

Single Chain Variable Fragment(scFv)
항체유전자 이식을 통한
Cucumber Mosaic Cucumovirus(CMV) 내성
형질전환 식물체의 제작 및 특성 분석

Production and special property analysis of
CMV resistant transgenic plants by means of
scFv antibody gene transplantation

연구기관

강원대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Single chain variable fragment(scFv) 항체유전자 이식을 통한 cucumber mosaic cucumovirus(CMV) 내성 형질전환 식물체의 제작 및 특성 분석” 과제 (제1세부과제 “CMV 특이적 scFv 항체 유전자의 획득 및 형질전환 식물체 내 발현 조사”, 제2세부과제 “CMV의 병원성 유전자 분석 및 scFv 항체 발현 식물에서의 반응기작”, 제3세부과제 “scFv 항체 발현 CMV 저항성 식물체 개발”)의 최종보고서로 제출합니다.

2002 년 11 월 10 일

주관연구기관명 : 강원대학교

총괄연구책임자 : 차상훈

세부연구책임자 : 차상훈, 최장경, 임학태

연 구 원 : 이희경, 허병웅, 이소연, 오미영

연 구 원 : 이상용, 정혜진, 박기찬

연 구 원 : 송용남, 이경아, 김혜진

요 약 문

I. 제 목

Single chain variable fragment(scFv) 항체유전자 이식을 통한 cucumber mosaic cucumovirus(CMV) 내성 형질전환 식물체의 제작 및 특성 분석

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

- ① CMV-Mf의 계통 RNA1, 2 및 3에 대한 전장 cDNA의 합성, 클로닝, 전사시스템 구축, 전사물 재조합에 따른 기주반응 실험등으로 외피단백질을 코드하는 RNA3의 CP gene의 기능 탐색.
- ② CMV-Mf특이적 항체제작, 항체와 CMV-Mf의 중화반응을 *in vitro* 검정, 특히 중화반응의 한계점을 검정하여 항체생산 형질전환체의 바이러스에 대한 저항성 능력 평가의 기준 마련.
- ③ CP의 아미노산서열이 다른 계통의 CMV 및 다른종의 바이러스에 대한 중화능력 평가 실시.
- ④ scFv항체 유전자를 도입시킨 형질전환체가 개발되었을 경우, 이 식물이 나타내는 CMV-Mf 또는 다른 계통 CMV들의 침입 (접종)에 대한 반응을 정밀 분석하여 저항성 식물로서의 가치를 평가하고 그 활용성을 모색.

- ⑤ 항체 유전자 조작 기술 개발 및 축적
- ⑥ scFv 항체 유전자의 분리를 위한 phage display library 기술 개발
- ⑦ 식물생명공학 분야에 면역학분야를 접목함으로써 유전형질 전환 기술을 이용한 식물 혹은 농업생명공학분야의 새로운 연구 방향 제시
- ⑧ 박과식물, 담배, 토마토의 원형질체 배양 및 재분화 체계확립
- ⑨ 조직배양을 통한 박과식물, 담배, 토마토 (소과 대과종) 계통의 재분화 및 형질전환 체계확립
- ⑩ 원형질체 배양을 통한 바이러스 중화 반응 측정 체계확립
- ⑪ 형질전환된 식물체의 유전자 도입 확인, 순화 및 포장검정
- ⑫ CMV 특이 항체 발현 형질전환 식물체의 포장 안정성 및 교잡육종에의 이용

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

상품화가 승인된 형질전환 식물의 특성별 재배면적은(1996년 기준), 바이러스 저항성 식물이 40%, 해충저항성 37%, 제초제저항성 23%, 품질향상 1% 미만이었음을 감안할 때 바이러스 저항성 식물체 개발의 상업적 중요성을 알 수 있다. 그러나 아직까지 바이러스 저항성 식물체의 개발은 불과 몇몇 작물에 한정되어 있고, 실험적 접근 방법은 주로 바이러스의 외피단백질 유전자를 식물체내로 도입하여 발현시킴으로서 바이러스에 대한 내성을 지닌 식물체를 생산하는 방법을 취해 왔다. 이러한 연구 결과들은 상품화까지 되었지만 식물체 내에서의 기작이 확실하게 알려지지 않아 다양한 종류의 작물에 적용되는 데는 많은 문제점이 있는 것으로 알려지고 있다. 그러나 최근에 Science나 Nature에 바이러스 특이적 항체를 식물체에 발현시켜 항바이러스성 담배 식물체를 생산하는 연구가 성공함으로써 금후 항바이러스 식물의 생산에 항체를 이용하는 것이 유망한 방법임이 증명되었다.

본 연구에서 모델로 선정된 CMV는 800여종의 식물 바이러스 중에서 450여종의 기주 식물을 가져 기주 범위가 가장 넓고, 또한 세계적으로 널리 분포하는 바이러스

로 그 피해 또한 매우 커서 막대한 경제적인 손실을 가져오고 있다. 그러나 외국에서도 아직까지 바이러스 특이적 단사슬 가변절편 (single chain variable region fragment -scFv) 항체 유전자를 이용하여 바이러스 저항성 식물체를 만들지 못하고 있다. 따라서 본 연구는 CMV 저항성 작물의 개발을 위해서 scFv 항체 유전자를 식물체 내로 도입하는 기술을 개발할 예정이며 이렇게 개발된 시스템은 다른 virus 저항성 식물체를 생산하는데 활용될 수 있을 것이다.

나. 경제·산업적 측면

본 연구에서 형질전환체를 개발하려고 하는 수박, 배추, 토마토의 바이러스 이병율은 각각 5%, 15%, 30% 에 이르는 것으로 추정되고 있으며 후기에 감염되었을 경우는 35% 이상의 수량 감소를 가져온다고 추정된다. 이것을 종자가격으로 비교해 보았을 때는 CMV에 의해 연간 약 15억 8천만원 상당의 피해를 보고 있으며 농산물이나 가공품이 되었을 때의 금액으로 환산하면 바이러스에 의한 농작물의 손실량은 연간 약 500억 원이 될 것으로 추정된다. 종묘 시장이 국제화됨에 따라 채소시장도 확대될 것이며, 따라서 바이러스 저항성 작물의 개발로 인한 경제적인 이익은 더욱더 커질 것으로 예상된다. 따라서 경제성의 측면에서 볼 때 scFv 항체 유전자 도입을 통한 항바이러스 식물체의 개발이라는 본 연구의 추진 필요성이 절실히 요구되었다.

유전형질전환 식물체의 개발에 관한 국제적인 경제, 산업적 측면을 보면 1996년 5억불 미만이었던 형질전환 식물의 세계시장 규모는 2000년 20 - 30억불로 증가하고, 2010년에는 200억불에 이를 것으로 예상된다. 국내에 수입되는 유전형질 전환 농작물의 예를 보면 1998년의 경우 옥수수 수입량 중에서 형질전환 식물체가 5천만불, 대두의 경우는 6천만불에 해당될 정도로 전체 수입량에 차지하는 비율이 높으며 앞으로 배추를 비롯한 다른 채소작물의 형질전환 종자가 국내에 시판되는 날이 얼마 남지 않았을 것으로 예상하고 있다. 따라서 국내에서의 유전형질 전환 기술의 개발은 자국의 시장을 보호함과 동시에 외국으로 형질전환 채소 종자를 수출하는 길을 개척함으로써 농가 소득증대 및 농업의 국제 경쟁력 향상에 크게 기여할 것이다.

다. 사회·문화적 측면

앞으로 닥칠 식량난을 극복하고 환경 친화적인 농업을 하기 위해서는 유전공학기술의 사용을 피할 수 없다는 것이 일반적으로 받아들여지고 있다. 그러나 국내뿐만 아니라 국제적으로도 카르타헤나 의정서를 채택하는 등 유전형질전환 식물의 안정성에 대한 문제를 심각하게 다루고 있지만 실제로 국내에서 적용시킬 만큼 개발된 형질전환 식물체는 매우 소수인 실정이다.

한편 미국을 비롯한 외국 회사들이 차례로 GMO (genetically modified organism, 유전자 조작 생물체)를 상품화시키는데 성공하였고 실제로 국내로 이러한 형질전환 식물이 수입되고 있다. 그 예로 1997년 미국으로부터 국내에 수입된 형질전환 옥수수(전체 옥수수 수입량 418만 톤 중 형질전환 옥수수 추정량이 1백만 톤으로 옥수수 전체 수입량의 12.6%에 해당하며 콩의 경우는 1998년 6월까지 미국으로부터의 수입량이 70만 톤으로 전체 콩 수입량의 97%에 해당되며, 이중 형질전환대두의 추정량은 21만 톤으로 유전형질 전환 농산물이 이미 우리들의 음식 문화에 깊이 들어와 있음을 여실히 보여주고 있다. 유전형질 전환 농산물의 사용에 대하여 생명안전윤리연대모임이나 기타 환경단체에서 반대하고 있지만 현실적으로 이미 형질전환 식물체들이나 형질전환 식물체를 이용한 가공식품들이 우리들의 일상생활과 밀접한 관계를 가지고 있다는 것이다.

기술이 개발되어야만 문화도 지속시킬 수 있는 힘이 생기고, 사회도 안정될 수 있다고 생각할 때 주요한 작물의 바이러스 저항성 식물체 개발의 필요성이 그 어느 때보다도 절실하다고 하겠다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 제1세부과제 : CMV 특이적 scFv 항체 유전자의 획득 및 형질 전환 식물체 내 발현 조사

- (1) 항체 제작
 - ① Mouse Immunization
 - ② Spleen으로부터 항체 유전자 증폭
 - ③ scFv 항체 유전자 phage display library 제작
- (2) 항바이러스 scFv 항체 분리 및 생산
- (3) 선발된 CMV-Mf scFv 항체의 중화능력 검증
- (4) scFv의 친화성 검증
- (5) 항바이러스 scFv 항체 유전자 조작
- (6) 형질전환 식물체의 항체 발현 양 조사
 - ① 항바이러스 scFv 항체 특이적 polyclonal 항체 제작
 - ② 식물세포에서 발현, 생산되는 항바이러스 scFv 항체 검색

2. 제2세부과제 : CMV의 병원성 유전자 분석 및 scFv 항체 발현 식물에서의 반응기작

- (1) 공시바이러스와 바이러스 증식
- (2) CMV-Mf의 기주 반응 실험
- (3) CMV-Mf CP gene의 분석
 - ① 바이러스의 순화 및 RNA의 정제
 - ② RNA3-cDNA합성 및 클로닝
 - ③ 염기서열분석
 - ④ CMV-Mf CP gene의 변이주 제작과 기능분석

- (4) CMV-Mf의 항체 제작을 위한 바이러스의 순화
- (5) 항 CMV-Mf혈청의 검정
- (6) 형질전환식물의 Protoplast 를 이용한 감염성 조사
- (7) CMV-Mf에 대한 형질전환식물의 반응
- (8) CMV-Mf RNA3의 변이주에 대한 형질전환식물의 반응
- (9) 다른 계통의 CMV 또는 다른 종의 바이러스에 대한 형질전환 식물의 반응

3. 제3세부과제 : scFv 항체 발현 CMV 저항성 식물체 개발

- (1) 식물체 재분화 및 형질전환 시스템 개발
 - ① 박과 작물, 담배, 토마토(대과 및 소과종)를 중심으로 재분화 체계확립
 - ② 효율적인 형질전환 체계 확립
- (2) 형질전환 식물체 생산
 - ① 식물에서 발현시킬 벡터 작성
- (3) 재조합된 벡터 *Agrobacterium*에 도입, 식물체 형질 전환
- (4) 바이러스 중화 반응을 위한 원형질체 분리 및 배양 체계확립
 - ① 담배, 박과 작물, 토마토의 원형질체 분리조건확립
- (5) 형질전환 식물체의 포장 적응성 및 유전적 안정성 (참여기업인 농우종묘와 공동으로 수행)
 - ① 형질전환 식물체의 온실 및 포장에서의 교배 및 selfing을 통한 종자확보
 - ② 확보된 종자의 후대검정을 통한 유전적 안정성
 - ③ 형질전환 된 식물체의 바이러스 저항성 정도와 수량 및 품질과의 관계

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구 과제를 통하여 1차 년도는 항-CMV 항체제작 및 scFv 항체 유전자 phage display library 제작을 완료하였다. 또한 CMV-Mf의 기주반응 실험, CMV-Mf CP gene의 분석등을 통하여 우리 나라 자생식물에서 분리한 CMV-Mf계통의 생물학적 특성을 구명하였다. 특히 병원성과 관련된 연구를 목표로 하여 계획된 연구목표를 달성하였으며, 이와 같은 CMV의 생물학적 기초 연구의 결과는 기타 다른 식물바이러스의 기초연구를 위한 지표가 될 수 있다. 그리고 담배와 토마토 및 박과 작물의 재분화 및 형질전환 체계를 확립하였다.

2차 년도에는 scFv 항체 유전자의 친화성 검증 및 항바이러스 scFv 항체 유전자의 조작을 완료하였다. 그리고 CMV-Mf의 병원성 유전자를 주로 분석하여, 지금까지 세계적으로 보고되지 않은 CP의 새로운 영역이 병원성에 관련되고 있다는 사실을 발견하였다. 이러한 결과는 CMV의 병원성과 관련된 유전자의 다양한 기능을 해석하는데 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 바이러스 특이적 항체의 제작과 CMV의 혈청학적 특성의 연구를 통하여, ① CMV-Mf의 혈청형을 결정하였고, ② 바이러스 특이적 항체에 대한 중화반응의 기작을 밝힐 수 있는 데이터를 개발하였으며, ③ in vivo에서의 항원-항체 반응의 기작을 해석하기 위하여 protoplast system을 도입함으로써 바이러스의 혈청학적 연구를 위한 다양한 연구방법의 개발에 기여하였다. 또한 담배, 토마토 및 수박과 오이 등의 박과 작물에서 CMV-Mf scFv 유전자가 도입된 형질전환 식물체를 개발하였다.

3차 년도에는 항바이러스 scFv 항체 특이적 polyclonal 항체 제작을 완료하였고 식물세포에서 발현, 생산되는 항바이러스 scFv 항체 검색 실험을 50% 진척하였다. 그리고 scFv항체 발현 식물에서의 바이러스의 반응을 분석을 분석하기 위하여 형질전환 R1세대의 유묘를 이용한 저항성 관별을 시도하였다. 결과적으로 CMV에 대한 만족할 만한 저항성을 갖는 형질전환체는 얻어지지 않았으나, 형질전환체의 바이러스에 대한 저항성 검정방법을 확립함으로써 금후 이와 관련된 연구에서 활용이 기대된다. 아쉬운 점은 형질전환체에서 CMV-Mf scFv 유전자의 도입은 확인되었으나 유전자의 발현은 확인 할 수 없었다. 따라서 이에 대한 원인 분석과 이 항체를 발현시키기 위한 새로운 벡터의 construction 등 차후의 지속적인 연구가 더 필요하다고 생각된다.

SUMMARY

I. Title

Generation and characterization of CMV resistant transgenic plants by means of scFv antibody gene transplantation

II. Objectives and Necessity of the Project

1. Objectives of the Project

- ① Research of the function of RNA3 CP gene that encodes the coat protein through full length cDNA synthesis of CMV-Mf RNA1, 2 and 3 genome, cloning, and construction of transcription system.
- ② Setting an evaluation standard protocol on viral resistance of transgenic plants producing anti-CMV-Mf antibody through antibody production, *in vitro* examination of neutralization reaction of antibody with CMV-Mf and examination of the critical point of neutralization reaction.
- ③ Evaluation of neutralization ability with other CMV family that has different amino acid sequences in CP.
- ④ Evaluation of the value of a resistant plant and searching for the practical

use of the transgenic plant.

- ⑤ Development and accumulation of techniques for antibody gene manipulation.
- ⑥ Development of phage display library technique for the isolation of scFv antibody gene.
- ⑦ Presentation of a new research direction in the field of genetic transformation technique in plant biology or agricultural biotechnology.
- ⑧ Protoplast cultivation and regeneration system establishment of Cucurbitaceae, tobacco and tomato
- ⑨ Establishment of regeneration and transformation system of Cucurbitaceae, tobacco and tomato by means of tissue culture.
- ⑩ Establishment of virus neutralization reaction measurement system using protoplast cultivation.
- ⑪ Introduction of gene identification, acclimation and field test of transgenic plants.
- ⑫ Field stability test and using in cross breeding with CMV specific antibody producing transgenic plants.

2. Necessity of Research

Ga. Technical aspects

The proportion of special quality of commercialized transgenic plants categorized by cultivation area(based upon 1996 data) was 40% of virus resistant plant, 37% of vermin resistant, 23% of herbicide resistant and less than 1% of quality improvement, indicating the commercial importance of the development of virus resistant plants. however, the development of virus resistant plants has

restricted in several plant species so far, and experimental approach was also limited to the introduction and expression of viral coat protein gene into plants for the generation of virus resistant plants. Those transgenic plants were finally commercialized without fully understanding of resistant mechanism so the application into variety of crop species has known to possess many potential problems. But recently, reports published in Science and Nature demonstrated the successful production of anti-viral tobacco plants by expressing virus-specific antibodies in plants, further suggesting that the use of antibody could be the hopeful method in the production of anti-viral plants.

CMV, the model of this project, infects around 450 plant species and spreads worldwide causing enormous economical damages, but virus resistant transgenic plants that using single chain variable region fragment (scFv) antibody gene has not produced yet. Therefore, in this project, we will develop transplantation technology of scFv antibody gene into plants for the production of CMV resistant crops and this system will be apply to production of another virus resistant plant.

Na. Economical and industrial aspects

It is estimated that morbidity rate of watermelon, Chinese cabbage, tomato is 5%, 15%, 30%, respectively and later term infection causes over 35% decrease in yield. If we compare this numbers with seed cost, CMV makes severe damages about 1,580,000,000 won per year and if it converts into the amount of money of farm products or manufactured products, the crop loss is about 50,000,000,000 won per year. As the seed market become internationalize, vegetable markets are increasing consequently, and the economical benefit from development of virus resistant crop will become enlarge much more. Therefore, in the view of economical efficiency, the development of anti-virus plant through scFv antibody gene transplantation is imperative.

The international economical and industrial aspects about genetically modified plant development was under \$500,000,000 in 1996 but in the year 2000, it had grown \$2,000,000,000 to \$3,000,000,000 and it will grow \$20,000,000,000 in 2010. In the case of domestically imported genetically modified plant, transgenic corn was account for \$50,000,000 of total imported amount, transgenic soybean was account for \$60,000,000 of total imported amount in 1998, and, in the future, another transgenic vegetable seeds including Chinese cabbage will be on domestic market soon. Consequently, development of domestic genetic transformation technique will protect our market as well as open up the export market to abroad, and therefore, contribute to farmhouse by increasing incomes and elevate competence of domestic agriculture in international market.

Da. Social and cultural aspects

To overcome the shortage of food crops (or vegetables) and to carry out environmentally friendly agriculture, we have been forced to use genetic technology in plants. But domestically and internationally also, the stability of genetically modified plants is considered seriously by public as shown in Cartagena protocol, although the situation is may not necessarily be applied domestically since there are a few transgenic plants in our country.

On the other hand, many foreign companies including the United States have succeeded in commercialization of GMO (genetically modified organism) one by one and these transgenic plants are imported now. For instance, the amount of imported transgenic corn from the United States was 1,000,000 tons that was 12.6% of total imported amount in 1997. In the case of soybean, the imported soybean from America was 700,000 tons that was 97% of total imported amount and among these 210,000 tons was presumed transgenic soybean. It is shown that genetically modified crops penetrated deeply in our foodstuff culture. Certain environmental groups or

Bio-safety Morals Solidarity Party are opposed to the use of genetically modified crops but practically transgenic plants or industrial products from them are already closely linked with our everyday life.

Since the development of GMO may continue in the future and our society has to end up accepting the reality in international agriculture, the production of virus resistant plant of important crops is earnestly needed immediately in our country.

III. Scopes of Research

1. The 1st Project : Obtaining CMV specific scFv antibody gene and expression investigation in transgenic plants

- (1) Antibody Production
 - ① Mouse Immunization
 - ② Antibody gene amplification from spleen
 - ③ Producing phage display library of scFv antibody gene
- (2) Isolation and production of anti-virus scFv antibody
- (3) Examination of neutralization ability of CMV-Mf scFv antibody
- (4) Affinity determination of scFv
- (5) Gene manipulation of anti-virus scFv antibody
- (6) Investigation of antibody production in transgenic plants
 - ① Production of anti-virus scFv antibody specific polyclonal antibody
 - ② Investigation of anti-virus scFv antibody that expressed and produced in plant cells

2. The 2nd Project : Analysis of pathogenic gene of CMV and reaction mechanism in scFv antibody producing plant

- (1) Public announcement of virus and virus multiplication
- (2) Host reaction experiment of CMV-Mf
- (3) Analysis of CMV-Mf CP gene
 - ① Virus acclimation and RNA purification
 - ② RNA3-cDNA synthesis and cloning
 - ③ Base pair order analysis

- ④ Variant subtype production and ability analysis of CMV-Mf CP gene
- (4) Virus acclimation for the production of CMV-Mf antibody
- (5) Anti CMV-Mf serum examination
- (6) Contamination tendency investigation using protoplast of transgenic plants
- (7) Reaction of transgenic plants to CMV-Mf
- (8) Reaction of transgenic plants to CMV-Mf RNA3 variant subtype
- (9) Reaction of transgenic plants to another CMV family or another viruses

3. The 3rd Project : Development of scFv antibody producing CMV resistant plant

- (1) Development of plant regeneration and transformation system
 - ① Regeneration system establishment of Cucurbitaceae, tobacco, tomato
 - ② Establishment of effective transformation system
- (2) Production of genetically modified plant
 - ① Vector development
- (3) Plant transformation with recombinant vector that already introduced into *Agrobacterium*
- (4) Establishment of protoplast isolation and culture system for the virus neutralization reaction
 - ① Establishment of protoplast isolation condition
- (5) Field adaptation and genetic stability test of transgenic plants
 - ① Seed production of transgenic plants by cross-fertilization and selfing in green house and field
 - ② Genetic stability test of seed by posterity examination
 - ③ The relation of virus resistant limit with crop yield and quality

IV. Suggestion of the research result and its application

In the 1st year, we produced anti-CMV antibody by hybridoma fusion and a scFv antibody gene by phage display library, and investigated the biological characteristics of CMV-Mf family, that was isolated from native plants, by means of host reaction experiment of CMV-Mf and analysis of CMV-Mf CP gene. Especially, we attained our object related with pathogenesis. The results from this biological basic study of CMV can be used as a milestone of the study of another plant virus. We also established the regeneration and transformation system of tobacco, tomato and Cucurbitaceae plants.

In the 2nd year, we finished the determination of the affinity and gene manipulation of anti-virus scFv antibody gene. We also analyzed the pathogenesis related CMV-Mf gene, and discovered novel finding that the new area of CP is related to pathogenesis. These results may contribute for the understanding of pathogenesis related gene of CMV. Through the production of virus-specific antibody and serological characterization, following experiments were completed: ① determination the CMV-Mf serotype, ② neutralization reaction process against virus specific antibody, ③ introduction of protoplast system to interpret antigen-antibody reaction process *in vivo*. Those results may contribute to various researches for serological study of virus. And we had produced transgenic plants with CMV-Mf scFv gene insertion in tobacco, tomato and Cucurbitaceae.

In the 3rd year, production of polyclonal anti-scFv antibody was completed and used to search plant cells expressing anti-virus scFv antibody, that has progressed 50%. In order to analyze viral behaviour in plants expressing scFv antibody, we determined resistant rate distinction from seedlings of transgenic R1 generation. The results was not quite satisfactory since we could not make fully resistant transgenic plants against CMV, but establishment of resistant

examination method can be applied in related research areas. The most disappointing result was that, although we could confirm the introduction of CMV-Mf specific scFv gene, we couldn't detect scFv gene expression in transgenic plants. Consequently, continuous research including construction of new vector systems are needed.

