느타리버섯 바이러스병 진단시약 개발

Kit Production for Diagnosis of Viruses in Oyster Mushroom, *Pleurotus ostreatus*

경상대학교 유전공학 연구소

농림부

[별지 제7호 서식]

최 종 보 고 서

190㎜×268mm

2000년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 느타리버섯 바이러스병 퇴치를 위한 진단시약 개발 및 바이러스 무병주 선발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

2000년 10 월 27일

주관연구기관 : 경상대학교

총괄연구책임자 : 이 현 숙 (인)

주관연구기관장 : 경상대학교총장 직 인

농 림 부 장 관 귀 하

느타리버섯바이러스병퇴치를위한진단시약개발및바이러스무병주선발 농림부

느타리버섯 바이러스병 퇴치를 위한
진단시약 개발 및 바이러스 무병주 선발

느타리버섯 바이러스병 진단시약 개발

Kit Production for Diagnosis of Viruses in Oyster Mushroom, *Pleurotus ostreatus*

경상대학교 유전공학 연구소

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “느타리버섯 바이러스병 퇴치를 위한 진단시약 개발 및 바이러스 무병주 선발” 최종보고서로 제출합니다.

2000 **년** 10 **월** 27 **일**

주관연구기관명 : 경상대학교
총괄연구책임자 : 이 현숙
세부연구책임자 : 이 현숙
연 구 원 : 임 동빈
연 구 원 : 손 대영
연 구 원 : 김 희규
협동연구기관명 : ○ ○ ○
협동연구책임자 : ○ ○ ○
협동연구기관명 : ○ ○ ○
협동연구책임자 : ○ ○ ○

요 약 문

Ⅰ. 제 목

느타리버섯 바이러스병 퇴치를 위한 진단시약 개발 및 바이러스 무병주 선발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

버섯농사의 성공은 ①**기술과 정성** ②**재배환경** ③**종균** ④**재배배지** ⑤**일기관계** 등이 모두 갖추어 져야 성공 할 수 있는 농사이다. 그러나 느타리버섯 농가 (1만 농가)는 매년 재배실패로 연간 300억원의 손실을 입고 있어(버섯 , 영농과 삶 1999년 10월호 105 쪽 참조) 그 근본대책이 마련되어야 한다. 재배실패의 주 원인은 세균, 바이러스 및 생리장애에 의한 병해이다. 종균회사와 농민간의 불신은 벌써 오래된 문제이고, 재배때 마다 발생하는 연작피해와 원인모를 병의 발생에 의한 수확의 격감은 과학적이고도 총체적인 연구와 대책이 시급하다. 일반적으로 재배사에서 바이러스병, 박테리아에 의한 갈반병, 환경불량과 배지의 부적합에 의한 생리적장애만 해결되면 재배농가는 일반적으로 수익을 낼 수 있다. 그러므로 본 연구는 최근 문제가되고 병해중의 하나인 느타리버섯의 바이러스병을 방제하기위한 목적으로 바이러스의 진단 키트를 합성하고자 하였다. 이 바이러스의 진단키트는 느타리종균의 바이러스 감염여부를 쉽게 알 수 있게 하고 조기에 병 발생을 알 수 있어 느타리버섯 재배사에서 바이러스병을 근원적으로 퇴치 할 수 있을 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

최근 느타리 버섯에서 문제가 되는 바이러스병을 퇴치하기 위하여서는 첫째 병원균인 바이러스에 대한 확실한 정보가 있어야 한다. 본 실험실에서는 우리나라의 이병느타리 버섯을 수집하여 3종류의 새로운 느타리버섯 바이러스를 순수분리하였다. 둘째, 순수분리한 바이러스를 이용하여 단클론 항체(monoclonal antibody)와 복클론 항체 (polyclonal antibody)를 이용하여 triple-antibody sandwich ELISA (TAS-ELISA) kit를 개발하여 세포내의 극소량의 바이러스도 감지해 낼 수 있는 방법을 정립하였다. 셋째, 이 진단kit를 이용하여 실제 포장에서 사용할 수 있는 지를 검정하였다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 기술은 첫째, 세계에서 최초로 느타리버섯에서 3종의 바이러스를 순수분리하여 단클론항체 및 폴리클론항체를 합성하였으므로 (2000년 12월 특허출원) 경쟁자가 없는 독점 기술이다. 둘째, sandwich ELISA 방법을 이용한 바이러스 진단 kit는 그 기술이 동물바이러스 검정에는 보편화 되어있고 본 실험실에서 합성한 단클론항체 및 폴리클론항체를 이용한 Sandwich ELISA kit는 버섯이나 균사 조직 0.6㎎만 가지면 바이러스를 기기의 도움없이 눈(naked-eye)으로도 검정할 수 있을 만큼 세포내의 바이러스 존재 유무를 쉽게 알 수 있다. 셋째, 본 실험실에서 PCR 방법으로 바이러스를 검정하는 것과 비교하였을 때 그 정밀성에서 차이가 없었으며 PCR 방법보다 사용이 매우 간편하였다.

종균소와 검역소에서 대량의 종균을 검정할 수 있도록 96 well plates를 만들었으므로 2000년 9월 1일부터 시행되는 종균검역법에 의하여 이 느타리버섯 바이러스 진단키트가 검역 현장에서 사용될 수 있도록 추천하여 주시면 감사하겠습니다.

SUMMARY

Oyster mushroom malformation (OMM) is one of the most severe disease nowadays of unknown etiology. Its spread is fast, and the disease recurs on the same farm. Therefore, the outbreak of the OMM in a comercial farm result in complete yield loss in affected areas and difficult to control. The disease always accompanied the presence of isometric virus particles. Using a purification procedure involving chlorofrorm extraction, PEG-NaCl precipitation, differential centrifugation, and equilibrium centrifugation in CsCl gradient (1.585g/ml), we have obtained three isometric viral particles with different densities and size of 27 and 34nm in diameter. In most cases 27nm viral particles coinfected with 34nm particles; the 27nm particles were denser than 34nm particles, named oyster mushroom spherical virus (OMSV), encapsidated 2 different ssRNAs of 6.0 and 1.25kb. This is the first report of isometric ssRNA mycovirus. The 34nm, lighter particles, named oyster mushroom isometric virus-I (OMIV-I), encapsidated 12 dsRNAs of 2.6, 2.45, 2.4, 2.2, 2.15, 2.1, 2.05, 2.0, 1.9, 1.8, 1.0, and 0.8kb. Another isometric dsRNA virus with same size (34nm; oyster mushroom isometric virus-II; OMIV-II) was also found in diseased mushroom. This OMIV-II encapsidated three dsRNA of 2.25, 2.15, and 2.05 kb. Coomassie brilliant blue stained polyacrylamide gel (12%) electrophoregram showed different coat proteins of *Mr* 29, 71 and 62kD, in OMSV, OMIV-I, and OMIV-II particles, respectively.

We made monoclonal and polyclonal antibodies against these three viruses. To make monoclonal antibodies against the viruses, immunized spleen cells of BALB/c mice were fused with myeloma cell (P3X63Ag8.V653) using polyethylene glycol 1500. After 12 13 days, supernatants of the hybrid cell cultures were screened for detecting the presence of monoclonal antibodies by ELISA. Rabbit polyclonal antibodies against the three viruses were also made. Monoclonal and polyclonal antibodies against OMSV, OMIV-I, and OMIV-II virus particles were hybridised by western blot only with self-antigen, OMSV, OMIV-I, and OMIV II, respectively but not cross-reacted with each other. Triple-antibody sandwich ELISA (TAS-ELISA) made of the monoclonal and polyclonal antibody was sensitive method to detect these three viruses even naked eye with 0.6mg of diseased tissue or 2μg/ml purified virus solution applied.

Thus, the monoclonal and polyclonal antibodies developed in this study were suscessfully applied in TAS-ELISA for identification and detection of the three oyster mushroom viruses even very small amount of viruses harbored in fungal tissue.

CONTENTS

목 차

제 1 장 서 론

최근 병발생과 연작피해 등으로 농가의 50%이상이 심한 경제적 손실을 입고있는 버섯재배의 주된 현황과 문제점은 다음과 같다.

첫째, 우량 종균의 확보가 힘들다는 것이다. 국내시판의 종균의 경우 50% 미만의 낮은 재배 성공률을 보인다. 느타리버섯의 경우 10여년전 농촌진흥청 응용미생물과의 유 영복 박사팀이 개발한 원형느타리버섯 (*Pleurotus ostreatus* ASTI2180)이 많이 재배되고 농가소득에도 많은 도움을 주었으나 최근 원형느타리버섯 재배상에서 세균성 갈반병과 바이러스병에 의한 연작피해가 심해져 새로운, 병에 강한 저항성을 나타내는, 종균 개발이 시급한 실정이다. 버섯곰팡이(*Basidiomysetes*)는 곰팡이의 특성상 Heterothallism으로 diploid가 만들어지므로 특정 strain의 경우 심하면 매번 계대배양할 때마다 5%까지 변이종이 발생하며, 또한 곰팡이의 특성상 균사상태로는 잘 알 수 없는 aneuploidy 발생빈도도 높아 Meiosis로 자실체를 생산하는 버섯을 균사에서 계대배양 증식할 경우 변이종의 발생빈도가 높아져 재배에 상당한 위험을 내포한다. 최근 일본에서 도입하여 재배하기시작하고 있는 애느타리는 버섯의 크기가 느타리버섯보다 작아 시장성이 떨어지고 있다.

둘째, 연작으로 인한 병 발생이 증가하고있어 올해 경상남도의 경우 병발생 농가가 전체농가의 80%에 달하고 있다. 1996년까지 가장 문제가 되는 병은 느타리에서는 박테리아에 의한 갈반병이었으나 1996년 겨울재배부터는 본 경상대학교 미생물학과에서 밝힌, 유럽에서 1960년 후반부터 현재까지 양송이에 많은 피해를 주고있는, “La France Disease"와 같은 병증을 나타내는 dsRNA 바이러스에 의한 폐농사태가 심각한 지경이다. 버섯의 바이러스병은 1950년 Sinden과 Hauser (16)가 그 당시 France에서 많이 재배하고 있던 양송이 (*Agaricus bisporus*)에 심한 타격을 준 병의 이름을 “La France Disease” 라고 명명한 이래 비슷한 병증을 나타내는 양송이버섯에서 1967년 virus like particles (VLPs)이 발견되어 보고되었으며 (15) 그 이후 이와 비슷한 병증을 나타내는 버섯의 바이러스병을 "La France Disease"라고 부른다(4, 6, 7, 10). 화란 등 선진국에서는 버섯종균을 판매할 때 반드시 버섯바이러스 검증을 하여 바이러스 무병주임을 확인한 것 만 판매한다. “La France Disease”에 걸린 버섯은 basidiocarps의 형성이 잘되지 않거나, basidiocarps이 형성된다고 해도 형태가 비정상적으로 되며 버섯생산량이 급속히 감소한다. 이들 병 발생의 원인은 25 nm와 34 - 36 nm의 구형 바이러스입자(14, 23, 25) 와 19 x 50 nm 의 bacilliform 바이러스입자 (12,19) 임이 밝혀졌다. 구형의 바이러스입자 (La france isometric virus [LIV])는 그 유전체로 3.8에서 0.8 kb의 9가지 크기의 dsRNA를 가지고 있으며(4, 8, 22, 23) bacilliform virus (mushroom bacilliform virus [MBV])는 그 유전체로 한 개의 positive-sense, single stranded RNA를 가지고 있다(12). 최근 Reverse transcription PCR analysis로 검사한 결과 La France Disease에 감염된 모든 버섯에

서 LIV가 검출되었으나 MBV는 60%의 버섯에서만 검출되었다(14). 또한 LIV가 primary causal agent이며 MBV는 병증순화 (symptom modulating)에 관여하는 것으로 보고되었다 (12, 19). 병든 양송이의 균사에서도 이들 9개의 dsRNA가 검출되었는데 균사를 21 ℃와 24 ℃에서 키웠을 때 세포내의 dsRNA의 양이 가장 많았으며, 16 ℃ 와 30 ℃에서 키웠을 때에는 dsRNA의 양이 가장 적었다 (6).

