

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0134618 (43) 공개일자 2011년12월15일
	(51) Int. Cl. C12N 15/11 (2006.01) C12N 15/33 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01) C12Q 1/70 (2006.01) (21) 출원번호 10-2010-0054280 (22) 출원일자 2010년06월09일 심사청구일자 2010년06월09일	(71) 출원인 경상대학교산학협력단 경상남도 진주시 가좌동 900 (72) 발명자 이현숙 경상남도 사천시 사천읍 사천우체국 159번지 동해 아트빌 405호 노현수 경상남도 진주시 신안동 신안주공1차아파트 103동 104호 이창원 경상남도 진주시 신안동 20 현대아파트 107-905 (74) 대리인 특허법인이름

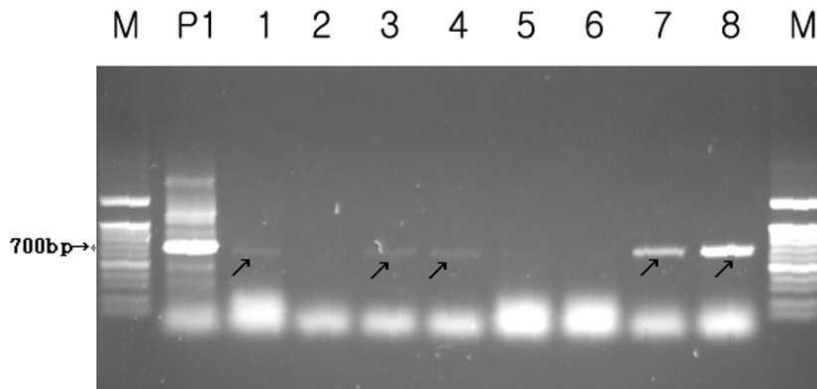
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 양송이버섯 바이러스 A b S V 진단용 특이 프라이머, 및 이를 이용한 진단 방법

(57) 요약

본 발명은 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머, 및 이를 이용한 진단 방법에 관한 것이다. 본 발명의 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머는 RT-PCR을 통해 PCR 산물의 생성여부를 확인하여 특정 바이러스의 존재 유무를 확인함으로써, 양송이버섯에 병을 유발하는 바이러스 AbSV의 감염 여부를 간편하고 정확하게 진단할 수 있다.

대표도 - 도7



특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1(정방향 프라이머) 및 서열번호 2(역방향 프라이머)로 표시되는 프라이머쌍을 포함하는 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머.

청구항 2

- 1) 양송이버섯 바이러스 AbSV로부터 ssRNA를 추출하여 분리하는 단계,
- 2) 상기 1)단계에서 얻은 ssRNA를 주형으로 하고, 제 1항의 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행하는 단계, 및
- 3) 상기 2)단계에서 얻은 RT-PCR 산물을 크기별로 분리하여 분석하는 단계를 포함하는, 양송이버섯 바이러스 AbSV의 감염 여부의 진단 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 3)단계에서 RT-PCR 산물을 크기별로 분리하는 방법은 아가로오스 겔 전기영동 또는 폴리 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용하여 수행하는 것을 특징으로 하는 양송이버섯 바이러스 AbSV의 감염 여부의 진단 방법.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 3)단계에서 RT-PCR 산물의 크기는 700bp인 것을 특징으로 하는 양송이버섯 바이러스 AbSV의 감염 여부의 진단 방법.

명 세 서

기술 분야

[0001] 본 발명은 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머, 및 이를 이용한 진단 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 양송이버섯(*Agaricus bisporus*)은 담자균류, 주름버섯목, 주름버섯과에 속하는 식용버섯으로, 주로 유럽에서 재배된다. 양송이버섯은 우리가 흔히 알고있는 느타리버섯, 표고버섯, 팽이버섯보다 단백질 함량이 높고 육질감 또한 우수하기 때문에 세계 각국에서 널리 재배하고 이용하는 버섯이다. 양송이버섯은 우유와 비슷한 양의 단백질이 존재하므로 체내에서 단백질 소모량이 많은 암환자에게 아주 유용한 식품이며, 비타민 D, 비타민 B2, 엽산 등을 많이 함유하고 있어 고혈압과 빈혈에 좋다고 알려져 있다. 우리나라에서는 1955년 경기도 임목양묘장에서 양송이버섯이 처음으로 시험재배 되었으며, 1961년 미국과 일본으로부터 양송이버섯 종균을 도입하여 증식 및 배양하였다. 그 후로, 양송이버섯의 재배면적이 늘어나면서부터 많은 생산량과 더불어 병 피해 역시 늘어나게 되었다.

[0003] 버섯 재배 시 많은 피해를 주는 병으로는 푸른 곰팡이 병(green mildew)과 세균성 갈반병(bacterial blotch)이 많이 알려져 있다. 최근 무분별한 종균의 도입으로 인하여 기존에 알려지지 않았던 곰팡이성 갈반병과 바이러스로 인한 피해가 발생하고 있다. 이러한 바이러스에 의한 병은 외국에서 무분별하게 종균을 수입하여 국내에서 검증되지 않은 종균이 유통되면서 사태가 더 심각해지고 있다. 상기와 같은 바이러스 병은 버섯 재배 시에 생기는 생리적 장애와 그 병증이 매우 유사하여 기형버섯이 발생하거나 심하면 균사가 잘 자란 것 같이 보이지만 버섯이 생기지 않아 수확을 완전히 포기해야 하는 지경에 이른다. 또한, 질병 확산 속도가 빠르며 동일한 농장에서 같은 질병이 재발하기도 한다. 그러나, 상기 바이러스 병에 대하여 아직까지 특별한 방제방법이 개발되지 않고 있다.

