

GOVP1200609934

최종
연구보고서

꿀벌 세균성 질병의 신속검색법의 개발

Development of Rapid Detection Method for
Bacterial Honeybee Diseases

경기대학교 (주관)

제주대학교 (협동)

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “꿀벌 세균성 질병의 신속검색법의 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 11 월 14 일

주관연구기관명 : 경기대학교
총괄연구책임자 : 윤 병 수
세부연구책임자 : 윤 병 수
연 구 원 : 한 상 훈
연 구 원 : 이 도 부
연 구 원 : 이 혜 민
협동연구기관명 : 제주대학교
협동연구책임자 : 임 윤 규

요 약 문

I. 제 목

꿀벌 세균성 질병의 신속검색법의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

양봉산업의 생산성 향상을 위하여 가장 직접적으로 중요한 것은 꿀벌 질병에 대한 적절한 방제와 고품질 제품의 생산이다. 꿀벌의 질병은 매우 다양하여, 크게 감염성 질병과 기생성 질병으로 나눌 수 있으며, 이는 또한 그 병인체에 따라 세균성 질병(미국 및 유럽 부저병), 바이러스성 질병 (낭충봉아부패병, 마비병), 원생동물성 질병 (노제마병), 진균성 질병(백목병, 석고병), 기생성 질병 (응애, 진드기) 등으로 나누어진다. 이들 다양한 질병에 의하여 봉군은 궤멸적 피해를 입을 수도 있으며, 많은 경우 그 생산성에 결정적 피해를 입히게 된다.

꿀벌은 현재 “수의사법 (법률 제 3441호)” 및 “가축전염병예방법 (법률 제 3548호)” 에 의하여 수의사의 직무대상 “동물” 및 신고대상 “가축” 으로 규정되어 있다. 그 중 특히 꿀벌의 부저병은 제 1종 가축 법정전염병으로 규정되어 있다 (수의사회지. 87년 5월, 289-301). 이는 다른 가축전염병과 같이 꿀벌전염병의 방역도 철저히 국가관리 하에 주도되어야 할 것임을 의미하나, 현재 꿀벌의 질병은 양봉산업의 특성 상 주생산지가 오지인 점 등의 이유로 근래 이전까지는 국가관리하의 방역대상 질병으로 적절한 대처를 받지 못하고 있었다.

현재, 부저병으로 인한 피해지역의 최소화를 위한 방법으로 테트라사이클린과 같은 항생제를 사용하는 것이 유일한 대처방안이며, 양봉현장에서의 질병확인은 양봉인의 자가 진단으로 이루어지고 있다는 것과 더불어, 이는 항생제의 오용 및 남용의 위험성을 가지게 된다. 이에 꿀벌의 사양에서 가장 직접적인 피해를 주고 있고 생산성을 크게 좌우하고 있는 세균성질병의 적절한 방제를 위한 실용적인 진단키트, 즉, 미국부저병 및 유럽부저병 진단 PCR kit 및 ELISA kit, Rapid kit 등을 개발하여, 항생제의 오용 및 남용을 합리적으로 억제함으로써 국내생산 벌꿀의 고품질화게 기여하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 우리나라의 꿀벌 세균성 질병에 관한 연구를 위해 미국 부저병 및 유럽 부저병의 세균성 질병을 정확히 검색해 낼 수 있는 검색용 PCR-kit 및 검색용 ELISA kit를 개발, 생산하여 제품화하고, 현장에서 미국 부저병 등 세균성 질병을 간단히 검색해 낼 수 있는 Rapid kit (Lateral flow chromatography법)를 개발, 생산하는 것을 목표로 하였다.

연구 내용을 요약하여 기술하면 아래와 같다.

유럽부저병 진단용 PCR 진단키트의 제작에서는, 원인균인 *M. pluton*를 혐기 배양하고 16s rDNA를 사용한 특이 primer를 제작하여 유전자를 검출해 냈으며, 이는 sequencing을 통해 확인되었다. 확인된 염기서열을 바탕으로 특이성, 민감성이 높은 특이 primer를 새롭게 제작하였고, 이는 대조 균주들의 인공 DNA 환경 조성에서 특이성이 입증되었다. *M. pluton*의 template농도에 따른 PCR의 감도를 확인한 결과 1,000 정도의 template가 존재할 때 PCR 진단이 가능한 것으로 확인되었다.

유럽부저병 진단용 ELISA 및 rapid kit의 제작을 위해, 체내에서 아포의 상태로 존재하는 *M. pluton*를 검출하기 위해, 배양된 세균을 아포가 형성되도록 처리하고, 형성된 아포를 회수하여 면역원으로 사용하였다. BALB/c 마우스에 면역시켜 얻어낸 단클론항체는 유럽부저병의 원인균인 *Melisococcus pluton*을 특이적으로 검출하였으며, 이들 단클론항체의 pair를 조합하여 ELISA kit을 개발하였다. 이는 민감도가 95.7%, 특이도가 100%인 것으로 우수성이 입증되었다.

유럽부저병 진단용 Rapid kit의 개발은 아포화 된 면역원으로부터 얻어낸 단일클론항체를 이용하여 Colloidal-gold와 접합체로서 제작하여, immuno-chromatographic assay kit에 적용하였다. 이는 민감도 87.0%, 특이도가 100% 이상인 것으로 확인되었다.

미국부저병 진단용 PCR 진단키트의 제작에서는, 원인균인 *P. larvae*를 배양하고 16s rDNA를 사용한 특이 primer를 제작하여 유전자를 검출해 냈으며, 이는 sequencing을 통해 확인되었다. 확인된 염기서열을 바탕으로 특이성, 민감성이 높은 특이 primer를 새롭게 제작하였고, 이는 대조 균주들의 인공 DNA 환경 조성에서 특이성이 입증되었다. *P. larvae*의 template농도에 따른 PCR의 감도는 Real-Time PCR 검출법에서 단지 2 copy의 template가 존재할 때에도 확인되는 것으로 매우 민감성이 뛰어난 것을 확인하였다.

미국부저병 진단용 ELISA 및 rapid kit의 제작을 위해서, 체내에서 아포의 상태로 존재하는 *P. larvae*의 검출을 위해, 배양된 세균을 아포가 형성되도록 처리하고, 형성된 아포를 회수하여 면역원으로 사용하였다. BALB/c 마우스에 면역시켜 얻어낸 단클론항체는 미국부저병의 원인균인 *P. larvae*를 특이적으로 검출하였으며, 이들 단클론항체의 pair를 조합하여 ELISA kit을 개발하였다. 이는 민감도가 96.0%, 특이도가 100%인 것으로 우수성이 입증되었다.

미국부저병 진단용 Rapid kit의 개발은 아포화 된 면역원으로부터 얻어낸 단일클론항체를 Colloidal-gold와 접합체로서 제작하여, immuno-chromatographic assay kit에 적용하였다. 이는 민감도 87.0%, 특이도가 100% 이상인 것으로 확인되었으며, 새로이 개발된 Rapid kit은 특이도와 민감도가 높은 현장적용 실시간 검출방법으로서 일선 양봉현장에서 편리하게 응용될 것으로 기대된다.

현재 국내에 꿀벌 질병 발생을 신고하고, 검사를 의뢰하고 결과를 통보받을 수 있는 시스템이 실질적으로 기능하지 못하고 있으나, Rapid kit의 개발은 현장에서 별도의 측정기기 없이 바로 판정이 가능하다는 장점을 가지고 있어 주로 오지에 분포하는 양봉현장에서도 신속, 정확하게 질병을 진단할 수 있게 할 것으로 사료된다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구과제의 결과로서 다음에 나열된 꿀벌 질병 및 벌꿀 진단용 키트 6종을 개발하였다. ① 유럽 부저병 진단용 PCR kit, ② 미국 부저병 진단용 PCR kit, ③ *M. pluton* spore 검출용 Sandwich ELISA kit, ④ *P. larvae* spore 검출용 Sandwich ELISA kit, ⑤ *M. pluton* spore 검출용 Rapid kit, ⑥ *P. larvae* spore 검출용 Rapid kit 등으로 현재 시제품 개발완성의 단계까지 와있는 수준이다. 이들은 물질특허의 대상이며, 본 과제에 의해 개발되는 kit는 모두 참여기업인 (주)진클론이 상품화를 진행해 나가게 될 것이다. 세균성 질병 원인균에 대한 PCR 진단 kit 및 ELISA 진단 kit의 개발은 꿀벌 질병에 대해 실험실적인 정확하고 신속한 진단을 가능하게 하였으며, 양봉현장에서 직접적으로 진단이 가능한 Rapid kit의 개발은 양봉인에게 보급하여 자가 진단의 정확성을 높여 치료제의 오용 및 남용을 방지하는 방법으로 사용되어 현장애로 해결의 좋은 예가 될 것이다.

SUMMARY

I. Title

Development of Rapid Detection Method for Bacterial Honeybee Diseases

II. Necessity for Research and Development

For improvement of productivity in Bee-farming, the most important thing is a proper prevention of honeybee disease and a production of high quality manufactures. Honeybee disease is various and largely classified into an infectious disease and a parasitic disease. These are also grouped into bacterial(American foulbrood, European foulbrood), virus(Sacbrood, Bee-Paralysis), protozoan(Nosema), fungal(Chalkbrood, Stonebrood), and parasitic(mite, acarid) disease. These diseases may do great damage to bee-farming and subsequently result in critical loss of productivity in many cases.

Of these honey diseases, especially, foulbrood is prescribed as first-class legal communicable disease. Although this fact means that honeybee disease is also strictly controlled by the government like other domestic animals', honeybee disease was not managed as a government-controlled disease before recent years because of the geographical necessity, which bee-farming is mostly cultivated at up-country.

Currently, usage of antibiotics, like tetracycline, is unique confrontation to minimize local damages by foulbrood and a fact that the diagnosis of honeybee disease at the field is achieved by farmers suggest the possibility of misuse or abuse of antibiotics. Hence, the object of this project is to develop practical diagnostic kits of a bacterial honeybee disease and to contribute to preventing the outbreak of the disease and effectively controlling misuses and abuse of antibiotics in bee-farming.

III. Contents and range of research and development

The object of the project is the development and production of PCR and ELISA Kit for specifically detecting American Foulbrood (AFB) and European Foulbrood (EFB). In addition, the development and production of Rapid Kit (Lateral Flow Chromatography Method), enabling to diagnose bacterial honeybee disease rapidly and easily in the field of bee-farming is also included in the project.

Contents of the research is as follow;

PCR Kit manufacture for EFB: the causative bacteria, *M. pluton* was cultured anaerobically and then its gene fragment for identification was analyzed by PCR with a specific primer set based on 16s rDNA sequence of the bacteria. The whole sequence of the PCR product was identified by automatic sequencing analysis. Based on the identified sequence of the bacteria, high specific and sensitive primer set was designed newly and then tested to prove these properties under artificial condition, like with various DNA contaminants of other bacteria. On a result of test for PCR sensitivity by the concentration of *M. pluton* template DNA, it is verified that PCR diagnosis is reliable under the presence of 1,000 copies of template DNA.

ELISA and Rapid Kit manufacture for EFB: for the detection of *M. pluton* existing in bee's body as a spore, the bacterial culture was induced into sporulation and then collected bacterial spores were used in mouse immunization. The monoclonal antibodies produced by immunizing into BALB/c mouse was able to detect *M. pluton* specifically and ELISA Kit was developed by assembly of these monoclonal antibodies pair. The sensitivity of the kit was 95.7% and the specificity was 100%. Development of Rapid Kit for the bacteria is achieved by application of immunochromatographic assay kit with conjugator of specific monoclonal antibodies and Colloidal-gold. The sensitivity and specificity are 87.0% and 100%, respectively.

PCR Kit manufacture for AFB: the causative bacteria, *P. larvae* was cultured and then its gene fragment for identification was analyzed by PCR with a specific primer set based on 16s rDNA sequence of the bacteria. The whole sequence of the PCR product was identified by automatic sequencing analysis. Based on the identified sequence of the bacteria, high specific and sensitive primer set was designed newly and then tested to prove these properties under artificial condition, like with various DNA contaminants of other bacteria. On a result of test for PCR sensitivity by the concentration of *P. larvae* template DNA, this PCR detection showed outstanding result as PCR diagnosis is reliable under the presence of only 2 copies of template DNA.

ELISA and Rapid Kit manufacture for AFB: for the detection of *P. larvae* existing in bee's body as a spore, the bacterial culture was induced into sporulation and then collected bacterial spores were used in mouse immunization. The monoclonal antibodies produced by immunizing into BALB/c mouse was able to detect *P. larvae* specifically and ELISA Kit was developed by assembly of these monoclonal antibodies pair. The sensitivity of the kit was 96.0% and the specificity was 100%. Development of Rapid Kit for the bacteria is achieved by application of immunochromatographic assay kit with conjugator of specific monoclonal antibodies and Colloidal-gold. The sensitivity and specificity are 87.0% and 100%, respectively.

These newly developed two Rapid Kits are highly specific and sensitive agents for a

real-time field-application, and are expected to facilitate the field test in bee-farming

Nowadays, the domestic system, which administrates the outbreak reports, diagnosis, and informing of the result, does not properly function. Therefore, the development of Rapid Kit for honeybee disease diagnosis is considered that bee-farmers living in the up-country are able to diagnose honeybee disease fast and exactly with these Rapid Kit because they do not need any device for diagnosis.

IV. Results of research and development, and a suggestion for the its application

As the result of the research, six kinds of kit was developed for honeybee disease detection from honeybees and honeybee products as follows; ① PCR Kit for EFB detection, ② PCR Kit for AFB detection, ③ Sandwich ELISA Kit for *M. pluton* spore detection, ④ Sandwich ELISA Kit for *P. larvae* spore detection, ⑤ Rapid Kit for *M. pluton* spore detection, and ⑥ Rapid Kit for *P. larvae* spore detection. These are almost ready for mass production. These are all objects of patent, and all kits developed by this project will be commercialized by Geneclone Inc. which took part in the project. The development of diagnostic PCR and ELISA Kit for bacterial honeybee disease made precise and fast diagnosis of the disease be possible in laboratories and development of Rapid Kits a good example of solution for a field problem in the control of honeybee disease when the kits are distributed to farmers because they can be used to diagnose disease directly in the field of bee-farming by farmers themselves.

CONTENTS

- Chapter 1 An outline of Research and Development / 1 3
1. The object of Research and Development / 13
 2. The Necessity and Range of Research and Development / 13
- Chapter 2 The Present State of Outside and Inside of the Country / 16
1. The Present Technical State and Problem / 16
 2. The Status of the Result of Research and Development / 16
- Chapter 3 The Result of Research and Development / 18
1. The Development of PCR Detection Method for Bacterial Honeybee Disease / 18
 - (1) The Production of PCR Kit for European Foulbrood / 18
 - (2) The Production of Real-Time PCR Kit for European Foulbrood / 29
 - (3) The Development of Multiplex PCR and Rapid PCR Detection Method for *M. pluton*, *P. alvei* and *B. subtilis* / 34
 - (4) The Production of PCR Kit for *Paenibacillus larvae* using 16S rDNA / 38
 - (5) The Rapid Diagnosis of *Paenibacillus larvae subspecies larvae* using Real-Time PCR / 50
 2. The Development of ELISA Kit for Bacterial Honeybee Disease / 58
 - (1) The Development of Sandwich ELISA for *P. larvae* spore Detection / 62
 - (2) The Development of Sandwich ELISA *M. pluton* spore Detection / 66
 3. The Development of Rapid Kit for Bacterial Honeybee Disease / 71
 - (1) The Development of Sandwich ELISA for *P. larvae* spore Detection / 74
 - (2) The Development of Sandwich ELISA *M. pluton* spore Detection / 75
 3. Research in other Honeybee Disease / 76
 - (1) The Development of PCR Detection Method for Fungal Honeybee Disease / 76
 - (2) The Effect of Antifungal agent Albofix for Growth Hinderance of *Ascospaera apis* / 85
 - (3) The Effect of Antifungal agent Albio K and Pure Wild Organo Oil for Growth Hinderance of *Ascospaera apis* / 95
- Chapter 4 The Extent of Achievement and Contribution to Related Study / 105
1. The Extent of Achievement based on Annual Object and Evaluation Points / 105
 2. The Extent of Contribution to Related Study / 110
- Chapter 5 The Application Plan of the Result / 112

1. Necessity of Additional Research /112
2. The Application of The Result of Research and Development/112
3. The Business Plan for the Result of Research and Development/112

Chapter 6 Reference/114

목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요/13
 - 제 1 절 연구개발의 목적/13
 - 제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위/13

- 제 2 장 국내외 기술개발 현황/16
 - 제 1 절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점/16
 - 제 2 절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치 /16

- 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과/18
 - 제 1 절 꿀벌 세균성질병 진단용 PCR kit의 개발/18
 - 제 1 항 유럽 부저병 PCR 진단키트의 제조/18
 - 제 2 항 유럽 부저병 (European foulbrood)의 Real-time PCR 진단법 개발/29
 - 제 3 항 *M. pluton*, *P. alvei*와 *B. subtilis*의 Multiplex PCR과 Rapid PCR 진단법의 개발/34
 - 제 4 항 미국부저병 원인균인 *Paenibacillus larvae* 16S DNA를 사용한 PCR 진단 kit의 제조 /38
 - 제 5 항 Real-Time PCR을 이용한 미국 부저병 원인균인 *Paenibacillus larvae subspecies larvae*의 신속 진단/50
 - 제 2 절 꿀벌 세균성질병 진단용 ELISA kit의 개발/58
 - 제 1 항 *M. pluton* spore 검출용 Sandwich ELISA kit의 개발/62
 - 제 2 항 *P. larvae* spore 검출용 Sandwich ELISA kit의 개발/66
 - 제 3 절 꿀벌 세균성질병 진단용 Rapid kit의 개발/71
 - 제 1 항 *M. pluton* spore 검출용 Rapid kit의 개발/74
 - 제 2 항 *P. larvae* spore 검출용 Rapid kit의 개발/75
 - 제 3 절 다른 꿀벌 질병에 관한 연구/76
 - 제 1 항 꿀벌 진균성질병의 PCR 진단법의 개발/76
 - 제 2 항 *Ascospaera apis*의 성장저해를 위한 항진균제 Albofix의 영향/85
 - 제 3 항 *Ascospaera apis*의 성장저해를 위한 항진균제 Albio K, Pure Wild Organo oil의 영향 /95

- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도/105
 - 제 1 절 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도/105
 - 제 2 절 관련분야의 기술발전에의 기여도 /110

- 제 5 장 연구개발결과의 활용계획/112

- 제 1 절 추가연구의 필요성 /112
- 제 2 절 연구개발결과의 타 연구에의 응용/112
- 제 3 절 연구개발결과의 기업화 추진방안/112

제 6 장 참고문헌/114

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

양봉산업의 생산성 향상을 위하여 가장 직접적으로 중요한 것은 꿀벌 질병에 대한 적절한 방제와 고품질 제품의 생산이다. 꿀벌의 질병은 매우 다양하여, 크게 감염성 질병과 기생성 질병으로 나눌 수 있으며, 이는 또한 그 병인체에 따라 세균성 질병(미국 및 유럽 부저병), 바이러스성 질병 (낭충봉아부패병, 마비병), 원생동물성 질병 (노제마병), 진균성 질병(백목병, 석고병), 기생성 질병 (응애, 진드기) 등으로 나누어진다. 이들 다양한 질병에 의하여 봉군은 궤멸적 피해를 입을 수도 있으며, 많은 경우 그 생산성에 결정적 피해를 입히게 된다.

꿀벌은 현재 “수의사법 (법률 제 3441호)” 및 가축전염병예방법 (법률 제 3548호)“에 의하여 수의사의 직무대상 ”동물“ 및 신고대상 ”가축“ 으로 규정되어 있다. 그 중 특히 꿀벌의 부저병은 제 1종 가축 법정전염병으로 규정되어 있다 (수의사회지. 87년 5월, 289-301). 이는 다른 가축전염병과 같이 꿀벌전염병의 방역도 철저히 국가관리 하에 주도되어야 할 것임을 의미하나, 현재 꿀벌의 질병은 양봉산업의 특성 상 주생산지가 오지인 점 등의 이유로 근래 이전까지는 국가관리하의 방역대상 질병으로 적절한 대처를 받지 못하고 있었다.

현재, 부저병으로 인한 피해지역의 최소화를 위한 방법으로 테트라사이클린과 같은 항생제를 사용하는 것이 유일한 대처방안이며, 양봉현장에서의 질병확인은 양봉인의 자가 진단으로 이루어지고 있다는 것과 더불어, 이는 항생제의 오용 및 남용의 위험성을 가지게 된다. 이에 꿀벌의 사양에서 가장 직접적인 피해를 주고 있고 생산성을 크게 좌우하고 있는 세균성질병의 적절한 방제를 위한 실용적인 진단키트를 개발하여, 항생제의 오용 및 남용을 합리적으로 억제함으로써 국내생산 벌꿀의 고품질화게 기여하고자 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위

1) 기술적 측면

양봉산업의 생산성 향상을 위하여 가장 직접적으로 중요한 것은 꿀벌 질병에 대한 적절한 방제와 고품질 제품의 생산이다. 꿀벌의 질병은 매우 다양하여, 크게 감염성 질병과 기생성 질병으로 나눌 수 있으며, 이는 또한 그 병인체에 따라 세균성 질병(미국 및 유럽 부저병), 바이러스성 질병 (낭충봉아부패병, 마비병), 원생동물성 질병 (노제마병), 진균성

질병(백목병, 석고병), 기생성 질병(응애, 진드기) 등으로 나누어진다. 이들 다양한 질병에 의하여 봉군은 궤멸적 피해를 입을 수도 있으며, 많은 경우 그 생산성에 결정적 피해를 입히게 된다.

이 꿀벌의 질병 중 가장 많은 피해를 야기 시키는 질병은 부저병으로 2001년 전국 양봉농민을 대상으로 한 설문조사에서 총 질병피해 중 24%를 차지하였다. 부저병은 현재 확실한 방제법이 적용되는 것으로, 항생제 테트라사이클린을 사용하여야 하기에 정확한 진단을 필요로 하며, 총 질병피해 중 13%를 차지한 노제마병(후미딜 비 등으로 처치) 및 24%로 집계된 기생성 질병(피투, 왕스 등으로 구제)과 함께 약제에 의한 제어가 가능한 꿀벌의 질병이다. 그 외 바이러스성 질병 및 진균성 질병(총 질병피해 중 24%)은 학계에서도 적절한 방제대책을 제시하지 못하고 있으며, 강균양성의 방법에 의하여 극복하기를 권고하고 있다.

꿀벌 질병의 정확하고 신속한 진단은 질병제어에 의해 생산성 향상시킨다. 본 연구는 양봉산업의 직접적인 생산성 향상과 고품질 양봉산물의 생산유도를 위하여;

- 1) 미국 부저병 등 세균성 질병을 정확히 검색해 낼 수 있는 검색용 PCR-kit 및 검색용 ELISA kit를 개발, 생산하여 제품화하고,
- 2) 현장에서 미국 부저병 등 세균성 질병을 간단히 검색해 낼 수 있는 Rapid kit (Lateral flow chromatography법)를 개발 생산하는 것을 목표로 한다.

미국부저병 원인균 *P. larvae subsp. larvae*의 검출을 위한 PCR-kit는 본인 및 본 연구의 참여기업인 (주)진클론에 의하여 개발되었고, 생산되고 있다(양 등, 2001). 그러나, 2001년 미국 부저병의 원인균인 *Paenibacillus larvae*에서 비병원성 아종인 *P. larvae subsp. pulvifaciens*가 발견됨에 따라(GenBank AY030080), 이 비병원성 균이 아닌 미국부저병 원인균 *P. larvae subsp. larvae*만을 검출해 낼 수 있는 진보된 PCR kit의 개발이 요구되고 있으며, 미국 부저병과는 병원균을 달리하는 유럽부저병을 검색할 수 있는 PCR-kit의 개발도 또한 요구되고 있다.

미국부저병의 검색을 위한 ELISA kit는 본인 등에 의하여 일차 시제품이 만들어져 있으나(백 등, 2002), 이는 다클론항체에 의한 시제품이며, 검색키트의 제품 안정화를 위하여 단클론항체의 개발과 이를 이용한 ELISA kit의 개발이 시급하다고 사료된다.

한편, 위에 언급한 Rapid kit 개발의 필요성을 요약하면 다음과 같다.

먼저, PCR kit 및 ELISA kit는 모두 실험실적 진단방법으로 정확성에서 큰 장점이 있으나, 현재 국내에 꿀벌 질병 발생을 신고하고, 검사를 의뢰하고 결과를 통보받을 수 있는 시스템이 실질적으로 기능하지 못하고 있는 이유로 양봉 농민에게 직접적 혜택을 주기 힘들다는 점. 또한 양봉현장이 주로 오지에 분포하고 있고, 신속, 정확을 요하는 질병의 진단이 거의 양봉 농민에 의하여 이루어지고 치료(항생제 투여 등)가 이루어지고 있는 현실 등을 개발의 필요성으로 들 수 있겠다. Rapid kit는 이 필요성에 바로 합당한 “현장에서 별도의 측정기기 없이 바로 판정이 가능하다”는 큰 장점이 있으며, 본 연구진(윤병수교수 팀

및 임윤규교수팀)은 이미 리스테리아의 검출을 위한 신속진단키트의 개발(1998년 농림특정 연구과제)에서 성공적으로 Rapid kit를 개발한 기술력을 보유하고 있다.

2) 경제·산업적 측면

국내 양봉업의 현황은 2001년의 통계에 약 5만 농가 및 월동봉군 114만군으로, 결코 적지 않은 규모로 집계되고 있다(조상균, 2001). 1993년 우루과이 라운드 협상의 결과로 우리는 2004년 243%의 관세로 420톤의 꿀을 의무수입하기로 되어 있으며, 이에 대비하기 위한 국내 양봉업계의 대책은 “고품질화”로 의견이 모아지고 있다.

벌꿀의 고품질화 대책 중 가장 시급한 문제는 항생제 오남용에 의한 잔류항생제의 문제이며, 본 연구개발 과제는 이 문제를 근본적으로 해결하고자 빠른 시일 내 질병여부를 판단할 수 있는 검사법을 개발하고자 하는 것이다. 사실 꿀벌 사양에서 적절한 질병 방제는 가장 중요한 사양기술이 되었으며, 항생제는 진단 없는 예방제로도 적지 않게 사용되어 왔다. 심지어 항생제(테트라사이클린 및 설파제) 및 기타 질병치료제의 붐철 처치를 잘 알려진 꿀벌 관리 교본에서도 권장되고 있기에, 이러한 항생제의 오용 및 남용에 의한 문제는 국내산 꿀의 저급화 및 소비자에 의한 불신의 주원인이 되었다. 본 연구에 의한 정확한 판정법, 간편한 현장진단 및 생산 벌꿀의 정확한 품질관리는 국내생산 벌꿀의 생산성 향상뿐 아니라 고품질 벌꿀의 생산에 중요 도구가 될 것이다.

3) 사회·문화적 측면

벌꿀은 오랜 기간 우리 국민에게 약제수준의 고급식품으로 인식되어 왔고, 따라서 상당한 고가로 유통되어 왔다. 이런 벌꿀의 고가는 많은 저급 벌꿀(주로 잔류항생제에 의한 불합격품)에 의한 유통구조의 왜곡을 야기 시키게 하였으며, 국내 생산된 꿀의 소비를 약화시키는 요인의 하나가 되게 하였다. 사실 국내산 꿀은 국제가격에 비하여 매우 높은 편이며, 2004년 이후 관세에 의한 보호 장벽이 약화되면 수입산 벌꿀과 직접적인 경쟁을 하고 이를 극복하여 나가지 않으면 안 될 것이다. 생산성향상과 고품질화 가 바로 양봉업계가 나아가야 할 길이라는 것은 주지의 사실이며, 이를 통하여 적절한 가격하락에 의하여 약제가 아닌 식품으로 소비를 촉진시켜야 할 것이라는 것이 현실적 정책으로 대두되고 있다. 본 연구개발과제는 꿀벌의 사양에서 가장 직접적 피해를 주고 있고 생산성을 크게 좌우하고 있는 세균성질병의 적절한 방제를 위하여 실용적인 진단키트를 개발하여, 항생제의 오용 및 남용을 합리적으로 억제함으로써 국내 벌꿀검사의 보편성을 확보하게 함으로써 국내생산 벌꿀의 고품질화에 기여하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

꿀벌질병에 관한 국내 연구인력 및 전문연구기관은 극히 제약되어 있는 것으로 파악되고 있다. 먼저 학계에서는 서울대학교 농과대학의 우건석교수(2002년 정년퇴직) 연구실에서 오랜 기간 꿀벌의 기생성질병인 꿀벌응애 및 꿀벌진드기에 관한 많은 연구를 수행하여 왔으며, 동 대학교의 고 강석권교수 연구실에서 꿀벌의 세균성 질병(백목병 및 석고병)의 연구를 수행하였었다. 관계에서는 현 수의과학검역원의 강승원박사등이 꿀벌 질병의 일반을 연구하였으며, 현재 농촌진흥청의 마영일박사, 정진교박사, 이만영박사 등이 꿀벌질병에 관한 다양한 연구를 수행하고 있다.

