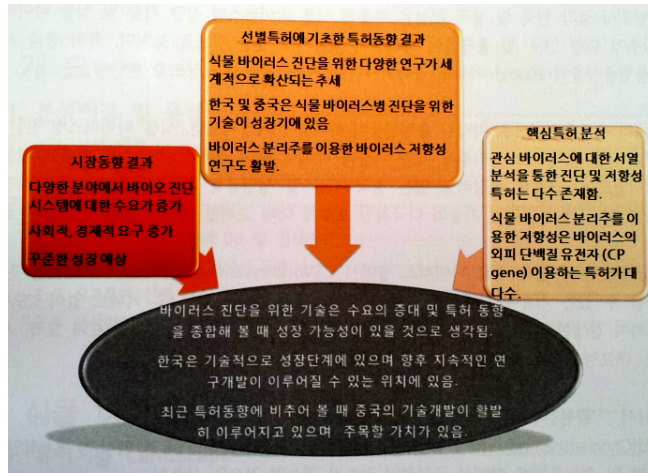


그림 VI. 식물바이러스병 진단키트 개발 및 식물 바이러스 분리주 연구 특허동향.

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- 토마토 바이러스 진단용 Biocube 결합 PCR/RT-PCR 패키지 제품 개발을 노하우를 이용해 기타 주요 식물바이러스 진단 분야에서 사업기반을 공고히 하고 이후 곤충/축산/식품 분야로 사업 영역을 확대가 가능할 것임.
- 식물의 경우 국내 병진단(주로 RNA용) 분야의 시장 규모는 20억원 이내로 판단된다. 반면, 국내 분자표지 분야에서 DNA 정제 kit와 premix 시장의 규모는 정확히 알려져 있지 않는데, 병진단에 비해 사용량이 10배 이상인 것을 감안한다면 대략 30~40억 정도이다.
- 국내 농업관련 분야의 시장의 규모는 작은 편이지만, 곤충과 축산, 식품 분야를 합칠 경우 죽히 100억 이상의 시장이 있는 것으로 판단되며, 아래의 그림 5처럼 바이오큐브는 식물 이외의 병원체에도 적용이 가능하기 때문에 관련 시장이 지속적으로 증가할 수 있을 것으로 추정된다.
- 그림 VII은 컬럼방식 kit로 정제한 바이러스 RNA(positive control, 농도별로 5µl 씩 주형으로 사용) 파란 화살표는 각 농도의 바이러스 배양액에 cube 살짝 접촉시킨 다음 PCR-tube에 1개 넣음(5반복), 빨간색 화살표는 바이러스에 cube 살짝 접촉시킨 다음 DEPC-water 10µl에 넣고, 95도씨에서 10분간 처리한 후 5µl를 주형으로 사용(2반복).

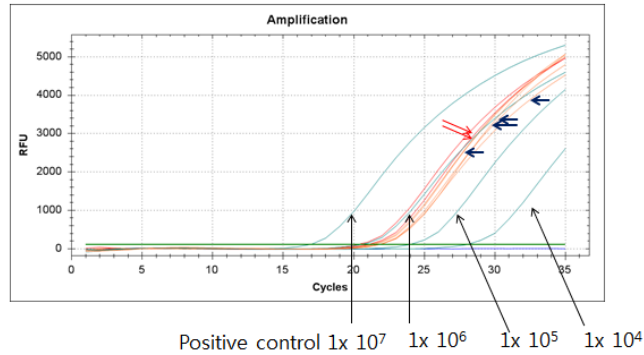


그림 VII. 바이오큐브를 이용한 비병원성 조류독감(AI)바이러스 진단.

2) 제품 및 시장분석 측면

- 현재 시중에 판매되고 있는 핵산 분리용 제품은 주로 컬럼 방식이 사용되는데, Biocube와 컬럼 방식이 장단점을 비교해 보면 Biocube를 이용한 핵산 분리법은 상당히 많은 장점을 지니고 있음을 알 수 있다. 이러한 관점에서 Biocube를 이용한 토마토바이러스 PCR/RT-PCR 패키지 제품을 개발할 경우 대내외 적으로 상당한 경쟁력을 가질 수 있기 때문에 토마토바이러스 뿐만 아니라 다른 주요 바이러스 진단에도 적극적으로 활용하여 국내 바이러스 진단 분야의 경쟁력 향상에 많은 도움이 될 것으로 판단된다(참고 2).
- 이들 제품의 국내 및 국외시장 분석결과 대략적인 소요량을 추정할 수 있었다(참고 3). Biocube를 이용한 토마토 바이러스 진단 제품은 아직 개발이 되지 않았기 때문에 본 과제를 통해 생산된 제품을 국내 및 국외에 판매할 계획임.

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

가. 연구개발의 추진전략 · 방법

(1) 토마토 바이러스 진단용 one step PCR/RT-PCR 패키지 제품 개발 및 사업화

- 토마토에 발생하는 주요 바이러스 자원 확보 및 증식
 - 농촌진흥청 식물바이러스 연구실에서 이미 10년 전부터 국가관리 바이러스에 대한 역학 조사를 수행해 왔고 본 과제에서 기술한 토마토 바이러스 isolate를 다량 보유하고 있으나, 이들 가운데 PCR/RT-PCR 진단법의 품질 기준으로 적합한 표준 바이러스는 아직까지 선 발되지 않았기 때문에 식물바이러스 연구실이 보유한 토마토 바이러스 isolate를 분양 받 아 본 과제에서 개발할 one step PCR/RT-PCR 패키지 제품의 품질 평가에 사용하고 토 마토 바이러스별 양성 대조구를 증식하고 확보하여 국립농업과학원에서 활용함.
- 토마토와 토마토 바이러스 유전체 분석을 통한 primer set 선발
 - 바이러스의 핵산 염기서열 만을 기반으로 primer를 제작할 경우, 사용하는 primer이나 대 상 식물체에 따라 비특이 증폭 산물이 발생할 수 있는 확률이 높음. 토마토의 경우 국내 및 해외 연구자로 구성된 solgenomics network(<http://solgenomics.net>)를 통해 2012년 3월 Nature지에 표준 유전체 정보가 발표 되었고, Micro-Tom Database (<http://www.kazusa.or.jp/jsol/microtom/indexj.html>)에서는 토마토 전체 mRNA에 대한 염기서열 정보를 제공하고 있 을 뿐만 아니라 NCBI data base에는 다량의 토마토 관련 염기서열이 공개되어 있음. 토마 토의 경우 다른 작물과는 다르게 토마토 바이러스 염기서열과 상동성 비교를 통해 바이러 스에 특이적인 primer 제작이 가능함. 국내의 생물정보분석서비스 회사(주 씨더스)를 통해 본 과제에서 서술한 토마토 바이러스의 핵산 서열과 토마토 염기서열을 분석하고 이를 통 해 바이러스 특이적인 primer 후보군을 선발하였음.
- 토마토 바이러스에 대한 RT/PCR 검출 조건 확립
 - 토마토 바이러스 검정에 적합한 primer 선발 및 농도 결정을 통해 진단 kit 제작에 적합한 RT, PCR, RT-PCR 용 후보 premix 조합 선발하고, 위탁업체에서 시판하고 있는 6종의 Biocube 가운데 진단에 적합한 우수한 Biocube를 선발하였음.
 - 아울러 위탁 업체에서는 주관 과제에서 제공한 토마토 바이러스별 검출 조건(primer 및 premix 우수조합 선발, 토마토 바이러스별 Biocube 적용 부위 결정 등)을 기초로 제품 생 산에 적합한 one step PCR/RT-PCR 조건을 확립하고 진단 kit의 일정한 품질 유지에 필 요한 바이러스별 표준 주형 제작에 이용하였음
- 바이오큐브용 RT/PCR premix를 1차에서 3차 시제품을 생산하여 현장 적용성 검토
 - 선발한 Biocube에 적합하도록 위탁 업체에서는 시제품을 3회에 걸쳐 생산하고, 이들 시제

품에 대한 현장 적용성을 검토한 다음 시제품을 최적화에 반영함.

- 기술 이전을 통한 one step PCR/RT-PCR 패키지 제품 개발 및 사업화
- 토마토 바이러스에 대한 one step PCR/RT-PCR 검정 조건을 위탁 업체에 기술 이전하여 누구나 손쉽게 토마토 바이러스를 진단 할 수 있는 one step PCR/RT-PCR 패키지 제품 7종을 사업화 하였음.

(2) 토마토 바이러스 진단용 다중 one step PCR/RT-PCR 패키지 제품 개발 및 사업화

- 토마토 바이러스에 대한 multiplex PCR/RT-PCR 검정 조건 확립
- PCR이나 RT-PCR에서 다중(multiplex)검정에 필요한 핵심 요소는 primer간의 유전자 간섭을 최소화 하는 것인데, 2~3가지 primer 조합을 동일 반응액에 동시에 첨가하는 기존의 방식으로는 일정한 토마토 바이러스 별로 일정한 농도의 증폭산물을 재현성 있게 얻기가 힘들다. 이는 주형에 존재하는 토마토 바이러스의 초기 농도와 밀접한 관련이 있는데, 한 쪽 주형을 많을 경우 필연적으로 다른 쪽 주형의 증폭을 방해할 뿐만 아니라 유전자 간섭으로 비특이 반응이 나타난다. 따라서 AFLP 기법을 응용하여 토마토 바이러스와 근연 관계가 먼 벼 바이러스의 유전자 서열을 분석하여 common primer를 선발 하였음.
- 토마토 바이러스 조합별로 common primer 서열 일부를 포함하는 2중, 3중, 다중용 primer 제작하고 premix와 primer 간 최적 조합 선발하였으며, 조합별로 토마토 바이러스 검출 민감도 및 특이도 비교를 통해 kit 제작에 적합한 최적 premix 조합을 선발하였음. 또한 주형 흡수력이 높은 Biocube 종류 및 형상을 토대로 다중 검출 kit에 적합한 Biocube를 최종적으로 선발하였으며, 다중 검출용 one step PCR과 RT-PCR 조건을 확립하고 진단 kit 품질 확인을 국립농업과학원의 검증을 거쳐 바이러스별 표준 주형을 제작하였음.
- 바이오큐브 다중 PCR/RT-PCR one step premix 1~3차 시제품 생산 및 현장 적용성 검토
- 선발한 Biocube에 적합하도록 위탁 업체에서는 시제품을 3회에 걸쳐 생산하고, 이들 시제품에 대한 현장 적용성을 검토한 다음 시제품을 상용화 하였음.

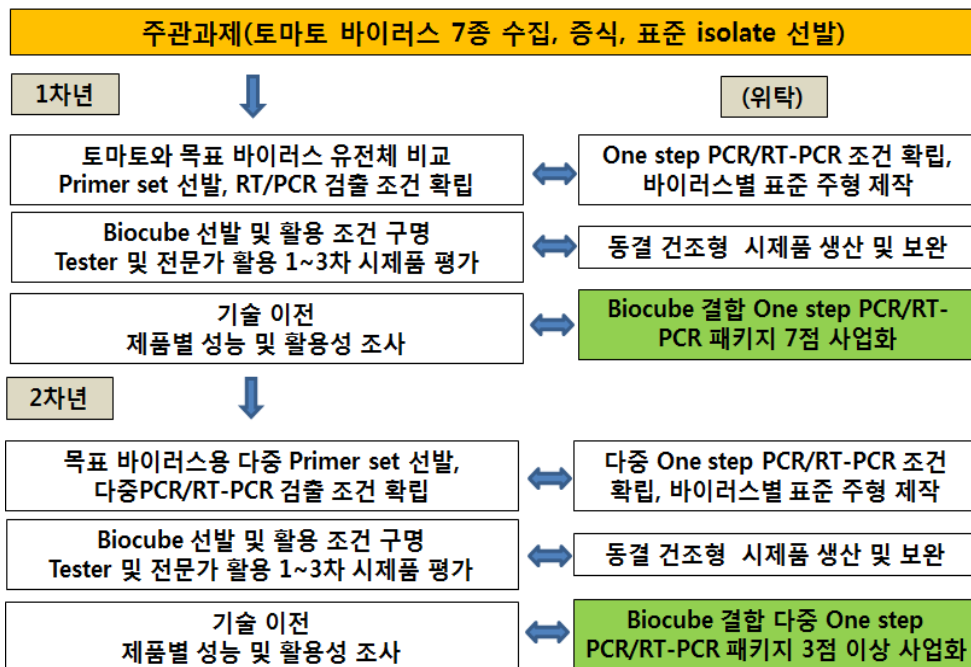
- 기술 이전을 통한 다중 one step PCR/RT-PCR 패키지 제품 개발 및 사업화
- 토마토 바이러스에 대한 다중 one step PCR/RT-PCR 검정 조건을 위탁 업체에 기술 이전하여 누구나 손쉽게 토마토 바이러스를 진단할 수 있는 다중 one step PCR/RT-PCR 패키지 제품을 상용화 하였음.

나. 연구개발의 추진체계

- RT와 PCR의 핵심 요소는 reverse transcriptase와 Taq-polymerase 인데, 이들을 포함한 dNTP, buffer 등 RT와 PCR 제품의 국내 생산 기술은 로슈나 다까라 등의 외국제품과 비교해 큰 차이가 없는 것으로 알려져 있다. 오히려 너무 많은 공급업체가 국내에 생겨남

으로써 관련 제품의 공급이 증가하고 결과적으로 식물바이러스 진단에 필요한 비용이 점점 떨어지고 있는 추세이다.

- 식물 바이러스뿐만 아니라 인체, 동물 등의 병원체 진단에 가장 보편적으로 사용하는 혈청학적 진단법인 효소결합항체진단법(ELISA)와 비슷한 수준 또는 그 이하의 비용으로 진단감도가 높은 유전자 진단기술을 식물바이러스 검정에 이용하기 위해서는 template DNA 나 RNA 분리가 간편하고 저렴하여야 한다.
- 이런 관점에서 Biocube를 이용한 주형 준비법은 실리카 멤브레인이 장착된 spin column이나 buffer로 구성된 기존의 방법과는 원리부터 다르며, 무엇보다 특별한 기구나 기술 없이 누구나 손쉽게 주형을 준비할 수 있다는 장점이 있다. 이를 이용해 식물바이러스 검정에 필요한 PCR 이나 RT-PCR 진단 패키지를 개발하여, 학계와 산업계 연구자나 농업 종사자들에게 매우 유용할 뿐만 아니라 국내 식물바이러스 진단 kit 산업 발전에 많은 도움이 될 것이다.
- 따라서 본 과제에서는 토마토 바이러스를 대상으로 토마토 유전체 분석을 통한 바이러스의 특이 프라이머 선별, 바이오큐브 매체를 통한 단일 및 다중 진단기술 개발과 국가기관의 성능검정을 통해서 진단키트를 상용화 하였다.



다. 연구개발 추진일정

연도	세부연구내용	월 단위 추진											
		9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8
1차년도	○ 토마토에 발생하는 주요 바이러스 자원 확보 및 증식	■	■	■	■								
	○ 토마토 유전체 분석을 통한 토마토 바이러스 진단용 primer set 선발		■	■	■	■							
	○ 토마토 바이러스에 대한 PCR/RT-PCR 검출 조건 확립					■	■	■	■	■			
	○ 바이오큐브용 PCR/RT-PCR premix 제작 및 1~3차 시제품 생산								■	■	■	■	■
	○ 토마토 바이러스 진단용 동결 건조 3차 시제품의 현장 적용성 검토											■	■
	○ 기술 이전을 통한 one step PCR/RT-PCR 패키지 제품 개발 및 사업화											■	■
2차년도	○ 토마토 바이러스에 대한 multiplex PCR/RT-PCR 검정 조건 확립	■	■	■	■								
	○ 바이오큐브용 multiplex PCR /RT-PCR one step premix 제작 및 시제품 생산				■	■	■	■					
	○ 토마토 바이러스 multiplex 진단용 동결 건조 시제품의 현장 적용성 검토								■	■	■		
	○ multiplex one step PCR/RT-PCR 패키지 제품 개발 및 사업화											■	■

라. 연구결과

(1) 1차 년도 연구결과

(가) 토마토에 발생하는 주요 바이러스 자원 확보 및 증식

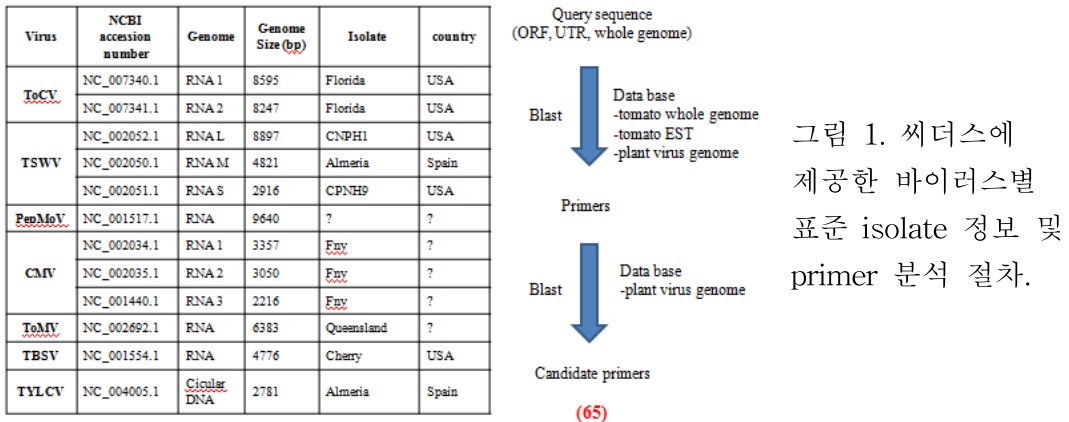
- 농촌진흥청 국립농업과학원 식물바이러스연구실과 농우종묘로부터 TYLCV, TSWV, ToCV, TBSV, CMV, PepMoV, ToMV 감염된 토마토 또는 담배 잎 시료를 분양 받아 주옥과 서광 토마토 품종에 증식한 후 실험에 사용하였으며(표 1), 시료 중 일부는 위탁 기관에 제공하여 후속 연구를 하였다.

표 1. 분양 받은 바이러스 분리주 특성

	바이러스명	분리주	발생 기주	분양처
1	토마토퇴록바이러스(ToCV)	ToCV-tom	토마토	농과원
2	토마토반점위조바이러스(TSWV)	TSWV-old	고추	농우종묘
3	고추모틀바이러스(PepMoV)	PepMoV-tom	토마토	농과원
4	오이모자이크바이러스(CMV)	CMV-P1	고추	농우종묘
5	토마토모자이크바이러스(ToMV)	ToMV-n1&n2	토마토	농과원
6	토마토덤불위축바이러스(TBSV)	TBSV-tom	토마토	농과원
7	토마토황화잎말림바이러스 (TYLCV)	TYLCV-tom	토마토	농과원

- 바이러스별 표준 isolate 선발은 기존 연구 결과 및 염기서열 분석을 통한 NCBI에 등록된 바이러스 염기서열 분석 후 전장 염기서열이 보고된 대표 바이러스를 선발하고 씨더스에

primer 분석 위해 자료 제공하였다(그림 1).



- 양성 대조구용 토마토 바이러스 genome 분리 및 에탄올 또는 동결 건조 형태로 시료 보관 대상 virus infectious clone을 분양 받아 stock으로 보관(감염성 클론이 없는 바이러스는 감염 있을 보관하거나 부분 정제한 RNA를 EtOH에 보관하여 사용하였다.

(나) 토마토와 토마토 바이러스 유전체 분석을 통한 primer set 선발

- 토마토의 표준 유전체와 토마토 바이러스(7종)의 서열 비교를 통해 바이러스별 후보 primer set 선발.

표 2. 바이러스별 1차 선발 primer에 상동성을 보인 NCBI 등록 바이러스

Virus name	NCBI ID	Design된 primer가 align되는 바이러스	5' primer start	5' primer length	5' primer tm
PepMOV	NC_001517.1	NC_023014.1 Bidens mosaic virus isolate SP01, complete genome	6,284	20	55.10
CMV	NC_002034.1	NC_012134.1 Gayfeather mild mottle virus RNA 1, complete sequence	2,598	20	54.84
ToMV	NC_002692.1	NC_022230.1 Tomato mottle mosaic virus isolate MX5, complete genome	164	20	55.15
ToMV	NC_002692.1	NC_022230.1 Tomato mottle mosaic virus isolate MX5, complete genome	838	20	55.02
ToMV	NC_002692.1	NC_022230.1 Tomato mottle mosaic virus isolate MX5, complete genome	1,525	20	55.05
ToMV	NC_002692.1	NC_022230.1 Tomato mottle mosaic virus isolate MX5, complete genome	2,269	20	54.71
ToMV	NC_002692.1	NC_001367.1 Tobacco mosaic virus, complete genome	3,707	20	55.06
ToMV	NC_002692.1	NC_009642.1 Bell pepper mottle tobamovirus, complete genome	4,337	20	55.23
ToMV	NC_002692.1	NC_022230.1 Tomato mottle mosaic virus isolate MX5, complete genome	5,130	20	55.03
ToMV	NC_002692.1	NC_022230.1 Tomato mottle mosaic virus isolate MX5, complete genome	164	20	55.15
ToMV	NC_002692.1	NC_022230.1 Tomato mottle mosaic virus isolate MX5, complete genome	838	20	55.02
ToMV	NC_002692.1	NC_022230.1 Tomato mottle mosaic virus isolate MX5, complete genome	5,130	20	55.03
ToMV	NC_002692.1	NC_009041.1 Rehmanna mosaic virus, complete genome	164	20	55.15
ToMV	NC_002692.1	NC_022230.1 Tomato mottle mosaic virus isolate MX5, complete genome	1,233	20	54.79
ToMV	NC_002692.1	NC_022230.1 Tomato mottle mosaic virus isolate MX5, complete genome	3,548	20	54.94
ToMV	NC_002692.1	NC_022230.1 Tomato mottle mosaic virus isolate MX5, complete genome	164	20	55.15
ToMV	NC_002692.1	NC_001367.1 Tobacco mosaic virus, complete genome	3,707	20	55.06

바이러스 특이적인 primer는 생물정보분석 회사인 씨더스에 분석 의뢰하였다. 분석방법

(그림 1)을 간단히 요약하면, 바이러스 유전체 서열과 토마토 전장 유전체 서열, 토마토 EST, 2014년 9월까지 NCBI에 등록된 모든 식물바이러스 유전체 염기서열(plant virus genome sequence data, PVS data) 간의 상동성 분석을 통해 7가지 바이러스에 특이적인 서열을 1차로 선발하였다. 이후 Primer3 프로그램을 이용하여 Tm값이 60도씨가 되게 primer를 디자인하고, 디자인된 primer 서열과 PVS data간의 상동성 조사를 통해 상동성이 전혀 없는 65개 primer 조합을 최종적으로 선발하였다(표 2와 그림 1).

(다) 토마토 바이러스에 대한 RT/PCR 검출 조건 확립

-바이러스 검출 감도 및 특이도 분석을 통해 진단 kit 제작에 적합한 RT, PCR, RT-PCR 용 후보 premix 조합 선발

진단 Kit 제작에 적합한 primer 조합과 반응시약을 선발하고자 비특이 band 증폭여부(특이도)와 검출 가능한 최대희석한계(검출감도)를 비교하였으며, 실험에 사용한 재료 및 방법은 표 3과 같다.

표 3. 토마토 바이러스 진단용 특이 프라이머 개발에 사용한 재료와 방법 요약

재료	방법 및 조건
DEPC-water	바이오세상 제품 구매
건전 토마토 RNA	BCS RNA purification kit를 이용해 서광과 주옥 토마토에서 분리
감염 토마토 RNA	ToCV, TBSV는 자연 감염된 토마토, 나머지 바이러스는 인공 접종한 서광과 주옥 토마토에서 동일한 kit를 사용해 분리
건전 토마토 DNA	BCS DNA purification kit를 이용해 서광과 주옥 토마토에서 분리
감염 토마토 DNA	동일 kit로 자연감염된 상용 토마토에서 분리
RT-PCR용 one step premix 1	chemical inhibition 방식으로 Taq-polymerase 활동 억제, 95도씨 처리로 활성화
RT-PCR용 one step premix 2	chemical inhibition
RT-PCR용 one step premix 3	항체를 이용해 Taq-polymerase활동억제,95도씨 처리로 활성화시킴, 일반적으로 hotstart 방식으로 불림
RT-PCR용 one step premix 4	hot start
Nano-drop spectrophotometer	RNA 및 DNA 농도를 측정에 사용, 100ng/μl ~ 600ng/μl 농도로 재료 통일
RT-PCR	primer 0.5pmol/20μl, RT는 42℃/20분, PCR 증폭 95℃/10분 후 35회 증폭(95℃/1분, 60℃/1분, 72℃/1분)
PCR	primer 0.5pmol/20μl, 95℃/10분 후 35회 증폭(95℃/1분, 60℃/1분, 72℃/1분)

총 65개 primer 조합[ToCV(17조합), TSWV(3조합), PepMoV (18조합), CMV(5조합), ToMV (3조합), TBSV (3조합)]을 이용하여 특이성을 조사하였다. 먼저 ToCV primer 조합과 4종류 RT-PCR mix 가운데, 현재 동물에서 많이 이용되는 3번 믹스를 가지고, template 없이 물만으로 반응했을 때, primer 조합에 따라 비특이 증폭 산물이 생성되기도 하였다(그림 2). 이는 RT & PCR 믹스에 포함된 plasmid DNA와 primer 조합 간에 발생하는 반응 판단되었다.