[0004] 버섯에서 발생하는 바이러스 병은 1948년 미국에서 최초로 양송이버섯 (*Agaricus bisporus*)에서 발견되었으나 그 병원체를 발견하지 못하여 줄기마름병 (die-back disease)이라고 불리다가 1960년 Sinden과 Hauser가 그 당

시 병이 최초로 발견된 농가의 이름을 따서 "La France Disease"라고 처음 명명하였다. 이와 같은 병증을 나타내는 양송이버섯에서 1967년 바이러스 유사 입자(virus like particle, VLP)가 발견되어 보고되었으며, 그 이후 비슷한 병증을 나타내는 버섯의 바이러스 병을 "라프랑스병" 혹은 "줄기마름병"이라고 부른다. 버섯에서 발견되는 라프랑스병의 전형적인 특징들을 살펴보면 버섯 자실체의 형성이 늦어지고 왜소하며 대의 길이가 짧고 갓의 모양이 기형이 되면서 알아지는 것을 볼 수 있는데, 심한 경우에는 버섯의 분화(development)가 거의 이루어지지 않는다. 또한, 균사 생장에도 영향을 미쳐, 균사 생장이 늦어지고 균사 밀도도 낮아진다. 상기 바이러스는 양송이버섯 바이러스에 감염된 양송이버섯 및 그것으로부터 재생된 균사체로부터 분리되고, 종균(spawn)을 통해 내부적으로 전염되며, 증상의 심각도는 환경조건에 좌우되는 것으로 보여진다.

[0005] 국내에서 양송이버섯의 바이러스 감염 시에는 다양한 병증이 나타나며, 균사 자체가 외부의 취약 환경이나 병해충에 약하게 된다. 특히 진단에도 많은 노력이 들고 특별한 방제방법도 없으므로, 종균 배양소는 보급된 원균만을 사용하여 종균을 만들고, 농가에서는 배지 조제 및 균상 관리를 충실히 하여 충실한 균상을 만드는 방식으로 양송이버섯 재배를 수행하고 있다.

[0006] 한편, 바이러스에 감염된 종균은 육안으로는 구분할 수 없을 정도로 정상적으로 자라나 계대 배양 횟수가 더해질수록 생장속도가 느려지는 특징이 있다. 따라서, 양송이버섯의 바이러스 감염의 전형적인 병증을 육안으로 관찰하지 않고서는 알 수 없으며, 그 원인 병원균의 동정 또한 어려운 면이 존재하였다. 또한, 양송이버섯의 바이러스 병 진단을 위하여 직접 현미경을 이용하는 경우 일반 광학현미경으로는 입자의 관찰이 불가능하고 전자현미경을 이용해야 하는데 이는 실제 적용이 곤란하다. 또한, 항체를 이용하는 방법에 있어서는 무엇보다 병을 유발하는 바이러스의 순수 분리가 이루어지지 않아 통상적인 면역 진단키트를 통한 진단도 불가능하여 외형적인 병증이 나타나지 않은 양송이버섯 바이러스 검사가 어려운 실정이다. 국내에서는 양송이버섯 바이러스에 의한 피해가 매년 발생하는데 그 방지대책이 미비하여 양송이버섯 재배농가에 막대한 피해를 입히고 있다.

[0007] 따라서, 양송이버섯에 병을 유발하는 바이러스의 감염에 의한 피해를 줄이고, 감염된 양송이버섯의 조기 발견 및 질병 발생의 예방을 위하여, 양송이버섯에서 바이러스의 감염 여부를 간편하고 정확하게 진단할 수 있는 특이 프라이머의 개발의 필요성이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 양송이버섯에서 바이러스의 감염 여부를 간편하고 정확하게 진단할 수 있는 특이 프라이머에 대해 연구하던 중, 양송이버섯 바이러스 AbSV의 RdRp 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 특이 프라이머를 제조하였으며, 이를 이용하여 RT-PCR을 통해 여러 종류의 양송이버섯 균주로부터 양송이버섯 바이러스 AbSV의 감염 여부를 간편하고 정확하게 진단할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머를 제공하고자 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 통해 양송이버섯 균주로부터 양송이버섯 바이러스 AbSV의 감염 여부를 진단하는 방법을 제공하고자 한다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 병든 양송이버섯에서 나타나는 여러 가지 바이러스 질병 증상을 나타낸 도이다.

도 2는 병든 양송이버섯으로부터 분리한 바이러스 AbSV를 투과전자현미경 (TEM)으로 관찰한 도이다.

도 3은 병든 양송이버섯으로부터 분리한 바이러스 AbSV를 아가로오스 겔 전기영동을 통해 분리한 바이러스 AbSV의 핵산을 분석한 도이다[M: ssRNA 크기 마커, 분획 1~12: 바이러스 AbSV 분획].

