

발 간 등 록 번 호

11-1541000-000747-01

보안과제(), 일반과제(○)

과제번호 108103-2

농림기술개발사업

(Technology Development Program for Agriculture and Forestry)

벼 바이러스 진단 기술개발 및 진단 키트 생산
(Development of immuno strip for diagnosis of rice virus)

서울대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “벼 바이러스 진단 기술개발 및 진단 키트 생산” 과제(세부과제 “벼 바이러스 항체 대량 생산”)의 보고서로 제출합니다.

2010년 12월 19일

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 제 연 호

세부연구책임자 : 제 연 호

연 구 원 : 최 재 영

연 구 원 : 박 지 현

연 구 원 : 유 금

세부연구책임자 : 김 국 형

연 구 원 : Gilda Jonson

연 구 원 : 유 지 숙

연 구 원 : 손 문 일

협동연구기관명 : (주)기산바이오백

협동연구책임자 : 박 은 경

요 약 문

I. 제 목

벼 바이러스 진단 기술개발 및 진단 키트 생산

II. 연구개발의 목적 및 필요성

벼 바이러스는 벼에서 황화모자이크, 위축, 고사 등을 야기하여 매년 큰 경제적 피해를 유발하며, 벼의 생육초기에 감염된 조생종과 조기 이앙답은 출수가 불량하여 감수에 직접적인 영향을 미친다. 이러한 벼 바이러스 중 벼검은줄오갈병 바이러스 (*Rice black-streaked dwarf virus*, RBSDV), 벼줄무늬잎마름 바이러스 (*Rice stripe virus*, RSV) 및 벼오갈병 바이러스 (*Rice dwarf virus*, RDV) 등은 발병빈도 및 피해가 매년 증가하고 있는 실정이다.

벼 바이러스를 포함한 식물 바이러스의 진단은 전자현미경으로 바이러스입자를 관찰하거나 항혈청에 의한 효소결합면역 항체법 또는 유전자를 증폭하여 검정하는 방법 등이 사용된다. 그러나 이러한 방법은 최소 하루이상의 시간이 소요되고, 포장에서는 직접 진단할 수 없으며, 고도의 교육과 기자재를 요하는 전문인들만이 수행할 수 있는 방법이어서 현장에서 직접 응용하기에는 부적합하다.

이에 반해 진단막대(immuno-strip)는 1~2시간 정도의 사용방법 교육만 받으면 농민들도 쉽게 포장단계에서 진단(10~15분 소요)을 할 수 있다는 장점이 있다. 현재 다른 여러 중요 바이러스를 대상으로 한 진단막대가 판매되고 있으나 최근 큰 피해를 야기하는 벼 바이러스(RSV, RBSDV, RDV, RRSV, RGSV) 및 잠재 유입가능 바이러스를 포장에서 특이적으로 조기 진단할 수 있는 키트는 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 주요 벼 바이러스를 특이적으로 진단할 수 있는 항체를 대량 생산하고 현장에서 쉽게 응용이 가능한 진단막대를 개발함으로써, 벼 바이러스 병의 대발생에 의한 피해를 예방하고, 벼 바이러스들을 조기 진단하여 대처할 수 있도록 농가에서 응용이 용이한 진단 키트를 공급하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 제1세부과제: 벼 바이러스 항체 대량 생산
 - 가. RBSDV 전장유전자 및 conserved region 대량발현
 - 나. RBSDV 전장유전자 및 conserved region 항체 제작
 - 다. RSV의 전장유전자 및 conserved region 대량발현
 - 라. RSV의 전장유전자 및 conserved region 항체 제작

2. 제2세부과제: 벼 바이러스 특이항체 생산용 고효율 유전자 선발
 - 가. 벼 바이러스 확보, 동정 및 계놈분석
 - 나. RBSDV 항체생산용 유전자 선발
 - 다. RSV 항체생산용 유전자 선발

3. 제1협동과제: Immuno-strip 제작 및 특이성 평가
 - 가. 항체를 이용한 immuno-strip의 경제적 대량생산 체계 확립
 - 나. RBSDV immuno-strip 제작
 - 다. RBSDV immuno-strip 민감성 및 특이성 검정
 - 라. RSV immuno-strip 제작
 - 마. RSV immuno-strip 민감성 및 특이성 검정

IV. 연구개발결과

식물 바이러스 중 *Reoviridae*과의 *Fijivirus*속에 속하는 *Rice black-streaked dwarf virus* (RBSDV)는 동아시아에서 큰 피해를 발생시키는 maize rough dwarf disease와 벼검은줄오갈병의 원인 바이러스이다. RBSDV의 감염을 검출 및 진단하기 위하여 RT-PCR과 같은 분자생물학적 방법이 개발되기는 하였으나, 현장에서 대량으로 신속하게 진단하는 데에는 그 사용에 제한이 있기 때문에 특이항체를 이용하여 신속하고 효과적으로 RBSDV를 진단할 수 있는 진단 키트의 개발이 필요하다. 이를 위하여 본 연구에서는 국내 분리주 RBSDV의 전체 계놈 염기서열을 결정하고 그로부터 12개의 유전자 구조를 분석하였다. RBSDV의 12개 유전자 중 ORF1, 2, 9 및 12는 각각 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), major core protein, core protein 및 major outer shell protein과 높은 상동성을 보였고, 이들은 바이러스의 복제나 구조에 필수적인 것으로 보고됨으로써 표지단백질로의 이용가능성이 가장 높을 것으로 추정되었다. 따라서

이들 유전자가 coding하는 단백질의 특이부분 및 전장단백질을 벡로바이러스 발현 벡터를 이용하여 다각체단백질과의 융합단백질의 형태로 발현시키거나 단독발현 시켰다. 이 중 단백질의 대량 발현 및 순수 분리가 잘 이루어진 ORF1 특이부분 및 ORF12 전장단백질을 항원으로 실험동물에 주사하여 이들에 대한 특이항체를 제작하였으며, 항체의 민감성 및 특이성을 검정하였다. 이렇게 제작된 RBSDV 특이항체는 이 바이러스를 진단하는데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

Rice stripe virus (RSV)는 대부분의 아시아 지역에서 벼에 큰 피해를 유발하는 벼줄무늬잎마름병의 원인 바이러스이며, 현장에서 이 바이러스를 진단할 수 있는 진단 키트의 개발을 위하여 재조합단백질 및 합성 polypeptide를 항원으로 이용하여 RSV에 대한 항체를 제작하였다. 우선, 항체 제작을 위한 RSV 표지단백질을 선별하기 위하여 2008년과 2009년도에 국내에서 발생한 이병 벼로부터 다양한 RSV 변이주를 분리하고, 그로부터 RNA2 및 RNA3의 전체 게놈 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열을 바탕으로 계통관계를 분석한 결과 국내 분리주 RSV는 중국과 일본에서 보고된 RSV와 같은 계통에 속하는 것으로 나타났으며, 국내 분리주와 중국 및 일본 분리주 RSV 사이의 유전적 재조합 관계를 구명하기 위한 RT-PCR/Restriction enzyme 기법을 개발하였다. 생물정보학적 분석을 통하여 RNA2에 *EcoRI*과 RNA3에는 *NdeI*과 *AseI* 제한효소 위치가 있음을 확인하였으며, 이 기법을 이용하여 아시아 지역에서 분리된 RSV를 몇 개의 그룹으로 나눌 수 있었다.

재조합단백질의 발현을 위하여 RSV의 7개 단백질 중 게놈 염기서열 분석 결과를 바탕으로 NCP와 NS3 단백질을 선별하였다. NCP 및 NS3 단백질을 RT-PCR로 증폭한 후 His-tag를 포함하는 발현 벡터에 클로닝하고, *E. coli*를 이용하여 재조합단백질을 대량 발현한 후 His-tag를 이용하여 순수 분리하였다. 한편, RSV 단백질의 polypeptide 또한 합성하여 항체 제작을 위한 항원으로 사용하였다. 전체적으로 2개의 재조합단백질과 4개의 합성 polypeptide를 항원으로 토끼에 주사하여 6가지의 polyclonal 항체를 제작하였다. 2개의 재조합단백질 중 NCP에 대한 항체만이 Western blot에서 안정적으로 반응하였으며, 합성 polypeptide의 경우에는 CP와 NCP에 대한 항체가 이병 벼 및 잡초에서 RSV를 검출하는데 매우 효과적이었다. 본 연구를 통해서 RSV에 대한 특이항체를 성공적으로 제작하였으며, 이렇게 제작된 특이항체는 RSV의 진단, 면역침강, 단백질 정제 및 Western blot 등의 다양한 분석에 사용될 수 있을 것이다.

본 연구의 결과 제작된 RBSDV 및 RSV 특이항체를 이용하여 immuno-strip을 제작하기 위하여 crude serum에서 column을 이용하여 항체를 정제하였다. 최종적으로

정제된 항체 중에서 OD값이 가장 높은 것을 선택하여, 항체의 농도를 1 mg/ml로 맞춰서 gold conjugation에 사용하였다. Gold conjugate 실험 시, gold 입자에 적절한 ligand의 양을 결정하는 것이 중요하며, 일반적인 실험 결과가 양호하지 못하여 실험 I에서는 항체의 양을 20% 증가시켜 실험을 수행하였다. 그리고 gold solution의 pH를 보다 세분하여 테스트하였다. 위의 조건 실험의 결과, 테스트 line이 positive와 negative 모두 양성이 나오는 비특이 반응을 보였다. 이와 같은 현상을 보완하고자, 다른 조건은 모두 실험 I과 같게 하고 gold 용액과 antibody의 반응 시간만 30분에서 16시간으로 늘린 후 blocking buffer을 추가하였다. Gold conjugate solution을 흡수시켜서 말린 polyester 리본으로 immuno-strip을 제작하여 테스트한 결과, 실험 I에서는 RBSDV와 RSV에서 모두 secondary line과 antibody line 모두에서 양성 반응이 나오는 비특이 반응을 보였다. 반면, 실험 II의 결과는 RBSDV와 RSV 각각 한 종류의 antibody에서 negative와 positive를 육안으로 판별할 수 있는 immuno-strip을 제작할 수 있었다. 차후 gold conjugate의 감도를 높이기 위한 실험이 추가 보완된다면, immuno-strip의 제품화 및 대량 생산이 가능할 것으로 판단된다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

가. 논문

- 1) Jonson, G. M., H. S. Choi, J. S. Kim, I. R. Choi and K. H. Kim. 2009. Sequence and phylogenetic analysis of the RNA1 and RNA2 segments of Korean *Rice stripe virus* isolates and comparison with those of China and Japan. *Archives of Virology* 154: 1705-1708.
- 2) Jonson, G. M., H. S. Choi, J. S. Kim, I. R. Choi and K. H. Kim. 2009. Complete genome sequence of the RNAs 3 and 4 segments of *Rice stripe virus* isolates in Korea and their phylogenetic relationships with Japan and China isolates. *Plant Pathology Journal* 25(2): 142-150.

나. 학술발표

- 1) Choi, J. Y., Y. Wang, J. Y. Roh, X. Tao, Liu, Q., J. B. Park, S. D. Woo, B. R. Jin and Y. H. Je. 2010. Development of an specific antibodies for the detection of

Rice black-streaked dwarf virus using baculovirus expression vectors. 2010년도 한국 응용곤충학회 심포지엄 및 추계학술발표회, 충북 충주시 수안보 상록호텔, 10. 21-23.

다. 특허 출원

- 1) 제연호, 최재영, 노종열, 왕용. 재조합 바이러스 에이씨이지-알비에스디브이1에스피 및 이를 이용한 베쿨로바이러스 발현벡터 시스템. 2010.12.15. 대한민국 특허출원 제 10-2010-0127988 호

라. 유전자원등록

Je, Y. H., J. Y. Choi, J. Y. Roh, Y. Wang, *Rice black-streaked dwarf virus* ORF1 complete CDS. GenBank Accession No. H2670663 외 11건

마. 시제품 제작

- 1) 벼검은줄오갈병 바이러스 (RBSDV) 진단용 immuno-strip 시제품 제작
- 2) 벼줄무늬잎마름병 바이러스 (RSV) 진단용 immuno-strip 시제품 제작

2. 연구성과 활용계획

- 자연 상태에서 빈번하게 일어나는 벼 바이러스를 확보하고 바이러스의 변이를 효과적으로 추적·예측하여 진단에 필수로 요구되는 항원성이 높은 바이러스 단백질을 선별하고, 이들의 대량생산 기술을 개발하여 항체를 생산함으로써 immuno-strip을 제작·보급할 수 있을 것으로 사료됨
- 본 연구를 통하여 긴밀한 산(기산바이오텍) 학(서울대 제연호, 김국형) 협력을 바탕으로 벼 바이러스 모니터링에 필요한 핵심 기술을 개발하고, 생산자가 포장에서 벼 바이러스를 신속하게 진단할 수 있는 immuno-strip을 제작·공급할 수 있을 것으로 기대됨
- 본 연구를 통하여 제작된 immuno-strip은 영농자료 활용 등을 통하여 관련 농민을 교육하고 보급함으로써 농가의 생산성 향상 및 농가와 관련 산업의 경쟁력 제고에 기여할 수 있을 것임

SUMMARY

Rice black-streaked dwarf virus (RBSDV), a member of the genus *Fijivirus* within the family *Reoviridae*, is the causative agent of maize rough dwarf and rice black-streaked dwarf diseases, both of which can lead to severe yield losses in east Asia. Although molecular approaches such as RT-PCR have potential for detection and diagnosis of this virus infections, their impact on high throughput certification is still limited. Therefore, the development of an antibody-based assay for rapid and effective diagnosis of RBSDV is preferable. In this study, we collected RBSDV from rice with rough dwarf disease and its complete nucleotide sequences of 10 genomic segments encoding 12 non-overlapping ORFs were determined. Among 12 ORFs, ORF1, 2, 9 and 12 showed high level of similarities with the RdRp, major core protein, core protein and major outer shell protein, respectively. These ORFs were expressed as polyhedrin fusion protein or full-length soluble protein using baculovirus expression system for the preparation of specific antibody against RBSDV, which could be useful for the detection and diagnosis of this virus.

Rice stripe virus (RSV) is one of serious epidemic pathogens for rice species grown in mostly Asia. Therefore, it is necessary to produce a diagnostic detection kit applicable in fields for RSV detection. For that, antibodies for RSV were generated on the basis of recombinant proteins and synthetic polypeptides as antigens. In prior to select RSV proteins for anti-body production, we first screened various RSV isolates from the RSV infected rice plants during 2008 and 2009 in Korea. And then, we analyzed whole genome sequences of RNA2 and RNA3 for collected Korean RSV isolates. Based on complete nucleotide sequences of RNA2 and RNA3, phylogenetic tree was constructed showing that the Korean RSV isolates were grouped together with RSV isolates derived from China and Japan. Furthermore, we developed RT-PCR/Restriction enzyme technique to reveal the genetic recombination between Korean RSV isolates and Chinese or Japanese RSV isolates. Bioinformatic analysis identified specific enzyme sites in RNA2 (*EcoR I*) and RNA3 (*Nde I* and *Ase I*). Using newly developed RT-PCR/Restriction enzyme technique, we could divide the Asian RSV isolates into several groups. Based on genome sequence data, we selected two proteins (NCP and NS3 proteins) among seven proteins in RSV for production of

recombinant proteins. Genes encoding NCP and NS3 proteins were cloned into the expression vector carrying His-tag after RT-PCR amplification. Consequently, we obtained purified His-tagged recombinant proteins which were produced in *E. coli*. Alternately, we also applied synthetic polypeptides of RSV proteins which are suitable to raise antiserum for antibody production. A total of six polyclonal antibodies consisted of two recombinant proteins and four synthetic polypeptides were raised in rabbits. Of two recombinant proteins, only anti-NCP displayed stable hybridization signals in western blot analysis. In case of synthetic polypeptides, antibodies for CP and NCP were very effective to detect RSV in both RSV infected rice and weed plants. However, antibodies for NS3 and NSvc4 showed weak specific bands as well as strong non-specific background. In summary, the antibodies successfully generated for RSV in this study can be practically applied for various assays such as RSV diagnostic detection, immunoprecipitation, protein purification, and western blot analysis.

To get the specific antibody from crude serum, column chromatography was performed. First, desalting from crude serum, second, separating the specific antibody from crude serum, third, desalting of purified antibody. We selected the best one which had highest OD value and adjusted it, 1 mg/ml. We did focused on adjusting proper amount of ligand. However the result of the tests was not that good, so we added 20% more antibody to the test. And we tested the various range of pH to set. When we performed the experiment after setting in detail, we got a nonspecific response, showing positive response from both of positive sample and negative sample. To correct this, we took more reaction time (from 30 min to 16 h) for gold-antibody conjugation and added blocking buffer. We tested immuno-strip manufacturing with polyester ribbon which was dried after absorbing gold conjugate solution. We got a non-specific result from first experiment from RBSDV and RSV. It showed positive reaction both secondary line and antibody line. However, we got a specific result from second experiment from RBSDV and RSV which showed a remarkable contrast between negative and positive samples. If we set more details by several experiments, we could make commercial production.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	12
Section 1. Objectives and importance of research	12
Section 2. Needs for research	12
Section 3. Contents and scopes of research	13
Chapter 2. Current status of domestic and foreign research	16
Section 1. Current status of domestic research	16
Section 2. Current status of foreign research	16
Section 3. Future prospect of research	17
Chapter 3. Contents and Results of research	18
Section 1. Mass production of antibodies specific to rice virus	18
Section 2. Selection of genes for production of antibodies specific to rice virus	39
Section 3. Production and specificity evaluation of immuno-strip	53
Chapter 4. Achievement of objectives and contribution to related areas	70
Section 1. Objectives of research and points of evaluation	70
Section 2. Achievement of objectives	71
Section 3. Contribution to related areas	73
Chapter 5. Achievements and Application plan of research results	74
Section 1. Quantitative products	74
Section 2. Application plan of research results	75
Section 3. Further study	75
Section 4. Application to other research	76
Chapter 6. Foreign scientific informations collected during research	77
Chapter 7. References	78

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	12
제 1 절	연구개발의 목적	12
제 2 절	연구개발의 필요성	12
제 3 절	연구개발의 내용 및 범위	13
1.	연구개발의 목표	13
2.	연차별 연구개발 목표와 내용	13
3.	연구추진 내용 및 계획	14
가.	연구추진 전략	14
나.	연구개발 내용	14
제 2 장	국내외 기술개발 현황	16
제 1 절	국내 기술현황	16
제 2 절	국외 기술현황	16
제 3 절	기술개발의 파급효과 및 금후의 전망	17
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	18
제 1 절	벼 바이러스 형체 대량 생산	18
제 2 절	벼 바이러스 특이항체 생산용 고효율 유전자 선발	39
제 3 절	Immuno-strip 제작 및 특이성 평가	53
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	70
제 1 절	연구개발 목표와 평가의 착안점	70
1.	연차별 연구개발의 목표	70
2.	연구평가의 착안점	70
제 2 절	연구개발 목표의 달성도	71
제 3 절	연구개발의 관련분야 기여도	73
1.	기술적 측면	73
2.	경제·산업적 측면	73

제 5 장	연구개발 성과 및 성과 활용계획	74
제 1 절	정량적 성과	74
제 2 절	연구결과의 활용계획	75
제 3 절	추가연구의 필요성	75
제 4 절	타연구에의 응용성	76
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	77
제 7 장	참고문헌	78

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

- 주요 벼 바이러스 검정용 특이 유전자 또는 유전자 부분을 검정하고, 순화된 벼 바이러스 유전자 산물을 이용하여 특이 항체를 대량생산함으로써 벼 바이러스의 신속한 진단이 가능한 진단 kit를 제작·보급함
- 주요 벼 바이러스를 특이적으로 진단할 수 있는 진단 kit를 이용하여 벼 바이러스 병의 대발생에 의한 피해를 예방하고, 현장에서 벼 바이러스의 발생을 조기에 진단함으로써 농가의 생산성 향상 및 농가와 관련 산업의 경쟁력 제고에 기여함

제 2 절 연구개발의 필요성

- 바이러스는 벼에서 황화모자이크, 위축, 고사 등을 야기하여 2007년 충남 서천과 전북 부안에서는 각각 전면적 대비 22.6%와 14.0%에 해당하는 2,441 ha와 2,016 ha에 벼줄무늬잎마름병의 대발생으로 피해가 발생하는 등 매년 큰 경제적 피해를 유발함
- 벼의 생육초기에 감염된 조생종과 조기 이앙답은 출수가 불량하여 감수에 직접적인 영향을 미쳐서, 계화와 서천 등 발병주율이 50% 이상 되는 극심지역에서는 수확을 포기하는 실정이며, 서남해안 지역인 충남, 전남, 제주지역에서 2007년 포장 발병률이 100%로 전염원이 상존하고 있음
- 이러한 벼 바이러스 중 벼검은줄오갈병 (*Rice black-streaked dwarf virus, RBSDV*), 벼줄무늬잎마름바이러스 (*Rice stripe virus, RSV*), 벼 오갈병 (*Rice dwarf virus, RDV*)외 4종 (*Rice tungro bacilliform virus, RTBV; Rice tungro spherical virus, RTSV; Rice grassy stunt virus, RGSV; Rice ragged stunt virus, RRSV*) 바이러스의 발병빈도 및 피해가 매년 증가하고 있음
- 한편, 지구온난화에 따라서 열대지역에만 발생하는 바이러스인 RGSV, RTSV 및 RRSV 등이 이미 일본이나 중국 남부지역에 보고가 되고 있고, 아직 우리나라에서는 발견되지 않았으나 금후 발생 확산이 예상되므로 이를 현장에서 조기 진단할 수 있는 진단키트의 개발이 요구되는 실정임
- 벼 바이러스 병의 보독충 및 이병 식물체에 대한 바이러스 정밀진단법은 현재 개발되어 있으나 현장에서 직접 응용하기에는 부적합하며, 벼 바이러스 병의 대발생에 의한 피해를 예방하기 위하여 주요 벼 바이러스들을 조기 진단하여 대처할 수 있는 농가에서 응용이 용이한 항체진단키트의 제작 및 공급이 필요함
- 현재 다른 여러 중요 바이러스를 대상으로 한 진단막대(immuno-strip)이

판매되고 있으나 최근 큰 피해를 야기하는 벼 바이러스(RSV, RBSDV, RDV, RRSV, RGSV) 및 잠재 유입가능 바이러스를 포장에서 특이적으로 조기 진단할 수 있는 키트는 없는 실정임

- 따라서 각 벼 바이러스들을 특이적으로 진단할 수 있는 항체를 대량생산하여 현장에서 쉽게 응용이 가능한 진단막대의 대량 공급에 의한 조기진단 및 피해 예방이 필요함

제 3 절 연구개발의 내용 및 범위

1. 연구개발 목표

- 주요 벼 바이러스 검정용 특이 유전자 또는 유전자 부분 검정
- 주요 벼 바이러스 유전자 대량 생산용 클론제작
- 순화된 바이러스 유전자 산물을 이용한 항체 대량생산
- 벼 바이러스 특이항체를 이용한 진단 kit 개발
- 벼 바이러스 진단 kit의 포장 특이성 및 민감성 검정

2. 연차별 연구개발 목표와 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차 년도	2008 ~ 2009	RBSDV 및 RSV 진단 키트 제작	<ul style="list-style-type: none"> ○ 벼 바이러스(RBSDV, RSV, RDV) 확보, 동정 및 계통분석 ○ 확보 바이러스의 유전자 변이 검정에 의한 항체생산용 유전자 선발 ○ RBSDV 전장유전자 및 conserved region 대량 발현 ○ RBSDV 전장유전자 및 conserved region 항체 제작 ○ RBSDV 항체의 경제적 대량생산 체계 확립 ○ RBSDV immuno-strip 제작 및 특이성 /민감성 검정
2차 년도	2009 ~ 2010	기 제작 진단 키트의 특성 검정 및 벼 바이러스의 진단 기초연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ RSV 항체생산용 유전자 순화 ○ 확보 유전자의 항원능력 검정 ○ RSV 전장유전자 및 conserved region 대량 발현 ○ RSV 전장유전자 및 conserved region 항체 제작 ○ RSV 항체의 경제적 대량생산 체계 확립 ○ RSV immuno-strip 제작 ○ RSV immuno-strip의 특이성 및 민감성 검정