본 연구과제의 대상인 꿀벌의 세균성 질병에 대한 연구는 본인(경기대 윤병수)의 연구실에서 1995년부터 수행하여 왔으며, 꿀벌의 세균성 질병에 관한 연구가 국내의 다른 연구진에서 수행되고 있는 것은 발견하지 못하였다. 1995년 이래 본인의 연구실에서는 한국산 *P. larvae* 균주의 검출 및 분리(홍 등, 1996; 권 등, 1996), 16S DNA 유전자의 염기서열 결정(GenBank U85263, U86605, U86606), Metalloprotease 유전자의 분리(GenBank AF 111421; 권 등 1998), 미국부저병 검색용 PCR방법의 개발(양 등, 2001), 미국부저병 검색용 ELISA방법의 개발(백 등, 2002) 등의 연구를 수행하여 왔었으며, 본 과제의 수행과정 중 미국부저병 검색용 Real-Time PCR방법의 개발(이 등, 2004), 유럽 부저병 검색용 PCR방법의 개발(하 등, 2005), *M. plutonius* 16S DNA 염기서열 결정(AY 862057) 등의 연구 성과를 내었다. 한편 2000년 한국꿀벌질병연구소를 설립하여 일반 양봉농민으로부터 시료를 의뢰받아 진단하고 무상으로 결과를 통보하여 주는 사업을 수행하고 있다.

현재 국내의 양봉산업은 관세장벽과 의무수입벌꿀에 의하여 큰 도전에 직면하고 있는 상황이며, 경쟁력 향상을 위해서는 생산성 향상과 고품질화가 유일한 방법이라 할 수 있다. 이를 위해서는 질병방제기법의 연구가 절실히 요구되나, 현재 꿀벌질병에 관한 연구인력 및 전문연구기관이 부족하여 적절한 대응책을 펴지 못하는 것이 문제점으로 지적된다.

제 2 절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

본 연구에서 3년 동안의 연구결과는 국내 양봉산업에서 큰 영향을 미칠 것으로 예상된다. 기존의 꿀벌 세균성질병의 방제에서는 항생제 등의 약제의 처리를 적용하였기에, 불필요한 오용과 남용을 줄이기 위해서 정확한 진단이 필요하였고, 질병의 제어를 위한 신속한

진단이 요구되었다.

본 연구과제의 결과에서는 꿀벌 세균성 질병의 신속하고 정확한 진단을 위한 유럽부저병 진단용 PCR kit, 유럽부저병 진단용 ELISA kit, 유럽부저병 진단용 Rapid kit, 미국부저병 진단용 PCR kit, 미국부저병 진단용 ELISA kit, 미국부저병 진단용 Rapid kit 등을 개발하였다. 상기 6종의 진단용 kit는 실용성 및 현장성을 검증하여 양봉산업에 직접적인 적용이 가능하며, 이는 양봉산업에서 생산성 향상과 고품질 양봉산물의 생산을 유도하는데 큰 기여를 할 것으로 예상되어 진다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 꿀벌 세균성질병 진단용 PCR kit의 개발

제 1 항 유럽 부저병 PCR 진단키트의 제조 (하 등, 2005)

가. 실험균주

1) *M. pluton* (ATCC number 35311)

*M. pluton*은 European foulbrood의 병원균으로 4일에서 5일된 꿀벌 애벌레의 치사를 일으킨다 (Baily, L. 1983). 이 균주는 $0.5\mu\text{m} \times 1.0\mu\text{m}$ 의 크기를 가지며 구간균 (Ovoid form)으로 그람 양성의 혐기성 균이며 사체가 오래된 경우 다른 연관 세균에 비하여 수가 작아져 발견되지 않을 수도 있다.

이 균주는 절대 혐기 균으로 자연 상태에서 분리하여 배양하기가 매우 어렵기에 (Alippi, A. M. 1991; Hornitsky, M. A. Z., and S. C. Wilson. 1989; Shimanuki, H., D. 1992) 미국 표준균주보관소 (ATCC number 35311)에서 분양 받아 사용하였다.

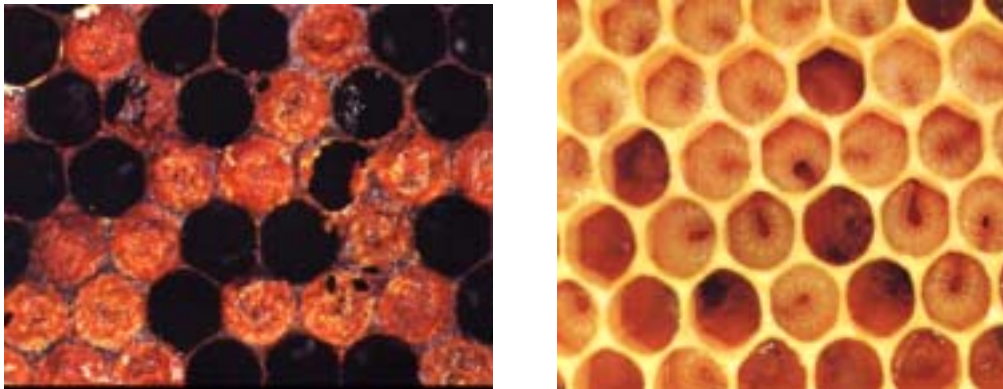


Fig. 1. Infected larvae by European foulbrood

2) 대조균주

*M. pluton*의 16S rRNA를 기반으로 한 PCR primer의 특이성 및 Multiplex PCR의 정확성을 확인하기 위해서 *Bacillus* 종에 대한 PCR을 실시하였다. 이 때 사용한 대조균주들은 *B. subtilis*, *P. alvaei*, *P. larvae sp pulvifaciens*, *B. larvae*-25748, 9545, *Escherichia coli*를 사용하였다.

나. 균주 배양 배지 및 조성

1) 액체 배지의 제조

*M. pluton*의 배양은 혐기 조건 (Allen, M. F., and B. V. Ball. 1993; Anderson, D. L. 1990; Bailey, L. 1983; Bailey, L. 1985; Bailey, L., and M. D. Collins. 1982; Hornitsky, M. A. Z., and S. C. Wilson. 1989.)으로 anaerobic gas mixture N₂ 90%, CO₂ 10%로 하였고 Glove box에서 30℃로 배양하였다. 배지 조성은 표 1에 표시하였으며 배지의 혐기상태 확인을 위해서 Resazurin을 배지에 포함시켜 차후에 배지의 혐기상태를 재확인하였다.

Bacillus 종들의 배양을 위해서 BHI (Brain Heart Infusion, Difco, Hardy diagnostics)를 사용하였다.

2) PCR 관련 시약

각 병원균의 검출을 위한 synthetic oligonucleotides (Bionics Co., Korea)는 합성을 의뢰하여 제작, 사용하였으며 PCR 시약들인 1.5 mM PCR buffer (with MgCl₂)와 0.25 mM dNTP, 2.5 unit Taq polymerase는 GeneClone (Korea)사의 시약을 사용하였다.

3) Real-Time PCR 관련 시약

4×GreenStar PCR premix, MgCl₂ PCR buffer, RNase free water (Bioneer Co., Korea)와 각각 특이 primer는 10 pmol의 농도로 사용하였다.

4) Rapid PCR 관련 시약

본 연구를 수행하기 위해서 Rapid PCR용 buffer를 직접 제조하여 사용하였다. 그 조성은 50 mM Tris (pH8.3), 500µg/ml BSA이며 KCl이 buffer안에 포함되지 않아서 PCR의 cooling 과정에서도 annealing을 유도하여 보다 적은 시간에서도 PCR 산물의 생성을 유도하였다.

Table 1. Composition of *Melissococcus pluton* culture medium per liter

Name	Component	Amount to add per 1liter
<i>Melissococcus</i>	Glucose	10.0g
<i>plutonius</i> medium	Soluble starch	2.0g
- ATCC number 1430	Peptone (Oxoid L37)	2.5g
	Neopeptone (Difco 0119)	2.5g
	Yeast extract (Oxoid L21)	5.0g
	Trypticase (BBL 11921)	2.0g
	1M Phosphate buffer, pH 6.7	50.0ml
	Cysteine HCl · H ₂ O	0.25g
BHI	Brain Heart Infusion broth	37g

* Adjust medium for final pH7.2. Dipense medium into tubes flushed with 90% N₂-10% CO₂ and immediately plug with butyl rubber stoppers. Autoclave at 121℃ for

15minutes.

* Always use freshly prepared pre-reduced media or pre-reduced media that has been previously prepared but stored under anaerobic conditions. Resazurin in the media is a color indicator for anaerobic conditions. Observance of pink color in medium before use or during incubation shows anaerobic conditions have not been met and oxidation has occurred. Medium should be discarded.

다. *M. pluton* 16S rRNA 유전자 확보를 위한 분자적 클로닝

M. pluton DNA의 추출은 Holmes 등(1981)의 방법을 이용하였고 이를 주형으로 하여 16S rRNA 염기서열을 확보하기 위해 PCR을 수행하였다. PCR 수행 시 사용한 prime는 Table 2, fig. 2에 정리하였다. 이들은 각 각 EFB-F/EFB-R (1.4 kb), EFB-SF/ EFB-SR (829 bp), EFB-PstI/EFB-R (681 bp)의 PCR 산물들을 얻을 수 있었고, 이 PCR 산물들은 pBlueXcm 을 사용하여 재조합 plasmid DNA를 제작하였다. 재조합체의 선별 및 확인은 제한효소 절단 및 DNA-sequencing reaction을 통하여 수행되었다. 제한효소의 자리는 NEB사의 제한효소 프로그램을 통하여 분석하였다 (자료 미제시). pBlue Xcm의 제한 효소 자리를 이용하여 각각 삽입된 insert DNA와 vector의 크기가 확인되었으며 삽입된 insert DNA 내부의 제한 효소를 이용하여 pBlue Xcm에 재조합되었음을 재확인하였다 (Fig. 3).

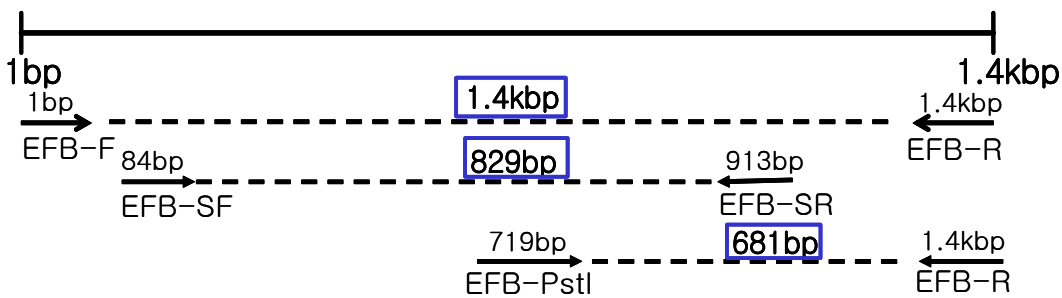


Fig. 2. Oligonucleotide primers and map used to 16S rRNA amplification

Each of PCR products were performed under condition annealing temperature 57°C. PCR product size : EFB-F/EFB-R(1.4kb), EFB-SF/EFB-SR(829bp), EFB-PstI/EFB-R (681bp)

Table 2. Primers used for amplification and sequences

Primer	Sequence (5'-3')	Reference
EFB-F	AGTAACACGTGGGCAACCC GenBank No. X 75751 1bp to 18bp	Ha <i>et al.</i> , 2005
EFB-SF	GAAGAGGATTAATAAGGCGC GenBank No. X 75751 84bp to 103bp	Govan <i>et al.</i> , 1998
EFB-PstI	GCTAAGTGTGGAGGGTTCC GenBank No. X 75751 719bp to 739bp	Ha <i>et al.</i> , 2005
EFB-SR	TTATCTCTAAGGCGTTCAAAGG GenBank No. X 75751 892bp to 913bp	Govan <i>et al.</i> , 1998
EFB-R	GGGTGAAGTCGTAACAAGGTA GenBank No. X 75751 1389bp to 1400bp	Ha <i>et al.</i> , 2005

본 연구에서 밝혀진 *M. pluton*의 16S rRNA 염기서열 (GenBank Accession No. AY862057)을 New EFB라 명명하였고, 이는 Cai 등 (1994)이 밝혀낸 16S rRNA 염기서열과 비교 분석 시 1bp point mutation과 2 bp 삽입이 확인되었으며 Behr 등 (2000)이 밝혀낸 전체 16S rRNA 염기서열과 비교해보았을 때 11bp point mutation과 2 bp point deletion이 확인되었다. 새로 밝혀진 염기서열은 각각의 PCR 산물을 기반으로 한 분자적 클로닝이기에 clone에 삽입된 DNA는 동일하다고 볼 수 없다. 또한 각 clone들의 염기서열 분석을 양 방향으로 수행하였기에 염기서열 분석 시 일어날 수 있는 문제점과는 무관한 것으로 사료된다 (Table. 3).

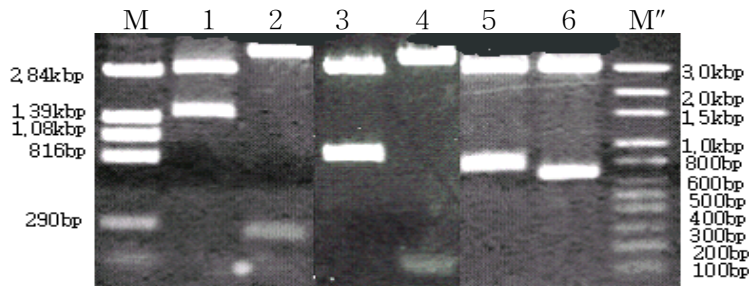


Fig. 3. Restriction analysis of pBlue Xcm-EFB F/R, pBlueXcm-EFB-SF/SR, pBlue Xcm-EFB-PstI/R in 1% agarose gel. Lane M, PS44 (BamHI/ HindIII); lane 1, pBlueXcm-EFB-F/R (SalI/XbaI) - 1475 bp and 2.9 kb; lane 2 pBlueXcm-EFB-F/R (HindIII) - 180 bp and 4.1 kb; lane 3, pBlueXcm-EFB-SF/SR (BamHI/HindIII) - 889 bp and 2.9 kbp; lane 4, pBlueXcm-EFB-SF/SR (PstI) -180bp 3.5 kb; lane 5, pBlueXcm-EFB-PstI/R (SalI/XbaI)-760 bp and 2.9 kb; lane 6, pBlueXcm-EFB-SF/SR (PstI) - 700 bp and 2.96 kb; lane M'', 100 bp ladder marker.

Table 3. Analysis of clones as compares with the sequence of GenBank

GenBank accession no.	Mis-match sequence
AJ 301842	Point mutation ; 120 bp, 121 bp(AC→GT), 123 bp(A→G), 150 bp(T→C), 226 bp(A→G), 1131 bp(G→A), 1209 bp(T→G), 1257 bp,1258 bp(AC→GA), 1278 bp(C→T), 1291 bp(T→A) Deletion point ; 348 bp(C→D), 59 4bp(G→D)
X 75751,X75752	Insertion point ; 482 bp(G→I), 826 bp(C→I) Point mutation ; 1018 bp(G→A)

라. *M. pluton* 종 검출을 위한 특이서열 제작

현재 GenBank에 기재된 *M. pluton*의 유전자는 16S rRNA 염기서열(GenBank Accession No. X75751, X75752)이 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 *M. pluton*의 16S rRNA 염기서열을 기초로 PCR 검출에 유용한 특이 염기서열 부위를 찾아내고자 하였다. 특이 염기서열은 GenBank에 등재된 염기서열을 기반으로 하여 대조균주들과의 상동성을 비교 분석함으로써 선별하였으며, 대조균주들은 *P. larvae* (GenBank Accession No. X60619), *P. alvei* (GenBank Accession No. X60604), *P. pulvifaciens* (GenBank Accession No. X60639) *P. subtilis* (GenBank Accession No. X60646), *E. coli* (GenBank Accession No. M24996)와 *M. pluton* 과 상동성이 높은 *E. faecium* (GenBank Accession No. Y18295)의 16S rRNA 염기서열을 PCGENE과 ClustalX (Ver. 1.81)등의 분석프로그램을 통하여 분석하였고 최적의 특이 primer를 선별하고 제작하였다. 본 연구의 것과 구분을 위해 Govan 등 (1998)이 제안한 primer는 EFB-SF/SR (Table 2)로 명명하였으며 본 연구에서 선별된 primer는 EFB-NSF/NSR로 명명하였다(Table 4). EFB-SF/SR은 PCR 검출 반응에서 특이적으로 작용하여 828bp의 DNA band를 증폭하고 EFB-NSF/NSR는 특이적으로 564bp의 DNA band를 증폭하도록 설계하였다.

Table 4. Oligonucleotide primers and map used to 16S rRNA

Primer	Sequence (5'-3')	Reference
EFB-NSF	AAGAGTAACTGTTTTTCCTCG	Ha <i>et al.</i> , 2005
	Genbank No. X75751, X75752 355bp to 375bp	
EFB-NSR	ACGCCTTAGAGATAAGGTTT	Ha <i>et al.</i> , 2005
	Genbank No. X75751, X75752 918bp to 938bp	

gene	EFB-NSF	EFB-NSR
EFB-X 75751	AAGAGTAACTGT-TTTCCTCG	<u>ACGCCTTAGAGATAAGGTTT</u>
EFB-X 75752	AAGAGTAACTGT-TTTCCTCG	<u>ACGCCTTAGAGATAAGGTTT</u>
Enterococcus Y18295	GAGAGTAACTGT-TCATCCCT	<u>CCACTCTAGAGATAGAGCTT</u>
<i>Bacillus larvae</i> X60619	GGGAGTAACTGC-CCCTGGAG	<u>CCGGTTTTGAGATAGACCTT</u>
<i>puvifaciens</i> X60639	GGGAGTNACTGC-CCNTNGAG	<u>CCGGTNTAGAGATAGACCTN</u>
<i>Bacillus alvei</i> X60604	GAGAGTNACTNC-TNNTNGGG	<u>CCGCCCTAGAGATAGGGCNN</u>
	**** **	* *****

Direction of sequence : 5'→3'

Fig 4. Alignment of 16S rRNA for specific primers. The PCR primers were based on a region of the *Melissococcus pluton* 16S rRNA gene that was not homologous to other closely related bacterial 16S rRNA genes deposited in the available databases. '*' character indicated alignment is perfectly conserved. Alignment of 16S rRNA for EFB-NSF/NSR primer.

마. *M. pluton* 종 특이 염기서열의 비교 분석

Govan 등 (1998)이 고안한 *M. pluton*의 검출 primer와 본 실험에서 사용한 특이 primer간의 비교 분석은 그림 3에 나타내었다.

PCR 반응 시 주형 가닥과 일차적으로 결합하는 forward primer의 3' - 말단의 6염기와 reverse primer의 3' - 말단 6염기(Fig. 5)에서는 16S rRNA 염기서열로 표시하였기에 5' - 말단 부위가 됨)의 상동성을 대조균주들의 염기서열들과 ClustalX (Ver. 1.81)를 이용하여 분석하였다. EFB-SF/EFB-SR이 EFB-NSF/EFB-NSR보다 대조균주들에서 primer 염기서열 위치에서의 상동성이 높은 것으로 나타났으며 대조균주들이 혼합되었을 때 PCR 검출 결과에 영향을 미칠 것으로 사료되었다.

ClustalX (Ver. 1.81)를 이용하여 *M. pluton*의 특이 primer의 염기서열과 대조균주들의 forward의 3' - 말단과 reverse의 5' - 말단 6염기서열의 상동성 분석 결과를 표 6에 제시하였다.

EFB-NSF/EFB-NSR이 EFB-SF/EFB-SR보다 대조균주들에서 특이 염기서열 위치의 상동성이 낮은 것으로 나타났으며 특히 *M. pluton*과 96%의 상동성을 가진 *E. faecium*과 비교 시 EFB-SF/EFB-SR의 forward 3'-말단 염기서열의 상동성은 100%이었고 reverse 3' -말단 염기서열의 상동성은 83%이었다. 이러한 높은 상동성은 *E. faecium*이 *M. pluton*과 공존 시 PCR을 이용한 검출에서 *M. pluton*의 검출을 불가능하게 할 것으로 사료된다. 하지만 본 연구에서 개발된 EFB-NSF/EFB-NSR에서는 forward 3'-말단 염기서열의 상동성은 33%이었고 reverse 3' -말단 염기서열의 상동성은 33%로 낮은 상동성을 보임으로 이는 Govan 등 (1998)이 제안한 PCR 검출 시 발생하는 문제점을 해결할 것으로 예상된다.

Genus		EFB-SF	EFB-SR
<i>M. pluton</i>	X 75751	AGAGGAGTTAAAAGGCG	TTTGAACGCCCTTAGAGATAA
<i>M. pluton</i>	X 75752	AGAGGAGTTAAAAGGCG	TTTGAACGCCCTTAGAGATAA
<i>E. faecium</i>	Y18295	TTTTGATTTGAAAGGCG	TTTGACCACTCTAGAGATAG
<i>B. larvae</i>	X60619	AGAAGTATTGAAAGACG	TCTGACCGGTTTTGAGATAG
<i>B. puvifaciens</i>	X60639	AGAAGTCATGAAAGACG	TCTNACCGGTNTAGAGATAG
<i>B. alvei</i>	X60604	GGGGAATGAGAAAGGCG	AATGACCGCCCTAGAGATAG
		**** ** * * *	* *****
(A)			
Genus		EFB-NSF	EFB-NSR
<i>M. pluton</i>	X 75751	AAGAGTAACTGTTTTCTCG	<u>ACGCCTTAGAGATAAGGTTT</u>
<i>M. pluton</i>	X 75752	AAGAGTAACTGTTTTCTCG	<u>ACGCCTTAGAGATAAGGTTT</u>
<i>E. faecium</i>	Y18295	GAGAGTAACTGTTTCATCCT	<u>CCACTCTAGAGATAGAGCTT</u>
<i>B. larvae</i>	X60619	GGGAGTAACTGCCCTGGAG	<u>CCGGTTTTGAGATAGACCTT</u>
<i>B. puvifaciens</i>	X60639	GGGAGTNACTGCCCNTGAG	<u>CCGGTNTAGAGATAGACCTN</u>
<i>B. alvei</i>	X60604	GAGAGTNACTNCTNNTNGGG	<u>CCGCCCTAGAGATAGGCCNN</u>
		**** ***	* *****
(B)			

Direction of sequence : 5'→3'

Fig. 5. Alignment of 16S rRNA for specific primers.

The PCR primers were based on a region of the *M. pluton* 16S rRNA gene that was not homologous to other closely related bacterial 16S rRNA genes deposited in the available databases. '*' character indicated alignment is perfectly conserved. A; Alignment of 16S rRNA for EFB-SF/SR primer(Govan *et al.*, 1998). B; Alignment of 16S rRNA for EFB-NSF/NSR primer(Ha *et al.*, 2005).

Table 4. Comparison of specific primer sequences to nucleotide sequences of other species.

A. EFB-SF/EFB-SR

Genus	Position of sequence	F 3'	Position of sequence	R 5'
<i>E. faecium</i>	243 bp-259 bp	100%	1213 bp-1232 bp	83%
<i>B. larvae</i>	285 bp-301 bp	83%	1202 bp-1221 bp	66%
<i>B. Puvifaciens</i>	285 bp-301 bp	83%	1202 bp-1221 bp	50%
<i>B. alvaei</i>	285 bp-301 bp	100%	1204 bp-1223 bp	16%

B. EFB-NSF/EFB-NSR

Genus	Position of sequence	F 3'	Position of sequence	R 5'
<i>E. faecium</i>	562 bp-581 bp	33%	1218 bp-1237 bp	33%
<i>B. larvae</i>	550 bp-569 bp	16%	1207 bp-1226 bp	33%
<i>B. Puvifaciens</i>	550 bp-569 bp	16%	1207 bp-1226 bp	16%
<i>B. alvaei</i>	551 bp-570 bp	16%	1209 bp-1228 bp	33%

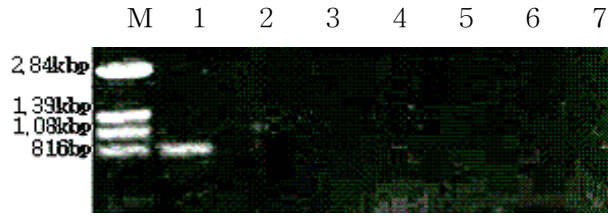
- The nucleotide sequences of *Melissococcus pluton* PCR primers and nucleotide sequences of six closely related species were compared.

F 3' : Comparison of 6 bp sequence among 3 frame of forward primer to nucleotide sequences of other species.

R 5' : Comparison of 6 bp sequence among 3 frame of reverse primer to nucleotide sequences of other species.

바. *M. pluton* 종 특이성 검출확인

대조균주 *B. larvae* (GenBank Accession No. X60619), *B. alvei* (GenBank Accession No. X60604), *B. subtilis* (GenBank Accession No. X60646), *B. pulvifaciens* (GenBank Accession No. X60639) *E. coli* (GenBank Accession No. M24996) chromosomal DNA를 template DNA로 사용하여 primer EFB-SF/SR, EFB-NSF/NSR로 annealing 온도 52°C에서 PCR하였다. 정확하게 828bp와 564 bp의 PCR 산물을 확인하였으며 *M. pluton*을 정확하게 검출하는 것을 확인하였다 (Fig. 6).



A. EFB-SF/SR 52°C



B. EFB-NSF/NSR 52°C

Fig. 6. PCR detection of *M. pluton* with specific primers. The PCR primers were designed on the basis of the 16S rRNA gene of *M. pluton*. Panel A; PCR detection of *M. pluton* by using primers-pair (EFB-SF/EFB-SR). The PCR product was 828bp B; PCR detection of *M. pluton* by using primers-pair(EFB-NSF/EFB-NSR). The PCR product was 564 bp. PCR detection was specific for *M. pluton* and strain with DNA from closely related bacterial species. lane M : the marker that PS44 digested by *Bam*HI/*Hind*III. lane 1, *M. pluton*; lane 2, *P. larvae 9545*; lane 3, *P. larvae 25748*; lane 4, *P. pulvifaciens*; lane 5, *B. alvaei*; lane 6, *B. subtilis*; lane 7, *E. coli*.

사. 대조 균주들의 인공 DNA 환경 조성에서의 *M. pluton*의 template DNA 농도에 따른 specific PCR의 감도 확인

자연 상태에서 *M. pluton*은 여러 가지 균주들과 혼합되어 있다. 따라서 EFB-SF/SR, EFB-NSF/NSR primer의 정확성을 확인하기 위해서는 임의적으로 혼합 DNA 환경을 조성하였고 이때 대조균주 *B. larvae*, *B. alvei*, *B. subtilis*, *B. pulvifaciens*, *E. coli*의 chromosomal DNA를 혼합하여 사용하였다. EFB-SF/SR primer를 이용한 PCR에서는 *M. pluton*의 DNA가 10 ng까지 검출이 확인되었고 이와 달리 EFB-NSF/NSR primer 쌍을 이용한 PCR에서는 100 ng에서 10 pg까지 검출이 확인되었고 소량이지만 1 pg에서도 검출이 확인되었다(Fig. 7). 더 높은 검출 한계를 위해서 PCR 반응 수행 시 회전수를 40회전으로 높이거나 *Taq polymerase*의 농도를 증가시킨다면 그 민감도는 향상될 것으로 사료된다.

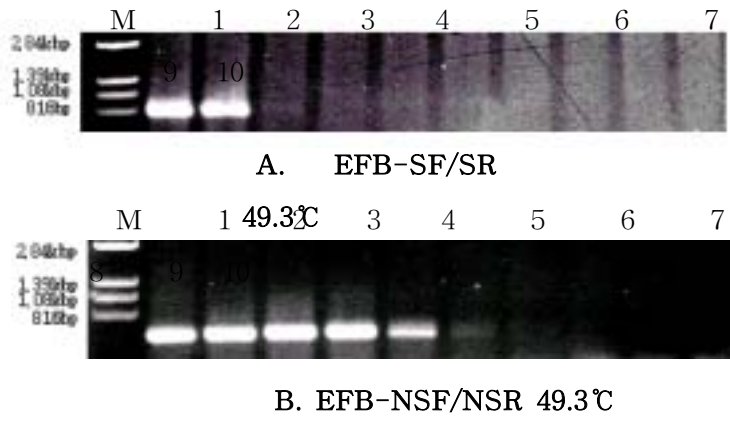


Fig. 7. Detection limit of *M. pluton* specific PCR by using EFB-SF/SR, EFB-NSF/NSR at the mixed DNA compound. Each PCR was performed under standard condition except 10-fold diluted template DNA at the mixed DNAs 100 ng, respectively. Panel A; PCR detection of *M. pluton* by using primers-pair (EFB-SF/EFB-SR) The PCR product was 828 bp. B; PCR detection of *M. pluton* by using primers-pair (EFB-NSF/EFB-NSR). The molecular weight is 564 bp. lane M is DNA size marker. lane 1 to 10, template DNA of 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 0.1 pg, 0.01 pg, 0.001 pg and 0.0001 pg, respectively.