도 4는 병든 양송이버섯으로부터 분리한 바이러스 AbSV의 핵산을 DNase I 및 RNase A로 처리하여 아가로오스 겔 전기영동을 통해 분석한 도이다[M: ssRNA 크기 마커, 레인 1: 누클레아제를 처리하지 않음, 레인 2: DNase I로 처리(10 μ l/ml), 레인 3: RNase A로 처리(0.5M NaCl 내 10 μ l/ml), 레인 4: RNase A로 처리(0.05M NaCl 내 10 μ l/ml)].

도 5는 SDS-PAGE에 의해 분리한 양송이버섯 바이러스 AbSV의 외피 단백질을 분석한 도이다.

도 6은 양송이버섯 바이러스 AbSV의 랜덤 프라이머를 이용하여 제조한 cDNA의 클로닝 과정을 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 통해 양송이버섯 균주로부터 양송이버섯 바이러스 AbSV ssRNA의 RdRp 유전자를 크기별로 분리한 도이다[M: 100bp DNA 크기 마커, P1: AbSV 양성대조균, 레인 1: 독일 양송이버섯, 레인 2: 네델란드 양송이버섯, 레인 3: 염부병 양송이버섯, 레인 4: 갈변 양송이버섯, 레인 5: 한국 양송이버섯(한마음 503호), 레인 6: 한국 양송이버섯(한마음 501호), 레인 7: 한국 양송이버섯(영농조합 101호), 레인 8: 한국 양송이버섯(부여산)].

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은

[0014] 1) 양송이버섯 바이러스 AbSV로부터 ssRNA를 추출하여 분리하는 단계,

[0015] 2) 상기 1)단계에서 얻은 ssRNA를 주형으로 하고, 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행하는 단계, 및

[0016] 3) 상기 2)단계에서 얻은 RT-PCR 산물을 크기별로 분리하여 분석하는 단계를 포함하는, 양송이버섯 바이러스 AbSV의 감염 여부의 진단 방법을 제공한다.

[0017] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0018] 본 발명에 따른 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머는 양송이버섯 바이러스 AbSV의 RdRp 유전자에 특이적으로 결합하여 RT-PCR 산물을 합성하는 것을 특징으로 한다.

[0019] 상기 프라이머는 하기와 같은 방법으로 제조될 수 있다. 구체적으로는, 병든 양송이버섯으로부터 바이러스 AbSV를 순수 분리한 후, 분리된 바이러스 AbSV로부터 ssRNA를 추출한다. 이때, 추출방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, 페놀 또는 페놀/클로로포름/이소아밀 알콜(25:24:1, v/v/v) 추출법을 이용할 수 있다. 상기 추출된 ssRNA를 표지 랜덤 프라이머(tagged random primer)를 이용하여 역전사 반응을 통해 cDNA를 합성한다. cDNA 일부분을 이용하여 PCR을 수행한 후, 바이러스 유전자가 삽입된 벡터를 대장균에 형질전환시켜 대장균을 대량 배양한다. 바이러스 유전자가 삽입되어 있는 대장균을 제한효소 *EcoR* I으로 확인하여, AbSV 유전자 일부를 동정한다. 특히, ssRNA의 중요한 유전자인 RdRp(RNA dependent RNA polymerase) 유전자를 분석한다. 그 다음 양송이버섯 바이러스 AbSV를 특이적으로 선택할 수 있는 프라이머를 디자인하여 제조한다.

[0020] 상기 제조된 프라이머는 PCR용 프라이머쌍을 말하며, 구체적으로는 바이러스의 RNA 게놈에 대한 RT-PCR용 프라이머쌍을 말한다. 본 발명의 프라이머는 서열번호 1(정방향 프라이머) 및 서열번호 2(역방향 프라이머)로 표시되는 프라이머쌍을 포함하여 이루어진 것이 바람직하다.

[0021] 본 발명의 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머는 RT-PCR을 통해 양송이버섯에 병을 유발하는 바이러스 AbSV의 감염 여부를 진단하는데 유용하게 사용될 수 있다.

[0022] 본 발명의 양송이버섯 바이러스 AbSV의 감염 여부의 진단 방법을 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 먼저, 양송이버섯 바이러스 AbSV로부터 ssRNA를 추출하여 분리한다. 추출방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, 페놀 또는 페놀/클로로포름/이소아밀 알콜(25:24:1, v/v/v) 추출법을 이용할 수 있다. 상기 분리된 ssRNA를 주형으로 하고, 본 발명의 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행한다. 이때 RT-PCR 반응은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있다. 상기 생성된 PCR 산물을 아가로오스 겔 전기영동 또는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 등을 통하여 크기별로 분리한다. 크기별로 분리한 프라이머를 대조 프라이머와 비교하여, 대응되는 해당 크기의 RT-PCR 산물이 검출되었는지 확인하고 양송이버섯 바이러스 AbSV ssRNA의 RdRp 유전자의 존재 유무를 확인한다.

[0023] 본 발명에서는 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 통해 여러 종류의 양송이버섯 균주로부터 얻은 PCR 산물의 크기가 700bp로 양송이버섯 바이러스 AbSV의 PCR 산물의 크기와 동일함을 확인하였다.

[0024] 따라서, 본 발명의 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머는 RT-PCR을 통해 PCR 산물의 생성여부를 확인하여 특정 바이러스의 존재 유무를 확인함으로써, 양송이버섯에 병을 유발하는 바이러스 AbSV의 감염 여부를 간편하고 정확하게 진단할 수 있다.