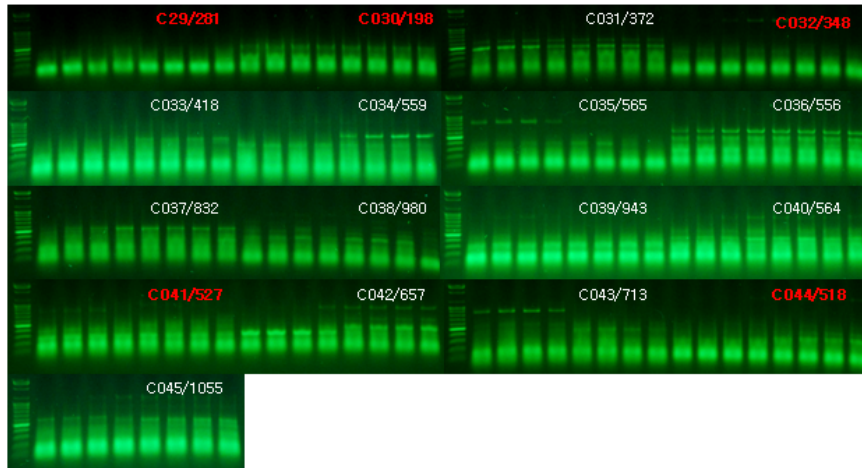
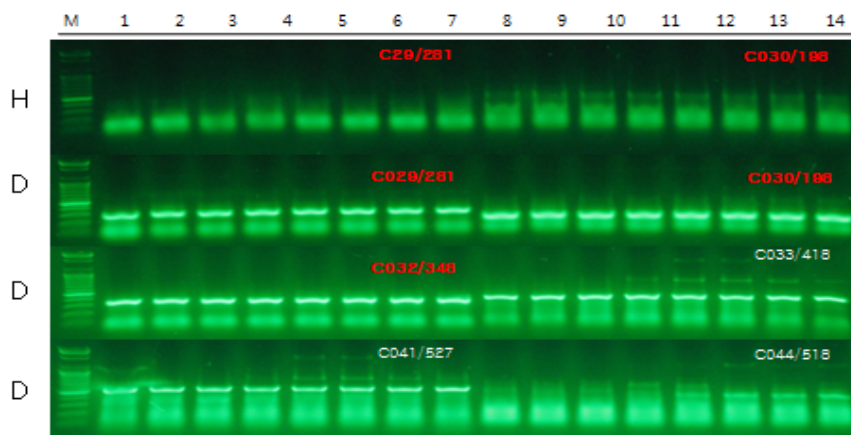


그림 2. 주형을 포함하지 않은 RT-PCR mix 3에서 ToCV 진단용 후보 primer 조합의 증폭양상 비교. Tm값 구배. 왼쪽에서 오른쪽으로 51~63.8℃.

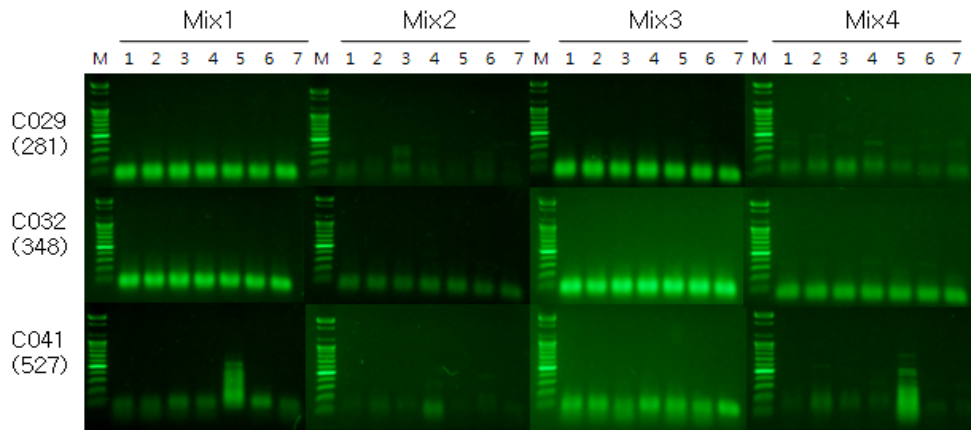
특이성이 높은 것으로 판단되는 primer 조합(그림 2의 붉은색 표시 조합)을 이용하여 건전 토마토 RNA와 ToCV에 감염된 토마토 RNA에서의 증폭 양상을 추가로 조사하였다. 그 결과 건전 토마토 RNA에서 새롭게 비 특이 증폭 산물이 나타나는 primer 조합이 관찰되었고, C030 primer 조합의 경우 건전과 감염 처리구를 비교해 볼 때 비 특이 증폭 산물과 목적 증폭 산물간에 경합이 발생함을 확인할 수 있었다(그림 3). 이러한 결과는 진단에 사용하는 primer 조합과 RT 조건이 매우 중요한 변수임을 시사하는 것이며, 아울러 premix의 조성에도 특이성에 영향을 줄 수 있는 변수가 존재함을 의미한다.



M: 1kb DNA ladder, 1~7 and 8~14: Tm gradient (51~63.8℃), H: healthy tomato RNA, D: ToCV infected tomato RNA

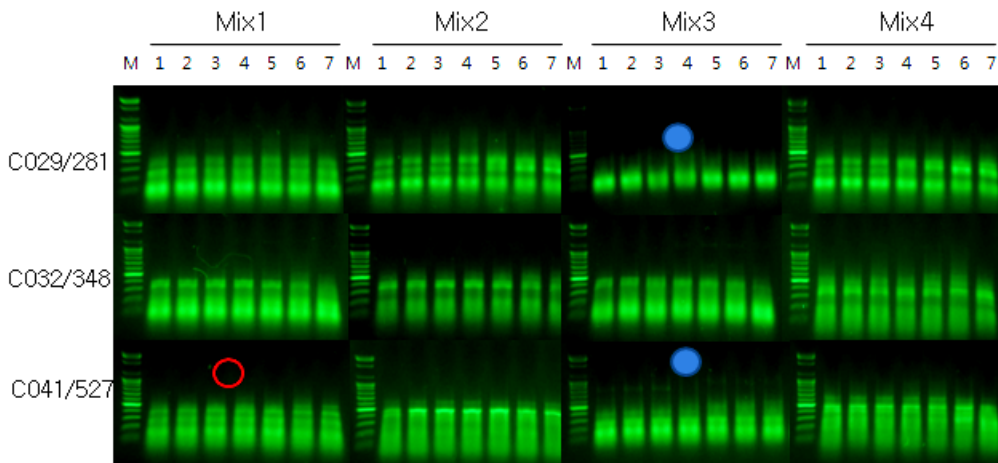
그림 3. 건전 토마토 RNA와 ToCV에 감염된 토마토 RNA의 증폭 양상 비교.

실험에 사용한 17개 primer 조합 가운데 특이성이 높은 3종의 primer 조합을 이용하여 RT-PCR one step premix 별 증폭 양상을 조사하였다. 주형을 넣지 않았을 경우 mix에 따라 비 특이 증폭 산물 발생 정도가 달라는데 대체적으로 premix 1번과 3번에서 양호한 결과를 나타내었다(그림 4). 건전한 RNA를 주형을 사용했을 경우에는 비 특이 증폭 산물이 훨씬 더 많이 발생하였고, 다른 premix에 비해 3번 mix에서 보다 좋은 결과를 보였다(그림 5).



M: 1kb DNA ladder, 1~7: Tm gradient (51~63.8°C),
The letter of C020 (280) means primer combination (amplicon size expected)

그림 4. ToCV 검정용 3종의 primer 조합의 RT-PCR one step premix 별 증폭 양상 비교. 주형을 넣지 않은 상태에서 실험 수행.



M: 1kb DNA ladder, 1~7: Tm gradient (51~63.8°C),

그림 5. ToCV 검정용 3종의 primer 조합의 RT-PCR one step premix 별 증폭 양상 비교. 건전 토마토 RNA를 주형으로 사용함.

RT-PCR one step premix(1~4) 조합에 따른 비특이 band 증폭 여부를 template를 넣지 않은 상태에서 조사했을 때, PepMoV의 경우 18개 primer 조합 가운데 비특이 증폭산

물이 생성되는 조합(C049와 Mix2 조합) 것과 그렇지 않은 것(C048과 Mix 1~4 조합)을 관찰할 수 있었으며(그림 6), C048, C054, C055 primer 조합은 4가지 mix 모두에서 비 특이 증폭산물을 생성하지 않았다(그림 7).

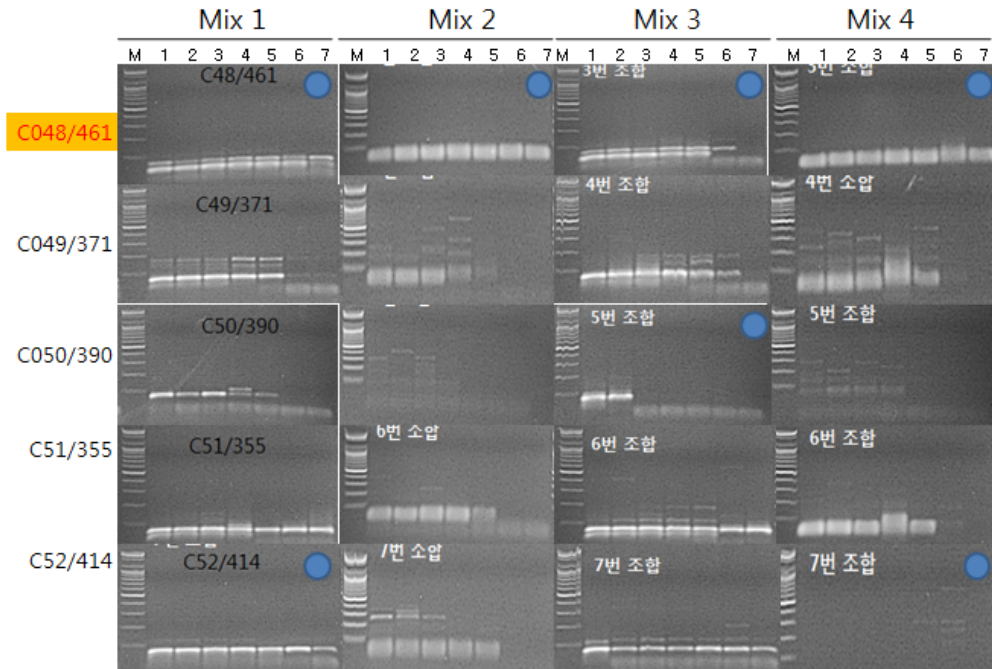


그림 6. PepMoV 진단용 primer 조합과 RT-PCR one step premix 조합 간의 PCR band 증폭양상 비교. M: 100bp ladder, 1~7: Tm 값 구배(51.0, 52.2, 53.9, 56.0, 58.5, 60.7, 62.4, 63.8도씨), C049~52/(숫자): primer 조합번호/예상 증폭산물의 크기(bp).

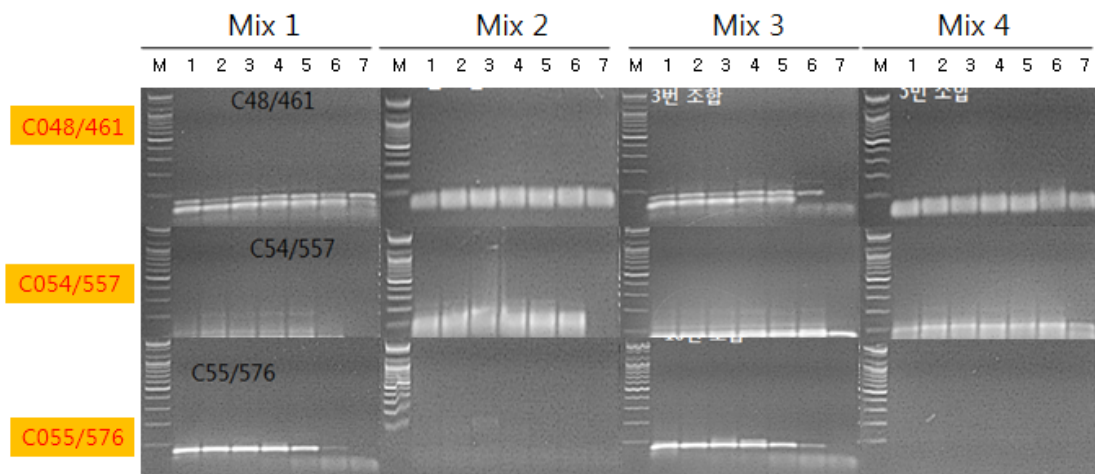


그림 7. PepMoV 진단용 선발 primer 조합과 RT-PCR one step premix 조합의 PCR band 증폭양상 비교. M: 100bp ladder, 1~7: Tm 값 구배(51.0, 52.2, 53.9, 56.0, 58.5, 60.7, 62.4, 63.8도씨), C048, 54, 55/(숫자): primer 조합번호/예상 증폭산물의 크기(bp).

CMV의 경우 5개 primer 조합 중 C70과 C71이 가장 좋은 결과를 보였고(그림 8), ToMV는 3개 primer 조합 중 4개 premix 모두에서 비 특이 증폭산물을 생성하는 조합은 관찰되지 않았지만, C066 조합은 mix 1과 4 그리고 mix3(primer Tm값 주변)에서 비특이 증폭산물이 생성되지 않았다(그림 9).

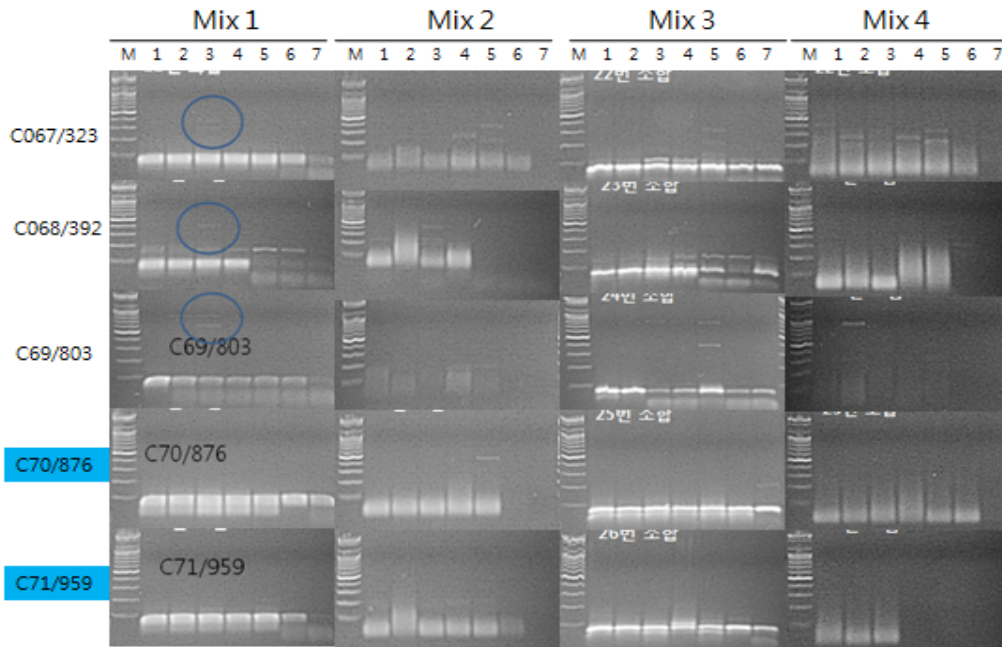


그림 8. CMV 진단용 primer 조합과 RT-PCR one step premix 조합의 PCR band 증폭양상 비교. M: 100bp ladder, 1~7: Tm 값 구배(51.0, 52.2, 53.9, 56.0, 58.5, 60.7, 62.4, 63.8도씨), C069, 70, 71/(숫자): primer 조합번호/예상 증폭산물의 크기(bp).

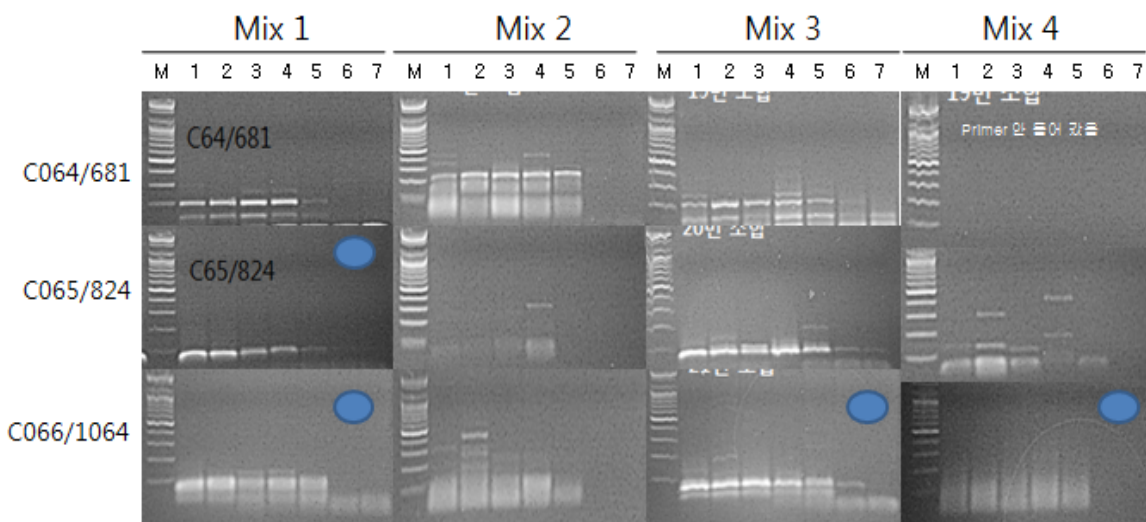


그림 9. ToMV 진단용 primer 조합과 RT-PCR one step premix 조합의 PCR band 증폭양상 비교. M: 100bp ladder, 1~7: Tm 값 구배(51.0, 52.2, 53.9, 56.0, 58.5, 60.7, 62.4, 63.8도씨), C064, 65, 66/(숫자): primer 조합번호/예상 증폭산물의 크기(bp).

이상의 결과로 ToCV 진단용으로는 C029, C032, C041, PepMoV는 C048, C054, C055, CMV는 C70과 C71, ToMV는 C066 primer 조합을 선발하였고, RT-PCR one step premix는 chemical inhibition 방식인 mix 1과 hot start 방식인 mix3을 선발하였다.

선발된 primer 조합을 실제 바이러스 검정에 활용하기 위하여 감염 토마토의 total RNA를 이용하여 primer의 특이성을 조사하였다. PepMoV의 경우 선발한 3개 primer 조합 가운데 C048 primer 조합이 가장 높은 특이성을 보였다(그림 10).

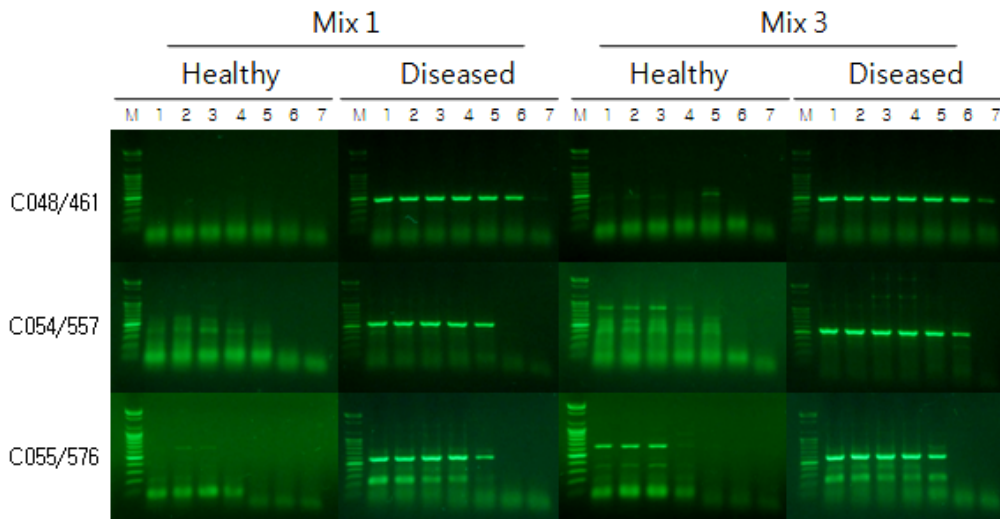


그림 10. 건전과 이병 RNA 처리구에서 PeMoV 진단용 primer 조합의 PCR band 증폭양상 비교. Mix 1: chemical inhibition 방식인 mix, Mix 3: hot start 방식 mix, M: 100bp ladder, 1~7: Tm 값 구배(51.0, 52.2, 53.9, 56.0, 58.5, 60.7, 62.4, 63.8도씨), C048, 54, 55/(숫자): primer 조합번호/예상 증폭산물의 크기(bp).

CMV의 경우는 건전 RNA 처리구에서 C070 primer 조합이 C071 primer 조합 보다 특이성이 높게 나타났으나, primer Tm 값 60도씨임을 감안할 때, C071 primer 조합 보다 검출 감도가 낮은 것으로 판단되었다(그림 11).

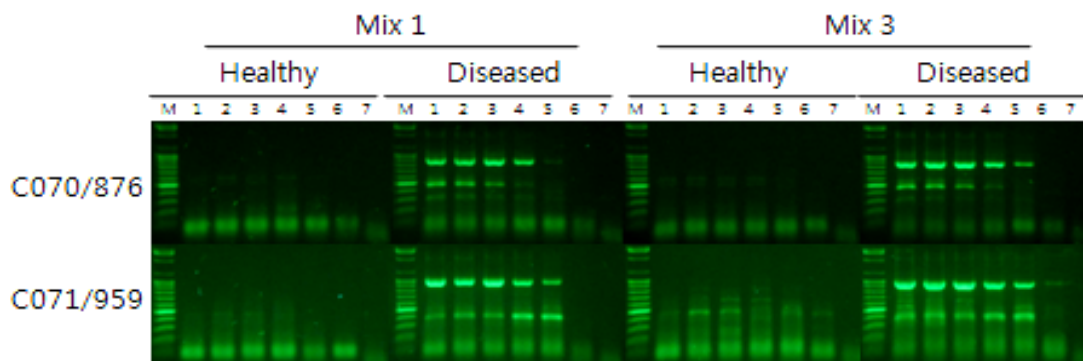


그림 11. 건전과 이병 RNA 처리구에서 CMV 진단용 primer 조합의 PCR band 증폭양상 비교. Mix 1: chemical inhibition 방식인 mix, Mix 3: hot start 방식 mix, M: 100bp ladder,

1~7: Tm 값 구배(51.0, 52.2, 53.9, 56.0, 58.5, 60.7, 62.4, 63.8도씨), C070과 C071/(숫자): primer 조합번호/예상 증폭산물의 크기(bp).

ToMV의 경우 선발된 C066 primer 조합은 건전과 감염 토마토의 RNA 처리구에서 비 특이 PCR band가 모두 증폭되었다(그림 12).

이상의 연구결과를 종합하여 PepMoV 진단용으로는 C048, CMV 진단용으로는 C70, ToMV 진단용으로는 C066 primer 조합을 2차로 선발하였고, RT-PCR one step premix는 특이도와 가격적인 측면을 고려하여 hot start 방식인 mix3을 최종적으로 선발하였다.

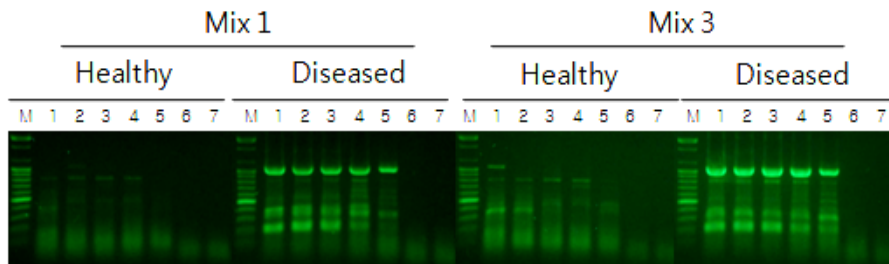


그림 12. 건전과 이병 RNA 처리구에서 ToMV 진단용 primer 조합의 PCR band 증폭양상 비교. Mix 1: chemical inhibition 방식인 mix, Mix 3: hot start 방식 mix, M: 100bp ladder, 1~7: Tm 값 구배(51.0, 52.2, 53.9, 56.0, 58.5, 60.7, 62.4, 63.8도씨), C066/(숫자): primer 조합번호/예상 증폭산물의 크기(bp).