느타리버섯의 바이러스병에 관한 연구는 양송이 바이러스병에 관한 연구에 비하면 매우 적은 편이다. 이는 양송이는 전세계적으로 애용되고 있는 반면, 느타리 버섯은 지역적으로 한정된 소비를 하고 있기 때문 일 것이다. 느타리버섯은 한국이 가장 많이 소비하고 있으며 느타리버섯에 대한 연구는 우리나라가 가장 많이 하고 있다. 느타리버섯에서도 최근 dsRNA 바이러스가 보고되고 있다. 특히 1992년 우리 나라 농촌진흥청의 연구팀이 느타리버섯에서 dsRNA를 추출하여 바이러스병의 발생 가능성을 보고하였으나(2, 3, 24) 그 당시는 병 피해가 적었던 탓으로 더 이상 이 바이러스에 관한 연구가 계속되지 않았다. 지금까지 보고된 우리 나라 느타리버섯에서 분리 된 dsRNA는 그 크기가 각각 8,100, 2,170, 2120, 1980, 1840 bp의 5 가지였다(24). 그러나 본 연구팀이 최근 경남지역의 바이러스병이 발생한 느타리버섯에서 분리한 바이러스는 그 크기가 앞에서 보고된 바와는 달랐다. 바이러스병은 기주특이성이 매우 높아 화란에서 양송이 바이러스 검증용으로 개발한 cDNA나 항체를 우리 나라에서 재배하는 느타리버섯 검증에 사용할 수 없다. 또한 버섯을 많이 재배하는 일본에서도 이 바이러스 검정 Kit를 개발하였다는 보고가 없어 이를 도입할 수 있는 형편도 되지 못하고 있다. 버섯의 바이러스는 항상 나쁜 측면만 있는 것은 아니다. 바이러스를 함유한 버섯이 제대로 수확될 수 만 있다면 그 나름대로 사람의 성인병치료 보조제로 개발될 수 있다. 일본의 표고버섯 (*Leutinus edodes*)에서 구형의 dsRNA바이러스 입자가 발견되었으며(21), 이 버섯바이러스의 dsRNA는 젖먹이동물의 interferon inducer로서 알려져 있으며 버섯의 dsRNA 는 항암효과 및 성인병 특히 cholesterol을 낮추는데 효과적이란 보고가 있다 (18).

지금까지 버섯재배는 다른 농작물 재배에 비하여 농가에 고수익 (단위면적당 벼 재배의 70배)을 주고 있었다. 그러나 최근 병 발생에 의한 연작피해로 그 수익이 급격히 줄어 버섯농사를 그만두는 농가가 늘고 있다. 최근 느타리버섯 재배사에 바이러스병의 창궐로 발생한 집단 폐농사태는 지금까지의 기술로하는 버섯재배는 그 한계에 와 있음을 보여준다고 하겠다. 버섯의 바이러스병은 그 특성상 감염원이 종균일 수 밖에 없고, 한 번 감염되면 퇴치하기도 어려우며, 박테리아나 곰팡이병과 달리 감염여부를 초기에 알기 어렵다. 감염된 버섯의 포자속에 바이러스가 존재하여 포자가 비상할 때 이웃 재배사로 전파된다. 이와 같이 한 번감염되면 속수무책인 바이러스를 근본적으로 퇴치할려면 종균의 바이러스 감염여부를 알아야 하며, 재배사에서 초기에 감염을 알 수 있는 방법이 개발 되어야 한다. 선진국에서는 모든 종균은 바이러스 무병주임이 확인되어야 농가에서 재배가 가능한 시스템으로 되어있다. 현재 우리나라에서 느타리버섯 4 kg 재배의 손익 분기점이 5,000 원이며 농협공판장

의 매입가격은 보통 16,000 원으로 느타리버섯은 수확만 가능하면 수익성이 보장되는 작물이다. 우리나라도 이러한 선진국의 시스템과 같이 종균의 바이러스 감염여부를 가려 농가에서 재배하도록 한다면 심하면 100% 까지도 수확을 할 수 없는 농가의 피해를 대부분 줄일 수 있어 UR 대비 작물로 느타리버섯 재배가 각광 받을수 있을 것이다.

이에 본 연구는 종균 및 재배사에서 바이러스 감염을 쉽게 알 수 있는 느타리버섯 바이러스 진단 kit를 만드는데 그 목적을 둔다.

제 2 장. 재료 및 방법

2-1. 공시재료.

경상남도 및 경상북도 지방에서 1997년 이래 원인불명의 병으로 집단폐사하는 느타리 버섯 재배사의 느타리버섯 (*Pleotus ostreatus*)을 수거하여 바이러스를 분리하였다. 건전 느타리버섯, 원형느타리 버섯(*Pleotus ostreatus*)은 경남 농업기술원에서 공급받았다.

2-2. 방법.

2-2-1. 바이러스 순수분리

가) Oyster Mushroom Spherical Virus (OMSV) 의 순수분리

병든버섯을 0.05M Tris-Cl(pH7.0), 1mM EDTA(pH7.0), 0.5% 2-mercaptoethnol이 포함된 buffer에서 3분간 waring blendor로 homogenization시킨 뒤, 6,000Xg에서 원심분리하여 세포 찌꺼기를 제거하였다. 상등액을 10% polyethylene glycol과 0.6M NaCl에서 overnight으로 교반한 후, 6,000Xg에서 원심분리 하였다. 침전물을 0.05M Tris-Cl/1mM EDTA가 포함된 buffer로 현탁하여, 10.000Xg에서 원심분리하고, 상등액을 100,000Xg에서 1시간 30분동안 초원심분리 하여 바이러스 입자의 침전물을 얻었다. 이 침전물을 같은 buffer에서 overnight으로 현탁하였고, 바이러스 입자들을 10 - 60%의 sucrose density gradient에서 16시간 동안 초원심분리하여 바이러스가 포함된 fraction을 gradient fractionator를 사용하여 분획하였다. 이렇게 얻은 바이러스 입자를 다시 50% CsCl (1.583g/㎤)에서 초원심분리(130,000g, 2.5hr)하여 0.75㎖씩 분획하였다. 각 fraction을 30시간동안 2회 투석하고 nucleic acid를 추출하여 1% agarosre gel electrophoresis 로 바이러스가 포함되어 있는지를 검정하였다. 바이러스 농도는 260 nm에서 5 OD 일 때 1mg per ml 의 농도로 계산하였으며 바이러스 순도는 260nm와 280nm에서 OD값을 구하여 E260/E280 이 1.65 일 때를 순수분리 되었다고 보았다.

나) Oyster Mushroom Isometric Virus-I(OMSV-I)의 순수분리

OMIV_I 는 바이러스 분리시에 보편적으로 사용하는 TE buffer, citrate buffer, phosphate buffer를 이용하여 버섯이나 균사세포에서 바이러스를 추출하였을 경우 그 안정성이 매우약하여 바이러스 particles량이 매우적고 24hr 이상 보관하기가 쉽지않았다. 그러나 단순히 distilled water를 사용하였을 때 같은량의 조직에서 5배 이상

의 바이러스 particles량을 얻을 수 있었고 보관기간도 1달을 넘길 수 있었다. 그리하여 OMIV-I의 분리시에는 OMSV의 분리방법과는 같으나 사용buffer만 distilled water로 바꾸었다.

다) (OMIV-II) Oyster Mushroom Isometric Virus-II의 순수분리
OMIV-II 의 분리는 OMSV의 분리방법과 같다.

2-2-2. Virus 단 클론 항체 (monoclonal antibody) 합성

가) 면역

생후 6주된 암컷 BALB/c 마우스에 바이러스와 Freund complete adjuvant의 혼합액을 마리당 10∼50㎍씩 복강으로 면역하였다. 면역 3주 후에 동량의 항원을 Freund incomplete ajuvant에 혼합하여 추가면역하였고 다시 3주후에 생리식염수로 희석한 동량의 항원을 복강내로 주사하여 최종면역하였다.(5, 17)

나) 형질세포종 세포의 준비

세포융합에 사용한 형질세포종세포는 P3X63Ag8.V653 세포주를 사용하였다. 이 세포는 hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase(HGPRT)가 음성이어서 8-azaguanine에 내성이며 면역 글로부린을 생산하지 못한다. 이 세포주를 8-azaguanine(20㎍/㎖)이 함유된 RPMI1640(Signa, Cat. No. R-6540)로 배양하여 2-4일에 한번씩 원침세척하여 새로운 배지로 갈아주면서 37℃, 6% CO2에서 배양 계대하였다. 세포융합에 사용할 형질세포종 세포는 새로운 배지로 18시간 배양한 후 RPMI1640으로 3회 세척하고 세포수를 1X107/ml로 조정하여 사용하였다.

다) 비장세포 준비

최종면역 후 3일이 경과된 BALB/c 마우스로부터 비장을 적출하여 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Sigma, Cat. No. D-7777)내에서 핀셍으로 비장세포를 분리하였다. 비장 세포액을 실온에서 15분간 정치시켜 비장 결합조직을 가라 앉혀 제거하고 DMEM으로 원침세척하였다. 비장 세포액을 우태아 혈청에 중층하여 280Xg에서 5분간 원심분리함으로써 비장 세포액내의 혈소판을 제거하였다. DMEM으로 원침세척한 다음 비장 세포액을 Tris-NH4Cl 용액(Tris 20.6g/l, NH4Cl 8.3g/l)으로 처리하여 적혈구를 용혈시켜 백혈구 성분을 분리하였다. 그런 다음 RPMI1640으로 3회 세척하여 세포수를 1X108/ml로 조정하여 사용하였다.

위에서 준비한 형질세포종 세포 (P3X63Ag8.V653)와 비장세포를 1:10의 비율로 혼합한 후 DMEM으로 2회에 걸쳐 원심세척하였다. 37℃로 보온시킨 혼합 세포침전물에 50%(w/v) polyethylene glycol 1,500(PEG, Boerhringer Mannheim, Cat. No. 783 641) 1ml을 1분간 점적하여 세포를 융합시켰다. 점적후 즉시 37℃의 DMEM 1ml을 흔들면서 1분동안에 첨가하고 계속해서 DMEM 15ml을 5분간 첨가한 다음 원침하고 20% 우태아

혈청, 10% NCTC, 그리고 gentamicin(50㎍/㎖)이 첨가된 DMEM에 세포를 부유시킨 다음 96-well 배양판에 well당 50㎕ 씩 분주하여 37℃, 6% CO2에서 배양하였다.

융합된 세포만을 선택하기 위하여 HAT(50μM hypoxanthine, 0.4μM aminopterin, 16μM thymidine)배지를 융합후 1,3,5, 및 7일에 well당 50㎕씩 첨가하고, 9일에는 150㎕씩 배지를 교환하면서 13일까지 융합세포의 증식 유무를 역위상차 현미경으로 관찰하였다.

라) 융합세포의 선택과 단클론 배양(cloning)

융합 후 10일 내지 13일 사이에 융합된 세포가 well 바닥의 1/3이상 성장하였을 때 배양 상청액을 채취하여 효소면역측정법으로 OMIV 항원에 대한 항체를 분비하는 지의 여부를 검색하였다. 항체를 생산하는 well의 세포를 24-well에 옮거 배양한 후 항체역가가 계속 유지되고 세포의 증식이 활발한 hybrid를 선택하여 cloning을 실시하였다.

Cloning은 Mckearn의 무한대 희석법으로 실시하였다. 24-well에서 성장하는 세포를 DMEM으로 희석하여 최종 10-30 cells/ml의 농도로 적정하여 well당 100㎕씩 첨가하여 배양하였다. 이 때 사용한 배지는 aminopterin이 첨가되지 않은 배지를 이용하고, 5일 배양후 역위상차 현미경으로 1개의 세포집락이 형성된 well을 선택하고 항체생산 여부를 효소면역측정법으로 검색하였다. 항체의 역가가 높은 hybridoma를 최종 선택하여 증식시키고 그 배양액을 모아 항체의 반응성 또는 특성을 조사하는데 사용하였다.

Cloning된 hybridoma cell (1×107cell/0.2ml)을 BALB/C 암컷의 복강에 주사하고, 약 1주일 후 쥐의 복강으로부터 복수를 얻어냄으로 대량 분리하였다. 분리된 항체를 ammonium sulfate(40 50% saturation) precipitation으로 농축한후 protein A column을 통과시켜 정제하였다.

