



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0107787
(43) 공개일자 2013년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 7/00 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01) *C12Q 1/04* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0029854

(22) 출원일자 2012년03월23일

심사청구일자 2012년03월23일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

이현숙

경상남도 사천시 사천읍 159번지 동해아트빌 405호

권영철

경상남도 진주시 신안동 주공3차아파트 301-701

정동원

경상남도 사천시 노룡동 787-1

(74) 대리인

특허법인이름

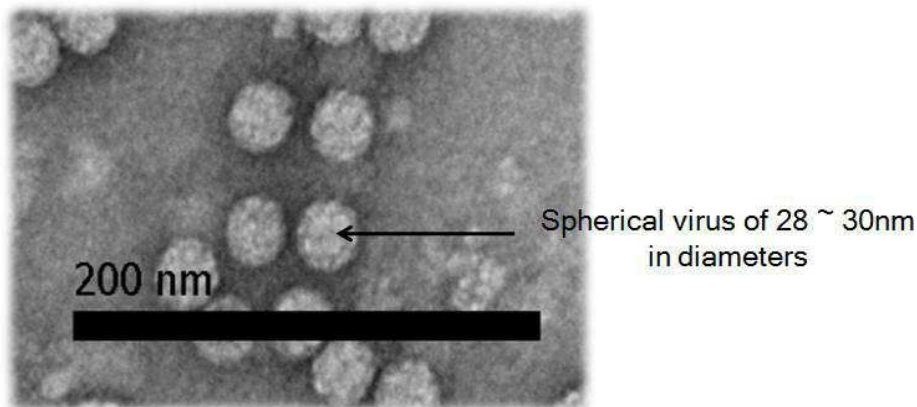
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 느타리 버섯 바이러스 P o S V 진단용 특이 프라이머, 및 이를 이용한 진단 방법

(57) 요약

본 발명은 느타리 버섯 바이러스 PoSV 진단용 특이 프라이머, 및 이를 이용한 진단 방법에 관한 것이다. 종래에는 PoSV에 감염된 느타리 버섯에서 이 바이러스를 순수 분리할 수 없어 외형적인 병징이 나타나지 않은 PoSV감염 느타리 버섯의 바이러스 검사가 어려운 점이 있었으나, 본 발명의 병든 느타리 버섯으로 부터 분리한 바이러스 PoSV 및 그 진단용 특이 프라이머는 느타리 버섯에서 병징을 내는 새로운 PoSV 바이러스를 최초로 순수분리 함으로써, 느타리 버섯에 대한 상기 바이러스 감염여부를 간편하고 정확하게 진단할 수 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 311021-3

부처명 농림수산식품부

연구사업명 생명산업 기술 개발 사업

연구과제명 버섯 (느타리, 표고) 바이러스 예방, 진단 기술 개발 및 viro-control 검정

주관기관 전북대학교

연구기간 2010.08.19 ~ 2014.08.18

특허청구의 범위

청구항 1

수탁번호 KACC 97002P로 기탁된 느타리 버섯 바이러스 PoSV(Pleurotus ostreatus Spherical Virus).

청구항 2

서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머쌍을 포함하는 느타리 버섯 바이러스 PoSV 진단용 특이 프라이머.

청구항 3

- 1) 느타리 버섯을 파쇄하여 총 알엔에이(total RNA)를 분리하는 단계;
- 2) 상기 1)단계에서 얻은 총 알엔에이(total RNA)를 주형으로 하고, 제 2항의 느타리 버섯 바이러스 PoSV 진단용 특이 프라이머를 이용하여 역전사효소 중합연쇄반응(RT-PCR)을 수행하는 단계; 및
- 3) 상기 2)단계에서 얻은 역전사효소 중합연쇄반응(RT-PCR) 산물을 대조군과 비교하여 외피 단백질(coat protein) 유전체의 존재유무를 분석하는 단계를 포함하는, 느타리 버섯 바이러스 PoSV의 감염 여부의 진단 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 3)단계에서 역전사효소 중합연쇄반응(RT-PCR) 산물을 대조군과 비교하는 방법은 아가로오스 겔 전기영동 또는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 이용하여 수행하는 것을 특징으로 하는, 진단 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 느타리 버섯 바이러스 PoSV 진단용 특이 프라이머, 및 이를 이용한 진단 방법 등에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 느타리 버섯(Oyster mushroom; *Pleurotus ostreatus*)은 한국에서 산업적으로 재배되는 버섯 중에서 가장 인기 있는 버섯으로, 농부들에게 고부가가치 작물로 인식되어, 국내 전역에서 재배되고 있다. 이런 이유로, 느타리 버섯의 재배 농가와 재배 면적이 점점 증가하고 있는 추세이지만, 재배면적이 늘어남에 따라 느타리 버섯을 가 해하는 질병과 해충의 종류가 많아지게 되었으며, 그 피해도 계속적으로 증가 하고 있다. 그 중에서 바이러스에 의한 피해는 1986년경 집단 재배지나 연작지를 중심으로 그 발생빈도가 높아 졌으며, 심한 경우 집단재배지역 전체가 재배를 실패하는 등, 그 피해가 점점 심각해지고 있지만, 이런 바이러스에 의한 피해를 줄일 수 있는 특별한 방제방법이 개발되고 있지 않는 실정이다. 1950년, 신덴 등(sinden, J. W. And E. Hauser. 1950. Mushroom Sci. 1: 96-100)은 아가리쿠스 비스포루스(*Agaricus bisporus*)라는 white-button 질병이 바이러스에 의한 버섯에 감염을 일으키는 질병이라는 것을 세계 최초로 보고하였고, 1962년에 홀딩스(Hallings, M. 1962. Nature 196: 962-965) 등은 이 질병이 바이러스 입자의 존재와 관련이 있는 것으로 보고하였다. 주요 증상은 수확 손실 및 과실체의 malfunction이 동반되는데, 프랑스에서는 이 질병을 라 프랑스 디지즈(La France disease) 또는 Die-back disease라 명명하였다.