CONTENTS

Proposition writings	1
Summary	2
I. Title	2
II. Objectives and Necessity of the Project	2
1. Objectives of the Project	2
2. Necessity of Research	3
Ka. Technical aspects	3
Na. Economical and industrial aspects	4
Da. Social and cultural aspects	5
III. Scopes of Research	6
1. The 1 st Project : Obtaining CMV specific scFv antibody gene and expression investigation in transgenic plants	6
2. The 2 nd Project : Analysis of pathogenic gene of CMV and reaction mechanism in scFv antibody producing plant	6
3. The 3 rd Project : Development of scFv antibody producing CMV resistant plant	7
IV. Suggestion of the research result and its application	8
SUMMARY(In English)	9
I. Title	9
II. Objectives and Necessity of the Project	9
1. Objectives of the Project	9
2. Necessity of Research	10
III. Scopes of Research	14

1. The 1 st Project : Obtaining CMV specific scFv antibody gene and expression investigation in transgenic plants	14
2. The 2 nd Project : Analysis of pathogenic gene of CMV and reaction mechanism in scFv antibody producing plant	14
3. The 3 rd Project : Development of scFv antibody producing CMV resistant plant	15
IV. Suggestion of the research result and its application	16
 CONTENTS(In English)	 18
 Contents	 23
 Chapter I Outline of research project	 28
Section 1. Backgrounds and objectives of research project	28
1. Backgrounds of research project	28
2. Objectives of research project	30
Section 2. Necessity and scopes of research project	31
1. Necessity of research project	31
Ka. Technical aspects	31
Na. Economical and industrial aspects	33
Da. Social and cultural aspects	35
2. Contents and extent of research project	37
 Chapter 2 The present technique development situation inside and outside of the country	 38
 Chapter 3 Contents and Results of the research	 40
Section 1. Research substances in order by year	40
1. The 1 st year	40
2. The 2 nd year	41

3. The 3 rd year	42
Section 2. Research results and analysis	44
1. The 1 st Project : Obtaining CMV specific scFv antibody gene	
and expression investigation in transgenic plants	44
Ka. Process of anti-CMV antibody production	44
Na. Production of phage display library of scFv antibody gene	46
Da. Isolation and production of anti-virus scFv antibody	48
Ra. Base pair order analysis of CMV-Mf specific scFv antibody	50
Ma. Affinity determination of scFv	52
Ba. Anti-virus scFv antibody gene manipulation	54
Sa. Positive clone searching of single cell antibody	56
Aa. Pho A color system development that conjugated with	
CMVscFv-AP	57
Ja. Anti-virus scFv antibody specific polyclonal antibody production	58
2. The 2 nd Project : Analysis of pathogenic gene of CMV	
and reaction mechanism in scFv antibody producing plant	59
Ka. Background of research	59
Na. Virus purification for biological characteristics of CMV-Mf family	
and antibody production	61
1) Propagation of virus	61
2) Host reaction of CMV-Mf	62
3) Analysis of CMV-Mf CP gene	64
4) Virus acclimation for the CMV-Mf antibody production	70
Da. CMV-Mf gene analysis related with pathogenesis	71
Ra. Serological character of CMV-Mf and <i>in vitro</i> reaction	
with scFv antibody	75
1) Virus multiplication	75
2) Anti CMV-Mf serum production and titer examination	75
3) Neutralization ability examination of CMV-Mf scFv antibody	76

Ma. Reaction of CMV–Mf CP protein in scFv antibody expressed	
transgenic plants	80
1) Contamination analysis of transgenic plants using protoplast	80
2) CMV contamination reaction of scFv antibody produced	
transgenic plants	81
3) Reaction research of transgenic plants to CMV RNA 3	
mutation virus	81
4) Reaction reaction of transgenic plants to another	
CMV family or another viruses	82
3. The 3 rd Project : Development of scFv antibody producing	
CMV resistant plant	86
Ka. Tobacco	86
1) Development of tobacco regeneration system	86
Ka) Hormone mixing experiment	86
Na) Analysis of hormone mixing experiment	87
2) Establishment and results of tobacco	
(<i>Nicotiana tabaccum. cv. Xanti nc</i>) transformation system	88
Ka) Experimental procedure and condition	88
Na) Results of transformation	89
Na. Tomato	93
1) Experimental procedure and condition for the establishment of	
tomato regeneration and transformation system	93
2) Results of tomato transformation system establishment	
using L3 gene	93
3) Results of tomato transformation using CMV scFv gene	96
Da. Cucurbitaceae(cucumber, water melon)	100
1) Experimental situation for Cucurbitaceae regeneration	
and transformation system establishment	100
2) Experimental methods of Cucurbitaceae regeneration	

and transformation	100
3) Results of Cucurbitaceae transformation	103
Ra. Establishment of protoplast isolation condition of each plant	107
1) Materials	107
2) Procedure of protoplast isolation	108
3) Establishment of protoplast isolation	109
Chapter 4 Objective achievement and contribution level	
to related field	110
Section 1. Objective achievement level	110
Section 2. Contribution level to related field	111
1. Technical aspects	111
2. Economical and Economical aspects	112
Chapter 5 Application plan of research results	113
1. Necessity of additional research	113
2. Practical application to other research	113
3. Industrialization plan	114
Chapter 6 Foreign countries scientific technique information	
collected during research	115
Chapter 7 Literature cited	117

목 차

제출문	1
요약문	2
I. 제목	2
II. 연구개발의 목적 및 필요성	2
1. 연구개발의 목적	2
2. 연구개발의 필요성	3
가. 기술적 측면	3
나. 경제·산업적 측면	4
다. 사회·문화적 측면	5
III. 연구개발 내용 및 범위	6
1. 제1세부과제 : CMV 특이적 scFv 항체 유전자의 획득 및 형질전환 식물체 내 발현 조사	6
2. 제2세부과제 : CMV의 병원성 유전자 분석 및 scFv 항체 발현 식물에서의 반응 기작	6
3. 제3세부과제 : scFv 항체 발현 CMV 저항성 식물체 개발	7
IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의	8
SUMMARY(영문요약)	9
I. Title	9
II. Objectives and Necessity of the Project	9
1. Objectives of the Project	9
2. Necessity of Research	10
III. Scopes of Research	14
1. The 1 st Project	14

2. The 2 nd Project	14
3. The 3 rd Project	15
IV. Suggestion of the research result and its application	16
CONTENTS(영문목차)	18
목차	23
제1장 연구개발과제의 개요	28
제1절 연구개발의 배경 및 목적	28
1. 연구개발의 배경	28
2. 연구 개발의 목적	30
제2절 연구개발의 필요성 및 범위	31
1. 연구개발의 필요성	31
가. 기술적 측면	31
나. 경제·산업적 측면	33
다. 사회·문화적 측면	35
2. 연구개발의 내용 및 범위	37
제2장 국내외 기술개발 현황	38
제3장 연구개발 수행 내용 및 결과	40
제1절 연차별 연구내용	40
1. 1년차 : CMV-Mf의 생물학적 특성 및 CP gene의 분석, 항체 제작 및 형질전환체계 확립	40
2. 2년차 : CMV-Mf 특이적 항체의 생산 및 바이러스 중화능력 검정 및 형질전환 식물체 생산	41
3. 3년차 : 형질전환식물의 항체 발현, 바이러스 저항성 검정	42
제2절 연구결과 및 분석	44
1. 제1 세부과제 : CMV 특이적 scFv 항체 유전자의 획득 및	

형질전환 식물체 내 발현조사	44
가. 항-CMV 항체 제작 과정	44
나. scFv 항체 유전자 phage display library 제작	46
다. 항바이러스 scFv 항체 분리 및 생산	48
라. CMV-Mf 특이적 scFv 항체의 염기서열 분석	50
마. scFv의 친화성 검정	52
바. 항바이러스 scFv 항체 유전자 조작	54
사. 단일세포성 항체의 positive clone의 검색	56
아. CMVscFv-AP가 conjugation된 Pho A color system의 개발	57
자. 항바이러스 scFv 항체 특이적 polyclonal 항체 제작	58
2. 제2 세부과제 : CMV의 병원성유전자 분석 및 scFv항체발현 식물에서의 반응기작	59
가. 연구의 배경	59
나. CMV-Mf계통의 생물학적 성질 및 항체제작을 위한 바이러스의 정제	61
1) 공시바이러스의 증식	61
2) CMV-Mf의 기주반응	62
3) CMV-Mf CP gene의 분석	64
4) CMV-Mf의 항체제작을 위한 바이러스의 순화	70
다. CMV-Mf의 병원성 관련 유전자의 분석	71
라. CMV-Mf의 혈청학적 특성 및 scFv항체와의 <i>in vitro</i> 반응	75
1) 공시바이러스의 증식	75
2) 항CMV-Mf혈청의 제작 및 역가 검정	75
3) CMV-Mf scFv항체의 중화능력 검정	76
마. CMV-Mf CP단백질의 scFv항체발현 형질전환체에서의 CMV-Mf의 반응	80
1) 형질전환식물의 protoplast를 이용한 CMV의 감염성조사	80
2) scFv항체를 발현하는 형질전환식물체의 CMV의 감염에 대한 반응	81
3) CMV RNA 3의 변이바이러스에 대한 형질전환체의 반응 조사	81
4) 다른 계통의 CMV 또는 다른 종의 바이러스에 대한 저항성 검정	82

3. 제3 세부과제 : scFv 항체 발현 CMV 저항성 식물체 개발	86
가. 담배	86
1) 담배의 재분화 시스템 개발	86
가) 담배의 재분화 조건 설정을 위한 호르몬 조합 실험	86
나) 담배의 재분화를 위한 호르몬 조건 규명 실험의 분석	87
2) 담배(<i>Nicotiana tabaccum. cv. Xanti nc</i>)의 형질전환	
체계 확립 및 결과	88
가) 실험방법 및 조건	88
나) 형질전환 결과	89
나. 토마토(대과종과 소과종)	93
1) 토마토의 재분화 및 형질전환 체계 확립을 위한 실험방법 및 조건	93
2) L3 유전자를 이용한 토마토 형질전환 체계 확립 실험결과	93
3) CMV scFv 유전자를 이용한 토마토(대과종)의 형질전환 결과	96
다. 박과 작물(오이, 수박)	100
1) 박과 작물의 재분화 및 형질전환 조건 확립을 위한 실험 조건	100
2) 박과 작물의 재분화 및 형질전환 실험방법	100
3) 박과 작물의 형질전환 실험 결과	103
라. 각 작물의 원형질체 분리 조건 확립	107
1) 실험재료	107
2) 원형질체 분리 과정	108
3) 원형질체 분리 조건 확립	109
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	110
제1절 목표달성도	110
제2절 관련분야 기술발전예의 기여도	111
1. 기술적 측면	111
2. 경제 · 산업적 측면	112
제5장 연구개발결과의 활용계획	113
1. 추가연구의 필요성	113

2. 타연구에의 응용	113
3. 기업화 추진방안	114
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	115
제7장 참고문헌	117

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 배경 및 목적

1. 연구개발의 배경

유전형질전환 기술로 말미암아 인간은 자연생태계에 존재하는 Darwinism에 의거한 진화의 개념을 인위적으로 가속화시킬 수 있는 능력을 얻을 수 있었으며, 이러한 능력의 획득은 과학 윤리적 혹은 종교적으로 옳고 그름을 따지기 전에 새로운 유전형질을 지닌 인위적인 동물과 식물을 생산함으로써 인간의 복지를 향상시킬 수 있는 무한한 잠재가능성을 지니고 있다는 것은 기정사실이라 할 수 있다. 외래유전자를 인위적으로 식물체의 염색체에 삽입, 발현함으로써 제작되는 식물의 유전형질전환 혹은 transgenic plant는 종래의 고전적인 육종에 의한 새로운 유전형질의 식물체 제작에 비하여 소요기간이 훨씬 단축될 수 있으며, 원하는 유전형질을 연구진에 의하여 정확히 선택되어질 수 있다는 장점이 있다. 식물염색체내에 삽입될 외래유전자는 원하고자하는 transgenic plant의 표현형질에 따라 달라지며 대표적인 transgenic plant의 표현형질 예로는 ① 식물 자체의 특성 변화, ② 백신과 같은 유용단백질의 생산, ③ 병원성 세균 혹은 바이러스에 내성을 지닌 식물체의 개발 등이다.

본 연구와 관련된 국내외 실제 연구 사례를 병원성 세균 혹은 바이러스에 내성을 지닌 식물체의 개발 면에서 일부 살펴보면 다음과 같다.

유전형질 전환을 통한 바이러스내성 식물체의 개발을 위하여 현재 두 가지의 접근 방법이 시도되고 있는데 첫째, 바이러스의 단백질 유전자를 발현하는 방법과 둘째, 바이러스 특이적 항체 유전자를 발현하는 방법이 있다. 바이러스의 단백질 유전자를 발현하는 방법으로는 Potato virus X (PVX)의 local movement에 관여하는 p24단백질을 transgenic tobacco plant (*Nicotiana Xanthi* D8 NN)에 발현하여 tobacco mosaic virus와 Ob tobamovirus에 내성을 지닌 식물체 개발하는데 성공하였으나, PVX를

transgenic plant에 infection 시킬 때에는 non-transgenic control plant와 별 차이가 없음이 보고되었다 (Ares et al., 1998). 한편 바이러스 특이적 항체 유전자를 발현하는 방법으로는 plant icosahedral tombusvirus artichoke mottled crinkle virus에 반응하는 single chain variable fragment (scFv) 항체 유전자를 transgenic tobacco에 발현시킴으로서 infection 저하와 증세 발생의 지연을 유도할 수 있었음이 보고되었으며 따라서 항체유전자의 조작에 관한 기술적 축적이 이루어져 있다면 바이러스의 단백질 유전자를 발현하는 방법보다는 바이러스 특이적 항체 유전자를 발현하는 방법이 유전형질 전환 기술을 이용한 바이러스내성 식물체의 개발에 더 효과적이고 성공적인 접근 방법이 될 수 있음을 알 수 있다 (Tavladoraki 등, 1993). 항체는 50 kDa 크기의 동일한 2개의 heavy chain과 25 kDa 크기의 동일한 2개의 light chain이 상호 disulfide bond를 형성함으로써 이루어져 있으며 항체에는 항원과 결합할 수 있는 부위가 두 군데 존재하는데 각각의 heavy chain과 light chain의 variable 부위가 이황결합으로 접합되어 만나는 지역이다. 따라서 항체의 최소 항원결합 부위는 heavy chain의 variable 지역 (V_H)와 light chain의 variable 지역 (V_L)을 인위적인 linker peptide로 결합시킴으로서 제작될 수 있는데 이를 single chain variable fragment (scFv)라 일컫는다. scFv 항체는 완전한 형태의 항체보다 크기가 적고 (정상 항체의 1/6 크기), heavy chain과 light chain의 이황결합이 필요 없어 식물체에서 생산하기가 훨씬 유리한 것으로 알려져 있다 (Tavladoraki 등, 1993).

현재 국외의 여러 연구진들에 의해 scFv 항체 유전자를 식물체에 발현시켜 새로운 형질의 transgenic plant를 제작하는 연구가 활발히 진행되고 있는데 그 실례를 간략히 살펴보면 transgenic tobacco plant에서 발현된 scFv 항체는 *E. coli*의 periplasm에서 생산된 scFv 항체와 항원 반응 특이성이 같다고 밝혀짐에 따라 식물체에서의 항체 생산에 관한 유용성이 증명되었고 (Bruyns 등, 1996), tobacco에서 seed-specific promoter를 사용하여 abscisic acid (ABA)에 특이적으로 반응하는 scFv 유전자를 발현함으로써 ABA가 종자의 배 발생에 미치는 영향을 seed maturation programme의 면역적 조절을 통하여 살펴봄으로서 항체 transgenic plant가 식물체의 배 발생에 관한 순수 학문적 연구에도 성공적으로 사용될 수 있음이 증명되었다 (Phillips 등, 1997). 또한 식물체내에서 삽입된 항체유전자의 단백질 발현을 향상시키기 위한 연구도 진행이 되고 있는데 scFv 항체유전자를 식물체내에서 발현하고자 할 때 ER retention signal을 항체 유전자의 C-terminal에 부착시킴으로서 잎 단백질의 4-6.8%,

tobacco seed 단백질의 3-4%를 scFv 항체 단백질이 차지하도록 만들 수 있음이 보고 되었으며 (Fiedler 등, 1997), 의학적으로 면역치료 (immunotherapy)를 위하여 많은 양의 항체를 저렴한 단가로 생산하는 것이 매우 유리한데 식물체에서 특히 IgA와 같은 완벽한 형태와 기능의 항체를 대단위 농경단위로 생산할 수 있으므로 그 활용 가능성이 매우 광범위하다는 사실이 지적되기도 하였다 (Ma 등, 1995a; Ma 등, 1995b). 그러나 국내에서는 아직까지 scFv 항체 transgenic plant를 제작하려는 시도가 진행되지 않았으며 그 주요 원인으로는 항체유전자를 조작하고 scFv 유전자를 gene cloning을 통하여 제작할 수 있는 기술적 know-how가 아직까지는 깊이 축적되지 않았기 때문이다.

상기에서 기술한바와 같이 식물생명공학 분야에 면역학분야가 접목됨으로서 유전형질 전환 기술을 이용한 식물 혹은 농업생명공학분야의 새로운 연구 방향이 제시될 수 있다는 사실을 주시해야 할 것이다. 따라서 본 연구진이 가지고 있는 분자면역학적 지식과 기술을 토대로 제 1 세부과제 및 제 2 세부과제의 식물 바이러스 및 식물세포 공학과 더불어 항체 유전자 발현을 통한 바이러스내성 식물체의 제작을 위한 기초 연구를 수행함으로써 본 연구과제가 이 분야의 연구 수준을 다시 한 번 국제적으로 향상시키고 궁극적으로 농업적, 의학적 유용 특성을 지닌 특화 작물을 제작함으로써 유전공학 기법을 이용한 농업생명공학의 발전에 다소나마 도움이 될 수 있으리라 사료된다.

2. 연구 개발의 목적

- ① CMV-Mf의 계놈 RNA1, 2 및 3에 대한 전장 cDNA의 합성, 클로닝, 전사시스템 구축, 전사물 재조합에 따른 기주 반응 실험 등으로 외피단백질을 코드 하는 RNA3의 CP gene의 기능 탐색.
- ② CMV-Mf특이적 항체제작, 항체와 CMV-Mf의 중화반응을 *in vitro* 검정, 특히 중화반응의 한계점을 검정하여 항체생산 형질전환체의 바이러스에 대한 저항성 능력 평가의 기준 마련.
- ③ CP의 아미노산서열이 다른 계통의 CMV 및 다른 종의 바이러스에 대한 중화능력 평가 실시.

- ④ scFv항체 유전자를 도입시킨 형질전환체가 개발되었을 경우, 이 식물이 나타내는 CMV-Mf 또는 다른 계통 CMV들의 침입 (접종)에 대한 반응을 정밀 분석하여 저항성 식물로서의 가치를 평가하고 그 활용성을 모색.
- ⑤ 항체 유전자 조작 기술 개발 및 축적
- ⑥ scFv 항체 유전자의 분리를 위한 phage display library 기술 개발
- ⑦ 식물생명공학 분야에 면역학분야를 접목함으로써 유전형질 전환 기술을 이용한 식물 혹은 농업생명공학분야의 새로운 연구 방향 제시
- ⑧ 박과 작물, 담배, 토마토의 원형질체 배양 및 재분화 체계 확립
- ⑨ 조직배양을 통한 박과 작물, 담배, 토마토(소과종, 대과종) 계통의 재분화 및 형질전환 체계 확립
- ⑩ 원형질체 배양을 통한 바이러스 중화 반응 측정 체계 확립
- ⑪ 형질전환된 식물체의 유전자 도입 확인, 순화 및 포장검정
- ⑫ CMV 특이 항체 발현 형질전환 식물체의 포장 안정성 및 교잡육종에의 이용

제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위

1. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

현재 유전자 조작을 이용한 작물의 연구개발은 농업혁명을 주도하고 있고, 따라서 다양한 기술이 개발되고 있다. 그 예로 1986년 이후 20년간 세계 45개국에서 60가지 식물의 10가지 특성에 대해 약 25,000건의 유전자 조작 작물의 포장검정이 이뤄졌고, 이중 10,000건 (40%)은 1996년과 1997년 2년간에 이뤄지고 있는 실정이다. 또한 전체 포장검정 (field trial) 건수 중 75%가 미국과 캐나다에서 이뤄졌으며, 형질전환식물 중 옥수수, 토마토, 대두, 유채, 감자, 면화 등이 대부분을 차지했고, 주요 특성은 제초제

내성, 해충, 바이러스 저항성, 품질 향상 등이었다. 유전자 변환 작물의 상용화를 살펴 보면 1994년에 미국 FDA가 안정성을 인정한 유전자 변환 농작물의 경우 호박의 바이러스 저항성 식물체 (Asgrow 회사), 숙기 지연 토마토 (Calgene, NDAP, Monsanto, Zeneca), 제초제 저항성 목화과 대두 (Calgene, Monsanto), 해충 저항성 감자 (Monsanto) 등이 있으며 그 이후 많은 회사와 대학에서 새로운 작물을 개발해서 상품화를 시키고 있다 (표 1).

표1. 미국에서 유통이 승인된 유전자재조합기술을 이용하여 개발된 작물

승인년도	개발회사	작물	도입된 유전자	기타승인국
1998	Agrebo	대두	제초제 저항성	
„	„	옥수수	해충저항성, 제초제저항성	
1998	Calgene	옥수수	해충저항성, 제초제저항성	
„	„	토마토	해충저항성	
1998	Monsanto	옥수수	제초제저항성	
„	„	감자	바이러스내성, 해충저항성	
1997	Seminis	호박	바이러스내성 (외피단백질유전자)	캐나다
„	하와이/코넬대	파파이아	바이러스내성	
„	Saskatchewan 대학교	감자	바이러스내성, 해충저항성, 제초제저항성	
1996	Monsanto	옥수수, 감자, 목화, 카놀라	해충내성, 제초제저항성	일본, 캐나다
„	Plant Genetic systems	옥수수	용성불임/수정회복	일본, 캐나다, 영국, 벨기에
1995	Monsanto	목화, 카놀라	제초제저항성	캐나다
1994	Asgrow	호박	바이러스내성	캐나다
1994	Calgen	토마토	숙성연장	캐나다
„	DNA plant technology	토마토	숙성개선	일본, 캐나다
„	Zeneca	토마토	물렁해지지 않는 특성	
„	Monsanto	대두, 감자	제초제내성, 해충저항성	캐나다

(유전자 전환 작물의 안전관리 방안 심포지움, 1999)

상품화가 승인된 형질전환 식물의 특성별 재배면적을 보면 (1996년 기준), 바이러스 저항성 식물이 40%, 해충저항성 37%, 제초제저항성 23%, 품질향상 1% 미만이었음을 감안할 때 바이러스 저항성 식물체의 개발의 상업적 중요성을 알 수 있으며 아직까지는 바이러스 저항성 식물체의 개발은 불과 몇몇 작물에 한정되어 있고, 실험적 접근 방법을 살펴보면 주로 바이러스 외피단백질 유전자를 식물체내로 도입하여 발현시킴으로서 바이러스에 대한 내성을 지닌 식물체를 생산하는 방법을 취해 왔고, 상품화까지 되었지만 이러한 방법의 식물체내 기작이 확실하게 알려지지 않아 다양한 종류의 작물에 적용되는데는 많은 문제점이 있는 것으로 알려지고 있다. 한편 최근에 Science 나 Nature지에 발표되는 바이러스 특이적인 항체를 식물체에 발현시켜 항바이러스 식물체를 생산하는 연구가 담배를 통해서 모델화 시키는데 성공함으로써, 금 후 항바이러스 식물의 생산에 유망한 방법임이 증명되고 있다.

본 연구에서 모델로 선정된 CMV는 800여종의 식물 바이러스 중에서 기주 범위가 가장 넓고 세계적으로 널리 분포하는 바이러스로 박과 (오이, 수박, 호박), 가지과 (고추, 토마토), 통과, 십자화과 (배추 등) 등 많은 주요 작물을 비롯해서 450여 종의 기주가 알려졌고, 그 피해 또한 매우 커서 막대한 경제적인 손실을 가져오고 있다. 외국에서도 아직까지 바이러스 특이적 **단사슬 가변절편 (single chain variable fragment -scFv) 항체** 유전자를 이용해서 유용한 작물에 성공한 예는 없고, 수박, 토마토, 배추에 바이러스 저항성 식물체를 만들지 못하고 있으며 따라서 본 연구는 CMV 저항성 수박, 토마토, 배추 종자 개발을 위해서 scFv 항체 유전자를 도입하는 기술을 개발할 예정이며 이렇게 개발된 시스템은 다른 virus 저항성 식물체를 생산하는데 활용될 수 있을 것이다. 본 연구팀은 이미 scFv 제작, 식물체 유전형질 전환 분야에 국제적인 수준에 와 있고, CMV 와 관련해서 많은 기술 축적이 이미 되어 있는 상태이다.

나. 경제·산업적 측면

국내의 채소종자 시장은 (1997년기준) 연간 약 1,150억원 (도매가격, 소매가격은 1495억원) 규모이고, 수박 253.5억원, (대목용 포함) 배추 109.2억원, 토마토 54.6억원으로 추정되고 있으며 CMV 로 인해서 피해가 크면서 근연 관계가 먼 중요한 3가지

채소작물인 수박, 배추, 토마토를 연구대상 작물로 선택하였다. 고추의 경우 CMV에 의한 피해가 크지만 이미 국내의 많은 실험실에서 고추와 관련된 연구 과제를 수행하고 있기에 본 과제에서는 제외 시켰다. 수박, 배추, 토마토의 바이러스 이병율은 각각 5%, 15%, 30% 에 이르는 것으로 추정되고 있으며 감염정도에 따라서 수량성에 미치는 영향이 크고 후기에 감염되었을 경우는 35% 이상의 수량 감소를 가져온다고 추정된다. 이러한 것을 수치화 하면 표 2와 같다.