아. *M. pluton*의 검출을 위한 annealing temperature 민감성 확인

M. pluton templete DNA에 대한 EFB-SF/SR, EFB-NSF/NSR PCR 검출 반응에서 annealing 온도 42°C부터 62°C까지 정확하게 828 bp와 564 bp의 16S rRNA 특이 PCR 산물을 확인할 수 있었고 49.3°C에서 가장 강한 PCR 산물이 생산됨이 확인되었다. 폭넓은 annealing 온도대의 PCR 실험 결과 단일 PCR 산물만이 확인되어 본 연구에 사용한 특이 primer쌍은 annealing 온도의 변화에 매우 안정적이며, 또한 단일 PCR 산물만을 보임으로 16S rRNA에 매우 특이적임을 확인하였다(Fig. 8).

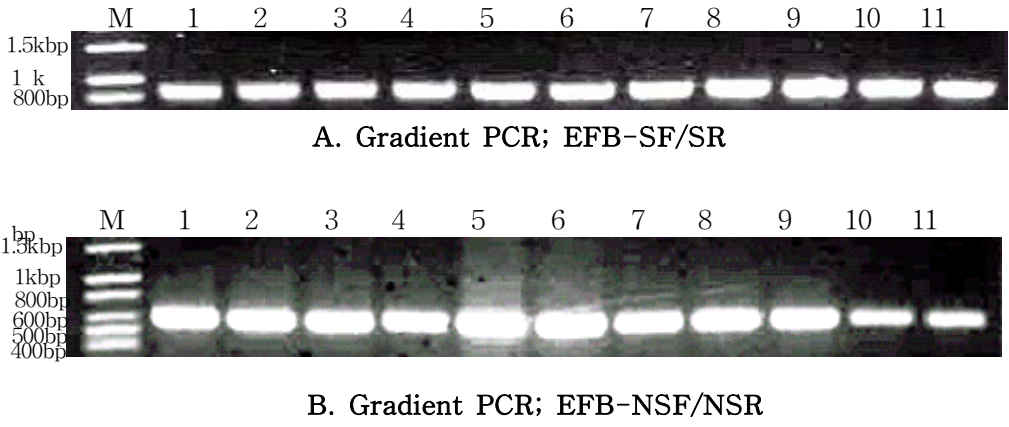


Fig. 8. Optimal annealing temperature of *M. pluton* specific PCR detection using EFB-SF/SR, EFB-NSF/NSR primer pairs. PCRs were performed under condition of 94°C, 3 min pre-denaturation/ 94°C, 30 sec; gradient annealing temperature, 30 sec; 72°C, 30 sec; 30 cycles/ 72°C, 5 min post-polymerization. A; PCR detection of *M. pluton* by using primers-pair (EFB-SF/EFB-SR) The PCR product was 828bp B. PCR detection of *M. pluton* by using primers-pair(EFB-NSF/EFB-NSR). The PCR product was 564bp Lane M is DNA size marker. respectively; lane 1, annealing temperature on 42.0°C; lane 2, 43.8°C; lane 3, 45.6°C; lane 4, 47.5°C; lane 5, 49.3°C; lane 6, 52.9°C; lane 7, 54.7°C; lane 8, 56.5°C; lane 9, 58.4°C; lane 10, 60.2°C; lane 11, 62.0°C.

자. *M. pluton*의 templete DNA 농도에 따른 특이 PCR의 검출 한계

PCR 결과, EFB-SF/SR 특이 primer를 사용하였을 때 100ng에서 0.1pg의 templete DNA에서도 검출이 가능함이 확인되었다. EFB-NSF/NSR 특이 primer를 사용하였을 때 100ng에서 0.01pg의 templete DNA에서도 검출이 가능함이 확인되었다 (Fig. 9)

EFB-NSF/NSR 특이 primer를 사용하였을 때 소량의 templete DNA가 존재하였을 때도 PCR이 가능하다고 판단되며 기존의 특이 primer인 EFB-SF/ SR보다 더 진단의 감도가 민감하다고 사료된다.

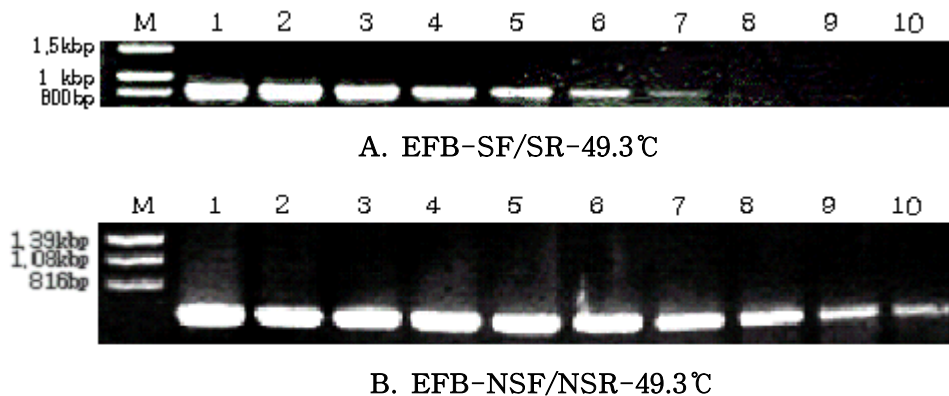


Fig. 9. Detection limit of *M. pluton* specific PCR using EFB-SF/SR, EFB-NSF/NSR. Each PCR was performed under standard condition except 10-fold diluted template DNA, respectively. A; PCR detection of *M. pluton* by using primers-pair (EFB-SF/EFB-SR). product was 828bp B; PCR detection of *M. pluton* by using primers-pair (EFB-NSF/EFB-NSR). The PCR The PCR product was 564bp. Lane M is DNA size marker. Lane 1 to 10, template DNA of 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 0.1 pg, 0.01 pg, 0.001 pg, 0.0001 pg, respectively.

본 실험에서 제시한 *M. pluton*에 대한 특이 primer 및 PCR 진단법은 다른 대조균주들

을 대상을 한 PCR 실험에서 *M. pluton*에 매우 특이적임을 확인되었다. 이 PCR 검출법은 혼합 균주의 chromosomal DNA를 이용한 인공적인 자연 상태에서도 특이적으로 반응하는 것이 확인되었다. Govan 등 (1998)이 제안한 PCR 검출법보다 검출의 감도가 약 1000배정도 검출 감도가 높은 것으로 나타났다. *M. pluton*의 template DNA 농도에 따른 특이 PCR의 검출 한계서도 Govan 등 (1998)이 제안한 primer보다 새로 개발된 primer가 PCR 검출에 있어서 감지되는 최저 농도가 0.1 fg로 약 1000배정도 검출 감도가 높은 것으로 나타났으며 이는 저 농도로 감염된 꿀벌의 감염여부의 확인이 가능할 것으로 예상된다.

제 2 항 유럽 부저병 (European foulbrood)의 Real-time PCR 진단법 개발

가. Real-Time PCR

Excycler™ Quantitative Thermal Block (Bioneer Co., Korea)을 사용하여 특이성, 정확성, 재현성, 민감도 등을 측정하였다. 증폭산물의 정량 측정을 위하여 SYBR Green을 사용하였으며 이를 측정하기 위해 각 PCR cycle마다 excitation 490 nm, emission 530nm로 한 filter set으로 700msec동안 형광값을 측정하였다. 측정된 형광값은 실시간으로 모니터상에 그래프로 나타났다.

Threshold Cycles (C_T) 값은 3-10 cycles간에 나타난 형광값의 표준편차의 10배 값 (Threshold value)에 도달하는 각 PCR의 cycles수를 기준으로 하였으나, 정량을 위한 표준 직선에서 기지의 초기 template의 양들 (pg 또는 fg)에 대한 C_T 값들이 회귀 (regression) 직선에서 1에 가장 근접한 것 ($R^2=1$)을 구하여 C_T 값을 보정하기도 하였다.

나. *M. pluton*의 검출을 위한 최적 Real time PCR 조건 확립

본 연구는 꿀벌 유럽부저병의 원인균인 *M. pluton*를 보다 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 *M. pluton* 특이 Real-Time PCR 진단법을 개발하였다. 개발된 Real-Time PCR 진단법은 *M. pluton*의 16S rRNA 염기서열을 기초로 제작된 특이 primer쌍인 EFB-NSF와 EFB-NSR를 사용하였으며, 이들 primer 쌍을 사용한 PCR은 *M. pluton*의 존재 하에 564bp의 특이 PCR product를 증폭시키게 설계되었다.

42.0°C ~ 62.0°C의 annealing 온도에서 gradient PCR을 수행하였으며, 최적의 annealing 온도를 구하였다. *M. pluton*에 대한 Real-Time PCR의 Amplification curve는 annealing 온도 49.3°C 반응의 형광값이 가장 낮은 C_T 값인 9 cycle을 보였으며, 이후의 반응 종료 (30 cycle)에서도 가장 높은 형광값을 나타내었으며, annealing 온도는 42°C-58.3°C까지 폭넓게 사용함이 가능한 것으로 나타났다 (Fig. 10. A). 이 결과는 PCR 종료액의 전기영동 상에서도 확인 할 수 있었으며, 설계된 바와 같이 정확한 564 bp의 16s rRNA 특이 PCR product를 확인할 수 있었고 각 PCR 산물의 양은 Real-Time PCR의 amplification curve에서 예측한 양과 거의 부합됨을 보여 주었다 (Fig. 10. B). 최적 annealing 온도를 49.3°C로 정하

여 연구를 진행하였다.

또한 최적의 $MgCl_2$ 농도를 구하기 위하여 0 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM의 $MgCl_2$ 농도를 변화시켜 수행한 PCR에서 모든 범위에서 정상적인 amplification curve를 보이는 것으로 나타났으며 (자료 미제시), 전기영동 상에서도 예상된 564bp의 product를 확인 할 수 있었다 (Fig. 11. B).

Real-Time PCR 결과는 melting temperature analysis에서 보다 분명한 결과를 볼 수 있었으며 동일한 melting temperature curve ($-dF/dT$) 및 $88.1^\circ C$ 의 일치되는 T_m (Temperature of midpoint)을 나타냈으며 동일한 증폭산물이 생산된다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 11. A). 따라서 본 연구에서는 최적 $MgCl_2$ 농도를 $88.1^\circ C$ 의 melting 온도를 보이는 3 mM로 사료되었다.

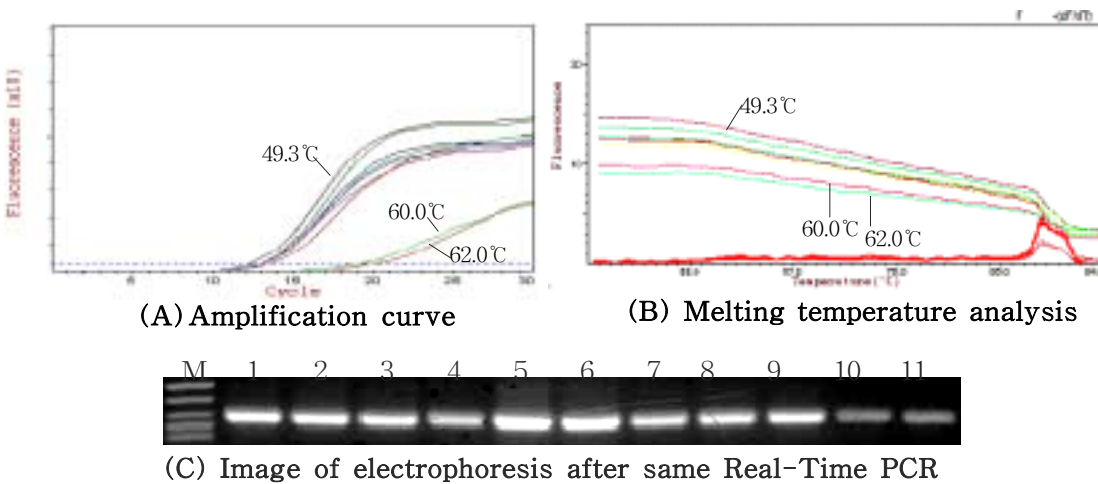


Fig 10. Optimal annealing temperature of *Melissococcus plutonius* specific PCR detection using EFB-NSF/NSR primer pairs. PCRs were performed under condition of $94^\circ C$, 3 min pre-denaturation / $94^\circ C$, 30 sec; gradient annealing temperature, 30 sec; $72^\circ C$, 30 sec; 30 cycles / $72^\circ C$, 5 min post-polymerization. PCR detection of *Melissococcus plutonius* by using primers-pair (EFB-NSF/EFB-NSR). The molecular weight is 564 bp lane M is DNA size marker. respectively; lane 1, annealing temperature on $42.0^\circ C$; lane 2, $43.8^\circ C$; lane 3, $45.6^\circ C$; lane 4, $47.5^\circ C$; lane 5, $49.3^\circ C$; lane 6, $52.9^\circ C$; lane 7, $54.7^\circ C$; lane 8, $56.5^\circ C$; lane 9, $58.4^\circ C$; lane 10, $60.2^\circ C$; lane 11, $62.0^\circ C$. Panel A was shown gradient PCR graph for search to optimal annealing temperature about *Melissococcus plutonius* by using Real-Time PCR. PCR product was amplified to reach threshold first from 11 cycles at PCR in annealing temperature of $49.3^\circ C$. Panel B was melting temperature analysis ($-dF/dT$) of *Melissococcus plutonius* specific Real-Time PCR with various annealing temperature. Panel C was result of electrophoresis after same Real-Time PCR. It could confirm product that agree with fluorescence value of Real-Time PCR. Lane 5 was from PCR in annealing temperature

of 49.3°C

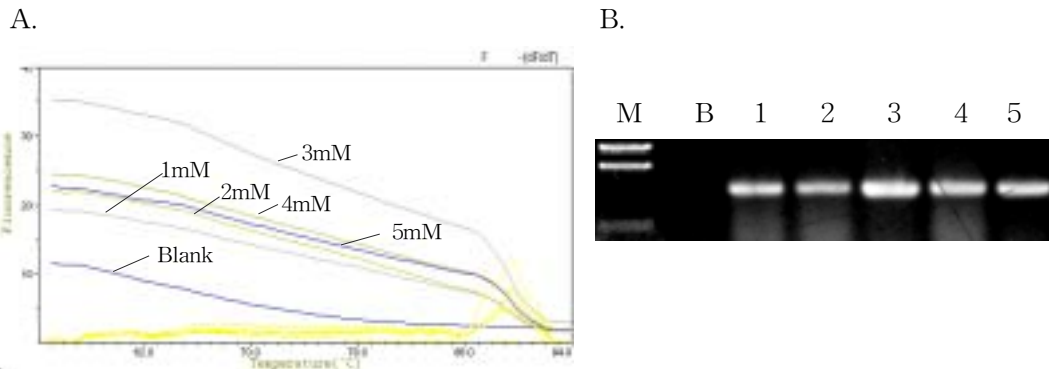


Fig. 11. Optimal MgCl₂ concentration of *Melissococcus plutonius* specific PCR detection using EFB-NSF/NSR primer pairs. PCRs were performed under condition of 94°C, 3 min pre-denaturation / 94°C, 30 sec; 49.3°C, 30 sec; 72°C, 30 sec; 30 cycles / 72°C, 5 min post-polymerization that were with various concentration of MgCl₂. Panel A was melting temperature analysis (-dF/dT) of *P. larvae sub. larvae* specific Real-Time PCR with various concentration of MgCl₂. Four different PCR products with 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mM shown same melting temperature of 88.1°C. Same melting temperature and same figure of graph in -dF/dT will be accepted as an identical contents of PCR products. Panel B was shown an image of electrophoresis after same Real-Time PCR. Lane 1 to 6, concentration of MgCl₂ of 0 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, respectively. In result, the optimal concentration of MgCl₂ was 3 mM.

다. *M. pluton*의 초기 주형 DNA 농도에 따른 특이 Real time PCR의 검출 한계

*M. pluton*의 Real-Time PCR detection의 민감도 (sensitivity)를 조사하기 위하여 *M. pluton* 16S ribosomal DNA clone의 plasmid DNA를 1ng부터 10⁻⁷fg까지 serial dilution 한 후 이를 template로 하여 확립된 최적 PCR조건으로 Real-Time PCR을 수행하였다. Amplification curve의 분석을 통하여 1ng의 template를 사용한 PCR에서 1 ng~10fg의 범위에서는 기질의 양과 C_T 값은 정확한 상관관계가 있는 것으로, 또한 1fg~1x10⁻³fg의 범위에서는 상관관계 및 정량이 불가한 것으로 나타났다 (Fig. 12. B). 이 모든 범위의 PCR에서 생성된 PCR product들은 같은 PCR product들을 가지고 수행된 melting curve 분석에서 -(dF/dT)의 curve 형태의 동일함이 인정되었고, 또한 88.1°C의 동일한 melting temperature가 확인됨으로써 모두 동일한 product만이 생성됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 12. C).

라. 대조 균주들의 인공 DNA 환경 조성에서의 *M. pluton*의 template DNA 농도에

따른 특이 Real time PCR의 감도 확인

*M. pluton*의 Real-Time PCR detection의 특이성 (specificity)을 조사하기 위하여 *P. larvae* *sup.* *larvae*, *P. larvae* *sup.* *alvei*, *B. subtilis*의 chromosomal DNA를 각 100ng씩 혼합하였다. 이는 각각의 DNA를 동량으로 혼합한 것으로 *M. pluton*의 최종 주형 DNA 농도를 1 ng부터 10⁻⁷fg까지 serial dilution 한 후 최적 PCR조건으로 Real-Time PCR을 수행하였다.

혼합시료를 사용한 본 실험의 결과로써 *M. pluton* 고유의 16S rRNA 유전자 서열이 특이적으로, 또한 정량적으로 증폭되는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 *M. plutoni*에 오염 시 존재할 수 있는 다른 오염균과 함께 추출하였을 경우에도, 쉽게 *M. plutoni*의 존재 여부 및 나아가 그 오염 세균의 양을 추산할 수 있을 것으로 사료된다 (Fig. 13).

앞으로 나아가야 할 연구는 간편성 및 신속성에서 보다 큰 장점이 있는 Real-Time PCR 방법을 도입이다. Real-Time PCR진단법은 amplification curve의 분석에 의한 C_T값의 계산과 melting curve분석에 의한 T_m값만으로 전기영동 분석에 준하는 정확성을 보이기에 PCR 수행 과정 중에 실시간으로 질병의 감염 여부를 확인할 수가 있으며 한번의 PCR 수행에서 96개 샘플의 검출이 가능하다. 따라서 Real-time PCR 진단법은 신속성, 민감성, 간편성의 면에서 기존 PCR 진단법의 수준을 크게 진보시킨 것으로 사료되며, 또한 정량성은 국내 봉균에 잠재되어 있는 것으로 예상되는 병원균의 양적 수준에서 발병 가능성의 예측도 가능하리라 기대된다.

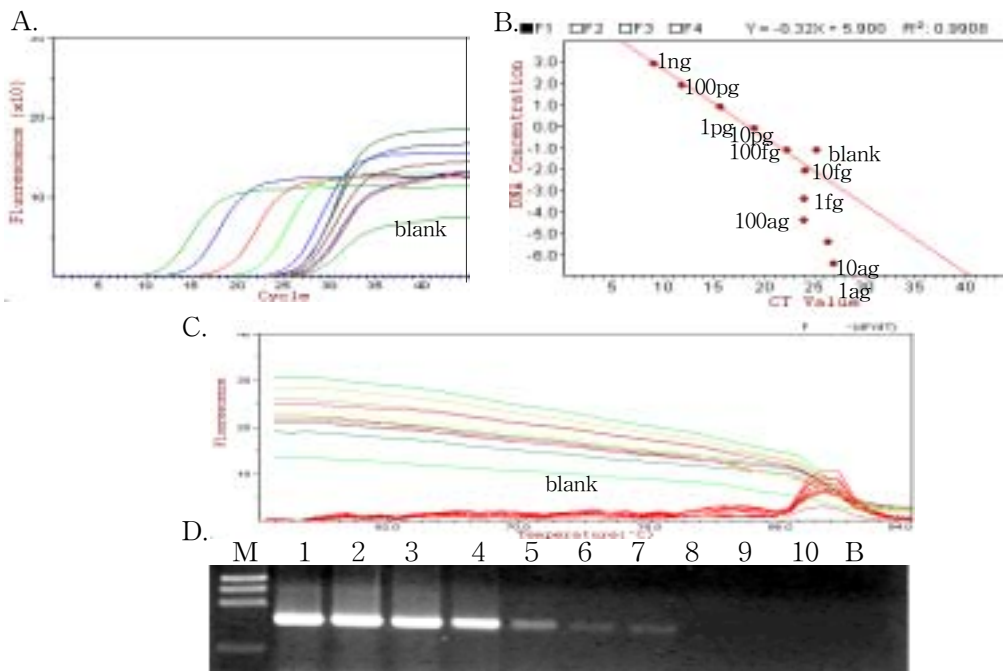


Fig. 12. Real-Time PCR with serially diluted template of *Melissococcus plutonius* using EFB-NSF/NSR primer pairs. Panel A. Real-Time PCR was

performed with standard condition in this study. Initial quantities of template were 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 100 ag (atto gram), 10 ag, 1 ag, respectively. The C_T values were shown initial quantity-dependent manner in the range of 1 ng to 10 fg. Fresh water was used in Blank instead of DNA template. **Panel B.** Regression analysis of same PCR products. The linear relationship between the quantities of initial template and C_T values was fairly accepted. Regression equation was calculated as $Y = -0.32X + 5.900$. Regression coefficient was $R^2 = 0.9908$. **Panel C.** Melting curve analysis of same PCR products. All products were identical, depend on same temperature of midpoint on 88°C , and identical form of curves, except Blank. **D.** An image of electrophoresis of same PCR products. PCR products of 564 bp were shown in all lanes, except Blank. Intensities of PCR bands were not simply decreased in the range of lane 1 to lane 6, though the initial quantities of PCR in lane 1 (1 ng) was 32,768 fold (2^{15} cycles) than one of lane 6 (10 fg).

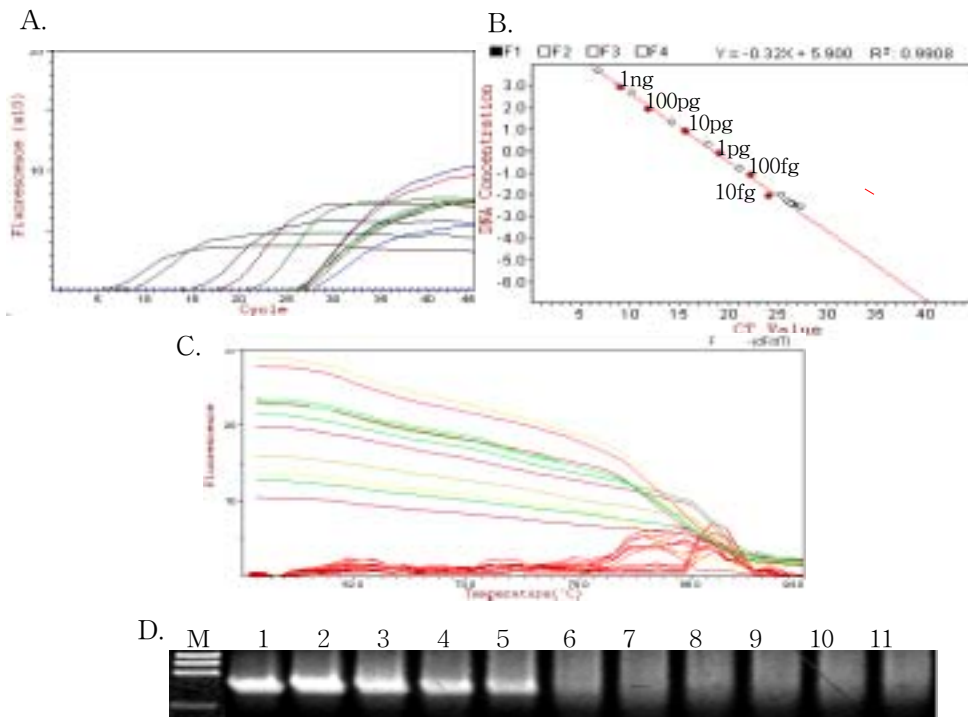


Fig. 13. Real-Time PCR with chromosomal DNA of *M. pluton* and mixed template using EFB-NSF/NSR primer pairs. Panel A. Real-Time PCR was performed with standard condition. Initial quantities of templates were used each 100 ng of chromosomal DNA from *P. larvae sub. larvae*, from *P. larvae sub. alvei*, from *B. subtilis*, and total 100 ng of DNA from 3 strains in the ratio of 1:1:1 (mixed). **Panel B.** Regression analysis of same PCR products. The linear relationship between the quantities of initial template and C_T values was fairly accepted. Regression equation

was calculated as $Y = -0.32X + 5.900$. Regression coefficient was $R^2 = 0.9908$. The C_T values were shown initial quantity-dependent manner in the range of 1 ng to 100 fg. **Panel C.** Melting curve analysis of same PCR products. All products were identical, depend on same temperature of midpoint on 88°C , and identical form of curves, except Blank. Melting curve analysis of same PCR products. PCR products from *M. pluton* and mixed were identical and same temperature of midpoint on 88.1°C . **Panel D.** An electrophoretical image of same PCR products. PCR products of 564 bp were shown in lane 1 to lane 5(mixed). The initial quantities of PCR in lane 1 (1 ng) was 32,768 fold (2^{15} cycles) than one of lane 5 (100 fg).

제 3 항 *M. pluton*, *P. alvei*와 *B. subtilis*의 Multiplex PCR과 Rapid PCR 진단법의 개발

가. *M. pluton*, *P. alvei*와 *B. subtilis*의 종 검출을 위한 특이서열 제작

*M. pluton*의 유전자는 16S rRNA 염기서열 (GenBank Accession No. X75751, X75752, AY862057)이 알려져 있으며 특이 염기서열은 GenBank에 등재된 염기서열을 기반으로 하여 대조균주들과의 상동성을 비교 분석함으로써 선별하였다. 대조균주들은 *P. alvei* (GenBank Accession No. X60604), *B. subtilis* (GenBank Accession No. X60646)의 16S rRNA 염기서열을 PCGENE과 ClustalX (Ver. 1.81)등의 분석프로그램을 통하여 분석하였고 최적의 특이 primer를 선별하고 제작하였고 이를 표 5와 그림 12에 나타내었다.

종 특이 PCR 산물들은 *M. pluton*에 대해서 339bp, *P. alvei* 종에 대해서는 603bp와 *B. subtilis* 종에 의해 438bp의 PCR 산물이 생성되었다. 또한 대조균으로 738bp의 PCR 산물을 확인하였다.

Table 5. Oligonucleotide primers and map used to 16S rRNA

Name	Position of 16S sequence	mer	GC %	Tm	sequence(5'→3')
NP8F	33	19	47.37	58.31	gcgtagcctaatacatgcaa
NP8R	795	22	45.45	56.90	ggtatcctaatcctgtttgctcc
NEFB-F	468	23	43.48	58.51	ggtgccccgtctttcaata
Nalvei-F	203	23	43.48	58.51	atgagaaaggcggagcaat
Nsub-R	476	20	50.00	58.21	gcctattcgaacggtactt

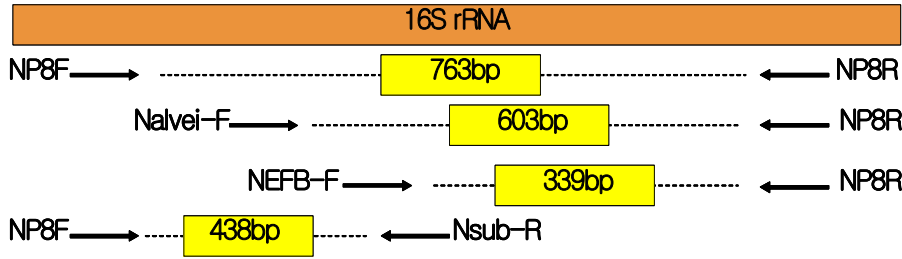


Fig. 14. Species-specific PCR products. Species-specific PCR products amplified by PCR using specific primer pairs. The respective DNA target products were 339 bp (*M. pluton*), 603 bp (*P. alvei*), 438 bp (*B. subtilis*) and 736 bp (control PCR fragment).

나. *M. pluton*, *P. alvei*와 *B. subtilis*의 종 검출을 위한 최적 PCR 조건 확립

각 병원균의 특이 PCR 검출 방법을 위한 최적 PCR 실험 조건으로 annealing temperature의 변화에 의한 증폭률의 변화를 확인하였다. 이는 각 병원균의 template DNA 농도를 10ng으로 조정하고 각기 특이 primer 쌍을 이용하였으며 사용된 PCR 반응액은 표준 조성액으로 하였다. PCR 반응은 Exicycler (Bioneer. Co., Korea)에서 표준 조건으로 수행하였으며 annealing 단계에서 온도 구배를 주었고 각 반응액의 적용 온도는 각기 49.8°C, 51.6°C, 53.5°C, 57.1°C, 58.9°C, 60.7°C, 62.5°C, 64.4°C, 66.2°C, 68°C, 62°C이었다.

또한 최적 MgCl₂ 농도를 알기 위해 0mM부터 5mM까지 1mM씩 MgCl₂의 농도를 올려 MgCl₂ 농도에 따른 PCR을 같은 PCR cycle 조건으로 수행하였다.