[0003] 느타리 버섯의 바이러스 질병(Oyster mushroom malfunction : OMM)은 불명확한 원인에 의해 확산되는 가장 심각한 질병중의 하나로, 그 증상이 아주 복잡하며 질병확산 속도가 빠르고, 동일한 농장에서 질병이 재발하여 그 피해가 더 커지게 되는 특성을 가지고 있는 질병이다. 그러므로, 상업적으로 느타리 버섯을 생산하는 농장에서 OMM 질병이 발생하면 방제가 곤란할 뿐만 아니라, 수확이 완전히 손실되는 결과를 초래하기도 한다. 수년 전, 구형의 이중(double-strand RNA)가닥 바이러스가 sporophore와 spawn으로부터 분리, 보고 되었으며(Go, S. J., D. Y. Cha, and J. G. H. Weswsels. 1992. Korean J. Mycol. 20: 229-233; Goodin, M. M., B. Schlaghaufer,

and C. P. Romaine. 1992. *Phytopathology* 82: 285-290), dsRNA의 존재와 균사 성장 감소간의 상관관계가 가능하다는 것이 보고되었다(Van der Lende, T. R., M. C. Harmsen, S. J. Go, and J. G. H. Wessel. 1995. *FEMS Microbiol. Lett.* 125: 51-56). 또한 이들 바이러스들은, OMM에 감염된 느타리 버섯 및 재배된 균사체로부터 분리되었으며, spawn을 통해 내부적으로 전염되고 증상의 심각성이 환경조건에 좌우되는 것으로 추측되어졌다. dsRNA를 포함하는 바이러스는 곰팡이에서 흔하게 존재하는데, 이들은 세포 내부에서 발견될 뿐만 아니라, 자유로운 감염력이 없이 균사간의 anastomosis를 통해서만 내부적으로 전염되며, 일반적으로 곰팡이 바이러스는 숙주세포에서 cryptic 또는 latent infection을 나타낸다. Tavantzis 등은, 1980년에 막대형(bacilliform) 형태를 가지며, 가로세로가 각각 52nm, 20nm인 막대형 바이러스를 분리 하였으며, 1992년 Goodin은 직경이 26nm 및 36nm 크기의 구형인 세가지 형태의 바이러스 입자를 감염된 버섯으로부터 분리하였으며, 이 바이러스들은 여섯 개의 dsRNA를 유전체로 가지고 있었다(Goodin, M. M., B. Schlagnhauser, and C. P. Romaine. 1992, *Phytopathology* 82: 285-290). 그 이후로 대부분의 곰팡이 바이러스는 25 내지 34nm의 isometric 입자내에 개별적으로 포함되는 1개 내지 10개 절편의 이중가닥 RNA(dsRNA)로 구성된 유전체를 갖는 것으로 나타났다(Buck, K. W. 1986. *Fungal virology: An overview*. (K. W. Buck, Ed), PP 1-85. CRC press, Boca Raton, Florida).

[0004] 바이러스 감염에 의해 나타나는 느타리 버섯 바이러스 감염(OMM) 병징은 라 프랑스 디지즈에 묘사되는 것과 같이 기형적인 과실체 및 퇴화된 균사가 특징이다. OMM을 유발하는 병원균을 밝혀내기 위하여 많은 노력들이 이루어졌으나 아직까지 그 원인균은 밝혀지지 않고 있었다. 단지 병든 느타리 버섯 및 버섯의 spawn으로부터 바이러스가 분리되고, 자연 균사체 성장속도 및 dsRNA간의 가능한 상관관계가 중국(Pingyan, L., L. Hongdi, and C. Kaiying. 1990. *Mycological Research* 94: 529-537) 및 한국에서 보고된 바 있으며, 그 이후로 병든 sporophore내 바이러스(또는 바이러스-양 입자)의 존재로 인해 OMM에 대한 바이러스 병원학이 제안되었다. 이에 본 실험실에는 병든 느타리 버섯으로부터 구형의 바이러스(Oyster Mushroom Spherical Virus (OMSV): Hyun Jae Yu, Dongbin Lim, and Hyun-Sook Lee. 2003. *Virology*. 314: 9-15) 및 선형의 바이러스(Oyster Mushroom Isometric Virus (OMIV): H. S. Ro, N. J. Lee, C. W. Lee, H. S. Lee. 2006. *Journal of virological methods*. 138: 24-29)를 분리, 보고 하였고, 병든 느타리 버섯으로부터 이와 같은 곰팡이 바이러스를 진단할 수 있는 특이 프라이머 및 항체를 개발한 적이 있다.

[0005] 느타리 버섯 재배지에서의 느타리 버섯 바이러스 감염 시에는 다양한 병증이 나타나며, 균사 자체가 외부의 환경이나 병해충에 취약하게 된다. 특히 진단에도 많은 노력이 들고 특별한 방제방법도 없다. 현재 우리나라의 느타리 버섯 재배는, 보급된 원균만을 사용하여 종균 보급소에서 종균을 만들고, 농가에서는 배지조제 및 균상 관리를 충실히 하여 균상을 만드는 방식으로 느타리 버섯 재배가 행해지고 있다. 그러나, 바이러스에 감염된 종균이라 하더라도 바이러스 감염 여부를 육안으로는 구분할 수 없을 정도로 정상적으로 자라나다, 계대배양 회수가 더해질수록 생장속도가 느려지는 특징이 있어 느타리 버섯의 바이러스 감염여부의 전형적인 병증을 육안으로는 관찰할 수 없으며, 그 원인 병원균의 분리 및 동정 또한 어려운 실정이다. 느타리 버섯의 바이러스 질환 진단을 위하여 직접 현미경을 이용하는 경우 일반 광학현미경은 입자의 관찰이 불가능하고 전자현미경을 이용해야 하는데 이는 실제 적용이 곤란하다. 항체를 이용하는 방법에 있어서는 무엇보다 병을 내는 바이러스의 순수분리가 이루어지지 않아 통상적인 면역 진단키트를 통한 진단마저 불가능한 실정이라서 국내에서도 매년 느타리 버섯 바이러스 질환이 발생하지만, 그 방지대책이 미비하여 느타리 버섯 재배농가에 막대한 피해를 입히고 있는 실정이다.