- [0025] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0026] **실시예 1 : 양송이버섯으로부터 바이러스의 분리 및 동정**
- [0027] **1. 바이러스 입자의 분리**
- [0028] 바이러스 분리에 사용한 양송이버섯은 전남 장흥에서 발생된 기형버섯을 사용하였다. 병든 양송이버섯(100g)을 0.05M Tris-Cl, 1mM EDTA, pH 8.0으로 구성된 추출 완충액에서 3분간 균질기(waring blender)로 균질화(homogenization)시킨 다음, 10,000g에서 20분간 원심분리하여 세포찌꺼기를 제거하였다. 상등액을 10% 폴리에틸렌글리콜(PEG 6000)과 0.6M NaCl에서 밤새도록 교반시킨 후, 10,000g에서 20분간 원심분리하였다. 상등액을 버리고, 침전물(pellet)을 0.05M Tris-Cl/1mM EDTA(TE)가 포함된 완충액으로 현탁한 후, 15,000g에서 20분간 원심분리하고, 상등액을 105,000g에서 90분간 초원심분리하여 바이러스 입자의 침전물을 수득하였다. 상기 침전물을 같은 TE 완충액에서 밤새도록 현탁하고 저속도 원심분리하여 수득한 상등액을 부분순화된 바이러스 재료(curde virus preparation)로 사용하였다. 부분순화된 바이러스 재료 1ml를 TE 완충액으로 조제된 1.585g/cm³ 염화세슘에 로딩한 후, Beckman Type 90Ti 로터를 사용하여 130,000g에서 20시간 동안 등밀도(isopycnic) 원심분리를 수행하였다. 구배는 750 μ l로 분획화하였으며, 상기 분획은 TE 완충액을 2번 바꾸고 24~36시간 동안 투석시킨 후, 130,000g에서 90분동안 원심분리하였다. 원심분리에 의한 추출물을 TE 완충액에 재현탁시키고 -20℃에서 냉동 보관하였으며, 각 분획에 대해 바이러스 입자, 바이러스 핵산 및 외피 단백질을 분석하였다.
- [0029] **2. 바이러스 입자의 관찰**
- [0030] 상기 1에서 분리한 각 분획의 바이러스 입자를 폼바-코팅된 400-메쉬 구리 그리드상에 배양한 후, 2%(w/v) 아세트산 우라늄, pH 4.5로 염색하고, 그리드를 투과전자현미경(TEM, JEOL 모델 200)으로 관찰하였다.
- [0031] 결과는 도 2에 나타내었다.
- [0032] 도 2에 나타난 바와 같이, 병든 양송이버섯으로부터 분리한 바이러스 입자는 양송이버섯 구형 바이러스(*Agaricus bisporus spherical virus*, AbSV)이었으며, 바이러스의 구형 입자 크기는 28~30nm이었다.
- [0033] **3. 바이러스 핵산의 분리 및 동정**
- [0034] 페놀 및 페놀/클로로포름/이소아밀 알콜(25:24:1, v/v/v) 추출법을 사용하여 상기 1에서 분리한 바이러스로부터 바이러스 핵산을 분리하였다. 상기 추출 분리된 바이러스 핵산을 에탄올에 침전시킨 후, 0.04% 브로모페놀 블루, 0.04% 자일렌 시아놀 FF 및 5% 글리세롤로 조정하여 1% 아가로오스 겔 전기영동을 통해 분리하였다. 이때, 전기영동은 50V에서 8시간 동안 수행하였으며, 전기영동 완충액은 에티디움 브로마이드(0.5 μ g/ml) 40mM을 포함하는 Tris-아세트레이트 및 1mM EDTA, pH 7.5 이었다.
- [0035] 또한, 바이러스 유전자 핵산 형태를 판별하기 위하여, 뉴클레아제에 대한 민감성을 조사하였다. 구체적으로는, DNase I 및 RNase A에 대한 민감성을 결정하기 위하여, 상기 분리한 바이러스 핵산을 각각 10 μ l/ml의 DNase I (RNase free, Promega) 및 10 μ l/ml의 RNase A를 사용하여 37℃에서 30분 동안 50mM Tris-Cl, 10mM MgCl, pH 7.5에서 배양하였다. dsRNA의 존재를 시험하기 위하여 RNase A를 첨가하기 전에 핵산 용액에 NaCl을 첨가하여 농도가 0.5M이 되게 하였다.
- [0036] 병든 양송이버섯으로부터 분리한 바이러스 AbSV를 아가로오스 겔 전기영동을 통해 분리한 바이러스 AbSV의 핵산을 분석한 결과는 도 3에 나타내었으며, 병든 양송이버섯으로부터 분리한 바이러스 AbSV의 핵산을 DNase I 및 RNase A로 처리하여 아가로오스 겔 전기영동을 통해 분석한 결과는 도 4에 나타내었다.
- [0037] 도 3에 나타난 바와 같이, 병든 양송이버섯으로부터 분리한 바이러스 AbSV를 아가로오스 겔 전기영동을 통해 분리한 바이러스 AbSV의 핵산이 8kb의 분자량을 가짐을 확인하였다.
- [0038] 또한 도 4에 나타난 바와 같이, 상기 분리한 바이러스 AbSV의 핵산을 DNase I로 처리하였을 경우 어떠한 분해도 일어나지 않았으나, RNase A로 처리하였을 경우에는 염농도에 상관없이 저염농도의 완충용액과 고염농도의 완충용액 조건에서 분해되었다. 즉, 분리한 바이러스 AbSV의 핵산은 DNase I의 처리에는 저항성이 있으나, RNase A의 처리에는 염농도에 상관없이 민감하다는 것을 알 수 있다. 따라서, 분리한 바이러스 AbSV의 핵산은 ssRNA로 구성됨을 알 수 있다.
- [0039] 따라서, 병든 양송이버섯으로부터 분리한 바이러스 AbSV의 핵산은 약 8kb의 ssRNA임을 알 수 있다.