표 2. 수박, 배추, 토마토의 국내 종자시장 규모와 CMV 감염에 의한 손해 예측액

	종자시장규모 (소매가격 기준)	금액상 점유비율 (%)	CMV 감염에 종자 손해액 추정치 (이병율)*	종자로부터 생산된 최종 산물의 총 매출액에 대한 추정되는 손해액**
수박	253.5 억원	17.5	4억 4천만원 (5%)	133
배추	109.2억원	7	5억 7천만원(15%)	171
토마토	54.6억원	4	5억 7천만원(30%)	171

* 후기에 감염되어서 35% 수량 손실을 가져왔다는 추정치 임.

** 고추의 경우 최종 산물로 인한 매출액이 2조원에 가깝다고 하면, 50배 정도라고 할 수 있지만, 일반 다른 채소의 경우는 20 - 40 배 정도라고 할 수 있음. 따라서 30배를 기준으로 추정치를 산정 했음.

표 2에서 보는 바와 같이 종자가격으로 비교해 보았을 때는 CMV에 의해 연간 약 15억 8천만원의 피해를 보고 있으며. 이러한 경제적 손실은 도매가격을 기준으로 했기 때문에 소비자 가격으로 환산하면 30%를 가산한 금액이다. 또한 종자를 심어서 최종 농산물이나 가공품으로 나왔을 때의 금액으로 환산하면 바이러스에 의한 농작물의 손실량은 연간 약 500억원이 될 것으로 추정된다. 종묘 시장이 국제화됨에 따라 이러한 채소시장도 확대될 것이며, 따라서 바이러스 저항성 작물의 개발로 인한 경제적인

이익은 더욱더 커질 것으로 예상되며 이러한 경제성 면에서 볼 때 scFv 항체 유전자 도입을 통한 항 바이러스 식물체의 개발이라는 본 연구의 추진 필요성이 절실히 요구된다고 하겠다.

또한 유전형질 전환 식물체의 개발에 관한 국제적인 경제. 산업적 측면을 살펴보면 최근 미국 Dupont 와 Pioneer사가 17억불 규모의 형질전환식물 합작 벤처를 구성함에 따라, 북미에서의 재배면적이 급증할 것으로 예상되며, 라틴아메리카 및 호주에 대한 시장이 증가할 것으로 예측되고 있다. 따라서 1996년 5억불 미만이었던 형질전환 식물의 세계시장 규모는 2000년 20 - 30억불로 증가하고, 2010년에는 200억불에 이를 것으로 예상된다. 국내에 수입되는 유전형질 전환 농작물의 예를 보면 1998년의 경우 옥수수 수입량 중에서 형질전환 식물체가 5천만불, 대두의 경우는 6천만불에 해당될 정도로 전체 수입량에 차지하는 비율이 높으며 앞으로 배추를 비롯한 다른 채소작물의 형질전환 종자가 국내에 시판되는 날이 얼마 남지 않았을 것으로 예상된다. 따라서 국내에서의 이러한 유전형질 전환 기술의 개발은 자국의 시장을 보호함과 동시에 외국으로 형질전환 채소 종자를 수출하는 길을 개척함으로써 농가 소득증대 및 농업의 국제 경쟁력 향상에 크게 기여할 것이다.

다. 사회·문화적 측면

외국 종묘회사 (Semini 와 Nobatis)들과 국내 주요 몇몇 종묘회사들의 M&A로 인한 종묘산업의 국제화가 시작되고 있으며 기술적으로 유전공학기술에 의한 형질전환 식물체의 탄생은 제 2 녹색혁명의 중심이 되고 있고 국가의 과학 농업적 위상을 측정하는 중요한 잣대가 되었고 있다. 사회적인 관점에서 앞으로의 식량난을 극복하고 환경 친화적인 농업을 하기 위해서는 유전공학기술의 사용을 피할 수 없다는 것이 일반적으로 받아들여지고 있으며 1999년 4월 유전자재조합 식품첨가물 안전성 평가자료 심사지침제정(안) 입안예고를 위한 준비 작업을 보건복지부에서 하고 있을 정도로 안정성에 대한 문제를 심각하게 다루고 있지만 실제로 국내에서 실제로 적용시킬 만큼 개발된 형질전환 식물체는 매우 소수인 실정이다. 국제적으로는 생물 다양성 협약에 따른 생명공학 안전성에 관한 카르타헤나 의정서가 1999년 2월에 콜롬비아 카르타헤나에서 개최된 회의에

서 만들어 졌으나 농산물 수출국과 수입국의 이해관계 대립으로 유보되었고 2000년 5월 생물다양성협약 총회에 상정해서 채택, 발효시킬 예정이라 하며 따라서 국제적으로 이미 유전자전환 생물체의 환경 위해성 평가에 대한 관심과 규정이 만들어지고 있음을 보여 주고 있다.

한편 미국을 비롯한 외국 회사들이 차례로 GMO (genetically modified organism, 유전자 조작 생물체)를 상품화시키는데 성공하였고 실제로 국내로 이러한 형질전환 식물이 수입되고 있는 실정이다. 그 예로 1997년 미국으로부터 국내에 수입된 형질전환 식물량은 옥수수 418만 톤이며, 이중 형질전환 옥수수 추정량은 1백만 톤으로 이는 우리 나라 옥수수 전체 수입량의 12.6%에 해당하며 콩의 경우 1998년 6월까지 미국으로부터의 수입량은 70만 톤으로 전체의 97%에 해당되며, 이중 형질전환대두의 추정량은 21만 톤으로 유전형질 전환 농산물이 이미 우리들의 음식 문화에 깊숙히 들어와 있음을 여실히 보여주고 있다.

이러한 유전형질 전환 농산물의 사용에 대하여 생명안전윤리연대모임이나 기타 환경단체에서 생명공학의 발전에 대해서 반대를 하고 있지만, 현실적으로 이미 이러한 형질전환 식물체들이나 이러한 식물로 만든 가공식품들이 우리들의 일상생활과 밀접한 관계를 가지고 있다는 것이다. 기술이 개발되어야만 문화도 지속시킬 수 있는 힘이 생기고, 사회도 안정될 수 있다고 생각할 때 주요한 원예작물인 수박, 토마토 등의 바이러스 저항성 식물체의 개발의 필요성이 그 어느 때보다도 절실하다고 하겠다.

2. 연구개발의 내용 및 범위

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (1999)	CMV-Mf의 생물학적 특성 및 CP gene의 분석, 항체 제작 및 형질전환 체계 확립	(1) 공시바이러스와 증식 (2) CMV-Mf의 기주반응 실험 (3) CMV-Mf CP gene의 분석 ① 바이러스의 순화 및 RNA의 정제 ② RNA3-cDNA합성 및 클로닝 ③ 염기서열분석 ④ CMV-Mf CP gene의 변이주 제작과 기능분석 (4) CMV-Mf의 항체 제작을 위한 바이러스의 순화 (5) 항체 제작 ① Immunization ② Spleen으로부터 항체 유전자 증폭 ③ scFv 항체 유전자 phage display library 제작 (6) 식물체 재분화 및 형질전환 시스템 개발 ① 박과식물, 담배, 토마토(대과 및 소과종)를 중심으로 재분화 체계 확립 ② 효율적인 형질전환 체계 확립
2차년도 (2000)	CMV-Mf 특이적 항체의 생산 및 바이러스 중화능력 검정 및 형질전환 식물체 생산	(1) 항 CMV-Mf혈청의 검정 (2) 항바이러스 scFv 항체 분리 및 생산 (3) 선발된 CMV-Mf scFv항체의 중화능력 검정 (4) scFv의 친화성 검정 (5) 항바이러스 scFv 항체 유전자 조작 (6) 형질전환 식물체 생산 ① 식물에서 발현시킬 벡터 작성 (7) 재조합 벡터 <i>Agrobacterium</i> 에 도입, 식물체 형질 전환 (8) 바이러스 중화 반응을 위한 원형질체 분리 및 배양 체계 확립 ① 담배, 박과식물, 토마토의 원형질체 분리조건 확립
3차년도 (2001)	형질전환 식물의 항체 발현, 바이러스 저항성 검정	(1) 형질전환식물의 Protoplast 를 이용한 감염성 조사 (2) CMV-Mf에 대한 형질전환식물의 반응 (3) CMV-Mf RNA3의 변이주에 대한 형질전환식물의 반응 (4) 다른 계통의 CMV 또는 다른 종의 바이러스에 대한 형질전환 식물의 반응 (5) 형질전환 식물체의 항체 발현양 조사 ① 항바이러스 scFv 항체 특이적 polyclonal 항체 제작 ② 식물세포에서 발현, 생산되는 항바이러스 scFv 항체 검색 (6) 형질전환 식물체의 포장 적응성 및 유전적 안정성 (참여 기업인 농우종묘와 공동으로 수행) ① 형질전환 식물체의 온실 및 포장에서의 교배 및 selfing을 통한 종자 확보 ② 확보된 종자의 후대검정을 통한 유전적 안정성 ③ 형질전환된 식물체의 바이러스 저항성 정도와 수량 및 품질과의 관계

제 2 장 국내외 기술개발 현황

본 과제에서 사용할 CMV는 3종의 외가닥 RNA (ssRNA)를 계놈으로 가지고 있으며, 이들 RNA는 3종의 바이러스입자에 나뉘어 분포하고 (tripartite genomic virus), 외피단백질 (coat protein gene, CP gene)을 코드 하는 서브계놈 RNA (RNA4)가 존재하며 이들 계놈 RNA중 RNA1 (약 3,400 base)과 RNA2 (약 3,200 base)는 복제효소 유전자의 기능을 가지며, RNA3 (약 2,200 base)에는 세포 내에서 증식된 바이러스의 세포간 이동에 관여하는 30kD 단백질 (3a gene) 및 외피단백질 (25 kD)을 코드하고 있다. 지금까지 CMV는 많은 계통이 분리 동정되어 있으며, 이들은 현재 혈청학적 유연 관계 및 PCR 등에 의한 유전자해석에 의하여 subgroup I 및 subgroup II로 구분되고 있으나, 연구자에 따라서는 기주 반응에 의해서 더욱 세분된 그룹으로 분류하기도 하지만 CMV는 subgroup I 과 subgroup II간에는 물론이고 같은 그룹 내에 속하는 바이러스간에도 기주 식물에 따라서는 병원성의 차이를 나타내는 기생성의 분화가 심하기 때문에 CMV에 의한 식물 병의 방제는 매우 어려운 문제를 안고 있다.

최근 들어 이러한 문제들을 해결하기 위한 기초연구로서 병징 및 감염성 등 각종 병원성에 관여하는 CMV 유전자의 해석이 활발하게 진척되고 있으며, 특히 바이러스의 full-length cDNA의 합성, 클로닝을 위한 효과적인 기술의 개발 또는 합성된 cDNA를 이용한 *in vitro* transcription system의 개발은 바이러스 유전자의 기능을 분석하는데 좋은 도구로 널리 활용되고 있다. 이러한 일련의 CMV에 대한 세계적인 연구의 흐름은 CMV병의 효과적인 방제 법을 개발하기 위한 중요한 기반이 되고 있으며, 특히 농약의 사용이 불가능한 식물 바이러스 병의 방제대책을 세우기 위해서도 매우 중요한 과제가 되고 있다.

식물 바이러스는 작물의 수량과 질에 직접 영향을 미치며, 아주 심할 경우 작물의 생존을 위협하기 때문에 내 바이러스성 작물의 개발을 위해서 많은 유전공학적 방법이 시도되고 있다. 즉, satellite RNAs 또는 viral positive-sense sequences에 상보적인 antisense RNAs, ribozymes, CMV 2a replicase 단백질을 만드는 유전자 (Carr 등, 1996), CMV movement proteins (MPs) 유전자 (Cooper 등, 1996), CMV 3a 유전자 (Kaplan 등, 1995), 외피단백질 유전자 (viral coat protein gene)의 도입을 통한

유전형질 전환 방법이 시도되었고 그중 가장 널리 이용되고 있는 외피단백질 유전자의 경우 실제로 애호박의 경우 종자로 시판되고 있는 실정이며, 외국의 종묘회사에서는 토마토를 비롯한 많은 채소작물을 대상으로 유전형질 전환 작물들을 2002 년부터 상품화시킬 예정이라고 하지만 식물체내에 도입된 유전자의 정확한 작용 기작이 밝혀지지 않아 모든 작물에 적용시키는 데는 어려움이 있을 것으로 예상된다. 국내에서도 바이러스 외피단백질 유전자를 도입하는 연구가 시도되고 있지만 고추, 감자에 한정되어서 연구가 진행되고 있다.

한편 최근에 **단사슬 가변 절편 항체 (single-chain Fv antibody - scFv)** 유전자를 이용한 형질전환 식물체의 제작이 보고되었고 한 예로 Nature 지에 1993년에 발표된 AMCV(Artichoke Mottled Crinkle Virus)에 특이적인 single-chain Fv 항체 유전자를 도입시켜 담배에서 발현시킴으로서 특이 바이러스 저항성을 지닌 담배 식물체 개발에 성공하였고 이러한 응용분야뿐만 아니라 배발생과 관련된 식물 성장 조절제를 조절할 수 있는 항체 유전자형질 전환 담배 식물을 제작함으로써 식물체 발생에 관한 순수연구에 유용하게 활용되고 있다 (Tavladoraski 등, 1993; Philips 등, 1997). 이후, 1995년에는 Science 지에 식물체내에서 secretory antibodies를 합성하는 연구결과가 발표되었으며 따라서 식물체에 항체유전자 이식을 통한 기술의 개발은 순수 및 응용면에서 많은 잠재성을 가지고 있음이 증명되었다. 따라서 유전공학 적으로 조작된 항체가 식물의 바이러스를 중화하는데 효과적이며 scFv mRNA가 형질전환 식물체에 다양한 수준으로 발현되었음이 증명되었으나 지금까지 담배 이외에 유용한 농작물에 실용화된 예는 보고되지 않고 있다. 따라서 상기에서와 같은 특이 immunomodulation 방법은 바이러스 저항성 주요 채소작물을 육성하는데 새로운 지평을 열었다고 할 수 있다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연차별 연구내용

1. 1년차 : CMV-Mf의 생물학적 특성 및 CP gene의 분석, 항체 제작 및 형질전환체 계확립

(1) 공시바이러스와 증식

바이러스는 장구채로부터 분리한 CMV-Mf (4)를 공시하고, *N. tabacum* cv. Xanthi nc 또는 *N. glutinosa*에 즙액 접종하여 증식시킨다.

(2) CMV-Mf의 기주반응 실험

CMV-Mf에 대응하는 scFv항체 유전자를 도입시키기 위한 형질전환 대상 식물들에서의 Mf가 나타내는 기주반응의 특성을 검정하기 위하여 *N. tabacum* cv. Xanthi nc, *Capsicum annuum* 및 *Spinacia oleracea*를 중심으로 즙액 접종을 실시하고, 이들 식물이 나타내는 기주 반응을 조사한다. 또한 형질전환체의 저항성 정도를 검정하는데 기초자료를 얻기 위하여 공시한 CMV-Mf 이외에 다른 계통들의 CMV 및 이들 식물에 감염성을 갖는 다른 종의 바이러스 (예 : Tobacco Mosaic Virus; TMV, Broad Bean Wilt Virus; BBWV)도 접종실험을 통하여 이들 3종의 식물에서 나타내는 반응의 차이를 검정한다.

(3) CMV-Mf CP gene의 분석

- A. 바이러스의 순화 및 RNA의 정제
- B. RNA3-cDNA합성 및 클로닝
- C. 염기서열분석
- D. CMV-Mf CP gene의 변이주 제작과 기능분석 :

(4) CMV-Mf의 항체 제작을 위한 바이러스의 순화

CMV-Mf에 효과적인 중화작용을 갖는 scFv항체를 제작하는데 있어서 필요한 항원을 얻기 위하여 바이러스를 순화한다. 공시 CMV-Mf는 *N. glutinosa*에 증식

시키고 접종 10일 후 잎을 채취하여 Takanami의 방법 (27)으로 바이러스를 순화한다. 순화된 바이러스는 전자현미경 관찰 및 흡광도 측정을 통하여 순도를 검정하고 이를 면역 동물에 주사할 수 있는 재료로 제공한다.

(5) 항체 제작

① Immunization

가. CMV 를 Freund's complete adjuvant와 섞어 ICR mouse에 복강주사 투여

나. booster injection 실시 (식물바이러스 + Freund's incomplete adjuvant)

다. 항-식물바이러스 항체의 혈청 역가가 높은 mouse로부터 비장 (spleen) 제거

② Spleen으로부터 항체 유전자 증폭

가. Mouse spleen으로부터 total RNA 분리한 후 1st strand cDNA 합성

나. Mouse IgG-specific PCR primer와 *Taq* polymerase를 사용하여 V_H 유전자와 V_L 유전자 증폭 획득

③ scFv 항체 유전자 phage display library 제작

(2) 식물체 재분화 및 형질전환 시스템 개발

① 박과 작물, 담배, 토마토(대과 및 소과종)를 중심으로 재분화 체계확립

② 효율적인 형질전환 체계확립

2. 2년차 : CMV-Mf 특이적 항체의 생산 및 바이러스 중화능력 검정 및 형질전환 식물체 생산

(1) 항 CMV-Mf혈청의 검정

scFv항체를 제작하기에 앞서, 순화 CMV-Mf를 이용하여 제작한 항혈청 (polyclonal antibody)의 CMV-Mf에 대한 역가 및 반응 특성을 검정

(2) 항바이러스 scFv 항체 분리 및 생산

1차년도에 제작된 scFv 항체 라이브러리를 CMV-Mf를 사용하여 panning 방법으로 검색함으로써 CMV-특이적 scFv 항체를 분리한다.

(3) 선발된 CMV-Mf scFv항체의 중화능력 검정

*in vitro*에서의 중화능력을 평가하기 위하여 공시한 형질전환 대상 식물의 원형질체를 작성하고, 이들 원형질체의 배지에 scFv항체를 첨가한 다음, 바이러스의 감염성

또는 세포내 증식성에 미치는 영향을 조사

(4) scFv의 친화성 검정

CMV-Mf 특이적 scFv항체의 친화성 검정은, scFv가 유기된 원래의 항체와 비교하여 친화성의 정도를 비교 검정한다. 항체의 평가는 CMV-Mf입자에 대한 결합의 50% 포화 농도를 기준으로 삼는다.

(5) 항바이러스 scFv 항체 유전자 조작

Tag PCR 방법을 사용하여 항바이러스 scFv 항체 유전자의 3' terminal에 식물의 ER retention signal 삽입

(6) 형질전환 식물체 생산

① 식물에서 발현시킬 벡터 작성

scFv 항체 유전자를 제한효소로 잘라서 pBluescrip-KS 에 subcloning 한 후 pBI121에 ligation 시켜 발현벡터 제작. Promoter는 Cauliflower mosaic virus 35S (CaMV 35s)를 사용. 선별 표지 유전자는 kanamycin과 hygromycin을 같이 사용한다.

(7) 재조합 된 벡터의 *Agrobacterium*으로의 도입 및 식물체 형질전환

① *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404로 electroporation transformation

② 형질전환 식물체의 선발 및 순화

③ 형질전환 식물체의 검정

(8) 바이러스 중화반응을 위한 원형질체 분리 및 배양방법 체계확립

① 담배, 박과 작물, 토마토의 원형질체 분리조건확립

3. 3년차 : 형질전환식물의 항체 발현, 바이러스 저항성 검정

(1) 형질전환식물의 원형질체를 이용한 감염성 조사

scFv항체 생산 유전자를 도입시킨 형질전환체가 개발되었을 때, 이들 식물로부터 원형질체를 작성하고 이를 이용한 바이러스의 감염성을 검정하여 형질전환체의 바이러스 억제력을 검정한다. 구체적인 실험방법은 위에서 기술한 scFv항체의 바이러스 중화능력 검정(2년차 2항)에서와 같은 방법으로 실시

(2) CMV-Mf에 대한 형질전환식물의 반응

CMV-Mf에 대응하는 특이적 scFv항체 유전자가 도입된 형질전환 식물들로

부터 얻어진 R₁ 세대의 식물체를 이용하여, 이들 식물의 CMV-Mf 접종에 대한 반응 (저항성)을 검정한다.

(3) CMV-Mf RNA3의 변이주에 대한 형질전환식물의 반응

(4) 다른 계통의 CMV 또는 다른 종의 바이러스에 대한 형질전환식물의 반응

CMV-Mf에 대응하는 특이적 scFv항체 유전자가 도입된 형질전환 식물들로부터 얻어진 R₁세대의 식물체를 이용하여, 이들 식물의 CMV-Mf 이외의 다른 계통의 CMV (subgroup I과 II를 구별하여)들과 다른 종의 바이러스 (형질전환체로 유기된 본래의 식물에서 감염 증식될 수 있는 TMV 및 BBWV)의 접종에 대한 반응 (저항성)을 검정한다.

(5) 형질전환 식물체의 항체 발현양 조사

① 항바이러스 scFv 항체 특이적 polyclonal 항체 제작

② 식물세포에서 발현, 생산되는 항바이러스 scFv 항체 검색

(6) 형질전환 식물체의 포장 적응성 및 유전적 안정성 (참여기업 농우종묘와 공동 수행)

① 형질전환 식물체의 온실 및 포장에서의 교배 및 selfing을 통한 종자확보

② 확보된 종자의 후대검정을 통한 유전적 안정성

③ 형질전환 된 식물체의 바이러스 저항성 정도와 수량 및 품질과의 관계

제 2 절 연구결과 및 분석

1. 제1 세부과제 : CMV 특이적 scFv 항체 유전자의 획득 및 형질전환 식물체 내 발현조사

가. 항-CMV 항체 제작 과정

- 1) CMV를 Freund's complete adjuvant와 섞어 ICR mouse에 복강주사 투여
- 2) booster injection 실시(식물 바이러스 + Freund's incomplete adjuvant)
- 3) 항-식물바이러스 항체의 혈청 역가가 높은 mouse로부터 비장(spleen)을 제거
- 4) Monoclonal antibody(Mab)제작 (Spleen의 항체생성세포와 골수종세포를 fusion 하여 하이브리도마 생성)
- 5) CMV에 특이적인 Mab 선별

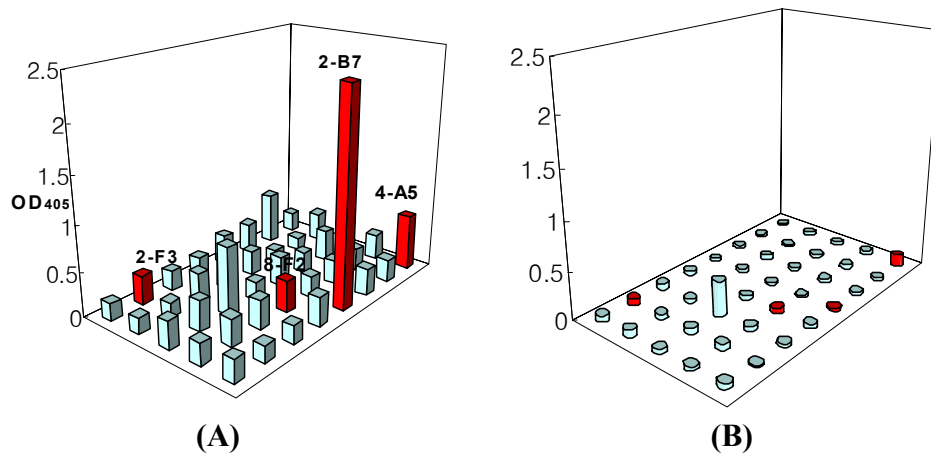


그림 1. Screening of positive clones from hybridomas
 A: ELISA with CMV antigen
 B: ELISA with BSA for negative control

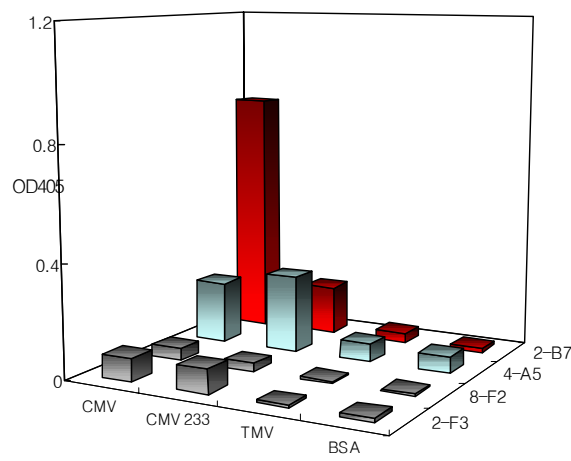


그림 2. ELISA of MAb in CMV *mf* & other plant viruses

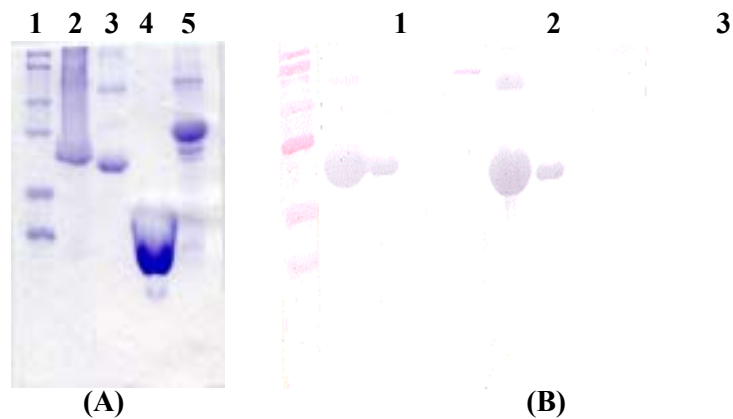


그림 3. Binding specificity of mAbs to CMV *mf* & other plant virus determined by western blotting

A: 12% SDS-gel electrophoresis

Lane 1 : M.W. marker

Lane 2 : CMV *mf*

Lane 3 : CMV233

Lane 4 : TMV

Lane 5 : PVY

B: Western blot

Pannel 1 : MAb 2-B7

Pannel 2 : MAb4-A5

Pnnnel 3 : MAb mHSP65-negative control

나. scFv 항체 유전자 phage display library 제작

CMV 항원으로 immunization된 mouse의 spleen을 적출하고 RNA를 분리한 후 RT-PCR을 이용한 cDNA를 합성하여 V_H 와 V_L 유전자를 증폭, linker PCR과 pull-through PCR의 과정을 거쳐 약 700 bp의 scFv fragment를 획득에 성공하였다. 분리된 scF

v fragment를 제한효소 *sfi* I과 *Not* I로 처리한 후 같은 제한효소로 자른 pCANTAB 5E vector와 ligation하여 TG1 cells에 transformation 시켜 약 4×10^4 의 library를 구축하였다.