3. 연구추진 내용 및 계획

가. 연구추진 전략

- 연구목적의 달성을 위해 본 과제는 우리나라 벼에 침해하는 주요바이러스의 방제를 위한 산학협력의 응용, 현장 활용에 의한 애로해결 등의 종합적인 성격을 가지고 있기 때문에 관련분야 국내 전문가로 구성하여 추진하고자 함
- 이를 위하여 기산바이오텍에서는 고효율 항원성 바이러스 유전자 탐색 및 대량발현 연구 결과를 바탕으로 벼 바이러스 항체의 대량 생산과 이를 이용한 immuno-strip 제작 및 효율 검정을 수행함
- 서울대에서는 국내 주요바이러스 재료 제공, 바이러스 계놈분석정보, 고효율 항원성 바이러스 유전자 탐색 및 기능연구와 바이러스 유전자의 대량발현 및 항체 생성 연구를 수행함

나. 연구개발 내용

- 1) 벼 바이러스 유전자원 선발 및 분석
 - 주요 벼 바이러스인 RBSDV 및 RSV를 분리함
 - 이들 선발된 바이러스를 이용하여, 온실시험을 통해 장기 보존 및 분양용 유전자원을 확보함
- 2) 벼 바이러스의 계놈 분석
 - 바이러스에 감염된 식물체로부터 전체 RNA를 정제하고, 이를 주형으로 하여 RT-PCR 반응을 이용하여 증폭시킨 후, 벡터에 클로닝함
 - 클로닝 된 유전자의 염기서열 분석을 통해 유전자 정보를 확보함
- 3) 유전자 변이 검정 및 항체 생산용 유전자 선발
 - 분리, 확보된 RBSDV 및 RSV를 대상으로 계놈 염기서열 정보들을 확인하고 항원력을 검정함
 - 항원력 검정 결과를 바탕으로 항체생산용 유전자를 선발하고 대량발현 벡터에 클로닝함
- 4) 항원성 관련 유전자기능 연구
 - 항원생산을 위하여 선발한 유전자들의 감염정도 및 시기에 따른 기주세포 내 발현정도 및 관련 기능 등을 조사함
 - 안정적으로 바이러스 감염을 확인할 수 있는 체계를 확립함
- 5) 벼 바이러스 유래 항원단백질을 발현하는 재조합 벡쿨로바이러스의 제작
 - 선발된 항체 생산용 유전자를 벡쿨로바이러스의 계놈 상에 도입함으로써 강력한 다각체단백질 promoter의 조절 하에 대상 유전자를 대량으로 발현할 수 있는 재조합 벡쿨로바이러스를 제작함
- 6) 벼 바이러스 유래 항원단백질의 대량발현
 - 항체 생산용 유전자가 도입된 재조합 벡쿨로바이러스와 곤충 세포주를 이용하여 항원단백질의 대량발현 조건을 확립함
 - His-tag column 등의 affinity column을 이용하여 발현된 항원단백질의 정제법을 수립함

7) 벼 바이러스 항체 제작

- 대량발현 및 순수 분리된 항원단백질을 항체 제작용 실험동물에 주입하여 대상 바이러스에 대한 특이항체를 개발함

8) 벼 바이러스의 immuno-strip 제작

- 개발된 항체들과 대조구로 이용하는 바이러스들을 이용하여 검정용 항체 스트립을 개발하여 효과 검정 확인에 이용함
- 효과가 확인된 항체 스트립을 대량 생산하여 필요한 연구자나 현장에서 활용할 수 있게 공급함

9) Immuno-strip의 효율 검정

- 각 바이러스별로 바이러스의 감염 정도 및 시기에 따른 바이러스 검정 효율을 조사함

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 기술현황

- 우리나라 벼에는 벼줄무늬잎마름 바이러스 (RSV), 벼검은줄오갈병 바이러스 (RBSDV) 및 벼오갈병바이러스 (RDV)가 주요 피해를 유발하는 바이러스임
- RSV의 경우 1935년에 진주, 밀양, 구례지역에서 30~70% 발생한 것을 시작으로, 1964년과 1965년에는 전국 발병주율이 26~38%였고, 1972년과 1973년에 추풍령 이남지역에서 피해율이 5.1%로 보고되었음
- 또한, 2001년에 벼줄무늬잎마름병이 경기도 7개 시군에 발생하였고, 김포, 화성, 동탄 지역은 발병포장율이 80~100%였음
- 벼 RSV는 벼를 비롯하여 19종의 화본과 작물에 감염이 가능하며, 비 화본과 식물인 방동사니 대가리, 방동사니 및 넓은잎개수염에서도 감염됨
- 벼 RSV의 진단법은 유묘 검정법, 적혈구 응집반응법, 효소결합항체 진단법 (ELISA), 유전자 진단법 (RT-PCR), 면역탐침 진단법 (IC/RT-PCR), 간편 유전자 진단법 (VC/RT-PCR) 등이 개발되어 이용되고 있으나 공급이나 특이성의 제한으로 응용확대에 어려움이 있는 편임

제 2 절 국외 기술현황

- 전 세계적으로 벼 발생하는 바이러스는 벼줄무늬잎마름바이러스 (RSV), 벼 오갈병 (RDV), 벼검은줄오갈병 (RBSDV)의 4종 (RTBV, RTSV, RGSV, RRSV)이 발생하고 있음
- 벼 주요 재배지역인 베트남, 필리핀 등 동남아 지역은 우리나라에서 발생하고 있는 RSV, RDV, RBSDV가 발생하고 있지 않으며, 일본에서는 우리나라 및 동남아 지역에서 발생하는 바이러스 7종 모두 발생하고 있음
- yellowing syndrome은 베트남의 Mekong Delta지역에서 가장 큰 문제로 대두되고 있고 주로 RGSV에 의해 발생하며 일부 포장에서 RGSV와 RRSV에 의한 복합감염이 높게 나타남
- 이상 기후의 지속 또는 지구 온난화의 영향으로 RSV, RBSDV, RDV, RTBV, RTSV, RGSV 및 RRSV 등 7종 바이러스에 의한 포장감염률이 지속적으로 증가하고 있는 추세임
- 주요 바이러스들을 검정할 수 있는 기법을 개발하여 지적 재산을 확보하여 창출 가능한 이익을 선점하고 있는 추세이고 벼 바이러스 검정용 immuno-strip kit의 경우 가격이 상대적으로 고가여서 국내 포장에서 보편적으로 구입하여 응용하기에는 경제적 타당성이 없음

제 3 절 기술개발의 파급효과 및 금후의 전망

- 국내 쌀 시장규모는 약 11조 원이고, 바이러스에 의한 연간 피해액은 발병 포장에 따라 차이는 있으나 전체적으로 2~5% 내외의 피해를 유발하여 잠재 피해액이 2,000~5,000억 원인 것으로 추정됨
- 2007년 큰 피해를 입었던 충남 서천(2,441 ha) 및 전북 부안(2,016 ha)의 경우, 2007년 우리나라 ha당 쌀 생산량인 4.9톤의 50% 정도의 피해가 발생하여 피해액을 추산하면 전체 10,900톤의 수확 피해를 유발한 것으로 추정할 수 있음
- 중도매가(20 kg, 40,000원) 기준 피해액을 산정하면 서천과 부안의 피해액만 200억 원을 상회함
- 기상 온난화와 기보고 및 미기록 바이러스들에 의한 피해가 증가하는 추세임을 감안하면 향후 피해액은 늘어날 것으로 추정됨
- 최근 국제 쌀 가격이 하루에 30%씩 오르는 등 폭등세임
- 태국, 인도 및 미국 등 주요 쌀 생산국에서 쌀값이 꾸준히 상승하고 있고 일부 국가들은 수출을 중단하여 향후 추가 인상 여지가 많음
- 국내 쌀 소비량은 다소 감소하고 있으나 국내 생산량의 꾸준한 감소, 바이러스 등 병해충에 의한 추가적인 수확 감소 및 국제 여건 변화에 대응하기 위한 안정적인 수급 대책이 필요함
- 바이러스 검정용 immuno-strip의 경우, 해외 immuno-strip test kit의 보급가격은 test 당 8,000~10,000원이고, 국내 immuno-strip test kit 보급가격은 test 당 5,000원 정도임
- 피해 예방을 위한 각 벼 바이러스 별 최소 예상 immuno-strip의 수를 50,000개로 산정하였을 경우, 5개 주요 벼 바이러스 진단용 immuno-strip의 추정 시장규모는 test 당 3,000~5,000원에 공급 가정하여 매년 최소 10억 원임
- 따라서 년 10억 원 정도의 검정용 항체를 공급하여 잠재 예상피해(2,000~5,000억 원)를 50% 정도 예방할 수 있다고 산정하면, 농가의 고소득 증진 및 안정적 농업생산성 확보를 위한 농업기반을 조성하는데 기여할 수 있음
- Immuno-strip의 상대적인 가격 경쟁력과 효율검정에 의해 해외 주요 벼 생산국에 추가로 수출이 가능하며, 관련기술의 산·학 협력으로 국내 벤처기업 육성에 기여할 수 있음

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 벼 바이러스 항체 대량 생산

1. Rice black streaked dwarf virus (RBSDV)의 유전자 구조 분석

본 연구실에서 분리하여 확보하고 있는 국내 분리주 RBSDV의 genomic segment clone에 대해 염기서열을 분석한 결과, RBSDV의 10개 genome에는 총 12개의 ORFs가 존재하였으며, segment 7과 9에는 각각 2개의 ORFs가 나머지 8개의 segment에는 각각 1개의 ORF가 존재하는 것으로 나타났다. 12개의 ORFs 중 9개의 ORFs에 대하여 그 기능이 보고되었다 (표 1). 또한, 국내 분리주 RBSDV의 genome은 기존에 보고된 RBSDV의 genome과 각 segment 별로 90.1~98.1%의 상동성을 보임으로써 기존에 보고된 것과는 다른 genomic information을 가지는 새로운 isolate임을 시사하였으나, coding하고 있는 단백질의 amino acid 서열 수준에서의 변이는 그다지 크지 않은 것으로 판단되었다(Fang *et al.*, 2001; Isogai *et al.*, 1998; Qu *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2001).

표 1. 국내 분리주 RBSDV 유래 ORFs의 BLAST 검색

Seg. No.	ORF No.	Amino acids	name	Database similarity (Protein ID) (% aa identity)
S1	1	1464	RNA-dependent RNA polymerase	Mal de Rio Cuarto virus (AAO73182) (76-77% in 1464aa)
S2	2	1226	possible major core protein	Mal de Rio Cuarto virus (AAO73185) (83-84% in 1224aa)
S3	3	1146	unknown	Rice black streaked dwarf virus (AAL27009) (97% in 1146aa)
S4	4	1170	B' spike structural protein	Fiji disease virus (NP620461) (37% in 1173aa)
S5	5	937	P5 protein	Rice black streaked dwarf virus (NP620462) (98% in 937aa)
S6	6	793	P6 protein	Rice black streaked dwarf virus (AAM00194) (31% in 358aa)
S7	7	363	Probable non-structural 41.0 kDa protein	Maize rough dwarf virus (CAA39227) (91-92% in 362aa)
	8	310	Probable non-structural 36.3 kDa protein	Maize rough dwarf virus (CAA39227) (91-92% in 362aa)
S8	9	591	core protein	Fiji disease virus (AAD04815) (97-100% in 591aa)
S9	10	348	structural protein	Fiji disease virus (AAD04815) (36-37% in 348aa)
	11	209	P9-2	Rice black streaked dwarf virus (BAA25082) (97-99% in 209aa)
S10	12	558	capsid protein	Rice black streaked dwarf virus (AAL66346) (99% in 558aa)

12개의 RBSDV ORFs 중 RNA dependent RNA polymerase (RdRp)와 높은 상동성을 가지는 것으로 나타난 ORF1은 전체적으로 1,464개의 amino acid로 구성되어 있고, 기 보고된 다른 식물바이러스의 RdRp 유전자들과 최대 76~77%의 amino acid sequence상의 상동성을 보였다. 특히, RBSDV ORF1의 amino acid sequence 22번째부터 78번까지의 총 57개는 다른 식물바이러스들의 상동단백질과 3.5~17.5%로 지극히 낮은 상동성을 보였다 (그림 1). 한편, RBSDV ORF1의 전체 amino acid sequence를 대상으로 Koo 등(2008)의 방법에 따라 antibody epitope prediction (http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input)을 수행한 결과, 이 단백질의 amino acid sequence 중 predicted epitopes는 앞에서 분석된 특이부분과 거의 일치하는 것으로 나타났다 (그림 2).

```

1.RBSDV RdRp  M V E R K F S R S A E I C L K K F E S I O Q F R Q K R Q Q Q E A S T D K S H S Q N E K T K 45
2.MRCV RdRp  . . . Q S . . . . . T . . . . . K Q . . . K H K T E Q K L K N L I E E I K T T N G K T S Q 45
3.cypovirus RdRp . T T D . Y T T C G Y V D T . V S K D R R S S S K S D G D N K S N Y K N S A S K H U G . D V 45
4.FDV RdRp   . I V . T V C . A K . K . . E . Y K N . L K Y K E Q L A K . D Q K E N E T T . N . K D . S 45

1.RBSDV RdRp  S P G P R T S D S K K D S S T R Q N E N S F K C S P N F Q Q A K D E Y I Q L L H S K D V A 90
2.MRCV RdRp  H K R . F G K V T A . E K F L D I E K L K . Q V L Q . Q A . S E S . . A S K . L L . . S . 90
3.cypovirus RdRp N G H V . V C . T D D S H Y D D S T M A D D H D D Y R N C K V S S M A G T R K A K M T A K 90
4.FDV RdRp   . S V . K P . N F R . T K V Q N . Y N R V . S I D E K V A E Y E K I L N D K V N M I . A I 90

1.RBSDV RdRp  L D L I E K A E D I R N V F I G E L P L T Q E V I E N N L N D V A V V L H N A S D L I F 135
2.MRCV RdRp  M . G . . A N . . E . . . T L . . . I . . . R . I . . S K . K . I . L . . . . . L 135
3.cypovirus RdRp H C T R V A . V M K V V K T D D A K T K Y R Y A C R G . Y K R G R H T . S T D V . S V T Y 135
4.FDV RdRp   F N K A E K I R D L F I G T E P L T K E . I K N E L Q Y G A I V L N R A S D L I L A F A D 135

1.RBSDV RdRp  K L F Q S D N G I L Q E C V V P V N V I Q K D I F P V L H P S E I F D Y N G F G I D E T N 180
2.MRCV RdRp  . . . E M . G . . E K S . I I . I S . . E . . . G . . . . I . . . . . A . . . . V . 180
3.cypovirus RdRp T C M S G T A M T G V S H . S V . A M N N M M A R T S V D K K Y K S A R . U T A H N G D T 180
4.FDV RdRp   N N E P R E P E F V L N T D M I . . D L K P L L H . T R I F D Y S S F G F D D V V N K L A I 180

1.RBSDV RdRp  N L A I S P T I R Y L P N W N V Q K I R S T I D L L K N D S T V V K A R N L A S D F G L I 225
2.MRCV RdRp  . . . . N . K . . . . . . . . . . . D . . . K . . D . . S Y . . . K S . S K . Y . I V 225
3.cypovirus RdRp V W N A . G D R S T V M K N T N S A V . . A D R K R . . S V M T A Y G H V S K C N S Y D S 225
4.FDV RdRp   . P K . R Y L P N W S I . Y I R K C . Q . F F T S N S . I E V Q N L H N Y S N H Y D N R . 225

```

그림 1. 국내 분리주 RBSDV ORF1의 amino acid sequence 및 특이부분

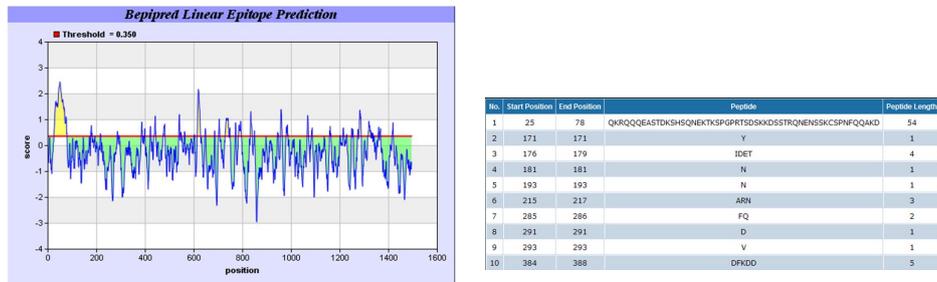


그림 2. 국내 분리주 RBSDV ORF1의 antibody epitope prediction

RBSDV의 ORF2인 major core protein의 경우 전체적으로 1,226개의 amino acid로 구성되어 있고, 기 보고된 다른 식물바이러스들의 그것과 최대 83~84%의 amino acid sequence상의 상동성을 보였다. 특히, RBSDV ORF2의 amino acid sequence 10번째부터 47번까지의 총 38개 amino acid sequence는 다른 식물바이러스들의 상동단백질과 5.3~31.6%로 낮은 상동성을 보였다 (그림 3). 이러한 ORF2의 특이부분은 antibody epitope prediction을 통해 분석된 predicted epitopes와도 거의 일치하는 것으로 나타났다 (그림 4).

2. 다각체단백질과 RBSDV 표지단백질 특이부분의 융합발현 및 항체 제작

RBSDV의 genomic segment 염기서열과 기존에 보고된 여러 식물바이러스의 염기서열간의 비교·분석을 통해 각각 RNA dependent RNA polymerase (RdRp) 및 major core protein과 높은 상동성을 가지는 것으로 나타난 ORF1과 2에 대해 기 보고된 식물바이러스의 상동단백질과 deduced amino acid sequences와의 비교를 통하여 가장 많은 차이점을 보이는 amino acid sequence 특이부분을 베쿨로바이러스 유전자 재조합 발현시스템을 이용하여 다각체단백질과의 융합단백질의 형태로 대량 발현시키고자 하였다.

RBSDV의 전체 RNA를 주형으로 ORF1에 특이적인 forward primer, anti 1-F (5'-GCAATTTAGACAAAAGAGACAAC-3')와 translation stop codon 및 제한효소 *Xba* I 인식서열이 포함된 reverse primer, anti 1-R (5'-GCGTCTAGATTAATCTTTG GCTTGTTGAAAATTT-3')을 각각 제작한 후 RT-PCR 반응으로 증폭한 후 baculovirus의 polyhedrin-fusion vector인 pBac9-PolhEKA의 제한효소 *Box* I 과 *Xba* I 의 위치에 삽입하여 전이벡터 pOB I -RBSDV1을 제작하였다 (그림 9). 이렇게 제작된 pOB I -RBSDV1은 베쿨로바이러스의 다각체단백질 promoter 하에서 다각체단백질과 RBSDV ORF1의 특이부분이 융합되어 있는 구조이다.

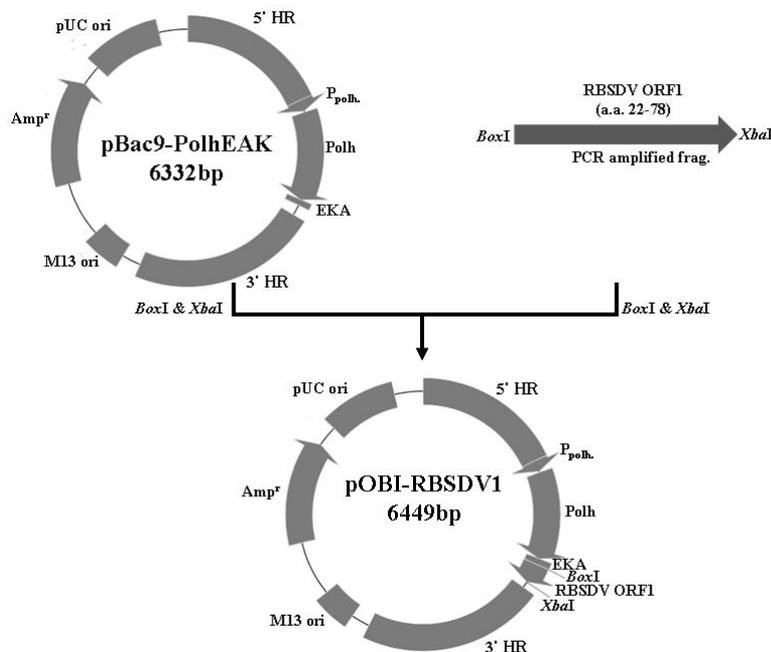


그림 9. 전이벡터 pOB I-RBSDV1의 제작과정 및 구조

RBSDV의 전체 RNA를 주형으로 ORF2에 특이적인 forward primer, anti 2-F (5'-GAACGCTAACCAAAACGA-3')와 translation stop codon 및 제한효소 *Xba* I 인식서열이 포함된 reverse primer, anti 2-R (5'-GCGTCTAGATTAGGGTGATGAC GTTTGTCT-3')을 각각 제작한 후 RT-PCR 반응으로 증폭한 후 baculovirus의 polyhedrin-fusion vector인 pBac9-PolhEKA의 제한효소 *Box* I 과 *Xba* I 의 위치에 삽입하여 전이벡터 pOB I -RBSDV2를 제작하였다 (그림 10). 이렇게 제작된

pOB I -RBSDV2는 베쿨로바이러스의 다각체단백질 promoter 조절 하에서 다각체단백질과 RBSDV의 ORF2의 특이부분이 융합되어 있는 구조이다.

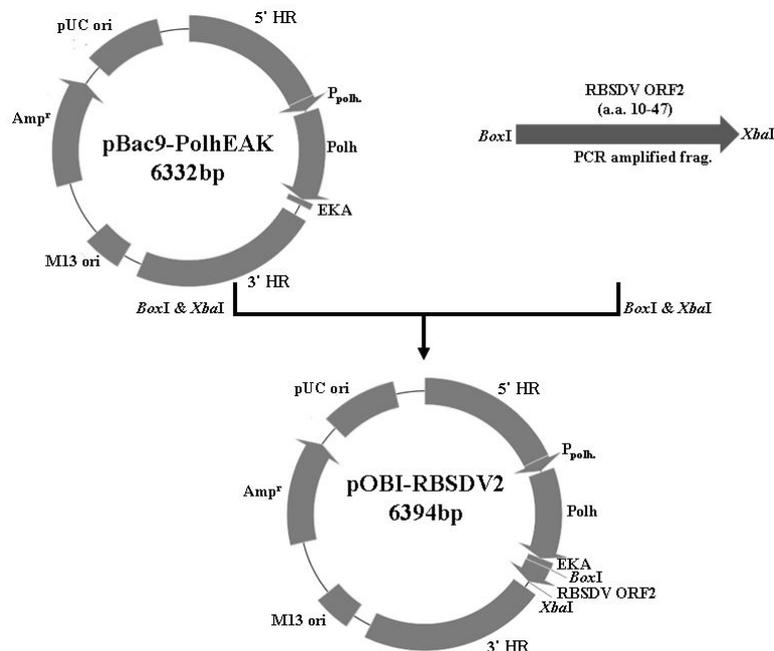


그림 10. 전이백터 pOB I -RBSDV2의 제작과정 및 구조

다각체단백질과 RBSDV ORF1 또는 ORF2의 특이부분의 융합 단백질을 각각 발현하는 재조합 베쿨로바이러스 ApPolhEKA-RBSDV1과 ApPolhEKA-RBSDV2를 제작하기 위하여, 전이백터 pOBI-RBSDV1 및 pOBI-RBSDV2 DNA 5 μ g을 각각 1 μ g의 bApGOZA genomic DNA와 함께 20 μ l의 Cellfectin (Invitrogen, USA)을 이용하여 제조사의 방법에 따라 Sf9 세포주에 각각 co-transfection 하고 plaque assay를 통하여 목적 재조합바이러스를 순수분리 하였다 (Je *et al.*, 2001; O'Reilly *et al.*, 1992).

이렇게 제작된 베쿨로바이러스 ApPolhEKA-RBSDV1 또는 ApPolhEKA-RBSDV2를 Sf9 세포에 접종하고, 접종 3~4일 후에 감염 세포를 수거하여 Laemmli (1970)의 방법으로 전기영동을 수행하였다. 그 결과, 감염 세포로부터 다각체 단백질과 RBSDV ORFs의 융합단백질이 발현되었으며, 또한 발현된 융합단백질이 재조합 베쿨로바이러스가 생성하는 다각체 내에 매립됨을 확인할 수 있었다 (그림 11). 발현된 RBSDV의 ORFs의 융합단백질은 다각체 정제와 electroelution 기법으로 용이하게 정제할 수 있었다 (그림 12).