[0040] **4. 바이러스 외피 단백질의 분석**

[0041] 논문[Laemmil, U.K. 1970. Natur (London) 227: 680-685])에 기재되어 있는 불연속 완충 시스템을 사용하여 폴리펩티드를 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 분리하였다. 전기영동 전에 단백질을 95℃, 5분 동안 50mM Tris-Cl, pH 6.8, 100mM 디티오프레톨(dithiothreitol), 2% SDS, 10% 글리세롤, 0.1% 브로모페놀 블루에서 변성시켰다. 변성된 단백질을 4% 스테킹 겔 및 12% 분리 겔을 갖는 0.75mm 두께의 폴리아크릴아미드 겔 상에서 분리하였다. 10% 아세트산 및 45% 메탄올 용액에서 0.25% 쿠마씨 브릴리언트 블루 R-250을 사용하여 적어도 30분 동안 겔을 염색한 후 동일한 용액에서 탈색시켰다.

[0042] SDS-PAGE에 의해 분리한 양송이버섯 바이러스 AbSV의 외피 단백질을 분석한 결과는 도 5에 나타내었다.

[0043] 도 5에 나타난 바와 같이, 양송이버섯 바이러스 AbSV의 외피 단백질은 23kDa의 분자량을 갖는 단일 폴리펩티드로 구성됨을 확인하였다.

[0044] 상기 결과를 종합하여, 상기 병든 양송이버섯으로부터 분리한 바이러스를 AbSV(*Agaricus bisporus spherical virus*)라고 명명하였으며, 이를 국립농업과학원 농업유전자원센터에 2009년 5월 12일자로 기탁하였다(KACC97003P).

[0045] **실시예 2 : 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머의 제조**

[0046] **1. 병든 양송이버섯으로부터 바이러스 AbSV의 순수 분리**

[0047] 병든 양송이버섯을 0.5M Tris-Cl(pH 7.0), 1mM EDTA(pH 7.0), 0.5% β-머캅토에탄올이 포함된 완충액에서 3분간 파쇄기로 균질화시킨 다음, 6000g에서 원심분리하여 세포찌꺼기를 제거하였다. 상등액을 10% 폴리에틸렌글리콜과 0.6M NaCl에서 밤새도록 교반시킨 후, 6000g에서 원심분리하였다. 상등액을 버리고, 침전물을 0.05M Tris-Cl(pH 7.0)/1mM EDTA(pH 7.0)가 포함된 완충액으로 현탁한 후, 10,000g에서 원심분리하고, 상등액을 100,000g에서 1시간 30분 동안 초원심분리하여 바이러스 입자의 침전물을 수득하였다. 상기 침전물을 같은 TE 완충액에서 밤새도록 현탁하였고, 바이러스 입자들을 10~60%의 수크로오스 밀도구배에서 16시간 동안 초원심분리하여 바이러스가 포함된 분획을 구배 분획기(gradient fractionator)를 사용하여 분획하였다. 이렇게 얻은 바이러스 입자를 다시 50% CsCl(1.583g/cm³)에서 초원심분리(130,000g, 2.5시간)하여 0.75mL씩 분획하였다. 각 분획을 30시간 동안 2회 투석하고 1% 아가로오스 겔 전기영동으로 바이러스가 포함되어 있는지를 검정하였다.

[0048] **2. 순수 분리된 바이러스 AbSV로부터 ssRNA 추출, 및 이로부터 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 프라이머의 제조**

[0049] 페놀 및 페놀/클로로포름/이소아밀 알콜(25:24:1, v/v/v) 추출법을 사용하여 상기 1에서 순수 분리한 바이러스로부터 바이러스 핵산을 분리하였다. 분리된 바이러스 ssRNA 부유액에 DNase를 처리하여 DNA의 오염을 완전히 제거하였다. DNA의 오염이 완전히 제거된 ssRNA를 이용하여 표지 랜덤 프라이머(tagged random primer)를 이용하여 역전사 반응을 통해 cDNA를 합성하였다. 이때, 10× 역전사 완충액, dNTP, 역전사효소(Promega) 및 표지 랜덤 프라이머를 첨가시켜 42℃에서 1시간 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. cDNA를 합성한 후, RNase H를 이용하여 RNA 가닥을 제거하고, 65℃에서 5분간 조건으로 역전사효소를 제거하였다. 이렇게 합성된 cDNA 일부분을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 수행 조건은 cDNA, dNTP, 10× PCR 완충액, EX taq DNA 중합효소 및 3차 멸균 증류수를 이용하여 수행하였다. PCR 수행 후, PCR 정제 키트를 이용하여 정제하고, 대장균을 숙주로 하여 PCR 산물을 대량 생산이 가능한 pGEM-T easy(Promega) 벡터에 삽입하였다. 바이러스 유전자가 삽입된 pEGM-T easy 벡터를 대장균 DH10b/r 숙주에 형질전환시켜, 대장균을 대량 배양하였다. 대장균 DH10b/r를 대량 배양한 후, 바이러스 유전자가 삽입되어 있는 대장균을 제한효소인 *EcoR* I으로 확인하고, 자동염기서열 분석 장치를 통하여 AbSV 유전자 일부를 동정하였다. 특히, ssRNA의 중요한 유전자인 RdRp(RNA dependent RNA polymerase) 유전자를 분석하였다. 그 다음 양송이버섯 바이러스 AbSV를 특이적으로 선택할 수 있는 프라이머를 디자인하였다.