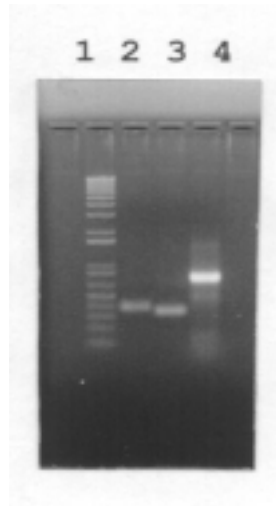


그림 4. V_H , V_L PCR 및 assembly PCR (1% agarose gel 전기영동)

Lane 1 : 1kb ladder

Lane 2 : V_H

Lane 3 : V_L

Lane 4 : scFv fragment(~ 700 bp)

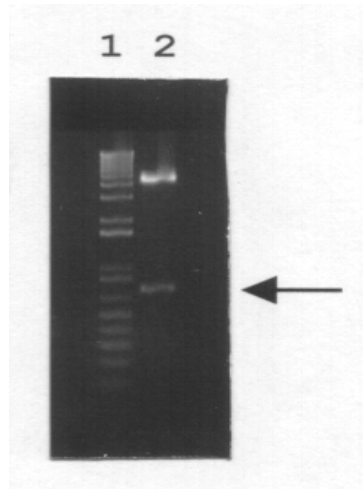


그림 5. Identification of a scFv insert by *Sfi* I - *Not* I digestion of miniprep plasmid isolated from the mouse scFv *E. coli* clone (1% agarose 전기영동)

Lane 1 : 1kb ladder

Arrow indicates 700 bp of scFv fragment in pCANTAB5E vector

다. 항바이러스 scFv 항체 분리 및 생산

1차년도에 구축된 library를 가지고 5번의 panning과정을 거쳐 얻어진 phage를 HB2151 cell에 infection시켜 IPTG induction 과정을 거쳐 soluble scFv 항체를 생산하여 항원과 ELISA를 해본 결과 반응을 보이는 clone을 찾을 수 있었다. 다량의 soluble scFv 항체를 분리하여 항원과의 특이성 검증을 위하여 단일 세포성 항체와 마찬가지로 여러가지 식물 바이러스와 western blot을 실시하여 특이성을 검증하여 CMV-Mf와 반응을 보이고 있음을 확인할 수 있었다.

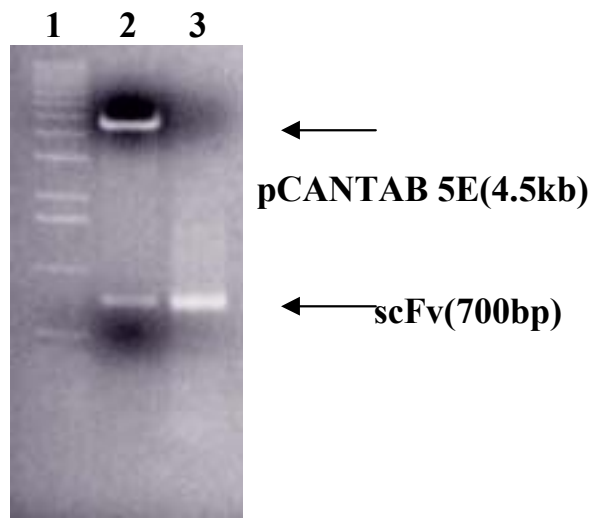


그림 6 . Anti-CMV positive clone DNA

Lane1 : kb ladder

Lane2 : DNA *Sfi* I-*Not* I digestion

Lane3 : pull-through primer 이용한 PCR

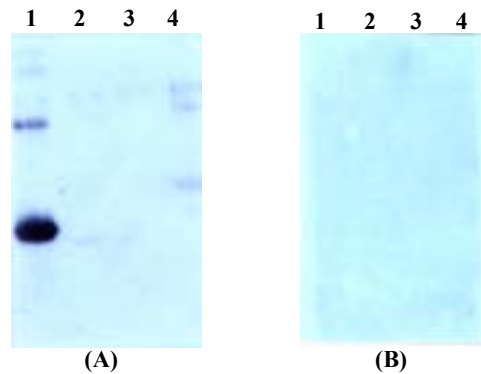


그림 7. Identification of soluble scFv antibody by western blot

A : Anti-CMV scFv 항체에 대한 결과

Lane1 : CMV-Mf

Lane2 : CMV233

Lane3 : TMV

Lane4 : PVY

B : Anti-*DerP* I scFv 항체에 대한 결과 (negative control)

라. CMV-Mf 특이적 scFv 항체의 염기서열 분석 (Generation of a Murine Single Chain Fv(scFv) Antibody Specific for Cucumber Mosaic Virus(CMV) Using a Phage Display Library *Mol.Cells*, Vol. 11, No. 1, pp. 7-12 발표)

scFv 항체 plasmid는 Qiagen Plasmid kit(QIAGEN)을 이용하여 CMV-specific scFv 항체를 생산하는 HB2151 cells로부터 분리되었고, scFv 항체 유전자의 확인을 위해 *Sfi* I과 *Not* I 제한효소를 처리하여 1% agarose gel 전기영동으로 확인하였다. scFv 항체의 염기서열을 분석하기 위해서 pCANTAB 5E vector에 *Hind* III와 *Not* I 을 처리하여 항체를 분리해낸 다음 pBlueScript SK-vector에 subcloning하였다. PCR 은 cy5TM AutoCycleTM Sequencing Kit (Pharmacia Biotech)을 이용하여 수행

되었고 sequencing gel은 Long Ranger™ Gel solution (FMC Corp.)를 이용하여 준비되었고 automatic DNA sequencing은 ALFexpress Sequencers (Pharmacia Biotech)을 이용하여 항체 유전자의 염기서열을 분석하였다.

(A) cDNA sequence

- **V_H**

ATGGCCCAGGGCAAACCTGCAGCAGTCAGGGGCTGAGCTTGTGAGGCCAGGGGC

CDR1

CTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTTTACATTAAAGACGACTAT

CDR2

ATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGATGG

ATTGATCCTGAGAATGGTGATACTGAATATGCCTCGAAGTTCCAGGGCAA

GGCCACTATAACAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCA

CDR3

GCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTACTATGCTGGGACCGGC

TTACTGGGGCCAAGGGA

- **V_{LK}**

GACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAA

CDR1

GGTCACCATAACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGT

CDR2

TCCAGCAGAAGCCAGGCACTTCTCCCAAACCTCTGGATTTATAGCACATCCAA

CCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCT

TACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGTTGCCACTTATTACT

CDR3

GCCAGCAAAGGAGTAGTTACCCATTCACGTTCCGGCTCGGGGACCAAGCTGG

AAATAAAACGGGCGGCC

하고 scFv 항체를 1% BSA와 serial dilution하여 각 well에 50 μ l씩 가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응하였다. PBS-Tween(0.1%)으로 세척한 후 alkaline phosphatase가 결합된 anti-mouse IgG(Fab specific)를 1:5000으로 희석하여 가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응하였다. PBS-Tween으로 세척한 후 50 μ l 기질 p-Nitrophenyl phosphate(pNPP)를 첨가하여 ELISA reader를 사용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다(그림 4). 이렇게 결정된 항체의 농도를 이용하여 항원-항체 친화성의 정도를 비교검정하는 실험이 진행중에 있다. 항체의 평가는 CMV-Mf입자에 대한 결합의 50% 포화 농도를 기준으로 삼는다.

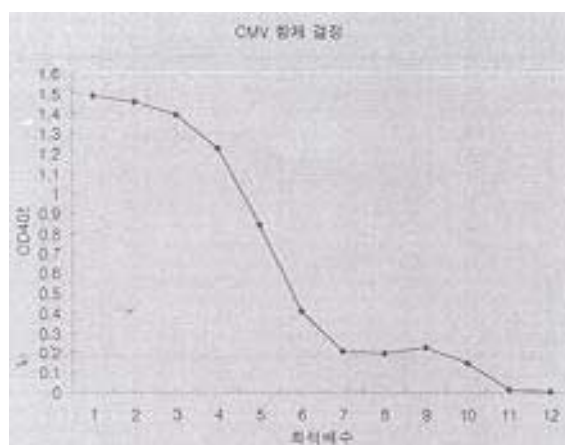


그림 9. Determination of scFv antibody concentration

[희석배수- 1(2배희석), 2(4배), 3(8배), 4(16배), 5(32배), 6(64배), 7(128배), 8(256배), 9(500배), 10(1000배), 11(2000배), 12(5000배)]

바. 항바이러스 scFv 항체 유전자 조작

CMV-Mf에 대한 특이적 scFv항체는 식물체내에서 항체유전자의 단백질 발현을 향상시키기 위하여 식물 발현용 promoter인 CaMv 35S promoter를 pBI 121 vector에서 *Hind* III/*Bam*H I으로 분리한 다음 pCAMBIA 2300 vector에 같은 제한효소로 T-DNA 영역에 cloning하고 scFv 항체 유전자도 PCR 방법으로 증폭하여 *Xba* I/*Kpn* I으로 식물 발현용 vector에 삽입하였다. 식물 발현용 vector인 pCAMBIA 2300에 poly-A tail을 만들어주기 위해서 Nos promoter를 증폭하여 1% agarose gel로 확인하여 분리한 다음 *Kpn* I/*Eco*R I으로 T-DNA 영역에 cloning하였다. 이렇게 제작된 식물발현용 벡터는 colony를 획득하여 DNA를 분리한 다음 cloning된 제한효소를 처리하여 agarose gel 전기영동으로 ligation을 확인하였다. 전체적인 식물발현용 벡터의 모식도는 다음과 같이 제작하였다.

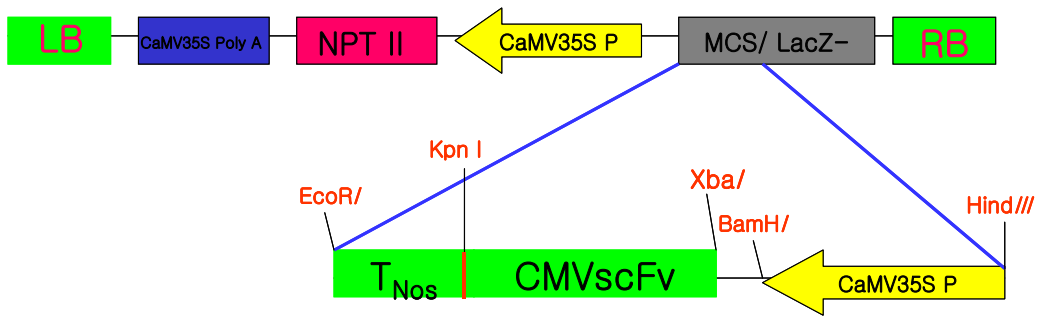


그림 10. Map of pCAMBIA 2300 for scFv expression in plant



그림 11. PCR of CMVscFv(A) and Nos terminator gene(B)

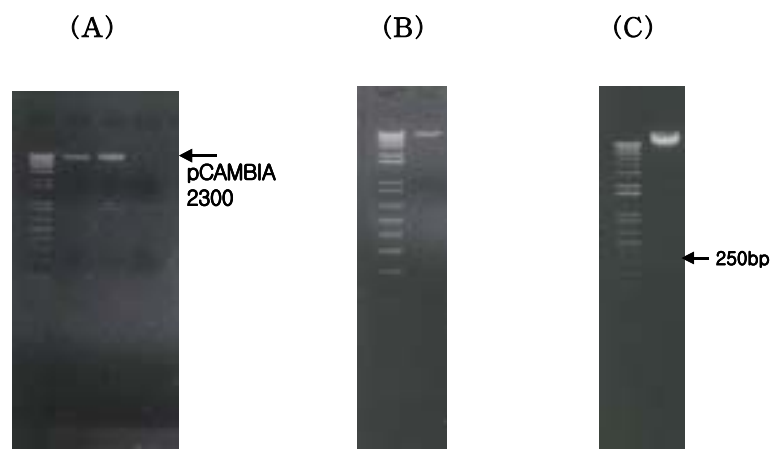


그림 12. Identification of a CaMv35S promoter insert(A), CMV-scFv(B) and Tnos(C) of recombinant plasmid by 1% agarose gel

사. 단일세포성 항체의 positive clone의 검색

1차년도에서 단일세포성 항체를 제작, 검색을 통하여 positive clone을 획득하였는데 2차년도에서도 더 많은 positive clone들을 확보하기 위한 실험을 진행하였다. Fusion을 통하여 성장하고 있는 cell들이 자라고 있는 well부터 100 μ l의 상등액을 취하여 CMV-Mf 항원이 coating(10 μ g/ml)되어진 ELISA plate에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시키고 PBS(0.1% Tween-20)buffer로 세척한 후 anti-mouse IgG(Fab specific, AP conjugated, 1:5000 dilution)항체를 가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켜 기질(pNPP)과의 반응으로 4개의 positive clone(19-A-7, 42-A-9, 26-D-3, 46-C-4)을 찾았다.

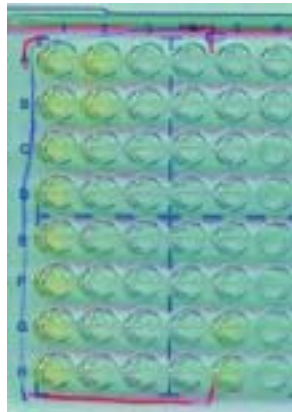


그림 13. selection of positive clone from hybridoma

아. CMVscFv-AP(Alkaline phosphatase)가 conjugation된 Pho A color system
의 개발

수용성의 항-바이러스 항체유전자를 Sfi I/Not I 제한효소가 있는 primer를 이용하여 PCR 방법으로 증폭하였다. 이렇게 증폭된 유전자를 low-melting agarose로 분리하여 같은 제한효소로 절단된 pQUANTabody vector에 T4 DNA ligase를 이용하여 16°C에서 O/N ligation하였다. ligation mixture를 XL-1 Blue E.coli host에 transformation 한후 transformant를 LB/Amp(50ug/ml) 배지에 키워서 OD=0.5가 되면 1mM IPTG를 넣어서 30°C에서 4시간 동안 induction하였다. 원심분리를 이용하여 cell pellet을 모은후 2X sample buffer로 희석하여 12% SDS-PAGE 전기영동을 하여 CMVscFv-AP recombinant clone의 발현을 확인하였다.

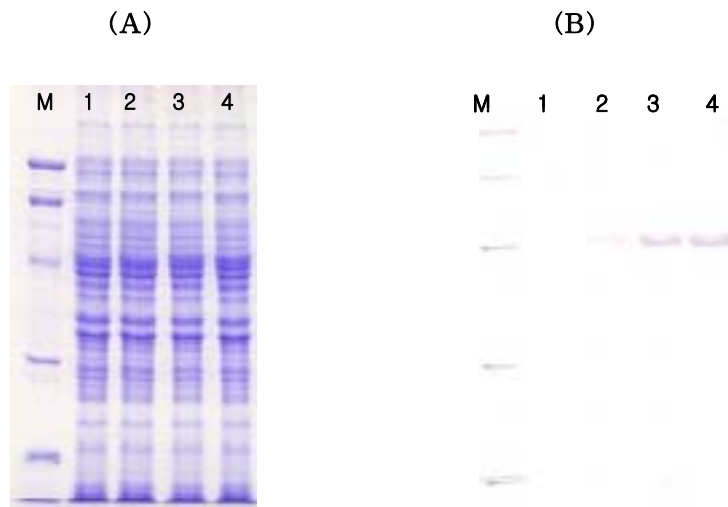


그림 14. 12% SDS-PAGE(A) and immuno blot(B) of CMVscFv in Pho A vector

M : Molecular marker

Lane1 : control (without IPTG)

Lane2-4 : induction

자. 항바이러스 scFv 항체 특이적 polyclonal 항체 제작

수용성의 CMVscFv 항체 유전자를 발현시킨 후 7.4M Guanidinium으로 protein을 denature 시켰다. His-tag resin(probond resin, Invitrogen)을 pH 7.4 8M Urea로 적정 시킨후 준비된 sample 1ml을 loading 한 후 pH 6.0, 8M Urea, pH 5.4, 8M Urea 로 wash 해준후 pH 4.0 8M Urea로 CMV scFv를 용출시켰다. 그 후 SDS-PAGE 로 CMVscFv 존재 여부를 확인한 후 6M Urea부터 0.5M Urea까지 stepwise dialysis 했다. 정제된 항체 유전자를 가지고 쥐의 복강에 일정기간으로 3차례 주사하여 ELISA 로 면역반을 확인한 후 쥐의 혈액으로부터 CMVscFv 항체 특이적 polyclonal 항체를 확보하였다.

이렇게 얻어진 polyclonal 항체를 가지고 scFv 항체 유전자가 발현된 E.coli lysate를 12% SDS-PAGE하고 nitrocellulose membrane에 transfer하여 westrn blot으로 polyclonal 항체의 특이성을 검증하였다.

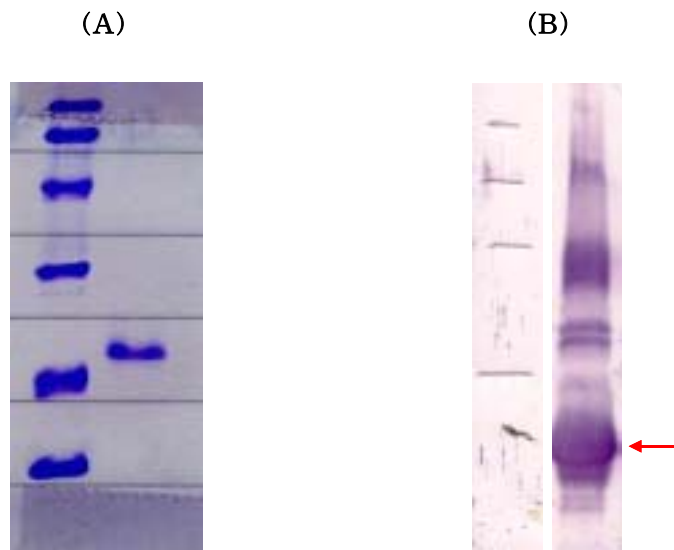


그림 15. 12% SDS-PAGE of purified CMVscFv(A) and specificity of CMVscFv polyclonal antibody to CMVscFv by western blot(B)

2. 제2 세부과제 : CMV의 병원성유전자 분석 및 scFv항체발현 식물에서의 반응기작

가. 연구의 배경

오이 모자이크 바이러스 (*Cucumber mosaic virus*; CMV)는 *Bromoviridae*의 *Cucumovirus* 속 (genus)에 속하며, 이 그룹의 대표바이러스이다 (Murphy, 1995). 바이러스입자는 직경 30 nm의 구형 (isometric)으로, 3종의 분절된 외가닥 게놈 RNA (single strand RNA; ssRNA)와 1종의 서브게놈 RNA를 가지고 있다 (Peden과 Symons, 1973). CMV는 진딧물 전염과 기계적 전염으로 전파된다 (Van Regenmortel, 1989).

CMV는 1916년 Doolittle, 그리고 같은 해 Jagger에 의해 오이와 머스크멜론에서 처음 보고되었다. 그 후 이 바이러스는 세계적으로 널리 분포하고, 가장 넓은 기주범위를 가지고 있는 중요 바이러스로 알려지게 되었으며, 식물바이러스 중 가장 많이 연구되고 있는 바이러스의 하나이다. 또한 현실적으로 각종 작물에 큰 피해를 주고 있는 주요 병원체이기도 하다. CMV는 앞에서 언급한 바와 같이 넓은 기주범위를 가지고 있다. Wellman (1935)이 정리한 CMV의 기주는 91종, 그 후 1966년 191종, 그리고 1969년에는 470종으로 증가되었다. 가장 최근 기록된 CMV의 기주범위에 관한 논문에는 85과 365속 775종의 식물에 달하고 있다 (Douine 등, 1979). 이러한 기록들로 보아 CMV는 적어도 1,000종 이상의 식물들을 기주범위로 가지고 있다고 생각된다. 이와 같이 자연계에 널리 분포하는 CMV는 많은 계통 또는 분리주들이 존재하며, 이들은 주로 병징이나 기주범위의 차이에 의해서 구분되고 있다. 그러나 CMV는 혈청학적 유연관계, 바이러스 외피단백질 (coat protein)의 펩티드 map 및 게놈의 hybridization analysis 등에 의해서 서브그룹이 정리되고 있으며 (Devergne과 Cardin, 1973; Gonda와 Symons, 1978; Piazzola 등, 1979), 연구자에 따라서 여러 가지로 불리던 이들 서브그룹의 명칭은 최근 subgroup I 및 subgroup II로 구분되며, 최근에는 subgroup I을 다시 IA 및 IB로 구분하고 있다 (Owen과 Palukaitis, 1988).

바이러스의 게놈은 그 바이러스의 유전적 특성을 가장 직접적으로 표현한다. 따라서 바이러스의 게놈을 분석할 수 있는 여러 가지 기법들이 바이러스의 기본적 성질

을 밝히는데 이용되고 있고, CMV에서도 RNA-RNA hybridization (Piazolla 등, 1979; Owen과 Palukaitis, 1988)이나 감염 세포로부터 직접 바이러스 게놈의 복제형인 double strand RNA (dsRNA)를 검출하는 방법들이 활용되었다 (Morris와 Dodds, 1979). 또한 CMV 계통들의 공통 염기서열을 이용한 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)기법의 개발은 CMV의 특성을 매우 빠르고 정확하게 판정할 수 있는 수단으로 많이 이용되고 있으며, 이 RT-PCR산물을 이용한 제한효소 절단방법은 바이러스의 계통간 특성을 쉽게 표현해 주고 있다 (Singh 등, 1995; Choi 등, 1998). 한편 게놈 RNA가 분절되어 있는 CMV의 경우 표현형을 달리하는 계통간 각 RNA의 pseudorecombination이 용이하기 때문에, 각 바이러스가 가지고 있는 유전자의 생물적 특성을 해석하는데 결정적인 역할을 해주었다 (Mossop과 Francki, 1977; Rao와 Francki, 1982; Lakshman과 Gonsalves, 1985).

최근 분자생물학적 기법의 발전과 더불어 바이러스의 게놈에 대한 분석 결과들이 많이 보고되고 있다. CMV에 있어서도 많은 계통들에 대한 전 염기서열과 게놈구조가 밝혀졌고 (Daves와 Symons, 1988; Nitta 등, 1988; Rizzo와 Palukaitis, 1988; Palukaitis 등, 1992), 이러한 결과들은 바이러스 유전자기능의 분석이나 기주식물과의 상호관계를 분자수준에서 이해하는데 중요한 역할을 해주고 있다. CMV의 경우, RNA1과 RNA2는 바이러스 RNA의 복제에 직접 관여하고, RNA3에 코드되어 있는 3a 단백질 및 외피단백질이 바이러스의 세포조직간 이동에 관여한다는 것이 밝혀졌다 (Gould와 Symons, 1978; Daves와 Symons, 1988; Nitta 등, 1988).

CMV의 감염에 따른 식물의 병징은 많은 식물에서 모자이크와 위축을 일으키는 것이 일반적이지만, 경우에 따라서는 완전한 전신괴사에서부터 무병징감염에 이르기 까지 매우 다양하게 나타난다. 또한 어떤 CMV계통 (예를 들면 M-CMV나 Y-CMV 등)은 대부분의 기주식물에 chlorosis를 유도하는데 반해서, 어떤 계통들은 일반적인 모자이크 (green mosaic)만을 특징적으로 발현하기도 한다 (Kaper와 Waterworth, 1981). 한편 CMV의 병징은 satellite RNA의 유무에 따라서도 크게 변하는 경우가 나타나며 (Francki, 1985), CMV의 단독감염에서는 매우 약한 모자이크를 발현하던 것이 다른 바이러스와 함께 감염됨으로서 심한 모자이크로 변하는 상승작용(severe synergy)을 일으키는 경우도 있다 (Francki 등, 1979).