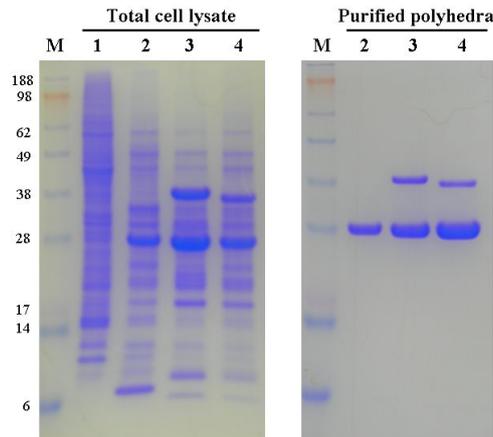


그림 11. 재조합바이러스 ApPolhEKA-RBSDV1 또는 ApPolhEKA-RBSDV2로부터 발현된 다각체단백질과 RBSDV ORF1 또는 2 특이부분의 융합 단백질의 SDS-PAGE. Lanes: M, Protein molecular weight marker (Invitrogen, USA); 1, mock-infected Sf9; 2, Sf9 infected with AcMNPV; 3, Sf9 infected with ApPolhEKA-RBSDV1; 4, Sf9 infected with ApPolhEKA-RBSDV2.



그림 12. 다각체단백질과 RBSDV ORF1 또는 2 특이부분의 융합 단백질의 정제. Lanes: M, Protein molecular weight marker (Invitrogen, USA); 1, fusion protein expressed by ApPolhEKA-RBSDV1; 2, fusion protein expressed by ApPolhEKA-RBSDV2.

Electro-elution 방법으로 분리한 다각체단백질과 RBSDV ORF1 또는 2 특이부분의 융합 단백질을 쥐에 주사하여 면역반응을 유도시킴으로써 RBSDV의 ORF1과 2에 대한 polyclonal 항체를 각각 생산하였다. 먼저 면역반응이 유도된 4마리 쥐에서 얻은 혈청은 바이러스에 감염되지 않은 Sf9 세포의 단백질 추출물에는 반응하지 않고 wild-type AcMNPV에 감염된 Sf9 세포의 단백질 중 다각체단백질과 각각의 융합단백질을 발현하는 재조합 벡로바이러스에 감염된 Sf9 세포의 단백질 중 다각체단백질 및 융합단백질에만 반응함으로써 polyclonal 항체가 생산되었음을 확인하였다 (그림 13, 14). 그러나, 이들 면역혈청은 1:30000 농도에서도 융합단백질뿐만 아니라 다각체단백질 또한 강하게 인식하는 것으로 확인되었다.

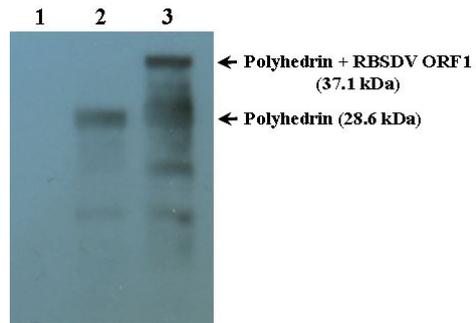


그림 13. RBSDV ORF1 polyclonal 항체를 이용한 Western blot 분석. Lanes: 1, mock-infected Sf9; 2, Sf9 infected with AcMNPV; 3, Sf9 infected with ApPolhEKA-RBSDV1.

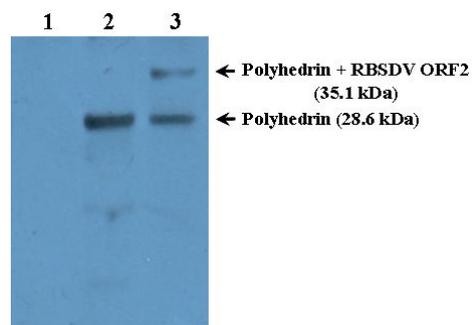


그림 14. RBSDV ORF2 polyclonal 항체를 이용한 Western blot 분석. Lanes: 1, mock-infected Sf9; 2, Sf9 infected with AcMNPV; 3, Sf9 infected with ApPolhEKA-RBSDV2.

3. RBSDV 표지단백질 특이부분의 단독발현 및 항체 제작

앞서 다각체단백질과 RBSDV 표지단백질 특이부분의 융합단백질을 항원으로 하여 제작된 면역혈청이 비목적 항원인 다각체단백질을 강하게 인식하는 결과로 비추어보아, 융합단백질을 이용하여 제작된 항체는 특이성에 문제가 있을 가능성이 대두되었다.

따라서, 국내 분리주 RBSDV의 ORFs 중 바이러스의 복제에 필수적이거나 구조단백질인 것으로 보고됨으로써 표지단백질로의 이용가능성이 가장 높을 것으로 추정되는 ORF1, 2, 9 및 12에 대해 predicted epitope을 중심으로 각 단백질의 특이부분을 벡로바이러스를 이용하여 단독발현 하고자 하였다.

이를 위해 ORF1의 경우 제한효소 *Bam*H I 인식서열이 포함된 forward primer, RBSDV-Spe1-BamHF (5'-CGCGGATCCATGGTGGAACGAAAGTTCA-3')와 단백질 정제를 위한 Histidine-tag 서열이 포함된 reverse primer, RBSDV-Spe1-6HisR (5'-ATGGTGATGGTGATGACTAGCTAAATTTCTTGCTTTGACAACACTG-3') 및 translation stop codon과 제한효소 *Xba* I 인식서열이 포함된 reverse primer, RBSDV-Spe1-StopXbaR (5'-GCGTCTAGATCAGTGATGGTGATGGTGATGACTAGCTAAATT-3')를 각각 제작하였다. 이들 primer를 이용하여 RBSDV의 전체 RNA를 주형으로 RT-PCR 반응으로 ORF1의 특이부분을 다량 합성하고 제한효소 *Bam*H I 과 *Xba* I 을 처리한 후 전이벡터 pDualBac의 동일 제한효소 위치에 삽입하여 전이벡터 pDualBac-RBSDV1SP를 제작하였다 (그림 15). 이러한 pDualBac-RBSDV1SP는 벡로바이러스의 다각체단백질 promoter의 조절 하에서 RBSDV ORF1 단백질 중 1번~220번 amino acid sequence region을 발현하며, 발현된 단백질은 C-terminal에 6His-tagging된 구조이다.

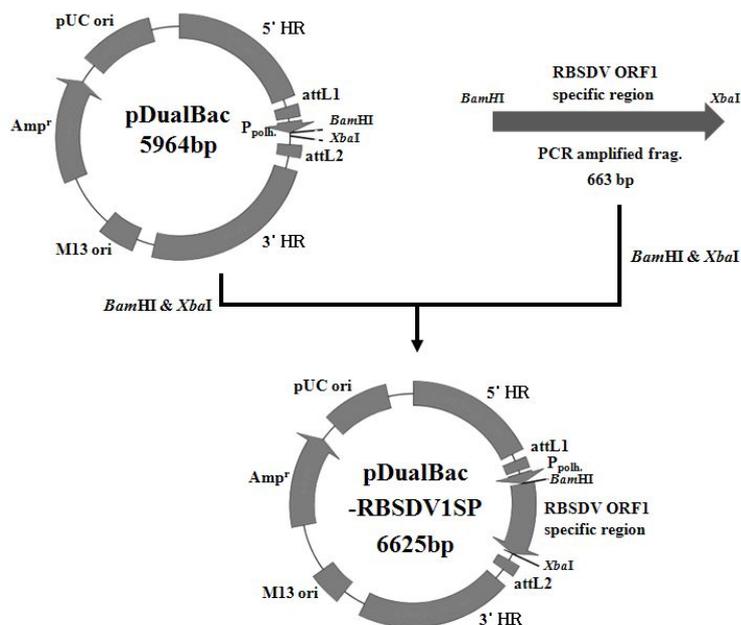


그림 15. 전이벡터 pDualBac-RBSDV1SP의 제작과정 및 구조

ORF2의 경우에는 *Bam*H I 인식서열이 포함된 forward primer, RBSDV-Spe2-BamHF (5'-CGCGGATCCATGAATTCTGAGGAGAAACGA-3')와 Histidine-tag 서열이 포함된 reverse primer, RBSDV-Spe2-6HisR (5'-ATGGTGATGGTGATGTGTGGGGTCTGTAATCTCAGGA-3') 및 translation stop codon과 *Xba* I 인식서열이 포함된 reverse primer, RBSDV-Spe2-StopXbaR (5'-GCGTCTAGATCAGTGATGGTGATGGTGATGTGTGG-3')를 각각 제작하고, 이들 primer를 이용하여 RBSDV의 전체 RNA를 주형으로 RT-PCR 반응으로 ORF2의 특이부분을 다량 합성하였다. 이렇게 증폭된 ORF2의 특이부분에 *Bam*H I 과 *Xba* I 을 처리한 후 전이벡터 pDualBac의 동일 제한효소 위치에 삽입하여 전이벡터 pDualBac-RBSDV2SP를 제작하였다 (그림 16). pDualBac-RBSDV2SP는 벡쿨로바이러스의 다각체단백질 promoter의 조절 하에서 RBSDV ORF2 단백질 중 1번~217번 amino acid sequence region을 발현하며, 발현된 단백질은 C-terminal에 6His-tagging된 구조이다.

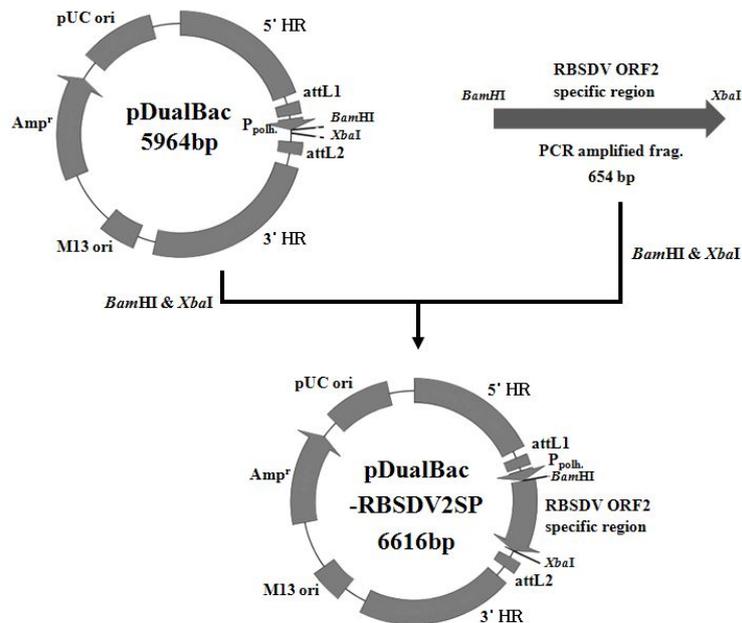


그림 16. 전이벡터 pDualBac-RBSDV2SP의 제작과정 및 구조

ORF9 특이부분의 단독발현을 위해서는 *Bam*H I 인식서열이 포함된 forward primer, RBSDV-Spe9-BamHF (5'-CGCGGATCCATGACTGGCACCCATGA-3')와 Histidine-tag 서열이 포함된 reverse primer, RBSDV-Spe9-6HisR (5'-ATGGTGATGGTGATGAACAGGTAATTTTCACGTTCTGTCA-3') 및 translation stop codon과 *Xba* I 인식서열이 포함된 reverse primer, RBSDV-Spe9-StopXbaR (5'-GCGTCTAGATCAGTGATGGTGATGGTGATGAACAGG T-3')를 각각 제작하였다. 이들 primer를 이용하여 RBSDV의 전체 RNA를 주형으로 RT-PCR 반응으로 ORF9의 특이부분을 다량 합성하고 제한효소 *Bam*H I 과 *Xba* I 을 처리한 후 전이벡터 pDualBac의 동일 제한효소 위치에 삽입하여 전이벡터

pDualBac-RBSDV1SP를 제작하였다 (그림 17). 이와 같은 pDualBac-RBSDV9SP는 베쿨로바이러스의 다각체단백질 promoter의 조절 하에서 RBSDV ORF9 단백질 중 1번~214번 amino acid sequence region을 발현하며, 발현된 단백질은 C-terminal에 6His-tagging된 구조이다.

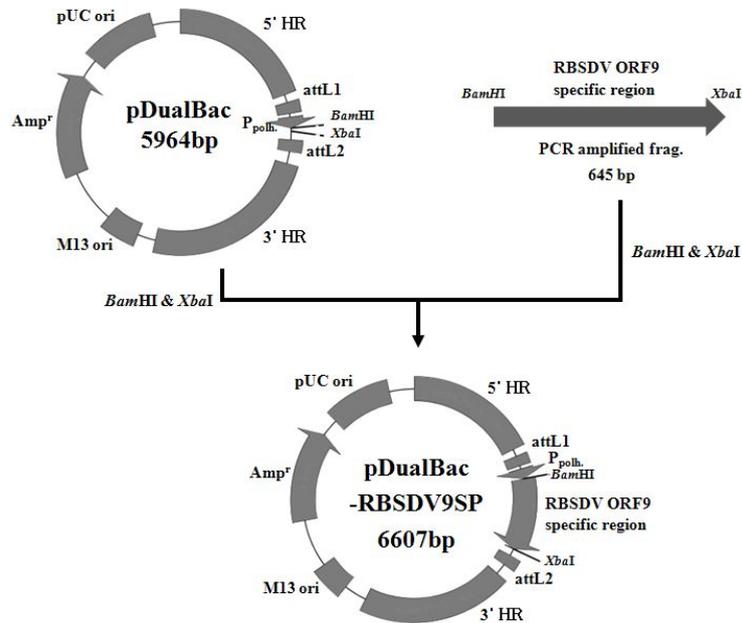


그림 17. 전이백터 pDualBac-RBSDV9SP의 제작과정 및 구조

ORF12의 경우 *BamH I* 인식서열과 translation start codon이 포함된 forward primer, RBSDV-Spe12-BamHF (5'-CGCGGATCCATGGGTTACGATTTTAATTGTCC TGCA-3')와 Histidine-tag 서열이 포함된 reverse primer, RBSDV-Spe12-6HisR (5'-ATGGTGATGGTGATGAATGTAATCAAACAAGGTACAGCCA-3') 및 translation stop codon과 *Xba I* 인식서열이 포함된 reverse primer, RBSDV-Spe12-StopXbaR (5'-GCGTCTAGATCAGTGATGGTGATGGTGATGAATGT AATCA-3')를 각각 제작하고, 이들 primer를 이용하여 RBSDV의 전체 RNA를 주형으로 RT-PCR 반응으로 ORF12의 특이부분을 다량 합성하였다. 이렇게 증폭된 ORF 12의 특이부분에 *BamH I* 과 *Xba I* 을 처리한 후 전이백터 pDualBac의 동일 제한효소 위치에 삽입하여 전이백터 pDualBac-RBSDV12SP를 제작하였다 (그림 18). 이렇게 제작된 pDualBac-RBSDV12SP는 베쿨로바이러스의 다각체단백질 promoter의 조절 하에서 RBSDV ORF12 단백질 중 219번~435번 amino acid sequence region을 발현하며, 발현된 단백질은 C-terminal에 6His-tagging된 구조이다.

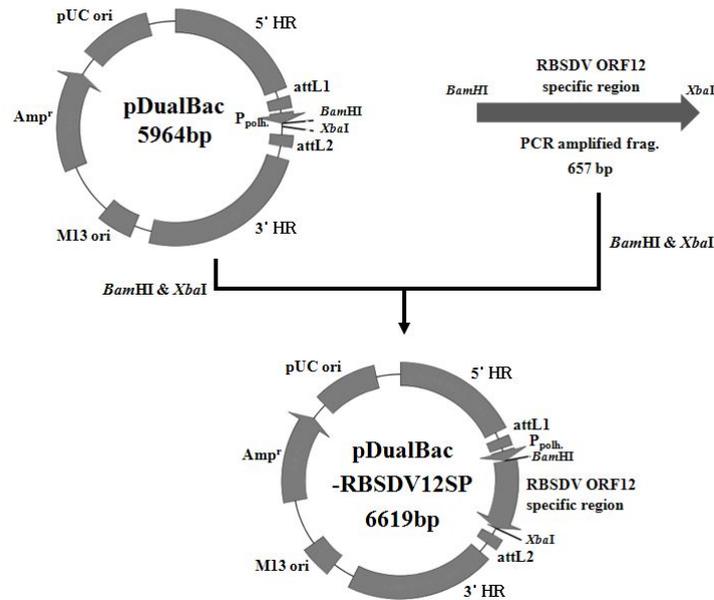


그림 18. 전이벡터 pDualBac-RBSDV12SP의 제작과정 및 구조

RBSDV의 ORF1, 2, 9 및 12의 특이부분을 발현하는 재조합 베쿨로바이러스들을 제작하기 위하여, 전이벡터 pDualBac-RBSDV1SP, pDualBac-RBSDV2SP, pDualBac-RBSDV9SP 및 pDualBac-RBSDV12SP DNA 150 ng을 각각 150 ng의 bEasyBac genomic DNA와 LR Clonase (Invitrogen, USA)를 이용하여 *in vitro* transposition 시키고, 이를 10 μ l의 Cellfectin (Invitrogen, USA)을 이용하여 제조사의 방법에 따라 Sf9 세포주에 transfection 하여 각각의 목적 재조합바이러스를 제작 하였다. 이렇게 제작된 각각의 베쿨로바이러스를 Sf9 세포에 접종한 결과, AcEasy-RBSDV2SP에 감염된 세포로부터는 RBSDV ORF2 특이부분의 발현을 확인할 수 없었으나, RBSDV ORF1, 9 및 12의 경우에는 약 25.0 kDa 정도의 목적단백질들이 각각 발현되었으며, 발현된 목적단백질은 insoluble fraction에 존재함을 확인할 수 있었다 (그림 19, 20, 21).

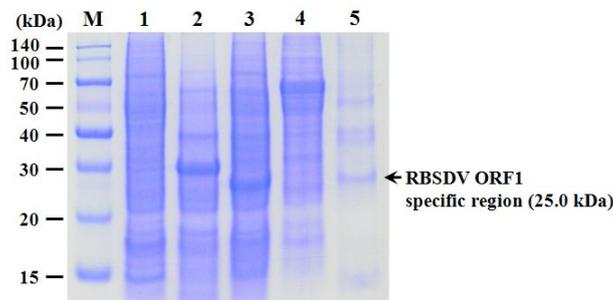


그림 19. 재조합바이러스 AcEasy-RBSDV1SP로부터 발현된 RBSDV ORF1 특이부분의 SDS-PAGE. Lanes: M, Protein molecular weight marker (Novagen, USA); 1, mock-infected Sf9; 2, Sf9 infected with AcMNPV; 3, Sf9 infected with AcEasy-RBSDV1SP (soluble fraction); 4, Sf9 infected with AcEasy-RBSDV1SP (insoluble fraction).

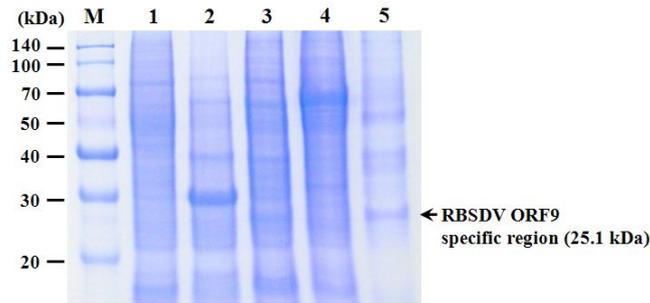


그림 20. 재조합바이러스 AcEasy-RBSDV9SP로부터 발현된 RBSDV ORF9 특이부분의 SDS-PAGE. Lanes: M, Protein molecular weight marker (Novagen, USA); 1, mock-infected Sf9; 2, Sf9 infected with AcMNPV; 3, Sf9 infected with AcEasy-RBSDV9SP (soluble fraction); 4, Sf9 infected with AcEasy-RBSDV9SP (insoluble fraction).

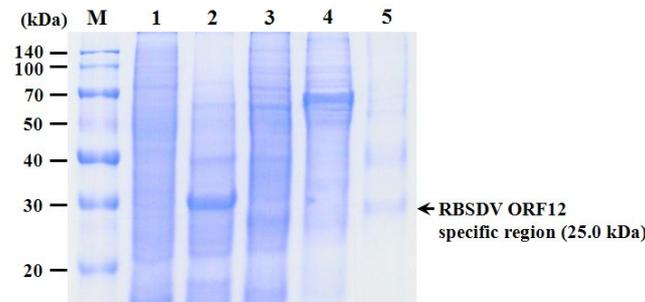


그림 21. 재조합바이러스 AcEasy-RBSDV12SP로부터 발현된 RBSDV ORF12 특이부분의 SDS-PAGE. Lanes: M, Protein molecular weight marker (Novagen, USA); 1, mock-infected Sf9; 2, Sf9 infected with AcMNPV; 3, Sf9 infected with AcEasy-RBSDV12SP (soluble fraction); 4, Sf9 infected with AcEasy-RBSDV12SP (insoluble fraction).

발현이 확인된 ORF1, 9 및 12 특이부분에 대하여, 각각의 재조합 벡로바이러스에 감염된 Sf9 세포를 감염 4일 후에 원심분리로 회수한 후, PBS로 1회 세척하였다. 회수한 세포를 Buffer B (8 M Urea, 100 mM sodium phosphate, 100 mM Tris·Cl, pH 8.0)로 가용화 시켰다. 가용화된 시료를 원심분리 하여 상등액을 취한 후, Ni-NTA Superflow Cartridge (Qiagen, Germany)와 FPLC (GE Healthcare, USA)를 이용하여 제조사의 방법을 따라 순수분리 한 결과, 약 25.0 kDa의 ORF1의 특이부분은 순수하게 분리할 수 있었으나, ORF9 및 12의 특이부분은 순수분리를 할 수 없었다 (그림 22, 23).

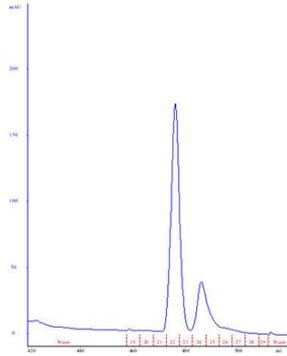


그림 22. Ni-NTA Superflow Cartridge를 RBSDV ORF1 특이부분의 분리

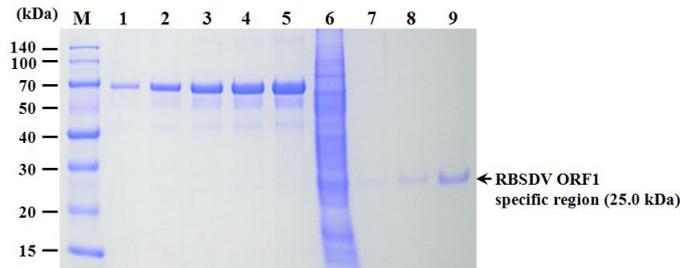


그림 23. 순수 분리된 RBSDV ORF1 특이부분의 SDS-PAGE. Lanes: M, Protein molecular weight marker (Novagen, USA); 1~5, BSA 1, 2, 3, 4, 5 ug; 6, Sf9 cells infected with AcEasy-RBSDV1SP; 7~9, FPLC fractions of RBSDV ORF1 specific region purified using Ni-NTA Superflow Cartridge.

His-tag column을 이용하여 분리한 RBSDV ORF1의 특이부분을 2마리의 토끼에 주사하여 면역반응을 유도시킴으로써 RBSDV의 ORF1에 대한 polyclonal 항체를 생산하였다. 면역반응이 유도된 토끼에서 얻은 혈청은 바이러스에 감염되지 않거나 wild-type AcMNPV에 감염된 Sf9 세포의 단백질 추출물에는 반응하지 않고 AcEasy-RBSDV1SP에 감염된 Sf9 세포의 단백질 중 ORF1의 특이부분에만 반응함으로써 polyclonal 항체가 생산되었음을 확인하였다 (그림 24).

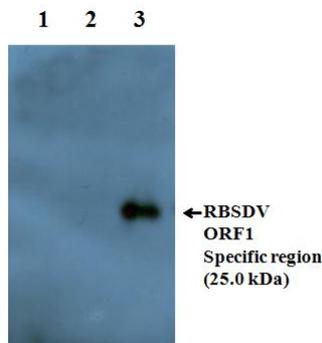


그림 24. RBSDV ORF1 polyclonal 항체를 이용한 Western blot 분석. Lanes: 1, mock-infected Sf9; 2, Sf9 infected with AcMNPV; 3, Sf9 infected with AcEasy-RBSDV1SP.