[0006] 따라서, 느타리 버섯에 병을 유발하는 바이러스의 감염에 의한 피해를 줄이고, 감염된 느타리 버섯의 조기 발견 및 질병 발생의 예방을 위하여, 느타리 버섯에서 바이러스의 감염 여부를 간편하고 정확하게 진단할 수 있는 특이 프라이머의 개발의 필요성이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 느타리 버섯에서 바이러스의 감염 여부를 간편하고 정확하게 진단할 수 있는 특이 프라이머에 대해 연구하던 중, 기존에 느타리 버섯에 병을 일으키는 바이러스와는 전혀 다른 새로운 바이러스에 의한 질병의 보고를 확인하고, 그 피해 또한 막대한 것으로 조사되고 있는 느타리 버섯 감염 바이러스를 분리 하였으며, 이 새로운 바이러스를 *Plerutus ostreatus Spherical Virus* (PoSV)라 명명하고, PoSV의 단백질 및 유전체를 분석하여, 느타리 버섯 바이러스 질환을 근절시키고, 전파를 막기 위한 PoSV 검출용 특이 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 통해 여러 종류의 느타리 버섯 균주로부터 느타리 버섯 바이러스 PoSV의 감염 여부를 간편하고 정확하게

진단할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0008] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 수탁번호 KACC 97002P로 기탁된 느타리 버섯 바이러스 PoSV(Pleurotus ostreatus Spherical Virus)를 제공한다.

[0010] 또한 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머쌍을 포함하는 느타리 버섯 바이러스 PoSV 진단용 특이 프라이머를 제공한다.

[0011] 더불어, 본 발명은 1) 느타리 버섯을 파쇄하여 total RNA를 분리하는 단계; 2) 상기 1)단계에서 얻은 total RNA를 주형으로 하고, 본 발명의 느타리 버섯 바이러스 PoSV 진단용 특이 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행하는 단계; 및 3) 상기 2)단계에서 얻은 RT-PCR 산물을 대조군과 비교하여 coat protein 유전체의 존재유무를 분석하는 단계를 포함하는, 느타리 버섯 바이러스 PoSV의 감염 여부를 진단 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 3)단계에서 RT-PCR 산물을 대조군과 비교하는 방법은 아가로오스 겔 전기영동 또는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 이용하여 수행하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0013] 종래에는 PoSV에 감염된 느타리 버섯에서 이 바이러스를 순수 분리할 수 없어 외형적인 병징이 나타나지 않은 PoSV감염 느타리 버섯의 바이러스 검사가 어려운 점이 있었으나, 본 발명의 병든 느타리 버섯으로부터 분리한 바이러스 PoSV 및 그 진단용 특이 프라이머는 느타리 버섯에서 병징을 내는 새로운 PoSV 바이러스를 최초로 순수분리 함으로써 느타리 버섯에 대한 상기 바이러스 감염여부를 간편하고 정확하게 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 느타리버섯(Pleurotus ostreatus)의 정상과 여러 가지 바이러스 질병 증상을 나타낸 사진을 나타낸 것이다.

도 2는 병든 느타리버섯으로부터 분리한 바이러스들 입자의 전자현미경 사진 (PoSV)을 나타낸 것이다.

도 3는 병든 느타리버섯으로부터 분리한 PoSV 바이러스 핵산을 전기영동한 사진을 나타낸 것이다.

도 4는 분리한 바이러스 핵산을 DNase 및 RNaseA로 처리한 전기영동 사진을 나타낸 것이다.

도 5는 SDS-PAGE에 의해 분리한 바이러스 외피 단백질을 보여주는 단백질 전기영동사진을 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명 PoSV 바이러스 유전체 분석을 위한 방법의 원리를 나타내는 그림이다.

도 7은 본 발명 특이 프라이머를 이용한 RT-PCR로 느타리 버섯 파쇄액 상등액에서 분리한 Total RNA를 이용한 PoSV 바이러스 감염여부를 진단하는 그림(레인1: 음성대조군, 레인2: 양성대조군, 3-4: PoSV 바이러스 감염 버섯 및 정상 버섯, 5: 양송이버섯)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명은 신규한 느타리 버섯 바이러스 PoSV 및 이를 이용하여 개발된 느타리 버섯 바이러스 PoSV 진단용 특이 프라이머를 제공한다.

[0016] 구체적으로 본 발명은 수탁번호 KACC 97002P로 기탁된 느타리 버섯 바이러스 PoSV(Pleurotus ostreatus Spherical Virus)를 제공하고, 서열번호 1(정방향 프라이머) 및 서열번호 2(역방향 프라이머)로 표시되는 프라이머쌍을 포함하는 느타리 버섯 바이러스 PoSV 진단용 특이 프라이머를 제공한다.