지금까지 몇몇 CMV계통들에서 기주에의 병원성이나 병징을 결정하는 유전자가 게놈 RNA의 pseudorecombination 실험을 통하여 결정되었다. 이러한 연구들의 결과

는 CMV의 게놈 RNA중 한 개 이상의 RNA가 특별한 병징발현의 유도인자로서 작용한다는 것을 나타내고 있다 (Palukaitis 등, 1992). 그러나 병원성의 유도에 있어서 복수의 RNA가 관련된다 할지라도, 특징적인 병징을 유도하는 CMV의 염기서열을 규정하는데 있어서는 크게 문제가 되지는 않는다. 예를 들면 M-CMV에 의해서 유도되는 담배에서의 진신적 chlorosis는 RNA3의 특정 염기서열에 의해서 유도된다는 사실이 밝혀졌지만, RNA2도 관여하고 있는 것으로 해석되고 있다 (Rizzo, 1989).

이 연구에서는 우리 나라에서 분리한 CMV의 한 계통을 이용하여 이 바이러스의 병원성과 관련된 유전자를 분석하고, 특히 이 바이러스의 외피단백질 (coat protein, CP)의 특성을 조사하여, CP에 대응하는 항원항체 반응의 기본적인 성질을 검정한다. 또한 CMV의 scFv항체를 제작하였을 때 이 항체와의 중화반응 등을 구체적으로 검정하고 scFV항체를 발현하는 형질전환 식물이 제작되었을 때, CMV의 반응기작을 조사하여 이 형질전환체가 CMV의 감염에 대해서 저항성을 나타낼 것인가를 검정하여 바이러스병에 저항성인 식물을 유도하는 것을 목적으로 실시하였다.

나. CMV-Mf계통의 생물학적 성질 및 항체제작을 위한 바이러스의 정제

1) 공시바이러스의 증식

본 연구에서 공시한 CMV (*Cucumber mosaic virus*, CMV)의 Mf계통은 1998년 강원도 평창군 대관령지역에 자생하는 장구채 (*Melandryum firmum*)로부터 분리한 CMV의 명칭 (Choi 등, 1998)으로, 당초 분리된 CMV-Mf는 CaCl₂에 보존되어 있었다. 보존된 CMV-Mf를 5-6엽기의 *Nicotiana glutinosa*에 즙액접종하고 접종 7 - 10일 후 모자이크 병징이 발현된 잎을 채취하여, 0.01 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 마쇄한 즙액을 *Chenopodium amaranticolor*의 전개엽에 접종하여 5 - 7일 후에 형성된 병반을 단일 분리하여 *N. tabacum* cv. Xanthi nc에 접종하였다. CMV-Mf를 접종하여 모자이크가 발현된 담배 (Xanthi nc)의 잎은 접종 10일 후에 수확하여, 본 연구의 공시재료로 공시하였다. 이때 수확한 이병엽은 -70℃에 보존하면서 필요시 재료로 사용하였다.

2) CMV-Mf의 기주반응

CMV-Mf의 기주반응 실험은 3단계로 나뉘어 수행하였다. 즉 ① CMV-Mf의 각종 작물에서의 생물적 특성을 조사하기 위한 작물별 기주반응 실험, ② 이미 보고된 CMV계통들과의 특성을 비교하기 위한 기주반응 실험 및 ③ 본 연구과제에서 추구하는 CMV-Mf의 scFv항체를 발현시킬 기주에서의 반응 특성과 공통기주를 갖는 다른 바이러스 (TMV 및 *Potyvirus*)와의 차이점 등에 관한 실험을 실시하였다. 바이러스의 접종은 CMV-Mf를 접종하여 모자이크가 발현된 담배 (*Xanthi nc*)의 잎을 접종 10일 후에 수확하여 접종원으로 사용하였으며, Carborandum을 이용한 즙액접종법을 이용하였다. CMV-Mf를 유묘기에 접종한 각종 지표식물은 25 - 30°C의 온실에 30일 정도 보존하면서 발현되는 병징을 경시적으로 관찰하였다. 공시한 각 기주식물에서 나타난 CMV-Mf계통의 병징 특성은 다음의 표 3, 4 및 5와 같다.

표 3. 주요 재배작물에서 발현된 CMV-Mf의 기주반응

기주작물		Control CMV (subgroup I)	Control CMV (subgroup II)
	CMV-Mf	CMV-Fny	CMV-LS
<i>Nicotiana tabacum</i>	M	M	M
<i>Capsicum annuum</i>	M	M	M
<i>Lycopersicon esculentum</i>	mM	M	sM
<i>Cucumis sativus</i>	mM	M	M
<i>C. pepo</i>	M	M	sM
<i>Raphanus sativus</i>	-	-	-
<i>Brassica pekinensis</i>	-	-	-
<i>Phaseolus unguiculata</i>	L	L	L

Abbreviations : M = mosaic, mM = mild mosaic, sM = severe mosaic,
L = local lesions, - = not infection.

표 4. CMV의 주요 지표식물에서의 CMV-Mf의 기주반응

판별기주 식물		Control CMV (subgroup I)	Control CMV (subgroup II)
	CMV-Mf	CMV-Fny	CMV-LS
<i>Nicotiana glutinosa</i>	M	M	M
<i>N. tabacum</i> 'Xanthi nc'	M	M	M
<i>N. tabacum</i> 'Burley 21'	YM	M	M
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	L	L	L
<i>C. pepo</i>	M	M	sM
<i>Raphanus sativus</i>	-	-	-
<i>Vicia faba</i>	L	L	L
<i>Zea mays</i>	-(+)	-	-

Abbreviations : M = mosaic, mM = mild mosaic, sM = severe mosaic,
 YM = yellow mosaic, L = local lesions, - = not infection.

표 5. CMV와 공통기주를 갖는 작물에서의 CMV-Mf와 다른 바이러스의 기주반응

기주작물	CMV-Mf	TMV	PVY
<i>Nicotiana tabacum</i>	M	M	CS,N
<i>Capsicum annuum</i>	M	mM	M,N
<i>Lycopersicon esculentum</i>	mM	M	M
<i>Cucumis sativus</i>	mM	-	-
<i>C. pepo</i>	M	-	-
<i>Raphanus sativus</i>	-	-	-
<i>Brassica pekinensis</i>	-	-	-
<i>Phaseolus unguiculata</i>	L	-	M

Abbreviations : M = mosaic, mM = mild mosaic, N = necrosis,
 CS = chlorotic spot, L = local lesions, - = not infection.

3) CMV-Mf CP gene의 분석

CMV의 CP gene (외피단백질 유전자)은 RNA 3의 3'말단영역에 존재한다. CP gene을 연구하는 목적은 바이러스의 항원성을 갖고 있기 때문에 CMV-Mf의 scFv항체를 제작하고, 그 유전자를 형질전환시키기 위해서는 이 유전자에 대한 분석이 필요하다.

CMV RNA 3의 CP gene 상류의 intergenic region과 3' non-coding region에는 모든 CMV의 공통 염기서열이 존재한다. 이들 sequence를 이용하여 primer pair를 디자인하고 (UP : 5'-TA GTTTTGAGGTTCAATTCC-3' DP : 5'-CGGCTAAAATGGTCAGTC-3'), 이들을 이용하여 RT-PCR에 의한 CP gene의 cDNA합성에 이용하였다. 그 결과 예상된 CP gene의 full-length를 포함한 약 900 bp의 cDNA가 합성되었고 (그림 16), 이를 클로닝하여 sequence를 결정하고 있다.

가) CMV-Mf RNA 3의 cDNA합성 및 클로닝

CMV의 CP gene (외피단백질 유전자)은 RNA 3의 3'말단영역에 존재한다. CP gene을 연구하는 목적은 바이러스의 항원성을 갖고 있기 때문에 CMV-Mf의 scFV항체를 제작하고, 그 유전자를 형질전환시키기 위해서는 이 유전자에 대한 분석이 필요하다.

CMV RNA 3의 CP gene 상류의 intergenic region과 3' non-coding region에는 모든 CMV의 공통 염기서열이 존재한다. 이들 sequence를 이용하여 primer pair를 디자인하고(UP:5'-TAGTTT TGAGGTTCAATTCC-3' DP: 5'-CGGCTAAAATGGTCAGTC-3'), 이들을 이용하여 RT-PCR에 의한 CP gene의 cDNA합성에 이용하였다. 그 결과 예상된 CP gene의 full-length를 포함한 약 954 bp의 cDNA가 합성되었고 (그림 16), 이를 pUC18에 클로닝하였다.

Mf Fny LS



그림 16. CMV-Mf의 CP gene을 포함하는 cDNA클론의 전기영동

나) CP gene의 염기 및 아미노산서열 분석

CMV-Mf RNA 3에 코딩된 외피단백질 유전자 (CP gene)의 염기서열을 분석하였다. 그 결과 CMV-Mf의 CP gene은 657 nucleotide로 구성된 ORF로, 대조 바이러스로 이용한 subgroup I의 Fny계통과 98.5%의 homology를 보였고, subgroup II인 LS계통과는 78.9%의 homology를 나타냄으로서 공시한 Mf계통은 Fny계통과 마찬가지로 subgroup I에 속하는 CMV로 판단되었다. CMV-Mf CP gene의 염기서열을 기 보고된 Fny 및 LS계통과 비교한 결과 (그림 17), Fny계통과 10곳의 염기치환이 나타났으며, 이들 중에서 아미노산의 치환으로 이어지는 염기의 치환은 218 아미노산중 단 1곳으로 99.5%의 homology를 보였다 (그림 18).

다) CMV-Mf CP gene의 변이주 제작과 기능분석

CMV-Mf 계통은 담배(*Nicotiana tabacum* cv. Burley 21)에 접종하였을 때, 대조바이러스로 이용한 Fny계통이나 LS계통과는 달리 심한 모자이크를 발현하면서 특징적

으로 접종 상업에 매우 작은 chlorosis (necrotic spot)를 형성하는 성질을 보였다 (그림 19). 이와 같은 CMV-Mf 계통이 CP gene의 기능과 관련이 있는지를 판단하고, 이러한 기능이 이 연구의 목표인 scFv항체발현 식물에서의 역할에 어떠한 영향을 미칠 것인지에 관한 기초적인 지식을 얻기 위하여, CP gene의 변이주를 제작하여 그 기능을 분석하였다. 즉 이 바이러스의 Burley 21에서의 chlorosis 발현에 관여하는 유전자를 탐색하기 위하여 Fny-CMV와 cDNA를 이용한 chimeric clone을 구축하고 *in vitro* transcription에 의한 병징과 관련된 유전자를 탐색하였다. 이들 재조합 키메라 RNA3의 cDNA와 Fny-CMV RNA1 및 cDNA clone으로부터 T7RNA중합효소를 이용한 *in vitro* transcripts를 만들고 Burley 21에 접종하였다. 그 결과 Mf-CMV의 RNA3중에서 외피단백질 유전자의 대부분이 포함되었을 때 chlorosis가 발현되었다. Mf-CMV의 외피단백질 유전자는 염기서열에서 10염기, 아미노산서열에서 1잔기가 Fny-CMV와 차이를 나타낸다 (그림 17). 그러나 지금까지 CMV의 병징과 관련된 domain으로 보고된 외피단백질의 129번째 아미노산은 Pro→Leu (또는 Ser)의 변이가 존재하지 않고, Mf-CMV는 Fny와 마찬가지로 Pro를 코드하였다. 따라서 Mf-CMV의 외피단백질 유전자를 좀더 세분시킨 재조합 키메라 cDNA를 구축하고 담배에 접종하였다 (그림 20). 그 결과 Mf-CMV RNA3의 HX fragment (HindIII- XhoI site)를 포함하는 키메라 RNA3이 포함된 조합에서 chlorosis가 발현되었고 이 fragment에는 Fny-CMV와 Mf-CMV 사이에 137번째 아미노산 alanine→threonine (Ala→Thr)의 치환이 존재하였다. 이러한 결과로부터 CMV의 병징발현과 관련되어 지금까지 알려진 129번째 아미노산 이외에 또 다른 domain에 의한 병징의 변화를 시사하였다. 금후 이와 같은 CMV-Mf CP gene의 특성이 이 바이러스의 scFv항체발현 식물에서의 특징적인 marker로 활용될 수 있을 것으로 판단되었다.

Mf	ATGGACAAATCTGAATCAACCAGTGCTGGTCGTAACCGTCGACGT	45
Fny	-----	45
LS	-----G--TC--A---A--A-A-C-TCC--G---	45
Mf	CGTC CGCGTCGTGGTTCCCGCTCCGCTCCCTCCTCCGCGGAT	87
Fny	-----C-----	87
LS	----GCC-----A-A-----T-G----- --TGGT-----	87
Mf	CGTAACTTTAGAGTCTTGTCCGAGCAGCTTTCGCGACTTAATAAG	132
Fny	-----	132
LS	--AGGG--GC-T-CT--A-T-----A-GCT-AA--C---GA	132
Mf	ACGTTAGCAGCTGGTCGTCCAACTATTAACCACCCAACTTTGTA	177
Fny	-----	177
LS	--CC-C--CAT-----C--C-----C--G	177
Mf	GGGAGTGAACGCTGTAGACCTGGATACACGTTACATCTATTACC	222
Fny	-----G-----	222
LS	--T-----A-----A--C--T----T-----	222
Mf	CTAAAGCCACCAAAAATAGACCGGGTCTTATTACGGTAAAAGG	267
Fny	-----T-----	267
LS	--G--A--G--TG----T--GAAA--T--A---TT---G---	267
Mf	TTGTTACTACCTGATTTCAGTCACGGAATATGATAAGAAGCTTGT	312
Fny	-----	312
LS	----CTT-G--A-----C-----	312
Mf	TCGCGCATTCAAATTCGAGTTAATCCTTTGCCGAAATTTGATTCT	357
Fny	-----	357
LS	-----CA-GA-----	357
Mf	ACCGTGTGGGTGACAGTCCGTAAAGTTCCTGCCTCCTCGGACTTA	402
Fny	-----	402
LS	-----T----T--G----A--T-A--A--C--TC-T	402
Mf	TCGGTTACCGCCATCTCTGCTATGTTTGCGGACGGAGCCTCACCG	447
Fny	-----G-----C-----	447
LS	----C-----GC--T--TAA-----	447
Mf	GTA CTGGTTTATCAGTATGCCGCATCTGGAGTCCAAGCTAACAAC	492
Fny	-----C-----	492
LS	--TT-----T--G--C----T--G--C----T	492
Mf	AAATTGTTGTATGATCTTTCGGCGATGCGCGCTGATATAGGTGAC	537
Fny	---C-----	537
LS	--GT-AC-T----C--G--C-A-----T-----C--C---	537
Mf	ATGAGAAAGTACGCCGTCCGTGTATTCAAAGACGATGCGCTC	582
Fny	-----	582
LS	---GC-T-----G--T--C--G-----AAA--A	582
Mf	GAGACGGACGAGCTAGTACTTCATGTTGACATCGAGCACCAACGC	627
Fny	-----	627
LS	----A-----A-T-----C--G-----T-----A	627
Mf	ATTCTACGTCTGGGGTGCTCCAGTCTGA	657
Fny	----C--A-----A-----	657
LS	-----TC--AC--A-----GACT-AG	657

그림 17. CMV-Mf CP gene의 염기서열과 Fny 및 LS계통과의 비교

Mf	MDKSESTSAGR NRRRRPRRGRSRSAPSSADANFRVLSQQLSRLNK	44
Fny	-----	44
LS	----G-PN-S-TS----- -SG---*]-A---MLK--R	44
Mf	TLAAGRPTINHPTFVGSECRPGYTFTSITLKPPKIDRGSYYGKR	89
Fny	-----	89
LS	---I---L-----S-K-----E-τ]-F-R-	89
Mf	LLLPDSVTEYDKKLVSRIQIRVNPLPKFDSTVWVTVRKVPASSDL	134
Fny	-----	134
LS	-S-----D-----I-----S----	134
Mf	SVTAISAMFADGASPVLYQYAASGVQANNKLLYDLSAMRADIGD	218
Fny	--A-----	218
LS	-----G--N-----E-----	218
Mf	MRKYAVLVYSKDDALETDELVLHVDIEHQRIPTSGVLPV	218
Fny	-----	218
LS	-----K--K--I-----V-----I-RM--T	218

그림 18. CMV-Mf CP의 아미노산서열과 CMV-Fny (subgroup I) 및 CMV-LS (subgroup II)의 CP와의 비교.

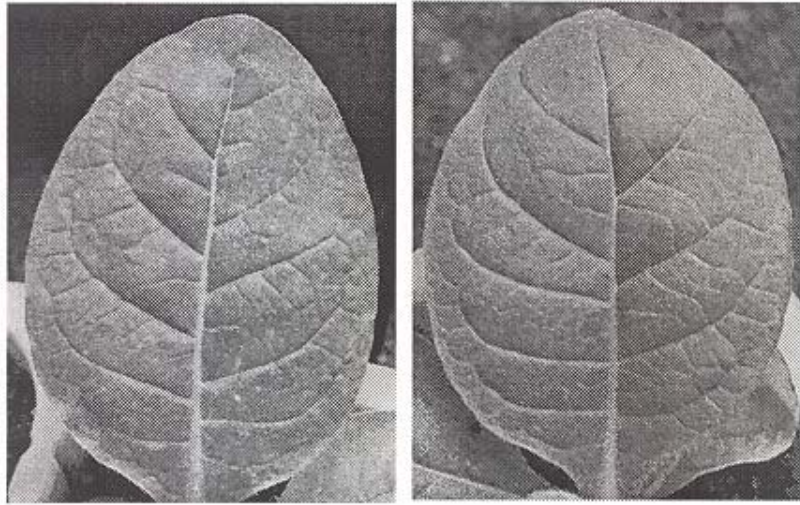


그림 19. CMV-Mf를 담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Burley 21)에 접종 후 상엽에 형성된 chlorosis 병징 (좌). 대조로 사용한 Fny계통 (우)은 모자이크를 발현하였다.

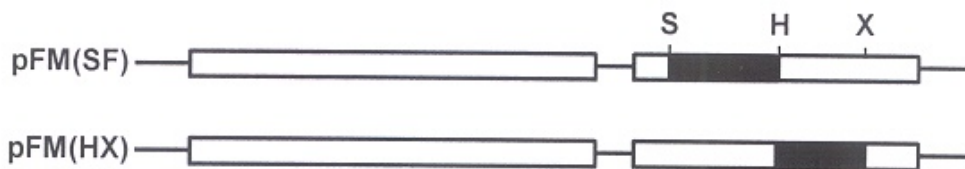


그림 20. CMV-Mf RNA3 (■)와 CMV-Fny RNA3 (□)의 cDNA를 이용하여 제작한 키메라 RNA3의 모식도. pFM(HX)의 키메라에서 CMV-Mf가 발현하는 병징이 재현되었다.

4) CMV-Mf의 항체제작을 위한 바이러스의 순화

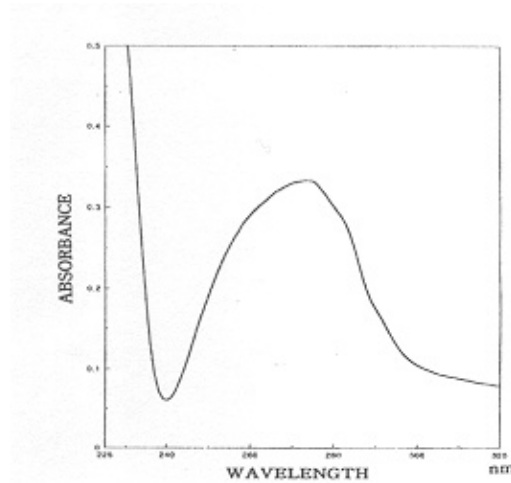


그림 21. 순화 CMV-Mf의 자외선 흡광도 패턴

CMV-Mf의 scFv항체를 제작하기 위한 바이러스 항원을 얻기 위하여 순화를 실시하였다. 공시 Mf계통을 *N. glutinosa* 또는 *N. tabacum* cv. Xanthi nc에 접종 후 10일째에 수확한 잎을 이용하여 Takanami (1981)의 방법으로 정제하였다. 정제한 바이러스의 전자현미경 관찰 및 흡광도 흡수 패턴은 contamination이 없는 바이러스의 정제가 이루어진 것을 나타냈다 (그림 21, 그림 22). 이 방법을 이용하여 이병된 담배 잎으로부터 정제한 바이러스의 수량은 17-22 mg/100g (extinction coefficient 5.0; Franki, 1966)이었다.

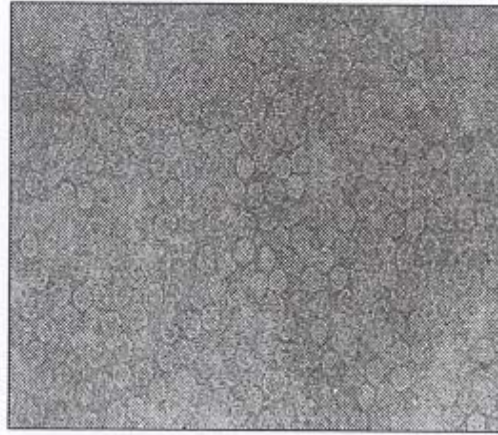


그림 22. 순화 CMV-Mf의 전자현미경 사진

다. CMV-Mf의 병원성 관련 유전자의 분석

장구채에서 분리한 Mf-CMV (Choi 등, 1998)는 담배 Burley21에 접종하였을 때, 접종상엽에 chlorosis (지금까지 보고된 Y-CMV나 M-CMV의 황화형 chlorosis보다는 연녹형 chlorosis)를 발현함으로써 다른 계통의 CMV들과 구별된다. 그러나 Burley21 이외에 다른 품종의 담배에 접종하였을 때에는 일반적인 모자이크를 발현하는 다른 CMV계통들과 크게 구별되지 않는다. 이 바이러스의 Burley21에서의 chlorosis 발현에 관여하는 유전자를 탐색하기 위하여 Fny-CMV와 pseudorecombination 및 cDNA를 이용한 chimeric clone을 구축하고 *in vitro* transcription에 의한 chlorosis 병징과 관련된 유전자를 탐색하였다. Mf-CMV와 Fny-CMV의 각 계놈 RNA를 상호 교환시킨 pseudorecombination 실험을 통하여 chlorosis는 Mf-CMV의 RNA3이 지배한다는 결과를 얻었다 (표 6). 즉 계놈 RNA들 중에서 Mf-CMV의 RNA3이 들어간 조합은 Burley21에 chlorosis가 발현되었다. 이 현상으로부터 Mf-CMV RNA3의 chlorosis에

관여하는 염기서열의 구체적인 domain을 확인하기 위하여 Fny-CMV RNA3의 cDNA (Rizzo와 Palukaitis, 1990)와 Mf-CMV RNA3에 대한 cDNA를 이용하여 키메라 RNA3을 제작하고 (그림 20), 이들 재조합 키메라 RNA3의 cDNA와 Fny-CMV RNA1 및 RNA2의 cDNA클론으로부터 T7 RNA 중합효소를 이용한 *in vitro* transcripts를 만들고 Burley21에 접종하였다. 그 결과 표 5에서와 같이 Mf-CMV의 RNA3 중에서 외피단백질 유전자의 대부분이 포함되었을 때 chlorosis가 발현되었다. Mf-CMV의 외피단백질유전자는 염기서열에서 13염기, 아미노산서열에서 2잔기가 Fny-CMV와 차이를 나타낸다 (그림 23). 그러나 지금까지 CMV의 chlorosis와 관련된 domain으로 보고된 외피단백질의 129번째 아미노산은 Pro→Leu (또는 Ser)의 변이가 존재하지 않고, Mf-CMV는 Fny와 마찬가지로 Pro를 포함하고 있었다. 따라서 Mf-CMV의 외피단백질 유전자를 좀더 세분시킨 재조합 키메라 cDNA를 구축하고 담배에 접종하였다. 그 결과 Mf-CMV RNA3의 HX fragment (*Hind*III - *Xho*I site)를 포함하는 키메라 RNA3이 포함된 조합에서 chlorosis가 발현되었고, 이 fragment에는 Fny-CMV와 Mf-CMV 사이에 137번째 아미노산 alanine→threonine (Ala→Thr)의 치환이 존재하였다. 이러한 결과로부터 CMV의 chlorosis 발현과 관련되어 지금까지 알려진 129번째 아미노산 이외에 또 다른 domain에 의한 chlorosis의 발현을 시사하였다. 이와 같은 결과는 외피단백질의 129번째와 같은 특정 아미노산의 변이 자체가 직접적으로 병징에 관련되기보다는, 아미노산의 치환에 따른 외피단백질의 구조적 변화가 더욱 중요할지도 모른다. 실제로 Suzuki 등 (1995)은 129번째 근처의 서열은 외피단백질의 고차구조에서 β -sheet의 안정성에 문제를 일으킬 가능성이 존재한다는 것을 보고하고 있다.