(라) 정제 DNA 또는 RNA를 이용한 one step PCR/RT-PCR 조건 확립

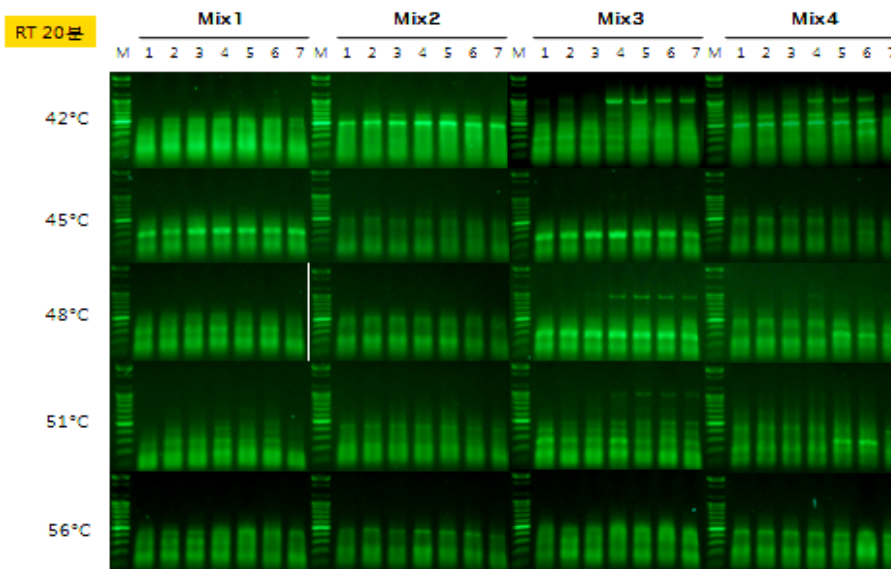


그림 13. RT 온도 변화에 따른 비특이 band 증폭 양상 비교. Mix 1: chemical inhibition 방식인 mix, Mix 3: hot start 방식 mix, M: 100bp ladder, 1~7: Tm 값 구배(51.0, 52.2, 53.9, 56.0, 58.5, 60.7, 62.4, 63.8°C).

선발한 premix와 primer 이외에 RT-PCR에 미치는 요인들을 분석하고자 역전사반응 온도와 시간, Tm값, primer 농도 변화에 따른 특이도 및 검출감도를 조사하였다. 먼저 primer 이외에 진단 조건에 가장 영향을 많이 주는 변수로 생각되는 역전사반응 조건을 최적화하기 위하여 ToCV 진단용 C041 primer 조합과 서광건전주 RNA를 Template(100ng/μl)로 RT 온도 변화에 따른 비특이 band 증폭 양상을 조사하였다. 온도 변화에 따라 비특이 band 증폭 양상은 다소 다르게 나타났는데, 42°C에서는 비 특이 반응이 심하였다(그림 13).

이전의 실험에서 42°C를 제외한 나머지 온도에서는 뚜렷한 차이점을 구분할 수 없었기 때문에 역전사 반응 증폭 시간에 따른 증폭 유형을 추가로 조사하였다. 역전사 반응 시간이 길수록 비 특이 증폭 산물의 발생량이 많아지는 경향을 보여 역전사 반응 시간으로는 5분이 적합한 것으로 판단되었다(그림 14).

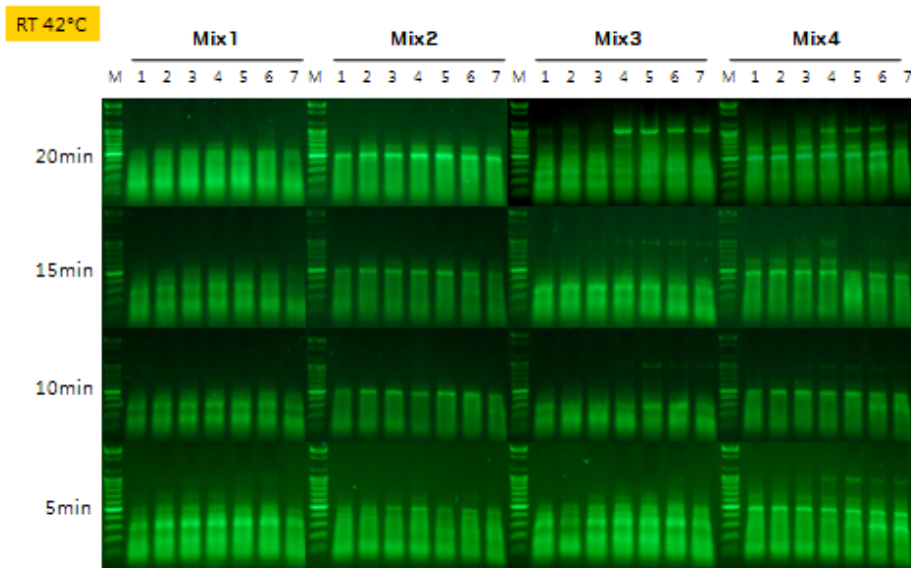


그림 14. RT 시간 변화에 따른 비특이 band 증폭 양상 비교. Mix 1: chemical inhibition 방식인 mix, Mix 3: hot start 방식 mix, M: 100bp ladder, 1~7: Tm 값 구배(51.0, 52.2, 53.9, 56.0, 58.5, 60.7, 62.4, 63.8°C).

전사 반응 온도와 시간을 48°C와 5분으로 하여 건전 토마토 RNA(R60)와 ToCV감염 토마토 RNA(R52)로 primer 농도에 따른 증폭양상을 비교 분석하였다. primer 농도가 높아지면 비 특이 증폭 산물도 늘어나는 경향을 보였으며, 목적 산물의 증폭량에는 큰 변화가 관찰되지 않았다(그림 15). 따라서 RT-PCR의 특이성에 영향을 주는 가장 큰 요인은 역전사반응 온도와 시간이었고, Tm값은 primer 특이성이 높다면 비교적 넓은 범위 내에서 적용이 가능하였다.

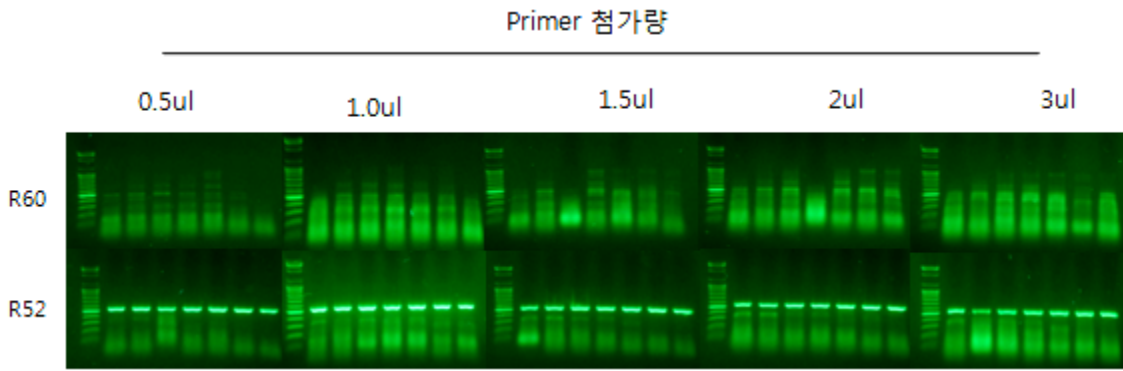


그림 15. Primer 농도 변화에 따른 비특이 band 증폭 양상 비교. Mix 1에서 Tm 값 구배(51.0, 52.2, 53.9, 56.0, 58.5, 60.7, 62.4, 63.8도씨) 줌.

ToCV 검출을 위한 RT-PCR 최적 조건은 역전사반응 온도와 시간 각각 5분과 48°C, Tm 값은 60°C, primer 농도는 0.5ng/μl, PCR 반응 조건은 95°C/10분 후 35회 증폭(95°C/1분, 60°C/1분, 72°C/1분)이었다. 이와 같은 조건으로 나머지 바이러스에 대한 특이성 및 검출 감도를 추가로 조사하였으며(자료 미제출), 최적화 조건에서 수행한 RT-PCR 결과를 보면 ToCV와 마찬가지로 조사한 RNA 바이러스 모두에서 양호한 결과를 나타내었고(자료 미제출), 역전사 반응을 제외한 동일 조건으로 TYLCV에 적용한 결과 특이성과 검출감도가 RT-PCR의 경우와 비슷한 경향을 보여 진단 kit제작에 필요한 최적조건을 확립하였다(그림 16).

■ Total RNA 를 이용한 RT-PCR/PCR 조건 최적화 III

Virus	Primer Pairs	RT-PCR premix	Template
ToCV		1-(Chemical 방식, 1x Taq) 2-(Chemical 방식, 2x Taq) 3-(Antibody 방식, 1x Taq) 4-(Antibody 방식, 2x Taq)	DW Healthy RNA Disease RNA
TSWV	2		
PepMoV			
CMV	2		
ToMV	2		
TBSV	1		

Tm gradient (°C)	RT	Template Added (ng)	10pmol Primer (ul)	PCR program
51 ~ 63.8	온도 (°C) ; 42, 45, 48, 51, & 56 시간 (minute) ; 5, 10, 15, & 20	800 400 200 100	0.5 1 1.5 2 3	95/10m, (95/20s, 60/20 or 45s, 72/30s) 35 cycles

그림 16. RT-PCR 및 PCR 진단 kit 제작을 위한 최적조건.

(마) 바이러스별 최적 primer 선발

1차로 선발한 primer 조합에서 진단에 적합한 최적 primer 조합을 선발하고자, RT-PCR 및 PCR 진단 kit제작을 위한 최적조건 하에서 primer 조합별 특이도 및 검출 감도를 조사하였다. 이들 가운데 일부 결과를 보면 TSWV는 결과 판독에는 큰 문제가 없으나 C074

primer 조합이 보다 진단 kit 제작에 적합하였다(그림 17).

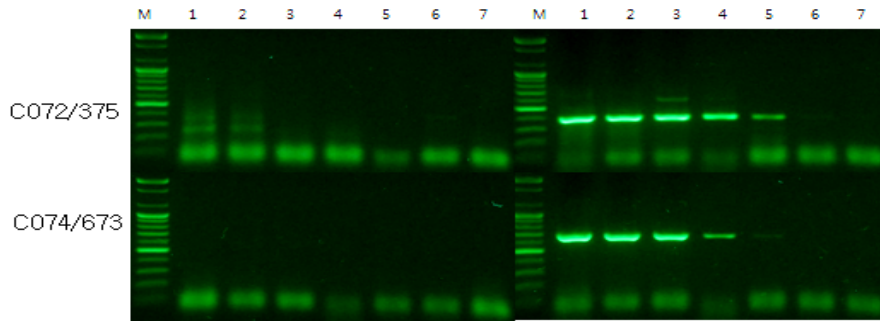


그림 17. TSWV 진단용 primer 조합의 검출 감도 및 특이도 비교. M: 100bp ladder, 1: 정제한 RNA (100ng/μl), 2~7: DEPC-water로 10배씩 연속 희석한 RNA. 왼쪽 건전, 오른쪽 감염.

CMV의 경우, 건전 RNA 처리구에서 C070 primer 조합이 C071 primer 조합 보다 특이성이 높게 나타났으나, primer Tm 값이 60°C임을 감안할 때, C071 primer 조합 보다 검출 감도가 낮은 것으로 판단되었다(그림 18).

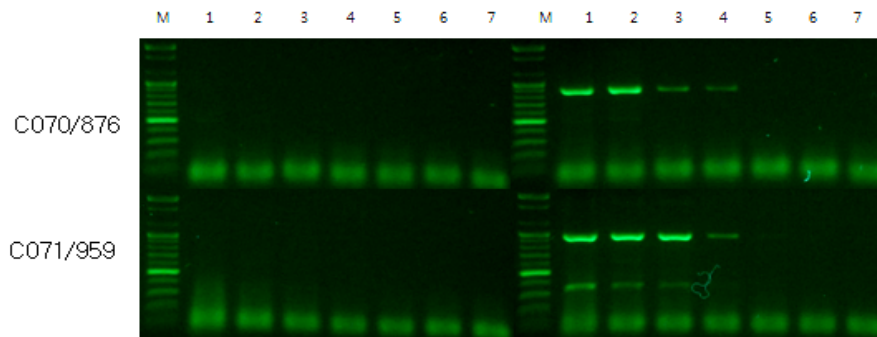


그림 18. CMV 진단용 primer 조합의 검출 감도 및 특이도 비교. M: 100bp ladder, 1: 정제한 RNA(100ng/μl), 2~7: DEPC-water로 10배씩 연속 희석한 RNA. 왼쪽 건전, 오른쪽 감염.

TBSV의 경우, 적합한 최종 검정에서 적합한 primer가 없는 것으로 판단되어 새로운 primer군을 설계하고 이를 이용해 최종적으로 1개 primer 조합을 선발하였다(그림 19).

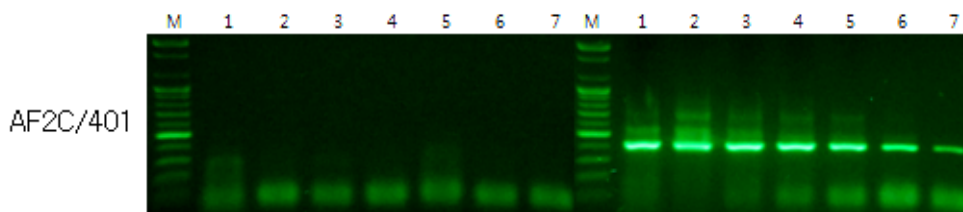


그림 19. TBSV 진단용 primer 조합의 검출 감도 및 특이도 비교. M: 100bp ladder, 1: 정제한 RNA(100ng/μl), 2~7: DEPC-water로 10배씩 연속 희석한 RNA. 왼쪽 건전, 오른쪽 감염

TYLCV의 경우, 최종적으로 한 개 primer 조합을 선발하였다.

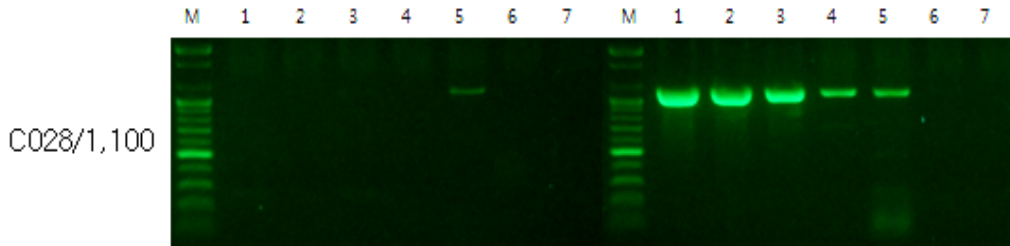


그림 20. TYLCV 진단용 primer 조합의 검출 감도 및 특이도 비교. M: 100bp ladder, 1: 정제한 DNA(100ng/μl), 2~7: DEPC-water로 10배씩 연속 희석한 RNA. 왼쪽 건전, 오른쪽 감염

이상의 결과를 기초로 ToCV는 C032/348(4679, RNA2, p63-64), TSWV는 C074/673(3302, M, P147-148), PepMoV은 C048/461(3605, p95-96), CMV는 C070/876 (113, RNA1, p139-p140), ToMV는 C065/824 (3128, p129-p130) TBSV는 AF2C/401(3980, p7-8) 선발하였고, RT-PCR one step premix는 특이도와 가격적인 측면을 고려하여 hot start 방식인 mix3을 최종적으로 선발하였다. TyLCV용으로는 C028 primer 조합을 선발하였고 hot start 방식인 DNA mix3을 최종적으로 선발하였다.

(바) 시제품용 Internal control 선발

RT-PCR 제품에 사용되는 Internal control은 크게 2가지로 나눌 수 있다. 첫 번째는 RNA 주형이 정상적으로 정제되었는지를 확인할 수 있는 것이고, 두 번째는 PCR mix가 정상적으로 작동하는지를 확인하는 것이다. 먼저 RNA 주형의 이상 유무를 확인할 수 있는 internal control을 개발하고자 문헌조사 결과를 기초로하여 가능성이 높은 primer 조합(Acta Biochim Biophys Sin 43:465 - 471에 보고된 토마토 18S rRNA용 primer 조합)을 선발하였다.

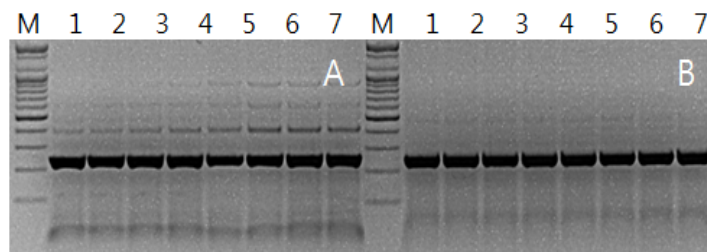


그림 21. 건전과 이병 RNA 처리구에서 ToMV 진단용 primer 조합의 PCR band 증폭양상 비교. A: chemical inhibition 방식인 mix 1, B: hot start 방식 mix 3, M: 100bp ladder,

1~7: Tm 값 구배(48, 49.1, 51.3, 54.6, 58.7, 62.1, 64, 65°C).

이전의 실험에서 선발한 2개 premix로 annealing 온도(48°C, 49.1°C, 51.3°C, 54.6°C, 58.7°C, 62.1°C, 64°C, 65°C)를 달리하여 증폭유형을 조사한 결과, premix 3이 premix 1보다 양호하였고, 조사한 모든 annealing 온도에서 특이적으로 증폭됨을 확인하였다(그림 21).

RT와 PCR mix가 정상적인 성능을 갖는지 확인하고자 NCBI에 등록된 역전사효소(reverse transcriptase)와 Taq-polymerase의 염기서열을 Primer3 프로그램으로 분석하였다. Taq-polymerase 서열에서는 23개, 역전사효소 서열에서는 32개 primer 후보 조합이 생성되었으나, Taq-polymerase 서열에서는 생성된 6개 primer 조합을 최종 후보로 선발하였다(표 4). Premix 3을 기본으로 annealing 온도와 첨가한 primer 농도(10ug/μl)를 달리하여 PCR 산물 생성 여부를 조사했을 때, T11-T12 primer 조합에서만 internal control로 사용할 수 있을 정도의 PCR 산물이 증폭되었다(그림 22). 본 실험에서 선발된 internal control용 primer 조합으로 시제품 제작하는 OEM 업체와 협의한 결과 제품 제작 상에서 몇 가지 문제점이 발견되어 OEM 업체의 도움을 받아 새로운 primer 조합 개발하여 CMV 진단용 시제품(version 1) 제작에 사용하였다.

표 4. Taq-polymerase 서열에서는 생성된 6개 primer 조합의 특성

Code	Name	start	len	tm	gc%	any	3' seq	Primer seq.	PRODUCT SIZE
T11	LEFT PRIMER	2034	20	60.35	55	3	0	ACCCCTTCAACCTCAACTCC	397
T12	RIGHT PRIMER	2430	20	59.95	55	6	0	CTATAGTCCAGGGCCACCAA	397
T33	LEFT PRIMER	1864	20	60.1	55	6	1	GGAGAAGCTCCTTTGGCTCT	657
T34	RIGHT PRIMER	2520	20	59.82	55	4	0	GTCTGGGTGTGGATGTCCTT	657
T35	LEFT PRIMER	598	20	59.96	50	4	1	GATGCTTCCGCTCTTTGAAC	684
T36	RIGHT PRIMER	1281	20	59.75	50	4	0	CGGACGTTTTCTGGCTTTAC	684
T37	LEFT PRIMER	2501	20	59.82	55	4	1	AAGGACATCCACACCCAGAC	635
T38	RIGHT PRIMER	3135	20	59.83	50	4	3	AGGGACAACCCCTTGAACTT	635
T47	LEFT PRIMER	176	20	60.12	60	2	0	GCCTCCTCTACCGCTTCTCT	825
T48	RIGHT PRIMER	1000	20	60.35	55	4	0	CACCTCGTACCCCTCCTTTT	825
T55	LEFT PRIMER	2181	20	60.35	55	8	0	TGGAGAAGATCCTCCAGCAC	955
T56	RIGHT PRIMER	3135	20	59.83	50	4	3	AGGGACAACCCCTTGAACTT	955

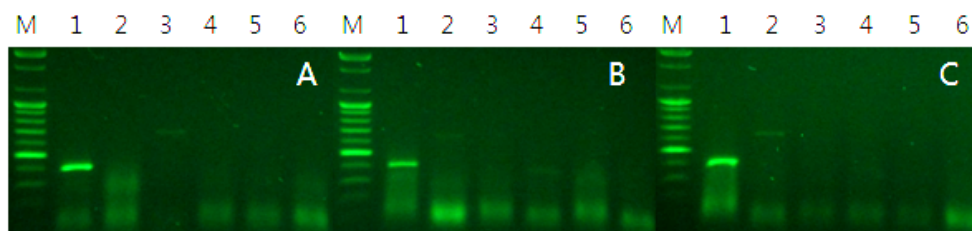


그림 22. Taq-polymerase 서열에서는 생성된 6개 primer 조합의 PCR band 증폭양상 비교. RT-PCR one step premix(2x)를 기반으로 대상 primer(10pg/μl) 첨가량(A-1μl, B-2μl, C-3μl)을 달리함. M: 100bp ladder.

(사) 검출 감도 및 특이성 비교를 통해 진단에 적합한 Biocube 선발

정제된 RNA 주형을 이용해 최적화된 조건을 Biocube를 매체로 적용하기 위하여 Biocube 예비 실험을 실시하였다. 일반적으로 식물바이러스는 감염된 조직에 따라 분포 농도가 다르며, 바이러스에 의한 병증이 심할수록 바이러스 농도가 높게 나타난다. Biocube를 감염 식물체 생체 앞에 찢러 주형을 흡수하는 방법은 어떤 조직에 바이러스가 높은 농도로 존재하는지에 따라 검출 결과가 달라질 가능성이 존재하기 때문에 검출 조건을 최적화해야하는 차후 실험에서 시료 간 차이를 배제하기 위하여 마쇄액을 이용한 Biocube 응용법을 우선적으로 실험하였다.

(예비 실험 1)

CMV 감염 토마토(주옥품종) 잎 100mg과 멸균수 100 μ l를 유발에 넣고 마쇄한 후 즙액 3 μ l과 멸균수로 2배 희석한 희석액 3 μ l를 각각의 Biocube에 떨어뜨린 다음 Biocube에 멸균된 휴지를 접촉하여 여액을 제거하였다. 주형이 흡수된 Biocube를 RT-PCR 반응액에 넣고 이전에 선발된 RT-PCR 최적 조건에 따라 증폭반응을 수행한 결과, 1:1 마쇄액 보다 2배 희석액을 사용할 때 결과의 재현성이 높음을 확인하였다(그림 23). 본 실험 이외에 5회 정도 반복 실험한 결과 비슷한 경향을 보였고, 이는 멸균된 종이로 Biocube에 묻은 여액 흡착할 때 고농도 시료에서는 PCR 저해 요인인 식물체 물질 완전히 제거되지 않아 발생하는 것으로 판단되었다.

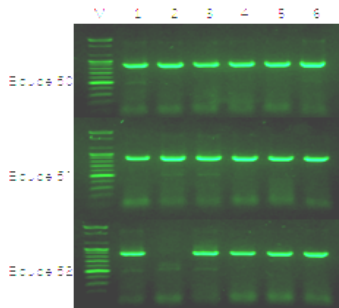


그림 23. Biocube에 적합한 즙액의 농도 결정(예비 실험). 5종류의 Biocube를 사용, 1~3: 1:1 마쇄액, 4~6: 2배 희석액. 동일 시료로 3 반복함.

(예비 실험 2)

일반적으로 식물바이러스 검정에 사용하는 시료는 냉동실에 보관하는 경우가 많은데, 이와 같은 경우를 고려하여 시료 상태(생엽과 냉동엽)에 따른 Biocube 적용 가능성을 조사하였다. TSWV에 감염된 토마토 생엽과 냉동엽 각 잎 100mg을 유발에 넣은 다음 멸균수 200 μ l를 첨가하고 마쇄한 후 마쇄액 3 μ l Biocube에 접촉하고 휴지로 Biocube에 묻은 여액 제거했으며, 이를 RT-PCR 반응액에 넣을 주형으로 사용하였다. 생엽에 비해 냉동 시료에 dimer가 좀 더 많이 관찰되었으나 두 시료 모두 사용에는 큰 문제가 없는 것으로 판단되었다(그림 24).