[0017] 더불어, 느타리 버섯을 파쇄하여 total RNA를 분리하는 단계; 상기 단계에서 얻은 total RNA를 주형으로 하고, 본 발명의 느타리 버섯 바이러스 PoSV 진단용 특이 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행하는 단계; 및 상기 단계에서 얻은 RT-PCR 산물을 대조군과 비교하여 coat protein 유전체의 존재유무를 분석하는 단계를 포함하는, 느타리 버섯 바이러스 PoSV의 감염 여부를 진단 방법을 제공한다.

- [0018] 상기 단계에서 RT-PCR 산물을 대조군과 비교하는 방법은 아가로오스 겔 전기영동 또는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 이용하여 수행하는 것을 특징으로 하지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0019] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0020] 본 발명은 느타리 버섯에 감염되어 질병을 내는 신규한 RNA 바이러스, 이를 검출할 수 있는 진단방법 및 키트에 관한 것으로, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 병든 느타리 버섯으로부터 신규 바이러스를 순수분리 및 동정하는 단계를 포함하여, 상기 바이러스의 외피단백질 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 특이 프라이머를 개발하고, 바이러스 질병을 신속하게 감별 진단하는 방법, 이에 사용될 수 있는 진단용 키트 및 그 제조방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명에서 제공하는 바이러스 PoSV가 감염된 느타리 버섯의 병징은 매우 다양하다(도 1 참조). 가장 보편적인 병징들을 살펴보면 버섯 자실체의 형성이 늦어지고 왜소하며 대의 길이가 짧고 갓의 모양이 기형이 되면서 얇아지는 것을 볼 수 있다. 한편, 병징이 발생한 재배상에서는 버섯편조차 튀지 않는 경우가 발생하기도 하는데, 이러한 병징이 발생하면 상품가치가 없어지며 연작 피해도 나타난다. 또한, 병든 버섯의 조직을 떼어내어 고체 배지나 액체 배지에서 균사를 키우면 바이러스가 감염되지 않은 버섯의 조직에서 유래된 균사는 매우 잘 자라나 바이러스에 감염된 버섯조직에서 유래된 균사는 잘 자라지 못하였다.
- [0022] 상기와 같이, 본 발명에서 분리한 바이러스 PoSV에 의해 발생하는 버섯의 병징은 육안으로는 그 차이를 알 수 없었으며, 버섯 재배상에서 한번 병증이 나타나면 그 이후로 이 병으로부터 회복되지 못하였다. 특히, 바이러스에 감염된 종균은 육안으로는 구분할 수 없을 정도로 정상적으로 자라나 계대배양 회수가 더해질수록 균사 생장이 느려지는데, 이를 균사에서보다 버섯에서 바이러스 증식 속도가 빠르기 때문인 것으로 판단되었다.
- [0023] 병든 느타리버섯에서 신종 바이러스 분리는 가검재료의 전처리 과정, 수회에 걸친 원심분리 과정 및 염화세슘 초원심분리에 의해 이루어진다. 먼저, 병든 버섯 100g과 멸균증류수 200ml를 혼합하여 파쇄기에서 3분간 처리한 뒤, 버섯 파쇄액을 20분간 10,000g에서 원심분리하여 상등액만을 모으고, 상기 상등액에 염화나트륨 및 폴리에틸렌 글리콜을 각각 0.6M, 10%되게 처리하여 4℃에서 2시간 동안 교반하였다. 교반 후, 10,000g에서 20분간 원심분리하고 침전물을 멸균증류수에 현탁한 뒤, 다시 20분간 10,000g에서 원심분리한 후, 상등액만을 모아 SW41Ti rotor (Beckman Co.)를 사용하여 1시간 30분동안 100,000g에서 초고속 원심분리하여 부분순화된 바이러스 혼합 침전물을 얻었다. 바이러스를 순수분리 하기 위하여 20시간동안 130,000g에서 초고속 원심분리한 후, 분획장치를 이용하여 바이러스가 포함된 부분만을 분획하고, 이 용액을 멸균증류수로 24-36시간 투석하여 순수 바이러스를 얻었다. 병든 버섯에서 부분 순화된 바이러스 용액을 네거티브 염색하여 전자현미경으로 검경한 결과 많은 시료에서 바이러스 입자가 있음을 확인하였다(도 2 참조). 원심분리한 분획에 따라 전자현미경으로 구형 바이러스를 검정하였으며, 각 분획의 RNA 패턴으로 바이러스가 분리된 것임을 확인하였다. 분리된 바이러스의 입자는 직경이 약 28 - 30 nm였으며 이 바이러스를 PoSV (Pleurutus ostreatus spherical virus)라 명명하였다. 상기 바이러스는 2009년 05월 12일부터 수탁번호 KACC 97002P로 국립농업과학원 농업유전자원센터에 기탁되어 있다.
- [0024] 상기 바이러스 입자에서 유전체 핵산을 분리하여 아가로스 겔 전기영동을 수행한 결과 이 바이러스 PoSV가 존재함을 확인하였다. 이 바이러스 입자에서 추출한 핵산을 모두 DNase로 처리 하였을 때 어떠한 분해도 일어나지 않았다. RNase로 처리하였을 때는 저염 농도의 완충용액 및 고염 농도의 완충용액조건에서 분해되었다(도 4 참조). 상기 결과로부터 PoSV의 유전체는 ssRNA로 되어있음을 확인하였다.
- [0025] 바이러스 외피 단백질(coat protein)의 폴리펩티드 정보를 알기 위하여 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 수행하였다. 그 결과, PoSV 바이러스는 그 외피 단백질 조성이 한가지 종류의 폴리펩티드(단일 펩티드)로 되어 있고, 폴리펩티드의 분자량은 70 kD였다(도 5 참조).
- [0026] 이 바이러스의 유전체는 ssRNA로 구성된 구형 바이러스 입자로 구성 되었으며, 유전체의 크기는 대략 4.1 kb를 이루고 있었다. 현재까지, ssRNA를 유전체로 갖는 4kb 크기의 (+)센스의 ssRNA를 유전체(monoparite)로 갖는 막대형의 MBV(mushroom bacilliform virus)가 보고되었으며(Tavantzis, S.M., C.P. Romainem, and S.H. Smith. 1980. Virology105 :91-102), 본 발명자가 분리 보고한 OMSV (Hyun Jae Yu, Dongbin Lim, and Hyun-Sook Lee. 2003. Virology. 314: 9-15)가 있다. PoSV는 국내에서 두번째로 보고되는 ssRNA를 유전체로 갖는 구형바이러스

인 마이코바이러스이다.