표 6. CMV-Mf의 병징관련 유전자를 분석하기 위한 CMV-Fny와의 pseudorecombination

Reconstituted RNAs	Symptoms on Burley 21
FFF	Green mosaic
MMM	Chlorosis
FMF	Green mosaic
FMM	Chlorosis
FFM	Chlorosis
MFM	Chlorosis
MFf	Green mosaic
MMF	Green mosaic

재조합RNA는 기호의 왼쪽부터 RNA1, 2 및 3을 뜻하고, 각 RNA중 Mf유래는 M으로, Fny유래는 F로 표기하였다. 예를 들면 FMF는 Fny-RNA1과 3 및 f-RNA2의 조합을 의미한다.

표 7. CMV-Mf 및 CMV-Fny RNA3의 cDNA를 이용한 CP유전자의 키메라 바이러스를 접종하였을 경우 발현된 병징의 변화

Reconstituted RNAs	Symptoms on Burley 21
F1F2F3 (parental)	Green mosaic
F1F2M3 (pseudorecombinant)	Chlorosis
F1F2F2-M(5N)	Green mosaic
F1F2F3-M(NS)	Green mosaic
F1F2F3-M(S3)	Chlorosis
F1F2F3-M(SH)	Green mosaic
F1F2F3-M(HX)	Chlorosis

각 키메라 transcript를 접종한 10일 후 Burley 21에서의 병징.

Recombination을 위한 restriction enzyme sites: 5' = 5' end, N=*Nhe* I, S=*Sal* I,

H = *Hind* III, X=*Xho* I, 3' = 3' end.

```

Fny ATGGACAAATCTGAATCAACCAGTQCTGGTCGTAACCGTCGACGT 45
Mf -----T-----
      CGTCCGCGTTCGTGGTTCCCGCTCCGCCCCCTCCTCCGCGGATGCT 90
      -----T-----
      AACTTTAGAGTCTTGTGCGCAGCAGCTTTCGCGACTTAATAAGACG 135
      -----
      TTAGCAGCTGGTTCGTCCAATAAACCACCCAACCTTTGTAGGG 180
      -----
      AGTGAACGCTGTAGACCTGGGTACACGTTACATCTATTACCCTA 225
      -----A-----
      AAGCCACCAAAAATAGACCGTGGGTCTTATTACGGTAAAAGGTTG 270
      -----C-----
      TACTACCTGATTCAGTCACGGAATATGATAAGAAAGCTTGTTTCG 315
      -----
      CGCATTCAAATTCGAGTTAATCCTTTGCCGAAATTTGATTCTACC 360
      -----
      GTGTGGGTGACAGTCCGTAAAGTTCCTGCCTCCTCGGACTTATCC 405
      -----
      Ala
      GTTGCCGCCATCTCTGCTATGTTTCGCGGACGGAGCCTCACCGGTA 450
      A-----T-----
      Thr
      CTGGTTTATCAGTATGCCGCATCTGGAGTCCAAGCCAACAACAAA 485
      -----T-----
      CTGTTGTATGATCTTTCGGCGATGCGCGCTGATATAGGTGACATG 540
      T-----
      AGAAAGTACGCCGTCCTCGTGTATTCAAAAGACGATGCGCTCGAG 585
      -----
      ACGGACGAGCTAGTACTTCATGTTGACATCGAGCACCAACGCATT 630
      -----T G-----
      Ile
      CCCACATCTGGAGTGCTCCCAGTCTGA 657
      -----G G-----
      Val
  
```

그림 23. CMV-Mf 및 CMV-Fny의 외피단백질 유전자의 nucleotide sequence alignment. CMV-Fny의 CP gene sequence는 dash line으로 표기하였다. Box는 chlorosis와 관련되는 것으로 추정된 *Hind* III-*Xho* I fragment를 뜻한다. CMV-Mf와 Fny의 아미노산 서열 중에서 차이가 있는 부분을 underline으로 표기하였다.

라. CMV-Mf의 혈청학적 특성 및 scFv항체와의 *in vitro*반응

CMV-Mf의 일반적인 혈청학적성질을 파악하고 scFv항체에 대한 반응기작을 검정하기 위하여 CP단백질에 대해서 제작한 polyclonal항체 및 제1세부과제에서 제작한 CMV-Mf의 monoclonal항체를 이용하여 각각의 반응한계 (역가)를 검정하였고, 이 결과로부터 공시한 CMV-Mf의 혈청학적 특성을 분석하였다. 이 연구항목의 결과는 금후 CMV scFv항체생산 식물체를 만들어 실용화할 때 바이러스에 대한 저항성 기작의 기초자료로 이용할 것을 목적으로 실시하였다.

한편 담배 엽육세포의 protoplast를 제작하고 여기에 scFv항체를 흡착하여 바이러스에 대한 중화반응을 *in vitro*에서 검정하였다. 또한 예비실험을 통하여 protoplast에 증식된 CMV의 농도와 감염성을 국부병반기주를 이용한 병반 산정법과 RT-PCR법으로 검정한 결과, scFv항체의 CMV에 대한 중화반응의 효과가 일정 농도 이상의 항체로부터 나타났기 때문에 금후 항체생산 식물체에서 scFv항체가 발현되었을 때의 효용성을 추정할 수 있었다.

1) 공시바이러스의 증식

CMV-Mf는 즙액접종법으로 담배 (*N. tabacum* cv. Xanthi nc)에서 증식하였고, 최초에 보고된 Mf-CMV의 특성이 유지되고 있는지의 여부를 몇몇 기주식물에서의 반응 통하여 점검하였다. 특히 satellite RNA가 오염되지 않도록 하기 위하여 증식된 바이러스 시료는 매회 dsRNA분석을 통하여 satellite RNA 존재여부를 조사하고 satellite RNA가 혼입된 경우의 시료는 폐기하였다.

2) 항CMV-Mf혈청의 제작 및 역가 검정

정제 CMV-Mf를 이용한 polyclonal항체의 제작과 Mf에 대한 반응 역가를 agar gel diffusion test로 검정하여 CMV-Mf계통의 항원성을 기존에 보고된 CMV계통들과 비교하였다. 즉 CMV-Mf에 대한 항혈청의 제조는 순화바이러스 (0.5 mg/ml)를 10일간격으로 토끼에 정맥주사 3회, 이어서 Freund adjuvant를 혼합한 항원을 2회 근육주사하고, 채혈하여 정제한 혈청을 CMV-Mf의 polyclonal 항체로 이용하였다. 이렇게

제작한 항혈청의 역가를 tube precipitin test를 통하여 검정한 결과, CMV-Mf 또는 대조 바이러스로 공시한 CMV-Fny나 CMV-LS에 대해서 희석배수 512 - 1024의 반응한계를 나타냈다. 이러한 역가는 유사한 방법으로 제작된 기보고 CMV계통들의 항혈청 역가와 차이를 보이지 않았다. 따라서 CMV-Mf는 기존에 알려진 CMV계통들과 유사한 항체형성능을 가지고 있는 것으로 판단되었다.

CMV-Mf의 항원 특성 (serotype)을 정확하게 조사하기 위하여 제작된 polyclonal항체를 이용한 agar gel diffusion test를 실시하였다. Mf의 항원은 순화바이러스를 이용하였으며, 이때 serotype을 검정하기 위한 대조 바이러스는 기보고된 subgroup I의 CMV-Ly2 및 subgroup II의 CMV-LS 항원 (순화바이러스)을 이용하였다. 그 결과 CMV-Mf의 Mf항혈청에 대한 반응은 subgroup I에 속하는 CMV-Fny와 융합하는 1종의 침강선 (precipitin band)을 형성하였으며 subgroup II에 속하는 CMV-LS의 항원과는 spur를 형성하였다 (그림 24). 이는 CMV-Mf가 CMV의 subgroup I에 속하는 혈청형으로 구분되었으며, 이러한 결과는 우리 나라에 분포하는 CMV의 대부분이 subgroup I에 속하기 때문에, CMV-Mf의 scFv 유전자가 도입된 형질변형 식물을 이용하기 적절한 혈청학적 성질을 가지고 있는 것으로 판단되었다.

한편 CMV-Mf에 대한 monoclonal항체를 제작하고 이를 이용하여 agar gel double diffusion test를 실시하였다. 제작된 여러 종류의 serotype을 나타내는 monoclonal항체 중에서 넓은 spectrum의 serotype을 선택하여 실험에 공시하였다. 이 항체의 단계별 희석액을 이용한 agar gel diffusion test결과는 순화 CMV-Mf에 대해서 128희석한계까지 반응을 나타냈다 (그림 25).

한편 효소결합항체법 (ELISA)을 이용하여 제작된 monoclonal항체 및 polyclonal항체의 반응성 비교실험을 CMV-Mf에 감염된 담배잎의 즙액을 이용하여 실시하였다. 그 결과 CMV-Mf에 대하여 제작한 monoclonal 항체가 polyclonal항체보다 균일한 반응을 나타냄으로서 (표 8), 높은 희석농도에서 사용이 가능하고, 비특이적 반응이 적은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 scFv항체를 이용한 CMV저항성 형질전환 식물의 효용성이 높을 것으로 추정되었다.

3) CMV-Mf scFv항체의 중화능력 검정

CMV-Mf scFv항체의 중화능력검정 : *In vitro*에서의 중화 능력을 검정하기 위하여

공시 형질전환 대상 식물 중 담배의 protoplast를 제작하고 scFv항체를 첨가한 경우와 그렇지 않은 경우의 CMV-Mf의 감염성 및 세포내 증식능을 조사하였다. 이때 감염성은 *Vigna unguiculata*의 초생엽을 이용한 국부병반 산정법으로 조사하였으며, 세포내 증식 바이러스의 농도는 RT-PCR에 의해서 검정하였다.

Protoplast는 담배 (품종 Xanthi nc)의 엽육세포로부터 Takebe and Otsuki (1969)의 방법을 기초로 제작하였다. 최종적으로 정제된 protoplast는 0.6 M manitol에 현탁하였으며, 제작된 protoplast의 일부는 현탁액과 scFv항체 (1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/216 단계 희석)의 혼합액을 제조하였다. 이들 scFv항체를 흡착시킨 protoplast와 항체를 흡착시키지 않은 현탁액에 각각 바이러스접종액 (순화 CMV-Mf, poly-L-ornitine, 0.5 M phosphate buffer 및 0.6 M manitol)을 혼합하고, 실온에서 10분간 정치하여 바이러스의 접종을 실시하였다. Protoplast에 감염된 바이러스의 세포내 증식능은 바이러스가 접종된 각 처리별 현탁액을 25℃에서 4시간 배양 후, 원심분리로 정제한 다음 마쇄하여, 감염성은 *Vigna unguiculata*의 초생엽을 이용한 국부병반 산정법으로 조사하였고, 세포내 증식된 바이러스의 농도는 RT-PCR (Choi 등, 1998)에 의해서 검정하였다. 동부의 초생엽에서 검정한 CMV-Mf의 국부병반 형성능은 항체를 처리한 protoplast에서 처리하지 않은 것이 비하여 병반수가 감소하였으며, 또한 항체의 희석농도에 따라 병반수의 감소가 비례하는 경향을 나타냈다 (표 9).

한편 CMV coat protein gene의 3'영역에 대응하는 primer (Choi 등, 1998)를 이용하여 RT-PCR로 scFv항체를 처리한 후 바이러스를 접종한 protoplast에서 검정한 결과 *Vigna unguiculata*에서 검정한 국부병반 형성능과 유사한 결과를 나타냈으며, 1/16 농도의 scFv항체를 처리한 protoplast까지 PCR product가 검출되었다 (표 9 및 그림 26).

표 8. CMV-Mf의 monoclonal항체와 polyclonal항체의 반응성 비교

시 료	polyclonal항체		monoclonal항체	
	25분 후	12시간 후	25분 후	12시간 후
CMV-Mf감염엽	1.48	>2.0	1.58	>2.0
CMV-LS감염엽	1.23	1.80	1.34	>2.0
건전엽	0.18	0.98	0.16	0.23

- 1) DAS-ELISA법으로 검정
- 2) polyclonal CMV-Mf항체, 효소결합항체 1/1,000희석
- 3) monoclonal항체, 효소결합항체 1/10,000희석

표 9. 담배 protoplast를 이용한 scFv항체의 CMV-Mf에 대한 중화능력

처리별	국부병반수	RT-PCR
scFv항체 (1/8)처리 protoplast	7.6	-
scFv항체 (1/16)처리 protoplast	18.9	+
scFv항체 (1/32)처리 protoplast	51.0	+
scFv항체 (1/64)처리 protoplast	78.6	+
scFv항체 (1/128)처리 protoplast	132.4	+
scFv항체 (1/216)처리 protoplast	128.7	+
무처리 protoplast	134.0	+

- 1) 접종 바이러스의 농도 : 0.05 mg/ml
- 2) 국부병반의 산출 : 각 처리별 *Vigna unguiculata*의 초생엽 4매에 형성된 병반의 평균수
- 3) RT-PCR은 CMV CP gene의 3'영역에 대한 primer를 이용하여 Choi 등 (1998)의 방법으로 PCR을 수행하였다

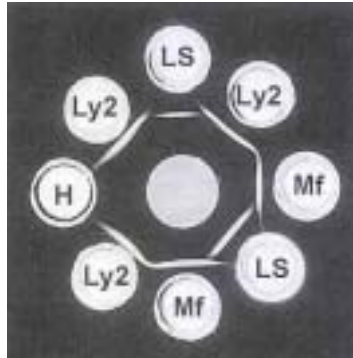


그림 24. CMV-Mf의 polyclonal항체에 대한 CMV-Mf의 agar gel diffusion반응. CMV의 subgroup I 및 subgroup II의 대조항원으로 CMV-Ly2 및 CMV-LS의 항원을 이용하였다. Mf의 항혈청에 대하여 CMV-Mf는 Ly2와 융합하고, LS와 spur를 형성하는 침강선을 형성하였다.

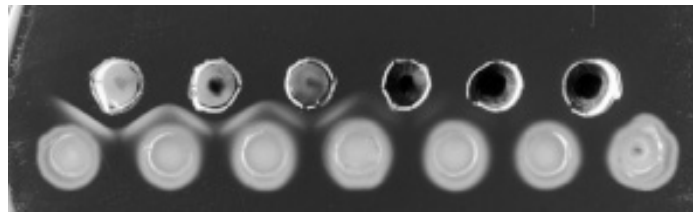


그림 25. CMV-Mf의 monoclonal항체에 대한 CMV-Mf항원 (순화 바이러스)의 단계별 희석항원의 agar gel diffusion반응. 항체의 희석 배수는 왼쪽부터 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/216 및 1/512로 1/128희석에서 반응의 한계를 나타냈다.

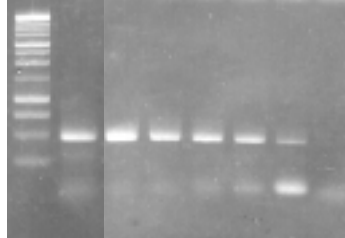


그림 26. scFv항체를 흡착시킨 담배 protoplast에 CMV-Mf를 접종한 후 RT-PCR로 검정한 중화반응의 한계. 왼쪽 lane부터 무처리, scFv항체 1/216, 1/128, 1/64, 1/32, 1/16 및 1/8희석 처리 protoplast.

마. CMV-Mf CP단백질의 scFv항체발현 형질전환체에서의 CMV-Mf의 반응

1) 형질전환식물의 protoplast를 이용한 CMV의 감염성조사

CMV-Mf의 CP단백질에 대한 scFv항체 유전자를 도입한 담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc 및 *N. tabacum* cv. Samsun)로부터 자식종자를 채종하였다. 채종한 R1세대의 종자를 파종하고, 50일 정도 성장한 각 형질전환 담배 및 비형질전환 담배의 잎을 이용하여 protoplast를 제작하였다. 각 식물체의 protoplast제작은 잎의 엽육세포로부터 Takebe and Otsuki (1969)의 방법을 기초로 제작하였다. 최종적으로 정제된 protoplast는 0.6 M manitol에 현탁하였으며, 이렇게 제작된 protoplast현탁액에 각각 바이러스접종액 (순화 CMV-Mf, poly-L-ornitine, 0.5 M phosphate buffer 및 0.6 M manitol)을 $1 \text{ ug} / 10^6$ protoplast의 비율로 혼합하고, 실온에서 10분간 정치하여 바이러스의 접종을 실시하였다. Protoplast에 감염된 바이러스의 세포내 증식능

은 바이러스가 접종된 각 처리별 현탁액을 25℃에서 48시간 동안 배양하면서 12시간 간격으로, 원심분리로 정제한 다음 마쇄하여, 감염성은 *Vigna unguiculata*의 초생엽을 이용한 국부병반 산정법으로 조사하였고, 세포내 증식된 바이러스의 농도는 RT-PCR (Choi 등, 1998)에 의해서 검정하였다.

그 결과 scFv항체를 발현하는 담배 (Xanthi nc 또는 Samsun)로부터 제작한 protoplast에 CMV-Mf를 접종하여 48시간 동안 조사한 바이러스의 감염율은 2.3 - 5.3%로 낮게 나타났다 (그림 27). 이러한 경향은 형질전환 담배의 품종에 관계없이 유사한 결과를 보였다. 그러나 같은 방법으로 제작하여 CMV-Mf를 접종한 비형질전환체 protoplast에서의 감염성과 비교하였을 때 형질전환체 protoplast의 바이러스에 대한 중화능력은 큰 차이가 인정되지 않았다.

2) scFv항체를 발현하는 형질전환식물체의 CMV의 감염에 대한 반응

scFv항체를 발현하는 형질전환체 담배에서의 CMV-Mf의 감염성을 조사하기 위하여 형질전환 담배 Xanthi nc로부터 1 line 및 Samsun으로부터 2 line (Xn 42, Ss 1106 및 Ss 6)의 식물체를 선발하여 각 형질전환체의 CMV-Mf의 감염에 대한 저항성 정도를 검정하였다. 즉 각 선발한 형질전환체 및 비형질전환 담배 (Samsun)의 유묘에 CMV-Mf를 접종하여 경시적으로 바이러스의 감염성, 증식 및 병징의 발현 등을 RT-PCR, northern blot 및 western blot으로 조사하였다.

그 결과 공시한 3종의 scFv항체 발현 형질전환 담배는 비형질전환 담배에 비해서 접종 후 10일 정도까지는 모두 CMV-Mf의 접종에 대해서 병징의 발현이 나타나지 않았다. 그러나 접종 15일 후부터는 모든 개체의 식물체에서 모자이크 증상이 발현되었고, 비형질전환체에서 나타난 정도의 심한 병징은 발현되지 않았으나 모든 개체가 공통적으로 뚜렷한 병징이 나타났다 (그림 28). 이들 식물체로부터 바이러스의 CP를 추출하여 western blot으로 검정한 결과 접종 후 시간의 경과와 함께 단백질의 축적이 증가되는 결과를 보였다 (그림 29).

3) CMV RNA 3의 변이바이러스에 대한 형질전환체의 반응 조사

CMV-Mf의 병징을 지배하는 유전자 RNA 3에 대한 변이주를 제작하여, 이 바이

러스를 접종하였을 경우에 scFv항체생산 형질전환식물의 증화능력에 대한 변화를 조사함으로써 CMV의 병원성 변이주에 대한 형질전환체의 반응을 검토하였다. 즉 병징을 지배하는 CMV-Mf의 외피단백질 유전자의 HX fragment (*Hind*III - *Xho*I site)를 CMV-Fny로 치환시킨 키메라 RNA3을 제작하여 (그림 20 참조), *in vitro* transcription시키고 CMV-Mf RNA 1과 RNA 2로부터 전사시킨 RNA와 혼합한 병원성 변이 바이러스를 제작하였다. 이와 같은 변이 CMV는 담배에서 CMV-Mf가 발현하는 chlorosis형 모자이크 병징이 green모자이크의 병징이 발현되었다. 이 클론의 자손 바이러스를 scFv항체 발현 형질전환 담배에 접종한 결과, CMV-Mf를 접종하였을 경우보다 2일 정도 늦게 병징이 발현되는 결과를 보였다. 이러한 결과는 병원성의 변이에 따라 형질전환체의 감수성 반응 또는 저항성 반응이 변할 수 있다는 것을 시사하였다.

4) 다른 계통의 CMV 또는 다른 종의 바이러스에 대한 저항성 검정

CMV-Mf 이외에 다른 계통의 CMV 또는 다른 종의 바이러스를 접종하였을 경우에 scFv항체생산 형질전환식물의 증화능력에 대한 변화를 조사함으로써 다른 바이러스 또는 계통에 대한 형질전환체의 저항성을 조사하여 실용성 검정하였다. 그 결과 다른 계통의 CMV를 접종한 경우에는 CMV-Mf를 접종한 결과와 유사하게 10일-12일 정도의 병징발현 지연효과를 나타냈으나, TMV 또는 PVY를 접종한 경우에는 비형질전환체와 마찬가지로 접종 후 병징발현 시간이 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 CMV CP의 scFv항체 발현 형질전환체는 CMV 이외의 바이러스에 대해서는 저항성을 발현하지 않는 것으로 판단되었다.

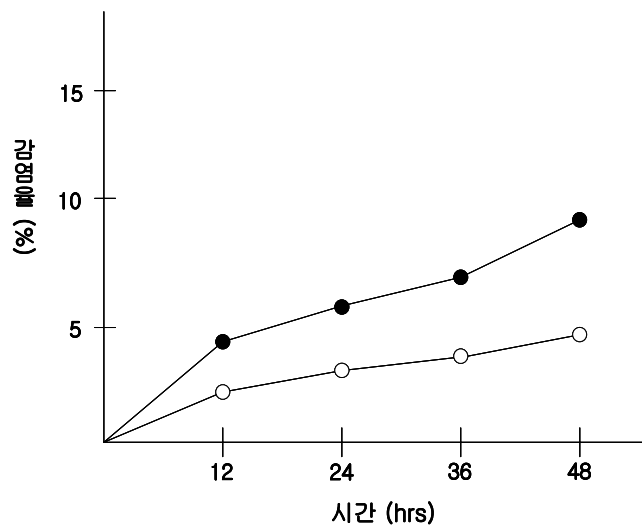


그림 27. CMV-Mf CP의 scFv항체 유전자를 도입시킨 형질전환 *Nicotiana tabacum* cv. Samsun (○-○) 및 비형질전환 Samsun (•-•)의 protoplast에 CMV를 접종하고 경시적으로 관찰한 CMV의 감염율.

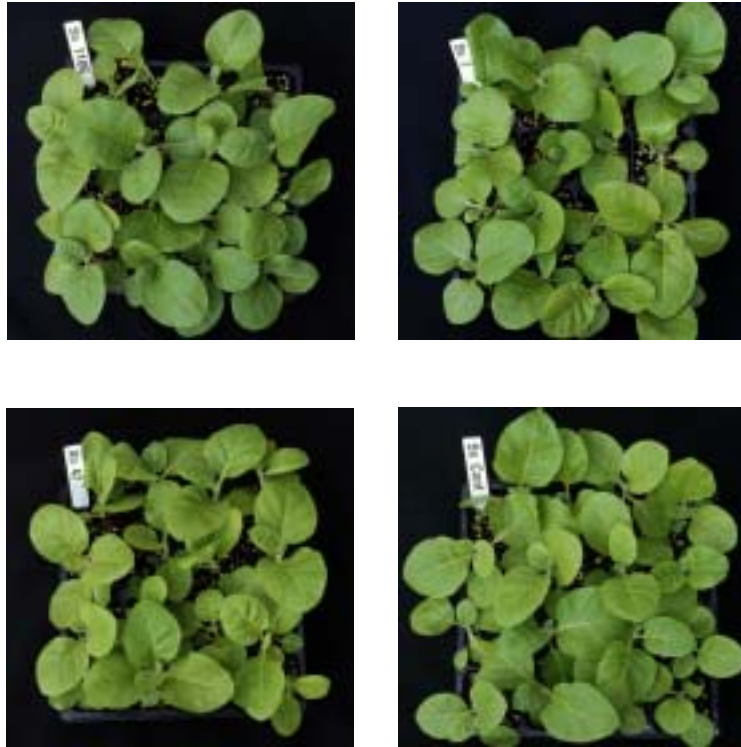


그림 28. CMV-Mf CP의 scFv항체 유전자를 도입시킨 형질전환 *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, Xanthi nc 및 비형질전환 Samsun의 R1세대 유묘에 CMV-Mf를 접종하고 15일 후 관찰한 병징. 위의 좌로부터 형질전환 line Ss1106, Ss 6, Xn 42 및 비형질전환 Samsun.

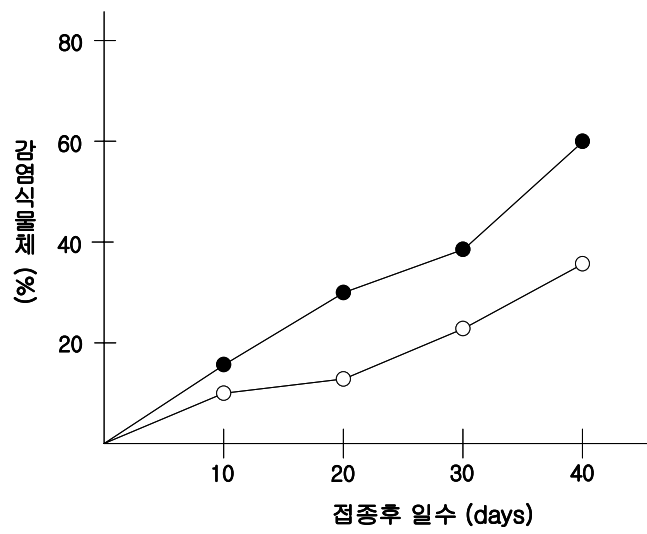


그림 29. CMV-Mf CP의 scFv항체 유전자를 도입시킨 형질전환 *Nicotiana tabacum* cv. Samsun (○-○) 및 비형질전환 Samsun (●-●)의 식물체에 CMV를 접종하고 경시적으로 관찰한 CMV의 감염율.