이렇게 두 마리의 토끼로부터 얻어진 RBSDV ORF1의 항체를 각각 AbRBSDV-ORF1SP-R1과 AbRBSDV-ORF1SP-R2로 명명하고, immuno-strip 제작 실험을 위하여 제1협동과제 연구기관인 (주)기산바이오텍에 분양하였다.

4. RBSDV 전장단백질 단독발현 및 항체 제작

베쿨로바이러스를 이용한 외래단백질의 발현 효율은 발현하고자 하는 목적단백질의 molecular weight가 클수록 낮아지는 경향이 있으며, 90 kDa 이상의 단백질은 사실상 대량 발현을 기대하기 힘든 것으로 알려져 있다. 앞서 국내 분리주 RBSDV의 ORFs 중 표지단백질로의 이용가능성이 가장 높을 것으로 추정되는 ORF1, 2, 9 및 12에 대해 특이부분을 다각체단백질과의 융합단백질이나 단독발현의 형태로 발현하였다. 그러나, 이 중 ORF1과 2의 경우 전장단백질의 크기가 100 kDa 이상이기 때문에 본 연구에서는 ORF9와 12를 대상으로 베쿨로바이러스를 이용하여 전장단백질을 단독발현 하고자 하였다.

국내에서 분리된 RBSDV의 ORF9를 발현하는 재조합 베쿨로바이러스의 제작을 위한 전이벡터 pDualBac-RBSDV9의 제작과 구조는 그림 25과 같다. RBSDV의 ORF9로부터 제한효소 *Xho*I 인식서열이 포함된 forward primer, RBSDV ORF9-*Xho*IF (5'-CGCCTCGAGATGACTGGCACCCATGA-3')와 histidine-tag 서열이 포함된 reverse primer, RBSDV ORF9-6HisR (5'-ATGGTGATGGTGATGTACAATAATCGA GGAAGCTTTTAG-3') 및 translation stop codon과 제한효소 *Kpn*I 인식서열이 포함된 reverse primer, RBSDV ORF9-Stop*Kpn*I (5'-GCGGGTACCTCAGTGATGGTGATGGTGATGTA-3')을 각각 합성하였다. 이들 primers를 이용하여 RBSDV의 전체 RNA를 주형으로 ORF9 유전자를 RT-PCR 반응으로 다량 합성하고 제한효소 *Xho*I 과 *Kpn*I 을 처리한 후 전이벡터 pDualBac의 동일 제한효소 위치에 삽입하여 전이벡터 pDualBac-RBSDV9를 제작하였다. 이렇게 제작된 pDualBac-RBSDV9는 베쿨로바이러스의 다각체단백질 promoter 하에서 C-terminal에 6His-tagging된 ORF9 전장단백질을 발현하는 구조이다.

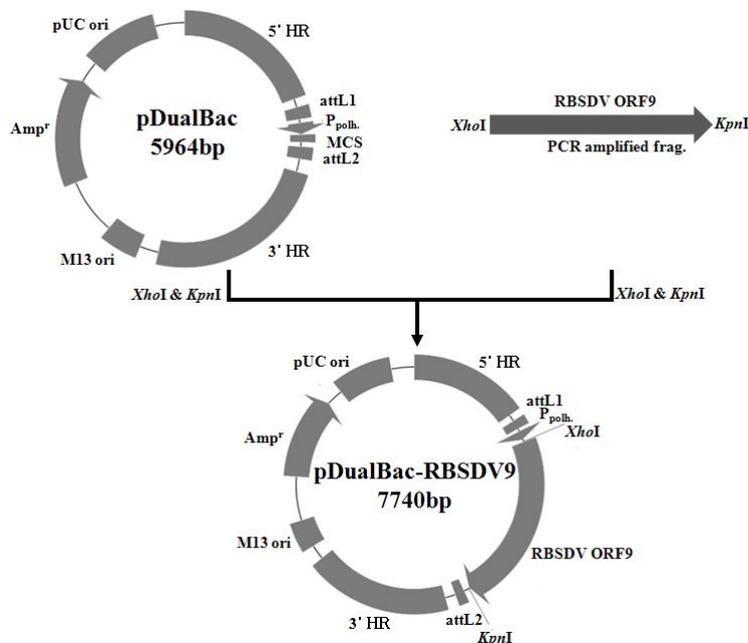


그림 25. 전이벡터 pDualBac-RBSDV9의 제작과정 및 구조

RBSDV의 ORF12를 발현하는 재조합 베쿨로바이러스의 제작을 위한 전이벡터의 경우에는, ORF12 염기서열로부터 제한효소 *Xho* I 인식서열이 포함된 forward primer, RBSDV ORF12-*Xho*IF (5'-CGCCTCGAGATGGCTGACATAAGACTCG-3')와 Histidine-tag 서열이 포함된 reverse primer, RBSDV ORF12-6HisR (5'-ATGGTGATGGTGATGTCCTTGTCACCTTTGTTTAATACTATCTTC-3') 및 translation stop codon과 제한효소 *Kpn* I 인식서열이 포함된 reverse primer, RBSDV ORF12-Stop*Kpn*I (5'-GCCGGTACCTCAGTGATGGTGATGGTGATGTC-3')을 각각 합성하였다. 이들 primers를 이용하여 RBSDV의 전체 RNA를 주형으로 ORF12 유전자를 RT-PCR 반응으로 다량 합성하고 제한효소 *Xho* I 과 *Kpn* I 을 처리한 후 전이벡터 pDualBac의 제한효소 *Xho* I 과 *Kpn* I 의 위치에 삽입하여 전이벡터 pDualBac-RBSDV12를 제작하였다 (그림 26). 이렇게 제작된 pDualBac-RBSDV12는 베쿨로바이러스의 다각체단백질 promoter 하에서 C-terminal에 6His-tagging된 ORF12 전장단백질을 발현하는 구조이다.

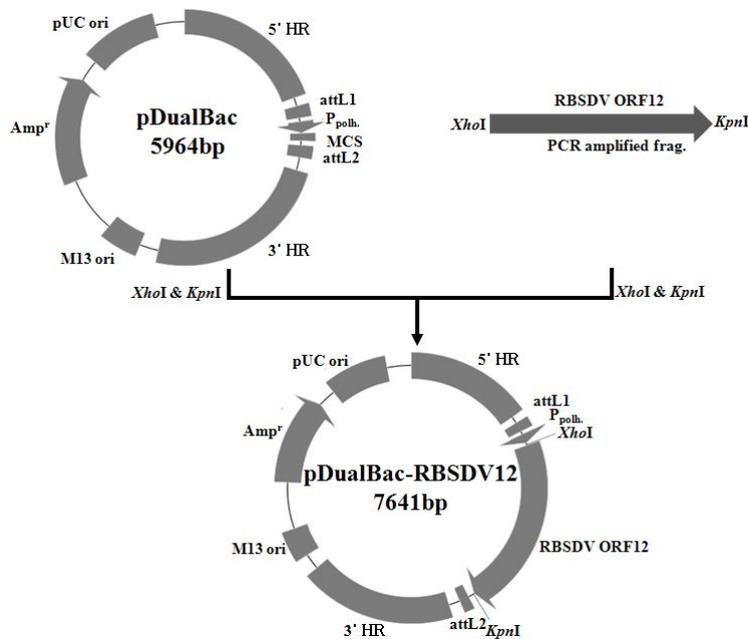


그림 26. 전이벡터 pDualBac-RBSDV12의 제작과정 및 구조

RBSDV의 ORF9 및 12 전장단백질을 발현하는 재조합 베쿨로바이러스 AcEasy-RBSDV9 및 AcEasy-RBSDV12를 제작하기 위하여, 전이벡터 pDualBac-RBSDV9 및 pDualBac-RBSDV12 DNA 150 ng을 각각 150 ng의 bEasyBac genomic DNA와 LR Clonase (Invitrogen, USA)를 이용하여 *in vitro* transposition 시키고, 이를 10 μ l의 Cellfectin (Invitrogen, USA)을 이용하여 제조사의 방법에 따라 Sf9 세포주에 각각 transfection 하여 목적 재조합바이러스를 제작 하였다.

이렇게 제작된 베쿨로바이러스 AcEasy-RBSDV9 및 AcEasy-RBSDV12를 Sf9 세포에 접종한 결과, AcEasy-RBSDV9에 감염된 세포로부터는 RBSDV ORF9 전장단백질의 발현을 확인할 수 없었으나, RBSDV ORF12의 경우에는 약 63.2

kDa의 목적 전장단백질이 발현됨을 확인할 수 있었다 (그림 27).

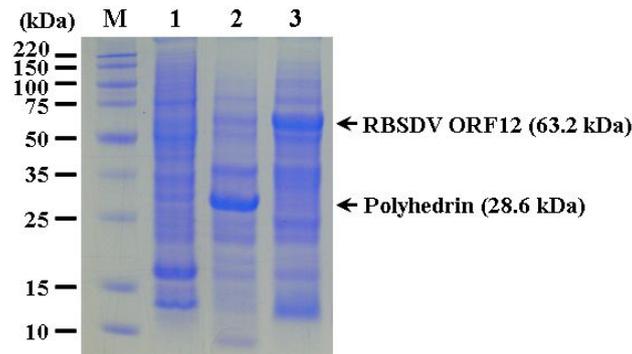


그림 27. 재조합바이러스 AcEasy-RBSDV12로부터 발현된 RBSDV ORF12 전장단백질의 SDS-PAGE. Lanes: M, Protein molecular weight marker (Novagen, USA); 1, mock-infected Sf9; 2, Sf9 infected with AcMNPV; 3, Sf9 infected with AcEasy-RBSDV12.

발현이 확인된 ORF12 전장단백질에 대하여, AcEasy-RBSDV12에 감염된 Sf9 세포를 감염 4일 후에 원심분리로 회수한 후, PBS로 1회 세척하였다. 회수한 세포를 NPI-10 binding/lysis buffer (50 mM sodium phosphate, 0.3 M NaCl, 10 mM imidazole, 1% Igepal CA-630, pH 8.0)로 가용화 시켰다. 가용화된 시료를 원심분리 하여 상등액을 취한 후, Ni-NTA Superflow Cartridge (Qiagen, Germany)와 FPLC (GE Healthcare, USA)를 이용하여 제조사의 방법을 따라 ORF12 전장단백질을 순수분리 하였다 (그림 28, 29).

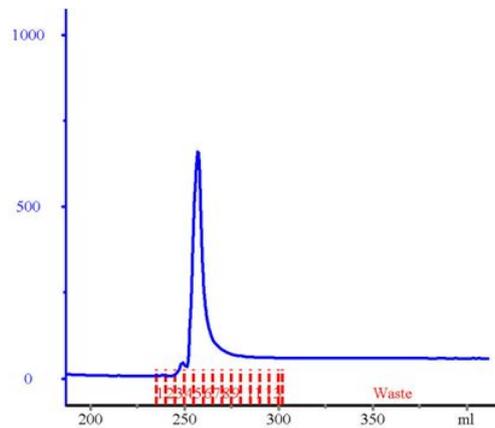


그림 28. Ni-NTA Superflow Cartridge를 RBSDV ORF12 전장단백질의 분리.

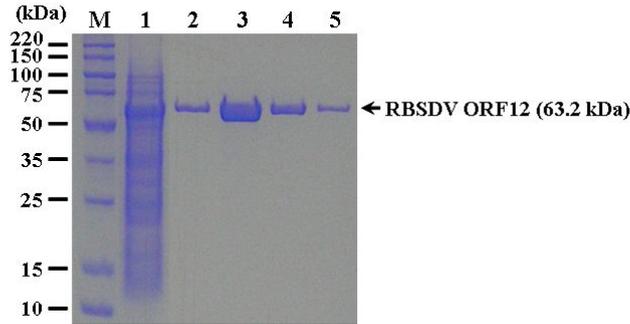


그림 29. 순수 분리된 RBSDV ORF12 전장단백질의 SDS-PAGE. Lanes: M, Protein molecular weight marker (Novagen, USA); 1, Sf9 cells infected with AcEasy-RBSDV12; 2-5, FPLC fractions of RBSDV ORF12 protein purified using Ni-NTA Superflow Cartridge.

His-tag column을 이용하여 분리한 RBSDV ORF12 전장단백질을 쥐에 주사하여 면역반응을 유도시킴으로써 RBSDV의 ORF12에 대한 polyclonal 항체를 생산하였다. 면역반응이 유도된 15마리 쥐에서 얻은 혈청은 바이러스에 감염되지 않거나 wild-type AcMNPV에 감염된 Sf9 세포의 단백질 추출물에는 반응하지 않고 AcEasy-RBSDV12에 감염된 Sf9 세포의 단백질 중 ORF12 전장단백질에만 반응함으로써 polyclonal 항체가 생산되었음을 확인하였고 (그림 30), 이 항체를 AbRBSDV-ORF12로 명명한 후 immuno-strip 제작 실험을 위하여 제1협동과제 연구기관인 (주)기산바이오텍에 분양하였다.

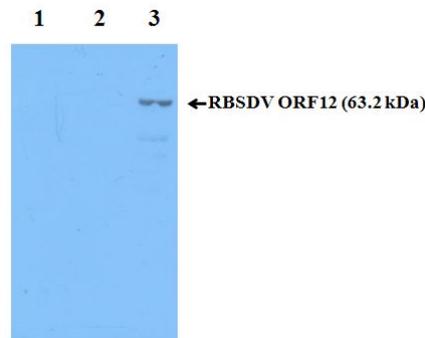


그림 30. RBSDV ORF12 polyclonal 항체를 이용한 Western blot 분석. Lanes: 1, mock-infected Sf9; 2, Sf9 infected with AcMNPV; 3, Sf9 infected with AcEasy-RBSDV12.

5. RBSDV 항체의 민감성 검정 및 특이성 최적화

앞서 제작된 RBSDV ORF1 특이부분(ORF1SP) 및 ORF12 전장단백질에 대한 항체의 민감성을 알아보기 위하여 각각의 항원단백질을 100 ng/well로 coating한 후 serial dilution한 항체를 반응시키고 2차 항체로 mouse 및 rabbit IgG-HRP를 이용하여 450 nm에서 ELISA assay를 수행하였다 (그림 31). 그 결과 두 항체 모두 1/100,000 dilution에서도 각각의 항원단백질에 대해 잘 반응함을 확인할 수 있었다.

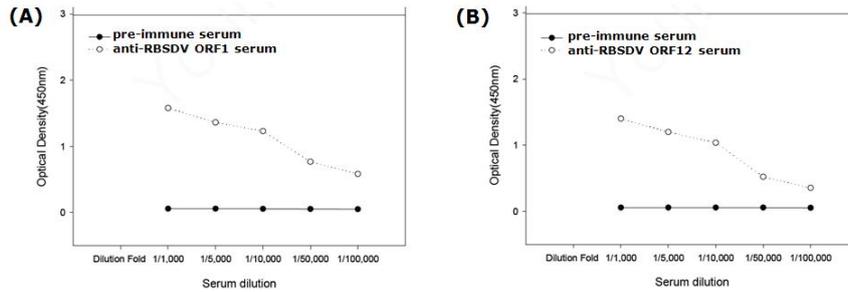


그림 31. RBSDV ORF1SP (A) 및 ORF 12 (B) polyclonal 항체에 대한 ELISA 분석

또한, RBSDV ORF1SP 및 ORF12에 대한 항체의 특이성을 최적화시키기 위하여 각각의 항체에 대해 wild-type AcMNPV에 감염된 세포를 matrix로 하여 pre-absorption을 실시하고, pre-absorption 과정을 거친 항체에 대해 최적 조건에 대한 연구를 수행하였다. 우선 최적의 blocking solution 농도를 알아보기 위하여 BSA의 농도가 각각 5, 10, 15 및 20%인 blocking solution을 준비한 후 각각의 항체를 이용하여 Western blot을 수행하였다 (그림 32). 그 결과, BSA의 농도가 증가할수록 background는 감소하는 것으로 나타났으나 positive control로 사용한 순수 분리된 항원단백질과의 반응 결과를 고려할 때 10%의 BSA 농도가 최적인 것으로 판단되었다.

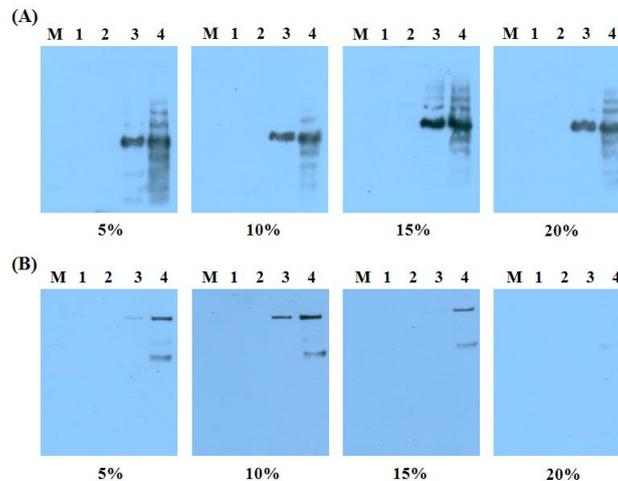


그림 32. RBSDV ORF1SP (A) 및 ORF12 polyclonal 항체의 blocking solution 농도 최적화.

Blocking solution의 농도를 BSA 10%로 고정하고 최적의 blocking 시간을 알아보기 위하여 각각 0.5, 1, 2 및 3시간동안 blocking을 실시한 후 Western blot을 수행한 결과, 두 항체 모두에서 blocking을 수행한 시간이 증가할수록 background는 감소하는 경향을 보였으며, 1시간 정도 blocking을 수행하는 것이 가장 이상적인 것으로 판단되었다 (그림 33).

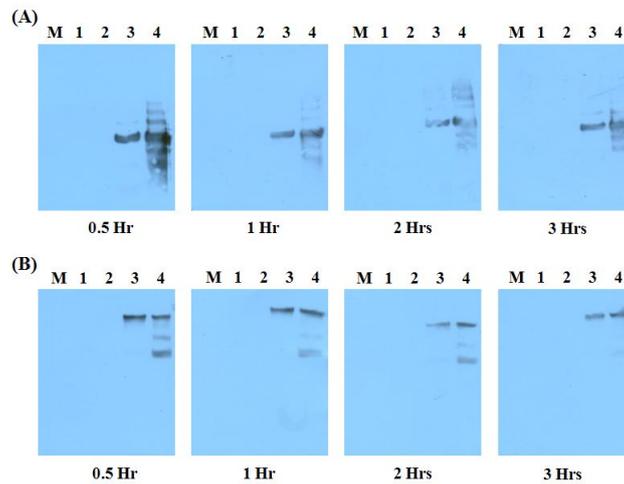


그림 33. RBSDV ORF1SP (A) 및 ORF12 polyclonal 항체의 blocking 시간 최적화.

BSA 10%의 blocking solution에 대해 pH를 각각 7, 8, 9 및 10으로 조정하고 1시간동안 blocking을 실시하여 최적의 blocking solution pH를 알아보았다 (그림 34). 그 결과, ORF1SP 항체는 pH 9.0에서 가장 우수한 결과를 보였으며, ORF12 항체는 pH 8.0에서 가장 이상적인 것으로 판단되었다 (그림 34).

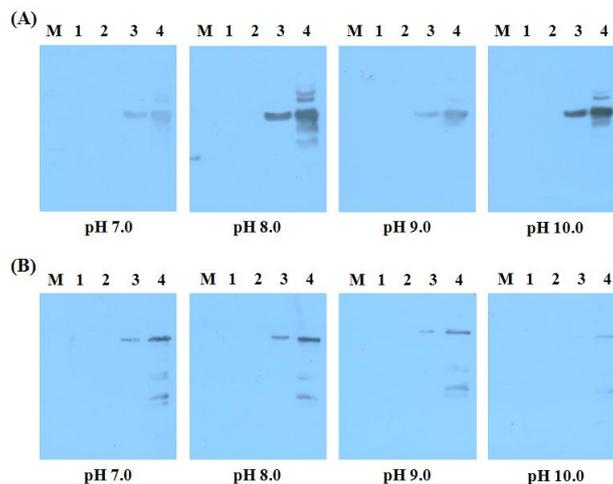


그림 34. RBSDV ORF1SP (A) 및 ORF12 polyclonal 항체의 blocking solution pH 최적화.

제 2 절 벼 바이러스 특이항체 생산용 고효율 유전자 선발

1. 주요 벼 바이러스 (RSV) 유전자원 확보

2008년 및 2009년 벼 바이러스 이병률 및 피해가 심각했던 전북 부안, 익산, 군산 지역과 전남 고창, 무안, 진도, 영광 및 충남 태안, 서천 지역의 *Rice stripe virus* (RSV) 이병 피해가 심각한 포장에서 주요 이병 벼 시료를 확보하여 바이러스 감염을 확인하였다 (그림 1).



그림 1. RSV에 감염된 벼 포장의 사진.

그림 2에서 보는 바와 같이 RSV 이병피해가 심한 포장에서는 바이러스의 매개충인 small brown plant hopper (SBPH)가 대량으로 발견되었으며 이로 인한 이차적인 감염의 진행도 빠르게 진행되고 있음을 확인할 수 있었다.



그림 2. RSV 감염피해가 심한 포장에서 흔히 발견되는 매개충인 SBPH.

RSV는 *Maize stripe virus* (MSV), *Rice hoja blanca virus* (RHBV), 그리고 *Rice grassy stunt virus* (RGSV)와 함께 *Tenuivirus*속에 속하는 바이러스로서 RNA1, 2, 3, and 4 등 총 4개의 RNA segment로 이루어진 바이러스이다 (Kakutani *et al.*, 1990;

Falk and Tsai, 1998; Haenni *et al.*, 2005; Koganezawa, 1977) (그림 3).

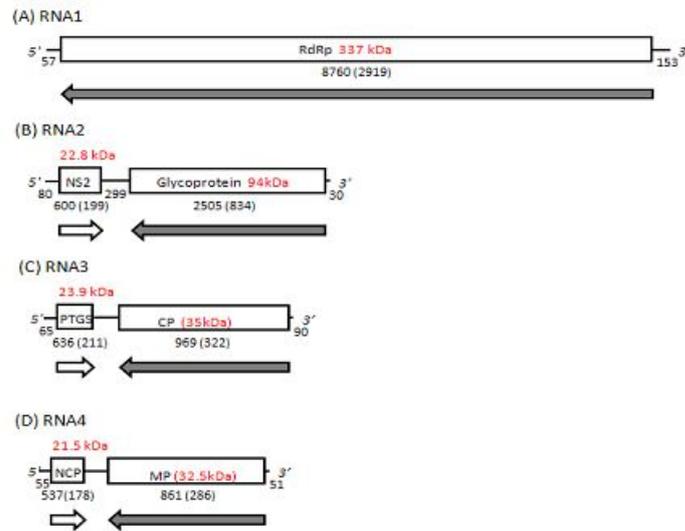


그림 3. RSV RNA1, 2, 3, 및 4의 게놈 구조. Schematic representation of the genomic organization of RSV RNA1 (A), RNA2 (B), RNA3, (C), RNA4 (D). Rectangular boxes indicate ORFs, showing the reported encoded genes with corresponding size in kilo-dalton (kDa). RNA dependent RNA polymerase (RdRp); Nonstructural 2 (NS2); Post-transcriptional gene silencing (PTGS); Coat protein (CP); Noncapsid protein (NCP); and Movement protein (MP). The line that connects the 2 rectangular boxes is the IGR. Only the value of RNA2 IGR was shown since IGR in RNAs 3 and 4 varied significantly among the 13 Korean-RSV isolates as shown in Table 5. The white and gray arrows indicate the direction of protein translation in the viral and viral complementary strands, respectively. The values below are the number of nucleotides and amino acids (enclosed) in each region in the RNA genome.

2. 벼 바이러스 (RSV)의 RNA2 및 RNA3의 계통분석

본 연구를 시작하기까지 한국에서 분리된 RSV의 genome정보는 외피단백질 (coat protein)등 일부 유전자 등에 대한 정보를 제외하고는, 전체계통 정보가 보고되어 있지 않았기 때문에, 실제 주요 이병포장에서 분리된 바이러스들을 대상으로 전체 계통을 분석하기 위하여 충남, 전북, 전남 및 제주 지역의 주요 이병포장에서 바이러스 균주들을 분리하였다 (그림 4).