[0027] 느타리버섯 병원 바이러스들의 유전체, 외피 단백질 및 입자의 크기는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0028] 바이러스 유전체, 외피 단백질 및 입자의 크기

바이러스 유전체 크기	바이러스 외피 단백질 크기	바이러스 입자의 크기
4.1kb ssRNA	70 kDa	28-30 nm

[0029] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0030] [실시예]

실시예 1. 바이러스의 분리 및 동정

[0032] 본 발명자들은 느타리버섯으로부터 바이러스의 분리 및 동정을 위해 경북 포항에서 발생된 기형버섯을 사용하였다.

[0033] 실험 1: 바이러스 입자의 분리

[0034] 본 발명자들은 바이러스 입자의 분리를 위해 병든 느타리버섯(도 1 참조) 100g의 sporophore를 0.05M Tris-Cl, 1mM EDTA, pH 8.0으로 구성된 추출 완충액에서 3분간 Waring blender로 균질화(homogenization)시킨 뒤, 10,000g에서 20분간 원심분리하여 세포찌꺼기를 제거하였다. 상등액을 10% 폴리에틸렌글리콜(PED) 6000 및 0.6M NaCl에서 밤새도록 교반 시킨 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)으로 사용하였다. 부분순화된 바이러스 재료 1ml를 TE 완충액으로 조제된 1.585g/cm³ 염화세슘에 로딩한 후, Beckman Type 90Ti 로터를 사용하여 130,000g에서 20시간 동안 isopycnic 원심분리를 수행하였다. 구배는 750ul로 분획화되었으며, 상기 분획은 TE 완충액을 2번 바꾸며 24 - 36시간 동안 투석시킨 후, 130,000g에서 90분 동안 원심분리하였다. 원심분리에 의한 추출물을 TE 완충액에 재현탁시키고 -20℃에서 냉동보관하였으며, 각 분획에 대해 바이러스 입자, 바이러스 RNA 및 외피 단백질을 분석하였다.

[0035] 실험 2: 바이러스 입자의 전자현미경 관찰

[0036] 본 발명자들은 상기 실험 1에 의한 각 분획의 바이러스 입자를 폼바-코팅된 400-메쉬 구리 그리드상에 배양한 수 2(w/v) 아세트산 우라늄, pH4.5로 염색한 후, 그리드를 JEOL 모델 200 TEM으로 조사하고, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에 나타난 바와 같이, 느타리 버섯 구형 바이러스(Plerutus ostreatus spherical virus, PoSV) 구형 입자 크기는 각각 28 - 30 nm (막대는 200nm를 나타낸다) 이었다.