3. 제3 세부과제 : scFv 항체 발현 CMV 저항성 식물체 개발

가. 담배

1) 담배의 재분화 시스템 개발

가) 담배의 재분화 조건 설정을 위한 호르몬 조합 실험

BA와 NAA의 16 조합으로 재분화 실험을 진행하였으며 selection 배지에 치상한 4주 후에 재분화 된 절편체 수와 갈변정도를 관찰하여 기록하였다.

표 10. 담배의 재분화 실험

호르몬 조합		재분화 된 절편체 수 () 안은 치상한 절편체 수				비고
BAP (ppm)	NAA (ppm)	잎의 기저부(10)	잎의 중간부분(10)	엽병(20)	절간(10)	
0.5	0	7	10	20(갈변)	9	
1	0	8	10	20(갈변)	10	
1.5	0	10	10	20(갈변)	10(갈변)	
2	0	10	9	20(갈변)	7(갈변)	
2.5	0	9	10	16(갈변)	5(갈변)	
3	0	6	9	19(갈변)	10	
0.5	0.2	10	10	20	10	100%
0.5	0.5	9	10	20	10	
1	0.2	9	10	18	9	
1	0.5	10	10	18	9	
1.5	0.2	10	10	20	10	100%
1.5	0.5	10	10	20	9	
2	0.2	10	9	18	10	
2	0.5	10	9	20	9	
2.5	0.2	9	10	19	10	
2.5	0.5	9	9	20(갈변)	8	

나) 담배의 재분화를 위한 호르몬 조건 규명 실험의 분석

대부분의 조합에서 50% 이상의 높은 재분화율을 보였다. BAP만을 단독으로 처리한 경우 호르몬 농도가 높아질수록 절편체가 갈변하고 재분화되는 식물체가 건강하지 못한 양상을 보였으며 BAP와 NAA를 함께 처리한 경우에도 농도가 높아질수록 재분화 개체들이 건강하지 못하였다.

이상과 같은 실험을 통하여 BAP 0.5, NAA 0.2 조합과 BAP 1.5, NAA 0.2 조합이 *Nicotiana tabacum* cv. Samsun의 재분화에 가장 적절한 것으로 확인되었다.

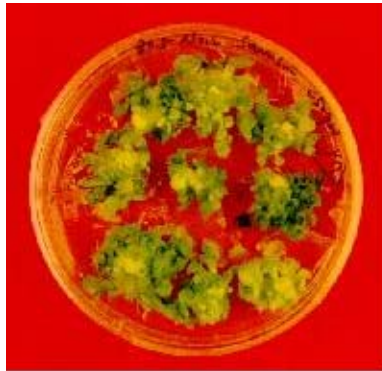


Fig. 30. Regeneration of *Nicotiana tabacum* cv. Samsun
BAP 0.5 ppm, NAA 0.2 ppm



Fig. 31. Regeneration of *Nicotiana tabacum* cv. Samsun.
BAP 1.5 ppm, NAA 0.2 ppm.

2) 담배(*Nicotiana tabacum*. cv. Xanti nc)의 형질전환 체계 확립 및 결과

가) 실험방법 및 조건

(1) 효율적인 형질전환 과정

식물체의 절편을 액체배지(3% MS)에 넣어 배양실에서 overnight incubation 한다.

→ 액체배지에 넣어 overnight incubation 한 후 원하는 유전자가 들어 있는 agrobacterium과 10분간 동안 공동배양하고 blotting 하여 치상한다.

→ 액체배지를 뺀 후 여과지에서 10분간 blotting 한다.

→ coculture medium에 치상 하여 암 상태에 2일간 둔다.

→ 2일 후 selection medium에 옮기고, 3주에 한번씩 계대배양 한다.

(2) 배지 조건 (mg/l)

coculture medium ; BAP 0.5 mg/l

NAA 0.2 mg/l

cefotaxime 250 mg/l

selection medium : BAP 0.5 mg/l
NAA 0.2 mg/l
cefotaxime 250 mg/l
kanamycin 100 mg/l

(3) 유전자 : CMVscFv

Agrobacterium strain - AGL1

나) 형질전환 결과

(1) 형질전환 과정

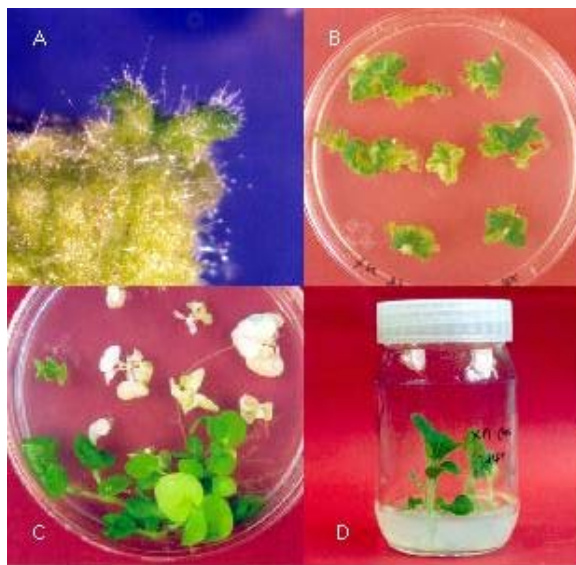


그림 32. 담배의 형질전환 과정

- A. Callus에서 shooting되고 있는 상태
- B. 호르몬 배지에서의 shooting
- C. 형질전환체로 추정되는 shoot의 항생제 배지에서 selection
- D. 1차로 항생제 plate에서 selection된 개체를 항생제 배지가 들어있는 배양병에서 2차 selection

(2) 순화 과정

항생제 배지에서 1차로 selection 되어 형질전환체로 추정되는 개체들을 온실로 옮겨 순화하였다. 초기에는 빛과 바람을 차단하기 위하여 신문지를 씌워 순화하였고(그림 . A) 일정시간이 지나 외부 환경에 적응이 되면 신문지를 벗기고 순화시킨다. 순화된 개체들은 온실 환경에 잘 적응하여 건강한 상태로 순화되었다(그림 . B).



A

B

그림 33. Putative transgenic tobacco 개체의 순화

- A. 기내에서 항생제 selection 된 개체들을 온실에서 pot에 옮겨 신문지를 씌워서 순화하는 모습
- B. 순화된 putative transformant

(3) 유전자 도입확인을 위한 PCR 결과

순화된 16 개체에서 DNA를 추출하여 NPTII primer로 PCR 해 본 결과 그림과 같은 결과를 얻었다. Positive control 에서는 확인한 band를 얻었으며 control plant는 band가 나타나지 않았다. 그리고 16개의 개체에서는 흐릿하지만(10, 16번) 모두 band를 확인할 수 있었다. 따라서 순화되고 있는 개체들은 모두 CMV scFv 유전자가 삽

입된 형질전환체로 추정된다. 그러나 더 정확한 결과를 얻기 위해서는 차후 Northern
과 Southern blotting을 실시하여야 할 것으로 본다.



그림 34. Putative transformant의 PCR 결과

M : 100 bp Size marker

+ : positive control

C : control plant

1 - 16 : putative transgenic plant

(4) 유전자 도입확인을 위한 Southern Blotting 결과

PCR 결과를 토대로 유전자의 도입을 확인하기 위하여 Southern Blotting을 실시하였다. 그 결과 실험을 실시한 10개의 개체에서 모두 band를 확인할 수 있었다. 이것은 담배 식물체의 genome 속으로 원하는 유전자가 확실히 삽입되었다는 것을 말해주는 것이다. 그러나 이 유전자가 전사되는지의 여부는 차후에 Northern Blotting을 통해 확인하여야 할 것으로 본다.



그림 35. Putative transformant의 Southern Blotting 결과

C : Negative control

1 - 10 : Putative transgenic tobacco plant

(5) Northern Blotting 결과

유전자의 발현 확인을 위한 Northern Blotting 결과 Band를 확인할 수 없었다. 이것은 유전자가 도입은 되었으나 그 이후의 단계가 진행되지 않는다는 것을 말해주는 것이며 이 유전자의 발현을 위해서는 벡터 및 유전자의 construction에 대한 차후의 연구가 더 필요하다고 하겠다.

나. 토마토(대과종과 소과종)

1) 토마토의 재분화 및 형질전환 체계 확립을 위한 실험방법 및 조건

가) 효율적인 재분화 과정

식물체 절편을 액체배지(3% MS)에 넣어 배양실에서 overnight incubation 한다.

→ 액체배지를 뺀 후 여과지에서 10분간 blotting 한다.

→ tomato coculture medium에 치상하여 2일간 둔다.

→ 2일 후 tomato selection medium에 옮기고, 3주에 한번씩 계대배양 한다.

나) 재분화배지 조건

(1) coculture medium ; zeatin 2 mg/l

IAA 0.5 mg/l

AgNO₃ 1 mg/l

cefotaxime 250 mg/l

(2) selection medium : zeatin 2 mg/l

IAA 0.5 mg/l

AgNO₃ 1 mg/l

cefotaxime 250 mg/l,

kanamycine 50 mg/l

다) 형질전환 조건

액체배지에 넣어 overnight incubation 한 후 원하는 유전자가 들어 있는 agrobacterium과 3시간 동안 공동배양하고 blotting 하여 치상한다.

라) 유전자

당도 유전자인 L3 유전자를 사용하였다.

2) L3 유전자를 이용한 토마토 형질전환 체계 확립 실험결과

가) 대과종 토마토의 형질전환 체계 확립 실험 과정 및 결과



Fig. 36. Regeneration of Tb(대과종) plant.

- A. Differentiation of shoots
- B. Calli and shoot around the plantlet
- C. Root induction from the regenerated shoot
- D. Putative transgenic plant in a pot

나) 소과종 토마토의 형질전환 체계 확립 실험 과정 및 결과



Fig. 37. Regeneration of Tm(소과종) plant

A. Differentiation of shoot

B. Putative transgenic plant in a pot

다) 형질전환 식물체 확인을 위한 PCR 결과

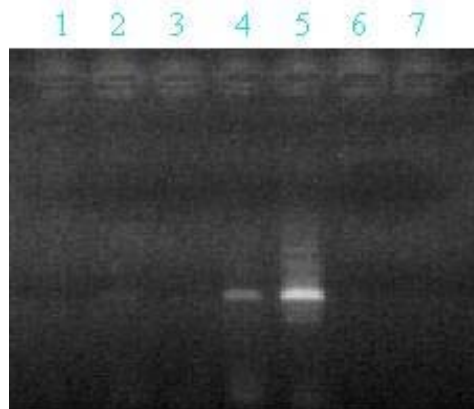


Fig. 38. PCR analysis of putatively transgenic tomato.

Lane 1-6, L3 gene introduced into inbred line Tb(대과종).

Lane 7, L0 gene introduced into inbred line Tm(소과종).

재분화 되어 포장에서 성장한 식물체의 잎으로부터 DNA를 추출하여 NPT II primer를 사용하여 PCR로 도입된 유전자를 확인하였다. 그 결과 대과종 토마토의 2, 4, 5번에 L3 유전자가 도입되었음을 확인할 수 있었다.

3) CMV scFv 유전자를 이용한 토마토(대과종)의 형질전환 결과

가) 실험방법 및 조건

(1) 효율적인 형질전환 과정

식물체의 절편을 액체배지(3% MS)에 넣어 배양실에서 overnight incubation 한다.

- 액체배지에 넣어 overnight incubation 한 후 원하는 유전자가 들어 있는 agrobacterium과 3시간 동안 공동배양하고 blotting 하여 치상한다.
- 액체배지를 뺀 후 여과지에서 10분간 blotting 한다.
- tomato coculture medium에 치상하여 2일간 둔다.
- 2일 후 tomato selection medium에 옮기고, 3주에 한번씩 계대배양 한다.

(2) 배지 조건

(가) coculture medium ; zeatin 2 mg/l

IAA 0.5 mg/l

AgNO₃ 1mg/l

cefotaxime 250 mg/l,

(나) selection medium : zeatin 2 mg/l

IAA 0.5 mg/l

AgNO₃ 1mg/l

cefotaxime 250 mg/l,

kanamycine 50 mg/l

(다) 유전자 : CMVscFv

Agrobacterium strain - AGL1

나) CMV scFv 유전자를 이용한 토마토의 형질전환 결과

(1) 형질전환 및 순화 과정



그림 39. 대과종 토마토의 형질전환 과정

A. 절편체 에서의 callus 형성 B. callus에서의 shooting
C. 항생제 배지에서의 selection D. 온실에서의 순화

(2) 유전자 도입확인을 위한 PCR 결과

순화된 8 개체에서 DNA를 추출하여 NPTII primer로 PCR 해 본 결과 그림과 같은 결과를 얻었다. Positive control 에서는 확연한 band를 얻었으며 control plant는

band가 나타나지 않았다. 그리고 8개의 개체 중 4, 5번과 7, 8번에서 band를 확인할 수 있었다. 따라서 순화되고 있는 개체들 중 이 네 개의 식물체는 CMV scFv 유전자가 삽입된 형질전환체로 추정된다. 그러나 역시 더 정확한 결과를 얻기 위해서는 담배의 경우와 마찬가지로 차후 Northern과 Southern blotting을 실시하여야 할 것이라고 생각된다.



그림 40. Putative transformant의 유전자 도입 확인을 위한 PCR

- M : 100 bp size marker
- + : positive control
- C : control plant
- 1 - 8 : putative transformant

(3) 유전자 도입 확인을 위한 Southern Blotting 결과

PCR 결과를 토대로 유전자의 도입을 확인하기 위하여 Southern Blotting을 실시하였다. 그 결과 PCR에서 밴드를 확인한 4개의 개체에서 모두 band를 확인할 수 있었다. 이것은 토마토 식물체의 genome 속으로 원하는 유전자가 확실히 삽입되었다는 것을 말해주는 것이다. 그러나 이 유전자가 전사되는지의 여부는 차후에 Northern Blotting을 통해 확인하여야 할 것으로 본다.



그림 41. Putative transformant의 Southern Blotting 결과

C : Negative control

1 - 4 : Putative transgenic tobacco plant

(3) Northern Blotting 결과

유전자의 발현 확인을 위한 Northern Blotting 결과 Band를 확인할 수 없었다. 이것은 유전자가 도입은 되었으나 그 이후의 단계가 진행되지 않는다는 것을 말해주는 것이며 이 유전자의 발현을 위해서는 벡터 및 유전자의 construction에 대한 차후의 연구가 더 필요하다고 하겠다.

다. 박과 작물(오이, 수박)

1) 박과 작물의 재분화 및 형질전환 조건 확립을 위한 실험 조건

가) 공시재료 :

수박 - 왕장수박

금천수박(농우바이오)

빛나수박(동부한농)

래비트수박(홍농종묘)

오이 - 장백다다기(농우바이오)

은화백, 동백다다기(동부한농)

나) 파종 : 종피제거 후 70% EtOH, 락스(1%),와 멸균수로 수세하여 MS, 1/2%에
치상, 배양실.

다) 식물 배양 : 수박 · 오이 모두 실험 전 1일 동안 암실에 넣은 후 사용

수박: 암실 - 3일, 광상태 - 3~4일 배양

오이: 암실 - 2일, 광상태 - 3일배양

라) 식물 재료 : 자엽, 하배축, 본엽, 엽병의 절편체 사용

마) 유전자 : CMVscFv (오이모자이크바이러스 단사슬가변항체)

Agrobacterium strain - AGL1

2) 박과 작물의 재분화 및 형질전환 실험방법

가) 전 배 양 : 절편체를 BAP 5 mg/l가 첨가된 MS 3%(pH5.6) 액체배지, 배양
실에서 2일

나) 공동배양 : 전배양 한 것에 *Agrobacterium*을 넣고, acetosyringon 20 mg/l
를 첨가한 뒤, 28℃ 암 상태에서 3시간 반응

다) 건 조 : 멸균된 filterpaper에다 5시간 동안 자연 건조

라) 재 분 화 : 선별배지에 치상하여 배양실에서 키움

- 배지 조건 : MS, 3% (pH 5.6~5.8, Agar 0.8~1.0%)

- 호르몬 조합 :

수박 - BAP 5 mg/l
 IAA 0.5 / 1/ 2 mg/l

오이 - BAP 5 mg/l
 NAA 0.5/ 1/ 2 mg/l
 2,4D 0.5/ 1 mg/l
 IAA 0.5/ 1/ 2 mg/l

- 항생제 농도(mg/l) : cefotaxim 300 mg/l
 kanamycin 100 mg/l

Table 11. 수박 자엽을 이용한 재분화 과정 (치상 4주 후)

Plant growth regulators	Seeds	Wang-Jang	Gum-Cheon	Rabbit	Bitna
		Cotyledon	Cotyledon	Cotyledon	Cotyledon
BAP 5		38/50	-	-	21/50
NAA/BAP	1/5	12/49	5/50	-	-
	2/5	5/50	*	10/50	-
	5/5	-	*	5/42	-
IAA/BAP	0.5/5	10/50	*	*	-
	1/5	45/48	30/45	40/50	-
	2/5	12/37	*	*	-
	3/5	2/20	-	-	-
2,4D/BAP	0.5/5	-	-	-	-
	1/5	-	*	-	-
	2/5	-	-	20/50	-
	3/5	-	-	-	-

- * 오염되었음
- 자엽의 수는 50개임



Fig. 42. 수박 자엽으로부터의 식물체 재분화 5mg/L BAP, 1mg/L IAA
 (1, 3 : Rabbit 4 : 왕장)

3) 박과 작물의 형질전환 실험 결과

가) 수박 형질전환 실험 결과

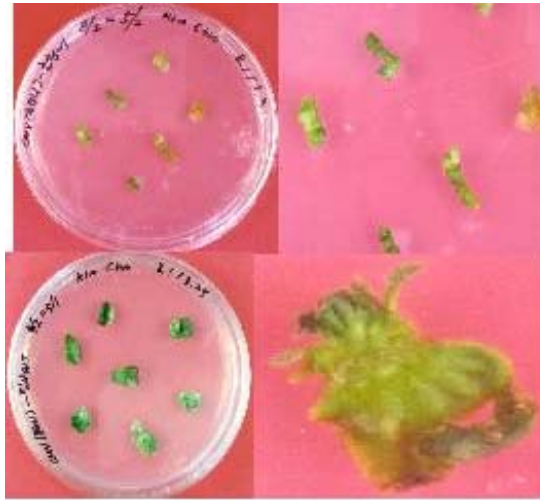


그림 43. 금천수박의 하배축 과 빛나수박의 자엽에서 형질전환 후 재분화 되는 과정

형질전환 후 항생제 selection 배지, 자엽과 하배축에서 shooting이 되고 있음.

- 공시재료 : 금천 수박(농우바이오)

빛나 수박(동부한농)

- 호르몬 조합 : BAP 5(mg/l)와 IAA 0.5~2(mg/l)의 조합에서 재분화 되고 있음.

나) 오이의 형질전환 실험 결과

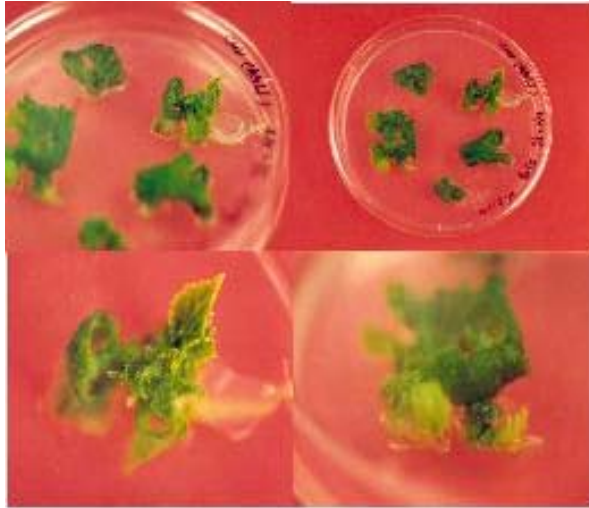


그림 44. 장백다다기 본엽의 형질전환 실험 후 재분화 되는과정

형질전환 후 항생제 selection 배지, 본엽에서 shooting 되고 있음.

- 종 자 : 장백다다기(농우바이오)
- 호르몬 조합 : BAP 5(mg/l)와 NAA 0.5~2(mg/l)의 조합에서 재분화 되고 있음.

다) 수박과 오이 형질전환체의 PCR 결과

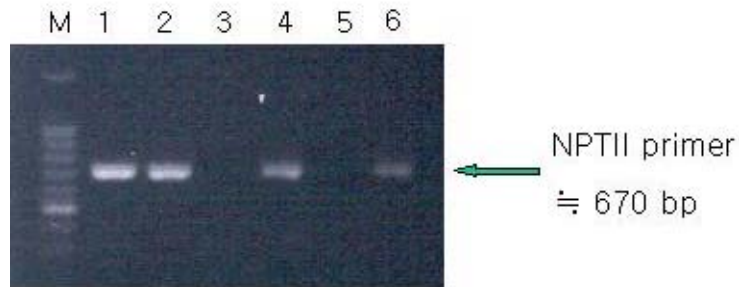


그림 45. 수박과 오이의 PCR 결과

M : 100 bp size marker

1 - 3 : 수박

4 - 6 : 오이

shooting 된 수박과 오이 각각 3 개체에서 DNA를 추출하여 NPTII primer로 PCR 해 본 결과 그림 21과 같은 결과를 얻었다. 각각 두 개의 개체에서 밴드를 확인할 수 있었다. 따라서 이 네 개의 식물체는 CMV scFv 유전자가 삽입된 형질전환체로 추정된다. 그러나 더 확실한 결과를 얻기 위해서는 차후 Northern과 Southern blotting을 실시하여야 할 것이라고 생각된다.

라) 수박 형질전환체의 *CMVscFv* 프라이머를 사용한 PCR 분석

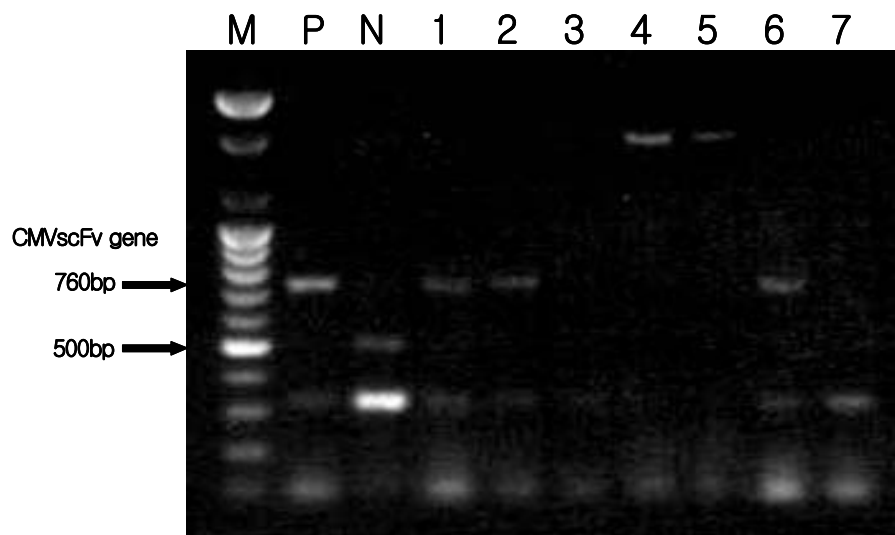


Fig. 46. *CMVscFv* 프라이머를 사용한 수박 형질전환체의 PCR 분석

M : 100bp ladder(Bioneer)

lane 1~2 : 왕장

lane 3 : 빛나

lane 4~7 : Rabbit

마) CMVscFv probe를 사용한 수박의 Genomic Southern Hybridization

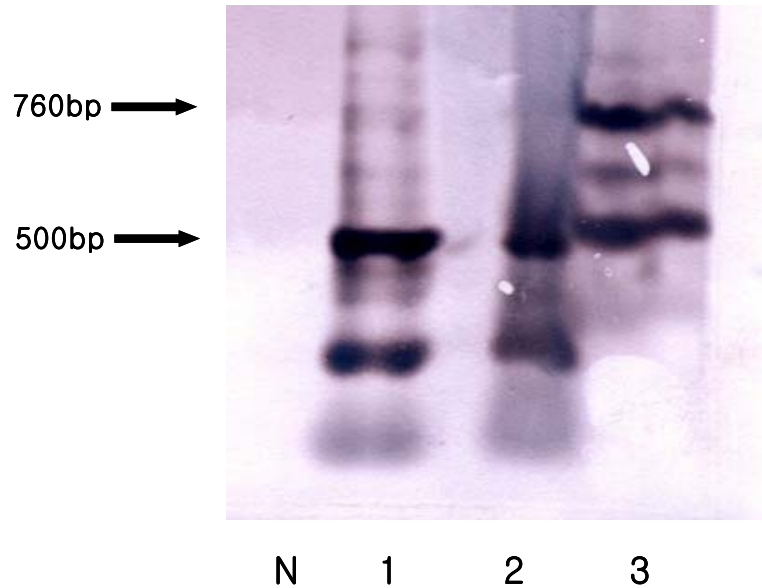


Fig. 47. CMVscFv probe를 사용한 Genomic Southern Hybridization

N : Negative

1 : Rabbit

2 ~ 3 : 왕장

라. 각 작물의 원형질체 분리 조건 확립

1) 실험재료

원형질체 분리를 위해 사용한 담배는 *N. tabacum* cv. Xanthi nc 와 *N. tabacum* cv. Samsun 이고, 오이는 (주)동부한농에서 분양 받은 해동백다다기 오이와 (주)농우

바이오에서 분양 받은 장백다다기 오이를 재료로 사용하였다. 또한 토마토는 대과종을 재료로 하여 원형질체를 분리하였다.