2-2-3 폴리클론 항체 합성.

가) 1차 접종

3㎖의 순수분리한 바이러스 10mg 용액에 동량(3㎖)의 Freund`s Complete Adjuvant(FCA)를 2개의 연결된 10㎖ Syringe에 넣어 20분간 mix하여 emulsion을 만든다. Emulsion이 완성되었었음을 확인 하기 위하여 증류수가 들어 있는 beaker에 한방울을 떨어뜨려 보았다. (이때 Ag이 oil(FCA)에 둘러 쌓여 있으면 물위에 뜨게 됨). Emulsified 된 Ag용액을 토끼 한 마리당 복강내에 1㎖, 피하(등의 여러곳)에 1㎖를 주사하였다.

나) 2차 접종

1차접종 1개월 후 바이러스 용액에 동량의 Freund`s Incomplete Adjuvant (FIA)를 처리하여 emulsion을 만들어 토끼의 복강에 1㎖, 피하에 1㎖를 각각 주사하였다.

다) 3차 접종

2차 접종 2-3주 후 virus용액만을 피하에 주사하였다.

라) 혈청 항체 역가 검정

3차 접종 4-5일 후 토끼의 귀 정맥에서 1㎖의 피를 채혈하여 3000rpm에서 10분 동안 centrifuge하여 혈청을 얻었다.(이때 혈청은 0.5㎖정도가 됨) 혈청을 2배수로 dilution series를 만들어 역가검정을 하였다. 이때 titer가 28-29 정도가 되지 않으면 토끼에게 한번 더 바이러스 용액을 접종하였다. 역가 검정 방법은 1% agarose 혹은 noble agar plate에서 Agar Gel Precipitation(AGP)test와 Enzyme Linked Immuno-solvent Assay(ELISA)로 하였다. ELISA test의 conjugated antibody로는 Sheep anti-rabbit Ig(s) conjugated with peroxidase (CAPPEL사 제조)를 사용하였다.

마) Factor Serum제조

바이러스의 Ab가 contaminant와 cross-reaction을 하는 것을 방지하기 위해서 cross-reaction이 일어날 가능성이 있는 물질(특히 버섯 추출물의 contaminant)을 항혈청과 혼합하여 실온(혹은 37℃)에서 1시간 정도 방치한 후 centrifuge하여 상등액을 factor serum으로 사용하였다.

2-2-4. Western Blot Analysis

바이러스로 면역된 쥐에서 얻은 monoclonal antibody와 토끼에서 얻은 polyclonal antibody의 반응성을 조사하였다. 조사된 단백질들은 95℃에서 5분간 끓인 뒤, 0.1% SDS상에서 단백질 전기영동(9)하여 nitrocellulose membrane에 옮겨졌다. TBST(10mM Tris-Cl, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20) buffer에 녹아있는 1% BSA 용액으로 실온에서 30분간 반응시켜 blocking한 뒤, monoclonal antibody의 경우 바이러스에 대한 1차 항체는 hybridoma세포를 배양한 배양액을 사용하였다. DMEM 배지에서 항체생성 융합 세포를 5x106cell/ml 까지 키운 뒤, 1,200rpm에서 5분동안 원심분리하여 얻은 상등액을 첨가하였다. Polyclonal antibody의 경우 antibody를 TBST buffer에 500배, 1,000배, 5,000배 희석하여 1차 항체로 사용하였다. 30분간 반응후, TBST buffer로 3분간 3회 세척하고 alkaline phosphatase conjugated second antibody를 30분간 반응시키고 BCIP/NBT를 발색 반응의 기질로 사용하여 발색을 관찰하였다.

2-2-5. 효소 면역 측정

융합세포에서 항체 생성세포를 선택하거나 선택된 단클론항체의 반응 특성을 조사하기 위하여 다음과 같이 효소면역측정법을 실시하였다. 수용성항원의 경우 96-well polystyrene microplate(Costar, Serocluster 96well EIA/RIA plate flat bottom, Cat. No. 3590)에 0.05M carbonate 완충액(pH9.6)으로 10㎍/㎖의 농도로 희석한 항원을 well당 50㎕씩 첨가하고 4℃에서 하룻밤동안 부착시켰다. 부착 후 증류수로 한 번 세척하고 3% bovine serum albumin (BSA)-phosphate buffered saline(PBS, pH7.3)-0.05% Tween 20용액을 100㎕/well 씩 첨가하여 37℃에서 3시간 동안 처리하여 항원이 부착되지 않는 부위를 차단시켰다. 그 다음 PBS-Tween 20용액으로 세척하고 검색할 배양액이나 희석한 혈청을 100㎕/well씩 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 항원-항체 반응을 진행시켰다. PBS-Tween 20으로 3분 간격으로 3번 세척하고 1:2,000으로 희석된 peroxidase conjugated rabbit anti-mouse IgG(Cappel, Cat. No. 22988)를 50㎕/well씩 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 PBS-Tween 20 용액으로 5회 세척하고 발색제가 첨가된 기질용액을 100㎕/well로 첨가하여 효소반응을 유도하였다. 기질용액은 0.1M phlsphate-citrate완충액 10ml에 30% 과산화수소 20㎕, 그리고 ortho-phenylene diamine 4mg을 넣어 만들었다. 실온에서 30분간 효소반응을 유지시킨 후 동량의 2M 황산용액을 첨가하여 효소반응을 중단시킨 다음 발색반응의 정도를 EIA Reader(BIO-RAD, Model 2550)을 이용하여 492nm에서 측정하였다.

2-2-6. Triple-Antibody Sandwich ELISA (TAS-ELISA)

바이러스에 대한 monoclonal antibody 일정량을 carbonate buffer(62mM Na_2CO_3, 30mM $NaHCO_3$, pH 9.0)에 희석하여 96-well plate에 coating 하였다. 4℃에서 2시간 이상 방치한 후, 남은 buffer를 털어내고, PBST(0.14M NaCl, 2.7mM KCl, 1.5mM KH_2PO_4, 8.1mM Na_2HPO_4, 0.05% Tween 20) buffer에 녹아있는 3% BSA 용액 150㎕를 첨가하고, 37℃에서 2시간 동안 반응시킴으로 blocking을 실시하였다. PBST buffer로 3회 세척하고 털어낸 뒤, 적당량의 바이러스 감염 버섯 즙액을 첨가하고 37℃에서 1시간 반응시켜 binding시켰다. 3회 세척 후, 바이러스에 대한 polyclonal antibody 일정량을 첨가하고 37℃에서 1시간 반응시켰다. 3회 세척 후, peroxidase conjugated second antibody (Sheep anti-rabbit Ig(s): CAPPEL사 제조) 를 37℃에서 1시간 반응시키고 o-phenylene diamine, H_2O_2를 발색 반응의 기질로 사용하여 발색을 관찰하였다.

2-2-7. 전자현미경 검경

순수분리한 바이러스 용액을 formbar-coated 400 mesh copper gride에서 2%(W/V) uranyl acetate, pH 4.5로 염색하여 JEOL model 200 transmission electronmicroscope(TEM) 으로 관찰 하였다.

제 3 장. 결 과

3-1. 바이러스의 병징

병든 느타리버섯에서 3종의 바이러스가 검출되었다. 이들 바이러스가 감염된 버섯의 병징은 매우 다양하였다. 가장 보편적인 병징은 버섯대가 짧아지고 매우통통해지거나 가지가 생기며 버섯갓이 찌그러지고 색이 짙어지는 등 기형의 버섯이 생기는 것이다 (Fig.1. B, C, D). 일반적으로 버섯재배상에서 종균을 한번 접종하면 20-25일후 발이하여 10일이 지나면 최초의 버섯을 수확하고 이후 10일 간격으로 5회 정도까지 재 수확이 가능하다. 초기에 수확하는 버섯보다 재차로 수확하는 버섯에서 바이러스에 감염된 병징은 더 심하게 나타나며 일반적으로 최초의 수확 버섯에서는 병징이 거의 나타나지 않거나 재배상의 일부분에서만 심하지않게 나타난다. 한번 병징이 발생한 재배상에서는 수확회수가 더해질수록 심해져 버섯핀 조차 튀지않는 경우가 생긴다. 병징이 발생하면 상품가치는 거의 없어지며 연작피해도 나타난다. 병든 버섯의 조직을 떼어내어 고체배지나 액체배지에서 균사를 키우면 바이러스가 감염되지않은 버섯의 조직에서 유래된 균사는 매우잘 자라나 바이러스에 감염된 버섯조직에서 유래된 균사는 잘 자라지 못하였다 (Fig.1. E, F). 본 연구에서 분리한 3종의 바이러스는 각기 다른 바이러스가 감염되었을 때나 혹은 두종류이상의 바이러스가 복합감염되었을 때 나타나는 버섯의 병징은 때때로 육안으로는 그 차이를 알 수 없었다. 버섯재배상에서 한번 병징이 나타나면 그 이후로 이 병으로부터 회복되지 못하였다.

바이러스에 감염된 종균은 육안으로는 구분할 수 없을 정도로 정상적으로 자라나 계대배양 회수가 더해질수록 균사생장이 느려졌다. 이는 균사에서보다 버섯에서 바이러스증식속도가 빠르기 때문으로 사료된다.

3-2. 바이러스 입자 순수분리

병든 버섯에서 부분순화한 바이러스 용액을 negative staining하여 전자현미경으로 검경한 결과 많은 시료에서 크기가 다른 두 종류의 바이러스 입자가 있음을 알 수 있었다. 이 부분순화한 바이러스를 고농도의 cesium chloride (CsCl: 1.585 g/㎤) 용액에서 isopycnic centrifugstion을 하여 각기 다른 크기의 바이러스 입자를 분리하는데 성공하였다 (Fig.2). 전자현미경으로 fraction에 따라 그 크기가 각기 다른 2종류의 구형바이러스를 검경할 수 있었으며 각 fraction의 RNA pattern으로 두 바이러스가 분리된 것을 확인하였다 (Fig.3). 그중 비중이 무거운 입자는 (Fig.3. fraction no.2,3,4,5) 작은 크기인 27㎚였으며 가벼운 입자는 (Fig.3. fraction no.11,12,13,14) 그 크기가 34㎚ 이었다(Fig.2). 우리는 이 27㎚인 작은 크기의 바이러스를 oyster mushroom spherical virus (OMSV), 34㎚인 큰 입자의 바이러스를 oyster mushroom isometric virus-I (OMIV-I)이라 명명하였다. 본 실험에서 수집한

경남지역의 병든 버섯에서는 대부분 OMSV와 OMIV-I가 중복감염되어 있었다.(Fig.11) 병든버섯에서 드물게 다른종류의 34㎚의 구형바이러스가 감염된경우를 볼 수 있었는데(Fig.3) 이 바이러스는 그 유전체 (genome) dsRNA 수와 크기가 OMSV-I과 달라 (Fig.4) oyster mushroom isometric virus-II (OMIV-II)라고 명명하였다.

3-3. 바이러스 유전체 RNA 분석

바이러스 입자에서 유전체 핵산을 분리하여 agarose gel electrophoresis 로 조사한 바 3종류의 바이러스가 있음을 알 수 있었다. 이들 3종의 바이러스 입자에서 추출한 핵산을 모두 DNase로 처리하였을 때 어떠한 분해도 일어나지 않았다. RNase 로 처리하였을때는 OMSV의 경우 저염농도의 완충용액 (low salt buffer condition; 0.05M NaCl) 조건에나 고염농도의 완충용액 (high salt buffer condition; 0.5M NaCl) 조건에서 모두 바이러스의 핵산이 분해되었고 OMIV-I 와 OMIV-II 의 경우 저염농도의 완충용액 조건에서는 핵산이 분해되었으나 고염농도의 완충용액조건에서는 분해되지 않았다 (Fig.4). 이 결과는 OMSV의 유전체는 ssRNA로 되어있고 OMIV-I 과 OMIV-II의 유전체는 dsRNA로 되어있음을 보여준다고 하겠다. OMSV 입자는 크기가 6,00kb 와 1.25kb 인 두종류의 ssRNA를 encapsidation하고 있고 OMIV-I 입자는 크기가 각기 다른 12개, 즉 2.65kb, 2.45kb, 2.40kb, 2.20kb, 2.15kb, 2.10kb, 2.05kb, 2.00kb, 1.90kb, 1.80kb, 1.10kb 및 0.80kb ,의 dsRNA를 encapsidation 하고 있었다. OMIV-II의 경우 2.25kb, 2.15kb, 2.05kb 등 3종의 각기 다른크기인 dsRNA를 encapsidation하고 있었다 (Fig.4).