최적 PCR 실험 조건으로 annealing temperature는 57.1°C이었다. 정확하게 각 병원균과 대조균을 PCR에 의해 검출하였고 최적 MgCl₂ 농도는 2 mM로 사료되며 본 연구에 사용한 특이 primer쌍은 annealing온도의 변화에 매우 안정적이며, 단일 PCR 산물만을 보임으로 16S rRNA에 매우 특이적임을 확인하였다 (Fig. 15, 16).

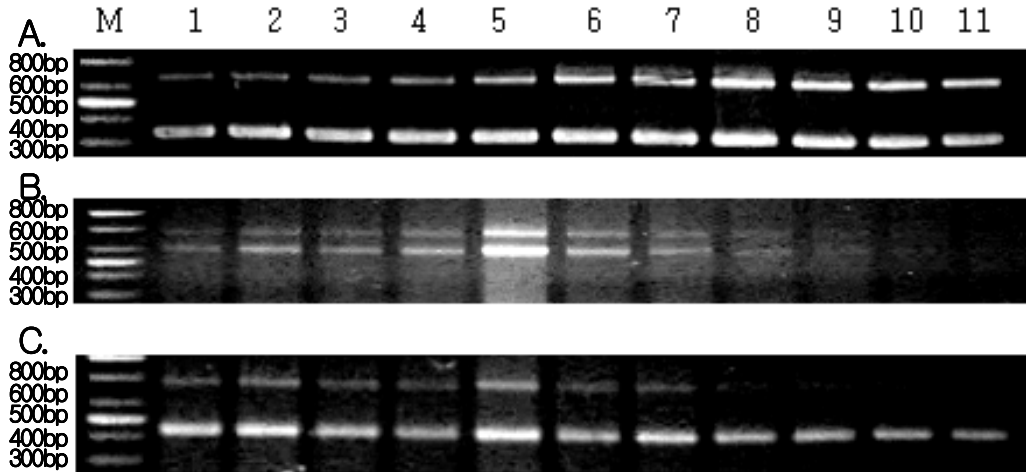


Fig 15. Optimal annealing temperature of each strains specific PCR. Panel A:

M. pluton detection (339 bp/763 bp), **Panel B:** *P. alvei* detection (603 bp/763 bp), **Panel C:** *B. subtilis* detection (438 bp/763 bp). Lane M, 100 bp DNA size ladder marker; lane 1, annealing temperature on 49.8°C; lane 2, 51.6°C; lane 3, 53.5°C; lane 4, 55.3°C; lane 5, 57.1°C; lane 6, 58.9°C; lane 7, 60.7°C; lane 8, 62.5°C; lane 9, 64.4°C; lane 10, 66.2°C; lane 11, 68.0°C.

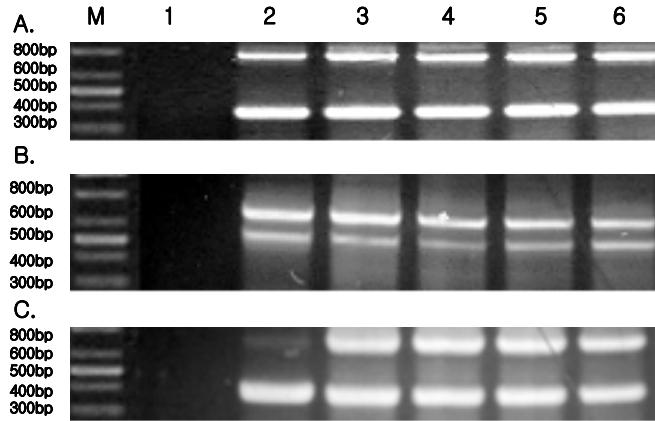


Fig 16. Optimal MgCl₂ concentration of each strains specific PCR

Panel A : *M. pluton* detection (339bp/763bp), **Panel B:** *P. alvei* detection (603bp/763bp), **Panel C:** *B. subtilis* detection (438bp/763bp), Lane M is 100 bp DNA size ladder marker. Respectively; lane 1, MgCl₂ concentration on 0 mM; lane 2, 1 mM; lane 3, 2 mM; lane 4, 3 mM; lane 5, 4 mM; lane 6, 5 mM

다. 초기 주형 DNA 농도에 따른 특이 PCR의 검출 한계

각 병원균의 초기 주형 DNA 농도 (1ng~100fg)에 따른 Rapid PCR을 일반 PCR buffer 상에서 수행하였고 *M. pluton*는 339bp의 특이 PCR 산물과 763 bp의 대조 PCR 산물을 100fg까지 생성하는 것으로 나타났으며 초기 주형 DNA농도가 흐려질수록 대조 산물이 많이 생성되는 것을 확인할 수가 있었다(Fig 17. A). *B. alvei*는 100pg까지 특이 PCR 산물을 검출할 수가 있었으며 *P. subtilis* 경우 10fg까지 특이 PCR 산물을 검출할 수가 있었다 (Fig 17. B, C). Multiplex PCR 경우 10fg까지 각 병원균을 검출할 수 있었지만 *P. alvei*의 PCR 산물이 상대적으로 적었다. 이는 검출 primer 중 NP8R을 NEFB-F, NP8F, Nalvei-F 에 동시에 작용함으로 상대적으로 annealing이 약한 *B. alvei*의 검출된 PCR 산물의 양이 적어진 것으로 사료되며 PCR 검출 시 Nalvei-F의 양을 증가시키거나 NP8R의 양을 증가시켜야 할 것으로 사료된다 (Fig. 17. D).

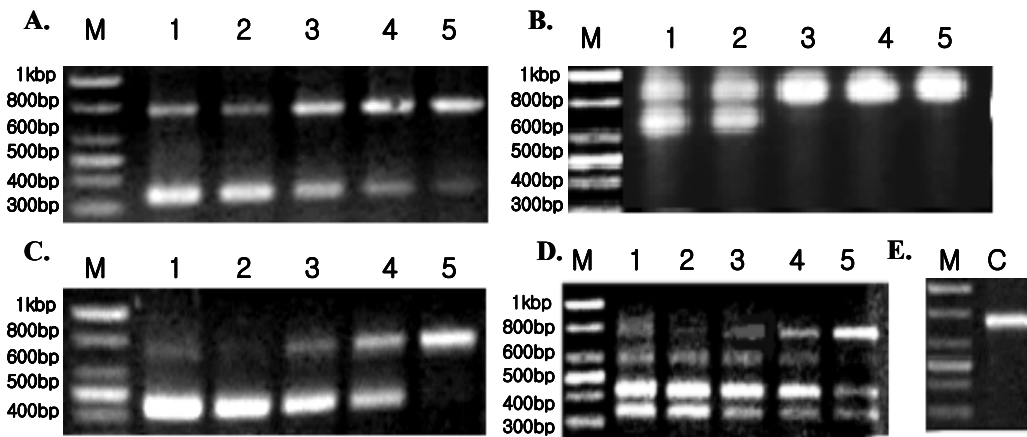


Fig 17. Rapid PCR of each strains specific PCR - General PCR buffer. Panel A: *M. pluton* detection (339 bp/763 bp), Panel B: *P. alvei* detection (603 bp/763 bp), Panel C: *B. subtilis* detection (438 bp/763 bp), Panel D: Mixed DNA (339 bp, 438 bp, 603 bp, 763 bp), Panel E: Negative Control (763 bp) Lane M is 100 bp DNA size ladder marker. Respectively; lane 1, Template DNA 10 ng; lane 2, 1 ng; lane 3, 100 pg; lane 4, 10 pg; lane 5. 1 pg.

라. Rapid PCR buffer를 이용한 Multiplex PCR 검출법

빠른 시간 안에 각 병원균의 검출을 위하여 일반적으로 사용되고 있는 PCR buffer (500mM KCl, 100mM Tris (pH 8.3), 100 mg/ml BSA)의 조성을 달리하여 Rapid PCR (50mM Tris (pH 8.3), 500 μ g/ml BSA)을 수행하였다.

PCR 반응은 GeneAmp PCR System 9600 (ABI. Co., U.S.A)에서 94 $^{\circ}$ C 1분의 predenaturation 후 94 $^{\circ}$ C 1초 (denaturation), 57.1 $^{\circ}$ C 1초 (annealing), 72 $^{\circ}$ C 1초 (extension) 로 30회 반복한 후 최종 신장을 위하여 72 $^{\circ}$ C 2분을 더 주어 증폭하였다. 소요시간은 57분 으로 일반 PCR 반응 조건으로 수행하였을 때 보다 약 1시간 정도가 절약되는 것을 확인 하였다.

Rapid PCR을 Rapid PCR용 buffer 상에서 수행하였을 때에는 일반 PCR buffer 상에서보다 더 많은 PCR 산물이 생성됨을 확인할 수가 있었다 (Fig 18). 이는 buffer 성분 안에 KCl이 포함되어있지 않기에 cooling하는 동안 주형 DNA에 primer가 annealing되어 두 가닥의 DNA를 생성함으로써 PCR 산물의 양이 일반 PCR buffer를 사용했을 때보다 증가되는 것으로 사료된다.

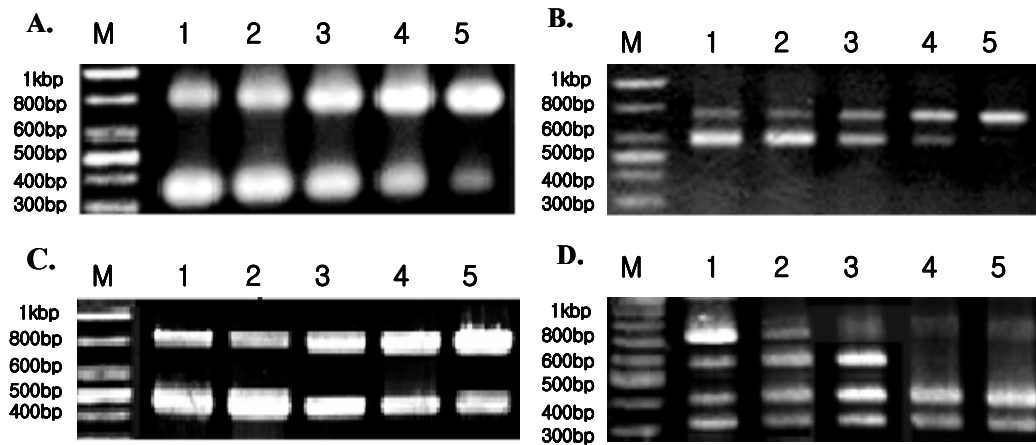


Fig 18. Rapid PCR of each strains specific PCR - Rapid PCR buffer. Panel A: *M. pluton* detection (339 bp/763 bp), Panel B: *P. alvei* detection (603 bp/763 bp), Panel C: *B. subtilis* detection (438 bp/763 bp), Panel D: Mixed DNA (339 bp, 438 bp, 603 bp, 763 bp) Lane M is 100 bp DNA size ladder marker. Respectively; lane 1, Template DNA 10 ng; lane 2, 1 ng; lane 3, 100 pg; lane 4, 10 pg; lane 5, 1 pg.

제 4 항 미국부저병 원인균인 *Paenibacillus larvae* 16S DNA를 사용한 PCR 진단키트의 제조 (양 등, 2002)

가. 사용 균주

① *Paenibacillus larvae* ATCC 9545

American foulbrood disease (AFB)의 원인균으로 꿀벌만을 숙주로 한다. 이 균주는 *P. larvae*의 type strain이며 Gram positive의 간균으로 $2.5 \sim 5.0 \times 0.7 \sim 0.8 \mu\text{m}$ 의 크기를 가진다. spore를 형성한다.

배지는 BHI (Brain Heart Infusion)을 사용하였으며, 성장 중 autolysis되는 특징을 가진다. Selection을 위하여 nalidixic acid $15\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 포함된 BHI를 사용한다.

② *Paenibacillus larvae* ATCC 25747, 25748

ATCC 9545 균주와 같은 American foulbrood disease (AFB)의 원인균이며 꿀벌만을 숙주로 한다. 일본에서 분리된 균주로서, Gram positive의 간균이고 $2.5 \sim 5.0 \times 0.7 \sim 0.8 \mu\text{m}$ 의 크기를 가지며 spore를 형성하는 점은 같으나, ATCC 9545에 비해 조금 가는 형태를 보인다. 배지는 BHI (Brain Heart Infusion)을 사용한다.

나. 16S rRNA 유전자의 분자적 클로닝 및 계통학적 분석

*P. larvae*에서 분자계통분류학적 자료가 될 수 있는 16S rRNA 유전자를 이용하여 표준균주 및 한국산 분리균주로부터 16S rRNA 유전자를 클로닝하고 분석하여 분리균주간의 분류계통관계를 나타내었고 *P. larvae* 검출, 동정을 위한 특이 primer를 제작하였다. Bacteria 16S rRNA broad primer, P8FPL/P806R (Table 6)을 이용해서 *P. larvae*, 표준균주 ATCC 9545, ATCC 25747, ATCC 25748과 한국산 분리균주 SJ23, KNH5, KNH9, pK4-5를 대상으로 PCR 반응을 수행하였고, PCR annealing 온도 55°C에서 802bp의 PCR 반응물을 얻어내어(Fig. 20), pBX-T-vector에 유전자 클로닝하였다. BamHI/HindIII restriction을 통해 약 830bp의 삽입부위와 약 3kb의 벡터 DNA를 포함하는 clone을 확인하였고(Fig. 20), sequencing 반응, 분석을 통해 각각의 16S rRNA 유전자 염기서열을 확보하였다.

또한 Bacteria 16S rRNA broad primer, P515F/P515R (Table 6)을 이용해서 *P. larvae*, 표준균주 ATCC 9545, ATCC 25747, ATCC 25748과 한국산 분리균주 SJ23, pK4-5를 대상으로 PCR 반응을 수행하였고, PCR annealing 온도 55°C에서 904bp의 PCR 반응물을 얻어내어 pBX-T-vector에 유전자 클로닝하였다. BamHI/HindIII restriction을 통해 약 904bp의 삽입부위와 약 3kb의 벡터 DNA를 포함하는 clone을 확인하였고(Fig. 20), sequencing 반응, 분석을 통해 각각의 16S rRNA 유전자 염기서열을 확보하였다.

Table 6. Oligonucleotide primers and map used to 16S rDNA amplification

Primer	Sequence (5'-3')	Reference
P8FPL	<u>CTGCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG</u> <i>Pst</i> I	Eden <i>et al.</i> , 1991
	Genebank No. X60619 4 to 22bp	
P806R	<u>CCGCGGACTACCAGGTATCTAAT</u> <i>Sac</i> II	Reiman <i>et al.</i> , 1992
	789 to 806bp	
P515FPL	<u>CTGCAGTGCCAGCAGCCGCGG</u> <i>Pst</i> I	Reiman <i>et al.</i> , 1992
P13B	<u>GGATCCCAGGCCCGGGAACGTATTCAC</u> <i>Eam</i> HI	Reiman <i>et al.</i> , 1990
	1381 to 1401bp	
16SP1	TTTCCTTCGGGAGACGCCAGG 72 to 93bp	This study
16SP2	GGGGCAGTTACTCCCCTGGCC 456 to 477bp	This study

Table 7. Sequencing homology of 16s rRNA gene in *P. larvae* strains

9545_T7	CTGCAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAAACGCTGGGGCGTGCCTAATACATGCAAGTC
25747_T7	CTGCAGAGTTTGATCCTGGCTCAAGACGAAACGCTGGGGCGTGCCTAATACATGCAAGTC
pK4-5_T7	CTGCAGAGTTTGATCCTGGCTCA-GACGAAACGCTGGGGCGTGCCTAATACATGCAAGTC
SJ23_T7	CTGCAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAAACGCTGGGGCGTGCCTAATACATGCAAGTC
25748_T7	CTGCAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAAACGCTGGGGCGTGCCTAATACATGCAAGTC

9545_T7	GAGCGGACCTTGTGTTTCTTTGCGGAGACGCCAGGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACAC
25747_T7	GAGCGGACCTTGTGTTTCTTTGCGGAGACGCCAGGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACAC
pK4-5_T7	GAGCGGACCTTGTGTTTCTTTGCGGAGACGCCAGGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACAC
SJ23_T7	GAGCGGACCTTGTGTTTCTTTGCGGAGACGCCAGGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACAC
25748_T7	GAGCGGACCTTGTGTTTCTTTGCGGAGACGCCAGGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACAC

9545_T7	GTAGGCAACCTGCCTGTAAGACCGGGATAACTTGGGAAACGTGATCTAATACCGGATAG
25747_T7	GTAGGCAACCTGCCTGTAAGACCGGGATAACTTGGGAAACGTGAGCTAATACCGGATAG
pK4-5_T7	GTTGGCAACCTGCCTGTTAGACCGGGATAACTTGGGAAACGTGAGCTAATACCGGATTG
SJ23_T7	GTAGGCAACCTGCCTGTAAGACCGGGATAACTTGGGAAACGTGAGCTAATACCGGATAG
25748_T7	GTAAGCAACCTGCCTGTAAGACCGGGATAACTTGGGAAACGTGAGCTAATACCGGATAG
	** ***** *
9545_T7	CTGGTTTCTTCGCATGAAGAAGTCATGAAAGACGGGGCAACCTGTCA-CTTACAGATGGG
25747_T7	CTGGTTTCTTCGCATGAAGAAGTCATGAAAGACGGGGCAACCTGTCA-CTTACAGATGGG
pK4-5_T7	CTGGTTTCTTCGCATGAAGAATTTCATGAAAGACGGGGCAACCTGTCA-CTTACAGATGGG
SJ23_T7	CTGGTTTTTTCGCATGAAGAAGTCATGAAAGACGGGGCAACCTGTCA-CTTACAGATGGG
25748_T7	CTGGTTTCTTCGTATGAAGAAATCATGAAAGACGGGGCAACCTGNCNACTTACATATGGG
	***** **** ***** ***** * ***** *****
9545_T7	CCTGGGGCGCATTACTAGTTGGTAGGGTAACGG-CTTACCAANGCGACNATGCGTNGCC
25747_T7	CCTGGGGCGCATTAACTAGTTGGTAGGGTAACGG-CTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCC
pK4-5_T7	CCTGGGGCGCATTAACTATGTGGTANGGTAACNGGCTTACCAAGGTGACGATGCGTACTC
SJ23_T7	CCTGGGGCGCATTAACTAGTTGGTAGGGTAACGG-CTT-CCAAGGCGACAATGCGTNAAC
25748_T7	NCTGCNGCGCATTACCTANTTGGTAAGGTGACGG-NTTACCAANGCNACNATGNGTAACC
	**** ***** *** ***** *** ** * ** ***** * ** *** ** *
9545_T7	GACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACA-CGGCCAAA-CTCCTACNGG-

25747_T7 GACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACA-CGGTCCAGA-CTCCTACGGG-
 pK4-5_T7 GATCTGNGANGGNGANCGGCCACACTGGGACTGNTACA-TTNTCNANAACCTCCTNOGNG-
 SJ23_T7 GACCTGAGAGGGTGAACGGNCAC-CTGGGACTGAGACA-CNGTCNNA-CTCCTACGGG-
 25748_T7 GANCTGTAAGGGTGANCGGTCOCTCTGGGACTGNACATCTGTCCANA-NTTCTACTAGT
 ** *** * ** ** *** * * ***** *** * * * ** * *

9545_T7 AGGCNCAAGTANGG-AATCTT--NCCAATGGAAGAA-AGTTTTGTONGACN-AGGC-CN
 25747_T7 AGGCAACA-GTAGGG-AATCTTCCGCAANTGGNCNAA-AGTCTGACNGAGCA-TGCG-CG
 pK4-5_T7 ANGTATGCAGTANGG-AATCTTTTCG-NAATGCACGATTNNTCTNCCNGACCT-TCNCCN
 SJ23_T7 AANGCANCAGTTNGG-AATCTCCGCAATTGGACGAAACTTCTGANAGNGCA-ANGCNN
 25748_T7 AGGCNCTNTTTCGGTAATCTTTCCGCTTGTACANA-CNTNTGANNGATCNATTNCTAC
 * * * ** *** * ** * * * * * * *

9545_T7 CGTGAGT-GATGAAAGTTTTCNNGTNTTNA-GCCCAGCAG--TAGGGAATCTT-CCGCA
 25747_T7 NGTGAGTTGATNAAAGTTTTCCGATCGTAAAAGCTCTGTTNCCTANCGAAANTT-CCGCA
 pK4-5_T7 TGTTAGT-NTTCTAANTNTTCTCNNTCCCTTNNCCCNANCAGTAGGGAATTTTTCCGCA
 SJ23_T7 NNTNANTNATNANGTTGTCNGATNCTNACNCCANCAG--TAGGGAATCTT-CCGCA
 25748_T7 CGTCNACTGNNTCNGTTNN-NCNNCTCTCTCTNCCAGCAG--TAGGGATTCTT-CCGCA
 * * * * * ** ** ** *****

9545_T7 ATGAACGAAAG-TCTGNCGGA-GCAACNCCGCGTGAG-GA-TGAAGGTTTTCCGGAT-CG
 25747_T7 ATGGACGAAAG-TCTNACGGA-GCAACNCCGCG-TGAGTGA-TGAAGGTTTTCCGGAT-CG
 pK4-5_T7 ATGGACGAAANGTCTNACGGAAGCACCCCGCG-TAAGTGAATAAAGGTTTTCCGGATTCG
 SJ23_T7 ATGGACGAAAG-TCTGACGGA-GCAACGCGCG-TGAGTGA-TGAAGGTTTTCCGGAT-CG
 25748_T7 ATGGACGAAAG-TCTGACGGA-GCAACGCGCG-TGAGTGA-TGAAGGTTTTCCGGAT-CG
 *** ***** ** **** ** * * ** * ** * ***** **

9545_T7 TAAAGCT-CTGTTGCCAAGAAAGAACGGCCAGGGGAGTAACTGCCCCGAGTGACGGTA
 25747_T7 TAAAGCT-CTGTTGCCAAGGAAGAACGGCCAGGGGAGTAACTGCCCCGAGTGACGGTA
 pK4-5_T7 TAAAGCTTCTGTTGCCAAGGAAGAACGGCCAGGGGAGTAACTGCCCCGAGTGACGGTA
 SJ23_T7 TAAAGCT-CTGTTGCCAAGGAAGAACGGCCAGGGGAGTAACTGCCCCGAGTGACGGTA
 25748_T7 TAAAGCT-CTGTTGCTAGGAAGAAG-CCAGGGGAGTAACTGCCCCGAGTGACGGTA
 ***** ***** ** ***** *****

9545_T7 CTTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGG-TAATAAGTAGGGGGCA
 25747_T7 CTTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAGCTACGTGCCAGCAGCCCGG-TAATAAGTAGGGGGCA
 pK4-5_T7 CTTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATAAGTAGGGGGCA
 SJ23_T7 CTTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGG-TAATAAGTAGGGGGCA

25748_T7 CTTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGG-TAATAAGTAGGGGGCA

9545_T7 AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGGCTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGGTGTT
 25747_T7 AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGGCTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGGTGTT
 pK4-5_T7 AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGGCTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGGTGTT
 SJ23_T7 AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGGCTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGGTGTT
 25748_T7 AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGGCTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGGTGTT

9545_T7 TAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGTTGCACTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGTAGGAGAGG
 25747_T7 TAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGTTGCACTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGTAGGAGAGG
 pK4-5_T7 TAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGTTGCACTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGTAGGAGAGG
 SJ23_T7 TAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGTTGCACTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGTAGGAGAGG
 25748_T7 TAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGTTGCACTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGTAGGAGAGG

9545_T7 AAAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCG
 25747_T7 AAAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCG
 pK4-5_T7 AAAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCG
 SJ23_T7 AAAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCG
 25748_T7 AAAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCG

9545_T7 AAGGCGACTTTCTGGCTATAACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGA
 25747_T7 AAGGCGACTTTCTGGCTATAACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGA
 pK4-5_T7 AAGGCGACTTTCTGGCTATAACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGA
 SJ23_T7 AAGGCGACTTTCTGGCTATAACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGA
 25748_T7 AAGGCGACTTTCTGGCTATAACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGA
 *** ** *****

9545_T7 TTAGATACCCTGGTAGTCCGCGG
 25747_T7 TTAGATACCCTGGTAGTCCGCGG
 pK4-5_T7 TTAGATACCCTGGTAGTCCGCGG
 SJ23_T7 TTAGATACCCTGGTAGTCCGCGG
 25748_T7 TTAGATACCCTGGTAGTCCGCGG

아래 Fig. 21.는 *P. larvae* 5가지 균주의 16s rRNA 유전자 염기서열간의 중간 차이를 이용하여 Phylogenic tree를 나타내었다.

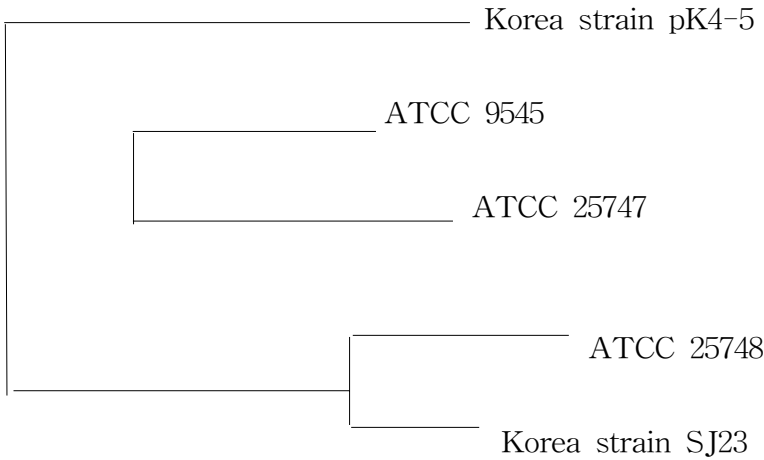


Fig. 21. Phylogenic tree of 16s rRNA gene in *P. larvae* strains

본 연구에서는 Phylogenic tree를 통하여 *Paenibacillus larvae* strain 들의 계통분류학적 연구를 수행하였다. *Paenibacillus larvae*의 표준균주 ATCC 9545, 25747, 25748 / 한국산 균주 SJ23, pK4-5의 16s rRNA gene을 증폭하여 cloning하였으며 그 결과 ATCC 표준균주와 한국산 균주는 약 82% 정도의 상동성을 보이고 있으며, 약 200bp 이상의 variation region을 가진 것으로 나타났다. 각 균주들의 염기서열을 이용한 phylogenic tree에서 일본표준균주 ATCC 25748/ 한국균주 SJ23이 연관성을 가지는 것으로 사료된다. 그러나 한국균주 pK4-5와 SJ23은 지리적으로는 가장 가까운데 반해, phylogenic tree에서는 가장 연관성이 없는 것으로 나타났다.

다. *P. larvae* 종특이 염기서열의 제작 및 검출확인

표준균주 및 한국산 분리균주의 16S rRNA 염기서열을 바탕으로 PCR 검출에 이용할 *P. larvae* 특이적 염기서열을 제작하고자 하였다. 본 연구로 클로닝한 ATCC 9545, ATCC 25747, ATCC25748, KNH5, KNH9, pK4-5의 염기서열 분석 결과와 이미 GeneBank에 등재되어 있는 *Paenibacillus larvae*(GenBank accession no. X60619), *Paenibacillus alvei* (GenBank accession no. X60604), *Bacillus subtilis* (GenBank accession no. X60646), *E. coli*(GenBank accession no. M24996)의 16s rRNA 유전자 염기서열을 PCGENE과 ClustalX등의 분석프로그램을 통하여 비교 분석하였다. 중간 서열변이가 비교적 심한 곳은 *P. larvae* (GenBank accession no. X60619)의 72번째 염기부터 93번째, 그리고 456번째 염기에서 477번째 부분으로 그 부위는 음각으로 표시하였다(Fig. 22). PCR 검출 반응에서 이 부위에 특이적으로 작용하여 405bp의 DNA band를 증폭해낼 특이 primer로 16SP1; 5'-TTTCCTTCCTTCGGGAGACGC- 3'와16SP2; 5'-GGGGCAGTTACTCCCCTGGCC-3'

를 제작하였다.