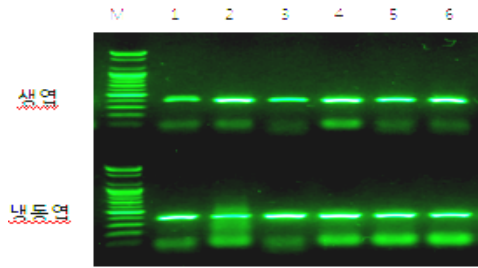


그림 24. 시료 상태(생엽과 냉동엽)에 따른 Biocube 적용 가능성 조사. TSWV에 감염된 주옥 토마토의 생엽과 냉동엽 사용, 1~6: 각각 다른 시료. RT-PCR은 C072(375bp) 조합으로

(예비 실험 3)

실험자에 따라 여액 제거에 차이가 있을 수 있기 때문에 효과적인 여액 제거방법을 조사하였다. 증폭된 band의 진하기는 멸균된 휴지를 Biocube에 살짝 접촉하는 것 보다는 충분히 눌러주는 더 좋게 나타났으며, 여액 제거 후 Biocube 건조 처리는 결과에 큰 영향이 주지 않는 것으로 판단되어 Biocube의 매체 안정성은 높은 것으로 판단되었다(그림 25).

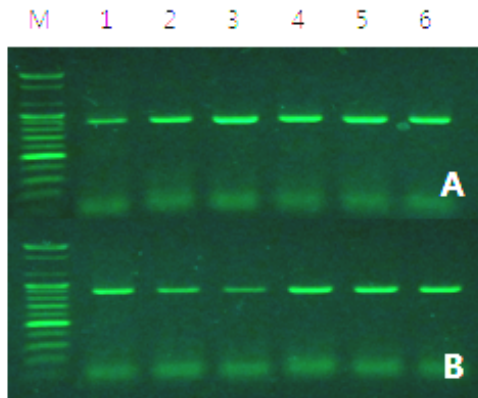


그림 25. 효과적인 여액 제거방법을 조사. CMV에 감염된 주옥 토마토의 생엽과 냉동엽 사용, 1~6: 각각 다른 시료. RT-PCR은 C070/876bp 조합으로 수행함. The remainder of extract sap was cleaned roughly (1-3) or carefully (4-6) with paper towel. A and B indicate the results of cleaning alone (A) and cleaning 2 times. min drying (B), respectively.

(아) 바이러스 진단을 위한 Biocube 적용 조건 최적화

○진단 kit 제작에 가장 적합한 Biocube 선발

바이러스별로 검출감도 및 특이성을 조사하기 위하여 각각의 바이러스에 감염된 토마토 냉동엽 100mg과 멸균수 200 μ l를 유발에 넣고 마쇄한 후 즙액 3 μ l를 각각의 Biocube에 떨어뜨린 다음 멸균된 휴지를 Biocube에 충분히 접촉하여 여액을 제거하였다. 주형이 흡수된 Biocube를 RT-PCR 또는 PCR 반응액에 넣고 이전의 RT-PCR 또는 PCR 최적 조건에 따라 증폭반응을 수행하였다. TBSV를 제외한 나머지 바이러스에 대해서는 51 Biocube(1.5mm)가 가장 좋은 결과를 보였고, PepMoV와 ToCV의 경우 3가지 Biocube 모두에서 증폭량이 매우 적어 적합한 Biocube 선택이 불가하였다(그림 26). 이상의 결과는 TSWV, ToMV, TBSV, CMV, TYLCV용 주형 준비에 적합한 Biocube로 51번 Biocube가 적합하지만 PepMoV와 ToCV의 사상형 바이러스의 진단에는 Biocube의 적합성 차이가 있다는 가능성을 시사하고 있다.

Biocube를 이용했을 때 PepMoV와 ToCV가 검출되지 않는 원인으로서는 바이러스입자 또는 RNA 3차 구조의 크기 차이에 기인한다고 생각할 수 있는데, 증폭이 잘 되는 바이러스의 입자 크기는 30nm~450nm 정도이고 PepMoV와 ToCV 입자크기는 650nm와 720nm로 알려져 있다. 그러나 아직까지 이들 바이러스 RNA가 이루는 3차 구조의 크기에 대한 연구가 없는 상황에서 정확한 원인을 파악하기는 불가능하였다.

Biocube에 흡착하는 물질이 바이러스 입자인지 RNA 인지에 대한 정보를 얻고자 마쇄액을 끓여 바이러스 입자에서 RNA를 나출하는 경우와 마쇄액을 끓이지 않고 곧바로 역전사 반응을 수행한 경우를 비교하였다.

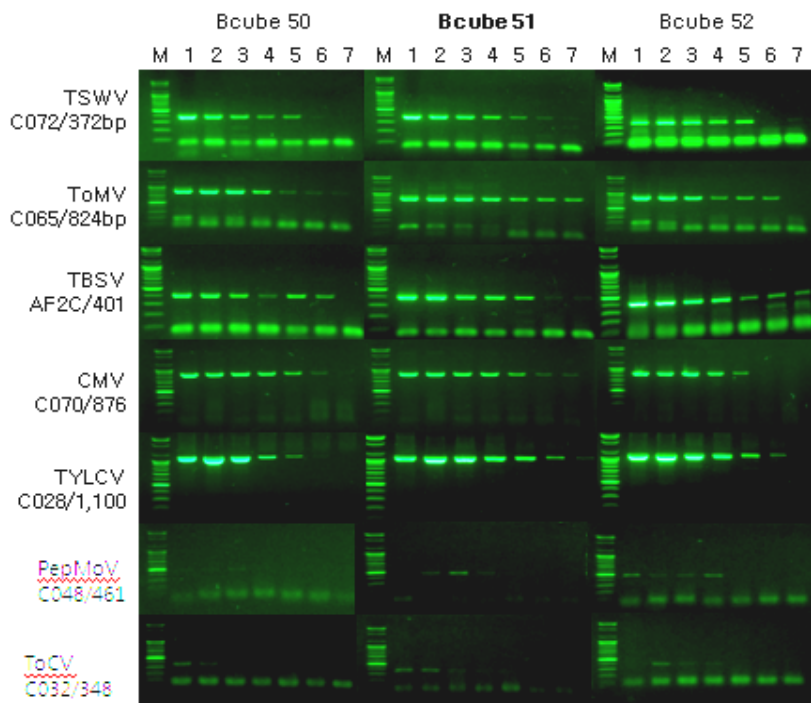


그림 26. Biocube 크기에 따른 바이러스 검출 감도 비교. 사용한 Bcube의 크기는 세로와 높이는 각 0.8mm, 길이는 1mm(Bcube 50), 1.5mm(Bcube 51), 2mm(Bcube 52)임.

TSWV에 감염된 주옥 토마토의 냉동엽 냉동엽 100mg을 비닐봉지에 담고 증류수 100 μ l첨가한 다음 베어링(hand held homogenizer)으로 마쇄하고 비닐봉지 한쪽 끝으로 즙액을 모았다. 즙액을 1.5ml tube에 옮겨 담고 vortexing한 다음 8,000rpm에서 30초간 원심분리하고 상층액(1x 원액)을 수거하여 DEPC-water로 5배씩 연속적으로 희석하여 희석액을 준비하였다. 원액과 희석액을 1.5ml tube에 절반씩 나눠 담아 반(non-boiling 처리구)은 -20 $^{\circ}$ C에 저장하고 나머지 반은 95 $^{\circ}$ C에서 10분 boiling 처리하였다. 시료를 각각 Biocube 51에 3 μ l씩 분주하고 휴지로 2초 정도 눌러 여액을 제거한 다음 RT-PCR one step premix에 넣어 주었다. 이후 48 $^{\circ}$ C에서 5분간 역전사 반응을 수행하고 95 $^{\circ}$ C 10분, 35 회(95 $^{\circ}$ C 20초, 60 $^{\circ}$ C 20초, 72 $^{\circ}$ C 30초), 72 $^{\circ}$ C 10분으로 반응을 수행하였다. 바이러스 검출 감도는 두 처리구 모두에서 비슷한 결과를 보여 Biocube에 흡수되는 물질이 TSWV RNA로 확인 되었다(그림 27).

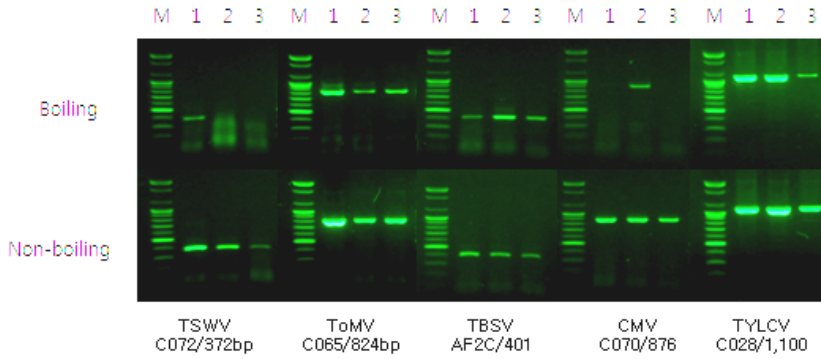


그림 27. 열처리 및 무처리에 의한 Biocube가 흡수하는 물질 추정.

따라서 ToCV와 PepMoV의 Biocube 매체를 이용하기 위해서는 열처리를 하여 RNA 구조를 깨어 줄 경우 Biocube를 활용할 수 있을 것으로 생각된다. 이를 확인하기 위하여 위탁 과제의 도움을 받아 다음 실험을 진행하였다. PepMoV에 감염된 토마토의 냉동엽 100mg과 SDS가 함유된 BCS denaturation buffer (B buffer) 500 μ l를 막자사발에 넣은 다음 마쇄하고 즙액을 1.5ml tube에 옮겨 담았다. 20~30초 vortexing하고 8,000rpm에서 30초간 원심분리한 다음 상층액(1x 원액)을 수거하여 Biocube 51에 3 μ l씩 분주하고 휴지로 2초 정도 눌러 여액을 제거한 다음 RT-PCR one step premix에 넣어 주었다. 희석액 처리구는 마쇄액으로 B buffer 원액(1X) 대신 DEPC-water로 B buffer를 5배와 10배 희석한 용액을 이용해 1x 원액과 동일한 방법으로 제조하였다. ToCV에 감염된 토마토 시료의 경우 PepMoV 처리구와 동일한 방법으로 시료를 제작하고 증폭반응을 수행하였고, 대조구로는 DEPC-water 처리구를 사용하였다. 그 결과 ToCV는 D buffer 원액(1X) 처리구에서 가장 양호한 결과를 보였고 (그림 28), PepMoV의 경우 여전히 증폭 효율이 좋지 못하였다.

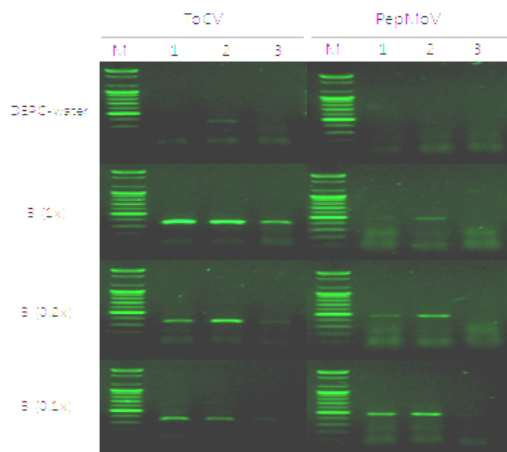


그림 28. Biocube의 ToCV와 PepMoV 주형 흡수를 위한 B buffer의 농도별 처리 효과.
M:100bp ladder, 1~3: 반복.

이와 같은 결과를 기초로 PepMoV의 RNA 구조가 ToCV 보다 안정적이라고 유추한다면, RNA 구조에 변형을 줄 수 있는 충분한 처리 시간이 필요할 것으로 생각되어 PepMoV에 감염된 토마토 시료를 마쇄한 다음 곧 바로 원심분리하는 대신 vortexing 후 5분과 10분간 마쇄액을 정치하고 원심분리한 것을 제외한 나머지 방법은 이전의 실험과 동일한 방법 수행하

였다. 5분 처리구 원액에서 양호한 증폭 결과 얻었으며 10분 처리구에서 RNA 분해되는 것으로 보이며 DEPC-water 10분 처리구의 경우 약하게 증폭되었는데, 이는 PepMoV RNA가 자연스럽게 분해되어 생긴 결과로 판단된다(그림 29).

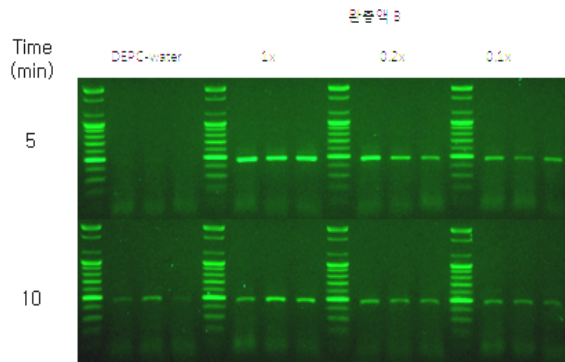


그림 29. Biocube의 PepMoV 주형 흡수를 위한 B buffer의 농도 및 시간별 효과.
M:100bp ladder, 1~3: 반복.

(자) 바이오큐브용 RT/PCR premix 제작 및 1~3차 시제품 생산

○ 선발 Biocube에 적합한 1~3차 one step PCR 및 RT-PCR premix 제작

① 1차 시제품의 적용 효율성 검토 및 개선점 탐색

제품 제작에 필요한 여러 가지 정보를 얻고자 농촌진흥청 국립농업과학원 식물바이러스연구실에서 사용하고 있는 CMV 검정용 primer 조합과 internal control용 primer 조합으로 1차 시제품을 추가로 제작하였다(그림 30).

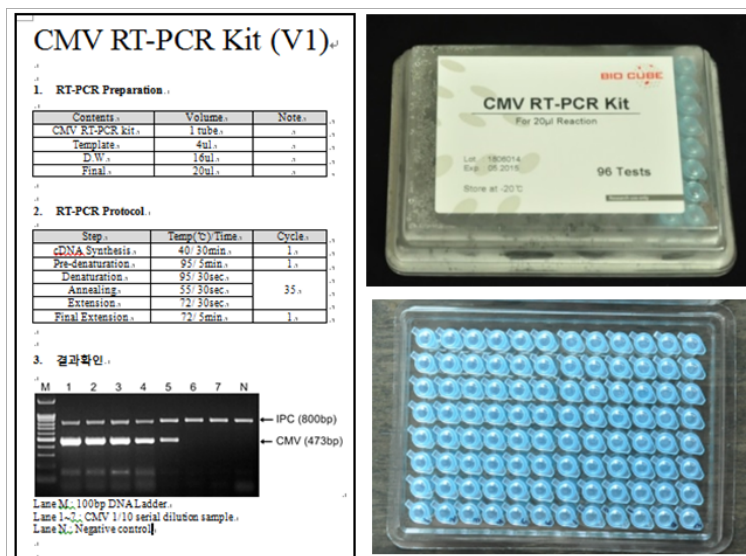


그림 30. CMV 검정용 1차 시제품.

농과원 바이러스 실험실의 연구결과에 따르면 본 제품을 다양한 시료에 적용했을 때 비특이 band가 자주 증폭되었고, 정제된 RNA 주형의 농도가 높을수록 비 특이 band의 발생

량과 증폭량이 증가한다는 문제점을 제기하였다. 담당자와 토의한 결과 이러한 문제점은 주로 토마토 이외의 다른 작물(잡초류와 고추)에 적용했을 때 더욱 심하였다고 했으며, 대량으로 검정시 internal control에 의한 PCR 산물이 목적 band와 경합하여 band의 진하기 정도에 차이가 나며 결과적으로 혼란을 초래 한다는 문제점을 제기하였다. 그러나 동일 제품을 사용한 다른 소비자는 다른 견해를 보였는데, 이와 같은 결과는 제조사가 다른 RNA purification kit를 사용하여 주형 RNA 추출하였으며 internal control에 대한 문제점은 없었다. 따라서 제품 제조에 사용하는 RT-PCR premix의 조성에 따른 차이에 기인할 가능성이 존재하는 것으로 판단되었다.

1차 시제품에서 나타난 문제점 가운데 검정용 primer의 특이성과 RT-PCR premix의 조성에 따른 차이를 추가로 조사하고자 internal control용 primer 조합을 빼고 국내에서 보고된 CMV 검정용 primer 조합(Kim 등 2000)을 이용하여 시제품을 다시 제작하였다. 동결건조 제품은 premix 종류에 따른 차이는 크지 않았으나 고농도 주형에서는 비 특이 산물이 약하게 증폭되어 검정용 primer의 특이성은 낮았다(그림 31).

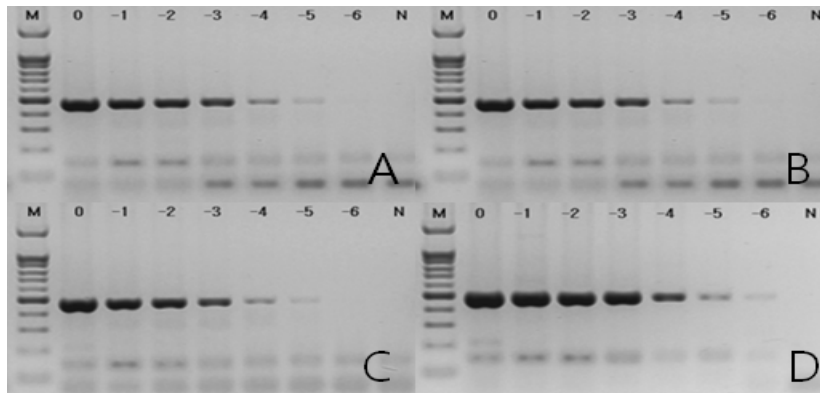


그림 31. 동결건조 RT-PCR premix별 CMV 진단 primer 증폭양상 비교. A~D: 각각 chemical inhibition 방식인 mix 1과 2, hot start 방식 mix 3과 4. M: 100bp ladder, 0: CMV에 감염된 토마토 잎 100mg에서 뽑은 total RNA 원액 1 μ l를 주형으로 사용. 1~6: 원액을 5배씩 연속적으로 희석한 용액 1 μ l를 주형으로 사용. N: 건전 토마토 잎 100mg에서 뽑은 total RNA 원액 1 μ l를 주형으로 사용.

② 1차 시제품 활용 자료 분석을 통한 2차 시제품생산

주관 연구과제에서 선발한 특이 primer 및 반응 조건과 1차 시제품 제작시 파악한 몇 가지 문제점을 고려해 ToCV 및 TyLCV를 대상으로 2차 시제품을 제작하였다(그림 32). 성능 검정 결과에 따르면 액상 premix와 primer를 따로 사용할 때 보다 작업 속도 빨라졌으며, 여러 가지 primer 사용에서 오는 오염 문제에 자유로울 수 있어 진단 효율이 높아졌으며 추가로 바이러스 검출 감도를 조금 더 높일 수 있다면 좋겠다는 의견이 있었다.

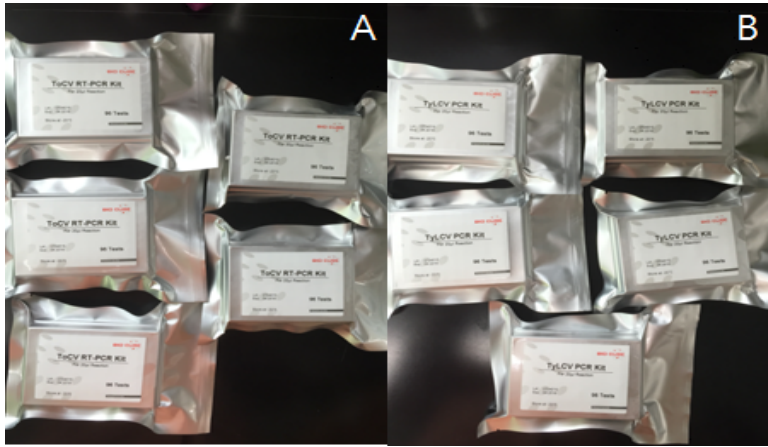


그림 32.
ToCV(A) 및
TyLCV(B)
검정용 동결건조
제품.

③ 우수 조합 선발 후 동결건조형 3차 시제품 생산 및 현장 적용성 검토

현재 국내 농업현장에서 큰 피해가 발생되지 않아 진단키트 개발의 효용성이 낮은 ToMV와 TBSV를 제외한 피해가 큰 토마토 감염 바이러스 5종에 대해 동결건조형 PCR/RT-PCR 진단 kit 3차 시제품과 사용설명서를 제작하였다. 시제품은 바이러스별 최적 검정 조건에 따라 kit당 48점 검정분량 제작하였고(그림 33), Bioube를 손쉽게 사용할 수 있도록 새로운 형태의 제품(BCS folder)을 개발하여 100점 씩 11개 기관에 분양 완료 하였다(그림 34).

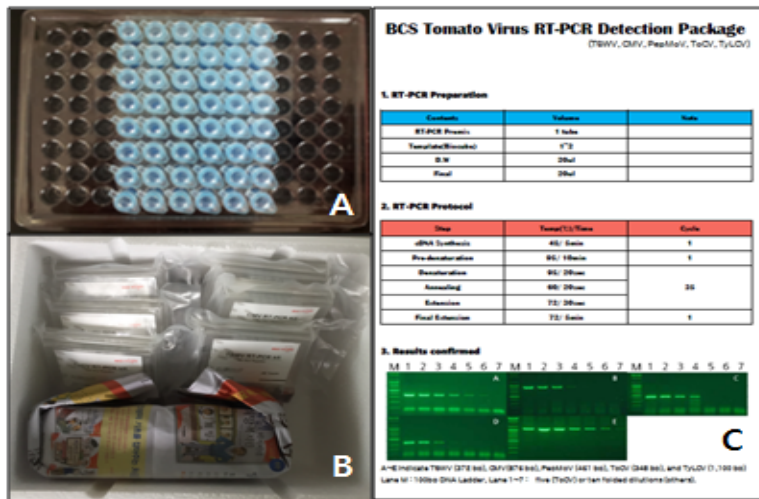


그림 33. 동결 건조형 3차
시제품 내용물(A)과
외관(B) 및 사용 설명서(C).

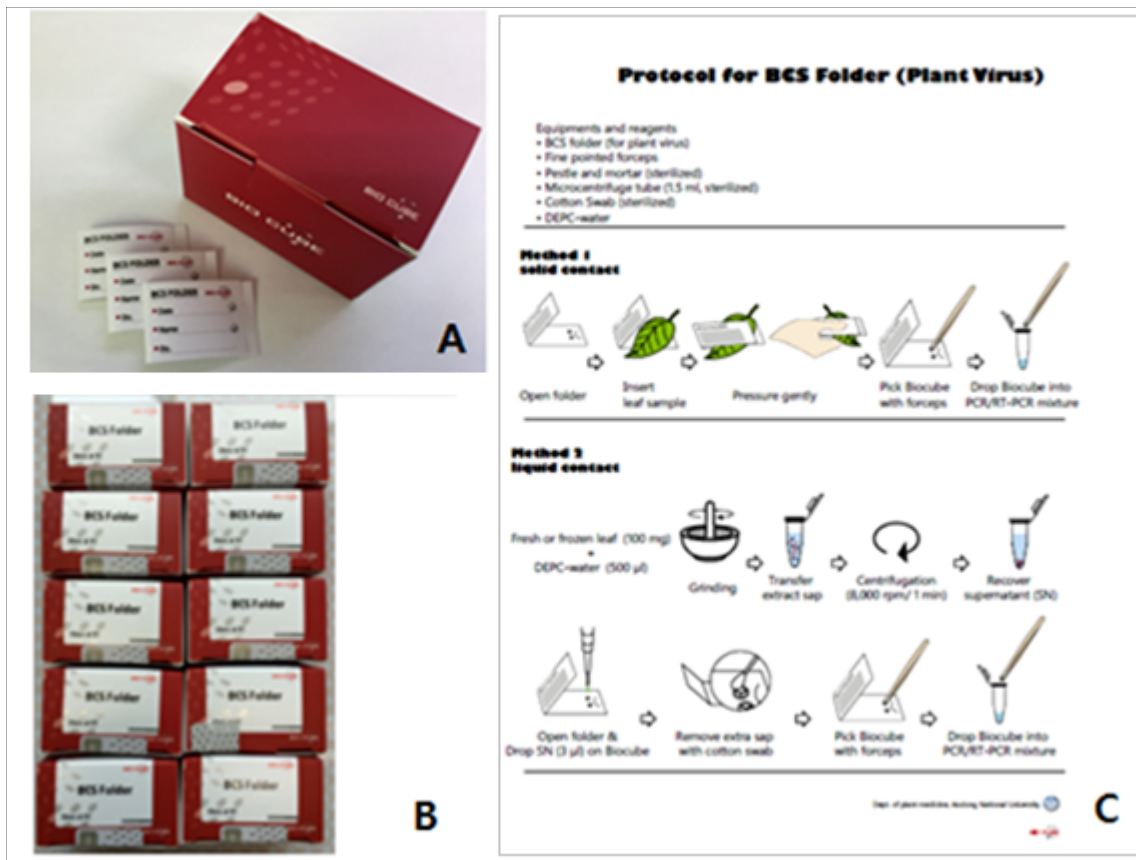


그림 34. BCS folder 시제품(A)과 분양 제품(B) 및 사용 설명서(C).