이들 분리주들을 이용하여 4개의 RNA segment들 중 RNA2와 RNA3의 계통서열 분석을 진행하기 위하여 그림 5에 나타난 것처럼 기 보고된 염기서열 정보들을 이용하여 특이 프라이머들을 제작하여 이병시료에서 추출된 전체 RNA를 이용하여 RT-PCR에 의해 DNA 절편을 증폭하였으며 증폭된 DNA 절편들의 염기서열분석에 의하여 RNA2 및 RNA3의 전체 계통분석을 완료하였다 (그림 5).

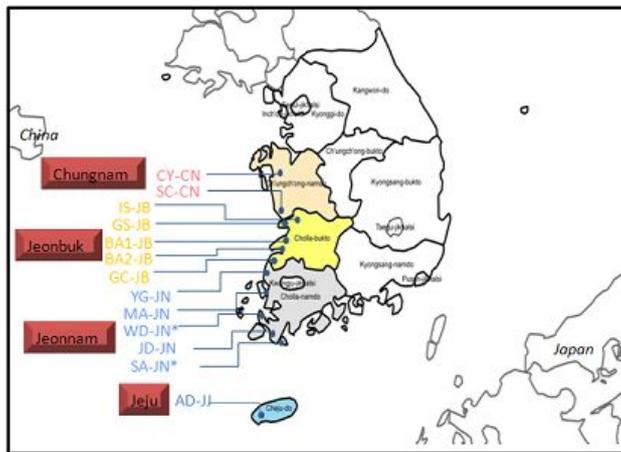


그림 4. 벼 바이러스 (RSV) 채집지역. Korea map showing the 13 RSV isolates in the 4 major provinces collected in 2007 and * 2008. Chungnam (CN) province includes Chongyang (CY), Seochon (SC); Jeonbuk (JB) includes Iksan (IS), Gunsan (GS), Buan1 (BA1), Buan2 (BA2), and Gochang (GC); Jeonnam (JN) includes Yeoggwang (YG), Muan (MA), Wando, (WD), Jindo (JD), and Shinan (SA); and andeok (AD) in Jeju (JJ).

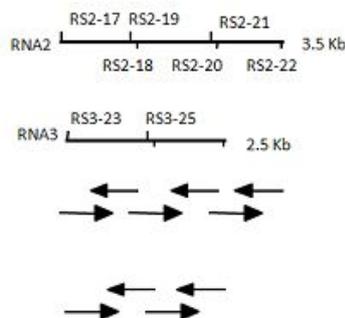


그림 5. RSV 계통분석에 이용된 프라이머. RNAs 2 and 3 segments and the strategy of sequence determination. Direction of arrows indicate the position of each fragments with specific primers sets.

3. 벼 바이러스 (RSV) RNA2 및 RNA3의 계통유전학적 분류

분석 완료된 RSV RNA2 및 RNA3의 계통 정보를 중국 및 일본에서 기 보고된 RSV 염기서열 정보들을 이용하여 계통유전학적 분류체계를 분석하였다 (Felsenstein, 1993; Hall, 1999; Saitou and Nei, 1987; Thompson *et al.*, 1994). 그림 6에 나타난 바와 같이 각 RNA들의 분류체계분석 결과는 지역 및 RNA segment 등에 따라 특이적으로 같은 그룹으로 분리되지 않고 일본 및 중국 균주 등과도 혼재하여 분류되는 것을 확인할 수 있었다 (Hibino, 1996; Toriyama, 2000). 이는 국내포장에 존재하는 RSV 분리주들이 이미 오랜 기간 타 지역 균주 등과의 혼재에 의한 심한 변이가 진행되고 있었음을 암시하는 결과로서 저항성 품종의 재배에 의한 바이러스 병의 피해 방제 노력이 저항성을 극복하는 새로운 변이주의 출현에 의해 깨질 수 있음을 암시하는 결과이다 (Garcial-Arenal and Fraile, 2003; Jeger *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2009).

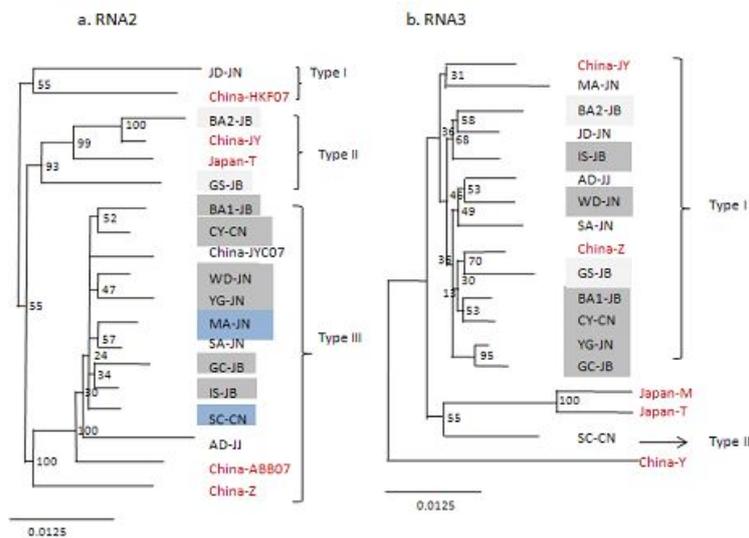


그림 6. Phylogenetic trees constructed based on complete genomic sequences of RNA2 (a) and RNA3 (b) of the 13 Korean, 1 Japanese and 5 Chinese isolates. Phylogenetic comparisons of the sequences were done with PHYLIP, version 3.5, using the neighbor joining method with a bootstrap value for each internal node, using 1,000 random replications. Isolates in box with same color denote different groups with similar RNA genome segment.

4. 자연적인 RSV RNA 절편들의 유전자 재조합을 찾기 위한 RT-PCR과 제한 효소를 이용한 분석 방법 개발

기존 연구를 통해 한국의 RSV가 여러 개의 그룹으로 나누어지는 것을 확인하였고, 중국과 일본의 RSV와 비교해 보았을 때 RNA절편 사이에 유전적 재조합이 일어날 가능성을 확인하였다 (Hamamatsu *et al.*, 1993; Toriyama *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2007). 한국의 RSV가 중국 또는 일본의 RSV로부터 유전적 재조합이 일어났는지 확인하기 위하여 RT-PCR과 제한효소를 이용한 기술을 개발하였다.

RSV의 RNA2와 RNA3의 제한 효소 위치를 알기 위해 기존에 발표된 13개의 한국 RSV의 염기 서열을 바탕으로 RNA2에 *EcoRI* 과 RNA3에는 *NdeI* 과 *AseI* 제한 효소 위치가 있는 것을 NEBcutter v. 2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) 인터넷 프로그램을 이용하여 확인하였다 (그림 7).

컴퓨터로 예측된 제한 효소 사이트를 확인하기 위하여 아래와 같은 RNA2와 RNA3 프라이머를 (RNA2 fragment: RS2-17F 5'-ACACAAAGTCCTGGGTATATAAG-3' and RS2-18R 5'-GAGGGATTGGCAGTTTGCCCTAT-3' with 1.3-kb product; RNA3 genome: RS3-23F 5'-ACACAAAGTCCTGGGTAAAATAG-3' and RS3-26R 5'-ACACAAAGTCWGGGTAATAAAAAT-3' with a 2.5-kb product) 이용하여 RT-PCR를 통해 RNA절편을 증폭하였다. 증폭된 PCR product는 각각의 제한효소를 이용하여 처리하였다. 제한 효소로 잘려진 PCR product를 전기연동으로 분리하여 결과를 확인하였다. 확인 결과 기존 계통학 연구와 비슷한 결과를 얻었다.

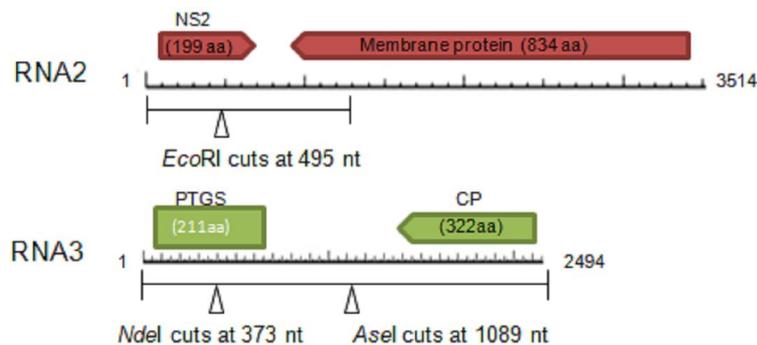


그림 7. Schematic representation of the genome organization of *Rice stripe virus* (RSV). The graduated lines represent the RNA segments, the rectangular arrowed boxes represent the gene encoded, and the values enclosed are the number of amino acid at viral and viral complementary-sense RNAs. Bar-ended lines in RNAs 2-3 show the specific region/genome amplified, and triangles point to the location of differentiating restrictions enzymes used to differentiate RSV subtypes. RNA1 fragment (nt 7413-8970) contained a part of the 5'-terminal region of the RdRp gene and the complete 3' -terminal noncoding region. RNA2 fragment (nt 1-1333) contained the 5' noncoding region, NS2 protein, and an intergenic region; the 3'-terminal region of Nvc2 codes for a membrane protein.

예를 들면 기존 연구에 의하면 RNA2는 세계의 그룹을 가지는 것으로 발표되었지만 제한효소 결과 *Spe* I 제한 효소 위치에 의해 단지 두 개의 그룹으로 나누어지는 것을 확인하였다 (그림 8A, 표1). IIC와 IIC에 속해있는 RSV의 경우 *Dra* I 제한효소 위치를 가지고 있지 않거나 가지고 있었다 (그림 8A). RNA3로부터 두 개의 제한 효소 위치를 발견했다. 동부 중국의 균주와 그룹을 이룬 한국 RSV의 경우 *Ase* I 와 *Nde* I 두 개의 제한 효소 위치를 동시에 가지고 있었다. 하지만 일본의 M이나 T균주의 경우 제한 효소 위치를 가지고 있지 않았다 (그림 8B, 표1). 예상과 달리 동부 중국의 균주와 그룹을 이루는 RSV의 경우 중국의 Y와 남서부 중국의 균주가 비슷하다는 결과를 얻었다.

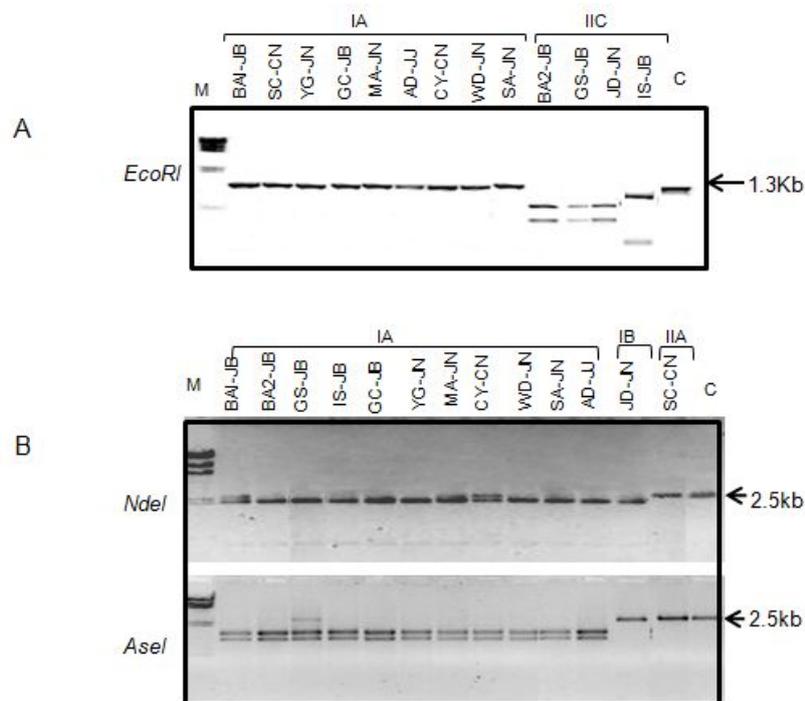


그림 8. Restriction enzymes analyses of different Korean *Rice stripe virus* (RSV) isolates RNA2 (A) and RNA3 (B) digested with *Eco*RI and *Ase* I/*Nde* I, respectively.

RSV의 RNA3를 제한효소로 처리한 결과 다양한 그룹으로 나눌 수 있기 때문에 이 기술을 새로운 RSV 샘플에 적용하였다. 한국의 4지역으로부터 대략 RSV에 감염된 식물 샘플로부터 RNA3 유전자를 증폭하였다. 총 14개의 병원성을 가지는 샘플을 2007년에서 2009까지 채취하였다. 제한효소로 처리한 결과 한국 RSV의 유전적 구조는 다양한 RSV의 그룹의 혼합으로 구성되어 있다는 것을 증명하였다 (그림 9).

표 1. Reassortment of RNA's 2-3 of the RSV-Korean isolates based on sequence, phylogenetic and RE analyses showing its distinctive ancestors^a.

Isolates	RNA2	RNA3
GS-JB	IIC	IA
SA-JN	IA	IA
JD-JN	IA	IB
SC-CN	IA	IIA
BA2-JB	IIC	IA
AD-JJ	IA	IA
MA-JN	IA	IA
CY-CN	IA	IA
WD-JN	IA	IA
BA1-JB	IA	IA
IS-JB	IA	IA
GC-JB	IA	IA
YG-CN	IA	IA

^aIsolates collected in 2007-2009.

^bEach type represents as follows: IA , Eastern China; IB , South Western China; IIA , Japan -M and -T; IIB, Japan -M; IIC, Japan T and 1A; shaded subtype showed the predominant subtype found in Korea.

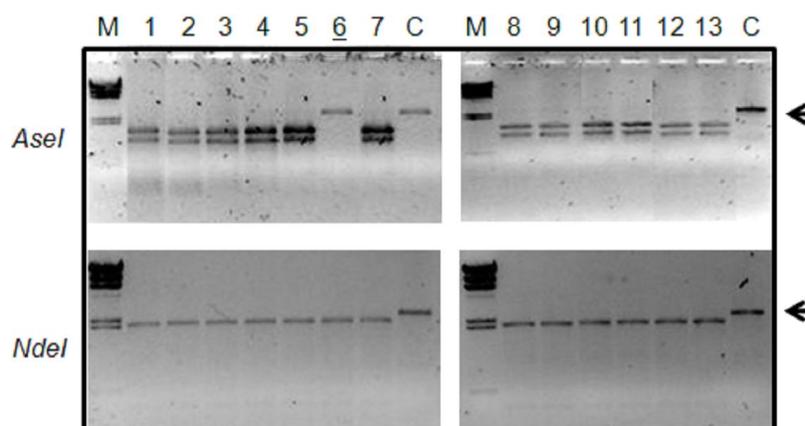


그림 9. Restriction enzyme analysis of amplified RNA3 from viruliferous insects. Total RNA was extracted from *Rice stripe virus* (RSV)-infected individual small brown planthoppers caught by aerial net traps in Buan, Jeonbuk (insects no. 1-7) and Taean, Chungnam (insects no. 8-13) provinces in early June 2009 and their amplified PCR product digested with *Ase* I and *Nde* I. M and C represent the *Hind*III-digested lambda DNA size marker and the 2.5-kbp undigested PCR amplified RNA3 genomic DNA (arrow), respectively.

제한효소 분석을 토대로 각각의 그룹에 속하는 대표 균주를 선택하여 그것들의 게놈 염기 서열을 분석하였다. 최소 3개의 서로 다른 클론을 분석하여 염기 서열을 결정하였다. 감염된 식물로 얻은 균주들은 BA-JB16, JD-JN6 (subtype IA)이고, TA-CN는 병원성 곤충으로 얻어졌고, SC-CN6, SC-CN70, and JD-JN4 (subtype

IB)는 곤충으로 얻어졌다. BA-JB6는 곤충 샘플로부터 얻어졌고, GS-JB16 (subtype II)는 감염된 식물로부터 얻어졌다. 계통학 분석 결과 선택된 RSV는 여러 그룹으로 나누어지는 것을 확인하였다 (그림 10).

표 1에서는 전체적인 계통수와 RT-PCR/RE 분석의 결과를 보여주고 있다. 이 결과 한국의 RSV는 크게 중국 또는 일본으로 유래되었다는 것을 알 수 있다. 또한 자세히 한국의 RSV는 다섯 개의 그룹으로 나누어지는 것을 알 수 있다. Eastern Chinese (IA) 과 Southwestern Chinese (IB), 또한 Type II는 일본의 M and T 의 mixture (IIA), Japanese M (IIB), Japanese T 와 Eastern Chinese 의 mixture (IIC) 등 세 그룹으로 나누어졌다. 이러한 결과는 아마도 중국이나 일본으로부터 온 애멸구로부터 전파되었다는 것을 추측할 수 있다.

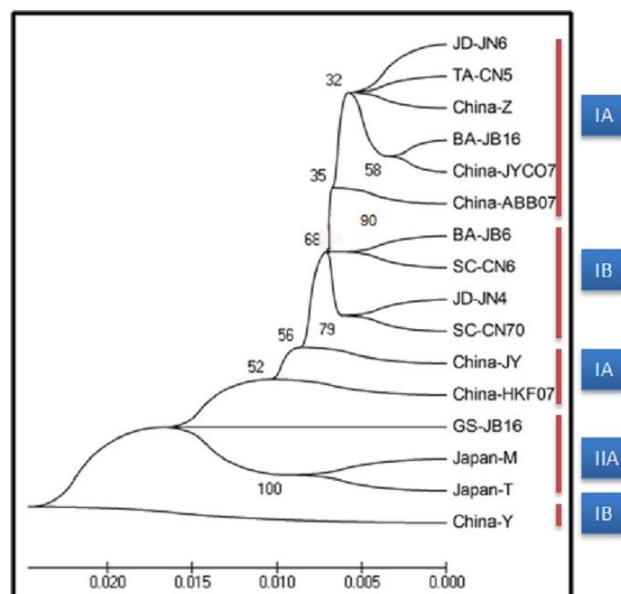


그림 10. Phylogenetic tree based on RNA3 nucleotide sequences of the new Korean *Rice stripe virus* (RSV) samples collected during 2007 - 2009, including Chinese and Japanese isolates. The clustering obtained from phylogenetic analysis corresponds to the subtypes identified by RE analysis. The tree was constructed with the neighbor-joining algorithm and a bootstrap value for each internal node based on 1,000 random replications using the Kimura two-parameter model implemented in MEGA version 4. Of eight Korean isolates, only two samples were obtained from insects (TA-CN5 and BA-JB6); the rest were all obtained from RSV-infected rice plant samples. Included in the analysis were 5 Eastern China- (Z, JY, JYCO7, ABBO7, and HKFO7), 1 Southwestern China-Y and 2 Japan- (M and T) RSV isolates.

5. Immuno-strip 제작에 필요한 항체 대량생산용 단백질 발현 및 순화

항혈청을 대량으로 생산하기 위하여 이병된 식물에서 바이러스의 검정에 유용하게 이용될 수 있는 NS2, NS3, NCP 및 CP 등의 유전자들을 선발하여 클로닝 하였다. 각 유전자의 크기 및 이용된 제한효소 등에 대한 정보는 아래 표 2에 나타난 바와 같다.

표2. 항혈청 대량생산 용 유전자 선발, 크기 및 이용된 제한효소

Segment	Protein	Mol Mass kDa	Product size (bp)	RE sites (pET vector)
RNA2	NS2	22.8	600	<i>EcoRI</i> / <i>Hind III</i>
	NSvc2-N termI	21.0	548	<i>EcoRI</i> / <i>Hind III</i>
RNA3	CP	35.0	969	<i>XbaI</i> / <i>Hind III</i>
	NS3	24.0	636	<i>EcoRI</i> / <i>Hind III</i>
RNA4	NCP	21.0	536	<i>EcoRI</i> / <i>Hind III</i>
	NSvc4	32.5	861	<i>EcoRI</i> / <i>Hind III</i>

각 선발된 유전자들을 대장균에서 대량으로 발현하기 위하여 pET vector를 이용하여 클로닝한 후 대장균에 형질전환하고 발현을 유도하여 대량발현 시켰다. 그림 11에 나타난 것과 같이 선발된 유전자 중 NS3와 NCP 유전자산물이 대량으로 생성되는 형질 전환된 대장균 균주들을 확보할 수 있었다.

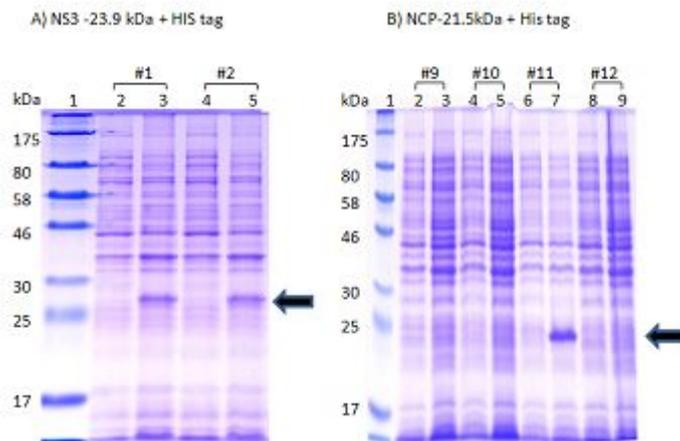


그림 11. Expression of pET-28-NS3 (A) and pET-GB-NCP (B) recombinant clones. Lanes 1, Marker; 2, 4, 6, 8 IPTG uninduced 3, 5, 7, 9, IPTG induced. All 5 clones tested for NS3 were expressed and only 1 clone for NCP out of 4 clones tested was expressed.

선발된 균주들을 이용하여 대량생성에 필요한 최적의 발현 조건을 확인하게 위하여 대장균의 배양온도 조건을 25°C, 30°C 및 37°C 등 세 조건에서 배양하여

발현량을 확인한 결과 큰 차이가 발견되지는 않았으나, 25°C 조건에서 상대적으로 많은 양의 soluble protein을 분리할 수 있음을 확인하였다 (그림 12, 13).

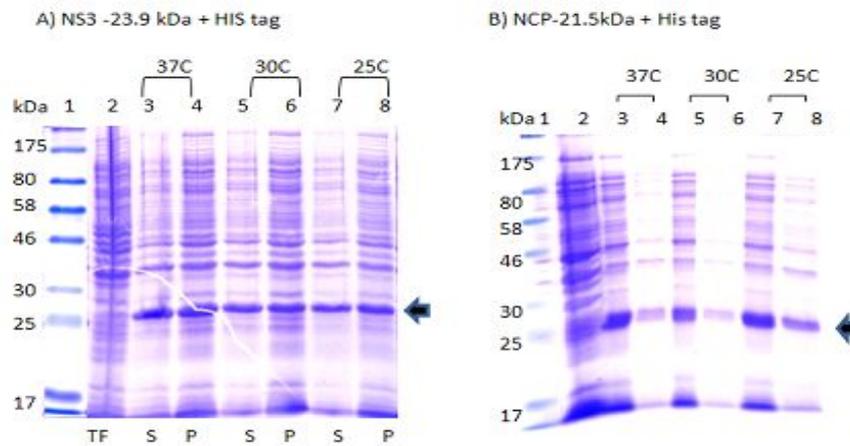


그림 12. Solubilization test of pET-28-NS3 (A) and pet-BG-NCP (B) recombinant clone under different temperature. Lanes 1, Marker; 2, Uninduced total fraction (TF); 3, 5, 7, induced supernatant (S); 4, 6, 8, induced pellet.

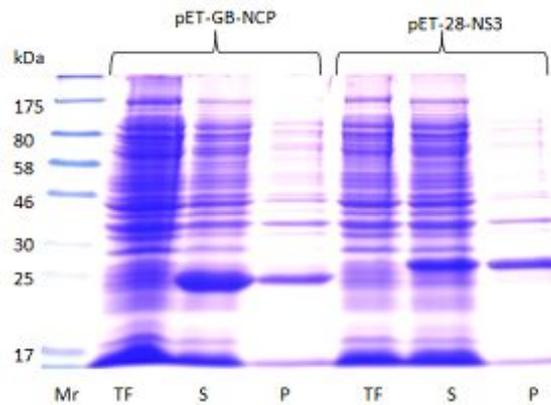


그림 13. Solubilization test of pET-28-NS3 (clone #1) and pet-BG-NCP (clone #11) recombinant clones under 25°C temperature. Mr, protein marker; TF, total fraction (IPTG uninduced), S, supernatant, P, pellet (IPTG induced).