Forward sequence		
ATCC 9545	ACCTTGTGT--TTCCTTCGGGAGACGCCAG---GTTAGCGG	90
ATCC 25747	ACCTTGTGT--TTCCTTCGGGAGACGCCAG---GTTAGCGG	90
pK4-5	ACCTTGTGT--TTCCTTCGGGAGACGCCAG---GTTAGCGG	90
<i>P. larvae</i>	ACCTTGTGT--TTCCTTCGGGAGACGCCAG---GTTAGCGG	90
<i>P. alvei</i>	ACTTGATGGAGTGCTTGC-----ACTCCTGATGGTTAGCGG	90
KNH9	ACAGAA-G-GGAGCTTGC-----TC-CC-GGATGTTAGCGG	86
<i>B. subtilis</i>	ACAGAT-G-GGAGCTTGC-----TC-CC-TGATGTTAGCGG	86
KNH5	ATGGATTA-AGAGCTTGC-----TC-TTATGAAGTTAGCGG	88
<i>E. coli</i>	TAACAGGAAACAGCTTGCTGCTTT-GCTGACGAGT----GG	90
 * * * ** **	
Reverse sequence		
ATCC 9545	GAAGAACG---GCCAGGGGAGTAA--CTGCCCTGGAGTGA	486
ATCC 25747	GAAGAACG---GCCAGGGGAGTAA--CTGCCCTGGAGTGA	486
pK4-5	GAAGAACG---GCCAGGGGAGTAA--CTGCCCTGGAGTGA	486
<i>P. larvae</i>	GAAGAACG---GCCAGGGGAGTAA--CTGCCCTGGAGTGA	485
<i>P. alvei</i>	GNAGAACG---CCTAGGAGAGTNA--CTNCTNNTNGGGTNA	486
KNH9	GAAGAACAAGTGCAGAGTAAGTCTCG-CACCC----TGA	482
<i>B. subtilis</i>	GAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCT----TGA	483
KNH5	GAAGAACAAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCACCT----TGA	485
<i>E. coli</i>	GAGGAA-GGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCAT----TGA	476
	* . *** * * , *	

Fig. 22. Alignment of 16S rRNA for specific primer.

The PCR primers were based on a region of the *P. larvae* 16S rRNA gene that was not homologous to other closely related bacterial 16S rRNA genes deposited in the available databases. '*' character indicated alignment is perfectly conserved: '.' indicated is well conserved.

Paenibacillus larvae 표준균주 3종(ATCC 9545, ATCC 25747, ATCC 25748), 한국산 분리 균주 6종(K10D4, pK4-5, K45, KNH5, KNH9, K7G1), *E. coli*, *Bacillus subtilis*, 전체 11종의 균주를 대상으로 특이 primer 16SP1/16SP2를 이용해 PCR 반응을 수행하였다. 그 결과 *Paenibacillus larvae* 표준균주 3종과 한국산 분리균주 pK4-5에서만 특이적으로 405bp의 DNA band가 검출됨을 확인하였다(Fig. 23).

본 연구를 통해 제작된 특이 primer가 *P. larvae*를 정확하게 검출하는 것을 확인하였고, 이는 분자유전학적으로 정확한 *P. larvae* 균주의 신속 검출에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.



Fig. 23. PCR detection of *P. larvae* with 16SP1/16SP2.

The PCR primers were designed on the basis of the 16S rRNA gene of *P. larvae* and selectively amplify a 405bp amplicon. PCR detection was specific for *P. larvae* and strain with DNA from closely related bacterial species. Lane M : marker DNA(6.5kb, 2.84kb, 1.39kb, 1.08kb, 0.86kb), lane 1-3 : ATCC 25747, 25748, 9545, lane 4-8 : Korea strain; pK4-5, K7G1, K45, K10D4, KNH5, KNH9, lane 8 : *B. subtilis*, lane 10 : *E. coli*.

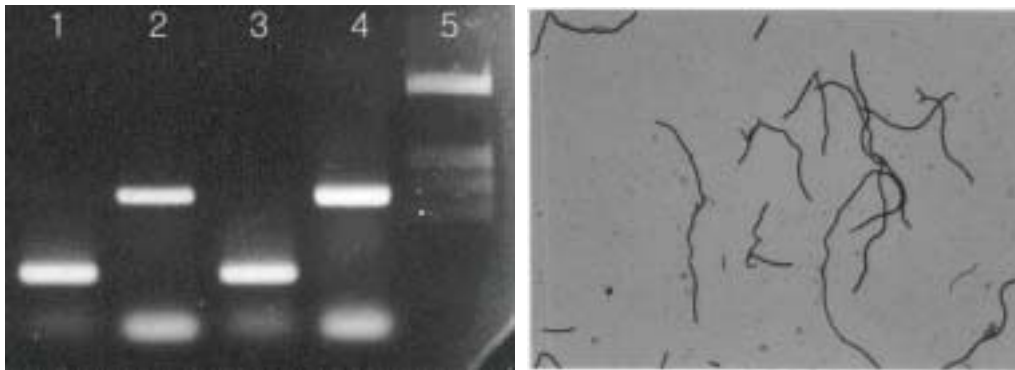


Fig. 24. PCR-detection and identification of *Paenibacillus larvae* strain ATCC 25748. (a) PCR detection of *P. larvae* strain ATCC 25748. Lane 1, PCR was performed with *P. larvae* ATCC 25748 lysate using 16SP1/16SP2 primer-pair deduced from 16 rRNA gene in *P. larvae*. Lane 2, PCR was performed with *P. larvae* ATCC 25748 lysate using PL16S-123/PL16S-224 primer-pair deduced from 16 rRNA gene in *P. larvae*. Lane 3, PCR with *P. larvae* ATCC 9545 (type strain) lysate using 16SP1/16SP2 primers. Lane 4, PCR with *P. larvae* ATCC 9545 lysate using PL16S-123/224. Lane 5, DNA size marker, 2.84kb, 1.30kb, 1.08kb, 860bp, 290bp, respectively. (b) *P. larvae* ATCC 25748. Typically long and narrow chains of bacteria are observed (1,000×).

라. 미국 부저병 검사법의 개발 및 응용

미국 부저병의 원인균인 *P. larvae*는 포자의 형태로 전파되거나 유지된다. 이로 인하여 한번 감염된 봉군은 오염된 봉군으로 미국 부저병의 재발병 확률이 매우 높다. 이에 착안하여 *P. larvae*의 잔류포자를 검사하여 미리 발병을 예측할 수 있는 검사법을 제시하고자 하였다. 봉군 내에 잔류하는 포자를 검출하기 위하여 미국 부저병의 발병이 있었던 오염 소비와 발병이 전혀 없었던 봉군의 소비를 검사시료로 이용하였으며 소비 내 최적의 검사 부위도 비교하였다. 미국 부저병의 병력이 전혀 없는 소비(G라 명명)와 미국 부저병이 발병했었던 오염 소비(S라 명명)에서 벌꿀 화분 저장부위(소비의 상단부 좌우; 각기 A, B로 명명)와 산란부위(소비의 중심 부; C라 명명) 및 소비하단부위(D라 명명)를 지정하여 실험하였다. 벌집 분쇄액을 BHI 배지에 접종 배양한 다음 일정한 간격으로 배양액을 회수하여 PCR 검사했을 때, 오염소비 산란부위(애벌레가 있던 부위)의 5일째 배양액에서 *P. larvae*가 검출되었다(Fig. 25).

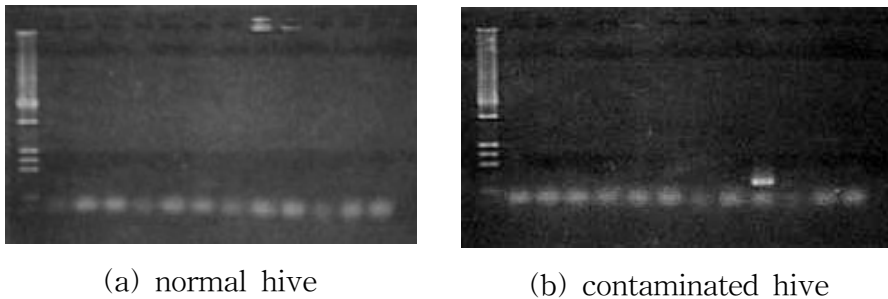


Fig. 25. PCR detection of *P. larvae* from culture of hive wall.

For the detection, we make use of part from hive wall -a portion of living of larva (lane 2, 6, 10), a portion of storage of honey(lane 3, 7, 11), a portion of storage of pollen(lane 4, 8, 12), a lower portion(lane 5, 9, 13). Each lane 1, marker DNA of 6.5kb, 2.84kb, 1.39kb, 1.08kb, 0.86kb, 0.29kb. Lane 2-5 detected from culture after 1 day, lane 6-9 detected from culture after 3 day. Lane 10-13 detected with culture after 5 day. In the lane 10, it is detected *P. larvae* from a portion of living of larva by 16SP1/16SP2 primer.

본 실험결과로 봉군 내에 미국 부저병이 발병하기 전에 잔류포자의 검출 확인으로 미국 부저병의 조기진단 및 예방의 가능성을 제시하였고 오염 소비 내에서 *P. larvae* 포자가 감염숙주인 애벌레가 있었던 벌집의 산란부위에 잔류하여 재 오염의 원인이 되는 것으로 추정하였다. 미 오염봉군과 오염봉군의 판정법에 본 연구 결과가 매우 유용하며, 이를 근거로 한 오염봉군 판정법으로 미국 부저병의 원인균을 봉군에서 쉽게 monitoring 할 수 있어 과도한 항생제 사용과 오용을 예방 할 수 있을 것으로 사료된다. 벌집 외에도 오염소비의 화분과 벌꿀을 이용하여 잔류포자의 검출을 시도하였으나, 본 연구에 의한 PCR 방법으로는 검출되지 않았다.

마. 미국 부저병 PCR 진단 kit의 최적 조건 비교

① *P. larvae* 특이 PCR 검출 방법을 위한 최적 PCR 실험 조건

P. larvae chromosomal DNA를 template로 각기 16SP1/16SP2 primer쌍을 사용하여, 94°C, 30초; 57±10°C, 30초; 72°C, 1분; (30회전)의 조건으로 온도구배(temperature-gradient) PCR을 수행하였다. PCR 반응 중 annealing 단계만 온도 구배를 주었으며 각 반응액의 gradient 온도는 57±10°C (각 반응액의 온도 측정결과는 47.0°C, 47.3°C, 48.4°C, 50.2°C, 52.5°C, 55.1°C, 57.8°C, 60.5°C, 63.0°C, 65.1°C, 66.7°C, 67.5°C)이었다.

P. larvae template DNA에 대한 16SP1/16SP2 PCR 검출 반응에서 annealing온도 47°C 부터 67°C까지 정확한 407 bp의 16S rRNA 특이 PCR band만을 확인할 수 있었고 63.0°C에서 가장 강한 PCR 산물을 생산함이 확인되었다. 폭넓은 annealing온도대의 PCR 실험 결과, 모두 407 bp의 단일 PCR 산물만이 확인되어 본 연구에 사용한 특이 primer쌍 16SP1/16SP2는 annealing온도의 변화에 매우 안정적이며, 또한 단일 PCR 산물만을 보임으로 16S rRNA에 매우 특이적임을 확인하였다(Fig. 26).

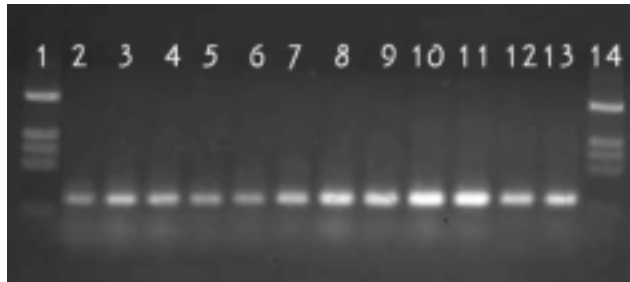


Fig. 26. Optimal annealing temperature of *P. larvae* specific PCR detection using 16SP1/16SP2 primer pair

PCRs were performed under condition of 94°C, 3 min pre-denaturation/ 94°C, 30 sec; gradient annealing temperature, 30 sec; 72°C, 1 min; 30 cycle/ 72°C, 5 min post-polymerization. lane 1 and 14, DNA size marker, 2.86 kb, 1.30 kb, 1.08 kb, 860 bp, 290 bp, respectively; lane 2, annealing temperature on 47.0°C; lane 3, 47.3°C; lane 4, 48.4°C; lane 5, 50.2°C; lane 6, 52.5°C; lane 7, 55.1°C; lane 8, 57.8°C; lane 9, 60.5°C; lane 10, 63.0°C; lane 11, 65.1°C; lane 12, 66.7°C; lane 13, 67.5°C.

② *P. larvae*의 template DNA 농도에 따른 specific PCR의 검출 한계

본 실험에서 개발된 *P. larvae* 특이 PCR의 민감도를 확인하기 위하여 *P. larvae* ATCC 9545의 DNA 각 1 µg, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 0.1 pg, 0.01 pg, 0.001 pg, 0.0001 pg을 template DNA로 사용하여 특이 PCR 검출을 수행하였다.

PCR 결과, 각기 100 ng 및 10 ng의 template DNA에서도 검출이 가능함이 확인되었다

(Fig. 27). 통상 민감도를 높이기 위하여 회전수를 40회전으로 높이거나 Taq polymerase의 농도를 증가시키는 등의 노력은 본 실험에서도 충분히 가능할 것이나, 30회전을 사용하는 것이 일반적인 PCR 조건이기에, 또한 시료 배양액을 간단히 template DNA로 사용하여 검출을 수행할 수 있기에 본 실험에서는 적용하지 아니하였다. 따라서 *P. larvae* 특이 PCR 검출을 위한 template DNA의 최적농도를 100 ng으로 정하였고 이 후의 PCR 조건으로 사용하였다.

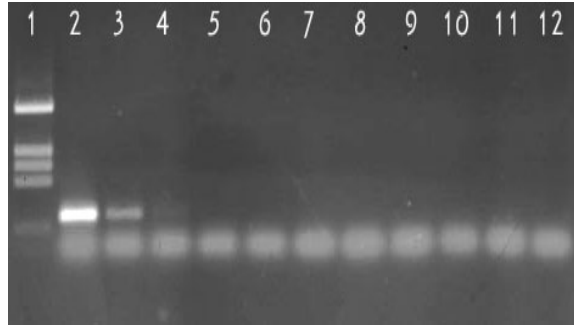


Fig. 27. Detection limit of *P. larvae* specific PCR using 16SP1/16SP2.

Template DNA was obtained from *P. larvae* by routine DNA isolation method (Mini-prep). Each PCR was performed under standard condition except 10-fold diluted template DNA, respectively. lane 1, DNA size marker, 2.86 kb, 1.30 kb, 1.08 kb, 860 bp, 290 bp; lane 2 to 12, template DNA of 1 µg, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 0.1 pg, 0.01 pg, 0.001 pg, 0.0001 pg, respectively.

③ 오염봉균에서 균주의 분리 및 *P. larvae* 신속 PCR 검출법의 적용

미국 부저병으로 예진되는 봉균을 대상으로 본 연구에서 개발된 *P. larvae* 특이 PCR 검출법을 사용하여 그 유용성을 시험하였다. 1999년 상주지방에서 발견된 미국 부저병 유사 증세를 보이는 봉균으로부터 수거한 꿀벌 및 유충을 수집하고, 이를 BHI배지에 접종하여 증식배양을 거친 후, milk plate상에 투명한을 형성하는 균 집락을 선별하고(protease 양성), 이를 검경하여 문헌상의 *P. larvae*와 형태적으로 유사한 5개의 *P. larvae* 유사 균주를 선별하였다.

선발된 균주를 대상으로 확실한 종 동정을 위하여 본 연구에서 개발된 *P. larvae* 특이 PCR을 수행하였다. PCR 결과, *P. larvae* 16S rRNA에서 특유의 407 bp의 PCR 산물을 증폭시킴으로써 본 연구에서 개발된 *P. larvae* PCR 검출법이 한국산 균주에서도 유효함을 보여주었다(Fig. 28).

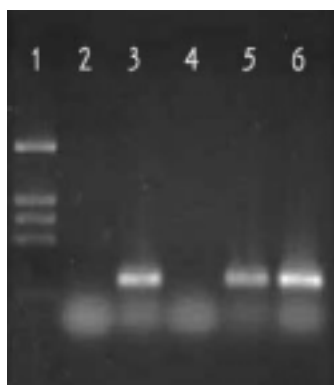


Fig. 28. PCR detection of *P. larvae* and its pathogen for infected sample.
 lane1. DNA size marker, 2.86 kb, 1.30 kb, 1.08 kb, 860 bp, 290 bp; lane 2, unidentified strain 1; lane 3, *P. larvae* strain SJ-15; lane 4, unidentified strain 2; lane 5, *P. larvae* strain SJ-18; lane 6, *P. larvae* strain SJ-23.

제 5 항 Real-Time PCR을 이용한 미국 부저병 원인균인 *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae*의 신속 진단 (이 등, 2004)

가. 사용균주 및 배양

*P. larvae sub. larvae*의 Real-Time PCR 검출법 개발을 위한 표준 균주로서 *P. larvae sub. larvae* strain ATCC9545 균주를 사용하였으며, 인위적인 오염봉균의 재현과 Real-Time PCR 진단법의 특이성을 측정하기 위하여 *Paenibacillus larvae sups. alvei*, *Bacillus subtilis*들을 사용하였다.

이들 균주들은 BHI (Brain Heart Infusion) 배지에서 증식시켰으며 단백질 분해효소의 존재에 의해 *P. larvae sub. larvae*를 순수분리하기 위해 Skim milk plate (5% Skim milk, 10% agar, BHI 고체배지)를 사용하였다. 평판배지의 배양조건은 25°C 또는 37°C를 사용하였으며, 액체 배양의 경우 180 rpm, 37°C으로 진탕배양 하였다.

나. Chromosomal DNA의 분리

*P. larvae sub. larvae*의 Real-Time PCR 검출법 개발을 위해 각 균주들의 chromosomal DNA를 proteinase K 방법을 이용하여 순수분리 하였다(윤, 1999b). 순수 분리된 chromosomal DNA는 spectrophotometer를 사용하여 우선 260nm에서 260/280nm의 흡광도를 측정하여 그 순수도를 측정하였으며, A₂₆₀/A₂₈₀ 이 1.7이상인 것을 실험에 사용하였다. 또한 A₂₆₀흡광도를 측정하여 각 DNA를 정량하였으며, 각각의 Real-Time PCR에서 template로서 사용되었다.

다. primer design

*P. larvae sub. larvae*의 Real-Time PCR detection을 위한 특이 염기 서열은 16s rDNA 유전자(Yoon 등, 1997; 양 등, 2001; GenBank U85263; U86605; U86606)의 염기서열을 이용하여 design 하였다. *P. larvae sub. larvae*의 16s rRNA의 특이 서열 검출을 위한 primer 쌍은 Primer3 program (www.cgi v 0.1 beta 1a)을 이용하여 선별하였으며, 16sNF (5'-GTGTTTCCTTCGGGAGACG-3')와 16sNR (5'-CTCTAGGTCGGCTACGCATC-3')로 명명하고 제작하였다 (Table 7.).

Table 7. Oligonucleotide primers selected for *P. larvae subs. larvae* Real-Time PCR

Primer	Sequence(5' to 3')	Origin	Nucleotide position	Product length (bp)
16sNF	GTG TTT CCT TCG GGA GAC G	16s rDNA	65-83	233
16sNR	CTC TAG GTC GGC TAC GCA TC	16s rDNA	278-297	

라. Optimal PCR condition

*P. larvae sub. larvae*의 Real-Time PCR detection을 위한 최적 annealing 조건을 확립하기 위하여 16sNF와 16sNR primer 쌍 각 20 pmole과 *P. larvae sub. larvae* chromosomal DNA 10ng을 template로 하여 4×GreenStar PCR premix (Bioneer Co., Korea) 5 μ l, 1.0 mM의 MgCl₂ 농도로 총 20 μ l의 반응액을 조성하여 Temperature gradient PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94°C 15분의 pre-denaturation 후 94°C 30초, annealing step에서 50°C -70°C의 범위의 온도 30초, polymerization 1분, scan으로 40cycle을 수행한 후 post-polymerization 5분으로 gradient PCR을 수행하였으며, 이 후 55°C부터 94°C까지 온도를 상승시켜 생성된 PCR산물 각각의 melting temperature analysis를 실시하였다 (ExcylerTM, Bioneer co., Korea). 이 분석은 온도의 변화 대 형광의 감소 (dF/dT)의 그래프로 나타내었으며, 얻어진 T_m (Temperature of midpoint)값을 각 PCR 생성물간의 동일성 여부의 판단근거로 하였다.

또한 최적 MgCl₂ 농도를 알기 위해 0mM부터 2.5 mM까지 0.5 mM씩 MgCl₂의 농도를 올려 MgCl₂ 농도에 따른 PCR을 같은 PCR cycle 조건으로 수행하였다(ExcylerTM, Bioneer Co., Korea).

*P. larvae sub. larvae*의 chromosomal DNA에 대한 primer 16sNF와 16sNR의 각 PCR 반응에서, Real-Time PCR의 Amplification curve는 annealing 온도 60.9°C 반응의 형광값이 가장 낮은 C_T값인 15.0 cycle을 보였으며, 이후의 반응 종료(40 cycle)에서도 가장 높은 형광값을 나타내었으며, annealing 온도는 52°C-62°C까지 폭넓게 사용함이 가능한 것으로

나타났다 (Figure 29. A). 이 결과는 PCR 종료액의 전기영동 상에서도 확인 할 수 있었으며, 설계된 바와 같이 정확한 233bp의 16s rDNA 특이 PCR product를 확인할 수 있었고, 육안으로 관찰한 각 PCR 산물의 양은 Real-Time PCR의 amplification curve에서 예측한 양과 거의 부합됨을 보여 주었다 (Figure 29. B). 따라서 본 연구에서는 이러한 결과를 토대로 primer 16sNF와 16sNR의 최적 annealing 온도를 60.9℃로 정하여 연구를 진행하였다.

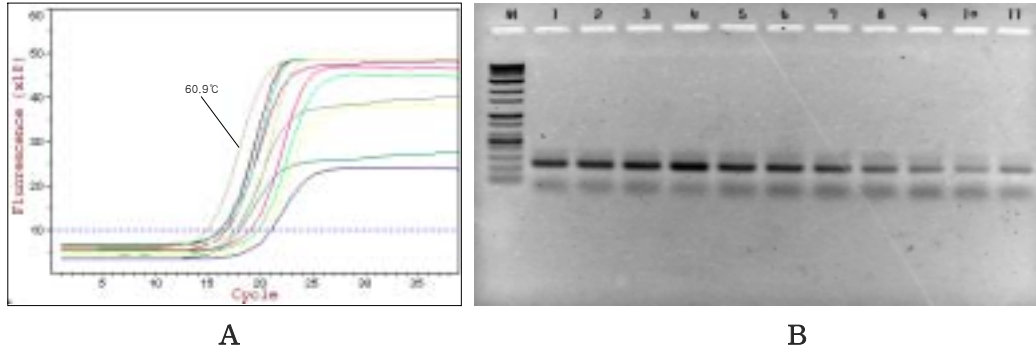


Figure 29. Optimal annealing temperature of *P. larvae sub. larvae* specific PCR detection by using 16sNF/16sNR primer pairs. Panel A was shown gradient PCR graph for search to optimal annealing temperature about *P. larvae sub. larvae* by using Real-Time PCR. PCR product was amplified to reach threshold first from 15.0 cycles at PCR in annealing temperature of 60.9℃. Panel B was result of electrophoresis after same Real-Time PCR. It could confirm product that agree with fluorescence value of Real-Time PCR. Lane 4 was from PCR in annealing temperature of 60.9℃.

또한 PCR 중 최적의 $MgCl_2$ 농도를 구하기 위하여 각각 0mM, 0.5mM, 1.0mM, 1.5mM, 2.0mM, 2.5mM의 농도로 $MgCl_2$ 농도를 변화시켜 수행한 PCR에서, 1.0-2.5 mM의 범위에서 정상적인 amplification curve를 보이는 것으로 나타났으며(자료 미제시), 전기영동 상에서도 예상된 233bp의 product를 확인 할 수 있었다 (Figure 30. B). Real-Time PCR 결과는 melting temperature analysis에서 보다 분명한 결과를 볼 수 있었으며, 역시 1.0, 1.5, 2.0, 2.5mM의 4개의 농도에서 수행된 PCR들 만이 일정한 형태의 melting temperature curve ($-dF/dT$) 및 88.1℃의 일치되는 T_m (Temperature of midpoint)으로 나타나 동일한 증폭 산물이 생산된다는 것을 알 수 있었다(Figure 30. A). 따라서 본 연구에서는 최적 $MgCl_2$ 농도를 88.1℃의 melting 온도를 보이는 1.5mM로 결정 하여 이후 실험에 적용하였다.

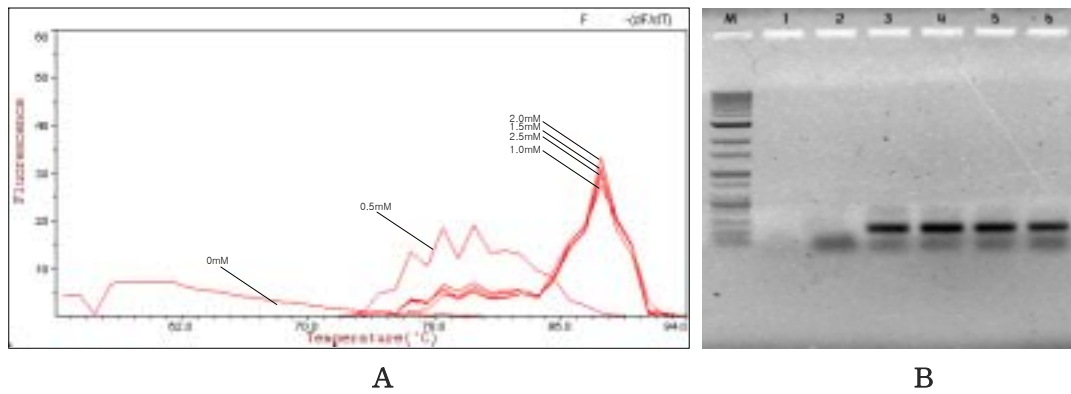


Figure 30. Optimal $MgCl_2$ concentration of *P. larvae sub. larvae* specific PCR detection by using 16sNF/16sNR primer pairs. Panel A was melting temperature analysis ($-dF/dT$) of *P. larvae sub. larvae* specific Real-Time PCR with various concentration of $MgCl_2$. Four different PCR products with 1.0, 1.5, 2.0, 2.5mM $MgCl_2$ were shown same melting temperature of 88.1°C. Same melting temperature and same figure of graph in $-dF/dT$ will be accepted as an identical contents of PCR products. Panel B was shown an image of electrophoresis after same Real-Time PCR. Lane 3, 4, 5 and 6 were PCRs with 1.0mM, 1.5mM, 2.0mM and 2.5mM of $MgCl_2$, respectively.

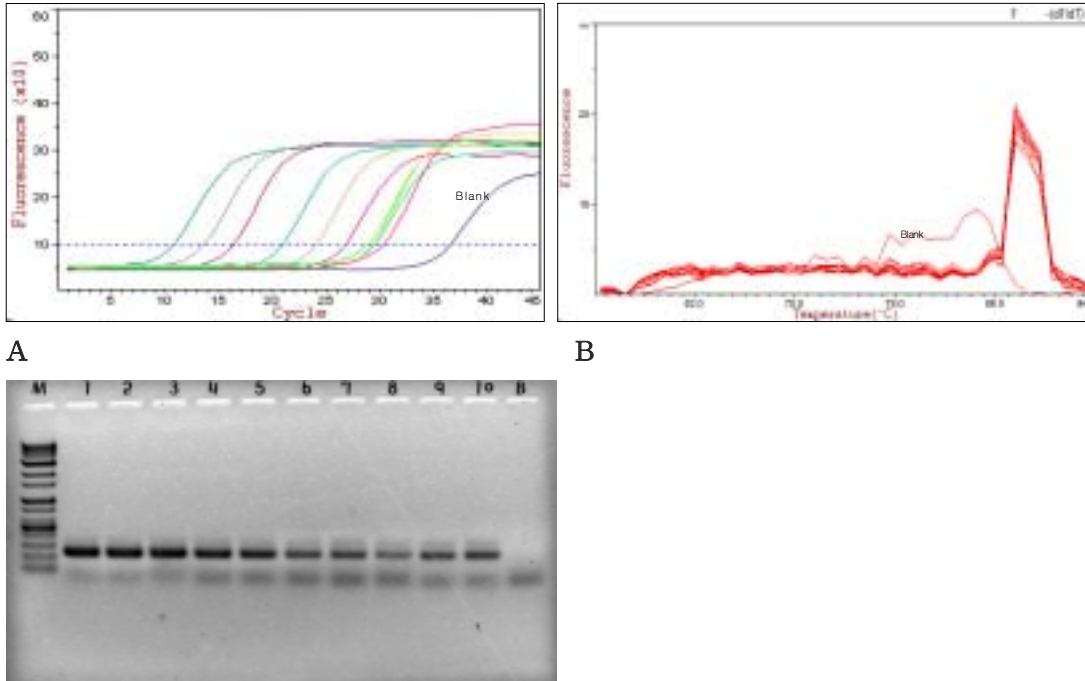
본 연구의 결과에서 16sNF/16sNR primer를 사용한 *P. larvae sub. larvae* specific Real-Time PCR의 표준조건은 다음과 같이 정리되었다. 즉, 16sNF/16sNR primer 각 20 pmole, $MgCl_2$ 1.5mM, dNTP 0.25mM, 10×SYBR 2 μ l, Taq polymerase (GeneClone Co., Korea) 5 units를 총량 20 μ l의 반응액으로 조성하여, 94°C 15분의 pre-denaturation 후 94°C 30초, 60.9°C 30초, 72°C 1분으로 40cycle로 증폭을 시킨 후 72°C 5분의 post-polymerization으로 PCR을 수행하였을 경우 최적의 검출능력을 보인 것으로 나타났으며, 이 반응조건은 ExcylerTM (Bioneer Co., Korea)를 사용하였을 때 얻어진 것이다.