안동대학교에서 개최한 workshop에서 BCS folder에 대해 참석자의 일부는 “BCS folder에 장착된 Biocube의 색깔이 흰색이기 때문에 sampling이 제대로 되었는지 확인하기 힘들다”라는 코멘트가 있었기 때문에 sampling 여부를 쉽게 확인할 수 있도록 개선하였다. 푸른색 Biocube 시제품은 sampling이 제대로 되면 진한 청색으로 변하기 때문에 눈이 어둡거나 가까이 볼 수 없는 사람들도 잘 이용할 수 있도록 신규로 제작하였다(그림 35).

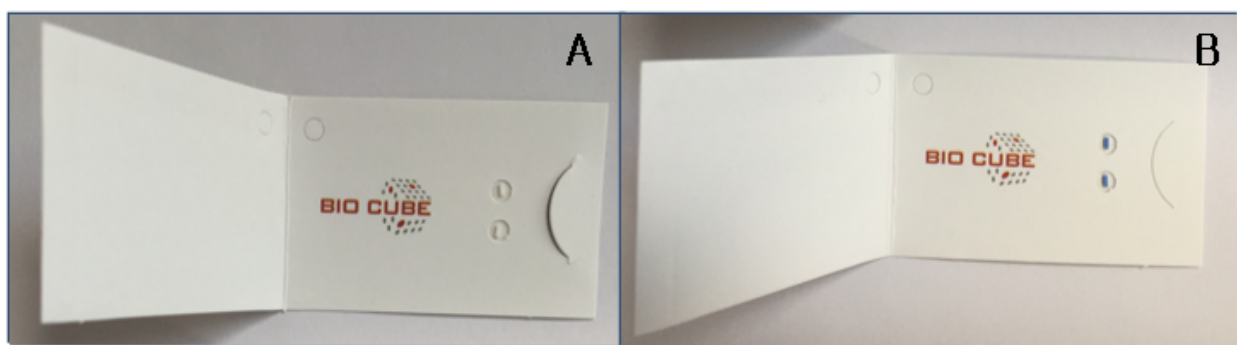


그림 35. 흰색 Biocube의 BCS folder 제품(A)을 푸른색 Biocube의 BCS folder로 개선한 제품(B).

바이오큐브가 흡수하여 유전자 진단에 사용하는 주형의 종류는 핵산인지 또는 바이러스 입자인지를 확인하기 위하여 바이오큐브에 ToMV와 TBSV 감염 앞에서 주형을 흡수한 다음 바이오큐브를 단백질 분해효소(proteinase K)와 핵산 분해효소(RNase)를 각각 처리하고 바이러스 특이 유전자를 증폭한 다음 전기영동하였으나, 핵산을 처리한 바이오큐브는 특이 유전자가 증폭되지 않았다(그림 36-1). 따라서 단백질 분해효소를 처리한 바이러스의 경우에는 정상적으로 유전자가 증폭되어 아마도 바이오큐브는 감염 식물체의 핵산을 흡수하는 것으로 판단된다.

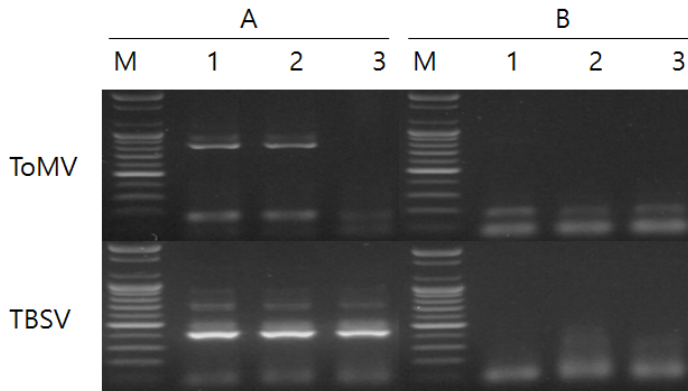


그림 36-1. 바이오큐브에 ToMV와 TBSV 감염 앞에서 주형을 흡수한 다음 단백질과 핵산 분해 효소를 처리하고, 특이유전자 증폭 여부 비교.

A: Proteinase K 처리, B: RNase 처리
1~3: 0, 20 and 40 mins.

④ 기술 이전을 통한 one step PCR/RT-PCR 패키지 제품 개발 및 사업화

one step PCR/RT-PCR 진단 kit는 현재 국내에서 거의 발생이 되지 않아 수요가 적은 ToMV와 TBSV를 제외한 나머지 바이러스인 ToCV, PepMoV, TSWV, CMV, TyLCV에 대해 개발하였으며 또한 사업화를 완료하였다.

BCS folder는 독자적으로 사업화가 가능한 제품으로 흰색 Biocube가 장착된 BCS folder는 이미 사업화를 진행하여 소정을 매출을 기록하였고, sampling 유무를 보다 손쉽게 알 수 있도록 푸른색 Biocube가 장착된 BCS folder는 품질 test 후 2016년 10월에 사업화하였다.

(자) 기술 이전을 위한 워크숍 개최 및 바이오큐브 진단키트 분양

○ 바이오큐브 진단키트 분양 : 총 3,168 키트

토마토 바이러스 진단용 2,640 키트 (5종 x 48test x 11기관),

BCS folder 2,200 tests (200 x 11기관)

벼줄무늬잎마름바이러스 528키트 (48test x 11기관)

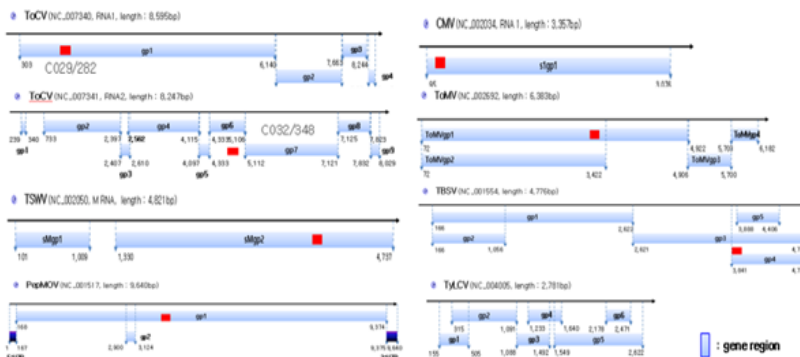
(가) 토마토 바이러스에 대한 multiplex PCR/RT-PCR 검정 조건 확립

바이러스 특이 primer 조합을 이용한 다중 PCR 조건 최적화를 위하여 1차년에 선발 바이러스 특이 primer 조합(그림 36)을 이용하여 다중 RT-PCR premix 제작에 적합한 조건 실험을 하였다.

대상 바이러스의 주형이 혼합된 시료에서 각각의 선발 primer 조합이 어떤 증폭 양상을 보이는지 비교하고자, BCS Plant RNA Prep kit와 Bioneer Genomic DNA purification kit를 이용하여 각각의 바이러스가 감염된 토마토, 담배, 고추 시료로부터 total RNA와 DNA를 분리하였다. 이들을 동량으로 혼합한 다음, 멸균수로 10배씩 희석하고, 이들을 주형으로 사용하였다. PT-PCR 반응조성은 주형 1 μ l, 각각의 primer 0.5 μ l(10pmol/ μ l), 멸균수 8 μ l, BCS one step RT-PCR premixture 10 μ l로 하였고, cDNA 합성은 온도는 44 $^{\circ}$ C에서 5min간 수행하였다. DNA 증폭은 48 $^{\circ}$ C 5분, 95 $^{\circ}$ C 10분, 35회(95 $^{\circ}$ C 20초, 60 $^{\circ}$ C 20초, 72 $^{\circ}$ C 45초) 조건에서 수행하였다. 증폭산물은 GelGreen (Biocubesystem, Korea)을 함유한 1% agarose에 well당 증폭액 6 μ l를 첨가하고 100V 5A 조건에서 30~60분간 전기영동한 다음 Gel-documentation system GDS200D (iNtRON, Korea)에서 촬영하였다. ToMV와 TBSV 검정용 primer 조합에서는 단일 주형에서 볼 수 없었던 비특이 밴드가 일부 발생하였다. ToMV의 경우 희석액 보다는 원액에서 비특이 밴드가 없었는데, 이는 비특이 증폭산물과 목적 산물간에 발생하는 primer경합에 원인이 있을 것으로 추정되며, TBSV의 비특이 증폭 산물의 실험 조건 조절을 통해 통제가 가능한 것으로 판단되었다(그림 37). 기타 나머지 바이러스의 경우 단일 주형을 사용했을 경우와 동일한 결과를 보여 주형 혼합은 선발 primer의 특이성에 크게 영향을 주지 않을 것으로 판단되었다.

Virus	Primer combination	product size	starting point	primer on	primer name
ToCV	C029	1652	282	RNA1	P057-058
ToCV	C032	348	4679	RNA2	P063-064
TSWV	C074	673	3302	M	P147-148
PepMoV	C048	461	3605	Gp1	P095-096
CMV	C070	876	113	RNA1	P139-140
ToMV	C065	824	3128	Gp1	P129-130
TBSV	AF2C	401	3980	Gp3	P007-008
TyLCV	C028	1,100	1540	Gp4	P055-056

그림 36. 1차년에 선발 바이러스 특이 primer 조합.



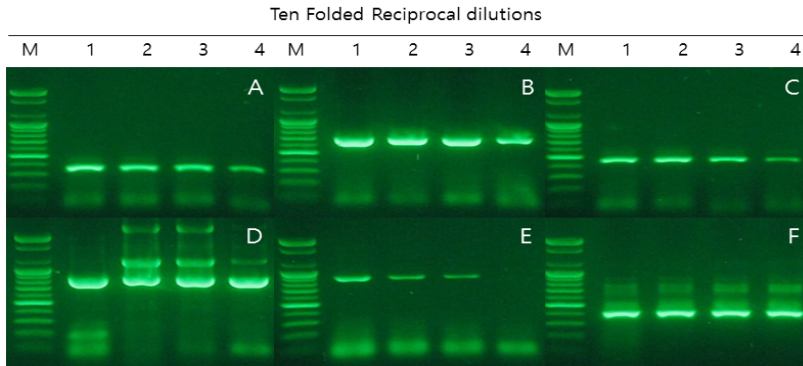


그림 37. 주형 혼합액에서의 선발 primer 조합의 증폭 양상 비교.

A, B, C, D, E, and F indicate ToCV, TSWV, PepMoV, CMV, ToMV, and TBSV, respectively.

Multiplex PCR/RT-PCR에 적합한 primer 농도를 결정하기 위해 주형 및 농도에 따른 바이러스 검출 감도를 비교하였다. 예상했던 것처럼 검출 감도가 일정 수준이상 유지되기 위해서는 주형의 농도가 낮을 경우에는 높은 농도의 primer가, 높을 경우에는 낮은 농도의 primer가 필요하였다.

바이러스의 농도는 감염된 시료에 따라 다를 수 있기 때문에 주형의 희석한계는 시료에 따라 다를 수 있다. 그러나 본 실험에 사용한 시료에서는 CMV를 제외한 나머지 시료의 경우 바이러스가 검출을 위한 시료의 최대 희석한계는 3,125배였다. CMV의 경우 주형의 희석한계는 625배였으며, 이때 검출 가능한 primer 농도는 5pmol/μl 인 것으로 나타났다(그림 38). 다른 바이러스 처리구의 경우, 검출가능한 주형의 희석한계는 CMV에 비해 다소 높지만, primer 농도는 5pmol/μl primer 이상일 때 결과를 명확하게 판독할 수 있었다. 따라서 Multiplex PCR/RT-PCR에 적합한 primer 농도는 20~5pmol/μl 범위일 것으로 판단되었다.

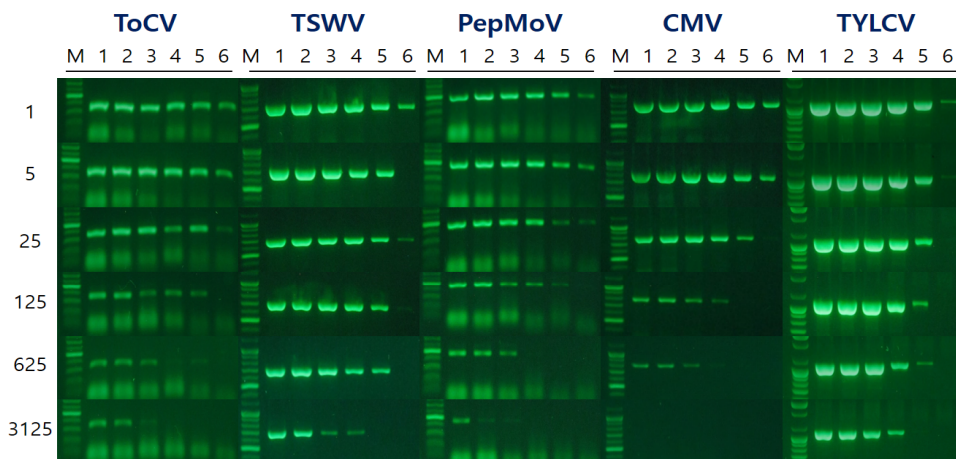


그림 38. 프라이머 첨가 농도에 따라 검출 감도 비교

M: 100bp ladder. Each primer was added at the concentration of 20 (1), 10 (2), 5 (3), 2.5 (4), 1.25 (5), 0.625 (6) pmol/μl. The number of the left side indicates original RNA (1) and 5 folded serial dilutions of RNA from the leaf samples infected with corresponding virus.

Multiplex PCR/RT-PCR 진단에 적합한 바이러스 조합을 선발하고자, 1차년에 선발한 primer 조합간 간섭효과 유무를 확인하였다. primer 농도는 20pmol/μl로 하고, 나머지 조건의 앞의 실험과 동일한 방식으로 수행하였다.

CMV-C070 primer는 ToCV, TSWV, PepMoV와는 경합이 없이 정상적으로 목적 산물을 증폭하였으나, 나머지 바이러스와는 경합을 비특이 산물이 생성되거나, 목적 산물이 전혀 증폭되지 않는 경향을 보였다. 때문에 C070 대신 1차년 monoplex RT-PCR에서 양호한 결과를 보인 CMV-C069를 이용하여 다른 바이러스 primer와 경합 정도를 조사하였다. 그 결과 ToMV를 제외한 나머지 바이러스 primer와는 경합을 하지 않았으며, 정상적인 증폭산물을 생성하였다(그림 39).

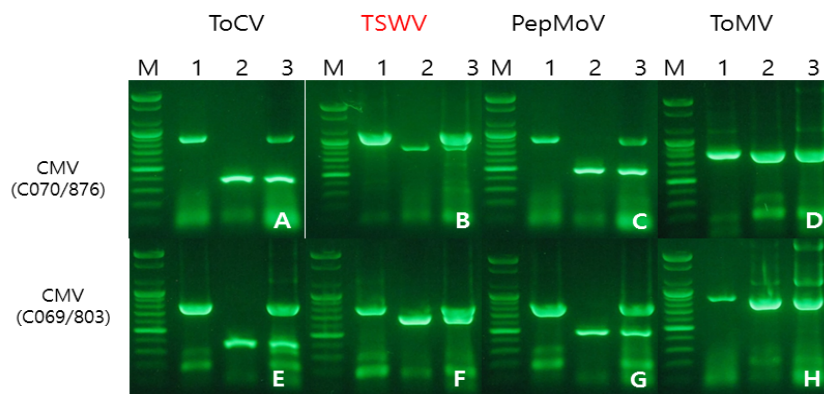


그림 39. Duplex RT-PCR 양상.

다중 진단용으로 개발된 바이러스 검정조건과 가능 조합을 이용하여 kit 제작에 필요한 바이러스 primer 비율을 최적화하였다. 전라남도 토마토 시설재배온실에서 문제가 되었던 TYLCV와 ToMV, PepMoV를 동시 다중 진단할 수 있도록, duplex PCR/RT-PCR을 위한 조합별 primer 최적 농도를 조사하였다. TYLCV의 경우, 각 바이러스에 감염된 시료와 TyLCV 감염 시료 각각에서 추출한 전체 RNA와 DNA를 혼합하고, 멸균수로 5배씩(5⁴ 까지) 희석한 다음 이들 주형으로 사용하였다.

Duplex PCR 반응조성은 BCS one step RT-PCR premixture 30μl, 주형 1μl, 각각의 primer 1.5~3μl (10pmol/μl) 첨가하고 멸균수를 이용하여 반응액의 양이 60μl가 되게 하였다. cDNA 합성은 온도는 44℃에서 5min간 수행하였으며, DNA 증폭은 48℃ 5분, 95℃ 10분, 35회(95℃ 20초, 60℃ 20초, 72℃ 45초) 조건에서 수행하였다. TYLCV-C028을 1로 하였을 때, ToCV는 1:1, TSWV는 1:2~1:3, 0.5~0.33, PepMoV-C048는 1:0.5, CMV는 1:1, ToMV는 1:2, 1:3, 2:1, TBSV는 2:1의 비율이 적합한 것을 나타냈다(그림 40).

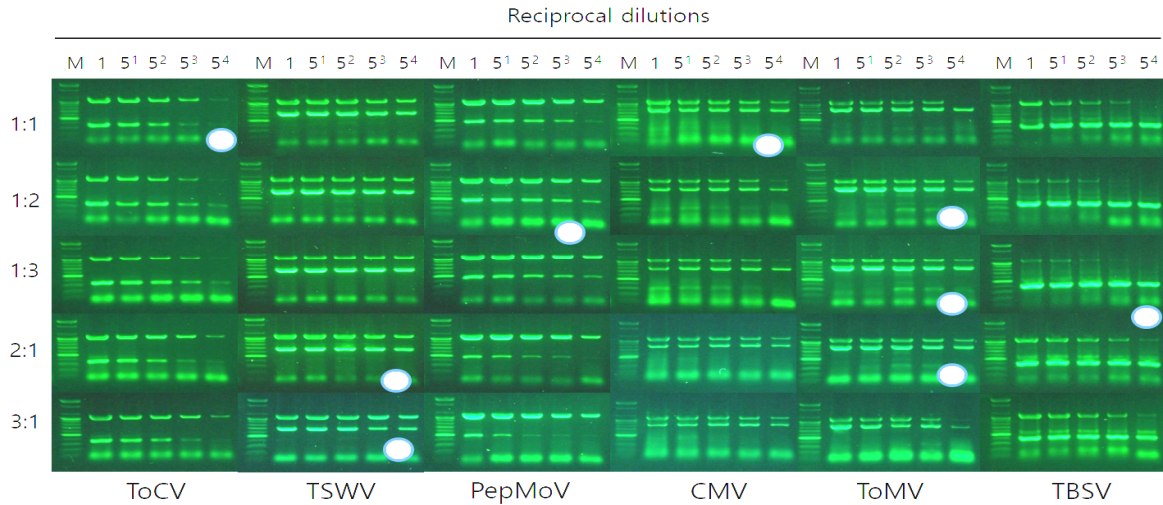


그림 40. TYLCV와 동시 진단 duplex PCR에 적합한 primer 최적 비율.

PepMoV/TBSV와 TBSV/ToCV primer 조합에서는 primer 비율에 상관없이 TBSV 특이 band만 증폭되어 이 조합은 kit 제작에 부적합한 것으로 판명되었다(그림 41).

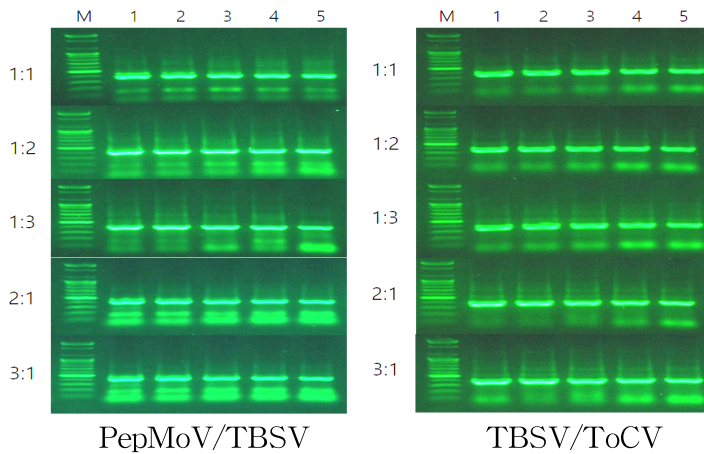


그림 41. TBSV, PepMoV, ToCV primer 간 간섭.

(나) 바이오큐브용 multiplex PCR /RT-PCR one step premix 제작 및 시제품 생산

1차 시제품으로 TYLCV 동시 진단용 kit 제작은 ToCV는 1:1, TSWV는 1:2, PepMoV-C048는 1:0.5, CMV는 1:1, ToMV는 1:2, TBSV는 2:1로 하여 제작하였다. PepMoV 과 ToMV의 경우, TSWV/PepMoV, ToMV/PepMoV, ToMV/TBSV, ToMV/ToCV 동시진단에 적합한 primer 비율은 각각 1:2~1:3, 1:2와 1:3, 2:1과 3:1, 1:2와 1:3이 양호한 결과를 보였고(그림 42), 시제품 제작은 각각의 비율을 1:2, 1:2, 2:1, 1:2로 하여 액상형 시제품을 제작하였다.

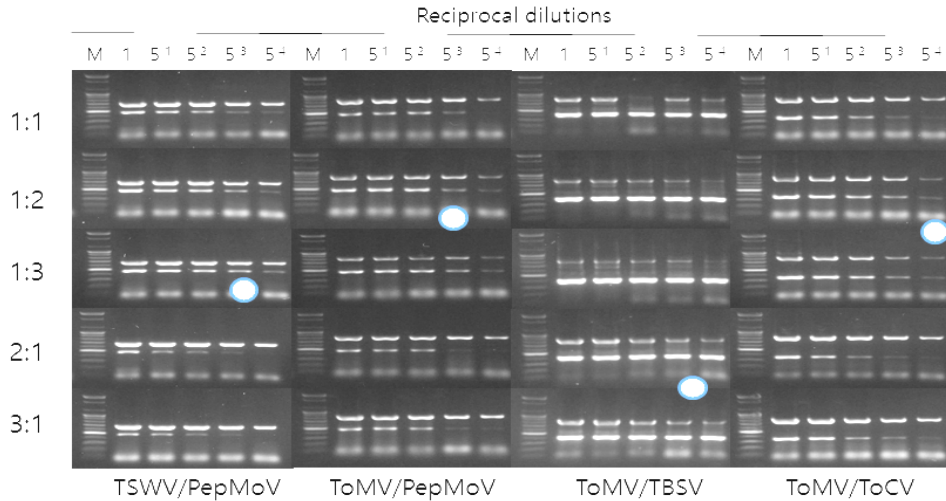


그림 42. Duplex RT-PCR에 적합한 primer 최적 비율.

Biocube 진단키트의 성능을 조사한 결과, 시료에 따라 증폭산물의 정도에 차이가 나타나는 제품이 있었고, 경우에 따라 특이 산물 이외에 약간의 비특이 증폭산물이 생성되는 경우도 발생하였다(자료 미제출). OEM 업체와의 협의에서 가장 문제가 되었던 부분은 초기 제작 수량과 반응액의 양이었는데, 동결건조 제품의 원가 절감과 품질 유지를 위해선 반응액이 튜브 당 최대 30 μ l가 넘지 않도록 하는 게 중요한 것으로 판명되었다. primer 비율 검정시 사용한 동일 RNA를 이용하여 제작한 kit의 바이러스 검출 한계를 조사한 결과, kit 제작전과 큰 차이가 없는 것으로 확인되었다(그림 43).

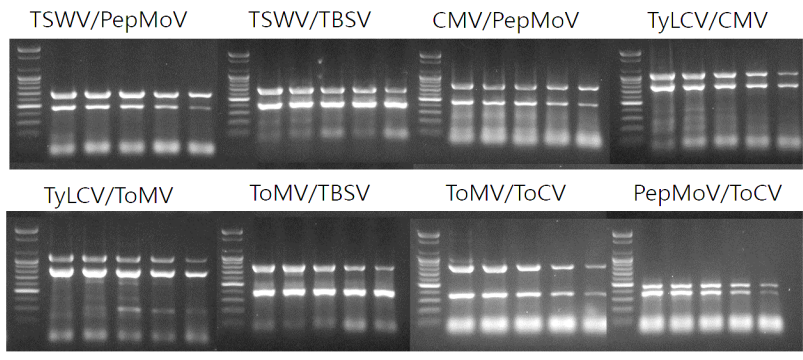


그림 43. 1차 시제품을 이용한 Duplex RT-PCR 결과

이상과 같이 duplex PCR/RT-PCR이 불가능한 조합은 TBSV/ToCV, TBSV/PepMoV, TOMV/CMV 조합이었고, 가능한 조합은 TSWV/ToCV를 포함한 20 조합이었다. 이들 가운데 CMV-C70 조합은 CMV-069와 증폭산물 크기의 중복으로 인해 kit 제작에서 제외하였다. duplex PCR/RT-PCR이 가능한 조합은 서로 간에 약간의 경합이 존재하였고, 이들의 최적 혼합 비율은 1: 0.3~3.0 까지 다양하게 나타났다(표 5).