위의 연구 결과 따라서 NS3와 NCP 단백질을 대량으로 발현하기 위하여 발현 유도 후 25°C에서 배양하여 각 단백질을 대량으로 His GraviTrap column을 이용하여 순화하여 확인하였다. 그림 14에서 확인할 수 있는 것처럼 soluble 한 각 단백질을 대량으로 순화할 수 있었다. 이들 순화된 단백질들은 항혈청 제작에 이용하여 그 특이성 등을 확인하였다.

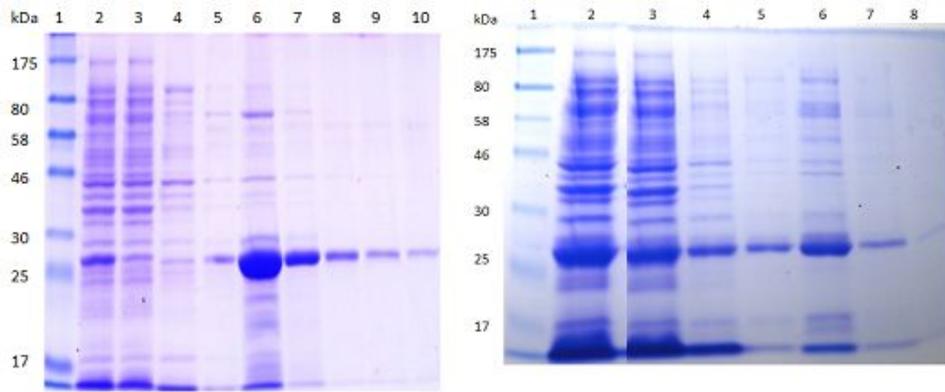


그림 14. Purification of pET-28-NS3 (A) and pET-GB-NCP (B) histidine-tagged proteins with His GraviTrap. (A) Lanes 1, Marker; 2, Total fraction; 3, Flow through; 4, Wash sample; 5 to 10 eluted sample (B) Lanes 1, Marker; 2, Total fraction; 3, Flow through; 4, Wash sample; 5 to 8 eluted sample

6. RSV 단백질에 대한 항체 생산

기존 연구에서 RSV 단백질을 생산하기 위하여 재조합 단백질을 만든 뒤 정제하여 그것을 antigen으로 이용하여 항체를 생산하였다. 또한, 기존의 재조합 단백질 방식 외에 합성 펩타이드를 antigen으로 사용하여 항체를 새롭게 생산하였다. 총 4개의 RSV 단백질의 amino acid sequence를 분석하여 그 중에서 각 단백질을 대표할 수 있는 두 개의 peptide들을 선발하여 항체를 생산하기 위한 antigen으로 사용하였다 (표 3).

생산된 항체들의 효율성을 알기 위하여 Western blot 실험을 수행하였다. 그림 15에서는 재조합 단백질을 이용하여 RSV NCP 단백질에 대한 항체를 생산하여 Western blot을 수행하였다. 서로 다른 RSV에 감염된 벼 단백질을 SDS-PAGE하여 blotting 후 NCP 특이적인 항체를 이용하여 6번과 8번 라인에서 21.5 kDa 사이즈를 가진 단백질을 확인할 수 있었다 (그림 15-A). 벼뿐만 아니라 두 개의 서로 다른 잡초 샘플로부터 단백질을 얻어 실험을 수행한 결과 RSV에 감염된 강아지풀에서도 효율적으로 원하는 단백질을 확인할 수 있었다 (그림 15-B). 비록 같은 양의 전체 단백질을 Western blot 실험에 사용했지만 바이러스 단백질 항체를 이용하여 확인된 단백질의 양이 다른 이유는 아마도 식물 속에 감염된 바이러스 양의 차이에서 기인할 수 있다.

합성 펩타이드를 이용하여 제작된 항체를 Western blot을 통해 효율성을 확인해 보았다. 반복된 실험을 통해 일정 비율의 농도로 항체를 희석 시킨 뒤 앞에서와 같이 RSV에 감염된 벼와 세 종류의 잡초로부터 단백질을 추출하여 Western blot을 수행하였다 (그림 16). 그 결과, NS3 단백질을 제외하고는 모든 바이러스 단백질 항체가 원하는 크기의 단백질 크기를 보여주었다. NS3의 항체로 발견된 단백질의 사이즈 경우 예상보다 크게 나왔는데, 이는 아마도 단백질이 응집되어서 나타나는 것으로 예상되었다. 몇몇 비특이 반응도 보였지만 대부분의 항체는 RSV를 강하게 찾아낼 수 있었다. 벼의 샘플뿐만 아니라 강아지풀에서 믿을 만한 데이터 결과를 얻었다. 하지만 다른 2개의 잡초로부터는 바이러스 단백질을 얻을 수 없었다. 본 연구로부터 얻어진 항체는 RSV의 진단 kit을 만드는 곳에 사용될 뿐만 아니라 immunoprecipitation, 단백질 정제 그리고 호스트 단백질 상호 작용 연구에도 응용될 수 있다. 한편, 이 중 효율이 우수한 두 종류의 항체 NCP-5+6-R2와 CP-2+5-R2를 선발하여 RSV 감염 판별을 위한 immuno-strip 제작 실험에 이용하였다.

표 3. List of RSV peptides identified by bioinformatic program for antibody production.

Protein	No.	Peptide sequences	Positiona	Length	Antibody
NCP	1	TLADLQKAINDISKD-C	8-22	16	
	2	KDKGGDTLAKDMTM-C	56-70	15	
	3	FVRDVTKKVKVAAGS-C	81-95	16	
	4	C-KKTMPEGKKKERGLTK	199-214	17	
	5	C-KKKEDGRKKVLDEF	237-251	16	○
	6	C-LVKEFFEDEAEGADD	308-322	16	○
NS3	1	MNVFTSSVGSVEFD-C	1-14	15	
	2	C-YIYDIHSSRHPSIDEHQ	41-58	18	
	3	C-SHDKNLPEEYRLPT	84-97	15	○
	4	C-DNRKTLYRSPSKKRHK	162-177	17	○
	5	C-KYVDSSALEPSPGSSP	193-208	17	
CP	1	MQDVQRTIEVSVGP-C	1-14	15	
	2	C-PDLKDPERVTEDTKK	38-52	16	○
	3	GGEDDDNALIDIG	93-105	13	
	4	KNFLRHPNRMSKDQIK-C	121-136	17	
	5	C-KAESSDTEEYKVVWKK	147-162	17	○
NSvc4	1	C-DLSEESQKRVDNKNRK	18-33	17	○
	2	KQDYSVKAHRKATFN-C	77-91	16	
	3	KSYVNSSDQVEVEVR-C	136-150	16	
	4	C-EFEPLEDKAINHLSS	218-232	16	
	5	C-KQPKKIPITKSKSEVS	267-283	18	○

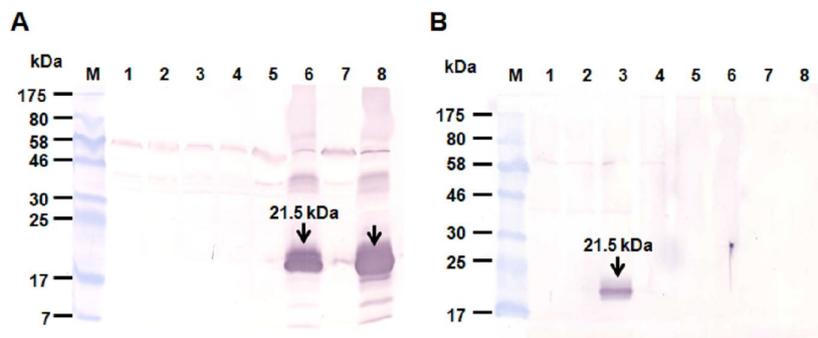


그림 15. Western blot analysis to detect *Rice strip virus* (RSV) using recombinant protein-antibodies. Proteins extracted from RSV infected rice and weeds were separated on SDS-PAGE gel. After blotting on the PVDF membrane, two protein-antibodies were applied for western blot analysis. Detection RSV in RSV infected rice (A) and weeds (B) by western blot analyses using anti-NCP antibody derived from the His-tag recombinant protein. (A) The rice samples were collected from Kimje (line 1-4) and Seocheon (line 5-6). Except sample 1 and 5, all samples were positive to RSV by RT-PCR detection. The weeds samples line 1-3 from green bristle grass (*Setaria viridis*) and line 4-6 from crabgrass (*Digitaria sanguinalis*) were collected from Anheung. And weed samples line 7-8 barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) were collected in Seosan. Except samples line 1 and 4, all samples were positive to RSV by RT-PCR detection. Anti-NCP antibody was diluted to 1:20000.

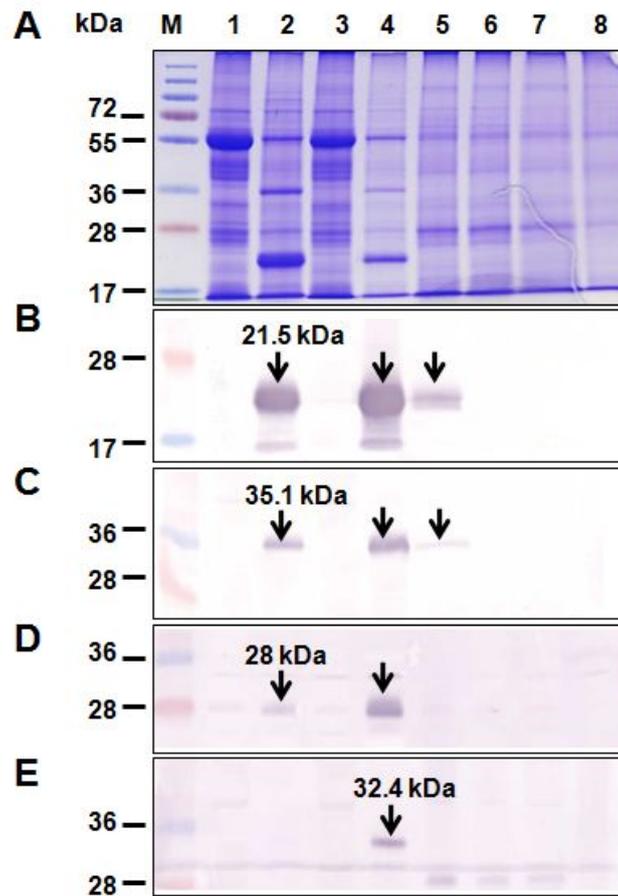


그림 16. Western blot analysis to detect RSV using peptide-antibodies. Proteins extracted from RSV infected rice and weeds were separated on SDS-PAGE gel. To visualize separated proteins, SDS-PAGE gel was stained with Coomassie Brilliant Blue (A). The blot on PVDF membrane was probed with peptide-antibody for NCP (B), CP (C), NS3 (D), and NSvc4 (E) proteins, respectively. Individual RSV viral protein was detected after reaction with freshly prepared NBT-BCIP substrate. M: Molecular marker. Lanes 1-4, rice samples collected from Seocheon region; Lanes 5-7, green bristle grass (*Setaria viridis*) samples collected from Anheung region; and Lane 8, crabgrass (*Digitaria Sanguinalis*) samples collected from Anheung region. Antibody dilution rates for NCP, CP, NS3, and NSvc4 proteins were 1: 50,000 titer, 1: 10,000 titer, 1: 1,000 titer, and 1: 1,000 titer, respectively.

제 3 절 Immuno-strip 제작 및 특이성 평가

1. 효소면역측정법 (ELISA)

가. 일반적인 DAS 및 compound 실험

우선, RBSDV를 일반적인 DAS 방법과 compound 방법으로 실험하였다. 일반적인 DAS 실험은 다음과 같이 수행하였다. 항체를 coating buffer에 1:200 비율로 희석하여, 각 well에 100 μ l씩 채웠다. 이것을 4°C에서 overnight하여 coating한 후, wash buffer로 세척하였다. 그리고 RBSDV의 positive와 negative sample을 extraction buffer에 넣고 갈아서 즙을 낸 뒤에 각 well에 100 μ l씩 넣고 실온에서 2시간 incubation하였다 (A,B - blank, C,D,E - negative, F,G,H - positive). Incubation이 끝나기 10분 전에 conjugate Ab와 ECI buffer를 1:200의 비율로 희석시킨 뒤, washing이 완료된 plate에 100 μ l 씩 분주하여 실온에서 2시간 incubation하였다. Incubation이 끝나면 washing을 하고 마지막으로 PNP solution을 100 μ l씩 넣어주고, 실온에서 30분 정도 두었다가 ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 O.D값을 측정 하였으며, 그 결과는 아래와 같이 뚜렷한 반응을 확인할 수 없었다.

	1	2
A	0.219	0.222
B	0.193	0.209
C	0.219	0.196
D	0.248	0.235
E	0.252	0.242
F	0.341	0.297
G	0.330	0.283
H	0.303	0.257

$$CV = 17.6\%$$

한편, 일반적인 compound 실험은 다음과 같이 수행 하였다. 항체를 coating buffer에 1:200 비율로 희석하여 각 well에 100 μ l씩 채우고, 이것을 4°C에서 overnight하여 coating한 후, wash buffer로 세척하였다. 그리고 RBSDV의 positive와 negative sample을 extraction buffer에 넣고 갈아서 즙을 낸 뒤에 각 well에 100 μ l씩 넣고 실온에서 2시간 incubation 하였다 (A,B - blank, C,D,E - negative, F,G,H - positive). Incubation이 끝나기 10분 전에 ECI buffer와 Ab, 그리고 secondary Ab를 1:200의 비율로 희석시킨 뒤 washing이 완료된 plate에 100 μ l 씩 분주하여 실온에서 2시간 incubation하였다. Incubation이 끝나면 washing을 하고 마지막으로 PNP solution을 100 μ l씩 넣어준 후, 실온에서 30분 정도 두었다가 ELISA reader로 405 nm에서 O.D값을 측정 하였으며, 그 결과는 DAS 실험과 마찬가지로의 결과를 얻었다.

	1	2
A	0.197	0.175
B	0.151	0.142
C	0.211	0.272
D	0.236	0.219
E	0.236	0.226
F	0.294	0.305
G	0.298	0.296
H	0.281	0.251

CV = 21.5%

이러한 결과는, 일반적인 DAS 방법(실험 1)과 compound 방법(실험 2)에 있어 특별한 조건을 맞추지 않고 실험을 수행했기 때문에 예상된 결과가 잘 나오지 않은 것으로 판단되었다. 따라서 효율적인 항원-항체 반응을 유도하기 위해서 다음의 다양한 조건 실험을 수행할 필요가 있었다.

나. compound 실험 3

이 실험은 Ab와 secondary Ab와의 비율 그리고 buffer와 각 Ab의 희석비율을 조절하였으며, Ab와 secondary와의 비를 1:1, 1:2, 1:3으로 실험을 수행하였다.

RBSDV

1:1	1:1	1:1	1:1
1:1	1:1	1:1	1:1
1:1	1:1	1:1	1:1
1:2	1:2	1:2	1:2
1:3	1:3	1:3	1:3
1:1	1:1	1:1	1:1
1:2	1:2	1:2	1:2
1:3	1:3	1:3	1:3

1:500 1:200 1:500 1:200 ← secondary 희석비율

	1	2	3	4
A	0.106	0.245	0.082	0.170
B	0.110	0.258	0.123	0.190
C	0.116	0.238	0.124	0.216
D	0.161	0.214	0.105	0.226
E	0.146	0.181	0.056	0.216
F	0.411	0.728	0.343	0.811
G	0.424	0.698	0.385	0.742
H	0.468	0.661	0.281	0.776

CV = 72.6%

실험 결과, 1:200로 희석한 것이 O.D 값이 조금 더 높게 나왔고, secondary의 농도가 낮을수록 O.D 값이 조금 더 높게 나왔다. 전체적인 결과 값은 낮지만 그 중에서 잘 나온 것을 보면 1:200에서 1:1이 가장 높은 것을 확인할 수 있었다.

다. compound 실험 4

실험 3과 동일한 실험으로 Ab와 secondary Ab와의 비율 및 buffer와 각 Ab의 희석비율을 각각 조절 하였으며, 특히 Ab와 secondary와의 비율 1:1, 1:0.75, 1:0.5로 하여 실험을 수행 하였다.

RBSDV

1:1	1:1	1:1	1:1
1:1	1:1	1:1	1:1
1:1	1:1	1:1	1:1
1:0.75	1:0.75	1:0.75	1:0.75
1:0.5	1:0.5	1:0.5	1:0.5
1:1	1:1	1:1	1:1
1:0.75	1:0.75	1:0.75	1:0.75
1:0.5	1:0.5	1:0.5	1:0.5

1:500 1:200 1:500 1:200 ← secondary 희석비율

	1	2	3	4
A	0.358	0.634	0.379	0.448
B	0.316	0.570	0.342	0.415
C	0.389	0.682	0.429	0.502
D	0.321	0.632	0.267	0.569
E	0.368	0.447	0.314	0.431
F	0.606	0.945	0.609	0.789
G	0.431	0.890	0.405	0.767
H	0.449	0.595	0.397	0.611

CV = 33.2%

본 실험에서는 1:500보다 1:200로 희석한 것이 O.D 값이 조금 더 높게 나왔고, secondary의 농도가 높을수록 O.D 값이 더 높게 나왔다. 즉 1:200에서 1:1이 가장 효율적임을 확인할 수 있었다.

라. compound 실험 5

RBSDV의 O.D값을 약 1.9로 올리고, secondary도 약 1.9로 동일하게 맞춰서 ECI buffer와 Ab와 secondary의 비율을 1:200으로 실험하였다.

	1	2
A	1.563	1.511
B	1.783	1.658
C	1.579	1.822
D	1.637	1.666
E	1.656	1.553
F	2.466	2.612
G	2.559	2.898
H	2.604	2.750

CV = 24.7%

결과에서 나타나는 것처럼 Ab와 secondary의 O.D값을 올릴 경우 positive 값이 높게 나오지만 blank와 negative도 같이 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

마. compound 실험 6

실험 5의 결과를 기초로 하여, 본 실험에서는 RBSDV의 O.D값을 약 0.4로 내리고, secondary도 약 0.4로 동일하게 맞춰서 ECI buffer와 Ab와 secondary의 비율을 1:200으로 실험하였다.

	1	2
A	0.299	0.233
B	0.342	0.161
C	0.494	0.377
D	0.550	0.386
E	0.530	0.306
F	0.853	0.616
G	0.842	0.575
H	0.800	0.577

CV = 41.5%

실험 결과, 각 Ab의 농도가 낮아졌기 때문에 positive와 negative의 O.D 값이 전체적으로 모두 낮아졌음을 확인할 수 있었다.

바. compound 실험 7

본 실험은 coating 후에 실온에서 blocking을 약 1시간정도 한 실험으로 PBS buffer에 5%의 BSA를 희석시켜 각 well에 220 μ l씩 분주하였고, RBSDV의 O.D값과 secondary의 O.D값을 약 0.4로 동일하게 맞춰서 ECI buffer와 Ab와 secondary의 비율을 1:200으로 실험하였다.

	1	2
A	0.464	0.405
B	0.371	0.354
C	0.340	0.245
D	0.357	0.320
E	0.377	0.219
F	0.787	0.641
G	0.800	0.609
H	0.786	0.730

CV = 40.5%

실험 결과, BSA로 blocking을 1시간정도 했지만, 각각의 O.D 값이 낮아서 positive와 negative 사이에 근소한 차이는 있지만 전체적인 결과 값이 약하게 나왔다.

사. compound 실험 8

실험 7과 동일한 실험으로 coating 후에 blocking을 약 1시간정도 시켰으며, RBSDV로 실험하였다. Ab의 농도는 1.4로 하였고, 1번은 secondary 농도가 1.3, 2번은 0.06, 3번은 0.07이다.

	1	2	3
A	0.432	0.034	0.015
B	0.414	0.033	0.026
C	0.301	0.003	-0.005
D	0.343	0.041	0.037
E	0.313	0.038	0.029
F	2.170	0.120	0.167
G	2.346	0.115	0.174
H	2.395	0.113	0.186

CV = 17.5%

실험결과 1번, 즉 Ab의 농도가 1.4일 때 secondary 농도가 1.3인 것이 가장 잘 나왔다.

아. compound 실험 9

이 실험은 coating후 blocking solution을 넣지 않고, ECI buffer에서의 BSA 농도를 조절해서 실험하였다. 1번은 원래의 ECI buffer에서의 BSA의 비율인 0.2%이고 2번은 BSA 비율이 2%, 3번은 5%로 실험하였으며, Ab는 RBSDV를 사용하였다.

	1	2	3
A	1.962	1.501	1.364
B	1.684	1.443	1.231
C	1.608	1.136	0.944
D	1.595	1.090	0.894
E	1.581	1.142	0.899
F	3.133	2.832	2.656
G	3.200	2.899	2.857
H	3.501	3.120	2.995

CV = 43.8%

결과 값을 보면 3번인 ECI buffer에서 BSA 농도가 5%인 것이 가장 좋은 것으로 나타나지만 negative와 blank 값이 높게나오는 경향이 있음을 확인할 수 있었다.

자. compound 실험 10

실험 9와 동일한 방법으로 ECI buffer에서의 BSA 농도를 조절해서 실험하였다. 1번은 ECI buffer에서의 BSA의 비율이 3%, 2번은 4%, 3번은 5%, 4번은 6%로 실험하였으며, Ab는 RBSDV를 사용하였다.

	1	2	3	4
A	0.952	0.620	0.790	0.852
B	0.952	0.587	0.721	0.820
C	0.776	0.453	0.601	0.547
D	0.795	0.519	0.574	0.506
E	0.818	0.502	0.560	0.477
F	2.682	1.872	2.247	1.891
G	2.849	1.961	2.311	1.982
H	3.079	2.189	2.661	2.041

CV = 65.2%

3~6% 모두 positive 결과 값이 잘 나왔지만, 4%로 했을 때 blank와 negative 값이 가장 낮게 나왔다.

차. compound 실험 11

지금까지의 결과를 바탕으로, RBSDV를 시료로 하여 최종 확인 실험하였다. Ab를 coating한 후에 blocking solution을 분주하여 1시간정도 incubation하였으며, ECI buffer에서 BSA의 농도를 4%로 맞춰서 각각 실험하였다.

RBSDV

blank	blank	blank	blank
blank	blank	blank	blank
negative	negative	negative	negative
negative	negative	negative	negative
negative	negative	negative	negative
positive	positive	positive	positive
positive	positive	positive	positive
positive	positive	positive	positive

	1	2	3	4
A	0.053	0.251	0.049	0.150
B	0.058	0.242	0.050	0.127
C	0.043	0.556	0.025	0.182
D	0.054	0.478	0.059	0.217
E	0.121	0.465	0.105	0.257
F	3.506	3.807	3.029	3.807
G	3.652	3.652	3.351	3.652
H	>4.000	>4.000	3.547	3.945

CV = 114.9%

실험 결과에서 보는 것처럼 모두 positive의 O.D 값만 높게 나오는 반면, blank와 negative의 O.D값은 현격히 낮게 나타남을 확인할 수 있었다.

2. Immuno-strip 개발 연구

가. 일반적인 strip 제작 실험

우선, 본 연구실에서 보유중인 일반적인 protocol을 이용하여 strip을 제작하고 그 효율을 확인하여 보았다. strip 제작과정은 다음과 같다 (그림 1). Gold solution을 tube에 500 μl 를 각각 넣은 뒤, pH 완충 buffer를 넣어서 pH를 5~10까지 범위로 만든다. 그리고 2~3초간 mixing 해주고 실온에서 30분간 incubation 한다. Incubation이 끝나면 각 tube의 색변화를 관찰해야 하는데, 약한 purple이나 색변화가 없는 것을 선택하여 다음 단계를 실행한다. Tube를 선택한 뒤 blocking solution을 50 μl 넣어주고, Gold drying buffer 60 μl 를 추가로 넣어준 뒤 pad에 흡수시켜 30~37°C에서 4시간 정도 말린다. Pad가 마르면 흡수패드가 부착된 PVC카드에 pad를 붙이고, secondary Ab와 Ab를 각각 선을 그어준 뒤 아랫부분에 마지막 흡수패드를 붙여준다. 완성된 것은 기계를 이용하여 일정한 간격으로 절단하여 positive와 negative sample에 담귀서 결과를 확인한다.