마. *P. larvae sub. larvae* 특이 Real-Time PCR의 검출 한계

*P. larvae sub. larvae*의 Real-Time PCR detection의 민감도(sensitivity)를 측정하기 위하여 *P. larvae sub. larvae* 16s clone plasmid DNA를 1ng부터 10⁻³fg까지 연속 희석한 후 이를 template로 하여 위에서 확립된 PCR조건으로 Real-Time PCR (ExcylerTM, Bioneer, Korea)을 수행 하였다.

Amplification curve의 분석을 통하여 1ng의 template를 사용한 PCR에서 C_T 값은 10.3 cycle로, 1x10⁻³fg의 sample에서의 C_T 값은 30.5 cycle로 나타났으며, 1ng - 1fg의 범위에서는 기질의 양과 C_T 값은 정확한 상관관계가 있는 것으로, 또한 0.1 fg - 1x10⁻³fg의 범위에서는 상관관계 및 정량이 불가한 것으로 나타났다(Figure 31. A). 이 모든 범위의 PCR에서 생성된 PCR product들은 같은 PCR product들을 가지고 수행된 melting curve

분석에서 $-(dF/dT)$ 의 curve 형태의 동일함이 인정되었고, 또한 88.1°C의 동일한 melting temperature가 확인됨으로써 모두 동일한 product만이 생성됨을 확인할 수 있었다 (Figure 31. B). Real-Time PCR에서의 결과를 비교하기 위한 동일한 PCR 산물의 전기영동 결과도 정확한 233bp의 product가 10^{-3} fg까지 확인되었다(Figure 31. C).



C

Figure 31. Real-Time PCR with serially diluted template of *P. larvae sub. larvae* using 16sNF/16sNR primer pair.

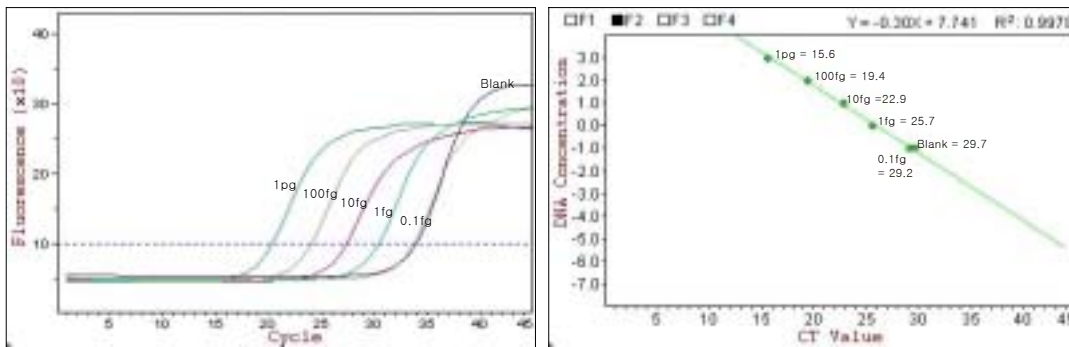
Panel A. Real-Time PCR was performed with standard condition in this study. Initial quantities of template were 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 100 ag(atto gram), 10 ag, 1 ag, respectively. The C_T values were shown initial quantity-dependent manner in the range of 1 ng to 1 fg. Fresh water was used in Blank instead of DNA template. **Panel B.** Melting curve analysis of same PCR products. All products were identical, depend on same temperature of midpoint on 88.1°C, and identical form of curves, except Blank. **Panel C.** An image of electrophoresis of same PCR products. PCR products of 233 bp were shown in all lanes, except Blank. Intensities of PCR bands were not simply decreased in the range of lane 1 to lane 5, though the initial quantities of PCR in lane 1 (1 ng) was 10,000 fold than one of lane 5 (100 fg).

*P. larvae sub. larvae*의 Real-Time PCR detection에서 초기 기질의 양을 정량적으로 측정하기 위하여 *P. larvae sub. larvae* 16s clone plasmid DNA를 1pg부터 10^{-7} fg까지 연속 희석한 후 이를 template로 하여 위에서 확립된 PCR조건으로 Real-Time PCR

(ExcylerTM, Bioneer, Korea)을 수행 하였다.

Amplification curve의 분석을 통하여 1pg의 template를 사용한 PCR에서 C_T 값은 15.6 cycle로, 0.1fg의 sample에서의 C_T 값은 29.2 cycle로 나타났으며, Blank의 C_T 값은 29.7 cycle로 나타났다(Figure 32. A). 또한 0.01 fg (10 attogram)에서 10⁻⁷ fg (0.0001 ag)의 범위에서는 C_T 값이 각기 33.4, 33.8, 33.6, 31.9, 33.2, 32.5의 매우 좁은 범위의 값으로 주어지며, 이 범위에서는 기질의 양과 C_T 값은 상관관계의 계산에서 전혀 의미가 없는 것으로 나타났다. 이 결과로써 C_T 값의 유효 범위를 결정할 수 있었으며, 본 실험에서는 그 유효 C_T 값이, Blank의 C_T 값인 29.7 cycle 이내로, 이를 일반화 한다면 10 cycles에서 Blank의 C_T 값까지가 유효 C_T 값의 범위라 할 수 있을 것이다 (자료 미제시). 사실 본 실험에서 사용한 *P. larvae sub. larvae*의 특이 template는 16S rDNA 염기서열을 포함한 약 4kb의 재조합 DNA로써, 1 fg의 DNA는 2.3x10² 개, 즉 23개 copy의 유전자를 의미한다. 연속희석법에 의한 오차를 감안하여도, 본 실험에서 나타난 0.1 fg의 DNA를 특이하게 증폭시켰다는 것은 단 2개의 특이 유전자를 검출한 것으로 해석되며 최고의 민감도를 보였다고 사료된다.

초기 기질의 양을 계산하기 위하여 DNA의 양과 C_T값과의 회귀직선을 구하였으며, 이는 $Y = -0.30X + 7.741$, $R^2 = 0.9978$ 과 같이 계산되었다. (Figure 32. B). 또한 Melting curve analysis에서 0.1 fg이상의 template로 수행한 PCR product는 정상적 T_m값 (88.1℃)을 나타내었으나, 0.01 fg (10 attogram)에서 10⁻⁷ fg (0.0001 ag)의 범위에서 생성된 PCR product는 76℃-82℃에 이르는 비정상적 T_m값을 나타내었으며, 전기영동에 의한 확인에서 전자는 233 bp의 정확한 PCR product의 band를 보여주었으나, 후자의 경우 PCR band를 전혀 확인할 수 없었다(자료 미제시).



A **B**
Figure 32. Standard Real-Time PCR with serially diluted template of *P. larvae sub. larvae* using 16sNF/16sNR primer pair. Panel A. Initial quantities of template were 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 100 ag(attogram), 10 ag, 1 ag, 0.1 ag, 0.01 ag, 0.001 ag, 0.0001 ag, respectively. The C_T values were shown initial quantity-dependent manner in the range of 1 pg to 0.1 fg. Fresh water was used in Blank instead of DNA

template. **Panel B.** Regression analysis of same PCR products. The linear relationship between the quantities of initial template and C_T values was fairly accepted. Regression equation was calculated as $Y = -0.30X + 7.741$. Regression coefficient was $R^2 = 0.9978$.

바. Mixed template 조건하에서의 *P. larvae sub. larvae* 특이 Real-Time PCR의 검출 한계

*P. larvae sub. larvae*의 Real-Time PCR detection의 특이도(specificity)를 검증하기 위하여 *P. larvae sub. larvae*, *P. larvae sub. alvei*, *Bacillus subtilis*의 chromosomal DNA를 개별 또는 각각 혼합하여 Real-Time PCR의 template로 사용하였다.

*P. larvae sub. larvae*의 경우, 순수 분리된 chromosomal DNA 100 pg을 사용하였으며, 혼합시료의 경우, *P. larvae sub. larvae*, *P. larvae sub. alvei*, *Bacillus subtilis*의 chromosomal DNA를 각기 1:1:1로 혼합하여 각 PCR 당 100 pg을 사용하였다.

본 연구의 표준 조건으로 Real-Time PCR을 수행한 결과 *P. larvae sub. larvae*의 단독 또는 타 균주의 chromosomal DNA와 혼합 template를 사용한 PCR에서만 정상적 C_T 값인 18.3 cycles, 22.5 cycles가 나타났으며, 타 균주의 chromosomal DNA를 template로 사용한 PCR에서는 33 cycle이상의 비정상 C_T 값이 측정되었다(Figure 33. A). 동일한 PCR산물을 가지고 수행한 melting point 분석에서, *P. larvae sub. larvae*의 단독 또는 혼합 template를 사용한 PCR에서만 정상 T_m 값 (88.1°C)을 보였으며, 이들은 타 균주의 chromosomal DNA를 template로 사용한 PCR의 결과와 T_m 값 및 melting curve의 형태에서 쉽게 그 차이를 확인할 수 있었다(Figure 33. B). 동일한 PCR산물을 전기영동하여 분석한 결과, *P. larvae sub. larvae*의 단독 또는 혼합 template를 사용한 PCR에서만 예상된 233bp의 PCR 증폭산물이 확인 되었으며, 타 PCR에서는 유사한 PCR 산물이 발견되지 아니하였다(Figure 33. C). 본 실험에 사용한 *P. larvae subs. larvae*의 초기 template의 양은 100 pg으로 이는 *P. larvae subs. larvae*의 chromosomal DNA의 총 길이를 대장균의 그것과 같은 수준인 4000 kb로 가정하였을 경우, 2.3×10^4 개의 16S rDNA 유전자로 계산되며, 같은 가정하에 혼합시료에서 *P. larvae subs. larvae*만의 초기 template의 수는 7.7×10^3 으로 계산된다. 측정된 C_T 값은 18.3 cycles, 22.5 cycles로써, 이는 plasmid DNA를 사용한 본 연구의 정량 측정값, 즉 100 fg의 4 kb DNA (2.3×10^4 개의 16S rDNA 유전자)의 C_T 값은 19.4 cycles, 10 fg의 4 kb DNA (2.3×10^3 개의 16S rDNA 유전자)의 C_T 값은 22.9 cycles로 나타난 것과 매우 근접한 것으로 나타났다.

따라서 혼합시료를 사용한 본 실험의 결과로써 *P. larvae subs. larvae* 고유의 16S rDNA 유전자 서열이 특이적으로, 또한 정량적으로 증폭되는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 *P. larvae subs. larvae* 포자에 오염된 시료를 존재할 수 있는 다른 오염균과 함께 추출하였을 경우에도, 쉽게 *P. larvae subs. larvae*의 존재 여부 및 나아가 그 오염 세균의 양을 추산할 수 있을 것으로 생각된다.

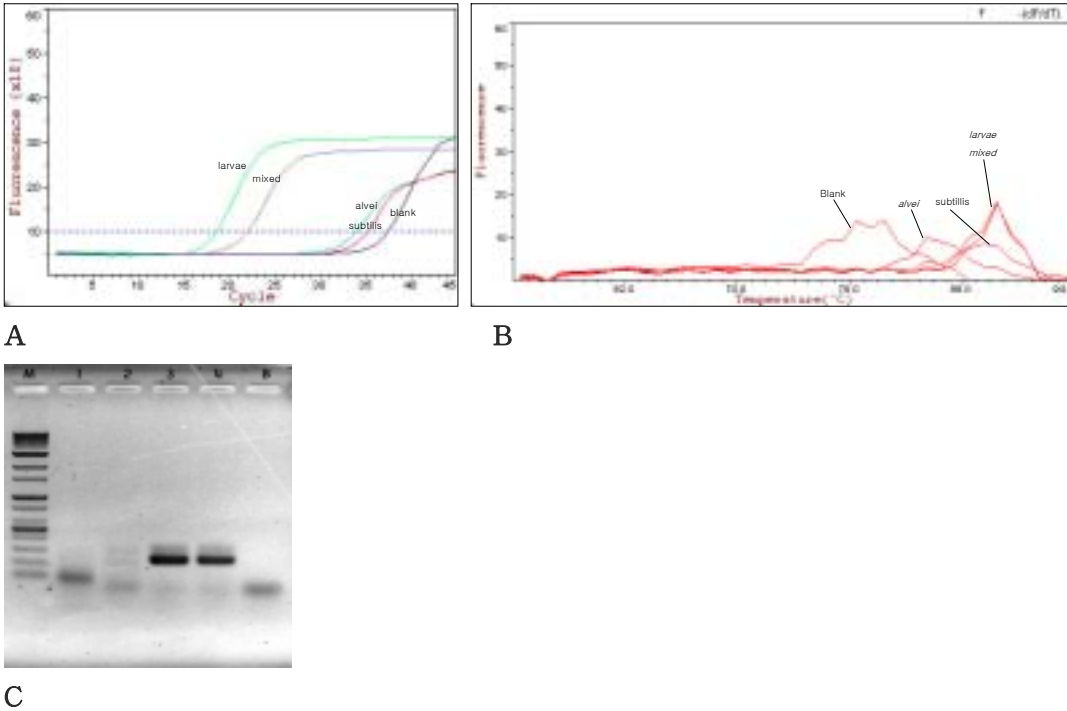


Figure 33. Real-Time PCR with chromosomal DNA of *P. larvae sub. larvae* and/or mixed template using 16sNF/16sNR primer pair.

Panel A. Real-Time PCR was performed with standard condition. Initial quantities of templates were used each 100 pg of chromosomal DNA from *P. larvae sub. larvae* (larvae), from *P. larvae sub. alvei* (alvei), from *Bacillus subtilis* (subtilis), and total 100 pg of DNA from 3 strains in the ration of 1:1:1 (mixed). Fresh water was used in Blank instead of DNA template. The C_T values were calculated as 18.3 cycles (larvae), 22.5 cycles (mixed). **Panel B.** Melting curve analysis of same PCR products. PCR products from larvae and mixed were identical and same temperature of midpoint on 88.1°C, except Blank, alvei and subtilis. **Panel C.** An electrophoretical image of same PCR products. PCR products of 233 bp were shown only in lane 3 (larvae) and lane 4(mixed).

본 연구는 *P. larvae subs. larvae*의 PCR 검색 및 진단에서 간편성 및 신속성에서 보다 큰 장점이 있는 Real-Time PCR 방법을 도입하고자 기획되었다. 본 연구에서 제시하는 Real-Time PCR을 사용한 *P. larvae subs. larvae* 특이 진단법은 amplification curve의 분석에 의한 C_T 값의 계산과 melting curve분석에 의한 T_m 값만으로 전기영동 분석에 준하는 정확성을 보인 것으로 나타났다. 또한 본 연구에서 제시한 primer set 16sNF/16sNR는 기존의 제시된 detection primer set 들(Govan 등, 1998; 1999; 양 등, 2001; 2002)에 비해 보다 민감한 것으로 나타났으며, 최고 20개 분자의 유전자도 무난히 증폭한 것으로 측정되었

다. 따라서 본 연구에서 제시하는 진단법은 신속성, 민감성, 간편성의 면에서 기존 PCR 진단법의 수준을 크게 진보시킨 것으로 사료되며, 또한 본 연구에서 제시된 뛰어난 정량성은 국내 봉군에 잠재되어 있는 것으로 예상되는 *P. larvae* *sups. larvae*의 포자의 양의 수준, 나아가 발병가능성의 예측도 가능하리라 기대된다.

제 2 절 꿀벌 세균성질병 진단용 ELISA kit의 개발

2차년도에는 미국 부저병의 원인균인 *P. larvae*와 유럽부저병의 원인균인 *Melisococcus pluton*에 대한 ELISA 방법을 개발하였다. 두 가지의 원인균은 꿀벌 체내에서 아포의 상태로 존재하므로, 면역학적인 검출법의 표적은 상기 세균들의 아포상태에서 검출이 되도록 개발하였다. 이에 따라 배양된 세균으로 하여금 아포가 형성되도록 처리하고, 형성된 아포를 회수하여 면역원으로 사용하였다. BALB/c 마우스에 면역시켜 얻어낸 단클론항체는 부저병의 원인균인 *P. larvae*와 유럽부저병의 원인균인 *Melisococcus pluton*을 특이적으로 검출하였으며, 이들 단클론항체의 pair를 조합하여 ELISA kit을 개발하였다.

본 과제에서 새로이 개발된 ELISA kit은 미국부저 및 유럽부저병을 진단하는 여타의 재래식 기존 방법, 즉, 임상증상에 의거한 형태학적인 관찰에 비하여 확정적인 결과를 제시할 수 있을 뿐 아니라 특이도와 민감도가 높은 방법으로서 현장적용 시험을 거친 후 실용적인 상용 kit으로의 응용이 기대된다. ELISA kit 개발을 위한 **단일클론항체의 개발과 kit화를 위한 공통적인 연구내용**은 아래와 같다.

가. BALB/c mouse의 면역

준비한 아포항원을 침전용적 대비 2배 용적의 생리식염수에 부유시킨 후 아포항원 50 ul를 동량의 CFA에 유제화하여 4주령의 암컷 BALB/c 마우스의 복강내 접종하여 각 아포에 대한 면역을 실시하였다. 면역계획은 Table 2 에 나타내었다. 제 2회 면역부터는 5일 간격으로 동량의 항원과 Freund's incomplete adjuvant(FIA)의 유제액을 복강내로 면역시켰다. 5, 6, 7회 면역은 동량의 항원만을 마우스 복강 내에 접종하였으며 최종접종 후 24시간 후에 경추 탈구시켜 살 처분하고 얻어낸 spleen 세포를 세포융합에 공여하였다.

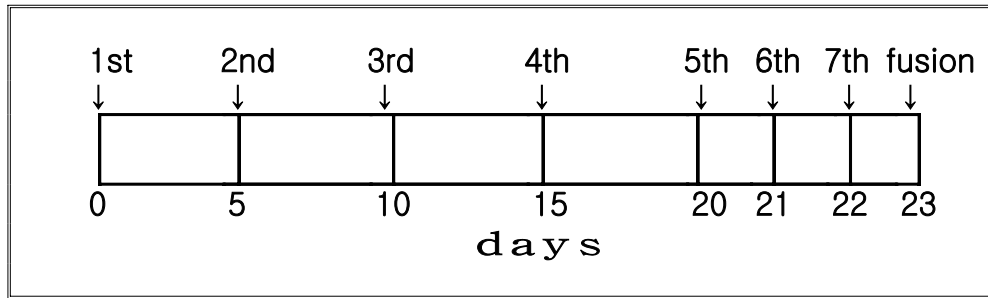


Table 8 . Immunizing schedule of *Paenibacillus larvae* and *M. pluton* for developing hybridoma clones secreting monoclonal antibody against immunized bacterial spores.

나. 세포융합

면역된 BALB/c mouse의 비장을 취하여 세포융합에 사용하였다. 심장을 통하여 전 채혈하고, 70% ethanol에 침적한 후, 가위와 포셉을 사용하여 비장을 적출한 후, 70% ethanol에 1회, washing media에 2회 침적하였다. 세포융합에 사용되는 모든 용액은 37°C로 미리 가온하여 사용하였다.

비장세포의 적출을 위하여 50 ml tube 위에 불에 달군 stainless steel mesh(400목)을 놓았다. 그 위에 분리된 비장을 놓고 3 ml 주사기를 이용하여 비장 내에 washing medium을 주입시켜 부풀린 후 외피를 절개하며 washing medium 20 ml를 첨가하며 비장세포를 분리하였다. 이후 4회 원심분리 (300 x g, 4분, RT)하여 세척하였다. 비장세포의 2회 세척 시 Mid-log phase 상태로 증식하는 SP/2 myeloma cell을 50 ml tube에 넣고 동시에 원심분리(1500rpm, 4분, RT)하여 3회 세척하였다. 원심분리 후 침전된 세포의 packed volume이 spleen cell과 동일하게 되도록 세포량을 조절하여 비장세포와 SP/2 myeloma cell을 혼합하였다. 이후 3회 더 원심분리를 실시하여 혈청성분을 완전히 제거하였다. 마지막 세척 후 washing medium을 완전히 제거한 상태에서 침전된 세포들을 부드럽게 tapping하여 tube 바닥에 얇게 골고루 퍼지게 한 후, PEG-1500를 가하여 세포융합을 실시하였다. 융합이 완료된 세포들은 washing medium으로 3회 원심분리 (300 x g, 4분, RT)하여 세척하였다.

HAT medium 80 ml에 침전된 세포를 부유시켜 96 well flat bottom plate에 150 ul씩 분주하였다. 약 5일간 HAT medium을 추가하며 세포융합이 되지 않은 SP/2 cell을 사멸시켰다. 이후 3일간 HT medium을 분주하였다. 세포의 증식정도를 살피며 따라 배양액 교환 주기를 조절하였다.

다. Hybridoma clone의 선별을 위한 ELISA

특이 항체를 분비하는 Hybridoma clone을 선별하기 위하여 세포가 증식하여 well 바닥

의 1/3 정도 채워졌을 때 배양 상층액을 100 ul씩 취하여 ELISA를 실시하였다. 항원을 coating buffer로 희석 (10 ug prot/ml)하고, 96well ELIAS plate (Nunc, maxisorb, USA)에 100 ul씩 분주하여 4°C에서 16시간 흡착시켰다. 상층액을 제거하고 PBS로 3회 세척 후, 비특이적인 항체의 결합을 억제하기 위하여 0.2%의 BSA blocking 용액 200 ul를 각 well에 분주하여 4°C에서 2시간 정치하였다. 상층액을 제거하고 PBS로 3회 세척 후 건조시켜 냉장보관하며 hybridoma 선별을 위한 ELISA에 사용하였다.

배양된 hybridoma 세포 상층액을 100 ul씩 ELISA plate well에 가한 후 실온에서 40분 동안 반응 시켰다. 다시 PBS로 3회 세척하고 Goat anti-mouse Ig G-HRP를 conjugate buffer로 희석하여 100 ul씩 가하고, 실온에서 40분 반응시켰다. PBS로 3회 세척하고 chromogen buffer에 0.1% ABTS와 0.02%의 과산화수소를 함유한 액을 각 well에 100 ul씩 첨가하고 실온에서 40분 반응시킨 후 405 nm (referance 파장 492nm)에서 흡광도를 측정하였다.

ELISA 결과 흡광도가 2.0이상이 되는 clone들은 따로 선별하여 일부 동결시켜 보관하며, 제한희석법 (0.5 cell/ well) 으로 특이항체를 분비하는 clone을 선별하였다. 선별된 hybridoma는 추가적인 배양을 실시한 후 복수생산에 공여하였다.

라. 복수 생산

특이항체를 분비하는 hybridoma clone은 BALB/c 마우스에 2×10^6 cell 씩 접종하여 고농도의 단클론항체를 함유하는 복수를 생산하였다. 복수 생산용 마우스 (12주령, female)는 세포접종 1주일 전에 미리 pristane (2, 3, 10, 14-tetra- methyl- pentadecane, Sigma, USA) 0.5 ml 씩 복강 내로 접종하여 감각시켜 놓았다. 이 후 약 10일간 복수형성 상태를 살피며 복수를 채취하였다. 채취된 복수는 원심분리 후 냉동보관 하였다.

마. 단클론항체의 정제

Protein G - sephrose 4B gel을 이용하여 복수중의 IgG를 정제하였다. 컬럼 (100 x 15 mm) 에 충전시켰다. 복강에 접종하여 얻은 복수는 PBS로 5배 희석한 후 컬럼에 흘러 보냈으며 (0.3 ml/min), 이 후 세척은 PBS로, 항체 용출은 3M NaSCN을 사용하였다. 회수된 IgG 분획은 10 mlM Phosphate buffer, pH 7.2 로 투석하고, 단백질량을 측정하고, 제균 여과한 (0.22 um pore size) 후, ELISA를 위한 흡착 plate 및 HRP 접합체의 제조에 사용하였다.

바. 단클론항체의 isotyping

단클론항체의 isotyping은 isotyping kit (Sigma, USA)을 이용하여 수행하였다. 제조자의 순서에 따라 하이브리도마 배양상층액 2~3 ml를 적용하여 nitrocellulose membrane strip에서 biotin-avidin enzyme detection system으로 하이브리도마가 분비하는 항체의 isotype

을 확인하였다.

사. HRP-MAb conjugates 생산

Wilson과 Nakane(1978년)의 방법에 따랐다. 우선 horse radish peroxidase(HRP, RZ=3.0) 5 mg을 1.2 ml 증류수에 녹인후 0.1 M NaIO₄ 300 μ l를 첨가하고 실온에서 20분간 약하게 흔들여 주었다. 이후 MAb가 10 mg/ml을 첨가하고 2시간 동안 실온에서 약하게 흔들여 준 후 NaBH₄ (4 mg/ml)을 100 μ l를 넣어 주었다. 냉장에서 2시간 반응시킨 후 PBS를 이용하여 투석한 후 냉장에 보관하며 사용하였다. 접합체의 안정을 위하여 BSA를 10% 되게 가하고 0.02 %되게 thimerosal을 가하여 주었다.

아. MAb coated plate 준비

정제된 단클론항체들을 항원으로 coating buffer에 희석하고, 이를 96well ELISA plate (Nunc, polysorb, USA)에 100 μ l씩 분주하며 37 $^{\circ}$ C의 항온기에 2시간 정치한 후 4 $^{\circ}$ C의 냉장 조건으로 16시간 흡착시켰다.

자. Antibody pair 결정

준비된 plate를 PBS로 3회 세척하고 양성배양액과 음성배양액을 PBS에 희석하여 well 당 100 μ l씩 분주하여 실온에서 30분간 다시 정치한 후 PBS로 3회 세척하였다.

이 후 HRP-항체 접합체를 Conjugate buffer에 희석하고 각 well에 100 μ l씩 분주하고 실온에서 30분간 방치 한 후에 PBS로 3회 세척하였다. Substrate buffer를 100 μ l씩 분주하고 30분 후에 이를 405nm와 refeance 492nm에서 Reading하여 흡광도를 측정하였다.

차. Sandwich ELISA를 위한 capture항체와 tracer항체의 조건 조사

결정된 Antibody pair의 각각의 항체를 capture항체 및 conjugate로 사용하여 배양된 항원을 통하여 ELISA system을 개발하였다. 흡착은 capture 항체를 약 10 μ g/ml이 되게 희석하여 실시하였고, blocking 용액으로는 0.2% bovine serum albumin (BSA)이 첨가된 PBS를 사용하였으며 이 후의 세척은 PBS로 3회 실시하였다. 항원으로는 spore 배양액을 0.2% BSA가 첨가된 PBS-T에 계단희석하여 40분간 실온에서 반응시켰다. Tracer로는 HRP와 결합시킨 단클론항체 접합체액을 항원희석액과 동일한 용액으로 희석하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 이 후의 반응은 항체가 측정을 위한 ELISA와 동일조건으로 실시하였다.

제 1 항 *M. pluton* spore 검출용 Sandwich ELISA kit의 개발

가. *M. pluton* 아포항원 준비

*Melisococcus pluton*은 절대 혐기 균으로 anaerobic gas mixture N₂ 90%, CO₂ 10%를 사용하며 배양온도는 30℃이며 Glove box에서 배양하였다. 배지 조성은 Table 9에 표시하였으며 배지의 혐기상태 확인을 위해서 Resazurin을 배지에 포함시켜 차후에 배지의 혐기상태를 재확인하였다.

Table 9. composition of *Melisococcus pluton* culture medium per liter

	component	amount to add per
		1liter
<i>M.</i> <i>plutonius</i> medium	Glucose	10.0g
	Soluble starch	2.0g
	Peptone(Oxoid L37)	2.5g
	Neopeptone(Difco 0119)	2.5g
	Yeast extract(Oxoid L21)	5.0g
	Trypticase(BBL 11921)	2.0g
	1M Phosphate buffer, pH 6.7	50.0ml
	Cysteine HCl · H ₂ O	0.25g
	Resazurin 0.001g/ml	1ml

* Adjust medium for final pH7.2. Dispense medium into tubes flushed with 90% N₂-10% CO₂ and immediately plug with butyl rubber stoppers. Autoclave at 121℃ for 15minutes.

* Always use freshly prepared pre-reduced media or pre-reduced media that has been previously prepared but stored under anaerobic conditions. Resazurin in the media is a color indicator for anaerobic conditions. Observance of pink color in medium before use or during incubation shows anaerobic conditions have not been met and oxidation has occurred. Medium should be discarded.

나. Hybridoma clone 개발

유립부저병 원인체인 *M. pluton*의 아포와 특이적으로 반응하는 hybridoma clone 중 지속적인 계대를 통하여 안정적인 항체분비를 확인하여 선정된 4 종을 BALB/c 마우스의 복강내에 접종하여 얻은 복수를 Protein G Sepharose gel을 이용한 Affinity chromatography를 통하여 정제한 단클론항체들의 역가를 측정 한 결과는 Fig 34와 같이 10⁵ 배 이상의 역가를 나타내었다.

한편, 이들 항체의 isotype은 Table 11과 같이 4종 공히 IgG1 type이었다. 이들 clone은

특이도를 보이는 조합을 선별하여 아포 검출용 sandwich ELISA kit의 개발에 사용하였다.