- [0037] 실험 3: 바이러스 핵산 분리 및 동정
- [0038] 본 발명자들은 페놀 및 페놀/클로로포름/이소아밀 알코올(25 : 24 : 1, v/v/v) 추출법을 사용하여 순수 분리된 바이러스로부터 바이러스 핵산을 분리하였다. 추출된 바이러스 핵산(RNA)는 에탄올로 침전시킨 후, 0.04% 브로모페놀 블루, 0.04% 자일렌 시아놀 FF 및 5% 글리세롤로 조정하여 1% 아가로스 젤로 분리하였다(도 3 참조). 전기영동은 50V에서 8시간 동안 수행하였으며, 이때의 전기영동 완충액은 에테디움 브로마이드 (0.5 ug/ml) 40mM 을 포함하는 Tris-아세트레이트 및 1mM EDTA, pH7.5를 이용하였다.
- [0039] 도 3에 나타난 바와 같이, M은 ssRNA 사이즈 마커이며 분획 7, 8, 및 9는 PoSV를 나타내었다. 바이러스 유전체 핵산형태를 판별하기 위하여, 뉴클레아제에 대한 민감성을 조사하였다(도 4 참조).
- [0040] 구체적으로, DNase 및 RNase에 대한 민감성을 결정하기 위하여 바이러스 핵산을 각각 10 unit/ml DNaseI (RNase free, Promega) 및 10 mg/ml RNase를 사용하여 37℃에서 30분 동안 50mM Tris-Cl, 10mM MgCl, pH7.5에서 배양하였다. dsRNA의 존재를 테스트하기 위하여 RNase를 첨가하기 전에 핵산 용액에 NaCl을 첨가하여 농도가 0.5M이 되게하였다. 상기 모든 세가지 타입의 핵산은 DNase 처리에는 저항성이 있으나, 염농도에는 관계없이 RNase처리에 민감하였다. 도 4는 느타리 버섯으로부터 추출한 바이러스 핵산의 전기영동사진으로, 레인 1은 뉴클레아제 처리 없이, 레인 2는 DNase I(10u/ml), 레인 3는 RNaseA (0.5 NaCl 내 10mg/ml), 레인 4는 RNaseA (0.05 NaCl 내 10mg/ml)로 각각 37℃에서 30분 동안 처리한 후, 전기영동한 결과를 나타낸 것이다. 상기 결과로부터 PoSV 유전체는 ssRNA 로 구성됨을 확인하였다. 바이러스 입자로부터 추출한 ssRNA의 패턴은 아가로스 젤상에서 일정하게 관찰되었는데, PoSV는 약 4.1kb ssRNA를 가지고 있음을 확인하였다.
- [0041] 실험 4: 바이러스 외피 단백질의 분석
- [0042] 본 발명자들은 Laemmli (Laemmli, U.K.1970.Natur (London) 227: 680-685)가 개시한 불연속 완충 시스템을 사용하여 폴리펩티드를 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동으로 분리하였다.
- [0043] 구체적으로, 전기영동 전에 단백질을 95℃, 5분 동안 50mM Tris-Cl, pH6.8, 100mM 디티오쓰레이톨 (dithiothreitol), 1% SDS, 10% 글리세롤, 0.1% 브로모페놀 블루에서 변성시켰다. 변성된 단백질을 4% 스테킹 젤 및 12% 분리 젤을 갖는 0.75mm두께의 폴리아크릴아미드 젤 상에서 분리하였다. 10% 아세트산 및 45% 메탄올 용액에서 1.25 mg 쿠마씨 브릴리언트 블루 R-250을 사용하여 적어도 30분 동안 젤을 염색한 후 동일한 용액에서 탈색시켰으며, 바이러스 외피 단백질을 SDS-폴리아크릴아미드에 전기영동한 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에 나타난 바와 같이, 바이러스 외피단백질은 단일 폴리펩티드로 70kD 크기의 폴리펩티드로 구성됨을 확인하였다.
- [0044] **실시예 2. 바이러스 진단키트의 제조**
- [0045] 본 발명자들은 바이러스 진단 키트의 제조를 위해, 바이러스를 순수분리하고, 이를 이용하여 ssRNA를 추출하였으며, 분리된 ssRNA의 중요한 유전자인 RNA dependent RNA polymerase (RdRp) 유전체 및 coat protein (CP) 유전체를 분석하였다.
- [0046] 실험 1: 바이러스 순수분리
- [0047] 본 발명자들은 바이러스 PoSV의 순수 분리를 위해, 병든 버섯을 0.5M Tris-Cl(pH 7.0), 1mM EDTA(pH 7.0), 0.5% 머캡토에탄올이 포함된 완충액에서 3분간 파쇄기로 균질화 시킨 뒤, 6000g에서 원심분리하여 세포찌꺼기를 제거하였다. 상등액을 10% 폴리에틸렌글리콜과 0.6M NaCl에서 밤새도록 교반한 후, 6,000g에서 원심분리하였다. 침전물을 0.05M Tris-Cl(pH 7.0)/1 mM EDTA(pH 7.0)가 포함된 완충액으로 현탁하여 10,000g에서 원심분리하고, 상등액을 100,000g에서 1시간 30분 동안 초원심분리하여 바이러스 입자의 침전물을 얻었다. 상기 침전물을 같은

완충액에서 밤새도록 현탁하였고, 바이러스 입자들을 10-60% 수크로스 밀도구배에서 16시간 동안 초원심 분리하여 바이러스가 포함된 분획을 구배분획기(gradient fractionator)를 사용하여 분획하였다. 이렇게 얻은 바이러스 입자를 다시 50% CsCl(1.583g/cm³)에서 초원심분리(130,000g, 2.5hr)하여 0.75ml씩 분획하였다. 각 분획을 30시간 동안 2회 투석하고 1% 아가로스 젤 전기영동으로 바이러스가 포함되어있는지를 검정하였다. 바이러스 농도는 260nm에서 측정하였으며, 바이러스 순도는 260nm 및 280nm에서 OD값을 구하여 E260/E280이 1.65일 때를 순수 분리되었다고 확인하였다.

[0048] 실험 2 : 순수분리된 바이러스로부터 ssRNA 추출

[0049] 본 발명자들은 페놀 및 페놀/클로로포름/이소아밀 알코올(25 : 24 : 1, v/v/v) 추출법을 사용하여 순수분리된 바이러스로부터 바이러스 핵산을 분리하였다. 분리된 바이러스 ssRNA 부유액에 DNase를 처리하여 DNA의 오염을 완전히 제거하고, DNA의 오염이 완전히 제거된 ssRNA를 이용하여 tagged random 프라이머를 이용하여 역전사 반응을 통해 cDNA를 합성하였다.

[0050] 이때, 10x 역전사 완충액 dNTP, 역전사효소 (Promega) 및 tagged random 프라이머를 첨가하여 42℃에서 1 시간 반응시켜 cDNA를 합성시켰다. cDNA를 합성시킨 후, RNase H를 이용하여 RNA 가닥을 제거하고, 65℃, 5분간 조건으로 역전사효소를 제거시켰다. 이렇게 합성된 cDNA 일부분을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 수행 조건은 cDNA, dNTP, 10x PCR 완충액, EX taq DNA 중합효소, 및 3차 멸균 증류수를 이용하여 수행하였다(94℃/30 sec, annealing: 60℃/30 sec, extension: 72℃/1 min, total reaction: 35 cycles). PCR 수행 후, PCR 정제 키트를 이용하여 정제하고, 대장균을 숙주로 하여 PCR 산물을 대량 생산이 가능한 pGEM-T easy (Promega) 벡터에 삽입시켰다. 바이러스 유전체가 삽입된 pGEM-T easy 벡터를 대장균 DH10b/r 숙주에 형질전환시켜, 대장균을 대량 배양 시켰다. 대장균 DH10b/r 를 대량 배양 후, 바이러스 유전체가 삽입되어 있는 대장균을 제한효소인 EcoRI으로 확인하고, 자동염기서열 분석 장치를 통하여 PoSV 바이러스 유전체 일부를 동정하였다. 특히, ssRNA의 중요한 유전자인 RNA dependent RNA polymerase (RdRp) 유전체 및 coat protein (CP) 유전체를 분석하였다.