[0050] 양송이버섯 바이러스 AbSV의 랜덤 프라이머를 이용하여 제조한 cDNA의 클로닝 과정은 도 6에 나타내었으며, 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머의 서열은 표 1에 나타내었다.

표 1

AbSV 진단용 특이 프라이머	프라이머 서열
정방향(Forward)	5'-CCC CTG AAG ATG ATA CCC-3'
역방향(Reverse)	5'-TCA TCT GCC ATC TTC TGC-3'

[0051]

[0052] 실시예 3 : 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머를 이용한 RT-PCR

[0053]

본 발명의 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 통해 여러 종류의 양송이버섯 균주로부터 양송이버섯 바이러스 AbSV ssRNA의 RdRp 유전자를 크기별로 분리하여 양송이버섯 바이러스 AbSV의 감염 여부를 진단하였다. 구체적으로는, 상기 실시예 2와 같은 방법으로 양송이버섯 바이러스 AbSV로부터 ssRNA를 추출한 후, 상기 실시예 2에서 제조한 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머 RdRp R를 이용하여 역전사시켜 cDNA를 합성하였다. 이때, 역전사는 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 실시하였다. 이렇게 생성된 cDNA를 이용하여 상기 실시예 2에서 제조한 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머 RdRp F를 이용하여 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 PCR을 수행하였다. PCR 수행 후, 1% 아가로스 겔에서 전기영동을 실시하고, 양성 대조군과 비교하여 양송이버섯 바이러스 AbSV ssRNA의 RdRp 유전자의 존재 유무를 확인하였다.

[0054]

결과는 도 7에 나타내었다.

[0055]

도 7에 나타난 바와 같이, 본 발명의 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 통해 여러 종류의 양송이버섯 균주로부터 얻은 PCR 산물의 크기가 700bp임을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머는 RT-PCR을 통해 양송이버섯에 병을 유발하는 바이러스 AbSV의 감염 여부를 간편하고 정확하게 진단할 수 있다.

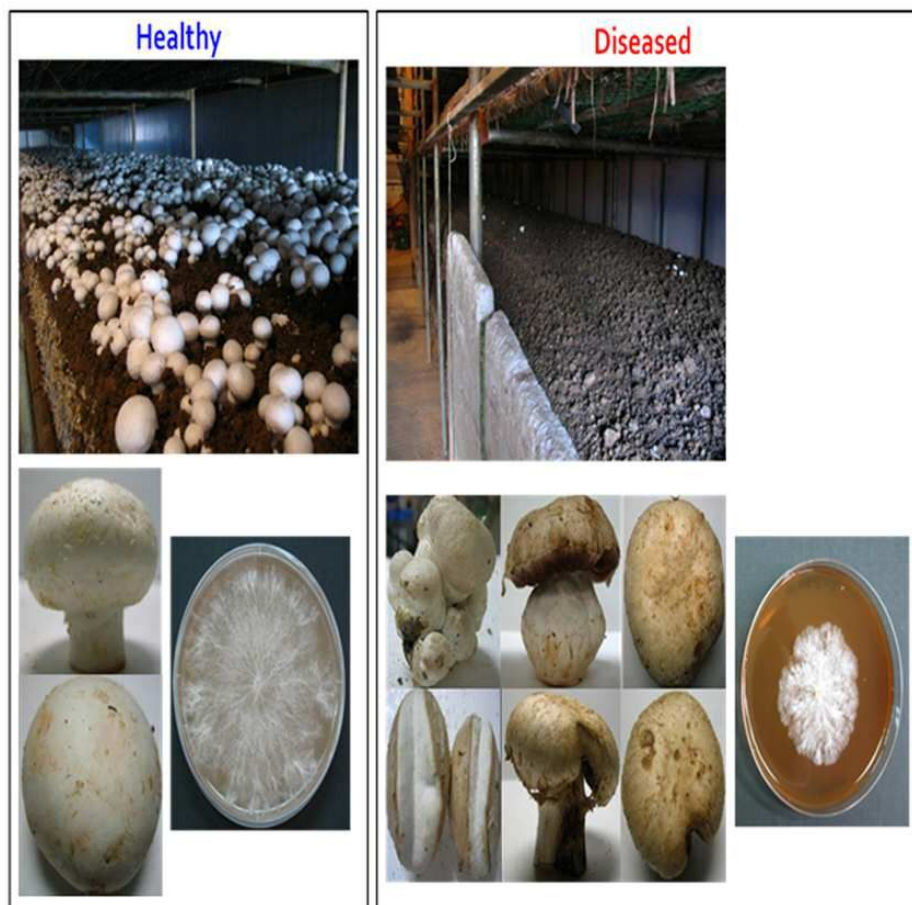
산업상 이용가능성

[0056]