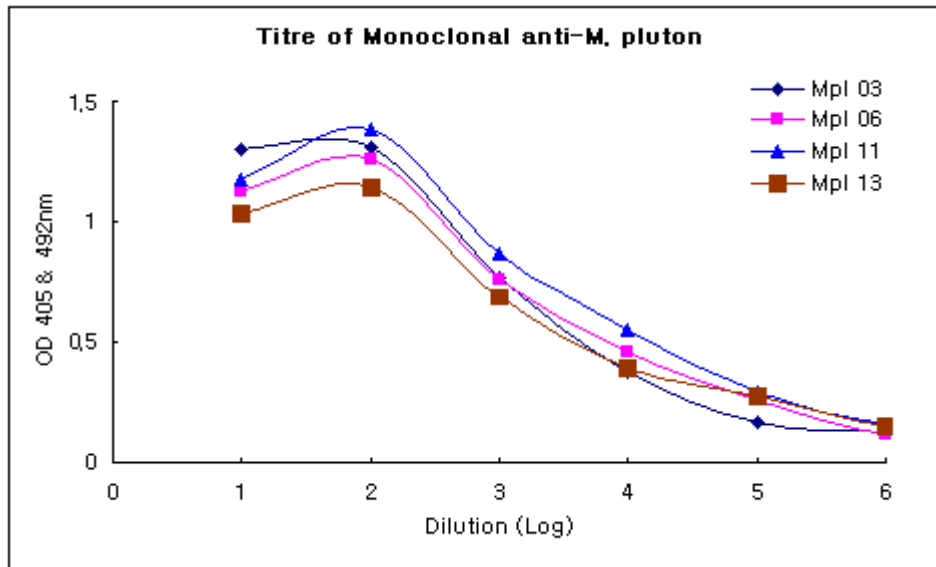


Fig 34. ELISA results of culture supernatant of Hybridoma clones showing specific reaction with *M. pluton* spore antigen.

Table 10. Titer and protein concentration of affinity purified monoclonal anti-*M. pluton*

Clone	OD280nm		Protein Con. mg/ml	Titre (log10)	Volume(ml)
	×5	×10			
Mpl 03	0.281	0.141	1.0	5	6.5
Mpl 06	0.377	0.110	1.4	6	7
Mpl 11	0.240	0.159	0.8	7	5.5
Mpl 13	0.137	0.042	0.5	7	6.5

Table 11. Characterization of monoclonal antibodies to *M. pluton* spore by isotype determination.

Clone no	Antibody type
Mpl 03	IgG1
Mpl 06	IgG1
Mpl 11	IgG1
Mpl 13	IgG1

다. 단클론항체의 특이도

본 실험에서 최종적으로 선정된 4종의 단클론항체들이 기타의 세균들과 교차반응성을 보이는가 알아보기 위하여 연구실에 소장중인 일반세균 12종을 대상으로 ELISA를 실시한 결과 공시된 세균들과 교차반응을 보이지 않았다(Table 12).

Table 12. Specificity analysis of antibodies by ELISA with different bacterial species.

Bacterial strains	Monoclonal Antibodies			
	Mpl 03	Mpl 06	Mpl 11	Mpl 13
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-
<i>E.coli</i> K88ab	-	-	-	-
<i>pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-
<i>E.coli</i> O175:H7	-	-	-	-
<i>Streptococcus mastitis strain 1</i>	-	-	-	-
<i>Streptococcus mastitis strain 2</i>	-	-	-	-
<i>Rhodococcus</i>	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus 1</i>	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus 2</i>	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-
<i>Micrococcus leutus</i>	-	-	-	-

라. Antibody pair 결정

Sandwich ELISA의 capture 및 Tracer antibody의 결정을 위하여 정제된 항체를 각각 plate coating 및 효소 (HRP) 접합체를 제조한 후 *M. pluton* spore antigen (약 10^8 cell/ml)을 사용하여 분석한 결과는 *P. larvae* 의 경우에 비하여 전체 조합에서 양성의 결과를 보였으나, Fig 35 와 같이 Mpl 06을 capture로 사용하고 Mpl 03을 tracer로 사용할 때와 Mpl 13을 capture로 사용할 경우에 가장 높은 signal을 보였으나 MP88의 경우는 복수 산생능이 상대적으로 미약하였으므로, 상품화를 위한 kit의 최적화 실험에 Mpl 03 및 Mpl 06을 적용하여 개발하기로 하였다.

Table 13. Determination of antibodies pair of sandwich ELISA for the detection of *P. larvae* spore antigen.

		Tracer (HRP-MAb conjugates)			
		Mpl 03	Mpl 06	Mpl 11	Mpl 13
Capture (plate coating Mab)	Mpl 03	-	++	++	+
	Mpl 06	+++	-	++	+++
	Mpl 11	+	+	+	+
	Mpl 13	+	+	+	-

마. Sandwich ELISA의 검출한계

봉체내의 *M. pluton* spore의 검출 민감도를 조사하기 위해 spore 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 /ml 가 되게 희석하여 sandwich ELISA를 실시하였다. fig 25와 같이 1×10^5 cell/100 ul의 검출감도를 보였으며 이는 100 ul의 시료량으로 고려할 때 1×10^4 까지 검출이 가능한 성적이며, 추가적인 최적화를 실시한다면 유럽부저병 진단용 ELISA kit의 산업화에 문제점이 없을 것으로 사료된다.

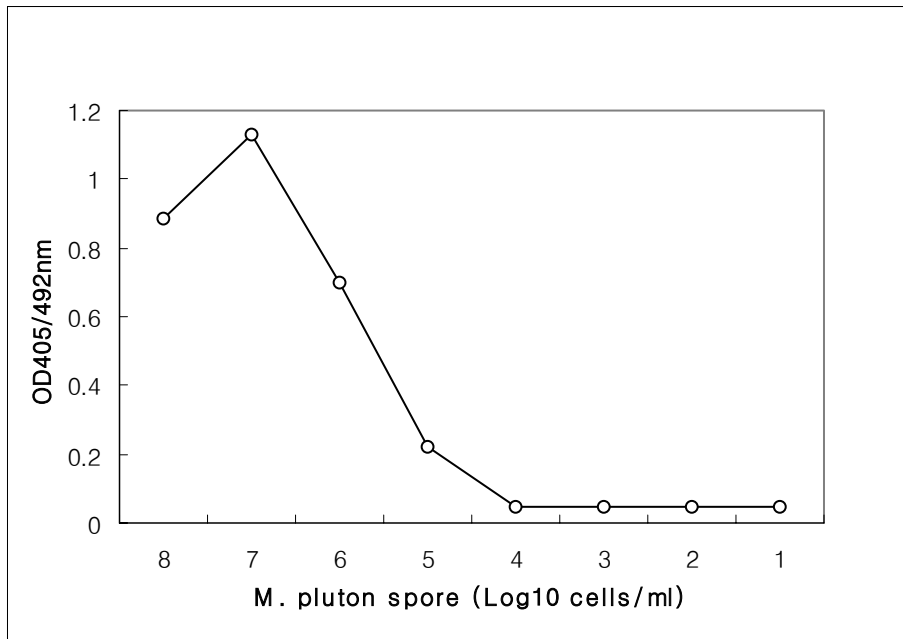


Fig. 35. Sensitivity study of sandwich ELISA for the detection of *M. pluton* spore antigen.

바. ELISA kit의 민감도 및 특이도

EFB의 진단에는 아직까지 표준화된 진단법이 제시되어있지 않고, 임상진단 및 드물게 균 분리동정 방법에 의존하기 때문에, ELISA kit의 민감도 및 특이도의 비교는 본 연구에서 기 개발한 PCR 방법을 표준으로 비교하여 보았을 때 민감도 95.7%, 특이도 100%를 보였다(table 14). 분석을 위한 유충 및 성충 시료는 마리 당 각 1 ml의 PBS-T를 가하고 균질화 시킨 후, 약 10분간 정치한 상층을 취하여 ELISA 분석하였다. 상층액은 전형적으로 x100배 희석하여 분석하였다

Table 14. PCR법과 ELISA검사 결과의 비교

ELISA kit	PCR (Ref. method)		소계
	양성	음성	
양성	22	0	22
음성	1	88	89
소계	23	88	

가. Sensitivity: $22/(22+1)*100= 95.7\%$

나. Specificity: $88/(88+0)*100= 100\%$

제 2 항 P. larvae spore 검출용 Sandwich ELISA kit의 개발

가. P. larvae 아포항원 준비

1) P. larvae 배양

P. larvae (ATCC 25748)를 BHI plate에 도말하여 하루 동안 37℃에서 배양하고 이중 single colony를 택하였다. 선택한 single colony를 BHI broth에 접종하고 배양 (37℃, 180rpm)하였다. 배양 후 spore 형성을 위하여 배양된 균을 4℃에서 1주일간 정치하여 spore 형성을 유도하였다.

2) P. larvae 아포확인

아포형성 여부를 확인하기 위해 슬라이드에 도말하여 자연 건조시킨 후 malachite green 염색시약을 떨어뜨리고 가열판에서 2~3분간 가온 염색한 다음 냉각하고 tap water로 세척하였다. Safranin으로 30초간 대조염색한 후 세척하고 검경하였다.

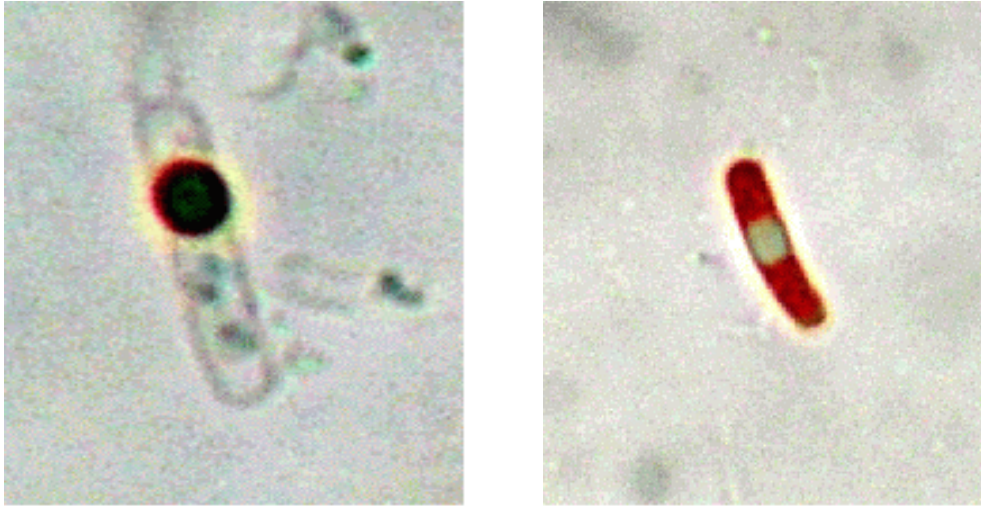


Fig 36. *Paenibacillus larvae* 의 포자

나. 아포항원 분리

아포형성이 확인된 각 균주의 배양액은 원심분리하여 (1,600 x g, 20 분, 3회, 생리식염수) 침전을 회수하여 냉동보관 (-70°C)하며 BALB/c 마우스의 면역원 혹은 hybridoma clone 선정을 위한 항원으로 사용하였다.

다. Hybridoma clone 개발

2차년도에 이어 3차년도에도 지속적인 Cell fusion을 통하여 선출한 *P. larvae* 아포와 특이적으로 반응하는 hybridoma clone 중 지속적인 계대를 통하여 안정적인 항체분비를 확인한 5 종의 clone을 마우스에 접종하여 얻은 복수를 Protein G Sepharose gel (Pharmacia LKB, Sweden)을 이용한 Affinity chromatography를 통하여 정제한 단클론항체들의 역가를 측정된 결과는 Fig 37 과 같이 10^5 배 이상의 역가를 나타내었다.

한편, 이들 항체의 isotype은 Table 15와 같이 4종의 IgG1과 1종의 IgG2b type이었다. 이들 clone은 특이도를 보이는 조합을 선별하여 아포 검출용 sandwich ELISA kit의 개발에 사용하였다.

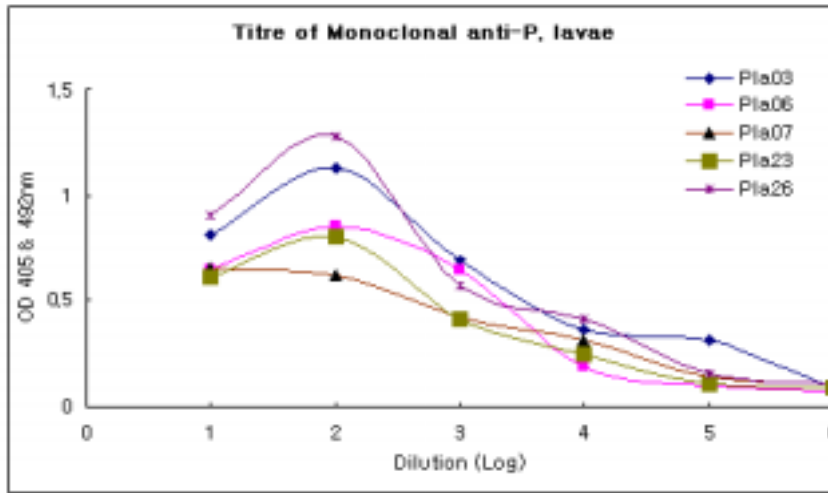


Fig 37. ELISA results of culture supernatant of Hybridoma clones showing specific reaction with *P. larvae* spore antigen.

Table 15. Titer and Protein concentration of affinity purified monoclonal anti-*P. larvae*

Clone	OD280nm		Protein Con. mg/ml	titer (Log10)	Volume(ml)
	×5	×10			
Pla03	0.182	0.066	0.66	6	8
Pla06	0.777	0.519	2.85	5	8
Pla07	1.031	0.795	3.79	5	8.5
Pla23	0.137	0.070	0.5	5	8.5
Pla26	0.892	0.582	3.2	5	8

Table 16. Characterization of monoclonal antibodies to *P. larvae* spore by isotype determination.

Clone no	Antibody type
Pla03	IgG1
Pla06	IgG1
Pla07	IgG1
Pla23	IgG2b
Pla26	IgG1

라. 단클론항체의 특이도

본 연구에서 최종적으로 선정한 5 종의 단클론항체들이 기타의 세균들과 교차반응을 보이는가 알아보기 위하여, 연구실에 소장중인 일반세균 12종을 대상으로 ELISA를 실시한

결과 공시된 세균들과 교차반응을 보이지 않았다.

Table 17. Specificity analysis of antibodies by ELISA with different bacterial species.

Bacterial strains	Monoclonal antibodies				
	Pla03	Pla06	Pla07	Pla23	Pla26
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-
<i>E.coli</i> K88ab	-	-	-	-	-
<i>pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
<i>E.coli</i> O175:H7	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus mastitis strain 1</i>	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus mastitis strain 2</i>	-	-	-	-	-
<i>Rhodococcus</i>	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus 1</i>	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus 2</i>	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus leutus</i>	-	-	-	-	-

마. Antibody pair 결정

Sandwich ELISA의 capture 및 Detector antibody의 결정을 위하여 정제된 항체를 각각 plate coating 및 효소 (HRP) 접합체를 제조한 후 *P. larvae* spore antigen (약 10⁸ cell/ml) 을 사용하여 분석한 결과는 Table 18 와 같이 Pla07을 capture로 사용하고 Pla06을 tracer 로 사용하였을 때 가장 강한 signal을 나타내었으므로, 추후의 실험과 kit의 상품화를 위한 최적화 시험에 Pla06 및 Pla07 clone을 적용하기로 하였다.

Table 18. Determination of antibodies pair of sandwich ELISA for the detection of *P. larvae* spore antigen.

		Tracer (HRP-MAb conjugates)				
		Pla03	Pla06	Pla07	Pla23	Pla26
Capture (plate coating Mab)	Pla03	-	-	+	+	-
	Pla06	-	-	+++	+	++
	Pla07	+	++++	++	+++	+++
	Pla23	++	+	++	+	+
	Pla26	+	-	+	+	-

바. Sandwich ELISA의 검출한계 조사

봉체내의 *P. larvae* spore의 검출 민감도를 조사하기 위해 spore 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 /ml 가 되게 희석하여 sandwich ELISA를 실시하였다. fig 23과 같이 1×10^5 cell/100 ul의 검출감도를 보였으며 이는 100 ul의 시료량으로 고려할 때 1×10^4 까지 검출이 가능한 성적이며, 추가적인 최적화를 실시한다면 산업화를 위한 kit 개발이 가능할 것이다.

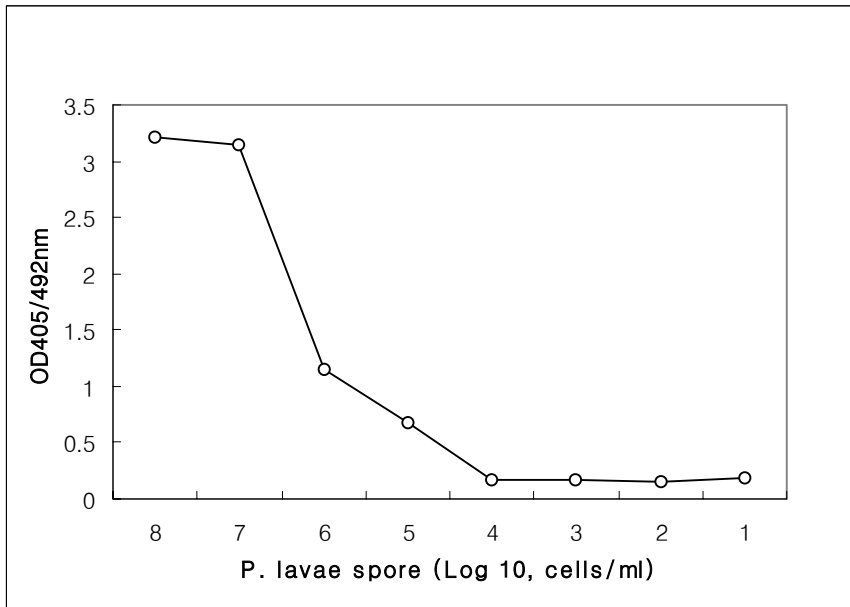


Fig. 38. Sensitivity study of sandwich ELISA for the detection of *P. larvae* spore antigen.

사. ELISA kit의 민감도 및 특이도

미국부저의 진단에는 아직까지 표준화된 진단법이 제시되어있지 않고, 임상진단 및 드물게 균 분리동정 방법에 의존하기 때문에, ELISA kit의 민감도 및 특이도의 비교는 본 연구에서 기 개발한 PCR 방법을 표준으로 비교하여 보았을 때 민감도 96.0%, 특이도 100%을 보였다(Table 19). 분석을 위한 유충 및 성충 시료는 마리 당 각 1 ml의 PBS-T를 가하고 균질화 시킨 후, 약 10분간 정치한 상층을 취하여 ELISA 분석하였다. 상층액은 전형적으로 x100배 희석하여 분석하였다.

Table 19. PCR법과 ELISA검사 결과의 비교

ELISA kit	PCR (Ref. method)		소계
	양성	음성	
양성	48	0	48
음성	2	54	56
소계	50	54	

가. Sensitivity: $48/(50)*100= 96.0\%$

나. Specificity: $54/(54+0)*100= 100\%$

제 3 절 꿀벌 세균성질병 진단용 Rapid kit의 개발

제 3차년도에는 미국 부저병의 원인균인 *P. larvae*와 유럽부저병의 원인균인 *Melisococcus pluton*에 대한 Rapid kit으로서 immuno-chromatographic assay 방법을 개발하였다. 두 가지의 원인균은 꿀벌 체내에서 아포의 상태로 존재하므로, 면역학적인 검출법의 표적은 상기 세균들의 아포상태에서 검출이 되도록 개발하였다. 이에 따라 배양된 세균으로 하여금 아포가 형성되도록 처리하고, 형성된 아포를 회수하여 면역원으로 사용하였다. BALB/c 마우스에 면역시켜 얻어낸 단클론항체는 부저병의 원인균인 *P. larvae*와 유럽부저병의 원인균인 *Melisococcus pluton*을 특이적으로 검출하였으며, 이들 단클론항체의 pair의 조합은 ELISA kit 뿐 아니라 immuno-chromatographic assay kit에도 적용되었다.

본 과제에서 새로이 개발된 Rapid kit은 미국부저 및 유럽부저병을 진단하는 여타의 재래식 기존 방법, 즉, 임상증상에 의거한 형태학적인 관찰에 비하여 확정적인 결과를 제시할 수 있을 뿐 아니라 특이도와 민감도가 높은 현장적용 실시간 검출방법으로서 일선 양봉현장에서 편리하게 응용될 것으로 기대된다.

Rapid kit 개발을 위한 공통적인 연구내용의 간략한 사항은 아래와 같다.

가. Colloidal gold 제작

20nm Gold Colloidal의 제조를 위하여, 철저히 세척 건조된 초자 비이커에 3차 증류수 95ml를 가하고 hot plate에서 100℃로 가열하며 교반하였다. 가열되는 동안 1% tri-sodium citrate 4ml를 준비해두었다. 끓기 시작하면 1% gold chloride (tetrachloroauric (III) acid trihydrate, Sigma G-4022, USA) 1 ml을 넣고 교반해주며, 준비해둔 Sodium

Citrate 액 4ml을 단숨에 가하였다. 반응액의 색상변화를 관찰하여 포도주 빛과 같은 암적 색을 보이면 100℃로 15분간 추가적으로 끓이며 교반하였다. 추가적인 seeding을 통하여 입자 size를 확대하여 40nm 규격의 colloidal gold를 제조하기 위하여, 기 제조된 20nm colloidal gold 25ml에 물 153ml을 가하고, 끓는 상태에서 1% tri-sodium citrate 2ml을 추가하였다. 이후, 1% Gold Chloride 2ml를 물 18ml와 섞어 희석한 액을 1ml/min의 속도로 점적하며 점차적인 입자성장을 유도하였다. 이후, 약 20분간 추가적으로 끓여낸 후 실온에 정치하여 gold-ab conjugates 의 접합에 사용하였다.

구경 20 nm 및 40 nm 로 제조된 Colloidal gold를 spectrophotometer로 파장별 흡광도를 측정된 결과 Fig. 39, 40에서와 같이 20nm 입자의 경우는 523 nm의 파장에서 최대 흡광을 보였으며, 40 nm 입자의 경우는 536 nm의 파장에서 최대 흡광을 보였다.

전자현미경으로 검경하였을 때 Fig. 41.에서와 같이 각각 40 nm 및 20 nm 구경의 입자가 확인되었다. 제조된 colloidal gold 부유액은 현장적용 측정방법으로서 Immuno-chromatographic assay kit의 Gold-Ab 접합체로 사용이 적합한 것으로 판단하였다.

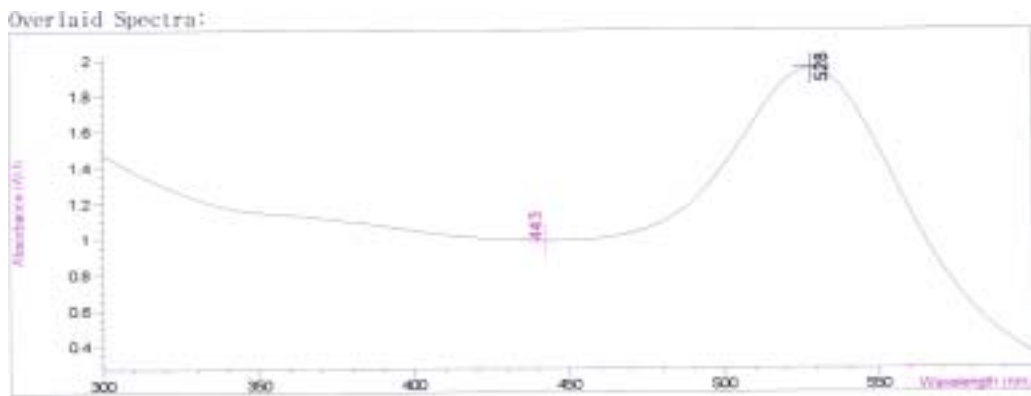


Fig. 39. Absorbance spectrum of 20 nm colloidal gold.

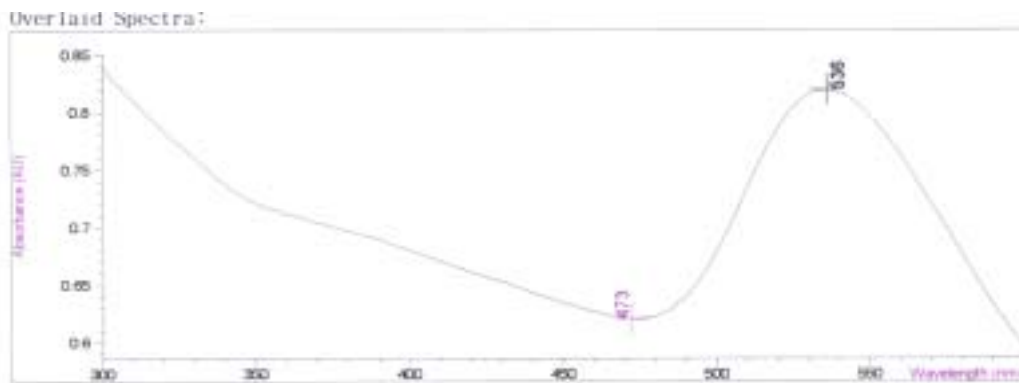


Fig. 40. Absorbance spectrum of 40nm colloidal gold.

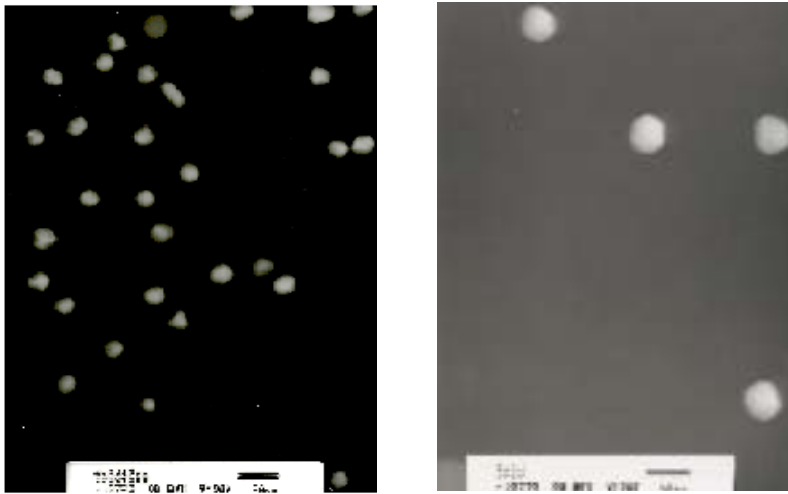


Fig. 41. Transmission Electron Micrograph of 40 nm & 20 nm Gold Colloid.

나. Monoclonal Ab-Gold 접합체 제작

Gold 접합체를 만들기 위한 시작 조건은 전형적으로 plain gold의 OD514 값이 1.0이 되게 하고 단백질농도는 0.1 mg/ml이 되게 하였다. Plain gold의 산도는 0.1% NaOH로 맞추다가 미세한 조정 시에는 0.01% NaOH를 사용하였다. 접합체 제조를 위하여 pH 7.5로 조정 한 plain gold 10ml에 antibody를 점적한 후 30분간 정치하였다. NaOH로 pH를 9까지 올린 후 BSA (10 ul of 10%/ml gold)를 가하였다. 10분간 정치 후 이를 원심분리(10,000×g, 30min, 4℃)시켜 맑은 상층액을 걷어내고 Gold 접합체 희석액에 재 부유하였다. Gold 전용 희석액으로 적당히(1% T-20, 1% BSA, 2~3% Score in 100mM PB) 희석하여 사용하였다.



Fig. 42. Optimization of ratio between Immunoglobulin and Plaingold.

다. Membrane 선정

Nitrocellulose transfer membrane (Whatman, SP 003,USA)을 3 mm 폭으로 절단하여 사용하였다. Antibody pair 선정을 위한 조건 설정은, 정제된 항체(S16)를 1 mg/ml을 1.0 ul 씩 넣고 dotting하여 실온에서 건조한 후 Immuno-chromatography를 실시하였다.

제 1 항 *M. pluton* spore 검출용 Rapid kit의 개발

가. Rapid test의 검출한계 조사

봉체내의 *M. pluton* spore의 검출 민감도를 조사하기 위해 spore 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 /ml 가 되게 희석하여 immuno-chromatographic assay 를 실시하였을 때, 1×10^5 cell/100 ul의 검출감도를 보였으며 이는 100 ul의 시료량으로 고려할 때 1×10^3 까지 검출이 가능한 성적이며, 일반적으로 ELISA assay 법에 비하여 약 1/10 배 정도의 검출감도를 보였다.

Table 20. Rapid test의 검출한계 조사

	Spore/ml						
	1×10^2	1×10^3	1×10^4	1×10^5	1×10^6	1×10^7	1×10^8
Grade	++	++	+-	-	-	-	-

나. Rapid kit의 민감도 및 특이도

EFB의 진단에는 아직까지 표준화된 진단법이 제시되어있지 않고, 임상진단 및 드물게 균 분리동정 방법에 의존하기 때문에, ELISA kit의 민감도 및 특이도의 비교는 본 연구에서 기 개발한 PCR 방법을 표준으로 비교하여 보았을 때 민감도 87.0%, 특이도 100%를 보였다.