[0051] 실험 3 : RdRp 유전체로부터 PoSV 바이러스를 특이적으로 진단할 수 있는 프라이머의 개발

[0052] 본 발명자들은 상기 실험 2에 나타난 바와 같이, 자동 염기서열 분석장치를 이용하여 PoSV coat protein을 분석 후, 느타리 바이러스 PoSV를 특이적으로 선택할 수 있는 프라이머를 디자인하고 표 2에 나타내었다.

표 2

[0053] PoSV 진단용 특이 프라이머

	프라이머 이름	서열
서열번호 1	PoSV coat protein primer F	GATCCGGTAGTAGAGCCAGTCC
서열번호 2	PoSV coat protein primer R	TTCGGTGACACCCACGACAACCTG

[0054] 실험 4 : 특이 프라이머를 이용한 여러 종류의 *Pleurotus ostreatus*로부터의 역전사효소 중합연쇄반응(Reverse transcription-Polymerase chain reaction, RT-PCR)

[0055] 본 발명자들은 상기 실험 2와 같은 방법으로 PoSV의 감염이 의심되는 느타리 버섯 및 건전 버섯(바이러스감염이 일어나지 않은 virus-free 버섯)으로부터 특이 프라이머를 이용한 진단을 실시 하였으며, 감염된 느타리 버섯으로부터 분리한 PoSV 유전체를 양성 대조로 사용하였다.

[0056] 구체적으로, 느타리 버섯을 액체 질소로 이용하여 파쇄한 후, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 상등액을 분리하였다. 이때 건전 버섯으로부터 분리된 총 알엔에이(total RNA)를 음성 대조군으로 이용하였다. 분리된 상

등액으로부터 트라이졸(Trizol)을 이용하여 느타리버섯의 총 알엔에이(Total RNA)를 추출하였고, 추출된 느타리버섯 총 알엔에이(Total RNA)를 주형으로 사용하여, 특이 프라이머 서열번호 2(역방향 프라이머)의 PoSV coat protein primer R을 이용하여 역전사 시켰다. 이때, 역전사는 상기 실험 2 와 같은 방법으로 실시하였다. 생성된 cDNA를 이용하여 특이 프라이머 서열번호 1(정방향 프라이머)의 PoSV coat protein primer F를 이용하여 PCR을 상기 실험 2의 방법으로 수행하였다. PCR 수행 후, 1% 아가로스 겔에서 전기영동을 실시하고, 양성 대조군 및 음성 대조군에 비교하여 PoSV ssRNA의 외피 단백질(coat protein) 유전체의 존재유무를 확인하였다.

[0057] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해되어야 한다.

수탁번호

[0058]