2) 원형질체 분리 과정

원형질체 분리를 위하여 먼저 각각의 실험재료를 기내배양 하여 본엽을 이용하였다.

각각의 실험 재료를 preplasmolysis 용액인 TVL용액에서 잘게 자른 후 상온의 암 상태에서 1시간 배양하였다. 1시간 후 TVL 용액을 버리고 enzyme 용액을 넣고 25℃~28℃의 조건에서 30 rpm으로 교반 하면서 16~20 시간 enzyme을 처리하였다. enzyme은 각각의 식물체별로 8가지 조건으로 하여 실험하였다. 담배, 오이, 토마토의 원형질체 분리를 위한 enzyme 조건은 다음과 같다(표.1)

표 12. 원형질체 분리 조건 규명을 위한 enzyme 조건

제품명 품종명	ONOZUKA R-10		CALBIOCHEM	
	Cellulysin(%)	Macerozyme(%)	Cellulysin(%)	Macerozyme(%)
담배 (0.6M Mannitol)	1	0.5	1	0.5
	1	1	1	1
	2	0.5	2	0.5
	2	1	2	1
오이 (0.35M Mannitol)	1	0.5	1	0.5
	1	1	1	1
	1.5	0.5	1.5	0.5
	1.5	1	1.5	1
토마토 (0.4M Mannitol)	1.5	1	1.5	1
	1.5	2	1.5	2
	2.5	1	2.5	1
	2.5	2	2.5	2

enzyme처리 후 순수한 원형질체만을 얻기 위해서 pore size가 60~100 μ m인 체에 거른 용액과 CPW21S(CPW solution, 21% Sucrose)를 첨가하여 원심분리 Tube에 넣고 800rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 Tube의 윗 부분에 띠 모양으로 떠있는 순수한 원형질체만을 파스퇴르 파이펫으로 따내어 새로운 tube에 넣고 남아있는 enzyme 용액과 CPW21S용액을 없애기 위해서 W5용액을 섞어 800rpm에서 10분씩 2회 원심분리 하여 세척하였다.

이렇게 하여 나온 순수한 원형질체를 액체 배양 배지를 넣어 희석하였다.

3) 원형질체 분리 조건 확립

담배의 경우 enzyme 조건은 0.6 M Mannitol Buffer에 ONOZUKA R-10의 2% cellulysin, 0.5% macerozyme에서 원형질체 상태가 양호하였고, 가장 많은 원형질체를 얻을 수 있었다(Fig. a). 오이의 경우는 0.35 M Mannitol Buffer에 ONOZUKA R-10의 1.5% cellulysin, 0.5% macerozyme의 조건에서 가장 활력이 좋고, 가장 많은 수의 원형질체를 얻을 수 있었다(Fig. b). 또한 토마토의 경우는 0.4 M Mannitol Buffer에 ONOZUKA R-10의 2.5% cellulysin, 2% macerozyme의 조건에서 가장 많은 원형질체를 얻을 수 있었다(Fig. c)

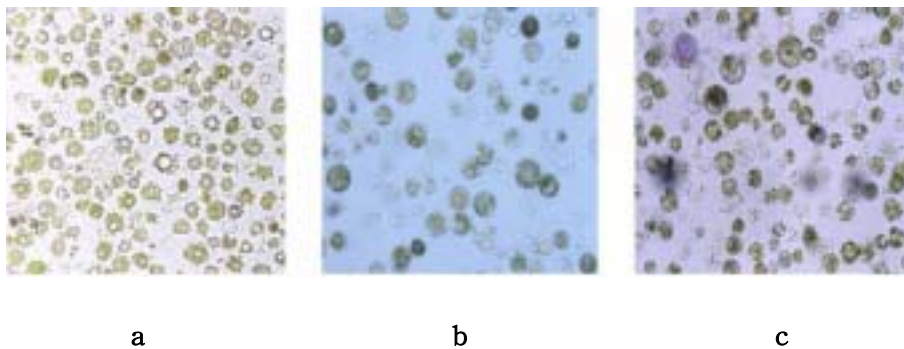


그림 48. 담배, 오이, 토마토 원형질체 분리

a : 담배 원형질체; b : 오이 원형질체; c : 토마토 원형질체

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 목표달성도

1. 이 실험을 통하여 1차 년도는 항-CMV 항체제작 및 scFv 항체 유전자 phage display library 제작을 완료하였으며, 우리 나라 자생식물에서 분리한 CMV-Mf계통의 생물학적 특성을 구명하고, 특히 병원성과 관련된 연구를 목표로 하여 계획된 연구목표를 달성하였으며, 이와 같은 CMV의 생물학적 기초 연구의 결과는 기타 다른 식물바이러스의 기초연구를 위한 지표가 될 수 있다. 그리고 담배와 토마토 및 박과 작물의 재분화 및 형질전환 체계를 확립하였다.

2. 2차 년도에는 scFv 항체 유전자의 친화성 검증 및 항바이러스 scFv 항체 유전자의 조작을 완료하였고 CMV-Mf의 병원성 유전자를 주로 분석하여, 지금까지 세계적으로 보고되지 않은 CP의 새로운 영역이 병원성에 관련되고 있다는 사실을 발견하였다. 이와 같은 결과는 CMV의 병원성과 관련된 유전자의 다양한 기능을 해석하는데 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 담배, 토마토 및 수박과 오이 등의 박과 작물의 CMV-Mf scFv를 발현하는 형질전환 식물체를 개발하였다.

또한 바이러스의 특이적 항체의 제작과 CMV의 혈청학적 특성의 연구를 통하여, ① CMV-Mf의 혈청형을 결정하였고, ② 바이러스 특이적 항체에 대한 중화반응의 기작을 밝힐 수 있는 데이터를 개발하였으며, ③ in vivo에서의 항원-항체 반응의 기작을 해석하기 위하여 protoplast system을 도입함으로써 바이러스의 혈청학적 연구를 위한 다양한 연구방법의 개발에 기여하였다.

3. 3차 년도에는 항바이러스 scFv 항체 특이적 polyclonal 항체 제작을 완료하였고 식물세포에서 발현, 생산되는 항바이러스 scFv 항체 검색 실험을 50% 진척하였다. 그

리고 scFv항체 발현 식물에서의 바이러스의 반응을 분석을 분석하기 위하여 형질전환 R1세대의 유묘를 이용한 저항성 관별을 시도하였다. 결과적으로 CMV에 대한 만족할 만한 저항성을 갖는 형질전환체는 얻어지지 않았으나, 형질전환체의 바이러스에 대한 저항성 검정방법을 확립함으로써 금후 이와 관련된 연구에서 활용이 기대된다. 아쉬운 점은 형질전환체에서 CMV-Mf scFv 유전자의 도입은 확인되었으나 유전자의 발현은 확인 할 수 없었다. 따라서 이에 대한 원인 분석과 이 항체를 발현시키기 위한 새로운 벡터의 construction 등 차후의 지속적인 연구가 더 필요하다고 생각된다.

제2절 관련분야 기술발전의 기여도

1. 기술적 측면

- ① 대표적인 CMV계통에 대한 유전자분석으로 바이러스의 유전자기능 해석이 가능해 질 것이며 바이러스 외피단백질의 기능을 구명하여 scFv 항체가 도입된 식물의 바이러스에 대한 저항성 기작을 해명할 수 있을 것임
- ② 바이러스 특이적 항체에 대한 중화반응을 통하여 바이러스 항원의 해석과 함께 그 작용 기작을 해명하는데 중요한 해답을 얻을 수 있을 것으로 사료
- ③ 궁극적으로는 식물 바이러스병의 효과적인 방제방법의 개발에 기초자료로서 유용하게 활용
- ④ 국내에서는 아직까지 식물바이러스의 방제, 특히 scFv항체 유전자의 도입을 통한 형질 전환체의 개발이나 이와 관련된 연구가 없는 상태이므로 본 연구의 결과는 국내 식물 바이러스학의 영역을 넓히고 발전시키는데 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 사료

2. 경제 · 산업적 측면

- ① 식물바이러스 항체의 개발을 통한 바이러스 내성 식물체 개발 기술 확보
- ② 항체를 비롯한 인체 면역과 관련된 유용단백질의 식물체 발현을 통한 단백질 생산 체계의 확립
- ③ 다양한 바이러스 내성 작물의 개발을 통한 농업 생산성의 확대
- ④ 농업적, 의학적 유용특성을 지닌 특화작물 재배를 통한 농업 분야 및 종사자의 시장경쟁력 향상
- ⑤ CMV 저항성 식물체의 안정적인 생산을 통한 생산성 증대
- ⑥ 본 과제를 통해서 체계화된 원형질체 배양 및 형질전환 시스템을 다른 바이러스에 적용하여 새로운 항바이러스 식물체 생산
- ⑦ 기초연구를 통한 경쟁력 확보 및 유전공학기술의 현장화

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 추가연구의 필요성

본 연구개발 과제에 성공 결과를 바탕으로 CMV 내성을 지닌 채소작물을 생산하여 재배할 수 있게 되며 CMV 내성을 지닌 채소 종자의 개발이 가능해질 것으로 본다. 그리고 본 연구 결과 제작된 유전자이식 식물체를 모델로 하여 CMV 이외의 다른 식물 바이러스 저항성 식물체를 제작하는 데도 기여할 수 있을 것이다. 따라서 다음 단계에는 참여기업인 농우바이오와 공동으로 scFv 항체 유전자가 형질전환 된 식물체의 포장적응성을 조사하고 그 수확량을 조사하여 현장보급 가능성을 타진하고 보급 가능한 CMV 저항성 식물체의 계통을 확보하는데 주력해야 할 것으로 본다.

2. 타연구에의 응용

- 가. 우리나라의 자생식물에서 흔히 발생하는 CMV의 계통을 분리하여 바이러스에 대한 병원성을 중심으로 조사한 CMV-Mf의 생물학적 성질은, 우리나라에 분포하는 CMV의 마커로서 기주특성을 측정할 수 있는 재료로 활용할 계획임.
- 나. 연구를 통하여 제작된 CMV-Mf의 monoclonal 또는 polyclonal 항체는 각종 작물에 발생하는 CMV병의 진단용으로 널리 활용할 계획임.
- 다. 연구를 통하여 분석된 CMV-Mf 유전자, 특히 CP유전자의 병원성 관련 영역의 발견은 식물바이러스 유전자의 기능을 이해하는데 학문적인 기초를 제공할 수 있음.
- 라. 연구결과 제작된 CMV CP의 scFv항체를 발현하는 담배의 경우 바이러스에 대한 저항성은 기대한 만큼 발현되지 않았다. 이러한 결과는 scFv항체 유전자의 선택과 활용성에 바이러스 유전자의 새로운 디자인을 요구하는 결과로 해석됨으로 금후의 연구에 기초자료로 활용될 수 있음.

- 마. Phage display library를 이용하여 식물바이러스의 scFv 항체 유전자 확보에 있어서의 활용.
- 바. scFv 항체 유전자의 유전자 해석 가능.
- 사. scFv 항체 도입 식물의 바이러스에 대한 저항성의 기작을 해명하는데 응용.
- 아. 바이러스 특이적 항체에 대한 중화반응을 통하여 바이러스 항원의 해석과 함께 그 작용 기작을 해명하는데 응용.
- 자. 각 작물의 재분화 및 형질전환 방법의 개발은 앞으로 타 작물의 형질전환에 응용이 가능하며 또한 다른 바이러스에 저항성을 갖는 작물의 개발에 널리 사용 가능함.

3. 기업화 추진방안

본 연구과제를 통해서 개발이 기술이 실용화됨으로써 다른 중요한 원예작물에 관여하는 바이러스 저항성 식물체 육성이 가능하게 될 것이다. 본 실험을 통해서 만들어진 scFv 항체 유전자 이식 식물체의 포장적응성 조사 및 수확량조사를 통하여 참여기업(농우종묘)과 공동으로 현장보급 가능성을 검토한 뒤 바이러스내성 식물체를 품종으로 시판할 계획이다. 그리고 이 분야에서 국제적인 우위를 점할 수 있을 것이고, 참여기업인 (주) 농우바이오도 바이러스 저항성 품종 육종에 국제적인 경쟁력을 갖추게 될 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. CMV의 병원성관련 유전자의 분석에 관한 해외 정보 및 유전자분석기술과 관련된 해외정보

CMV에 의한 기주식물의 병징발현이나 병원성과 가장 직접적으로 관련된 유전자는 RNA3의 외피단백질이다. 그러나 외피단백질 유전자 이외에도 모든 RNA가 직접적으로 기주에의 병원성과 관련됨으로서 CMV의 다양한 병징발현을 유도하는 것으로 나타나고 있다. 이러한 결과들은 아직까지 극히 일부의 CMV에서 보고된 결과들로서, 금후의 연구 결과에 따라서는 더욱 구체적인 병징관련 유전자의 해석이 이루어질 것으로 예상되며, 결과적으로 CMV병에 대한 기주의 저항성관련 유전자를 탐색하는데 있어서 가장 중요한 자료로서 활용될 것으로 기대된다. 예를 들면 최근 Y-CMV가 *Arabidopsis*에서 hypersensitive response (HR)를 일으키는 것과 관련하여 Y-CMV 외피단백질 유전자의 129번째 아미노산에 의한 HR 반응과 이에 대응하는 *Arabidopsis*의 유전자좌가 해석되었고 (Takahashi 등, 1994), Y-CMV의 RNA2가 동부에서 HR 반응을 결정하는 유전자로 작용하면서 gene-for-gene hypothesis가 증명된다는 실험 등의 보고가 이어지고 있다 (Karasawa 등, 1997). 이들의 결과를 보면 바이러스의 특이적 병징발현과 관련된 유전자의 domain이 다른 병징 또는 병원성과도 연관되는 흥미로운 결과를 보이고 있다.

그러나 지금까지 CMV에서 밝혀진 병징 또는 병원성과 관련된 유전자의 분자생물학적 해석은 극히 일부에 지나지 않기 때문에, 더 많은 CMV 계통들과 다양한 병징들과의 상호관계가 유전자 수준에서 해명되어야만 CMV의 감염에 대한 기주의 응답이 확실해질 수 있을 것으로 생각된다.

2. 식물바이러스의 항체개발현황에 관한 정보와 새로운 항체의 제작방법과 관련된 기술정보

3. 지금까지 보고된 식물바이러스의 외피단백질에 대응하는 scFv항체 발현 형질전환 식물의 개발에 관련된 정보

CMV의 외피단백질은 게놈 RNA를 보호하는 기본적인 기능을 가지고 있다. 그러면서도 또한 외피단백질은 병징의 발현을 주도하며, 감염조직에서 증식된 바이러스의 원거리이동이나 (Taliensky와 Garcia-Arenal, 1995) 진딧물 매개성 (Mossop과 Francki, 1977) 등에도 중요한 역할을 하고 있다. 이러한 외피단백질의 다양한 기능은 비단 CMV 뿐만이 아니라 Tobamovirus나 Potyvirus 등에서도 밝혀지고 있어, 앞으로 바이러스 외피단백질의 기능과 관련된 분자생물학적 해석은 바이러스병의 방제를 위한 중요한 계기를 만들어줄 수도 있다. 즉 CMV의 외피단백질 유전자나 scFv 항체 유전자를 도입시킨 형질전환체 식물에서의 바이러스저항성 기작의 해명이나, 또는 바이러스의 병원성관련 유전자와 식물체의 대응 유전자의 관계 해석의 결과들은 바이러스병에 대한 저항성 육종의 자료로 널리 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

제 7 장 참고문헌

Anghel J, Rosu A, 1985, In vitro morphogenesis in diploid, triploid and tetraploid genotypes of watermelon-*Citrullus lanatus* (Thumb.) Mansf. Rev Roum Biol Biol Veget(Bucarest) 30 : 43-55

Ares X, Calamante G, Cabral S, Lodge J, Hemenway P, Beachy RN, Mentaberry A. 1998. Transgenic plants expressing potato virus X ORF2 protein (p24) are resistant to tobacco mosaic virus and Ob tobamoviruses. J. Virol. 72: 731-738.

Barens LR ,1979, Sci. Hortic. 11 : 223-227

Bruyns AM, jaeger G, De Neve M, De Wilde C, Van Montagu M, Depicker A. 1996. Bacterial and plant-produced scFv proteins have similar antigen-binding properties. FEBS Lett. 386: 5-10.

Carr et al., 1994. Replicase-mediated resistance to CMV in transgenic plants involves suppression of both virus replication in the inoculated leaves and long-distance movement. Virology 199: 439-447.

Choi, J.K., Kim, H.J., Hong, J.S., Kim, D.W. and Lee, S.Y. 1998. Identification and differentiation of cucumber mosaic virus isolates in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 14: 7-12.

Choi PS, Soh WY, Kim YS, Yoo OJ, Liu JR ,1994, Genetic transformation and plant regeneration of watermelon using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep 13: 344-348

Colijn-Hooymans CM, Bouwer R, Orczyk W, Dons JJM ,1988, *Plant Science* 57 : 63-71

Comptom ME, Gray DJ ,1993a, High efficiency plant regeneration from cotyledons of watermelon(*Citrullus vulgaris Schrad.*) *Plant Cell Rep* 9: 559-562

Comptom ME, Gray DJ, Elmstron GW ,1993b, A simple protocol for micropropagating diploid and tetraploid watermelon using shoot tip explants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 33 : 211-217

Cooper et al., 1996. Cell-to-cell transport of movement-defective cucumber mosaic and tobacco mosaic viruses in transgenic plants expressing heterologous movement protein genes. *Virology* 216: 208-213.

Davies, C. and Symons, R.H. 1988. Further implications for the evolutionary relationships between tripartite plant viruses based on cucumber mosaic virus RNA3. *Virology* 165: 216-224.

Devergne, J.C. and Cardin, L. 1973. Contribution for cucumber mosaic virus. IV. Classification of the isolates. *Ann. Phytopathol.* 5: 409-430.

Dong J-Z, Jia S-R ,1991, High efficiency plant regeneration from cotyledons of watermelon (*Citrullus vulgaris Schrad.*). *Plant Cell Rep.* 9: 559-562

Douine, L., Auiot, J.B., Marchoux, G. and Archange, P. 1979. Recensement d'especes vegetales sensibles au virus de la mosaique de concombre (CMV) etude bibliographique. *Ann. Phytopathol.* 11: 439-475.

Doyle JJ, Doyle JL ,1990, Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 12-15

- Fiedler U, Phillips J, Artsaenko O, Conrad U.** 1997. Optimization of scFv antibody production in transgenic plants. *Immunotechnology* 3: 205-216.
- Francki, R.I.B.** 1985. Plant viral satellites. *Ann. Rev. Microbiol.* 39 : 151-174. cDNA to determine the RNA sequence homology between strains of plant viruses; Its application to several strains of cucumoviruses. *Virology* 88: 361-370.
- Francki, R.I.B., Mossop, D.W. and Hatta, T.** 1979. Cucumber mosaic virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, No. 213.
- Gonda, T.J. and Symons, R.H.** 1978. The use of hybridization analysis with
- Gould, A.R. and Symons, R.H.** 1978. Alfalfa mosaic virus RNA. Determination of the sequence homology between the four RNA species and a comparison with the four RNA species of cucumber mosaic virus. *Eur. J. Biochem.* 91: 269-278.
- Jong-Suk Chae, Jang-Kyung Choi, Hak-Tae Lim, and Sang-Hoon Cha** ,2001, Generation of a Murine Single Chain Fv(scFv) Antibody Specific for Cucumber Mosaic Virus (CMV) Using a Phage Display Library. *Mol Cells. Vol 41.* No. 1. pp. 7-12
- Kaper, J.M. and Waterworth, H.E.** 1981. Cucumoviruses. In: *Plant Virus Infection*, ed. by E. Kurstak, pp. 258-332. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York.
- Kaplan et al.,** 1995. Complementation of virus movement in transgenic tobacco expressing the cucumber mosaic virus 3a gene. *Virology* 209:188-199.
- Karasawa, A., Ito, A., Okata, I., Hase, S. and Ehara, Y.** 1997. A possible role of RNA2 of cucumber mosaic cucumovirus as a determinant of infection phenotype

on cowpea. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 63: 289-297.

M. Dabauza, M. Bordas, A. Salvador, L. A. Roig ,1997, Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledon explants of *Citullus colocynthis* (L.) Schrad.

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

Mossop, D.W. and Francki, R.I.B. 1977. Association of RNA3 with aphid transmission of cucumber mosaic virus. *Virology* 81: 177-181.

Murphy, F.A. 1995. Bromoviridae. In: *Virus Taxonomy*, ed. by F.A. Murphy, pp. 450-457. Springer-Verlag, Wien.

Nitta, N., Masuta, C., Kuwata, S. and Takanami, Y. 1988. Comparative studies on the nucleotide sequence of cucumber mosaic virus RNA3 between Y strain and Q strain. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 54: 516-522.

Nitta, N., Takanami, Y., Kuwata, S. and Kubo, S. 1988. Inoculation with RNAs 1 and 2 of cucumber mosaic virus induces viral RNA replicase activity in tobacco mesophyll protoplasts. *J. Gen. Virol.* 69: 2695-2700.

Owen, J. and Palukaitis, P. 1988. Characterization of cucumber mosaic virus. I. Molecular heterogeneity mapping of RNA3 in eight CMV strains. *Virology* 166: 495-502.

Palukaitis, P., Roossinck, M.J., Dietzgen, R.G. and Franki, R.B. 1992. Cucumovirus. *Adv. Virus Res.* 41: 281-348.

- Peden, K.W.C. and Symons, R.H.** 1973. Cucumber mosaic virus contains a functionally divided genome. *Virology* 53: 487-492.
- Phillips J et al.,** 1997. Seed-specific immunomodulation of abscisic acid activity induces a developmental switch. *The EMBO Journal*. 16(15): 4489-4496.
- Piazzolla, P., Diaz-Ruiz, J.R. and Kaper, J.M.** 1979. Nucleic acid homologies of eighteen cucumber mosaic virus isolates determined by competition hybridization. *J. Gen. Virol.* 45: 361-369.
- Reynolds JF ,**1986, In : *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* Vol. 3, Vasil IK ed. Academic Press Inc. Orlando pp 151-178
- Rizzo, T.M. and Palukaitis, P.** 1988. Nucleotide sequence and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA2. *J. Gen. Virol.* 69: 1777-1787.
- Singh, Z., Jones, R.A.C. and Jones, M.G.K.** 1995. Identification of cucumber mosaic virus subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR. *Plant Dis.* 79: 713-716.
- Srivastava DR, Andrianov VM, Piruzian ES ,**1989, Tissue culture and plant regeneration of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad. cv. Melitoposki). *Plant Cell Rep* 8: 300-302
- Takahashi, H., Goto, N. and Ehara, Y.** 1994. Hypersensitive response in cucumber mosaic virus-infected *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 6: 369-377.
- Taliansky, M.E. and Garcia-Arenal, F.** 1995. Role of cucumovirus capsid protein in long-distance movement within the infected plant. *J. Virol.* 69: 916-922.

Taviadoraki P, et al., 1993. Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* 366(2): 469-472.

Trulson AJ, Simpson RB, Shahin EA (1986) *Theor Appl Genet* 73 : 11-15

Van Regenmortel, M.H.V. 1989. Applying the species concept to plant viruses. *Arch. Virol.* 104: 1-17.

Wellman, F.L. 1935. Host range of celery mosaic virus. *Phytopathology* 25: 377-404.

Ziegler, A., Torrance, L., Macintosh, S.M., Cowan, G.H. and Mayo, M.A. 1995. Cucumber mosaic cucumovirus antibodies from a synthetic phage display library. *Virology* 214 : 235-238.

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 아니 됩니다.

최 중
연구보고서

Single Chain Variable Fragment(scFv)

항체유전자 이식을 통한

Cucumber Mosaic Cucumovirus(CMV) 내성

형질전환 식물체의 제작 및 특성 분석

Production and special property analysis of
CMV resistant transgenic plants by means of
scFv antibody gene transplantation

연구기관

강원대학교

농림부