3-4. 바이러스 coat 단백질 분리

바이러스 coat 단백질의 polypeptide 정보를 알기위하여 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 하였다. 각각의 바이러스는 그 coat 단백질 조성이 한가지 종류의 polypeptide (single polypeptide)로 되어있고 각 polypeptide의 분자량은 OMSV의 경우 29kD, OMIV-I 의 경우 71kD, OMIV-II의 경우 62kD 였다 (Fig.5).

3-5. 단클론항체 (monoclonal antibody) 합성

지금까지 본실험에서 느타리버섯 바이러스에 대한 단클론항체는 OMSV 의 경우 5개, OMIV-I의 경우 3개를 얻었다. OMSV에 대한 단 클론 항체를 isotype을 결정해보니 한 종류의 IgG와 네 종류의 IgM을 확인 할 수 있었으며 OMIV-I에대한 단클론항체는 IgG가 두종류, IgM이 한종류였다. 이 중 가장 반응성이 좋은 항체 IgG를 이용해 western blot 분석을 실시하였다. 그중 screening 과정에서 ELISA test에서 각 바이러스에 가장 반응성이 좋은 단클론 항체를 하나씩 골라 단클론이 cloning된 hybridoma cell (1×107cell/0.2ml)을 BALB/C 암컷의 복강에 주사하여 약 1주일 후 쥐의 복강으로부터 복수를 얻어냄으로 대량 분리하였다. 이들 단클론은 western

blot 으로 그 특이성을 test 한 결과 특이적으로 OMSV에대한 항체는 OMSV에만, OMIV-I에대한 항체는 OMIV-I에만 반응하여 그 특이성을 확인할 수 있었다(Fig.6).

Fig.7에서 lane 1은 대조구인 건전한 느타리버섯 세포에서 추출한 추출물과 iane 2는 순수분리한 OMSV와, lane 3,4,5는 바이러스병증이 나타난 느타리버섯에서 취한 각기 다른 농가에서 수집한 세포추출물과 OMSV 단클론 항체와 westen blot을 한 결과를 보여준다. 이때 건전한 느타리버섯 추출물에서는 바이러스가 없으므로 OMSV 단클론 항체와 반응을 하지않으나 순수분리한 OMIV 바이러스나 바이러스가 감염된 세포 추출물은 이 바이러스를 함유하고있으므로 단클론항체와 반응하였다.

Fig.7은 OMIV-I으로 만든 단클론항체 IgG중 하나로 western blot analysis를 한 결과이다. lane 1은 건전 대조구 (healthy control), lane 2는 순수 분리한 OMIV-I, lane 3은 순수 분리한 OMSV, lane 4는 순수분리한 OMIV-II, lane 5, 6, 7은 사천 및 고성의 병발생 농가에서 수집한 버섯의 추출물을 electrophoresis하여 검정하였다.

건전 대조구에서는 항원항채 결합이 없고 병든 버섯 즙액에만 단클론 항체가 항원항체 결합을 한 것으로 보아 본 실험에서 만든 단클론 항체는 성공적으로 얻어진 것으로 볼 수 있다. OMIV-I의 경우 비교적 최근에 농가에서 채집되었고, 순수분리하여 단클론항체를 얻는 과정에서 immunization한 쥐가 사고로 죽게되어 단클론항체를 얻는 것이 계획보다 늦어 졌으나, 2000년 12월 말경에 단클론항체를 증폭시킬수 있으리라 사료된다.

3-6. 폴리클론 항체 (polyclonal antibody) 합성

OMSV, OMIV-I, OMIV-II에 대한 바이러스로 면역된 토끼에서 얻은 serum으로 polyclonal antibody의 반응성을 조사하였다. 조사된 단백질들은 95℃에서 5분간 끓인 뒤, 0.1% SDS상에서 단백질 전기영동하여 nitrocellulose membrane에 옮겨졌다. TBST(10mM Tris-Cl, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20) buffer에 녹아있는 1% BSA 용액으로 실온에서 30분간 반응시켜 blocking한 뒤, 토끼 serum을 TBST buffer에 500배, 1,000배, 5,000배 희석하여 1차 항체로 사용하였다. serum을 500배 희석한 실험에서는 바이러스가 감염된 버섯(lane5,6,7)을 확인할 수 있었으나 감염되지 않은 정상 버섯(lane 1)에서도 nonspecific band가 많이 나타남으로 신뢰할 수 있는 polyclonal antibody의 반응성으로 생각할 수 없었으나 1,000배 이상 희석한 실험에서만 정상 버섯에서 nonspecific band가 관찰되지 않고, 감염 버섯을 확인할 수 있었다. 그러므로 사용한 serum은 1,000배 이상 희석되었을 때 non-specific binding으로 생기는 혼동을 방지할 수 있어 바이러스에 대한 polyclonal antibody로 사용할 수 있음을 알 수 있었다 (Fig.9, 10). 이들 polyclonal Ab는 각각의 self antigen에만 항원-항체 반응을 보였으며 OMSV, OMIV-I 및 OMIV-II 간의 cross-reactivity는 나타나지 않아 각기 항체들이 특이적으로 반응함을 알 수 있었다.(Fig.11). Fig.11에서 보면, OMIV-I의 경우 coat protein, Mr. 71KD 보다 적은 크기의 단백질과 항체가 반응하는 것으로 나타나는데 이는 OMIV-I virus의 coat protein이 specific clearage가 일어난 현상으로

사료된다.

3-7. Three antibody sandwich ELISA (TAS-ELISA)를 통한 바이러스 검정 키트 개발.

이상에서 합성한 OMSV, OMIV-I의 단 클론 항체와 폴리 클론 항체를 이용하여 TAS-ELISA kit를 그림 (Fig.12) 과 같은 방법으로 만들었다

Fig.13은 OMSV(A)와OMIV-I(B)에 대한 모노/폴리 클론 항체를 동시에 사용해 병든 버섯 시료의 바이러스 감염성 여부를 발색 정도에 따라 진단할 수 있음을 나타낸다. NC칸은 fusion partner cell (형질세포종 P3X63Ag8.V653세포) culture 의 상등액을 음성 대조군으로, H는 정상 버섯 시료의 반응성을 보여주고, 1번칸은 병든 종균, 2-11번칸은 여러 지역에서 수집한 병든 버섯들로 실험하였다. A에서 알수 있듯이 OMSV(Fig.13-A)는 사용한 병증버섯 및 종균에 모두 감염되어있고, OMIV-I(Fig.13-B) 은 일부 감염되어 있지 않은 시료도 있음을 알 수 있다. A,B에서 사용한 시료는 모두 같은 시료이기 때문에 두 실험에서 모두 발색을 보인 시료는 종균및 그 병증 버섯에 OMSV, OMIV-I이 동시에 감염되어 있음을 나타낸다. 실제로, OMSV와 OMIV-I은 하나의 버섯에 약 80%가 동시에 감염되어 있었음을 앞서 언급한 바 있다. OMIV-II에 대한 폴리 클론 항체는 이미 만들어졌으나 단 클론 항체 생성은 진행 중에 있어 2000년 12월 말 경에 TAS ELISA kit를 완성할 수 있을 것이다.

합성한 TAS-ELISA 진단 키트의 바이러스에 대한 민감도(sensitivity)를 조사 하였다. Fig.14에서 보면 NC는 fusion partner cell (형질세포종 P3X63Ag8.V653세포) culture 의 상등액을 음성 대조군으로, HM은 정상 버섯을 사용하였고, lane1은 병든 버섯의 파쇄액을 희석해 가며, lane2는 순수 분리한 바이러스(A:OMSV, B:OMIV-I)를 희석해가며 TAS-ELISA를 실시 하였다. OMSV 및 OMIV-I 바이러스를 검정하기 위해서는 버섯조직이 6mg (Fig.14→)만 있으면 바이러스 감염여부를 진단 할 수 있었고 순수 바이러스 용액은 OMSV일 경우 2㎍/ml (Fig.14 ↘)까지 OMIV-I은 4㎍/ml (Fig.14, ↙)까지 눈(naked eye)으로 발색반응을 판별 할 수 있었다.

제 4 장. 고 찰

대부분의 곰팡이에는 기생하는 바이러스가 있다(1). 이들은 dsRNA genome으로 갖고 있는 구형의 바이러스이며 보통 바이러스에 감염된 곰팡이는 병증을 나타내지 않는다(1). 또한 곰팡이 바이러스는 그 특징이 세포 외부에서는 존재할 수 없는 바이러스 입자이므로 cell fusion이나 anastomosis에 의해 plasmid처럼 한세포에서 다른 세포로 전달되므로 virus-like-particle(VLP)이라고도 부른다. 그러므로 곰팡이에 바이러스를 감염시켜 병원성을 증명하기가 매우 어렵다. 본 연구의 대상인 느타리 버섯의 바이러스도 그 병원성을 코흐의 가설(Koch's postulates)에 의하여 증명하여야만 하는 숙제가 있다. 이 병원성 검증을 위하여 본 실험실에서는 버섯의 fungal cell protoplast를 만들어 electroporation 으로 바이러스를 곰팡이 세포내로 감염시키는 실험을 하고있다. 버섯에 바이러스가 감염되었을 경우 심각한 병증을 나타내는 그 대표적인 예가 양송이 (*Agaricus bisporus*)에 'la France Disease'를 나타내게 하는 dsRNA virus이다(1, 22)

느타리버섯의 바이러스병에 관한 연구는 양송이 바이러스병에 관한 연구에 비하면 매우 적은 편이다. 이는 양송이는 전세계적으로 애용되고 있는 반면, 느타리 버섯은 지역적으로 한정된 소비를 하고 있기 때문 일 것이다. 느타리버섯은 한국이 가장 많이 소비하고 있으며 느타리버섯에 대한 연구는 우리나라가 가장 많이 하고 있다. 느타리버섯에서도 최근 dsRNA 바이러스가 보고되고 있다. 특히 1992년 우리 나라 농촌진흥청의 연구팀이 느타리버섯에서 dsRNA를 추출하여 바이러스병의 발생 가능성을 보고하였다(2, 3, 24). 지금까지 보고된 우리 나라 느타리버섯에서 분리된 바이러스는 24nm 및 30nm의 구형 바이러스로(24) 그 유전체는 dsRNA로 되어 있으며, 그 크기가 각각 8.0, 2.4, 2.1, 1.9, 1.7 kb의 5 종류였다(24). 그러나 본 연구팀이 최근 경남지역에서 바이러스병이 발생한 느타리버섯으로부터 분리한 바이러스는 구형인 3 종류였다. 즉, 그 유전체가 ssRNA 인 oyster mushroom spherical virus (OMSV), 유전체가 dsRNA로 되어있는 oyster mushroom isometric virus-I (OMIV-I)과 oyster mushroom isometic virus-II (OMIV-II) 이었다(Fig.4). OMSV는 그 입자크기가 직경 27㎚였으며 OMIV-I과 OMIV-II 는 그 크기가 직경 34㎚로 동일한 크기의 입자였으나 (Fig.2) 그 coat protein의 크기는 달랐다(Fig.5). 이들 바이러스 유전체는 OMSV의 경우 6.00 및 1.25kb의 두 조각의 ssRNA로 되어 있었으며, OMIV-I은 2.60, 2.45, 2.40, 2.20, 2.15, 2.10, 2.05, 2.00, 1.90, 1.80, 1.00, 및 0.80kb 로된 12개의 dsRNA 조각으로 되어있었고, OMIV-II는 2.25, 2.15, 및 2.05 kb인 3조각의 dsRNA 로 되어있었다(Fig.4). OMSV의 경우 곰팡이 바이러스로는 최초로 발견된, 그 유전체가 ssRNA로 되어있는 구형의 바이러스이다. 이 바이러스의 유전체를 cDNA로 합성하여 DNA sequencing을 일부분 한 결과 Garlic virus와 sequence homology가 높았으며 OMIV-I과 OMIV-II의 경우 *Fusarium foe* virus와 그 sequence homology가 높았다 (result not shown). OMSV는 아직 그 분류학상의 위치를 알 수 없으나 OMIV-I 및

OMIV-II는 pastitivirus의 group에 속하리라 사료된다.