기탁기관명 : 국립농업과학원 농업유전자원센터

수탁번호 : KACC97002P

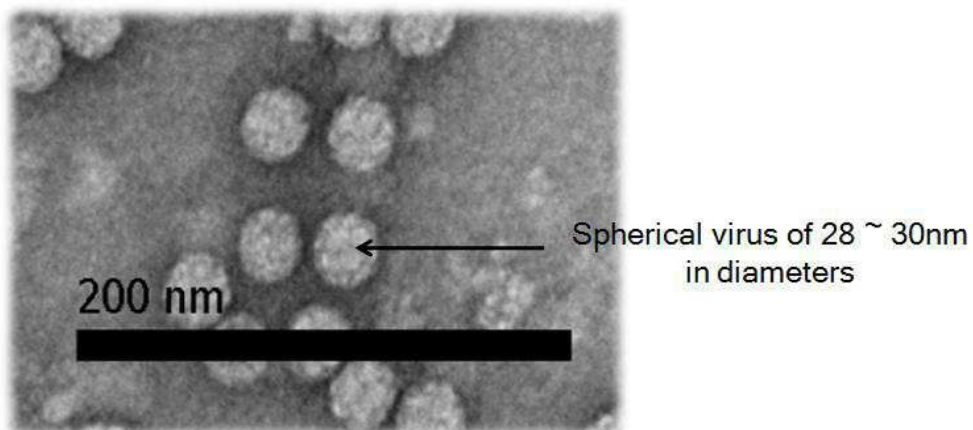
수탁일자 : 20100211

도면

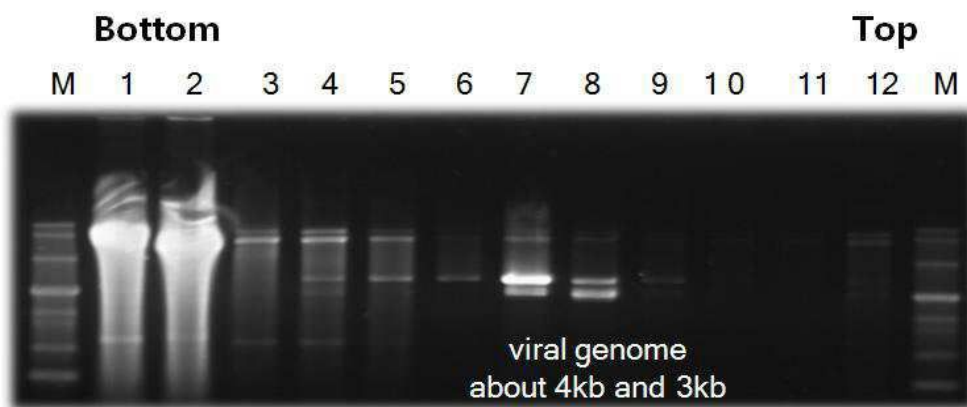
도면1



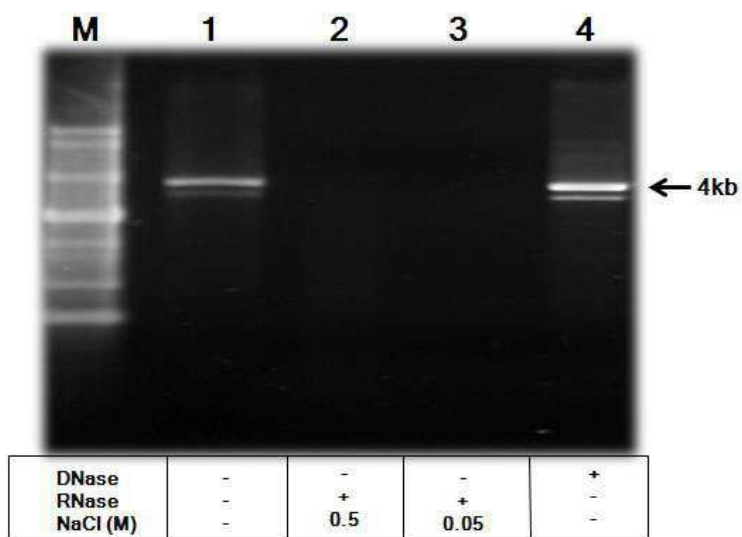
도면2



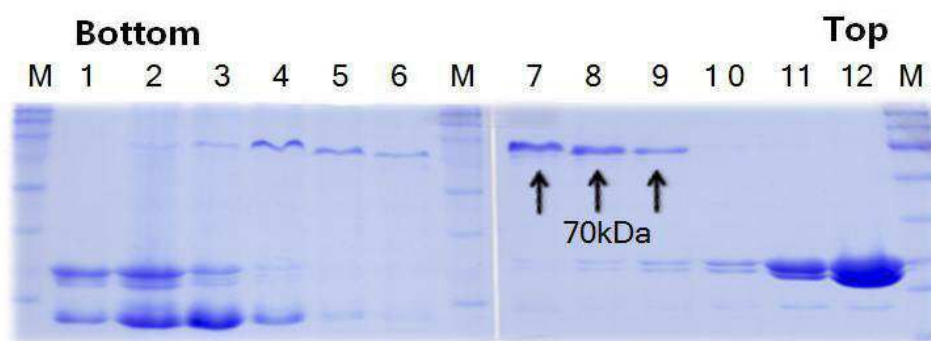
도면3



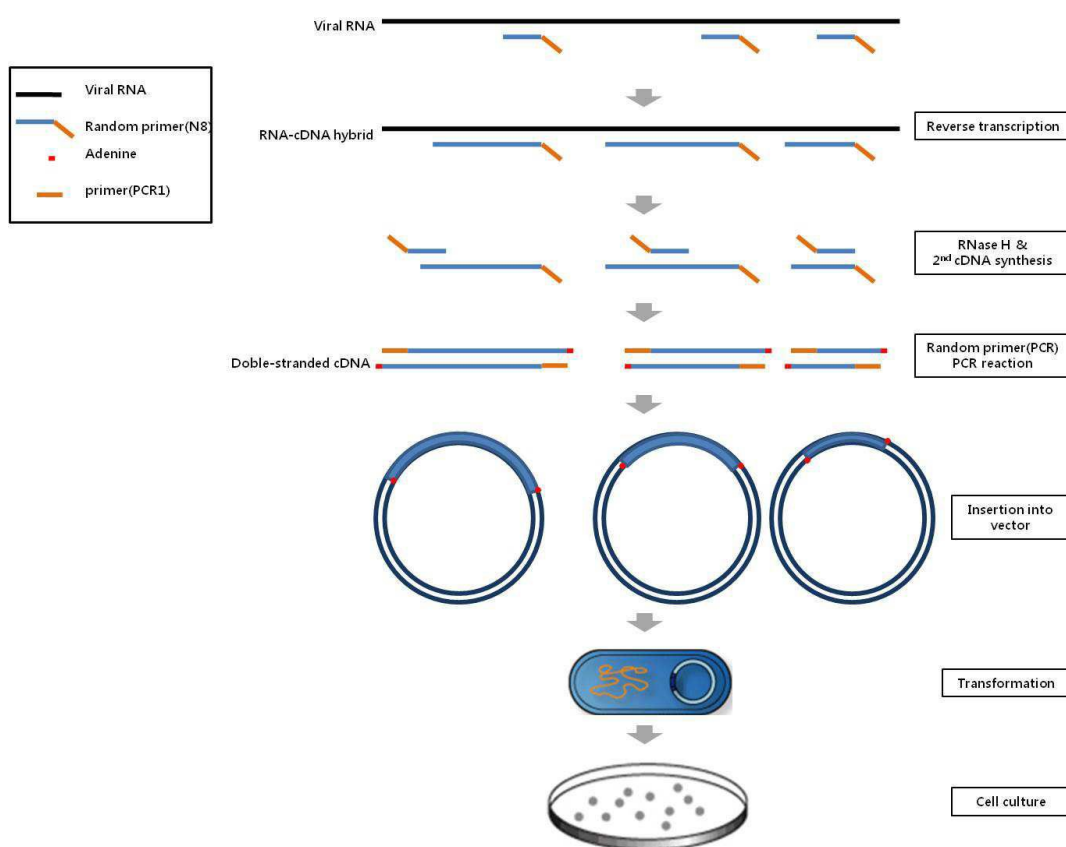
도면4



도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Specific primer for diagnosing Pleurotus ostreatus virus PoSV,

and method for diagnosing using the same

<130> PB11-10384

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PoSV coat protein primer F

<400> 1

gatccggtag tagagccagt cc

22

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PoSV coat protein primer R

<400> 2

ttcgggtgaca cccacgacaa ctg

23