표 5. 토마토 바이러스 다중 유전자 진단을 위한 일차와 이차 프라이머의 최적 비율

The first primers	ToCV- C032-348	TSWV- C074-673	PepMoV- C048-461	CMV- C069-803	CMV- C070-876	ToMV- C065-824
TSWV-C074-673 ^a	2					
PepMoV-C048-461	0.5	0.3				
CMV-C069-803	1	0.5	2			
CMV-C070-876	0.5	-	1	-		
ToMV-C065-824	3	0.5	2	ToMV	ToMV	
TBSV-AF2C-401	TBSV	3	TBSV	3	3	3
TyLCV-C028-1100	1	0.5	2	0.3, 1	-	0.5, 2, 3

토마토 바이러스의 다중 유전자 진단은 바이러스 특이 프라이머 간의 간섭효과를 제어할 수 있는 각 바이러스 조합별 적정 희석 비율이 매우 중요한 것을 알 수 있으며 이 결과를 바탕으로 하여 상용 진단키트를 제작하였다(그림 44).



그림 44. 2차 시제품 사용설명서(A) 및 duplex RT-PCR Kit 대표그림(B).

(다) 토마토 바이러스 multiplex 진단용 동결 건조 시제품의 현장 적용성 검토

2차 시제품을 농우바이오 병리실과 고추와 육종 병리 담당자와 협의하여 필요한 kit를 우

선적으로 분양하였다. 분양된 제품을 사용하여 진단한 결과를 보면 CMV+PepMoV, TSWV+TBSV, PepMoV+ToCV, ToMV+ToCV 다중 진단키트가 정상적으로 잘 작동하고 있음을 확인하였다(그림 45).

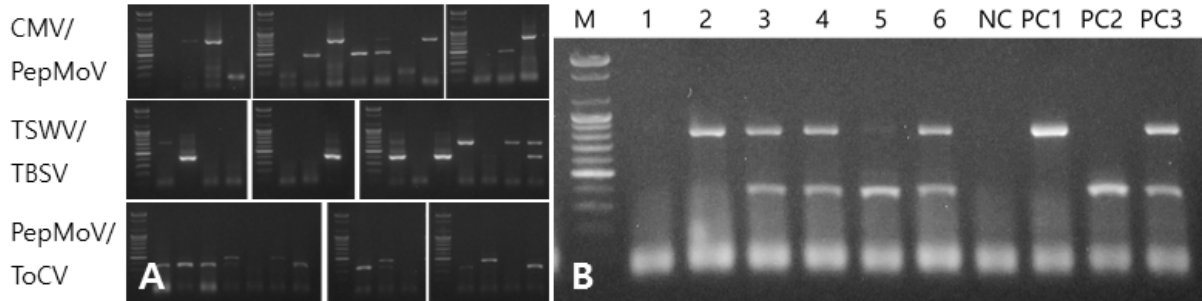


그림 45. Duplex RT-PCR kit 활용 예. A: 농우바이오 병리실험실, B:(주)고추와 육종(ToMV+ToCV용 kit), M:1Kb DNA ladder, 1~6은 검사한 시료 번호, NC: 건전시료, PC1과 PC2는 ToMV와 ToCV 각각에 감염된 시료, PC3: 두 종 바이러스 복합감염.

농업현장의 사용자 의견을 수렴한 결과 제품의 사용시기가 필요에 따라 달라질 수 있기 때문에 제품 구매 후 오랜 기간 보관이 힘들며, 무엇보다 kit의 가격이 비싸기 때문에 가능하면 제품의 검정 수량을 소량으로 포장하거나 다양한 바이러스 진단이 가능하도록 구성하는 것이 효과적이라고 권고하였다. 따라서 실제 제작하는 제품의 소비자의 수요에 맞게 다양한 형태로 제작할 것을 위탁기관에 의뢰하였다.

시제품용 Internal control을 선발하고자 위탁에서는 프라이머 5종을 제작하고, 건전 토마토에서 비 특이 밴드 유무를 확인한 다음 최종적으로 IC2 프라이머 1pmol/μl와 주형으로 pSNU 100배희석 1.5ng/μl를 선발하였다(그림 46). 그러나 제품 제작시 사용자의 요구에 따라 multiplex kit 제작에는 PCR 반응액에 직접 첨가하지 않고, 제품의 기능 소실 여부를 확인 할 수 있도록 따로 제품을 제작 하였다.

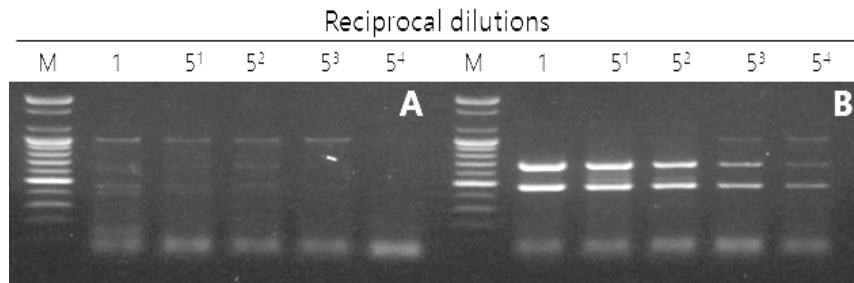


그림 46. internal control이 들어간 TSWV/PepMoV 진단용 duplex RT-PCR kit을 이용한 건전 (A)과 감염(B) 식물체 검정. M:1Kb DNA ladder, 1은 TSWV와 PepMoV 복합 감염일 100mg으로부터 BCS Plant RNA kit로 뽑은 전체 RNA(원액).

Duplex PCR/RT-PCR이 가능한 조합을 기반으로 triplex PCR/RT-PCR 가능 여부를 조사하였다. CMV와 ToMV 조합이 함께 포함된 triplex RT-PCR 조합(CMV/ToMV/TSWV, CMV/ToMV/PepMoV, CMV/ToMV/TBSV)의 경우 CMV 특이 band가 공통적으로 증폭되지 않았고, TYLCV/CMV/TSWV, CMV/TSWV/PepMoV 등을 포함한 8개 조합은 triplex PCR/RT-PCR이 가능하였다(그림 47).

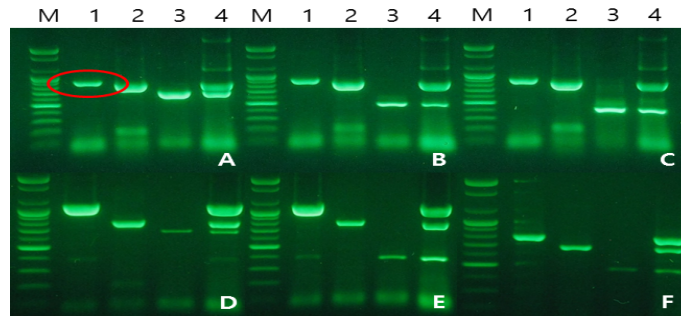


그림 47. Duplex PCR/RT-PCR이 가능한 조합을 기반으로 한 triplex PCR/RT-PCR 결과. triplex PCR/RT-PCR에서 primer간 간섭이 일어나는 조합(A, B, & C)과 간섭이 일어나지 않은 조합(D, E, & F). A: 1~4 (CMV, ToMV, TSWV, & CMV/ToMV/TSWV), B: 1~4(CMV, ToMV, PepMoV, & CMV/ToMV/PepMoV), C: 1~4(CMV, ToMV, TBSV, & CMV/ToMV/TBSV), D: 1~4(TYLCV, CMV, TSWV, & TYLCV/CMV/TSWV), E: 1~4(TYLCV, CMV, TSWV, & TYLCV/CMV/TSWV), F: 1~4(CMV, TSWV, PepMoV, & CMV/TSWV/PepMoV).

또한 Biocube에 흡수되는 물질이 무엇인지 확인하고자, ToMV와 TBSV에 감염된 식물의 잎을 마쇄하고 동일 마쇄액을 여러 개로 나누어 각각에 proteinase K, RNase 시간대별로 처리하였다. 해당 시간을 처리액은 90°C에서 10분간 처리한 후 냉동실에 보관하고, 동일한 방식으로 모든 처리를 마친 다음, Biocube에 찍어 바이러스 검출 여부를 확인하였다. 그 결과 Biocube에 흡수되는 물질은 주로 virus RNA일 것으로 판단되었다(그림 48).

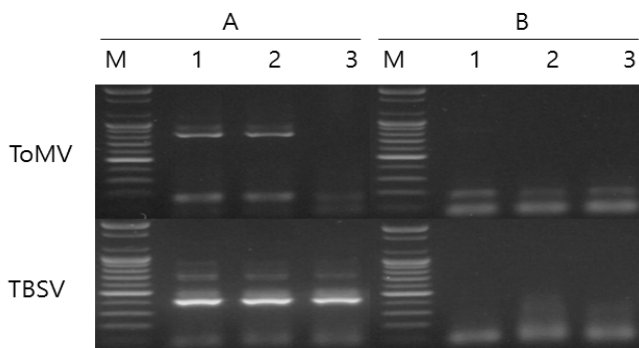


그림 48. Biocube가 주로 흡수하는 물질. A: proteinase K 처리, B: RNase처리, 1~3: 처리시간 0분, 20분, 40분.

Triplex PCR/RT-PCR이 가능하였던 8개 조합을 기반으로 tetraplex RT-PCR이 가능한

조합을 검사하였다. 그 결과 유일하게 TSWV+PepMoV+TBSV+ToCV 조합에서만 간섭이 발생하지 않았다(그림 49).

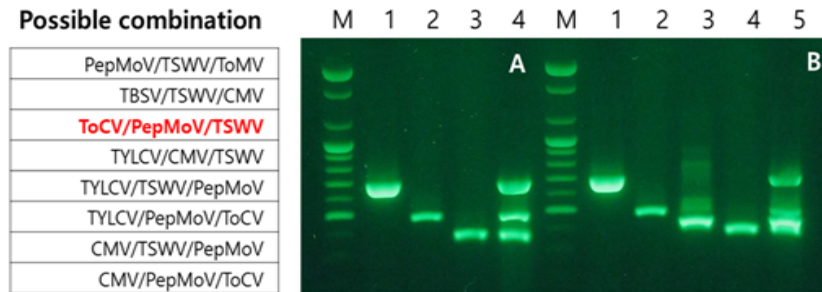


그림 49. TSWV/PepMoV/TBSV/ToCV 진단용 triplex 및 tetraplex RT-PCR.

A: 1~4(TSWV, PepMoV, ToCV, TSWV/PepMoV/ToCV), B: 1~4(TSWV, PepMoV, TBSV, ToCV, TSWV/PepMoV/TBSV/ToCV).

이상의 실험 결과에 기초하여 multiplex PCR/RT-PCR 진단키트 제작을 위해 primer 조합의 최적 첨가 비율을 조사하였으며, 바이러스 검출 감도를 높이기 위해 PCR 증폭 횟수에 따른 비특이 반응 여부도 함께 조사하였다. 국내 시설재배 토마토에서 바이러스 검출 소요가 가장 많은 TYLCV, TSWV, ToCV를 우선적으로 조사한 결과 tetraplex PCR/RT-PCR의 경우 증폭 횟수를 기존 보다 5회 증가시켜도 특이성에 영향을 주지 않았고, 바이러스 검출 감도는 평균적으로 5배 이상 증가되는 것으로 판단되었다(그림 50).

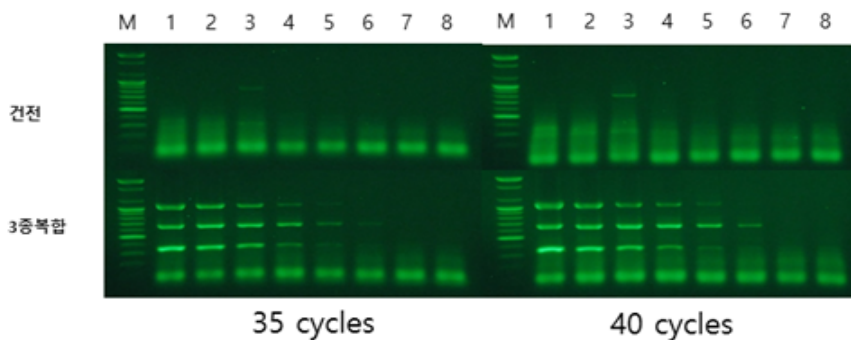


그림 50. TYLCV, TSWV, ToCV 진단을 위한 tetraplex PCR/RT-PCR의 증폭 회수별 검출 감도 비교.

(라) Multiplex one step PCR/RT-PCR 패키지 제품 개발 및 사업화

triplex 진단키트 2종 TSWV+PepMoV+ToCV, TYLCV+TSWV+ToCV, duplex 진단 kit 6종 TYLCV+PepMoV, TYLCV+CMV, TYLCV+TSWV, ToMV+ToCV, TSWV+PepMoV, CMV+PepMoV을 각각 제작하였으며, 제품 판매에 적합하도록 포장용 상자를 제작하고(그림 51), 관련 기관에 분양하였다(그림 52).

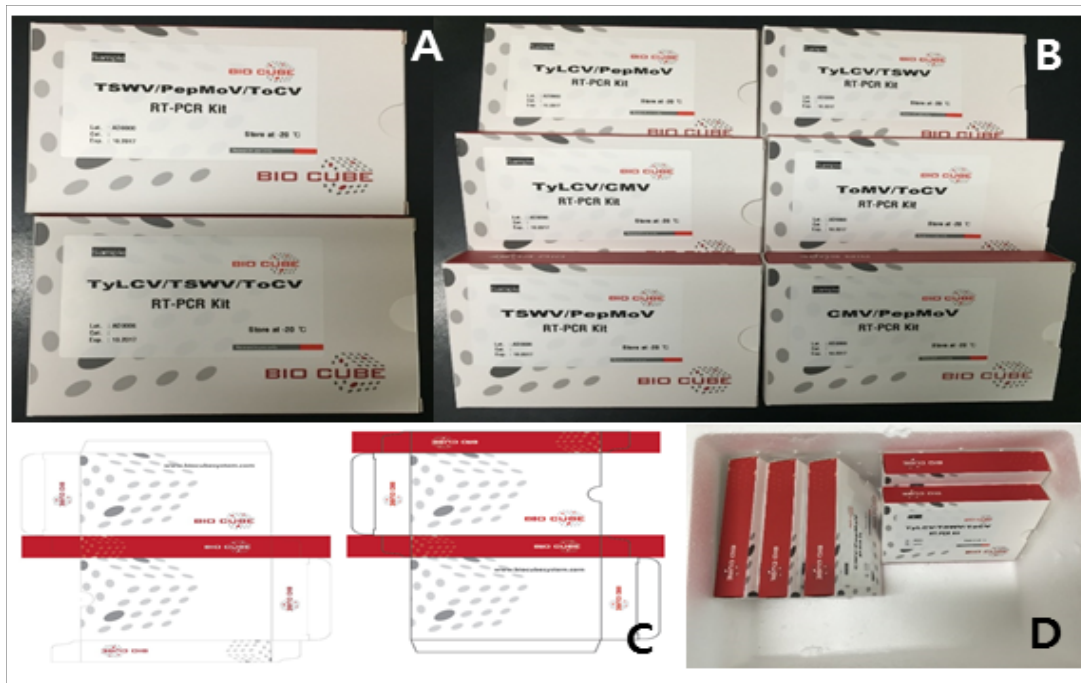


그림 51. Triplex (A) 및 duplex (B) 진단용 PCR/RT-PCR kit와 제품 박스(C) 및 제품 포장(D).

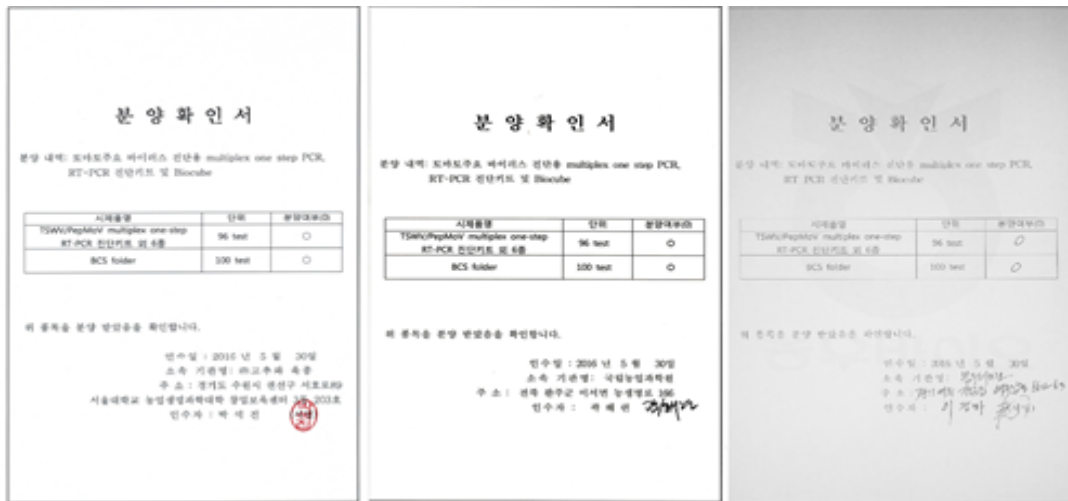


그림 52. 토마토 바이러스 진단용 Multiplex PCR/RT-PCR kit 분양확인서.

1차년에 분양한 진단 kit 가운데 사용 결과의 피드백은 농과원 식물바이러스 실의 경우 CMV는 다른 제조사에서 사용한 kit 보다 성능이 뛰어나거나 유사한 결과를 보였고, PepMoV는 분양한 kit의 검출 감도가 약했으며, TSWV와 ToCV는 검출 감도가 다른 제품에 비해 훨씬 뛰어났다. 반면에 TYLCV 진단키트의 경우 본 제품과 타 제품 간에 부분적으로 결과에 차이가 있었는데, 이는 사용하는 primer의 특성이 다른 것에서 기인한 것으로 판

단되었다. 특히 PepMoV의 검출 결과에서 상당한 차이가 있었는데(그림 53), 이러한 현상이 어디에서 발생하는지를 조사하고자 위탁연구 기관에서는 추가로 정보 분석 없이 임의로 PepMoV 전장유전체 서열로부터 부위 별로 primer를 제작하고, 건전한 식물체에서의 바이러스 band 증폭 양상을 조사하였다(그림 54).

제주도농업기술원의 피드백은 TYLCV 검정을 수행하였으나, 분양한 kit의 편의성을 관독할 수 있는 비교 자료가 없어 kit 성능 향상을 위해 필요한 추가 자료를 얻지는 못하였다. 그러나 분양기관의 담당자에게 kit 사용 여부를 수차례 전화상으로 확인 할 결과, kit의 활용은 담당자의 필요성에 의해 결정될 때가 많고, 관할지역 내에 관련 바이러스가 발생하지 않을 경우에 kit 사용이 현실적으로 매우 어렵다는 답변을 확인하였다. 이와 같은 사용 후기를 감안한다면 kit 제작은 필요에 따라 즉각적으로 이루어져야만 효용성이 높을 것으로 판단되었다.

일반적으로 식물 바이러스의 유전자 진단기술은 기주식물의 유전정보 분석 및 비 특이 반응 생성 여부를 고려하지 않은 primer 조합의 경우 비 특이 증폭산물이 명확하게 증폭되는 경향이 높았고, 본 과제에서 개발한 primer 조합에서는 비 특이 증폭산물이 발생하지 않는 제품의 신뢰성이 높았다. 이러한 결과는 아직까지 판명되지 않은 어떤 원인에 기인한 것으로 생각되며, 정확한 원인을 파악하기 위해서는 추가로 보다 많은 비교실험이 이루어져야 할 것으로 판단되지만 시판 타 제품은 본 과제에서 수행된 일련의 정밀 실험이 수행되지 않고 개발되었기 때문이다.

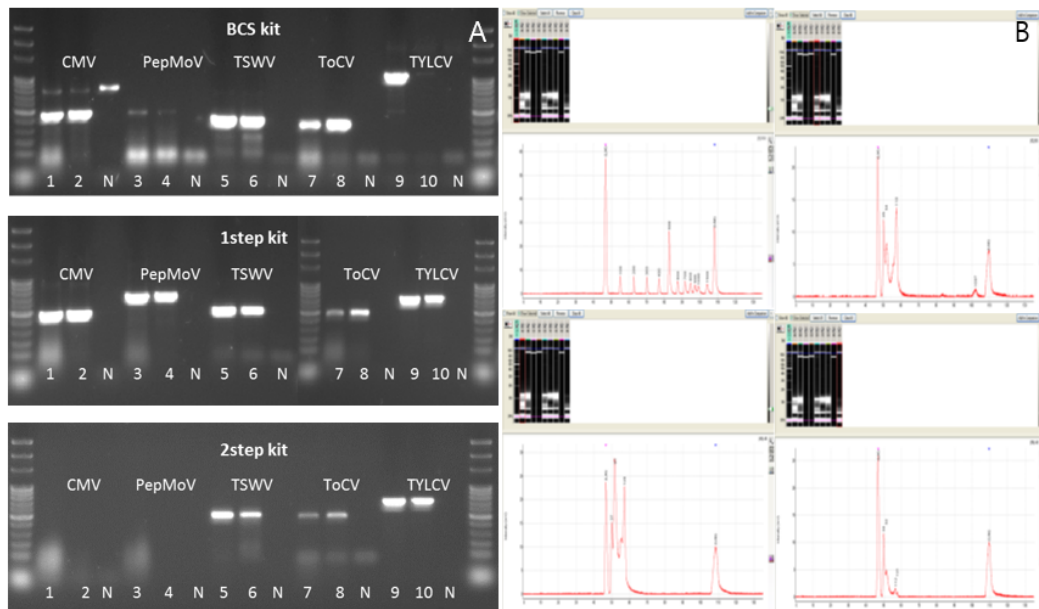


그림 53. 1차년에 분양 kit를 이용한 진단 결과. 농과원(A)과 제주도원(B) 결과, A에서 BCS는 분양한 kit, 1step kit 및 2step kit는 타사 제품.

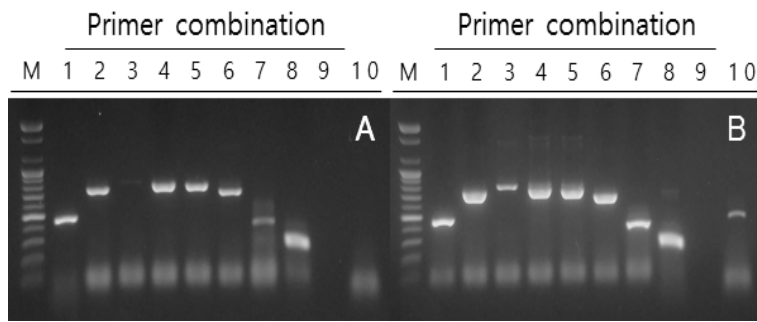


그림 54. PepMoV 유전체 유래 primer 조합의 증폭 양상. 건전 토마토 RNA(A), 감염 토마토 RNA(B). M: 1Kb DNA ladder, 1-8: 미 정보 prime조합. 9: blank, 10:정보 분석 후 본 과제에서 선발한 primer 조합.

(마) 다중(multiplex)검정에 적합한 common primer 설계 및 다중(multiplex)검정 조건 최적화

바이러스 특이 primer를 이용한 multiplex PCR/RT-PCR 다중 진단키트의 경우 시료에 감염된 바이러스의 종류를 확인하는 것에는 매우 유용하다. 복합감염 시료에서 특정 바이러스의 양이 많을 경우 양이 적은 바이러스의 검출 한계가 낮을 수 있다는 것은 일반적인 유전자 진단의 필연적인 문제점이다. 이러한 문제점을 극복하고자 검출 감도가 높은 multiplex PCR/RT-PCR kit를 제작하기 위해 common primer 활용성을 조사하였다.