중국(11)에서 발표된 느타리버섯 바이러스를 보면 그 크기가 직경 24㎚ 인 구형과 40-600nm 길이의 막대형 이었으며, 1.97, 1.67, 1.49, 1.29kb인 4개의 dsRNA를 encapsidation하고 있었다. Acrylamide gel electrophresis 에서 coat protein 이 두 개의 band로 나타나고 있는 것 으로 보아 두 개의 다른 바이러스가 복합감염된 가능성도 있는것으로 사료된다. 그러므로 encapsidation된 dsRNA도 두 종류의 바이러스 입자에서 유래된 것으로 볼 수 있겠다고 하겠다.

이상의 결과들을 종합해 보면 느타리버섯에서는 ssRNA 및 dsRNA를 유전체로 갖고 있는 여러 종류의 바이러스가 존재하며 양송이에서와 같이 막대형의 바이러스도 존재함을 알 수 있다. 그러므로 우리나라에서도 이미 발견된 바이러스 외에 다른 종류의 바이러스가 있을 가능성도 높아 느타리버섯 바이러스에 관한 연구가 지속적으로 되어야 하겠다.

OMIV-II의 경우 처음분리한 시료는 병증이 나타나지 않았으나 실험실에서 균사체 계대배양을 여려차례 한 결과 균사의 성장이 배우 늦어지는 등 바이러스 병증을 나타내었다. 또한 병증 발현과 함께 바이러스의 세포내 함량도 늘어 이는 병증발현이 세포내 바이러스 함량과도 관련이 있음을 시사한더고 하겠다. 이는 바이러스가 종균에 감염되었을 때 육안으로는 균사성장이 정상으로 보이더라도 계댜배양시 안심할 수 없다는 것을 시사한다. 곰팡이의 dsRNA 바이러스는 보통 기주에서 거의 병증을 나타내지 않으나 빵효모, *Saccharomyces cerevisiae*의 Killer virus system을 예를들면 특정 dsRNA 가 co-infection 되거나 cold-stress가 가해지면 *S. cerevisiae*의세포가 자라지 못하고 심지어는 죽게된다.(13,20) 다시말하면 특정환경에서는 균체내에 바이러스가 있어도 바이러스 병은 나타나지 않는다. 건전세포인줄 알고 증식시키다가 어느날 갑자기 환경요인의 변화에 의하여 병증이 발현될 수 있다는 이야기이다. 그러므로 바이러스병 감염여부를 과학적으로 정확히 알 수 있는 방법의 개발이 필요하다.

이에 본 연구팀은 느타리버섯 바이러스를 검정할 수 있는 단클론 항체 및 폴리클론 항체를 이용한 TAS-ELISA 진단 키트를 만들었다. 이 TAS-ELISA 진단 키트는 병든균사 및 버섯에서 바이러스량이 2 4㎍/㎖의 농도로 있으면 바이러스를 검정할 수 있어 종균이나 버섯조직이 약 0.6㎎ 이상만 있으면 바이러스 감염유무를 눈으로 판단할 수 있다. 이 정도의 정밀성이면 종균소나 농가에서 바이러스 감염유무를 쉽게 알 수 있어 건전주를 선발함에 있어 문제가 없으리라 사료된다.(Fig.14) 현재로는 시료의 sample 수가 많은 종균소나 검역소에서 사용하기 쉬운 96well plate를 만들었으나 농가에서 손쉽게 사용할 수 있는 nylon paper 등에 항체를 붙여 값싸게 보급할 수 있도록 하려고 한다.

경남 지방의 10곳의 느타리 재배농가에서 바이러스 병증이 나타난 느타리버섯을 수집하여 이 TAS-ELISA 진단키트로 검사한 결과 OMSV는 10농가의 느타리버섯 모두에 걸려있었고 OMIV-I은 8농가의 느타리버섯에 걸려 있음을 알 수 있었다. (Fig.13) OMSV 한 바이러스만 걸린 느타리버섯이나 OMSV 및 OMIV-I이 복합감염된 버섯이나 모

두 병증이 빗스하였다(병증이 너무나 복합적이어서 병즐을 눈으로 보아 진단하기는 어려움). 지금까지 수집한 병든 느타리버섯에서 OMIV-I만이 검출된 경우가 없었으므로 OMIV-I 만이 감염된 느타리버섯을 채집하거나 OMIV-I 만을 느타리버섯의 세포에 감염시켜 OMIV-I의 느타리 바이러스 병증 발현에 미치는 영향을 연구하여야 할 것이다.

버섯의 바이러스는 항상 나쁜 측면만 있는 것은 아니다. 바이러스를 함유한 버섯이 제대로 수확될 수 만 있다면 그 나름대로 사람의 성인병치료 보조제로 개발될 수 있다. 버섯바이러스의 dsRNA는 젖먹이동물의 interferon inducer로서 알려져 있으며 버섯의 dsRNA 는 항암효과 및 성인병 특히 cholesterol 을 낮추는데 효과적이란 보고가 있다 (18). 버섯바이러스 유전체의 sequence 가 알려지면 이를 이용한 무독성 바이러스를 개발하여 버섯에서 증식은 되나 병을 일으키지 않는 바이러스개발이 가능할 것이다. 이를 목적으로 본 연구팀은 OMSV, OMIV-I, OMIV-II 유전체의 nucleotide sequences를 알기 위해 cDNA를 합성하고 있다.

제 5 장. 결 론

1. 병든 느타리버섯에서 최초로 3종의 바이러스를 순수분리 하였다. 이 바이러스들은 모두 구형이었으며 유전체는 ssRNA 혹은 dsRNA였다.

그중 oyster mushroom spherical virus (OMSV)는 그 크기가 27nm 이고 6.00kb와 1.25kb인 2조각의 ssRNA를 encapsidation 하고 있었다. Coat protein은 29 kD의 polypeptide 1종류로 되어 있었다.

Oyster mushroom isometric virus-I (OMIV-I)은 그 크기가 34 nm 이며, 이 입자는 2.65kb, 2.45kb, 2.40kb, 2.20kb, 2.15kb, 2.10kb, 2.05kb, 2.00kb, 1.90kb, 1.80kb, 1.10kb 및 0.80kb 등의 12개의 dsRNA를 encapsidation 하고 있었다. Coat protein은 71kD의 polypeptide 1종류로 되어 있었다.

Oyster mushroom isometric virus-II (OMIV-II)는 그 크기가 34nm 이며, 2.25kb, 2.15kb, 2.05kb 등 3종의 dsRNA를 encapsidation 하고 있었으며 Coat protein은 62kD의 polypeptide 1종류로 되어 있었다.

2. 경남 지방의 경우 병든 버섯에서는 대부분 OMSV와 OMIV-I이 감염 되어 있었다. OMIV-I은 항상 OMSV와 함께 중복 감염 되어 있었으며, 버섯에서 나타나는 병증은 OMSV 한 종류만 감염되어 있거나, OMSV가 OMIV-I과 중복 감염이 되어 있거나, 눈으로는 봐서는 병증을 구별하기 어려웠다. OMIV-II는 비교적 최근에 종균을 계대배양 하는 과정에서 균사성장을 억제 하는 것으로 관찰되어 수집된 것이다.

3. 이들 3 바이러스를 쥐에 주사하여 단클론 항체를 얻었고, 토끼에 주사하여 폴리클론 항체를 얻었다. 각 바이러스에 대한 항체들은 Western Blot에서 특이적으로 바이러스에 반응 하였다.

4. 단클론 및 폴리클론 항체를 이용하여 OMSV 및 OMIV-I 바이러스 검정을 위한 triple-antibody sandwich ELISA (TAS-ELISA) 키트를 합성 하였다. 이 TAS-ELISA kit는 병든 조직이 0.6mg 혹은 순수분리된 바이러스가 OMSV인 경우 0.2mg/ml, OMIV-I의 경우 0.4mg/ml만 존재하면 발색반응에 의한 바이러스 유무를 눈으로 판별할 수 있었다.

OMSV-II에 대한 키트합성은 현재 진행중에 있다.

5. 이 TAS-ELISA 키트는 종균 및 버섯에서 바이러스 존재를 쉽게 검정 할 수 있으며 96well plate는 이미 만들어져 있어 종균소나 검역소에서 사용 할 수 있다. 이 키트의 이용은 바이러스 무병종균을 선발 할 수 있어 농가의 바이러스병 확산을 막을 수 있다.

6. 참 고 문 헌

1. Buck, K. W. 1986. Fungal virology: An overwiew. *In* Fungal virology (K. W. Buck, Ed.), PP 1-85. CRC Press, Boca Raton, Florida

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

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

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

5. Harlow, Ed. and D. Lane. 1988. Immunizations. pages 53-137 in : Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory.

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

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

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

9. Laemmil, U. K. 1970. Cleavage of stractural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London) 227: 680-685

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

11. Pingyan, L., L. Hongdi, and C. Kaiying. 1990. Intracellular appearance, morphological feature and properties of oyster mushroom virus. *Mycological Reasearch* 94: 529-537

12. Revill, P. A., A. D. Davidson and P. J. Wright. 1994. The nucleotide sequence and genome organization of mushroom bacilliform virus: a single-stranded RNA virus of *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. *Virology* 202: 904-911.

13. Ridley, S. P., S. S. Sommer and R. B. Wickner. 1984. Superkiller mutations in *Saccharomyces cerevisiae* suppress exclusion of M2 double-stranded RNA by L-A-HN and confer cold sensitivity in the presence of M and L-A-HN. *Mol. Cell. Biol.* 4: 761-770.
14. Romain, C. P. and B. Schlagnhaufer. 1995. PCR analysis of the viral complex associated with La France disease of *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2322-2325.
15. Schisler, L. C., J. W. Sinden and E. M. Sigel. 1967. Ethiology, symptomatology, and epidemiology of a virus disease of cultivated mushrooms. *Phytopathology* 57: 519-526.
16. Sinden, J. W. and E. Hauser. 1950. Report of two new mushroom diseases. *Mushroom Sci.*1:96-100
17. Stott E.J. and D.A.J. Tyrrell. 1986. Application of Immunological methods in virology. Pages 120.1-120.25 in : Application of Immunological Methods in Biomedical Sciences. D.M. Weir. ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
18. Suzuki, S. and S. Ohshima. 1974. Influence of Shii-ta-ke (*Lentinus edodes*) on human serum cholesterol. pages 463-467 in: Mushroom Science IX (Part I). Proceedings of the Ninth International Scientific Congress on the Cultivation of Edible Fungi. Tokyo.
19. Tavantzis, S. M., C. P, Romaine, and S. H. Smith. 1980. Purification and partial characterization of a bascilliform virus from Agaricus bisporus: A single stranded RNA mycovirus . *Virology* 105: 94-102
20. Thiele, D. J., E. M. Hanning and M. J. Leibowitz. 1984. Multiple L double-stranded RNA species of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for separate encapsidation. *Mol. Cell. Biol.* 4: 92-100.
21. Ushiyama, R., Nakai, Y. and Ikegami, M. 1977. Evidence for double-stranded RNA from polyhedral virus-like particles in *Lentinus edodes*. *Virology* 77: 880-883.
22. van Zaayen, A. 1979. Mushroom viruses. Pages 239-324 in: Viruses and Plasmids in Fungi. P. A. Lemke, ed. Marcel Dekker, Inc., New York.
23. van der Lende, T. R., M. C. Harmsen and J. G. H. Wessels. 1994. Double-stranded RNA and proteins associated with the 34 nm virus particles of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Virol.* 75: 2533-2536.
24. van der Lende, T. R., M. C. Harmsen, S. J. Go and J. G. H. Wessels. 1995. Double-stranded RNA mycoviruses in mycelium of *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Micorbiol. Let.* 125: 51-56.
25. van der Lende, T. R., E. H. Duitman, M. G. Gunnewijk, L. Yu and J. G.