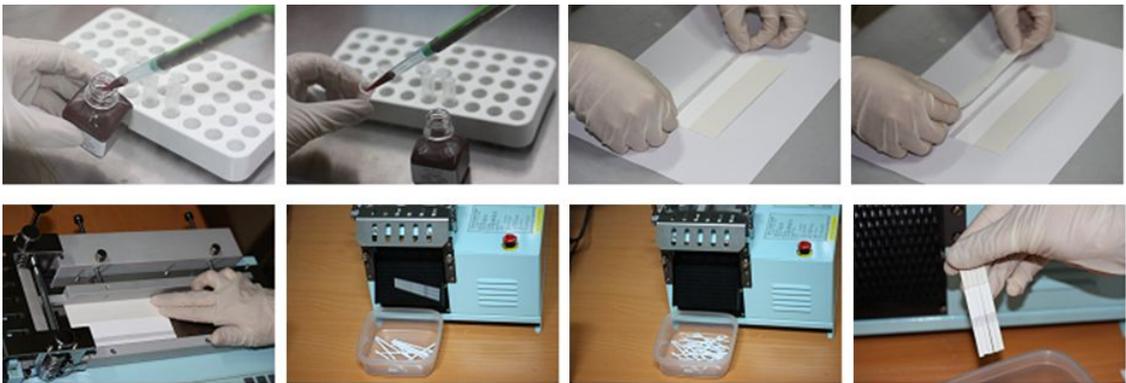
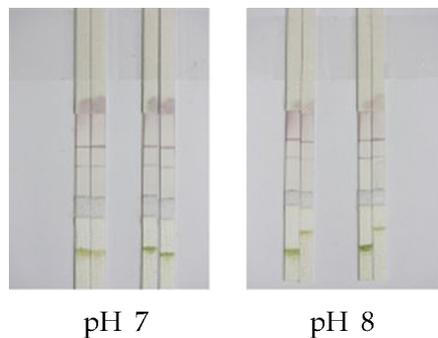


그림 1. Strip 실험 과정.

정상적인 결과는 negative에서는 secondary line만 색이 나타나야하고, positive에서는 secondary와 Ab 두 line 모두 색이 나타나야 한다. 본 실험은 pH를 7과 8로 맞춰서 한 실험으로 RBSDV를 이용하였다.

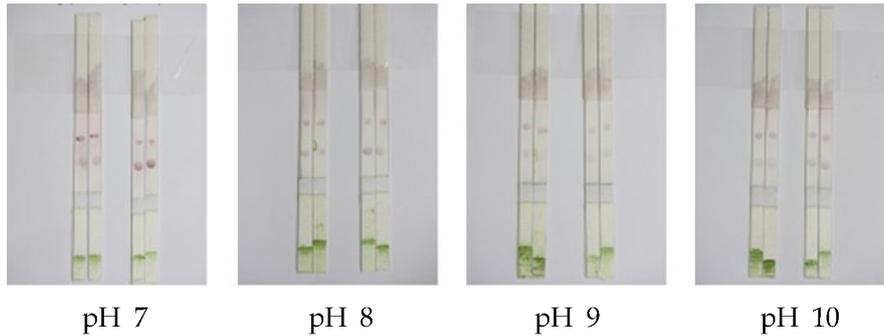


사진의 왼쪽이 negative, 오른쪽이 positive이며, strip의 윗부분에 그어진 line이 secondary이고 아래쪽에 그어진 line이 Ab이다. 실험 결과, pH 7과 8 모두

전체적인 색이 흐리고, negative에도 두 line이 모두 확인됨으로 추가 조건 실험이 필요함을 확인할 수 있었다.

나. RBSDV를 이용한 strip 조건 실험 1

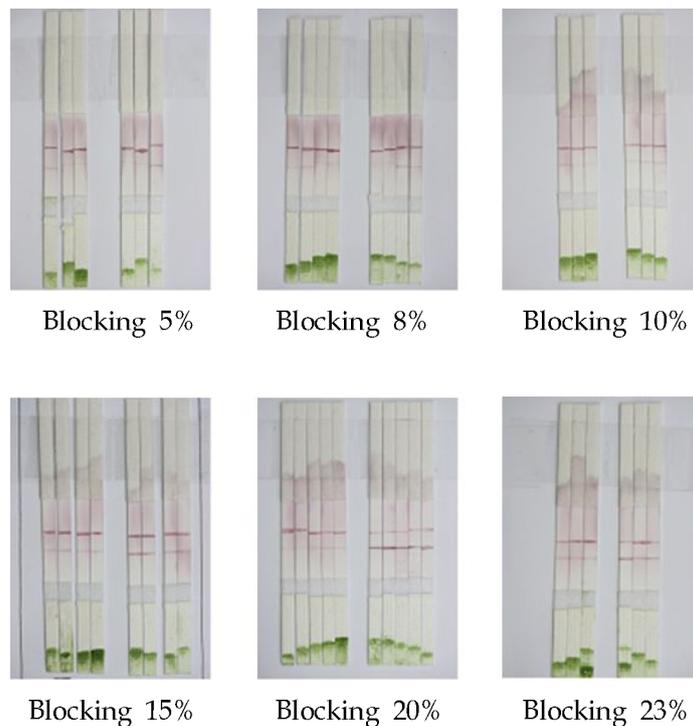
이 실험은 pH를 7, 8, 9, 10으로 맞췄으며, blocking solution을 넣어준 뒤 원심분리를 약 5분간 하여 상층 액을 따서 버리고, 그 양만큼 다시 blocking solution을 채워 넣은 뒤 실험을 진행하였다.



이번 실험은 line 대신 점을 찍어서 했는데, 실험 1과 마찬가지로 전체적인 색이 흐리고 negative에도 두 line이 모두 생겼다.

다. RBSDV를 이용한 strip 조건 실험 2

이 실험은 blocking solution의 농도를 각각 다르게 하여 실험하였다. Blocking solution의 농도는 5, 10, 15, 18, 20, 23%로 맞췄으며, pH는 8로 하였다.



이번 실험은 위의 2가지 실험보다 line에 나타나는 색이 더 진해졌다. 하지만 positive와 negative 각각의 결과에 대한 line이 뚜렷하게 나타나지 않았다. Blocking solution 농도 5~10%까지는 Ab의 line이 positive와 negative 모두 흐리게 나왔지만, 15~23%에서는 positive에서 Ab의 line이 조금 진하게 나온 것을 볼 수 있었다. 하지만 negative에서도 Ab의 line이 흐리게 생겼기 때문에 이 부분에 대한 추가 보완 실험이 필요함을 확인 할 수 있었다.

3. RBSDV 특이항체를 이용한 immuno-strip 제작

가. Crude serum 정제

제1세부과제로부터 분양받은 세 종류의 RBSDV 특이항체 (AbRBSDV-ORF1SP-R1, AbRBSDV-ORF1SP-R2 및 AbRBSDV-ORF12)로부터 immuno-strip 제작에 필요한 항체를 얻기 위하여, 각각의 RBSDV crude serum을 column을 이용하여 정제하였다 (그림 2).

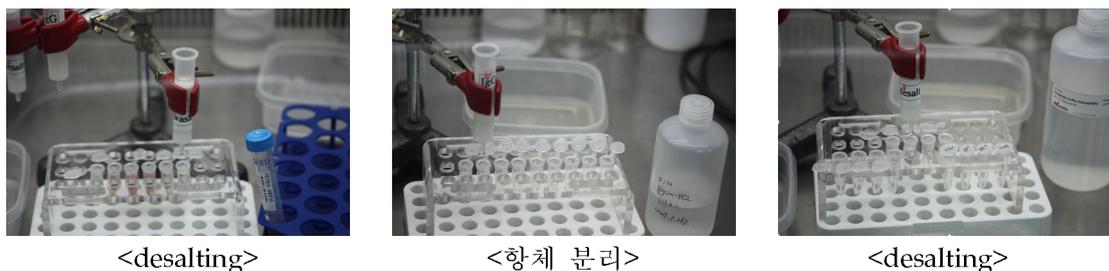


그림 2. Column을 이용한 crude serum으로부터의 항체 분리.

우선, 0.01 M PBS (pH 7.4)를 washing buffer로 사용하여 아래 그림과 같은 방식으로 crude serum 내의 염기를 제거하였다. 이렇게 desalting된 항체를 0.01 M PBS buffer로 washing한 다음, 0.1 M Glycine-HCl (pH 3.0) buffer를 이용하여 1 M Trizma base (pH 9.0) 200 μ l가 담긴 tube에 elution하여 crude serum에서 항체만을 분리하였다. Crude serum에서 분리된 항체의 농도를 알아보기 위하여 각 tube의 O.D값을 측정한 결과는 다음과 같다.

AbRBSDV-ORF1SP-R1		AbRBSDV-ORF1SP-R2		AbRBSDV-ORF12	
O.D값	추출량	O.D값	추출량	O.D값	추출량
2.326	1 ml	2.308	1 ml	1.941	1 ml
2.313	1 ml	2.299	1 ml	1.058	1 ml
2.311	1 ml	0.802	1 ml	0.709	1 ml
0.737	1 ml			0.233	1 ml
0.264	1 ml				

마지막으로 정제된 항체를 desalting하기 위하여 crude serum으로부터 분리된 항체를 desalting column에 loading하고 1.5 ml tube에 1 ml씩 elution하였다. 이렇게 정제한 항체의 농도를 알아보기 위하여 각 tube의 O.D값을 측정하였으며, O.D값이 가장 높은 fraction을 선택하여 0.01 M PBS (pH 7.4)로 항체의 농도를 1 mg/ml으로 맞추는 후 gold conjugation에 사용하였다.

AbRBSDV-ORF1SP-R1		AbRBSDV-ORF1SP-R2		AbRBSDV-ORF12	
OD값	추출량	OD값	추출량	OD값	추출량
2.331	1 ml	2.313	1 ml	1.592	1 ml
2.320	1 ml	2.298	1 ml	0.977	1 ml
2.309	1 ml	2.291	1 ml		
2.226	1 ml	1.733	1 ml		
0.977	1 ml	1.565	1 ml		

나. Gold conjugate 조건 실험 I 및 immuno-strip 제작

Gold conjugate 실험 시, gold 입자에 적절한 ligand의 양을 결정하는 것이 중요하다. 통상적인 실험에서는 500 μ l의 gold 용액에 항체를 14 μ l를 넣는데, 본 실험에서는 항체의 양을 20% 증가한 17 μ l를 넣어 실험 조건을 다르게 하여 수행하였다. 또한 pH를 보다 세분하여 테스트하였다.

우선, 40 nm gold 용액을 10개의 1.5 ml tube에 각각 500 μ l씩 넣은 다음, 각 tube의 pH를 5.4에서 10.1까지 조정하였다. 10개의 pH가 다른 gold 용액에 정제된 항체(1 mg/ml)를 각각 17 μ l씩 넣고 저속의 vortex mixer를 사용하여 충분히 섞어준 다음, 30분 정도 반응시켰다. Gold solution의 색깔 변화가 없거나 약한 보라색이 나는 것이 면역 분석에 유용하므로, 용액의 색깔이 양호한 것만 선택하여 blocking solution을 50 μ l씩 추가하여 반응을 종료시켰다.

<Gold solution 색 변화 결과> (양호:○, 보통:△, 불량:×)

pH	5.4	6.6	7.3	7.8	8.2	8.4	8.8	9.2	9.6	10.1
AbRBSDV-ORF1SP-R1	×	×	×	×	×	△	○	○	○	○
AbRBSDV-ORF1SP-R2	×	×	×	×	×	△	○	○	○	○
AbRBSD1SP-ORF12	×	×	×	×	×	×	○	○	○	○

Gold를 효과적으로 말리기 위해서 gold drying buffer 60 μ l을 넣어 충분히 섞어주고 polyester 리본에 천천히 고르게 흡수시킨 후, 37°C의 인큐베이터에 넣고 4 시간 동안 완전히 말려서 아래의 그림과 같이 strip을 제작하였다 (그림 3).

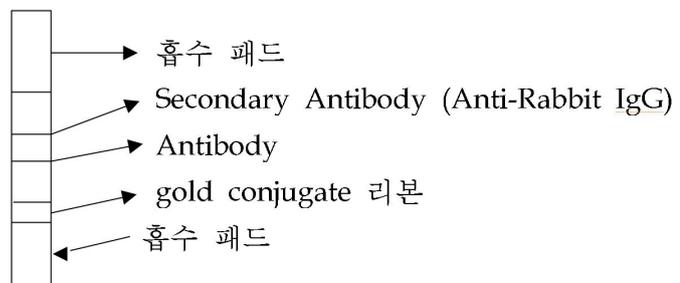
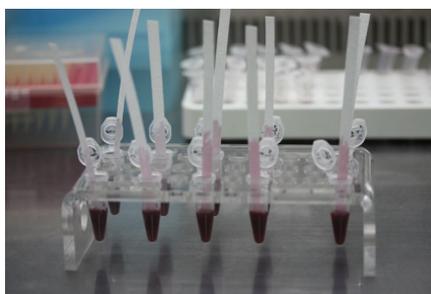


그림 3. Polyester 리본을 이용한 immuno-strip 제작.

이렇게 제작된 strip을 테스트한 결과, 테스트 line에서 positive와 negative에서

모두 양성을 보이는 비특이 반응을 보임을 알 수 있었다 (그림 4, 5, 6). Negative control 및 strip buffer로는 본사의 RSV negative control (KS1233-N) 및 Rapid strip sample buffer (KS3015-0500)를 사용하였다.

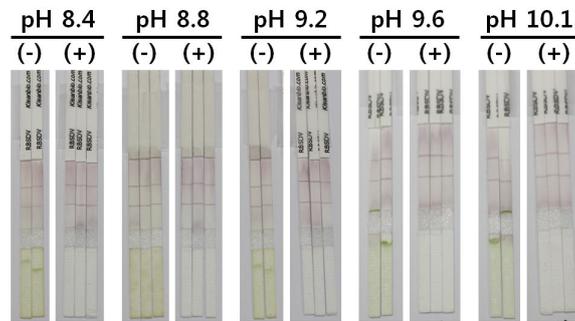


그림 4. AbRBSDV-ORF1SP-R1 항체에 대한 gold conjugate 조건 실험 I의 strip test.

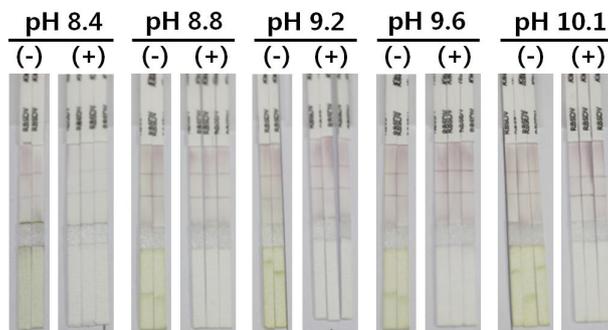


그림 5. AbRBSDV-ORF1SP-R2 항체에 대한 gold conjugate 조건 실험 I의 strip test.

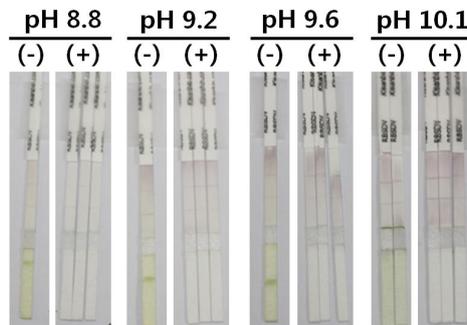


그림 6. AbRBSDV-ORF12 항체에 대한 gold conjugate 조건 실험 I의 strip test.

다. Gold conjugate 조건 실험 II 및 immuno-strip 제작

위의 조건 실험 I에서 비특이 반응이 나옴에 따라, 다른 조건은 모두 같게 하고 gold conjugate 반응 시간을 30분에서 16시간(실온)으로 늘린 후 blocking buffer를 추가하였다. 그 결과, gold conjugate의 색깔 변화가 조건 실험 I보다 양호하였다 (그림 7).

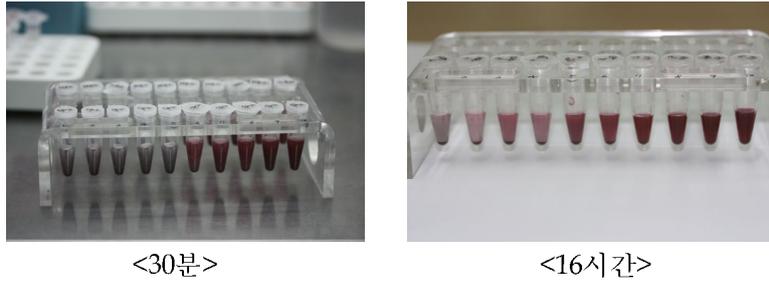


그림 7. gold conjugate 반응 시간에 따른 반응 gold conjugate의 색깔 변화.

Gold conjugate 실험 시 gold 용액과 antibody의 반응 시간을 30분에서 16시간으로 늘린 후 blocking buffer를 넣어 준 strip의 결과, AbRBSDV-ORF1SP-R1과 AbRBSDV-ORF1SP-R2에서는 negative와 positive 모두 음성 반응이 나타났으나, AbRBSDV-ORF12에서는 negative에서는 음성 반응이, positive에서는 양성 반응이 뚜렷하게 나타났다 (그림 8, 9, 10).

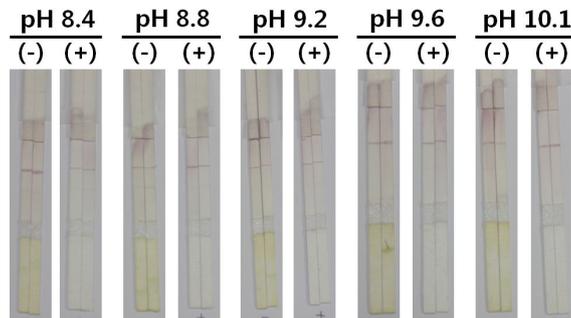


그림 8. AbRBSDV-ORF1SP-R1 항체에 대한 gold conjugate 조건 실험 II의 strip test.

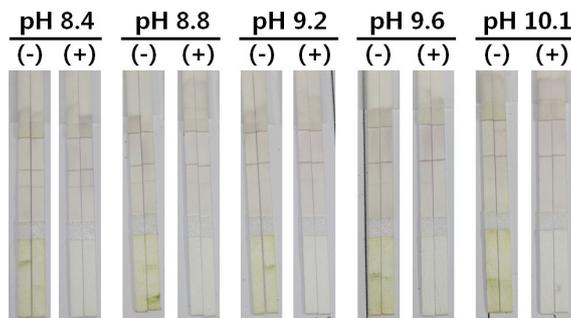


그림 9. AbRBSDV-ORF1SP-R2 항체에 대한 gold conjugate 조건 실험 II의 strip test.

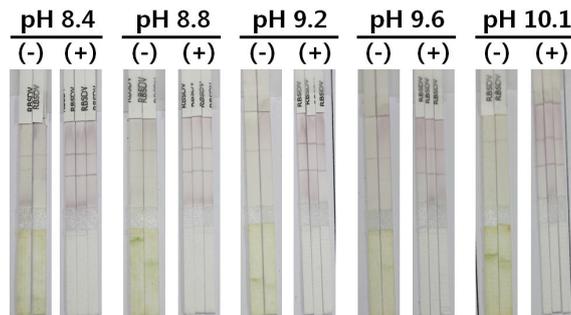


그림 10. AbRBSDV-ORF12 항체에 대한 gold conjugate 조건 실험 II의 strip test.

이상의 결과, gold conjugate 조건 실험 II의 AbRBSDV-ORF12로 제작한 immuno-strip의 테스트 결과가 양호함으로써 이 serum이 immuno-strip 제작에 적합한 것으로 판단되었으며, 차후 gold conjugate의 감도를 높이기 위한 실험이 추가된다면 immuno-strip의 제품화 및 대량 생산이 가능할 것으로 기대된다.

4. RSV 특이항체를 이용한 immuno-strip 제작

가. Crude serum 정제

제2세부과제로부터 분양받은 두 종류의 RSV 특이항체 (CP-2+5-R2 및 NCP-5+6-R2)로부터 immuno-strip 제작에 필요한 항체를 얻기 위하여, 각각의 RBSDV crude serum을 column을 이용하여 정제하였다.

우선, 0.01 M PBS (pH 7.4)를 washing buffer로 사용하여 아래 그림과 같은 방식으로 crude serum 내의 염기를 제거하였다. 이렇게 desalting된 항체를 0.01 M PBS buffer로 washing한 다음, 0.1 M Glycine-HCl (pH 3.0) buffer를 이용하여 1 M Trizma base (pH 9.0) 200 μ l가 담긴 tube에 elution하여 crude serum에서 항체만을 분리하였다. Crude serum에서 분리된 항체의 농도를 알아보기 위하여 각 tube의 O.D값을 측정한 결과는 다음과 같다.

CP-2+5-R2		NCP-2+5-R2	
O.D값	추출량	O.D값	추출량
2.349	1 ml	2.290	1 ml
2.303	1 ml	2.280	1 ml
1.077	1 ml	1.317	1 ml
0.709	1 ml	0.217	1 ml
0.644	1 ml		

마지막으로 정제된 항체를 desalting하기 위하여 crude serum으로부터 분리된 항체를 desalting column에 loading하고 1.5 ml tube에 1 ml씩 elution하였다. 이렇게 정제한 항체의 농도를 알아보기 위하여 각 tube의 OD값을 측정하였으며, O.D값이 가장 높은 fraction을 선택하여 0.01 M PBS (pH 7.4)로 항체의 농도를 1 mg/ml으로 맞추는 후 gold conjugation에 사용하였다.

CP-2+5-R2		NCP-5+6-R2	
OD값	추출량	OD값	추출량
2.285	1 ml	2.307	1 ml
2.280	1 ml	2.304	1 ml
2.189	1 ml	2.011	1 ml
1.440	1 ml	1.325	1 ml
0.739	1 ml		

나. Gold conjugate 조건 실험 I 및 immuno-strip 제작

Gold conjugate 실험 시, gold 입자에 적절한 ligand의 양을 결정하는 것이 중요하다. 통상적인 실험에서는 500 μ l의 gold 용액에 항체를 14 μ l를 넣는데, 본 실험에서는 항체의 양을 20% 증가한 17 μ l를 넣어 실험 조건을 다르게 하여 수행하였다. 또한 pH를 보다 세분하여 테스트하였다.

우선, 40 nm gold 용액을 10개의 1.5 ml tube에 각각 500 μl 씩 넣은 다음, 각 tube의 pH를 5.4에서 10.1까지 조정하였다. 10개의 pH가 다른 gold 용액에 정제된 항체(1 mg/ml)를 각각 17 μl 씩 넣고 저속의 vortex mixer를 사용하여 충분히 섞어준 다음, 30분 정도 반응시켰다. Gold solution의 색깔 변화가 없거나 약한 보라색이 나는 것이 면역 분석에 유용하므로, 용액의 색깔이 양호한 것만 선택하여 blocking solution을 50 μl 씩 추가하여 반응을 종료시켰다.

<Gold solution 색 변화 결과> (양호:○, 보통:△, 불량:×)

pH	5.4	6.6	7.3	7.8	8.2	8.4	8.8	9.2	9.6	10.1
CP-2+5-R2	×	×	×	×	×	○	○	○	△	△
NCP-5+6-R2	×	×	×	×	×	△	△	△	△	△

Gold를 효과적으로 말리기 위해서 gold drying buffer 60 μl 을 넣어 충분히 섞어주고 polyester 리본에 천천히 고르게 흡수시킨 후, 37°C의 인큐베이터에 넣고 4 시간 동안 완전히 말려서 strip을 제작하였다. 이렇게 제작된 strip을 테스트한 결과, CP-2+5-R2 항체는 pH 8.4에서만 비특이 반응을 보였고, 나머지 pH에서는 양호한 결과를 얻을 수 있었으나, secondary antibody line과 테스트 line의 색깔이 연하게 나왔다 (그림 11). 이에 반해 NCP-5+6-R2 항체는 negative와 positive 모두 양성을 보이는 비특이 반응을 보였다 (그림 12).