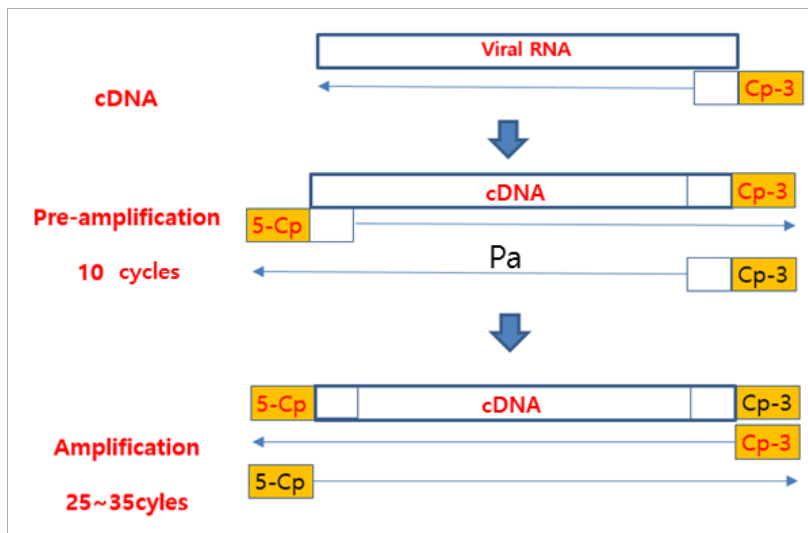


그림 55. Common primer를 이용한 RT-PCR 증폭 개념도.

Common primer를 사용할 경우 RT-PCR 반응액의 양을 최소화할 수 있고, 가격이 상대적으로 저렴한(1/5 수준) PCR 반응을 공통 primer용으로 사용할 수 있어 제품의 가격을 낮출 수 있는 장점이 있다. common primer를 이용한 RT-PCR법은 우선 1차년에 선발한 바이러스 특이 primer의 한쪽 끝에 common primer sequence를 첨가한 hybrid primer를 이용하여 cDNA 합성 및 10회 사전증폭(preamp)을 실시하여, common primer를 이용해 PCR 산물을 증폭하는 절차로 구성되어 있다(그림 55). 먼저 특이성이 높은 common primer를 선발하고자 생물정보기술로 벼에서 발생하는 식물바이러스 유전체 가운데 토마토와 알려진 바이러스 서열과 상동성이 없는 부분을 우선적으로 선발하였다. 선발된 시퀀스 가운데 primer 제작이 가

장 용이하다고 판단되는 Rice dwarf virus의 유전체 서열을 선별하고 이를 기반으로 common primer 후보 21종을 디자인하였다(그림 56).

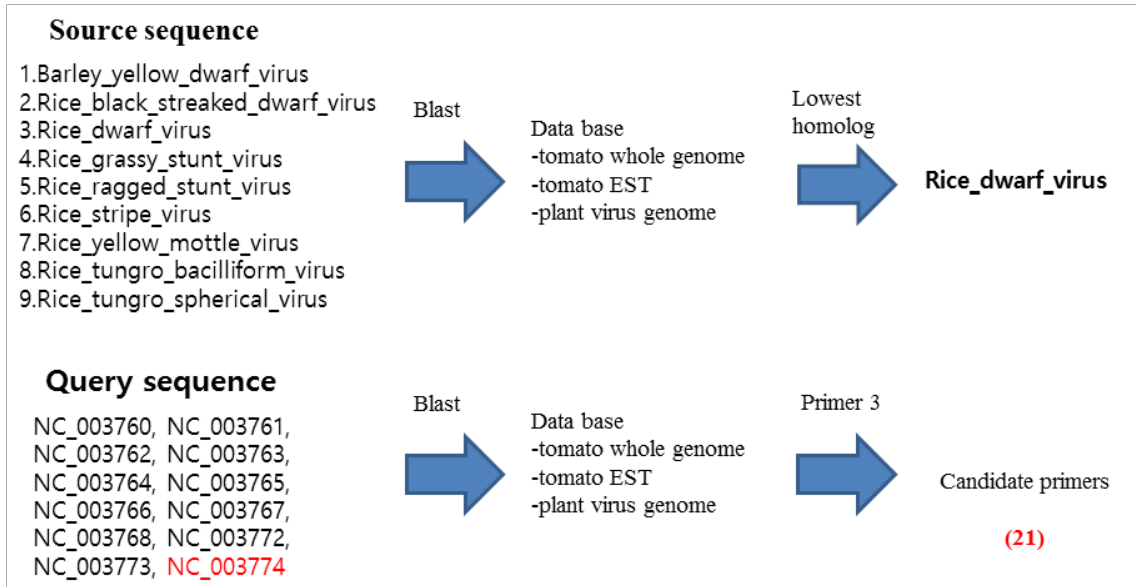


그림 56. common primer 선별 흐름도.

처리한 21종에서 유망한 3종의 특이성을 조사하였는데, 건전한 토마토 1번 시료에서 1개 primer 조합에서 비특이 산물이 증폭되었고, 나머지 primer 2조합을 다른 토마토에 적용했을 때, 둘 다 비특이 산물을 증폭하였다(그림 57).

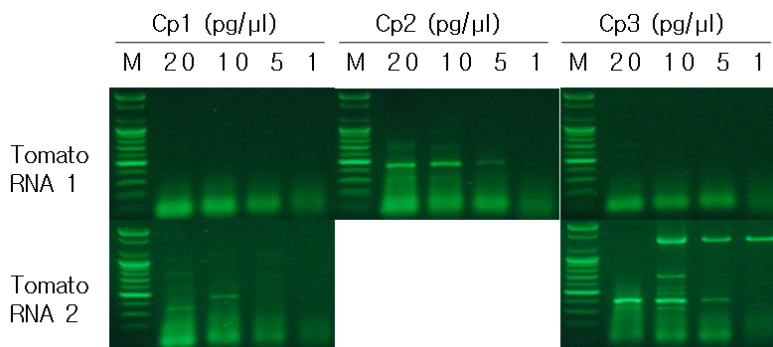


그림 57. 건전한 토마토 RNA에서 common primer 후보 3종의 증폭 양상 비교. Cp는 common primer, M은 1Kb DNA ladder, 그림 상단의 숫자는 primer의 농도임.

비 특이 산물이 증폭되지 않는 primer 조합을 선별하고자 나머지 후보 primer로 그림 57과 동일한 실험을 수행하였다. 그 결과 2개 조합(C114 와 C119)에서 비특이 산물이 증폭되지 않았으며(그림 58), 이들을 52개 토마토 품종의 RNA에 적용했을 때 둘 다 조사한 모든 품종에서 비특이 산물을 생성하지 않았으며(그림 59), C114를 이후의 실험에 사용하였다.

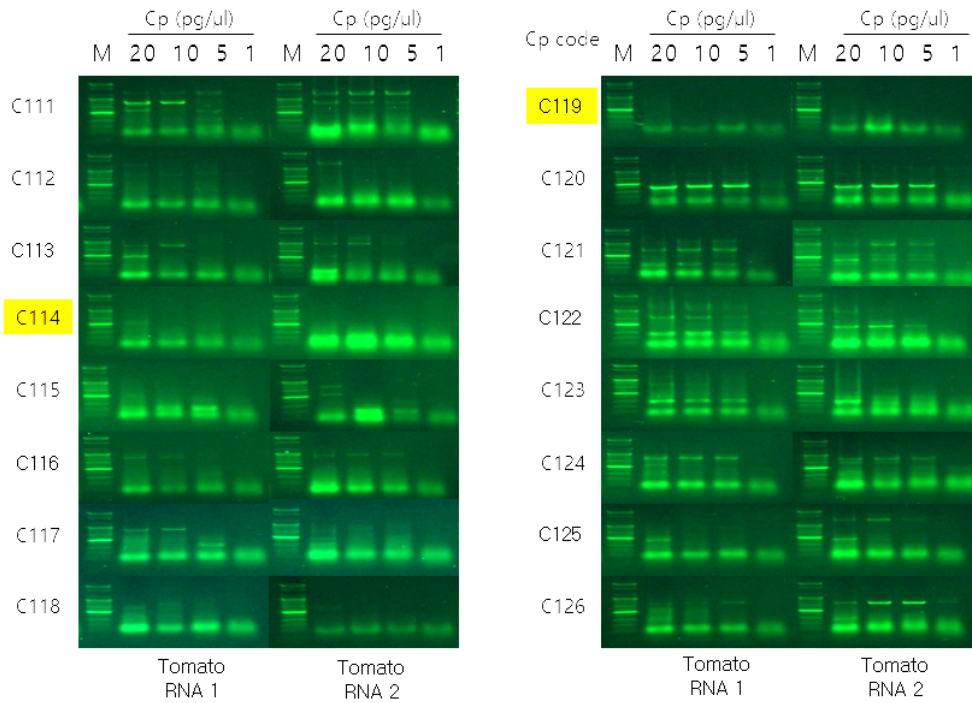


그림 58. 건전한 토마토 RNA 2종에서 common primer 후보 증폭 양상 비교.

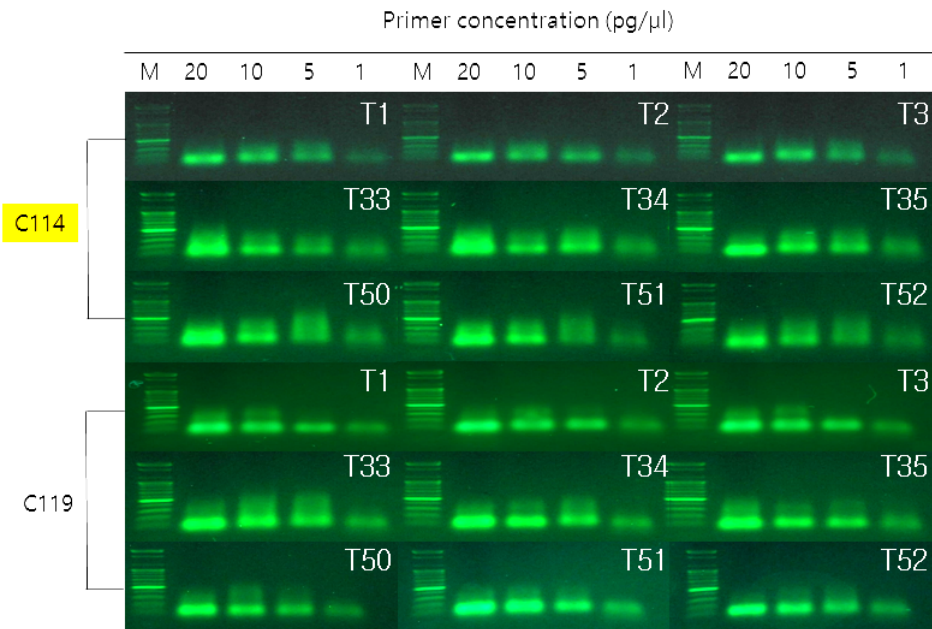


그림 59. 건전한 토마토 RNA 52종에서 common primer 후보 증폭 양상 비교.
T1은 토마토 시료 1번을 의미.

ToMV hybrid primer를 이용해 hybrid primer의 농도와 주형으로 사용할 사전증폭 (preamp) 산물의 농도가 바이러스 검출 감도에 어떤 영향을 주는지 조사하였다. hybrid primer 농도에 따른 증폭 산물의 양은 비슷하였으나 preamp(Pa) 산물의 양은 적게 넣을 때 오히려 더 좋은 결과를 보였다. 이를 보다 세부적으로 조사하기 위해 hybrid primer 농도를

0.5~3pg/μl 범위로, preamp 산물의 양을 5배씩 연속해서 희석하여 주형으로 사용했을 때, 실험에 적합한 hybrid primer 농도를 0.5pg/μl였고, 증폭산물의 첨가농도는 실험 구간 내에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 hybrid primer 농도를 보다 세분화했을 때, 1~0.4pg/μl 범위에서는 바이러스 검출 감도에 영향을 주지 않았다(그림 60).

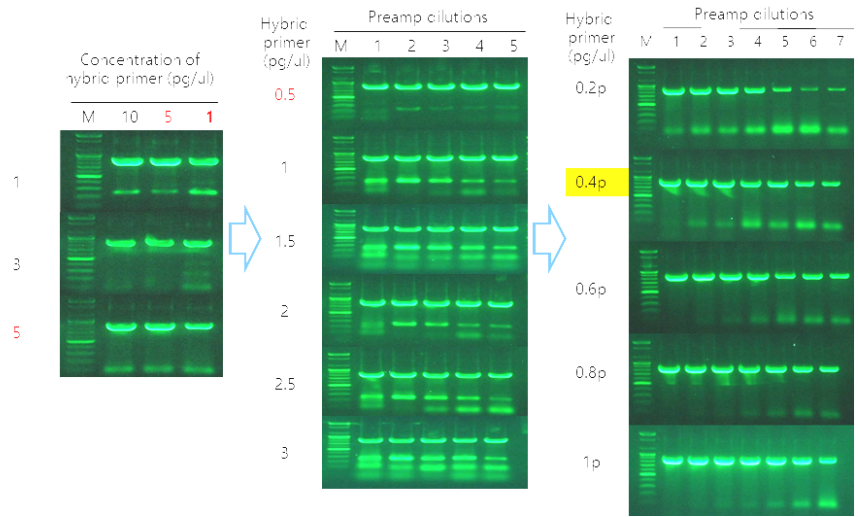


그림 60. hybrid primer의 농도와 주형으로 사용할 사전증폭 산물(preamp, Pa)의 첨가 농도에 따른 ToMV 바이러스 검출 양상 비교. common primer(C108) 1pg/μl.

ToMV 이외에 다른 바이러스에 대해서도 동일한 실험을 수행했을 때, ToCV의 경우 C138 hybrid primer 조합이, TSWV는 C134, PepMoV는 C131과 C139 둘 다가 적합한 것으로 나타났다. hybrid primer 첨가 농도와 Pa양은 대체적으로 1pg/μl과 1μl가 적합한 것으로 판단되었다(그림 61).

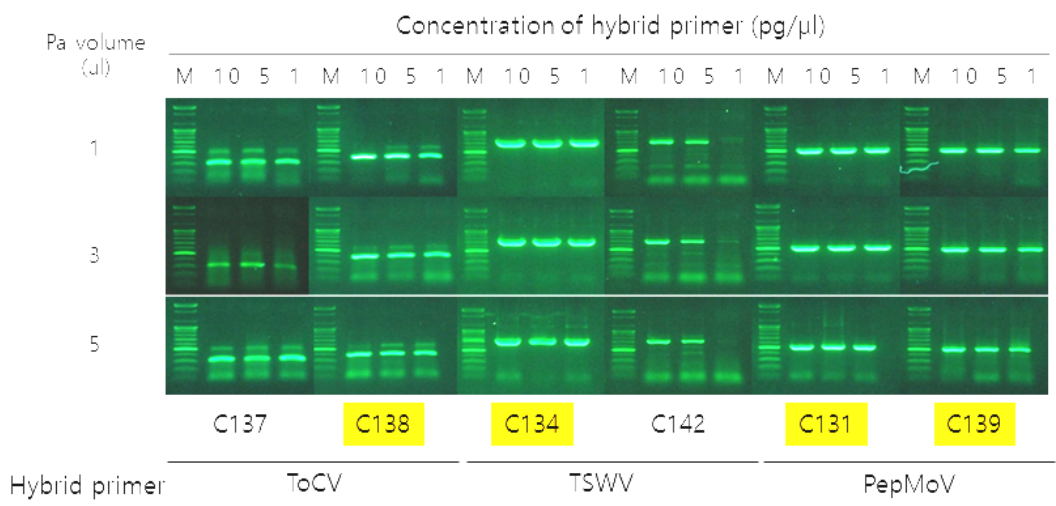


그림 61. ToCV, TSWV, PepMoV 검출을 위한 hybrid primer 조합과 첨가 농도.

hybrid primer와 Pa양은 1pg/20 μ l로 1 μ l로 고정하고, common primer 첨가량에 따른 바이러스별 검출 감도를 조사하였다. 그 결과 각각의 바이러스 검출에 적합한 common primer 농도는 ToMV, TBSV, CMV, ToCV의 경우 5pg/20 μ l 이상, TSWV와 PepMoV는 1pg/20 μ l 이상이 적합한 것으로 나타났다(그림 62).

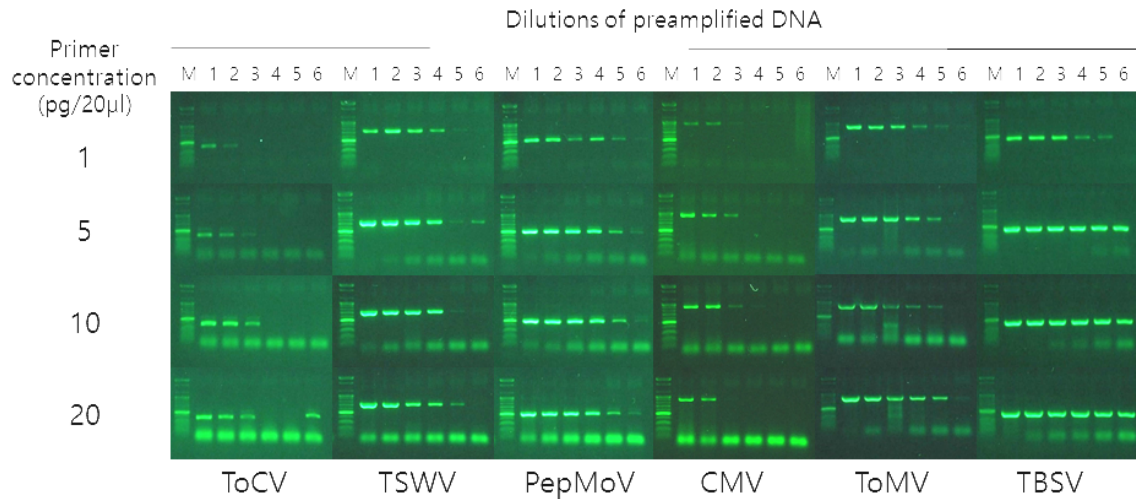


그림 62. common primer 첨가 농도에 따른 바이러스 검출 감도 비교.

M: 1Kb DNA ladder, 1: 사전 증폭 DNA 원액, 2~6: 원액을 5배씩 연속적으로 희석한 용액, 각각의 용액 1 μ l를 주형으로 사용.

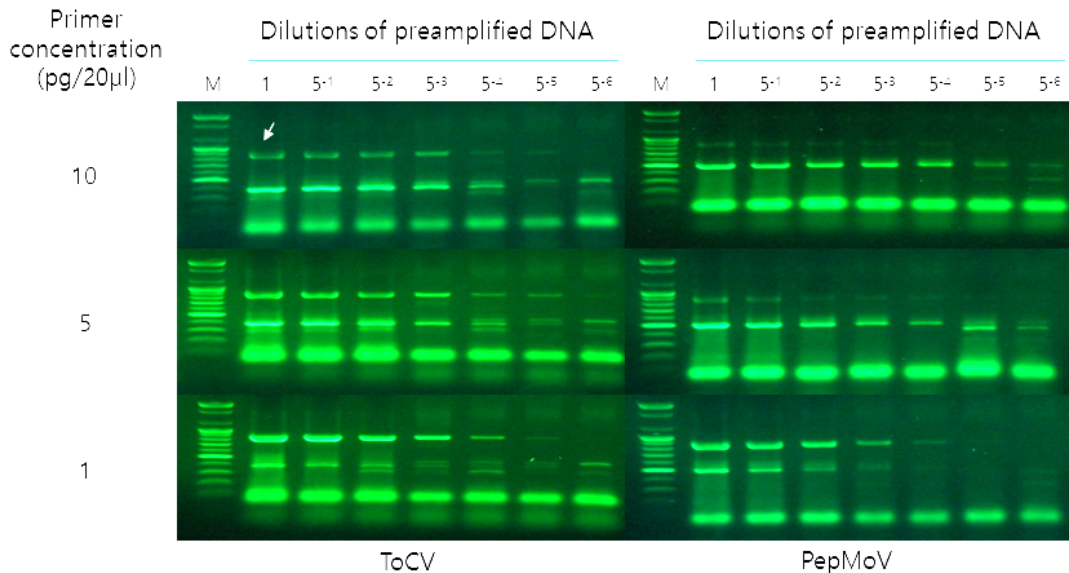


그림 63. 바이러스별 hybrid primer 첨가 비율에 따른 duplex RT-PCR. M: 1Kb DNA ladder, 각각의 용액 1 μ l를 주형으로 사용. ToMV hybrid primer의 농도는 1pg/20 μ l로 고정.

사전 증폭 산물을 증폭하는데 적합한 common primer 농도를 5pg/20 μ l로 고정하고, duplex RT-PCR kit 제작을 위해 바이러스 조합별 hybrid primer의 최적비율을 조사하였다. 예로써 ToMV hybrid primer의 농도를 1pg/20 μ l로 고정하고, ToMV+ToCV와 ToMV+PepMoV 동시 검정에 적합한 ToCV와 PepMoV hybrid primer 첨가 비율을 조사한 결과 ToMV/ToCV는 1:5, ToMV+PepMoV는 1:1이 가장 적합하였다(그림 63). ToMV+ToCV hybrid primer를 1:5로 하여 사전 증폭은 한 다음, 사전 증폭 산물의 첨가량에 따른 바이러스 검출 감도를 조사하였다. 사전 증폭 산물을 1 μ l 첨가했을 때보다 3과 5 μ l 첨가할 때 ToMV/ToCV 특이 PCR 산물이 명확하게 증폭되었으며(그림 64), 진단키트 제작을 위해서는 사전 증폭 산물 첨가량을 3 μ l가 적합하였다.

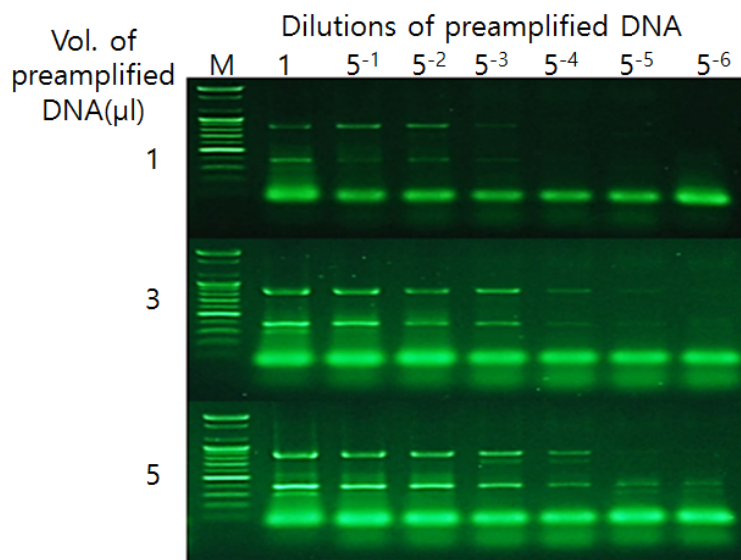


그림 64. 사전증폭 산물의 첨가 농도에 따른 ToMV/ToCV 바이러스 검출 양상 비교. common primer(C108)는 1pg/20 μ l를 사용해 PCR 증폭함.

RNA를 주형으로 사용할 때 PCR/RT-PCR 반응액에는 20 μ l기준 약 8 μ l의 RNA를 첨가할 수 있지만, Biocube 1개에 흡수되는 주형의 양은 약 0.2 μ l 정도이다. 주형첨가량이 적어질 경우 검사하려는 시료에 적은 농도의 바이러스가 존재한다면, 시료의 바이러스 감염 유무를 정확하게 판단하는데 문제가 발생할 수 있다.

바이러스 RNA를 고농도로 정제할 수 있는 방법을 고안하였는데, 이를 위해 건전 또는 ToMV 감염 토마토 잎 1g에 바이러스 RNA 추출액 1ml를 첨가하고 막자사발을 이용하여 곱게 마쇄하였다. 마쇄액을 8,000rpm에서 1분간 원심분리하고 상층액(원액)을 절반으로 나누어, 비농축은 원액을 DEPC-water로 10배씩 연속적으로 희석한 다음 각각의 희석액에 Biocube를 찍고 이를 주형으로 사용하였다. 농축의 경우는 최종 산물 20 μ l를 DEPC-water로 10배씩 연속적으로 희석한 다음 각각의 희석액에 Biocube를 찍고 이를 주형으로 사용하였다. 그 결과 바이러스 검출 감도가 약 10배 증가함을 확인할 수 있었다(그림 65).

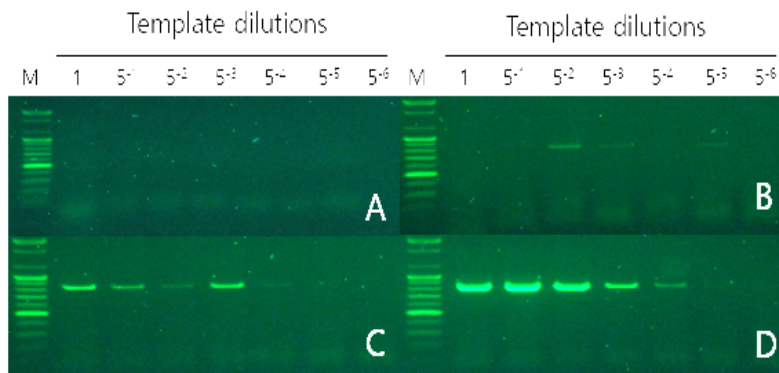


그림 65. 주형 준비법에 따른 tomato mosaic virus 검출 효과 비교. 건전(A, B), ToMV 감염 토마토 잎(C, D). 비농축(A, C), RNA 농축(B, D)

제품 제작을 위해 여러 가지 조건을 최적화한 다음 바이러스 RNA를 고농도로의 뽑을 수 있는 용액과 Biocube 50개를 한 개의 제품(FP-Kit)으로 구성하였다(그림 66).