Wessels. 1996. Functional analysis of dsRNAs (L1, L3, L5, and M2) associated with isometric 34 nm virions of *Agaricus bisporus* (white button mushroom). *Virology* 217: 88-96.

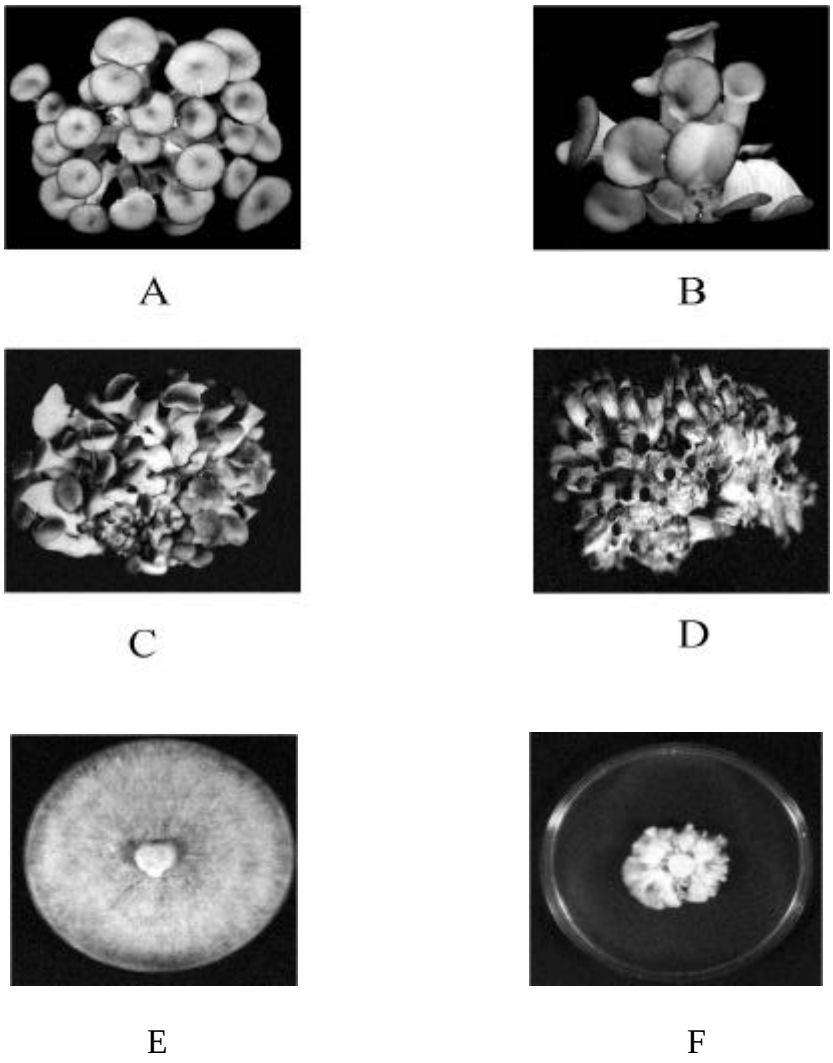


Fig. 1. Possible viral disease symptoms of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. Healthy (A) and diseased mushroom (B, C, D), and mycellia grown from the healthy (E) and diseased basidiocap (F).

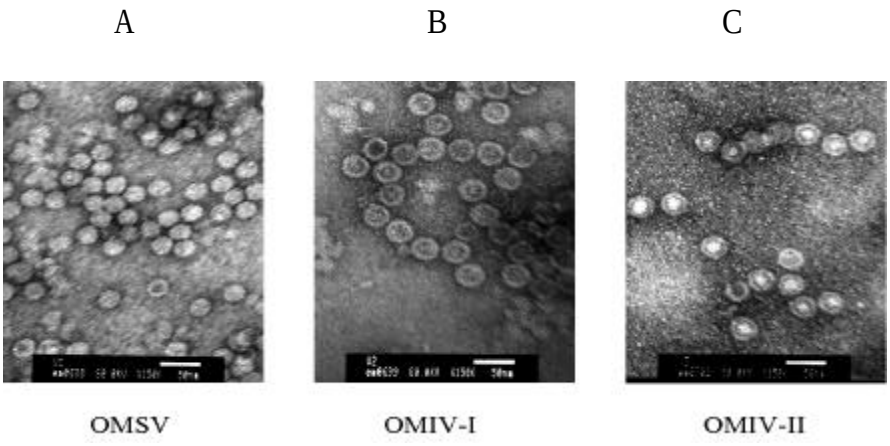


Fig. 2. Electron micrograph of viruses from diseased oyster mushroom, *Pleorotus ostreatus*. The sizes of spherical particles of oyster mushroom spherical virus (OMSV; A), oyster mushroom isometric virus-I (OMIV-I; B), and oyster mushroom isometric virus-II (OMIV-II; C) are 27, 34, and 34 nm, respectively. Stained with 2% (w/v) aqueous uranyl acetate pH 4.5. Bars represent 50 nm.

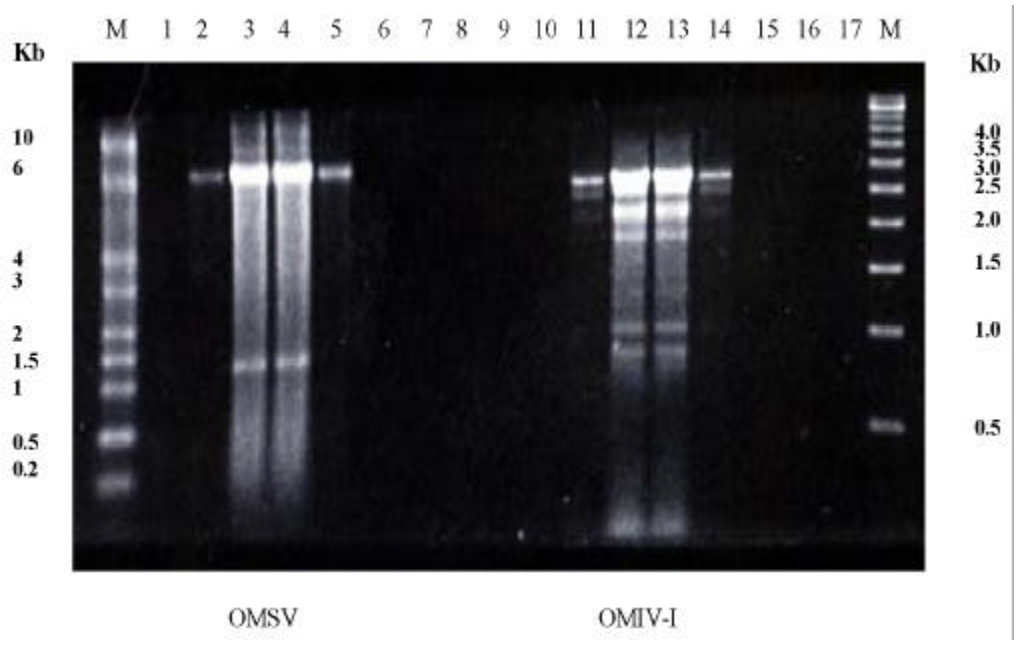


Fig.3. Separation of oyster mushroom spherical virus (OMSV) and oyster mushroom isometric virus-I (OMIV-I). Viruses from diseased oyster mushroom mixed infected with the two were separated by isopycnic centrifugation in 1.585 g/cm3 cesium chloride (CsCl) in Tris-EDTA buffer. The viral RNAs were extracted by phenol, precipitated with ethanol, and electrophoresed on 1% agarose gel. M1 and M2, size markers of ssRNA and dsDNA, respectively. Fractions: 2, 3, 4, 5; OMSV and 11, 12, 13, 14; OMIV-I

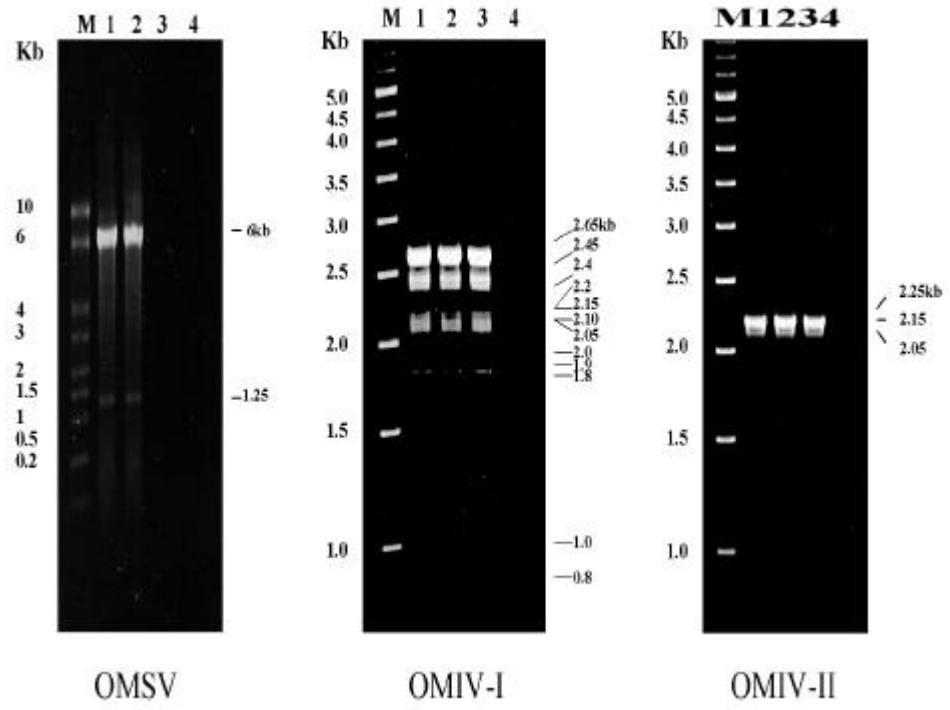


Fig.4. Ionic strength-dependent sensitivity of purified viral nucleic acids to hydrolysis by RNaseA. A, B, C show electrophoregrams of nucleic acids extracted from oyster mushroom spherical virus (OMSV), oyster mushroom isometric virus-I (OMIV-I), oyster mushroom isometric virus-II (OMIV-II), repectively. Viral nucleic acids were incubated without nuclease (lane 1), with DNase I (10 u/ml; lane 2), with RNaseA (10 g/ml) in 0.5 M NaCl (lane 3) or 0.05 M NaCl (lane 4) for 30 min at 37

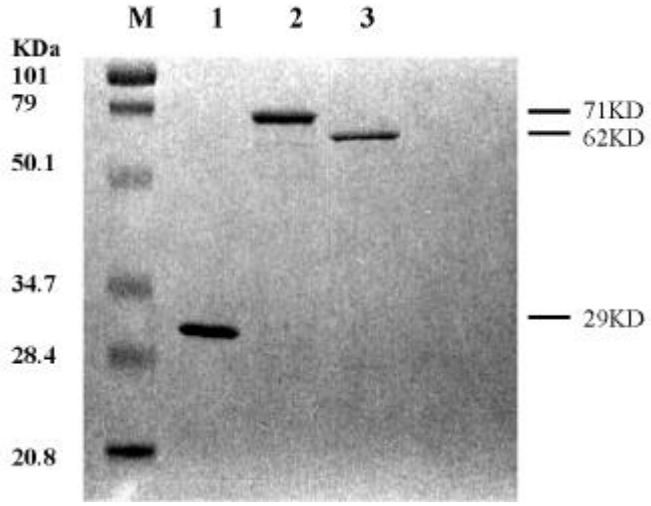


Fig. 5. Polypeptides of viral coat proteins in SDS-PAGE. Viral coat proteins were denatured for 5 min at 95℃ in 50 mM Tris-Cl, pH 6.8, 100 mM dithiothreitol, 2% SDS, 10% glycerol, and 0.1% bromophnol blue. Denatured proteins were separated by 12% polyacrylamide gel electrophoresis. Gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. 1, 2, 3; oyster mushroom spherical virus (OMSV), oyster mushroom isometric virus-I (OMIV-I), oyster mushroom isometric virus-II (OMIV-II), respectively.