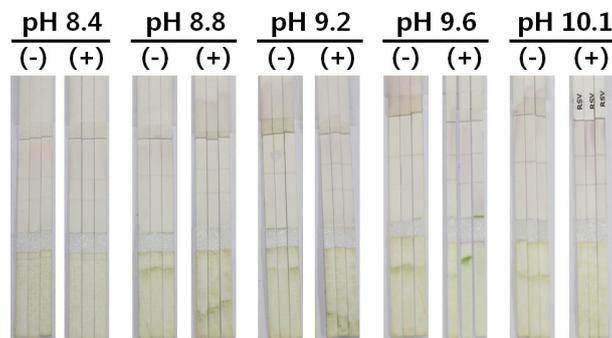


그림 11. CP-2+5-R2 항체에 대한 gold conjugate 조건 실험 I의 strip test.

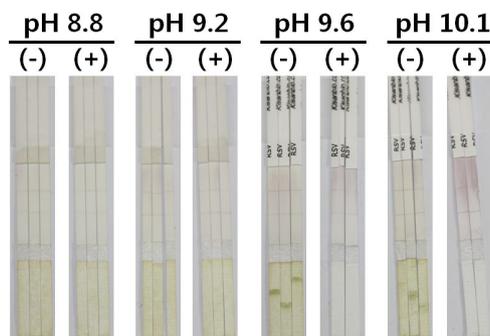


그림 12. NCP-5+6-R2 항체에 대한 gold conjugate 조건 실험 I의 strip test.

다. Gold conjugate 조건 실험 II 및 immuno-strip 제작

위의 조건 실험 I에서 CP-2+5-R2 항체의 경우 secondary antibody line과 테스트 line의 색깔이 연하게 나오거나 비특이 반응이 나옴에 따라, 다른 조건은 모두 같게 하고 gold conjugate 반응 시간을 30분에서 16시간(실온)으로 늘린 후 blocking buffer를 추가하였다. 그 결과, gold conjugate의 색깔 변화가 조건 실험 I보다 양호하였다.

Gold conjugate 실험 시 gold 용액과 antibody의 반응 시간을 30분에서 16시간으로 늘린 후 blocking buffer를 넣어 준 strip의 결과, CP-2+5-R2 항체는 negative에서는 음성 반응이, positive에서는 양성 반응이 보다 선명하게 나타났다 (그림 13).

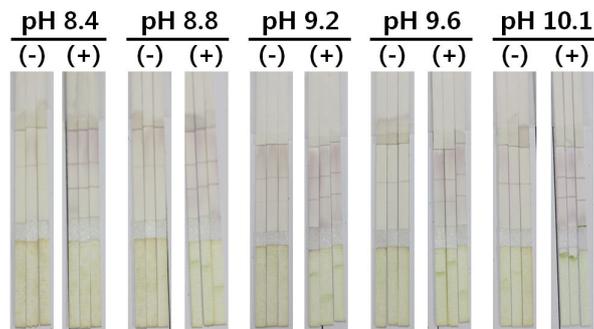


그림 13. CP-2+5-R2 항체에 대한 gold conjugate 조건 실험 II의 strip test.

이상의 결과, gold conjugate 조건 실험 II의 CP-2+5-R2 항체로 제작한 immuno-strip의 테스트 결과가 양호함으로써 이 serum이 immuno-strip 제작에 적합한 것으로 판단되었으며, 차후 gold conjugate의 감도를 높이기 위한 실험이 추가된다면 immuno-strip의 제품화 및 대량 생산이 가능할 것으로 기대된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표와 평가의 착안점

1. 연차별 연구개발의 목표

가. 1차년도 연구개발 목표

- 벼 바이러스(RBSDV, RSV, RDV) 확보, 동정 및 계통분석
- 확보 바이러스의 유전자 변이 검정에 의한 항체생산용 유전자 선발
- RBSDV 전장유전자 및 conserved region 대량 발현
- RBSDV 전장유전자 및 conserved region 항체 제작
- RBSDV 항체의 경제적 대량생산 체계 확립
- RBSDV immuno strip 제작 및 특이성/민감성 검정

나. 2차년도 연구개발 목표

- RSV 항체생산용 유전자 순화
- 확보 유전자의 항원능력 검정
- RSV 전장유전자 및 conserved region 대량 발현
- RSV 전장유전자 및 conserved region 항체 제작
- RSV 항체의 경제적 대량생산 체계 확립
- RSV immuno strip 제작
- RSV immuno strip의 특이성 및 민감성 검정

2. 연구평가의 착안점

- 벼 항체생산용 유전자
 - 20개 유전자 GenBank 등록
- 항원단백질 발현 및 특이항원 제작
 - 이용된 항원의 특이성 검정기법, 벡터개발 및 지적재산권 출원
- Immuno-strip 특이성
 - 개발된 Strip의 특이성, 현장 활용 가능성 및 지적재산권 출원
- Immuno-strip 민감성
 - 1~5 $\mu\text{g}/\ell$ 민감도의 Immuno-strip

제 2 절 연구개발 목표의 달성도

구분 (연도)	추진목표	달성 내용
1차년도 (2008 ~ 2009)	며 바이러스 확보, 동정 및 계놈분석	<ul style="list-style-type: none"> - 2008년 및 2009년 며 바이러스 감염포장에서 RSV 및 RBSDV 감염시료를 확보함 - 2008년 대발생지역에서 확보한 RSV의 전장계놈을 확인함
	RBSDV 항체생산용 유전자 선발	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 분리주 RBSDV의 10개 genomic segment의 염기서열을 분석함 - 10개 genomic segment로부터 12개의 ORFs를 예측하고 기존에 보고된 유전자와 비교함
	RBSDV 전장유전자 및 conserved region 대량발현	<ul style="list-style-type: none"> - RBSDV ORF 1 및 2의 conserved region을 다각체단백질과의 융합단백질 형태로 대량 발현함 - RBSDV ORF 9 및 12의 전장유전자를 대량 발현함
	RBSDV 전장유전자 및 conserved region 항체 제작	<ul style="list-style-type: none"> - RBSDV ORF 1 및 2의 conserved region과 다각체단백질의 융합단백질에 대한 항체를 제작함 - RBSDV ORF 12의 전장유전자 단백질에 대한 항체를 제작함
	항체를 이용한 immuno-strip의 경제적 대량생산 체계 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 며 바이러스 항체의 대량 생산 연구를 수행함 - 이를 이용한 Immuno-strip 제작 및 효율 검정을 수행함

구분 (연도)	세부연구목표	달성 내용
2차년도 (2009 ~ 2010)	RBSDV 전장유전자 및 conserved region 항체 제작	<ul style="list-style-type: none"> - RBSDV ORF 1, 2, 9 및 12의 conserved region을 대량 발현함 - RBSDV ORF 1의 conserved region에 대한 항체를 제작함
	RSV 바이러스 확보 및 계놈분석	<ul style="list-style-type: none"> - 중국비래 곤충 및 2009년 감염포장에서 분리한 RSV 전장계놈을 분석함 - 국내 분리주와 중국 및 일본 분리주 RSV의 유전적 재조합 관계를 구명하기 위한 RT-PCR/Restriction enzyme 기법을 개발함
	RSV 항체생산용 유전자 선발	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 분리주 RSV로부터 7개의 ORFs를 예측하고 기존에 보고된 유전자와 비교함 - RSV의 NS2, NS3, NCP 및 CP 유전자를 선발하여 클로닝함
	RSV 전장유전자 및 conserved region 대량발현 및 항체 제작	<ul style="list-style-type: none"> - RSV의 NS3 및 NCP 전장단백질을 대량 발현함 - RSV의 NS3 및 NCP 전장단백질에 대한 항체를 제작함 - RSV의 NS2, NS3, NCP 및 CP에 대한 polypeptides를 합성함 - RSV의 NS2, NS3, NCP 및 CP의 polypeptides에 대한 항체를 제작함
	RBSDV 진단 키트 제작	<ul style="list-style-type: none"> - RBSDV ORF 1의 conserved region과 ORF 12의 전장유전자 단백질에 대한 항체의 민감성을 검정함 - RBSDV ORF 1의 conserved region과 ORF 12의 전장유전자 단백질에 대한 항체의 특이성을 최적화함 - RBSDV ORF1 및 12에 대한 항체를 이용하여 immuno-strip을 제작함
	RSV 진단 키트 제작	<ul style="list-style-type: none"> - RSV CP 및 NCP에 대한 항체의 민감성을 검정함 - RSV CP 및 NCP에 대한 항체의 특이성을 검정함 - RSV CP 및 NCP에 대한 항체를 이용하여 immuno-strip을 제작함

제 3 절 연구개발의 관련분야 기여도

1. 기술적 측면

- 주요 벼 바이러스 자원의 DB 구축 및 관련 생명공학 원천기술 확보
- 국내 바이러스 유전자원의 보존 및 데이터베이스의 운용에 의한 'Virom (Viral Genome) Project'에의 능동적 참여 및 국제 교류 확대
- 주요 벼 바이러스 진단법의 개발에 필수적인 진단관련 표지유전자 선발
- 주요 벼 바이러스 및 관련 식물 병 바이러스에 대한 조기 진단 system 확산
- 주요 작물 바이러스 방제에 활용 가능한 기반기술력 제공
- 효율적인 육종 체계 확립을 위한 주요 작물 바이러스 게놈의 기능분석 및 관련 DNA 데이터베이스 구축 및 이용 기반 구축

2. 경제·산업적 측면

- 식물 바이러스 병을 조기에 진단하여 효율적인 방제에 일조
- 주요 벼 바이러스 제놈 분석과 변이 실태 구명을 통한 현장 중심의 실용적인 방제 정책수립
- 주요 벼 바이러스에 대한 수평 저항성 품종 보급을 위한 기초 자료 제공
- 벼 바이러스의 피해를 조기에 진단하여 바이러스 병의 확대를 방지
- 안정적인 고품질 우량 작물의 지속적 농업을 통한 농가소득 향상
- 관련기술의 산학연 협력으로 국내 벤처기업 육성 및 건전한 사회 기여
- 벼 바이러스 진단키트를 국내외에 공급하여 산업화 추진

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 정량적 성과

1. 논문게제

- Jonson, G. M., H. S. Choi, J. S. Kim, I. R. Choi and K. H. Kim. 2009. Sequence and phylogenetic analysis of the RNA1 and RNA2 segments of Korean *Rice stripe virus* isolates and comparison with those of China and Japan. Archives of Virology 154: 1705-1708.
- Jonson, G. M., H. S. Choi, J. S. Kim, I. R. Choi and K. H. Kim. 2009. Complete genome sequence of the RNAs 3 and 4 segments of *Rice stripe virus* isolates in Korea and their phylogenetic relationships with Japan and China isolates. Plant Pathology Journal 25(2): 142-150.

2. 학술발표

- Choi, J. Y., Y. Wang, J. Y. Roh, X. Tao, Liu, Q., J. B. Park, S. D. Woo, B. R. Jin and Y. H. Je. 2010. Development of an specific antibodies for the detection of *Rice black-streaked dwarf virus* using baculovirus expression vectors. 2010년도 한국응용곤충학회 심포지엄 및 추계학술발표회, 충북 충주시 수안보 상록호텔, 10. 21-23.

3. 특허 출원

- 제연호, 최재영, 노종열, 왕용. 재조합 바이러스 에이씨이지-알비에스디브이1에스피 및 이를 이용한 베쿨로바이러스 발현벡터 시스템. 2010.12.15. 대한민국 특허출원 제 10-2010-0127988 호

4. 유전자원 등록

- Je, Y. H., J. Y. Choi, J. Y. Roh, Y. Wang, *Rice black-streaked dwarf virus* ORF 1 complete CDS. GenBank Accession No. H2670663
- Je, Y. H., J. Y. Choi, J. Y. Roh, Y. Wang, *Rice black-streaked dwarf virus* ORF 2 complete CDS. GenBank Accession No. H2670664
- Je, Y. H., J. Y. Choi, J. Y. Roh, Y. Wang, *Rice black-streaked dwarf virus* ORF 3 complete CDS. GenBank Accession No. H2670665
- Je, Y. H., J. Y. Choi, J. Y. Roh, Y. Wang, *Rice black-streaked dwarf virus* ORF 4 complete CDS. GenBank Accession No. H2670666
- Je, Y. H., J. Y. Choi, J. Y. Roh, Y. Wang, *Rice black-streaked dwarf virus* ORF 5 complete CDS. GenBank Accession No. H2670667
- Je, Y. H., J. Y. Choi, J. Y. Roh, Y. Wang, *Rice black-streaked dwarf virus* ORF 6 complete CDS. GenBank Accession No. H2670668

- Je, Y. H., J. Y. Choi, J. Y. Roh, Y. Wang, *Rice black-streaked dwarf virus* ORF 7 complete CDS. GenBank Accession No. H2670669
- Je, Y. H., J. Y. Choi, J. Y. Roh, Y. Wang, *Rice black-streaked dwarf virus* ORF 8 complete CDS. GenBank Accession No. H2670670
- Je, Y. H., J. Y. Choi, J. Y. Roh, Y. Wang, *Rice black-streaked dwarf virus* ORF 9 complete CDS. GenBank Accession No. H2670671
- Je, Y. H., J. Y. Choi, J. Y. Roh, Y. Wang, *Rice black-streaked dwarf virus* ORF 10 complete CDS. GenBank Accession No. H2670672
- Je, Y. H., J. Y. Choi, J. Y. Roh, Y. Wang, *Rice black-streaked dwarf virus* ORF 11 complete CDS. GenBank Accession No. H2670673
- Je, Y. H., J. Y. Choi, J. Y. Roh, Y. Wang, *Rice black-streaked dwarf virus* ORF 12 complete CDS. GenBank Accession No. H2670674

5. 시제품 제작

- 벼검은줄오갈병 바이러스 (RBSDV) 진단용 immuno-strip 시제품 제작
- 벼줄무늬잎마름병 바이러스 (RSV) 진단용 immuno-strip 시제품 제작

제 2 절 연구결과의 활용계획

- 본 연구를 통하여 긴밀한 산학협력을 바탕으로 자연 상태에서 빈번하게 일어나는 벼 바이러스의 변이를 효과적으로 추적·예측하여 진단에 필수로 요구되는 항원성이 높은 바이러스 단백질을 선별하고 이들의 대량생산 기술을 개발하여 항체를 생산함으로써, 생산자가 포장에서 벼 바이러스를 신속하게 진단할 수 있는 immuno-strip kit를 제작·공급할 수 있을 것으로 기대됨
- 주요 바이러스들을 진단하는 관련 기술은 상대적으로 고가인 immuno-strip kit의 수입 대체 및 지적 재산권 확보를 통한 이익 창출과 국내 벤처기업 육성에 기여할 것으로 기대됨
- 본 연구를 통하여 제작된 immuno-strip kit는 영농활용 자료 등을 통하여 관련 농민을 교육하고 보급함으로써 농가의 생산성 향상 및 농가와 관련 산업의 경쟁력 제고에 기여할 수 있을 것임
- 관련 기술의 지적 재산권 확보 및 참여기업(기산바이오텍)으로의 기술이전을 통하여 상대적으로 고가인 해외 immuno-strip kit에 비해 가격경쟁력을 도모하며, 주요 벼 생산국을 대상으로 수출이 가능할 것으로 예상됨

제 3 절 추가연구의 필요성

- 본 연구의 결과 국내에서 큰 피해를 유발하는 벼검은줄오갈병 바이러스(*Rice*

black-streaked dwarf virus, RBSDV)와 벼줄무늬잎마름 바이러스 (*Rice stripe virus*, RSV)를 신속하게 진단할 수 있는 immuno-strip을 개발하였으나, RNA 바이러스의 특성상 유전자의 변이가 빠르게 진행되고 국외로부터의 변이주의 유입가능성 또한 배제할 수 없기 때문에, 이에 대한 신속한 대응을 위하여 야외에서 이들 바이러스의 변이에 대한 지속적인 monitoring과 예상 가능한 변이에 대한 항원유전자 library clone의 제작 및 확보가 요구됨

- 기후변화에 따른 지구온난화의 효과로 열대지역에서만 발생하던 RGSV (*Rice grassy stunt virus*), RTSV (*Rice tungro spherical virus*) 및 RRSV (*Rice ragged stunt virus*) 등이 아열대 지방인 인근의 중국 남부지역과 일본에서도 보고가 되고 있는 실정이고, 차후 우리나라에서도 발생 확산이 예상되므로 이들 바이러스의 국내 유입 시 이를 조기에 진단할 수 있는 진단 키트 개발이 요구됨

제 4 절 타연구에의 응용성

- 주요 경제 작물에 대한 바이러스 게놈 분석과 변이 실태 구명을 통한 현장 중심의 방제 정책 지원
- 바이러스 변이 기전 및 유전자원의 체계적인 이용으로 바이러스 저항성 품종 개발에 응용
- 주요 작물 바이러스를 분리하고 게놈 정보를 제공함으로써 바이러스에 대한 수평 저항성 품종 보급을 위한 기초 자료 제공
- 지속적인 식물 바이러스의 분리·동정을 통한 바이러스 분포 상태에 대한 주기적인 점검 및 체계화
- 새로운 바이러스의 분리를 통한 유전자원 확보

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 국내외의 바이러스 진단 관련 연구는 원핵세포 발현계인 대장균을 이용한 재조합 단백질의 발현이나 펩타이드 합성과 이를 이용한 항체 생산 분야에 치중되어 있음
- 식물 바이러스에 대한 ELISA 키트 및 PCR 진단 키트 제품 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 현재까지 국내에 발병하는 벼 바이러스를 진단할 수 있는 검정 제품은 아직까지 없는 실정임
- 뎅그 바이러스 및 쯔쯔가무시 감염의 검출을 위한 진단 kit 개발과 관련하여 재조합 단백질의 발현 및 순화를 위해 표면 항원활성을 갖는 재조합 단백질을 원핵세포인 대장균 발현 벡터를 이용하여 대량 발현하여 병 진단 kit 제조에 활용하였음
- 개 디스토펙퍼 바이러스의 항체 진단 kit의 경우 바이러스에 특이적인 항체를 대량 생산하여 면역크로마토그래피법을 통해 바이러스를 신속하게 검출함으로써 바이러스의 항원 선별과정이 없이 바이러스를 순화하여 이에 대한 단일클론 항체를 제조하였음
- 말라리아 젖산탈수소효소 및 알돌라아제를 대장균에서 발현하고 마우스를 면역시켜 바이러스의 산물에 특이적인 단일클론 항체를 대량 생산하여 면역크로마토그래피법을 통해 바이러스를 신속하게 검출하는 말라리아 진단 키트를 개발하였음
- H7형 고병원성 및 일반 조류인플루엔자 바이러스의 진단을 위해 바이러스에 특이적인 항체를 대량 생산하여 면역크로마토그래피법을 통해 바이러스를 신속하게 검출하고, 순화한 바이러스를 이용하여 마우스를 면역시켜 단일클론 항체를 제조함으로써 신속 면역크로마토그래피법에 의한 항원 진단 스트립을 개발하였음
- Norovirus genogroup I 및 II의 진단을 위하여 베쿨로바이러스를 이용하여 발현한 재조합 단백질에 특이적인 항체를 대량 생산하고 면역크로마토그래피법을 통해 바이러스를 신속하게 검출하였음
- Norovirus에 특이적인 단일클론 항체를 대량 생산하여 면역크로마토그래피법을 통해 바이러스를 신속하게 검출하였음
- 미국의 Agdia 및 영국의 Neogene은 식물 바이러스에 대한 ELISA 키트와 GMO 진단 스트립을 개발하여 전세계에 판매하고 있으나, 아직 국내에 발병하는 벼 바이러스에 대한 검정 제품은 없음

제 7 장 참고문헌

- Falk, B. W. and J. H. Tsai. 1998. Biology and molecular biology of viruses in the genus tenuiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 139-163.
- Fang, S., J. Yu, J. Feng, C. Han, D. Li and Y. Liu. 2001. Identification of rice black-streaked dwarf fijivirus in maize with rough dwarf disease in China. *Arch. Virol.* 146: 167-170.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Interference Package) 3.5. Department of Genetics. University of Washington, Seattle
- Fitch, W. M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimal change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* 20: 406-416.
- Garcial-Arenal, F. and A. Fraile. 2003. Variation and evolution of plant virus populations. *Int. Microbiol.* 6: 225-232.
- Haenni, A.-L., J. R. de Miranda, B. W. Falk, R. Goldbach, M. A. Mayo, Y. Shirako and S. Toriyama. 2005. Tenuivirus. In: C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L. A. Ball (eds) *Virus taxonomy: eighth report of the International Committee on taxonomy of viruses*. Elsevier, San Diego, pp 717-723.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hamamatsu, C., S. Toriyama, T. Toyoda and A. Ishihama. 1993. Ambisense coding strategy of the rice stripe virus genome: in vitro translation studies. *J. Gen. Virol.* 74: 1125-1131.
- Hibino, H. 1996. Biology and epidemiology of rice viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: 249-274.
- Isogai, M., I. Uyeda and B.-C. Lee. 1998. Detection and assignment of proteins encoded by rice black streaked dwarf fijivirus S7, S8, S9 and S10. *J. Gen. Virol.* 79: 1487-1494.
- Je, Y. H., J. H. Chang, J. Y. Choi, J. Y. Roh, B. R. Jin, D. R. O'Reilly and S. K. Kang. 2001. A defective viral genome maintained in *Escherichia coli* for the generation of

- baculovirus expression vectors. *Biotechnology Letters* 23(8): 575-582.
- Jeger, M. J., S. E. Seal and F. van den Bosch. 2006. Evolutionary epidemiology of plant virus disease. *Adv. Virus Res.* 67: 163-203.
- Kakutani, T., Y. Hayano, T. Hayashi and Y. Minobe. 1990. Ambisense segment 4 of Rice stripe virus: Possible evolutionary relationship with phleboviruses and uukuviruses (Bunyaviridae). *J. Gen. Virol.* 71: 1427-1432.
- Koganezawa, H. 1977. Purification and properties of rice stripe virus. *Trop. Agric. Res. Ser.* 10: 151-154.
- Koo, H. N., J. M. Oh, J. K. Lee, J. Y. Choi, K. S. Lee, J. Y. Roh, Y. H. Je, B. R. Jin, S. S. Yoo, J. S. Kim, Y. I. Kim, I. J. Yoon and S. D. Woo. 2008. Molecular characterization of ORFs 2 to 7 of Korean porcine reproductive and respiratory syndrome virus (CA) and its protein expression by recombinant baculoviruses. *Journal of Microbiology* 46(6): 709-719.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- O'Reilly, D. R., L. K. Miller and V. A. Luckow. 1992. *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*. W. H. Freeman & Co., New York.
- Qu, Z., D. Liang, G. Harper and R. Hull. 1997. Comparison of Sequences of RNAs 3 and 4 of Rice Stripe Virus from China with those of Japanese Isolates. *Virus Genes* 15: 99-103.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Toriyama, S., M. Takahashi, Y. Sano, T. Shimizu and A. Ishihama. 1994. Nucleotide sequence of RNA1, the largest genomic segment of Rice stripe virus, the prototype of the tenuivirus. *J. Gen. Virol.* 75: 3569-3579.

- Toriyama, S. 2000. Rice stripe virus. CMI/AAB description of plant viruses. No. 375
- Wang, Z., S. Fang, J. Sun, D. Li and J. Yu. 2003. Sequence analysis of the complete genome of *Rice black-streaked dwarf virus* isolated from maize with Rough dwarf disease. *Virus Genes* 27: 163-168.
- Wei, T. Y., J. G. Yang, F. L. Liao, F. L. Gao, L. M. Lu, X. T. Zhang, F. Li, Z. J. Wu, Q. Y. Lin, L. H. Xie and H. X. Lin. 2009. Genetic diversity and population structure of rice stripe in China. *J. Gen. Virol.* 90: 1025-1034.
- Zhang, H. M., J. P. Chen and M. J. Adams. 2001. Molecular characterization of segments 1 to 6 of *Rice black-streaked dwarf virus* from China provides the complete genome. *Arch. Virol.* 146: 2331-2339.
- Zhang, H. M., J. Yang, H. R. Sun, X. Xin, H. D. Wang, J. P. Chen and M. J. Adams. 2007. Genomic analysis of Rice stripe virus Zhejiang isolate shows the presence of an OTU-like domain in the RNA1 protein and a novel sequence motif conserved within the intergenic regions of ambisense segments of tenuiviruses. *Arch. Virol.* 152: 1917-1923.

주 의

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