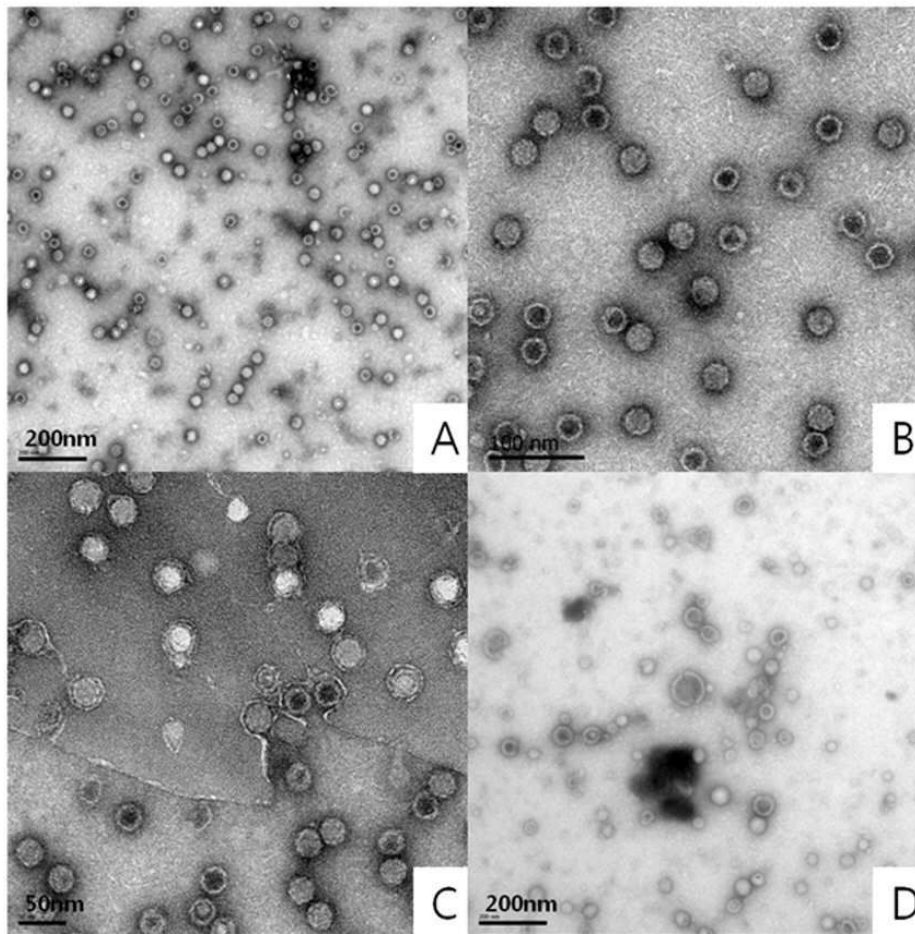
본 발명의 양송이버섯 바이러스 AbSV 진단용 특이 프라이머는 RT-PCR을 통해 PCR 산물의 생성여부를 확인하여 특정 바이러스의 존재 유무를 확인함으로써, 양송이버섯에 병을 유발하는 바이러스 AbSV의 감염 여부를 간편하고 정확하게 진단할 수 있다.