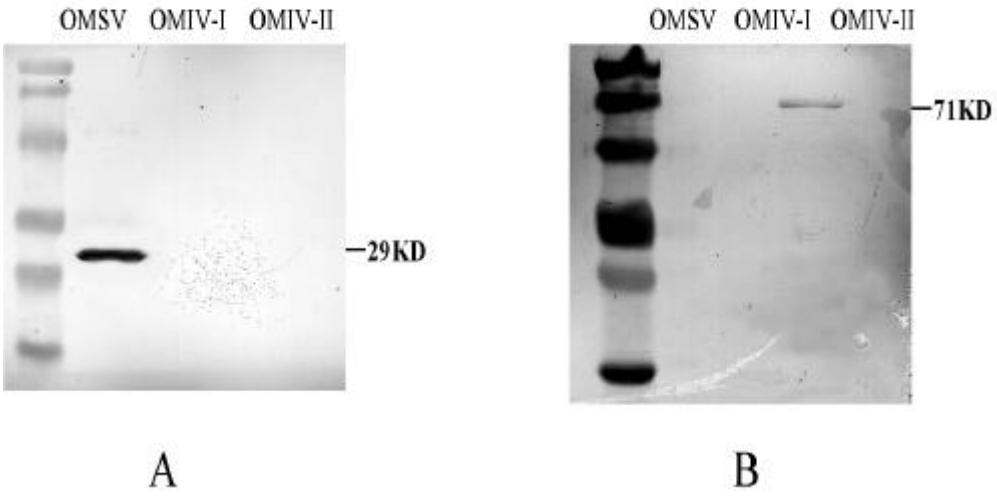


Fig6. Western analysis of monoclonal antibodies against CMSV and CMIV-I.
Viral proteins were separated in 12% SDS-polyacrylamide gel and second antibodies were used alkaline phosphatase conjugated mouse IgG. For staining reaction, the substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium(BCIP/NBT) was used.

Antibodies against CMSV react only with CMSV, not with CMIV-I and CMIV-II(A). Antibodies against CMIV-I react only with CMIV-I, not with CMSV and CMIV-II (B).

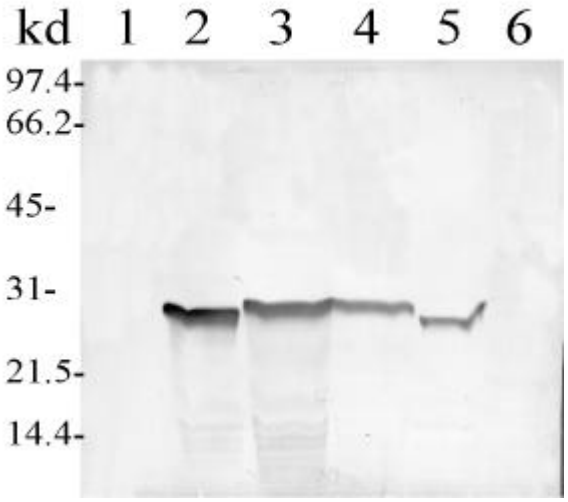


Fig.7. Western blot of viruses with monoclonal antibody against CMSV.
Each sample wae electrophoresed on 15% SDS-polyacrylamide gel.
lane 1; extract of healthy oyster mushroom, 2;purified CMSV, 3,4,5;xell lysate of diseaed oyster mushroom from different cormertial farm.

M 1 2 3 4 5 6 7

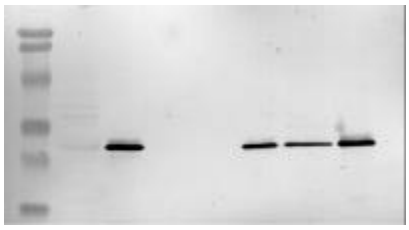


Fig.8. western blot of viruses with monoclonal antibody against CMIV-I.
each sample was elecrophoresed on 15% SDS-polyacrylamide gel.
M; size marker, lane 1; extract of healthy oyster mushroom, 2; purified CMIV-I, 3; purified CMSV, 4; purified CMIV-II, 5, 6, 7; extract of diseased oyster mushroom collected form different commercial farm.

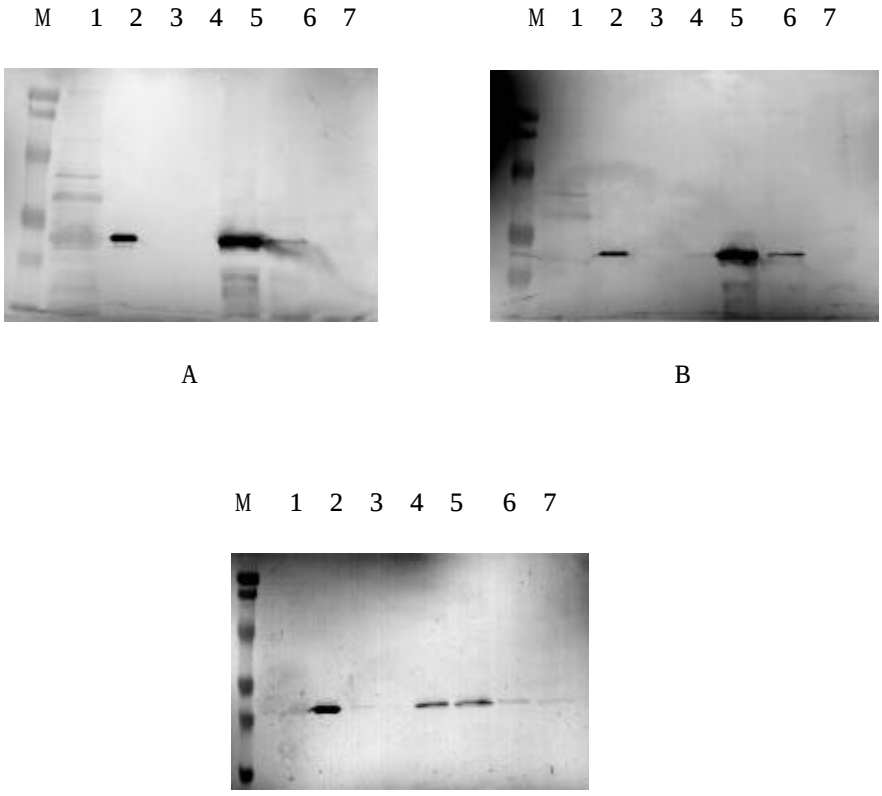
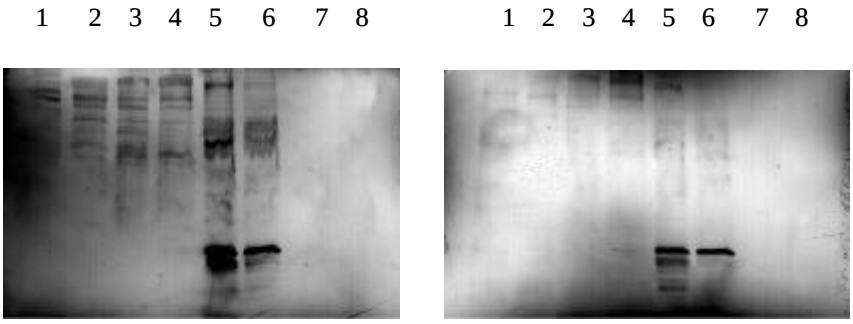
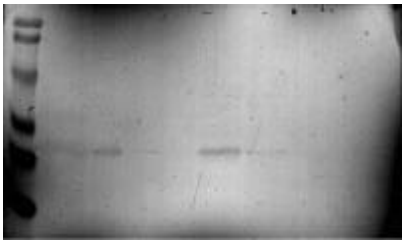


Fig.9. western blot analysis of polyclonal antibody against CMSV. Rabbit antiserum was diluted by 500(A), 1000(B) and 5000(C) times.
sample were electrophoresed in 15% acrylamide gel.
lane 1; cell extract of healthy oyster mushroom, lane 2; purified CMSV, lane 3; purified CMIV-I, lane 4; purified CMIV-II, lane 5, 6, 7, 8; cell extract from diseased mushroom collected from different commercial farms



A B



C

Fig.10. western blot analysis of policlonal antibody against CMIV-I.
Rabbit antiserum was diluted by 500(A), 1000(B), 5000(C) times.
each samples were electrophoresed in 15% acrylamide gel.
lane 1; cell extract of healthy oyster mushroom, lane 2; purified CMIV-I,
lane 3; purified CMSV, lane 4; purified CMIV-II, lane
5, 6, 7, 8; cell extract from diseased mushroom collected from different commercial farms

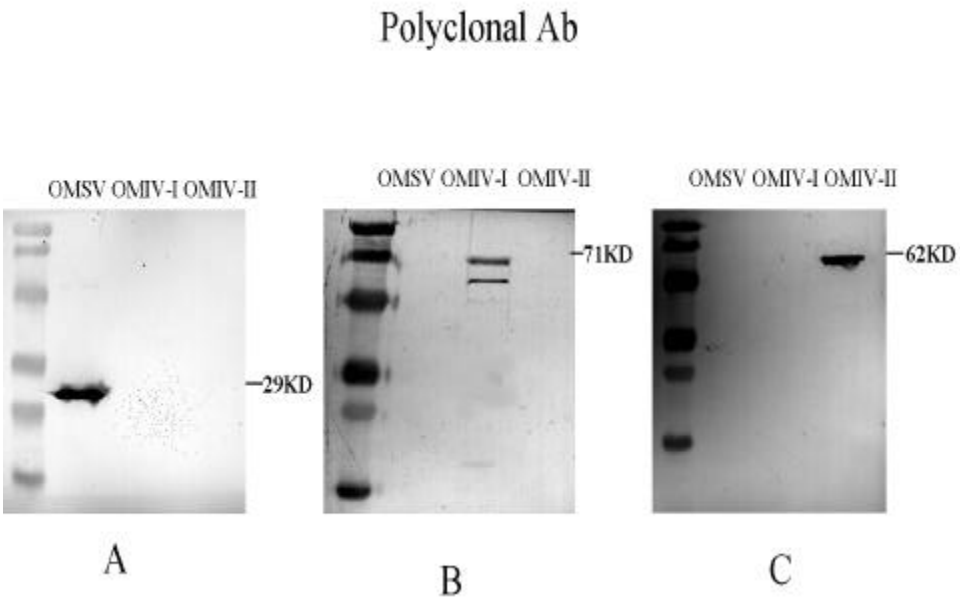


Fig.11. Western blot analysis of polyclonal antibodies against three oyster mushroom viruses, OMSV (A), OMIV-I (B), OMIV-II (C). Each antibody reacted only with its own virus used as a antigen, showed no cross reactivity with the remaining two viruses.

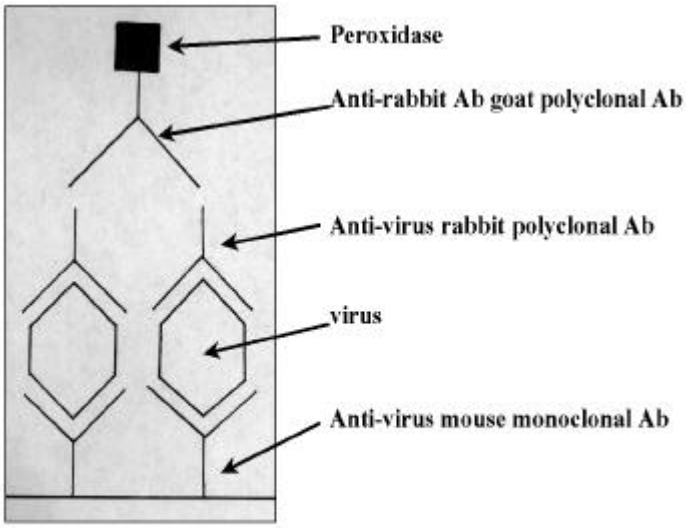


Fig.12. Scheme of tirple antibody sandwich-ELISA (TAS-ELISA)

NC	H	8
NC	1	9
NC	2	10
NC	3	11
NC	4	
NC	5	
NC	6	
NC	7	

A B

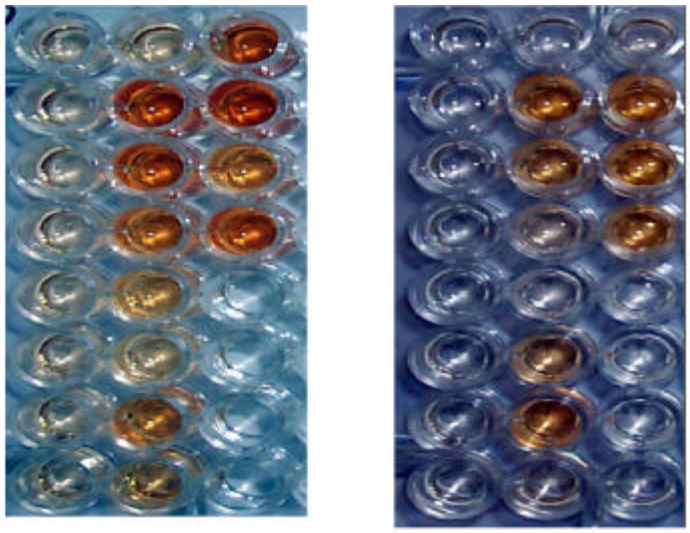


Fig.13. A tirple antibody sandwich-ELISA (TAS-ELISA) to detect CMSV(A) and CMIV-I(B) infection in oyster mushrooms.