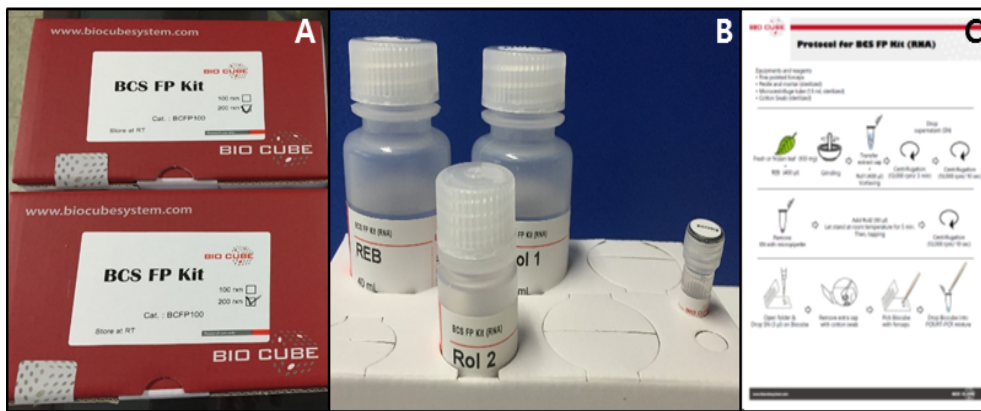


그림 66. 식물바이러스 RNA 농축용 FP Kit(A), 제품구성(B), 사용설명서(C).

마. 연구개발성과

(1) 논문게재

- ① RT-PCR과 다공성 세라믹 큐브를 이용한 벼 줄무늬 잎마름 바이러스 간편 진단. 2015. 식물병연구 21(4): 321-325.
- ② Specific primer sets for RT-PCR detection of major RNA viruses of tomato plants in Korea. 2016. 식물병연구(심사중)

(2) 특허성과

구분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
특허	생물학적 시료로부터 핵산 증폭 반응용 생물학적 분자를 신속하게 분리하기 위한 다공성 고체상 및 이의 용도	미국	주식회사 바이오큐브시스템	2015.02.23	14/423,135				발명자 김정수 외 5인
특허	생물학적 시료로부터 핵산 증폭 반응용 생물학적 분자를 신속하게 분리하기 위한 다공성 고체상 및 이의 용도	중국	주식회사 바이오큐브시스템	2015.02.25	201380044466.5				발명자 김정수 외 5인
특허	생물학적 시료로부터 핵산 증폭 반응용 생물학적 분자를 신속하게 분리하기 위한 다공성 고체상 및 이의 용도	유럽	주식회사 바이오큐브시스템	2015.02.23	13832463.7				발명자 김정수 외 5인
특허	생물학적 시료로부터 핵산 증폭 반응용 생물학적 분자를 신속하게 분리하기 위한 다공성 고체상 및 이의 용도	일본	주식회사 바이오큐브시스템	2015.02.20	2015-528395				발명자 김정수 외 5인
특허	토마토 바이러스 특이적 프라이머 세트 및 이를 이용한 토마토 바이러스들의 검출 방법	한국	안동대학교 산학협력단	2015.10.08	10-2015-0141597				발명자 김정수 외 3인

(3) 기술요약정보

연도	기술명	요약내용	기술완성도
2015	one step PCR/RT-PCR 패키지	- PCR/RT-PCR Kit(6종) - PCR/RT-PCR 결합패키지(6종)	실용화
2016	다중 one step PCR/RT-PCR 패키지	- multiplex PCR/RT-PCR Kit(16종) - multiplex PCR/RT-PCR 결합패키지(16종)	실용화

(4) 기술사업화

(가) 기술사업화 목록

번호	제품(상품)명	제품(상품)설명	활용업체명	사업화여부	매출생여부	제품매출액
1	ToCV RT-PCR Kit	one step virus detection kit	주식회사 바이오큐브시스템	○	○	1,430,000
2	TSWV RT-PCR Kit	one step virus detection kit	주식회사 바이오큐브시스템	○		

번호	제품(상품)명	제품(상품)설명	활용 업체명	사업화 여부	출생 매발여부	제품 매출액
3	PepMoV RT-PCR Kit	one step virus detection kit	주식회사 바이오큐브시스템	○		
4	CMV RT-PCR Kit v1	one step virus detection kit	주식회사 바이오큐브시스템	○	○	990,000
5	CMV RT-PCR Kit v2	one step virus detection kit	주식회사 바이오큐브시스템	○		
6	CMV RT-PCR Kit v3	one step virus detection kit	주식회사 바이오큐브시스템	○	○	1,100,000
7	TyLCV PCR Kit	one step virus detection kit	주식회사 바이오큐브시스템	○	○	825,000
8	ToCV RT-PCR Package	one step virus detection kit with BCS folder	주식회사 바이오큐브시스템	○		
9	TSWV RT-PCR Package	one step virus detection kit with BCS folder	주식회사 바이오큐브시스템	○		
10	PepMoV RT-PCR Package	one step virus detection kit with BCS folder	주식회사 바이오큐브시스템	○		
11	CMV RT-PCR Package	one step virus detection kit with BCS folder	주식회사 바이오큐브시스템	○		
12	TyLCV PCR Package	one step virus detection kit with BCS folder	주식회사 바이오큐브시스템	○		
13	TSWV/PepMoV RT-PCR Kit	multiplex one step virus detection Kit	주식회사 바이오큐브시스템	○		
14	TyLCV/PepMoV RT-PCR Kit	multiplex one step virus detection Kit	주식회사 바이오큐브시스템	○		
15	TyLCV/TSWV RT-PCR Kit	multiplex one step virus detection Kit	주식회사 바이오큐브시스템	○		
16	TyLCV/ToCV RT-PCR Kit	multiplex one step virus detection Kit	주식회사 바이오큐브시스템	○		
17	TyLCV/ToMV RT-PCR Kit	multiplex one step virus detection Kit	주식회사 바이오큐브시스템	○		

번호	제품(상품)명	제품(상품)설명	활용 업체명	사업화 여부	출생 매발여부	제품 매출액
18	TyLCV/CMV RT-PCR Kit	multiplex one step virus detection Kit	주식회사 바이오큐브시스템	○		
19	ToMV/PepMoV RT-PCR Kit	multiplex one step virus detection Kit	주식회사 바이오큐브시스템	○		
20	ToMV/ToCV RT-PCR Kit	multiplex one step virus detection Kit	주식회사 바이오큐브시스템	○		
21	PepMoV/ToCV RT-PCR Kit	multiplex one step virus detection Kit	주식회사 바이오큐브시스템	○		
22	CMV/TSWV RT-PCR Kit	multiplex one step virus detection Kit	주식회사 바이오큐브시스템	○		
23	CMV/PepMoV RT-PCR Kit	multiplex one step virus detection Kit	주식회사 바이오큐브시스템	○		
24	TSWV/ToCV RT-PCR Kit	multiplex one step virus detection Kit	주식회사 바이오큐브시스템	○		
25	TSWV/ToMV RT-PCR Kit	multiplex one step virus detection Kit	주식회사 바이오큐브시스템	○		
26	TSWV/TBSV RT-PCR Kit	multiplex one step virus detection Kit	주식회사 바이오큐브시스템	○		
27	TyLCV/TSWV/ToCV RT-PCR Kit	multiplex one step virus detection Kit	주식회사 바이오큐브시스템	○		
28	TSWV/PepMoV/ToCV RT-PCR Kit	multiplex one step virus detection Kit	주식회사 바이오큐브시스템	○		
29	TSWV/PepMoV RT-PCR Package	multiplex one step virus detection Kit with BCS folder	주식회사 바이오큐브시스템	○		
30	TyLCV/PepMoV RT-PCR Package	multiplex one step virus detection Kit with BCS folder	주식회사 바이오큐브시스템	○		
31	TyLCV/TSWV RT-PCR Package	multiplex one step virus detection Kit with BCS folder	주식회사 바이오큐브시스템	○		
32	TyLCV/ToCV RT-PCR Package	multiplex one step virus detection Kit with BCS folder	주식회사 바이오큐브시스템	○		

번호	제품(상품)명	제품(상품)설명	활용 업체명	사업화 여부	출생 여부	제품 매출액
33	TyLCV/ToMV RT-PCR Package	multiplex one step virus detection Kit with BCS folder	주식회사 바이오큐브시스템	○		
34	TyLCV/CMV RT-PCR Package	multiplex one step virus detection Kit with BCS folder	주식회사 바이오큐브시스템	○		
35	ToMV/PepMoV RT-PCR Package	multiplex one step virus detection Kit with BCS folder	주식회사 바이오큐브시스템	○		
36	ToMV/ToCV RT-PCR Package	multiplex one step virus detection Kit with BCS folder	주식회사 바이오큐브시스템	○		
37	PepMoV/ToCV RT-PCR Package	multiplex one step virus detection Kit with BCS folder	주식회사 바이오큐브시스템	○		
38	CMV/TSWV RT-PCR Package	multiplex one step virus detection Kit with BCS folder	주식회사 바이오큐브시스템	○		
39	CMV/PepMoV RT-PCR Package	multiplex one step virus detection Kit with BCS folder	주식회사 바이오큐브시스템	○		
40	TSWV/ToCV RT-PCR Package	multiplex one step virus detection Kit with BCS folder	주식회사 바이오큐브시스템	○		
41	TSWV/ToMV RT-PCR Package	multiplex one step virus detection Kit with BCS folder	주식회사 바이오큐브시스템	○		
42	TSWV/TBSV RT-PCR Package	multiplex one step virus detection Kit with BCS folder	주식회사 바이오큐브시스템	○		
43	TyLCV/TSWV/ToCV RT-PCR Package	multiplex one step virus detection Kit with BCS folder	주식회사 바이오큐브시스템	○		
44	TSWV/PepMoV/ToCV RT-PCR Package	multiplex one step virus detection Kit with BCS folder	주식회사 바이오큐브시스템	○		

(나) 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	434.5만원
			향후 3년간 매출	5 억원
		관련제품	개발후 현재까지	0.4 억원
			향후 3년간 매출	10 억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0.01% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 80% 국외 : 10%
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 100% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 100% 국외 : 100%
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		30위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		5위

(다) 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	3			
	소요예산(백만원)	300			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0.04	5	15	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0.01	80	90
		국외	0	10	30
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	- 국내 주요 채소류 바이러스 진단키트 개발 - 자석기능 보강한 Biocube 개발			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0	4	13	
	수 출	0	5	15	

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
------	------

4-1. 목표달성도

구분	연도	세부연구목표	가중치 (%)	달성도 (%)	평가의 착안점 및 기준
1차년도	2014. 9 ~ 2015. 9	○ 토마토에 발생하는 주요 바이러스 자원 확보 및 증식(7종)	2.5	100	토마토 바이러스 자원 7점 확보 및 증식 여부
		○ 토마토와 토마토 바이러스 유전체 분석을 통한 primer set 선발 (종 당 1개 이상)	5	100	토마토 바이러스 진단용 primer set 선발 여부(바이러스 별 1개 이상)
		○ 토마토 바이러스에 대한 RT/PCR 검출 조건 확립(7종)	12.5	100	RT/PCR 검출 조건 확립 여부(7종)
		○ 바이오큐브용 RT/PCR premix 제작 및 1~3차 시제품 생산(7종)	10	100	바이러스 별 진단용 시제품 7종 생산 여부
		○ 토마토 바이러스 진단용 동결 건조 3차 시제품의 현장 적용성 검토 (7종)	7.5	100	3차 시제품의 현장 적용성 검토 여부
		○ 기술 이전을 통한 one step PCR/RT-PCR 패키지 제품 개발 및 사업화(7종)	12.5	100	기술 이전을 통한 패키지 제품 7종 개발 및 패키지 제품의 사업화 여부
2차년도	2015. 9 ~ 2016. 9	○ 토마토 바이러스에 대한 multiplex PCR/RT-PCR 검정 조건 확립 (3종 이상)	10	100	multiplex PCR/RT-PCR 검정 조건이 3종 이상 확립 여부
		○ 바이오큐브용 다중 PCR /RT-PCR one step premix 제작 및 1~3차 시제품 생산 (3종 이상)	10	100	바이오큐브용 다중 PCR /RT-PCR 시제품 3종 이상 개발여부
		○ 토마토 바이러스 진단용 동결 건조 3차 시제품의 현장 적용성 검토(3종 이상)	10	80	3차 시제품의 현장 적용성 검토 여부
		○ 기술 이전을 통한 다중 one step PCR/RT-PCR 패키지 제품 개발 및 사업화(3종 이상)	20	80	기술 이전을 통한 패키지 제품이 3종 이상 개발 및 사업화 여부

4-2. 관련분야 기여도

- 국내의 토마토에서 자주 문제가 되는 식물바이러스 진단 기술 확립
- 누구나 쉽게 주형을 준비할 수 있는 방법을 최초로 상용화함.
- 본 과제에서 개발된 제품 사용시 누구나 쉽게 토마토 바이러스 진단이 가능
- 대상 바이러스 동시 진단을 통한 진단 비용 및 노력 절감
- 식물 바이러스 PCR/RT-PCR 진단 kit 시장의 경우 외국에 비해 상대적으로 경쟁력이 낮았으나, 생물정보와 실험적 방법으로 선발한 primer를 통해 제품의 특이성을 향상시켰을 뿐만 아니라 진단 kit에 주형 준비가 쉽도록 Biocube를 결합한 제품 개발로 시장 경쟁력 확보함

○ 참고

- 식물 바이러스 PCR/RT-PCR 진단 kit 기술 수준

개발기술명	관련기술 최고보유 국	현재 기술수준		비고
		우리 나라	본 연구팀	
바이오큐브 결합 PCR/RT-PCR 패키지 개발	대한 민국	-	100	바이오큐브를 이용한 PCR/RT-PCR용 주형 준비법은 세계최초로 개발된 독자 기술임.
식물바이러스 진단용 PCR/RT-PCR 진단 kit	미국	50	10	Agdia, Santa Cruz Biotechnology 등에서 80여가 이상의 진단 kit 시판중, 대부분 monoplex PCR/RT-PCR kit
형광probe 기반 식물 바이러스 진단용 PCR/RT-PCR 진단 kit	미국	50	5	GMbiolab Co., Ltd. (Taiwan) Bio-Synthesis (USA) Norgen Biotek (Canada) (주)코젠바이오텍(한국) 등의 생명공학관련 회사에서 100여가지 이상의 진단 kit 시판 중. 모두 monoplex qPCR/RT-PCR kit, 상당수의 viroid 진단 포함

- 시판되고 있는 RNA 정제 kit의 특징

회사명 (국가명)	제품명	판매가격(천원) 98test (premix) 100 prep(정제kit)	제품 특징
바이오니아 (대한민국)	ExiPrep™ Plus Viral RNA Kit	423	column 방식
진올 (대한민국)	Ribospin	440	Phenol 사용, column 방식
Qiagen (독일)	Qiagen RNeasy kit	800	column 방식
Promega (USA)	ReliaPrep™ FFPE Total RNA Miniprep System	806	유기용매 없이, mineral oil이용해 분리
Roche Applied Science (스위스)	RNA-Purification kit		column 방식
Invitrogen (USA)	Trizol plus RNA purification system	580	column방식
Chemicell (독일)	geneMAG-RNA/DNA 100	314	magnetic bead이용

- column 방식과 Biocube의 장단점 비교

구분	column 방식	Biocube
실험 절차	복잡	단순
주형 획득 시간	30분	3초
일일 가능 작업량 (1인 기준)	100~200 시료	1000~2000 시료
핵산 수득량	높음	낮음
소요되는 소모품 (시료 100개 기준)	filter column 100개 bind column 100개 2ml tube 200개 1.5ml tube 200개 1.5ml tip 400개 0.2ml tip 200개	세라믹 큐브 100개
필요한 용매 (시료 100개 기준)	마쇄용 완충액 60ml 결합용 완충액 60ml 세척용 완충액 120ml	없음
원심분리기	필요함	필요 없음
사용자의 전문성	높은 편	낮아도 가능
작업 피로도	매우 높은	낮음
현장 적용성	매우 낮음	매우 높음

5. 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07
------	------

○ 타 연구개발 사업에의 활용

번호	연구사업명	과제명	책임자	과제발주처(부처)	활용년도
1	농업공동연구사업 농업기후변화 적응체계구축	기후변화 대응 국가관리 바이러스 정밀분포지도 작성 및 진단매뉴얼 개발	최홍수	농촌진흥청	2016년 베트남, 캄보디아, 필리핀 등 동남아 국가 에서 활용

- 아시아태평양농업기술협력협의체(AFACI) 회원국 12개 나라에 BCS Folder 분양(1,200test) 참여국: 13(방글라데시, 부탄, 캄보디아, 인도네시아, 라오스, 몽골, 미얀마, नेपाल, 필리핀, 스리랑카, 태국, 베트남, 한국)
- 활용: 벼는 동남아시아를 비롯한 세계 주요 식량원이며, 동남아 국가는 식량 부족으로 사람의 영양원이 부족한 상태이다. 베트남, 태국 등 동남아 국가에서 벼에 발생하여 심각한 피해를 주는 벼 바이러스의 효과적인 진단을 위하여 본 과제에서 개발한 바이오큐브 진단 기술을 활용할 경우 연구시설과 전문 인력이 부족한 국가에서도 신속하고 정밀한 진단이 가능하다. 또한, 벼 바이러스는 우리나라에도 동남아 국가에서 매개충의 비래로 인하여 해에 따라 전국적인 대 발생을 하므로 동남아 국가와 대한민국의 진단 협력체계를 구축함으로써 대 발생을 예방할 수 있으며 동남아 국가에 진단키트를 보급하여 국제적인 국가위상을 제고할 수 있을 것이다.



그림. BCS Folder(A), AFACI분양사진(B), 제품매뉴얼(C), 2016년 9월 20일~24일.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 해당사항 없음

7. 연구개발결과의 보안등급

- 해당사항 없음

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

- 해당사항 없음

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

- 안동대학교 연구실안전관리규정에 의거 연구실안전 조치를 이행하였음.

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

구분 번호 (논문 /특허 /기타)	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	기술 이전	토마토 바이러스 특이적 프라이머 세트 및 이를 이용한 토마토 바이러스들의 검출 방법	안동대	책임자	대한민국		2016.04.26	단독	개발기술 상용화
2	국내 특허	토마토 바이러스 특이적 프라이머 세트 및 이를 이용한 토마토 바이러스들의 검출 방법	안동대 산학협 력단	책임자	대한민국		2015.10.08		발명자 김정수 외 5인
3	국외 특허	생물학적 시료로부터 핵산 증폭 반응용 생물학적 분자를 신속하게 분리하기 위한 다공성 고체상 및 이의 용도	주식회 사 바이오 큐브시 스템	공동	특허 미국, 중국, 유럽, 일본		2015.02.23		발명자 김정수 외 5인
4	논문 게재	RT-PCR과 다공성 세라믹 큐브를 이용한 벼줄무늬잎마름바이 러스 간편진단	안동대	교신	식물병연구		2015. 21(4): 321-325	중복	KCI
5	논문 게재	국내의 토마토 주요 바이러스 진단을 위한 역전사 중합반응법용 프라이머 셀	안동대	교신	식물병연구		2016 (게재중)	단독	KCI
6	사업 화	토마토감염바이러스 단독 및 다중진단기술	주식회 사 바이오 큐브시 스템	공동	44종				4종 매출

11. 기타사항

○ 해당사항 없음

12. 참고문헌

코드번호	D-14
<p>Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J. and Mumford, R. 2014. Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. <i>Virus Research</i> 186:20 - 31.</p>	
<p>Chen, S., Gu, H., Wang, X., Chen, J. and Zhu, W. 2011. Multiplex RT-PCR detection of Cucumber mosaic virus subgroups and Tobamoviruses infecting Tomato using 18S rRNA as an internal control. <i>Acta. Biochim. Biophys. Sin.</i> 43(6):465-471.</p>	
<p>Cho, J. D., Kim, J. S., Kim, J. Y., Kim, J. H., Lee, S. H., Choi, G.S., Kim, H. R. and Chung, B. N. 2005a. Occurrence and symptoms of Tomato spotted wilt virus on vegetables in Korea. <i>Res. Plant Dis.</i> 11: 213-216.</p>	
<p>Hassani-Mehraban, A. Westenberg, M., Verhoeven, J.T.J., van de Vossenbergh, B.T.L.H., Kormelink, R. and Roenhorst, J.W. 2016. Generic RT-PCR tests for detection and identification of tospoviruses. <i>J. Virol. Methods</i> 233:89-96.</p>	
<p>Hu, J.S., Li, H.P., Barry, K., Wang, M. and Jordan, R. 1995. Comparison of dot blot, ESLISA, and RT-PCR assays for detection of two cucumber mosaic virus isolates infecting banana in Hawaii. <i>Plant Dis.</i> 79:902-906.</p>	
<p>Ji, J., Oh, T. K., Lee, H. J., Kim, S. H., Rajangam, U., Kim, S. C., Kim, Y. S. and Choi, C. W. 2008. Molecular characterization of tomato infecting Tobacco leaf curl geminivirus isolated from Jeju island. <i>Res. Plant Dis.</i> 24: 238. (Abstract)</p>	
<p>Kataya, A., Stavridou, E., Farhan, K., and Livieratos, I. 2008. Nucleotide sequence analysis and detection of a Greek isolate of Tomato chlorosis virus. <i>Plant Pathology</i>, 57(5):819-824.</p>	
<p>Kil, E.-J., Lee, Y.-J., Cho, S., Auh, C.-K., Kim, D., Lee, K.-Y., Kim, M.-K., Choi, H.-S., Kim, C.-S. and Lee, S. 2015. Identification of natural weed hosts of Tomato chlorosis virus in Korea by RT-PCR with root tissues. <i>Eur. J. Plant Pathol.</i> 142:419-426.</p>	
<p>Kim, J.S., Lee, S.H., Choi, H.S., Kim, M.K., Kwak, H.R., Nam, M., Kim, J.S., Choi, G.S. Cho, J.D., Cho, I.S. and Chung, B.N. 2011. Occurrence of Virus Diseases on Major Crops in 2010. <i>Res. Plant Dis.</i> 17(3):334-341.</p>	
<p>Kim, M.-K., Kwak, H.-R., Han, J.-H., Ko, S.-J., Lee, S.-H., Park, J.-W., Jonson, M.G., Kim, K.-H., Kim, J.-S., Choi, H.-S. and Cha, B.-J. 2008. Isolation and characterization of Pepper mottle virus infecting tomato in Korea. <i>Plant Pathol. J.</i> 24(2):152-158.</p>	
<p>Kumar, S., Udaya, S.A.C., Nayaka, S.C., Lund, O.S. and Prakash, H.S. 2011. "Detection of Tobacco mosaic virus and Tomato mosaic virus in pepper and tomato by multiplex RT-PCR." <i>Lett. Appl. Microbiol.</i> 53(3): 359-363.</p>	
<p>Koressaar, T. and Remm, M. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. <i>Bioinformatics</i> 23(10):1289-1291.</p>	
<p>Lee, J.-S., Cho, W.K., Lee, S.-H., Choi, H.-S. and Kim, K.-H. 2011. Development of RT-PCR Based Method for Detecting Five Non-reported Quarantine Plant Viruses Infecting the Family Cucurbitaceae or Solanaceae. <i>Plant Pathol. J.</i> 27(1):93-97.</p>	
<p>Mumford, R.A., Barker, I. and Wood, K.R. 1994. The detection of tomato spotted wilt virus using the polymerase chain reaction. <i>J. Virol. Methods</i> 46(3):303-311.</p>	

Okuda, M. and Hanada, K. 2001. RT-PCR for detecting five distinct Tospovirus species using degenerate primers and dsRNA template. *J. Virol. Methods* 96:149-156.

Park, M.-R. and Kim, K.-H. 2004. RT-PCR detection of three non-reported fruit tree viruses useful for quarantine purpose in Korea. *Plant Pathol. J.* 20:147-154.

The Tomato Genome Consortium. 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485:635 - 641.

Webster, C.G., Wylie, S.J. and Jones, M.G.K. 2004. Diagnosis of plant viral pathogens *Current Science* 86(12):1604-1607.

Sun Jung Kwon, Hong Soo Choi, Jung Heon Han, Yong Joon La, Kook Hyung Kim 2000. Three Different Viruses Isolated from Typical Weed Plants that Grown Adjacent to Common Crop Fields. *Plant Pathol. J.* 16:297-305

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.