도면

도면1



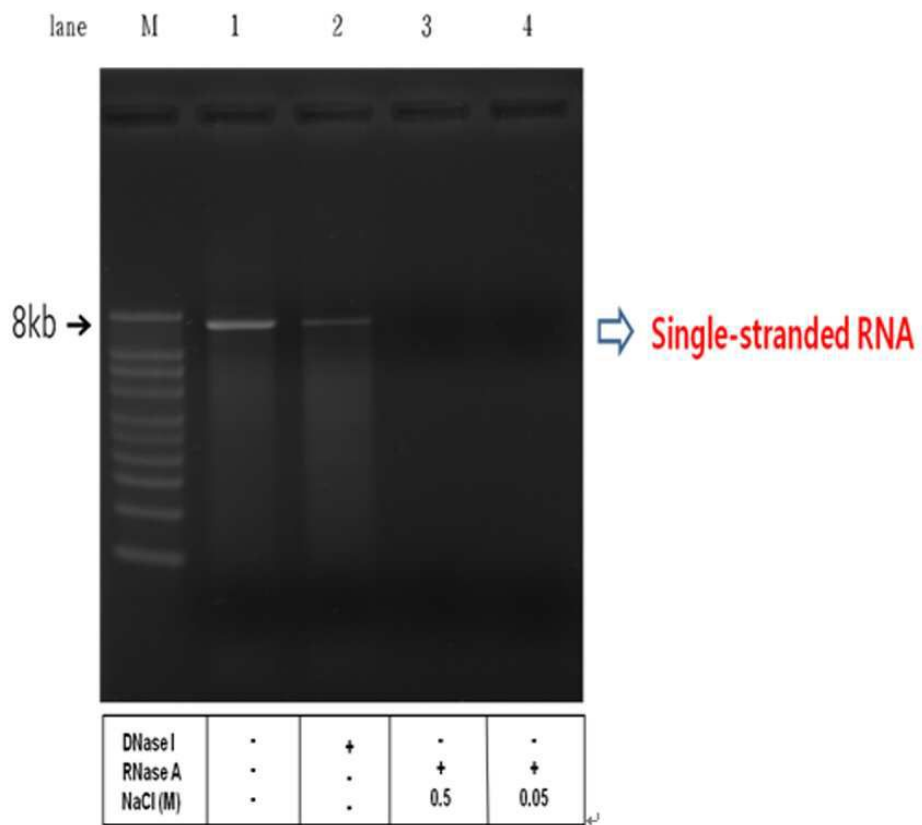
도면2



도면3



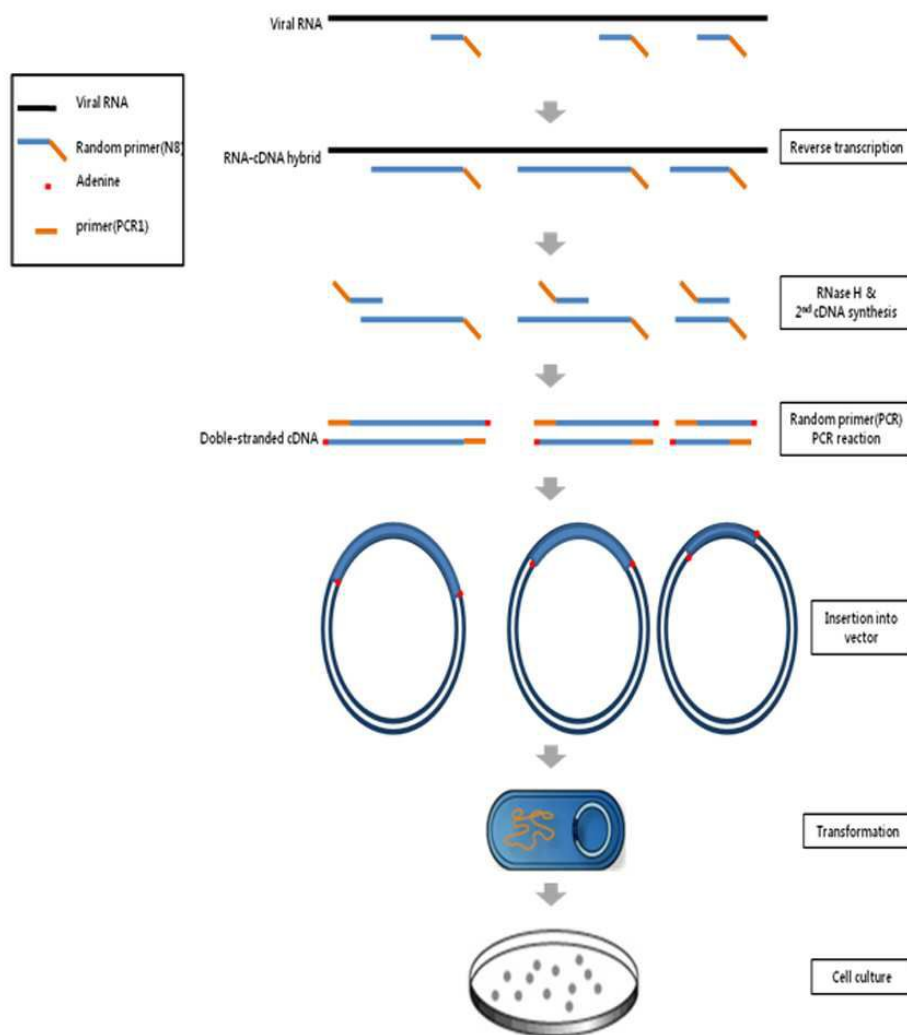
도면4



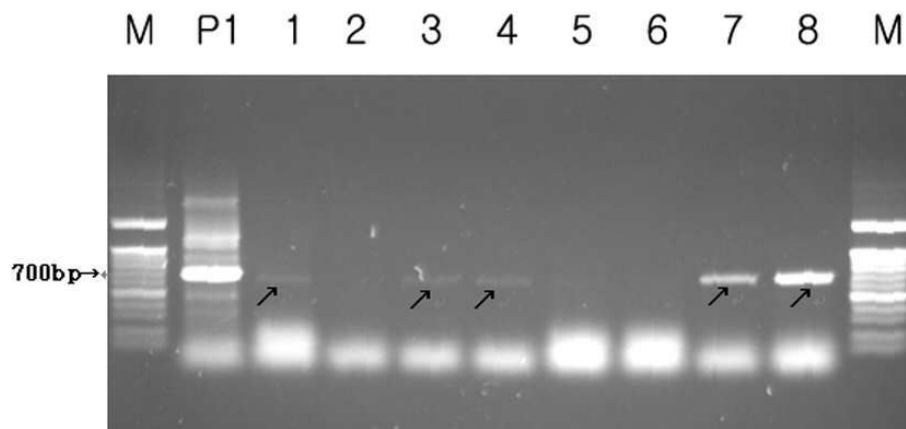
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Specific primer for diagnosing Agaricus bisporus virus AbSV, and
method for diagnosing using the same

<130> P10-08300

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 1

cccctgaaga tgataccc 18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer

<400> 2

tcattctgcca tcttctgc 18