Monoclonal and polyclonal, antibodies against CMSV(A) and CMIV-I(B) and peroxidase conjugated second antibodies were used. Virus infection was tested with the cell lysate of spawn and oyster mushroom. NC; negative control, H; healthy mushroom, 1; diseased spawn, 2-11; diseased mushrooms. All the diseased mushroom collected from the different mushroom farms were infected with CMSV(A), not all with CMIV-I(B). Samples 1,2,3,5,6,9,10,11 colored in this test show co-infection with CMSV, CMIV-I in a oyster mushroom.

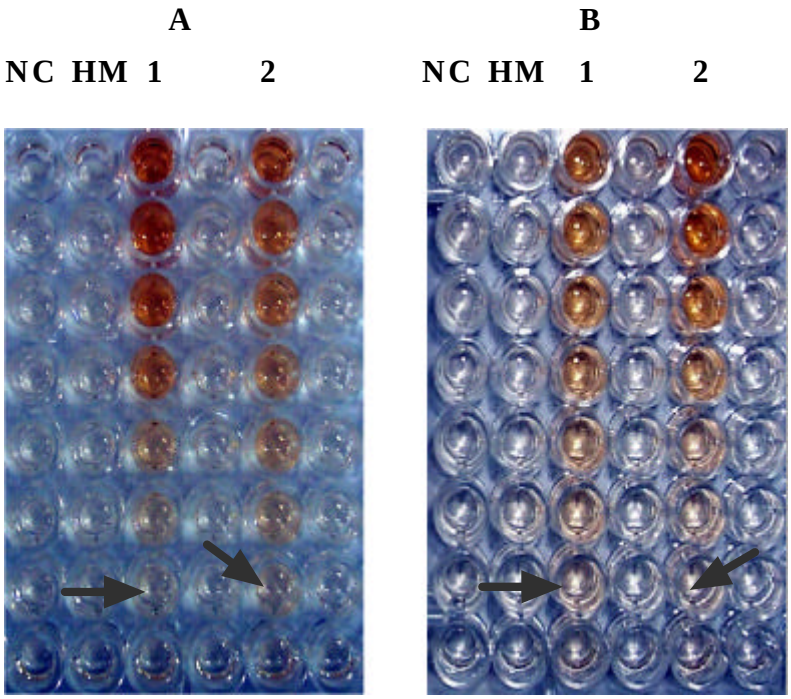


Fig.14. Sensitivity of tirple antibody sandwich-ELISA (TAS-ELISA) to detect CMSV(A) and CMIV-I(B) infection in oyster mushrooms.
Monoclonal and polyclonal, antibodies against CMSV(A) and CMIV-I(B), and peroxidase conjugated second antibodies, were used as Fig.12. Sensitivity of TAS-ELISA was tested with the cell lysate of oyster mushroom and purified virus solution. NC; negative control, HM; healthy mushroom.
Test was determined by diluting the cell lysate and pure virus by two times Lane 1 and 2; dilution series of the cell lysate of a diseased mushroom and purified virus solution, respectively. 0.6mg of deseased mushroom(→) and 2μg/ml(↘) and 4μg/ml(↙)of purified virus solution can be detected by this TAS-ELISA.

주 의

1. **이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.**

2. **이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.**

3. **국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.**

[별지 제9호 서식]

연구개발보고서초록

<table>
<tr><td rowspan="2">과 제 명</td><td colspan="5">(국문) 느타리버섯 바이러스병 퇴치를 위한 진단시약 개발 및 바이러스 무병주 선발</td></tr>
<tr><td colspan="5">(영문) Kit production for diagnosis of viruses in oyster mushroom, Pleurotus ostreatus</td></tr>
<tr><td>주관연구기관</td><td colspan="2">경상대학교</td><td rowspan="2">총 괄 연 구 책 임 자</td><td colspan="2">(소속) 경상대학교</td></tr>
<tr><td>참 여 기 업</td><td colspan="2"></td><td colspan="2">(성명) 이 현숙</td></tr>
<tr><td rowspan="4">총연구개발비
(천 원)</td><td>계</td><td>119,200</td><td>총 연 구 기 간</td><td colspan="2">1997.10.28 2000.10.27
(3 년 0 월)</td></tr>
<tr><td>정부출연금</td><td>119,200</td><td rowspan="3">총 참 여 연 구 원 수</td><td>총 인 원</td><td>8</td></tr>
<tr><td>기업부담금</td><td></td><td>내부인원</td><td>5</td></tr>
<tr><td>기 타</td><td></td><td>외부인원</td><td>3</td></tr>
</table>

○ 연구개발 목표 및 내용

최근 문제가되고 병해중의 하나인 느타리버섯의 바이러스병을 방제하기위한 목적으로 병을 일으키는 바이러스를 순수분리하여 진단 키트를 합성하고자 하였다. 이 바이러스의 진단키트합성의 목적은 느타리종균 및 버섯의 바이러스 감염여부를 쉽게 알 수 있게 하여 바이러스 무병주 종균을 보급할 수 있게하고 조기에 병 발생을 알 수 있어 느타리버섯 재배 사에서 바이러스병을 근원적으로 퇴치 할 수 있게 하는 데 있다.

○ 연구결과

느타리 버섯에서 문제가 되는 바이러스병을 퇴치하기 위하여서는 첫째 병원균인 바이러스에 대한 확실한 정보가 있어야 한다. 본 실험실에서는경상남도 지역을 중심으로 이병느타리 버섯을 수집하여 3종류의 새로운 느타리버섯 바이러스를 순수분리하였다. 둘째, 순수분리한 바이러스를 이용하여 단클론 항체(monoclonal antibody)와 복클론 항체 (polyclonal antibody)를 이용하여 triple-antibody sandwich ELISA (TAS-ELISA) kit를 개발하였다. 셋째,이 진단kit는 매우 정밀하여 세포내의 극소량의 바이러스도 감지해 낼 수 있어 세포가 0.6㎎, 혹은 바이러스 량이 2 4㎍/㎖만 있어도 눈으로 바이러스 감염 유무를 알 수 있었다.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

본연구로 개발한 3종의 바이러스 진단시약에 대한 국내특허 출원을 하였으며 국제특허 출원을 준비중에 있다.

본연구로 얻은 성과로 산업기술평가원의 신기술 창업보육(TBI)사업자로 선정되었다 (신기술 사업화 과제명: 느타리버섯 및 채소종자 바이러스병 진단시약 개발 및 판매). 그러므로 판매회사(바이러스디텍티브)를 통해 검역소, 종균소, 및 농가에 보급할 계획이다.

< 양식 6>

자체평가 의견서

<table>
<tr><td>연구개발분야</td><td colspan="2">생명공학</td><td>과제관리번호</td><td colspan="2">197042- 3</td></tr>
<tr><td>연구과제명</td><td colspan="5">느타리버섯바이러스병 퇴치를 위한 진단시약 개발 및
바이러스 무병주 선발</td></tr>
<tr><td>주관연구기관</td><td colspan="5">경상대학교</td></tr>
<tr><td rowspan="5">연구담당자</td><td>총괄책임자</td><td colspan="4">이 현숙</td></tr>
<tr><td rowspan="4">협동・위탁・세부
연구책임자</td><td>기관(부서)</td><td colspan="2">경상대학교 유전공학 연구소</td><td>성 명</td><td>이 현숙</td></tr>
<tr><td>〃</td><td colspan="2"></td><td>〃</td><td></td></tr>
<tr><td>〃</td><td colspan="2"></td><td>〃</td><td></td></tr>
<tr><td>〃</td><td colspan="2"></td><td>〃</td><td></td></tr>
<tr><td>연구 기간</td><td>총 기 간</td><td colspan="2">3년</td><td>당해년도기간</td><td>1999.10.28-
2000. 10.27</td></tr>
<tr><td>연구비(천원)</td><td>총 규 모</td><td colspan="2">119,200</td><td>당해년도규모</td><td>30,000</td></tr>
</table>

1. 연구는 당초계획대로 진행되었는가?

■ 당초계획 이상으로 진행 □ 계획대로 진행 □ 계획대로 진행되지 못함

계획대로 수행되지 않은 원인은?

2. 당초 예상했던 성과는 얻었는가?

■ 예상외 성과얻음 □ 어느 정도 얻음 □ 얻지 못함

3. 연구과정 및 성과가 농림어업기술의 발전•진보에 공헌했다고 보는가?
■ 공헌했음 □ 현재로서 불투명함 □ 그렇지 않음

4. 경제적인 측면에서 농림어가의 소득증대에 공헌했다고 보는가?
■ 공헌했음 □ 현재로서 불투명함 □ 그렇지 않음

5. 얻어진 성과와 발표상황

5-1 경제적 효과
□ 기술료 등 수익 수 익 :
■기업등에의 기술이전 기업명 :바이러스디텍티브

■기술지도 등 기업명 : 바이러스디텍티브

5-2 산업•지적재산권 등
■ 국내출원/등록 출원 3 건, 등록 건
□ 해외출원/등록 출원 건, 등록 건

5-3 논문게재•발표 등
□ 국내학술지 게재 건
□ 해외학술지 게재 (submitted) 1 건
□ 국내학•협회 발표 4 건
□ 국내세미나 발표 1 건
□ 기타 건

5-4 인력양성효과
□ 석 사 2 명
□ 박 사 명
□ 기 타 명

5-5 수상 등
□ 있 다 상 명칭 및 일시 :
■ 없 다

5-6 매스콤등의 PR
■ 있 다 1 건
□ 없 다

6. 연구개발착수이후 국내 다른 기관에서 유사한 기술이 개발되거나 또는 기술 도입함으로 연구의 필요성을 감소시킨 경우가 있습니까?
■ 없다 □ 약간 감소되었다 □ 크게 감소되었다

감소되었을 경우 구체적인 원인을 기술하여 주십시오?

7. 관련된 기술의 발전속도나 추세를 감안할 때 연구계획을 조정할 필요가 있다고 생각하십니까?

■ 없다 □ 약간 조정필요 □ 전반적인 조정필요

8. 연구과정에서의 애로 및 건의사항은?

(**아래사항은 기업참여시 기업대표가 기록하십시오**)

1. 연구개발 목표의 달성도는?

□ 만족 □ 보통 □ 미흡

(근거 :)

2. 참여기업 입장에서 본 본과제의 기술성, 시장성, 경제성에 대한 의견

가. 연구성과가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?

□ 충분 □ 보통 □ 불충분

나. 연구성과가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?

□ 충분 □ 보통 □ 불충분

3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

□ 충분 □ 보통 □ 불충분

나. 향후 계속 참여 의사는?

□ 충분 □ 고려 중 □ 중단

다. 계속 참여 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는?

□ 확대 □ 동일 □ 축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?

□ 즉시 기업화 가능 □ 수년내 기업화 가능 □ 기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

작 성 자

구 분	소 속 기 관	직 위	성 명
총괄연구책임자	경상대학교	교수	이 현숙 (인)
참여기업대표			(인)