분석을 위한 유충 및 성충 시료는 마리 당 각 1 ml의 PBS-T를 가하고 균질화 시킨 후, 약 10분간 정치한 상층을 취하여 ELISA 분석하였다. 상층액은 전형적으로 x100배 희석하여 분석하였다.

Table 21. PCR법과 ELISA검사 결과의 비교

Rapid kit	PCR (Ref. method)		소계
	양성	음성	
양성	20	0	20
음성	3	88	91
소계	23	88	

가. Sensitivity: $20/(23)*100= 87.0\%$

나. Specificity: $88/(88)*100= 100\%$

다. Rapid kit의 안정성

Rapid kit은 현장적용의 특성상 실온에 보관하게 되어있다. 그러므로 실온에서도 일정기간 성능을 유지할 수 있는가의 여부가 중요한 사항이다. 본 연구 기간 중 이러한 사항을 추정하기 위하여 약 45℃의 항온기에 1주간 보관하며 검출 한계를 조사하였으며, 검사기간 중 검출감도의 저하는 관찰되지 않았으므로, 경시적인 안정성이 우수한 것으로 판단되었다.

제 2 항 *P. larvae* spore 검출용 Rapid kit의 개발

가. Rapid test의 검출한계 조사

봉체내의 *P. larvae* spore의 검출 민감도를 조사하기 위해 spore 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 /ml 가 되게 희석하여 immuno-chromatographic assay를 실시하였을 때, 1×10^5 cell/100 ul의 검출감도를 보였으며 이는 100 ul의 시료량으로 고려할 때 1×10^3 까지 검출이 가능한 성적이며, 유럽부저의 경우와 마찬가지로, 일반적으로 ELISA assay 법에 비하여 약 1/10 배 정도의 검출감도를 보였다.

Table 22. Rapid test의 검출한계 조사

	Spore/ml						
	1×10^2	1×10^3	1×10^4	1×10^5	1×10^6	1×10^7	1×10^8
Grade	++	++	+-	-	-	-	-

나. Rapid kit의 민감도 및 특이도

미국부저의 진단에는 아직까지 표준화된 진단법이 제시되어있지 않고, 임상진단 및 드물게 균 분리동정 방법에 의존하기 때문에, ELISA kit의 민감도 및 특이도의 비교는 본 연구에서 기 개발한 PCR 방법을 표준으로 비교하여 보았을 때 민감도 92.0%, 특이도 100%를 보였다.

분석을 위한 유충 및 성충 시료는 마리 당 각 1 ml의 PBS-T를 가하고 균질화 시킨 후, 약 10분간 정치한 상층을 취하여 ELISA 분석하였다. 상층액은 전형적으로 x100배 희석하여 분석하였다.

Table 23. PCR법과 ELISA검사 결과의 비교

Rapid kit	PCR (Ref. method)		소계
	양성	음성	
양성	46	0	48
음성	4	54	56
소계	50	54	

가. Sensitivity: $46/(50)*100= 92.0\%$

나. Specificity: $54/(54+0)*100= 100\%$

다. Rapid kit의 안정성

Rapid kit은 현장적용의 특성상 실온에 보관하게 되어있다. 그러므로 실온에서도 일정기간 성능을 유지할 수 있는가의 여부가 중요한 사항이다. 본 연구 기간 중 이러한 사항을 추정하기 위하여 약 45℃의 항온기에 1 주간 보관하며 검출 한계를 조사하였으며, 검사기간 중 검출감도의 저하는 관찰되지 않았으므로, 경시적인 안정성이 우수한 것으로 판단되었다.

제 3 절 다른 꿀벌 질병에 관한 연구

제 1 항 꿀벌 진균성 질병의 PCR 진단법의 개발 (이 등, 2004)

가. 공시 균주

공시균주로 백목병의 원인균인 *Ascosphaera apis*를 미국표준균주보관소(ATCC; American Type Culture Collection)에서 분양 받아 사용하였으며, 국내 균주는 양봉장에서 채집한 시료를 본 연구실에서 배양하여 사용하였다. 경상북도 상주에서 채집한 실험 균주는 각 black형(SJB21, double strain)과 white형(SJW21, sigle strain)으로 나누어 단독 또는 혼합(double strain)하여 배양하여 사용하였다. 또한, 농촌진흥청 농업과학기술원 잠사곤충부에서 분양받은 *Ascosphaera apis* double strain, A0007 및 기타 균주를 실험에 사용하였다.

석고병 원인균인 *Aspergillus flavus*는 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC, Korean Collection for Type Cultures)에서 분양 받아 사용하였다(KTCT 6905). 또한 본 연구실에서 보관 중인 미동정 진균류를 다수 배양하여 대조 실험에 사용하였다.

나. 균주의 배양 및 chromosomal DNA의 분리

배양은 PDB(Potato Dextrose Broth, Difco), 또는 SAD+Y media에 균사를 접종하여 액체 배양하거나, 1.5% agar powder를 첨가한 고체평판배지를 사용하여 상온의 암처에서 2-4주간격으로 계대 배양하며 사용하였다.

실험실에서 배양된 균사체 및 포자는 다음과 같이 chromosomal DNA를 순수분리하였다. 즉, 액체 질소를 사용하여 시료를 신속 동결시킨 후 12,000 g의 원심분리로 시료를 침전시키는 과정을 3회 반복하여 세포를 완전히 파괴하고, 증류수를 소량 첨가하여 추출된 세포액과 함께 수거하였다. 수거된 세포 추출액은 Phenol/chloroform/isoamyl alcohol로 단백질을 제거하고, Ethanol 침전으로 DNA를 분리하였다. 단, 바로 PCR-detection이 요구되는 실험에서는 세포파괴 후 원심분리를 거쳐 상등액을 바로 PCR의 주형으로 사용하였다.

3. 진균의 18S rRNA gene의 검출을 위한 primer의 설계

진균의 18S rRNA gene을 detection하기 위한 primer는 미국 국립 의학도서관에서 제공하는 GenBank database에서 얻은 염기서열을 바탕으로 하였으며 Primer3 program (www.cgi, v 0.1 beta 1a; 양 등, 2001; 2002)을 이용하여 선별하였다. Fungi universal primer는 Fungi Kingdom의 6개 phylum으로부터 무작위로 고른 50여개의 fungi 18S rRNA gene의 alignment결과를 바탕으로 선별하였으며(자료 미제시), 백목병 원인균인 *Ascosphaera apis* 18S rRNA gene과 석고병 원인균인 *Aspergillus flavus*의 18S rRNA gene의 특이 서열 검출을 위한 primer쌍은 특이성 검색을 거친 후에 제작하였다. 순수분리된 Chromosomal DNA는 본 연구에서 설계된 백목병, 석고병 specific-detection primer를 사용하여 균주를 확인하였으며, PCR detection을 통해 증폭된 특이 서열은 T-vector cloning을 거쳐 염기서열분석을 통해 유전자를 확인하였다. 또한, Fungi Universal primer를 사용하여 확인된 균주 또는 미확인 진균류의 fungi 18S rRNA gene을 증폭시켰으며, 동정된 균주에 대하여는 specific-detection primer를 사용한 2차 PCR을 수행하였다(Figure 43; Table 24).

본 연구의 모든 specific PCR은 Gene Amp PCR System 9600(Perkin Elmer, USA)을 사용하였고, Gradient PCR은 MJ Research(USA)의 기기를 사용하였다. 각 실험의 결과에 따라 specific detection을 위한 PCR 표준조건을 확립하였다.

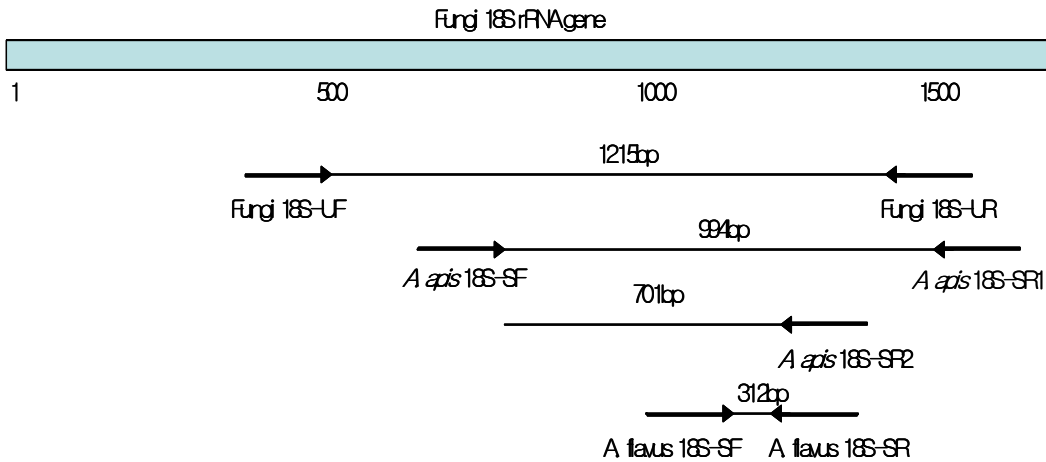


Figure 43. The location of detection primers in fungal 18S rRNA gene.

Table 24. Detection primers based on fungal 18S rRNA genes.

Name	Sequence	Product size
Fungi 18S-UF	CGC GCA AAT TAC CCA AT	GenBank M83264
Fungi 18S-UR	GGC GGT GTG TAC AAA GG	(380-1594) 1210bp
<i>A. apis</i> 18S-SF	GGC TGT AGG GGG GAA CCA GGA	GenBank M83264
<i>A. apis</i> 18S-SR1	CGG GTG GTC GTT TCC AGC CTC	(671-1666) 994bp
<i>A. apis</i> 18S-SR2	CCT CAA ACT TCC ATC GGC TTA AGA A	(671-1371) 701bp
<i>A. flavus</i> 18S-SF	ATC GGG CGG TGT TTC TAT G	GeneBank D63696
<i>A. flavus</i> 18S-SR	ACC GGG CTA TTT AAG GGC CG	(1004-1315bp) 312bp

라. Fungal 18S rRNA genes의 PCR detection

1) Temperature gradient PCR

꽃별 진균성 질병의 원인균인 *Ascosphaera apis* 및 *Aspergillus flavus*는 실험실에서 배양한 후 chromosomal DNA를 순수분리하고 이를 PCR 실험의 template로 사용하였다. 각 primer에 대한 최적 PCR annealing 온도를 측정하기 위하여 온도구배 PCR을 수행하였으며, 사용된 기기는 Gradient PCR, PTC-200 (MJ Research, USA)이다. PCR의 조성은 template 100 ng, 각 50 pmol primers, 2.5 mM dNTPs, 1×PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂,

2.5U *Taq* polymerase를 사용하였으며 각 반응액의 총 volume은 50 μ l로 하였다. PCR의 수행은 94 $^{\circ}$ C, 3min의 pre-denaturation에 이어 94 $^{\circ}$ C, 30sec; 45-60 $^{\circ}$ C gradient, 30sec; 72 $^{\circ}$ C, 30sec을 30 cycles로 하였으며, 최종신장을 위하여 72 $^{\circ}$ C, 5min post-polymerization으로 하였다. PCR의 결과는 1xTAE, 1% Agarose 전기영동으로 판정하였다.

온도 gradient PCR결과에서 *A. apis*, *A. flavus* 18S detection primers는 온도의 변화에 매우 안정적이며 PCR product가 단일 band로 깨끗한 것으로 보아 specific함을 보여주었다. 최적의 annealing 온도는 *A. apis*의 PCR에서는 60 $^{\circ}$ C로, *A. flavus*에서는 57 $^{\circ}$ C로 나타났다(Figure 44). 이후의 PCR에서는 모두 이 annealing temperature를 사용하였다.

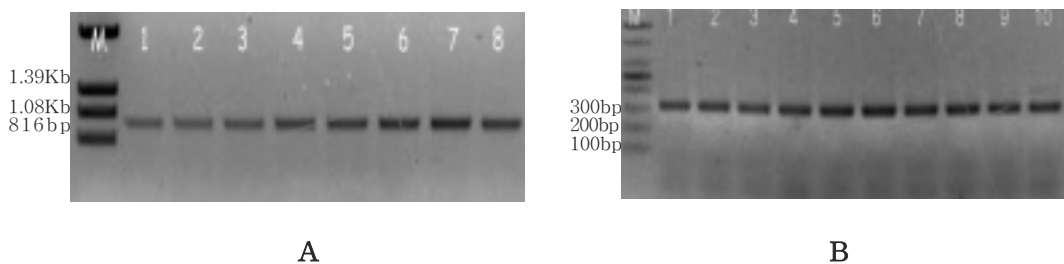


Figure 44. Temperature gradient PCR of *Ascospheera apis*, *Aspergillus flavus*

PCR was performed under condition of 94 $^{\circ}$ C, 3 min pre-denaturation/ 94 $^{\circ}$ C, 30s; 45-60 $^{\circ}$ C temperature gradient, 30s; 72 $^{\circ}$ C, 30s; 30 cycles/ 72 $^{\circ}$ C, 5min post-polymerization.

Panel A: Gradient PCR of *Ascospheera apis* by using primer-pairs, *A. apis* 18S-SF and *A. apis* 18S- SR1. The size of PCR product was 994bp. Lane 1. annealing temperature on 45.0 $^{\circ}$ C; lane 2. 46.3 $^{\circ}$ C; lane 3. 49.2 $^{\circ}$ C; lane 4. 51.4 $^{\circ}$ C; lane 5. 53.9 $^{\circ}$ C; lane 6. 56.0 $^{\circ}$ C; lane 7. 58.8 $^{\circ}$ C; lane 8. 60.0 $^{\circ}$ C. **PanelB:** Gradient PCR of *Aspergillus flavus* by using primer- pairs, *A. flavus* 18S-SF, *A. flavus* 18S- SR. The size of PCR product was 312bp. Lane M is DNA size marker. Lane 1. annealing temperature on 50.0 $^{\circ}$ C; lane 2. 51.3 $^{\circ}$ C; lane 3. 52.5 $^{\circ}$ C; lane 4. 54.2 $^{\circ}$ C; lane 5. 56.4 $^{\circ}$ C; lane 6. 58.9 $^{\circ}$ C; lane 7. 61.0 $^{\circ}$ C; lane 8. 62.7 $^{\circ}$ C; lane 9. 63.9 $^{\circ}$ C; lane 10. 65.0 $^{\circ}$ C.

2) PCR detection의 초기 template의 양의 한계 측정

초기 주형으로서 chromosomal DNA를 각기 100 ng - 1 fg으로 다르게 사용하였으며 각 primer쌍을 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR반응은 본 실험의 표준 조건으로 수행하였으며, 표준조건의 PCR이란 각 50 pmol primers, 2.5 mM dNTPs, 1xPCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 2.5U *Taq* polymerase (GeneClone Co., Korea)를 사용하여 total 50 μ l로 PCR 반응액을 조성하고, PCR의 수행은 94 $^{\circ}$ C, 3min의 pre-denaturation에 이어 94 $^{\circ}$ C, 30sec; 각 primer쌍에 따른 최적온도, 30sec; 72 $^{\circ}$ C, 30sec을 30 cycles로 하였으며, 최종신장을 위하여 72 $^{\circ}$ C, 5min post-polymerization을 수행하는 것이다. 표준조건의 모든 specific PCR은 Gene Amp PCR System 9600(Perkin Elmer, USA)에서 얻어진 것이며 각 primer쌍에 따른 최적온도는 본 연구의 결과에 따라 *A. apis*에서는 60 $^{\circ}$ C, *A. flavus*에서는 57 $^{\circ}$ C의

annealing temperature를 사용하였다. 단, 본 실험의 한계 측정 PCR에서는 30 cycles 또는 40 cycles로 하였다

A. apis 및 *A. flavus*의 DNA 양에 따른 PCR검출 한계를 알아보기 위해 순수분리된 chromosomal DNA를 100 ng 이하로 희석하여 template로 사용하였으며 primer는 각각의 specific primer인 *A. apis* 18S-SF/ *A. apis* 18S-SR1 및 *A. apis* 18S-SR2와 *A. flavus* 18S-SF/ *A. flavus* 18S-SR primer쌍을 사용하였다. PCR의 조건 및 수행은 본 연구의 표준조건으로 하였다. 단, annealing 온도는 *A. apis*는 60°C, *A. flavus*는 57°C에서 수행하였다. 검출한계 실험의 결과는 *A. apis*의 18S gene증폭을 위해 *A. apis* 18S-SF/ *A. apis* 18S-SR1 primer pair를 사용하였을 때 detection limit은 1 ng까지이었으며(Figure 45A), *A. apis* 18S-SF/ *A. apis* 18S-SR2 primer pair를 사용하였을 때에는 100 pg까지 detection 됨을 확인하였다(Figure 45B). 또한 *A. flavus*의 18S rRNA gene 증폭을 위해 사용한 *A. flavus* 18S-SF/ *A. flavus* 18S-SR primers-pair로는 10ng까지 detection 되었다(Figure 45C).

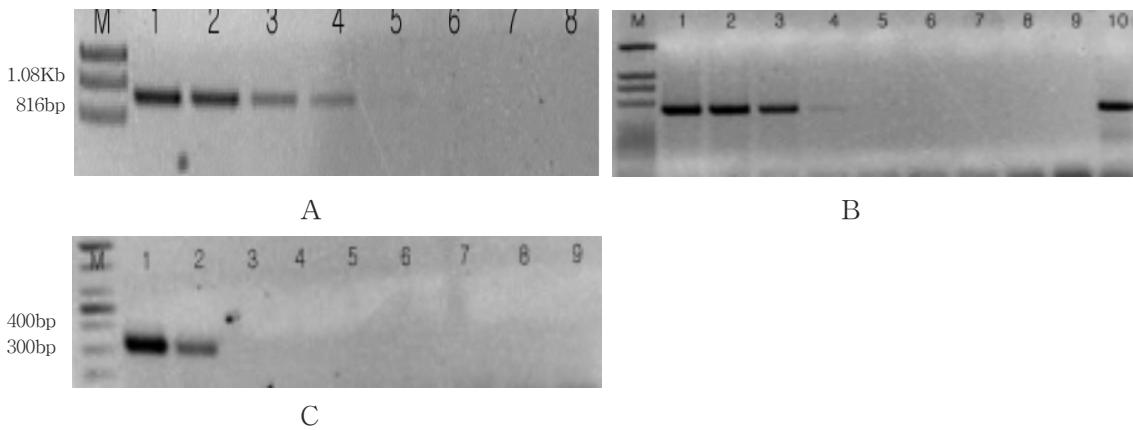


Figure 45. Detection limit of the quantity of initial template in the *A. apis*- or *A. flavus*-specific PCR using specific primer-pairs. Each PCR was performed under standard condition with different quantities of initial template DNA. **Panel A:** PCR detection of *Ascosphaera apis* by using specific primer-pairs *A. apis* 18S-SF/ *A. apis* 18S-SR1. PCR product size was 994bp. Lane M is DNA size marker; lane 1. template DNA of 100 ng; lane 2. 50 ng; lane 3. 10 ng; lane 4. 5 ng; lane 5. 1 ng; lane 6. 100 pg; lane 7. 10 pg; lane 8. 1 pg. **Panel B:** PCR detection of *Ascosphaera apis* by using specific primer-pairs *A. apis* 18S-SF/ *A. apis* 18S-SR2. PCR product size was 701bp. Lane M is DNA size marker; lane 1. template DNA of 100 ng; lane 2. 10 ng; lane 3. 1 ng; lane 4. 100 pg; lane 5. 10 pg; lane 6. 1 pg; lane 7. 100 fg; lane 8. 10 fg; lane 9. 1 fg; lane 9. positive control. **Panel C:** PCR detection of *Aspergillus flavus* by using *A. flavus* 18S-SF/ *A. flavus* 18S-SR. PCR product size was 1215bp. lane 1. template DNA of 100 ng; lane 2. 10 ng; lane 3. 1 ng; lane 4. 100 pg; lane 5. 10 pg;

lane 6. 1 pg; lane 7. 100 fg; lane 8. 10 fg; lane 9. 1 fg.

3) 혼합된 DNA를 주형으로 한 특이 검출 PCR

오염된 봉군 시료로부터 적합한 PCR detection 조건을 확립하기 위해 혼합 DNA를 사용한 PCR을 수행하였다. 소비에서 얻어낸 6종의 미동정 진균류를 실험실에서 배양 후, 각기 chromosomal DNA를 순수분리하고 동일한 농도로 혼합하여, 혼합된 DNA를 만든 후, 이들 100 ng과 *A. apis* chromosomal DNA 100 ng, 50 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg을 각기 첨가하여 함께 혼합 사용하였다. PCR 조성 및 수행은 표준조건으로 수행하였으며, *A. apis* 18S-SF/ *A. apis* 18S-SR1 primer pair를 사용하여 annealing 온도 60°C에서 수행하였다.

Template DNA가 오염된 상태에서 PCR detection 한계를 알아보기 위해 꿀벌의 세균성 질병인 미국부저병의 원인균 *P. larvae* ATCC 9545, ATCC 25747, ATCC 25748과 유럽부저병 원인균 *Melissococcus pluton* 그 밖의 *Bacillus pulvifaciens*, *Bacillus subtilis*의 chromosomal DNA를 각기 같은 비율로 혼합하여 인공오염 DNA 시료를 조성하였으며, 이 DNA 100ng에 *A. apis* chromosomal DNA 100 ng, 50 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg과 각기 혼합하여 초기 주형으로 PCR을 수행하였다. Specific PCR은 50 pmol primer pair(*A. apis* 18S-SF/ *A. apis* 18S-SR1), 2.5mM dNTP, 1.5mM MgCl₂로 하여 최종 50 µl가 되도록 조성하고 60°C annealing온도의 표준조건으로 시행하였다. 결과로써 인공오염 DNA 시료에서 50 ng의 *A. apis* chromosomal DNA까지 specific detection이 가능함을 보여주었다(Figure 46). 이 오염된 DNA환경에서 PCR은 단일 DNA환경의 조건(Figure 45.)과 큰 차이를 보이지는 않은 것으로 판단되어 양봉 현장시료에 대한 정확한 PCR이 가능함을 시사하였다.

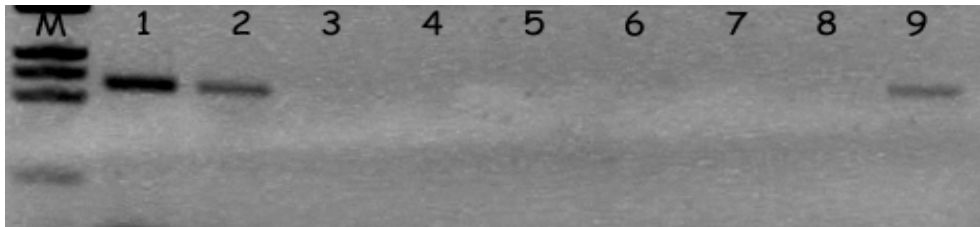


Figure 46. Detection limit of *Ascospaera apis* using specific PCR with artificially contaminated DNA. Artificially contaminated DNA was composed of chromosomal DNAs from *P. larvae* ATCC 9545, ATCC 25747, ATCC 25748, *Melissococcus pluton*, *Bacillus pulvifaciens*, *Bacillus subtilis* with same ratio. In each PCR 100ng contaminated DNA was added into PCR mixture. PCR was performed under standard condition with chromosomal DNA from *A. apis*. PCR detection of *Ascospaera apis* by using specific primers(18S-SF/ *A. apis* 18S-SR1). Product size was 994bp. Lane M is DNA size marker; lane 1. 100 ng template DNA from *A. apis* ; lane 2. 50 ng; lane 3.

10 ng; lane 4. 5 ng; lane 5. 1 ng; lane 6. 100 pg; lane 7. 10 fg; lane 8. 1 fg; lane 9 Lane 9 is *A. apis* control DNA 50 ng.

3. Fungi Universal PCR primer쌍을 사용한 Temperature gradient PCR

Fungi universal primer의 PCR 중 최적 annealing 온도를 측정하기 위하여 온도구배 PCR 을 수행하였다. 최적온도는 45-65°C의 범위에서 조사되었으며 기타 PCR의 조성파 수행은 표준조건에 준하였다. PCR반응의 template로는 소비에서 얻어낸 unknown fungi 6종, 기타 fungi 3종(*R. solani*, *C. gloeosporioides*, *P. oryzae*)을 사용하였으며 반응조건은 fungi 18S-UF/ fungi 18S-UR primer를 각 50 pmol 씩, 2.5mM dNTPs, 1×PCR buffer, 1.5mM MgCl₂, 2.5U *Taq* polymerase를 첨가하여 total 50 μl로 조성하였다. 온도구배 PCR결과에 서 fungi 18S universal primer는 annealing 온도의 변화에 안정적이며, 45-60°C에서 예상 된 product를 생산케 하였으나, 52°C이하의 온도에서는 non-specific한 product도 생성되고 있기 때문에 최적의 annealing 온도는 57°C로 결정하였다(Figure 47).

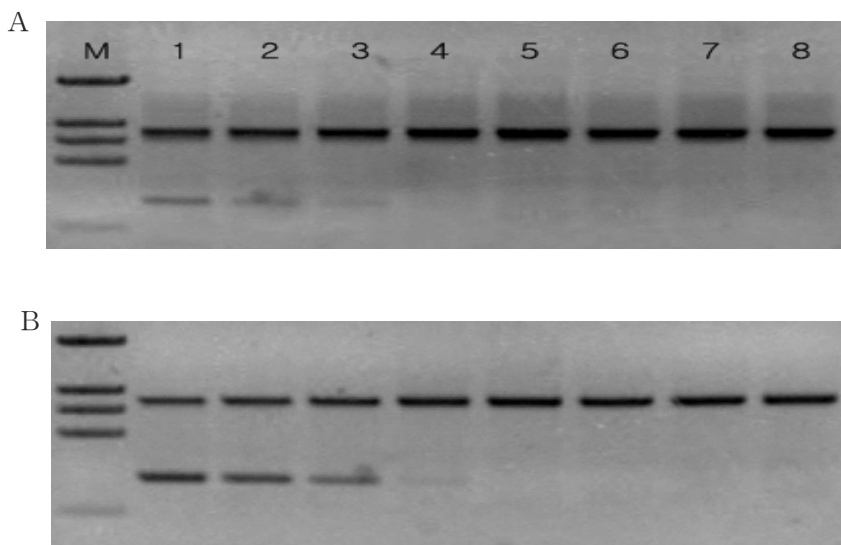


Figure 47. Temperature gradient PCR amplification by using the fungi universal primer pairs. PCR was performed under standard condition with universal primers fungi 18S-UF, fungi 18S-UR, except 45-60°C annealing temperature gradient. Lane M is DNA size marker; Lane 1, annealing temperature on 45.0°C; lane 2, 46.3°C; lane 3, 49.2°C lane 4, 51.4°C lane 5, 53.9°C lane 6, 56.0°C lane 7, 58.8°C lane 8, 60.0°C. The expected PCR product was 1215bp. **Panel A:** 100 ng chromosomal DNA from *Ascosphaera apis* was used. **Panel B:** 100 ng chromosomal DNA from *Aspergillus flavus*.

라. Fungi Universal PCR primer쌍을 사용한 초기주형에 대한 검출한계

Fungi chromosomal DNA의 양에 따른 PCR검출 한계를 조사하기 위하여 소비에서 추출한 unknown fungi 6종과 fungus *P. oryzae*를 각각 실험실 배양한 후 chromosomal DNA를 순수분리하고 이들을 동량 혼합한 후 universal primer를 사용하는 PCR의 주형으로 사용하였다. 즉 혼합 DNA 또는 단독 균주의 DNA를 100 ng, 50 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg씩 각 PCR에 사용하여 검출한계를 측정하였다. PCR은 표준조건에서 수행하였으며, fungi universal primer인 fungi 18S-UF/ fungi 18S-UR primer를 각 50 pmol 씩 사용하고 57°C의 annealing온도에서 수행하였다. PCR 결과 혼합 DNA 주형과 단독 DNA주형들 모두에서 예상된 PCR 산물인 1215 bp의 DNA가 증폭되었으며, 검출한계는 1 ng 수준이었다(Figure 48). 이로써 Fungi universal primer의 미지의 진균류의 18S rDNA를 증폭시킬 수 있음이 확인되었으며, 본 실험의 목적 외에 미지의 진균류의 빠른 동정에 사용될 수 있을 것으로 기대되었다.

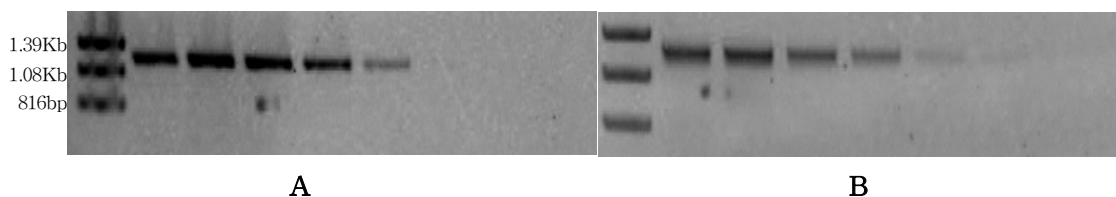


Figure 48. Detection limit of the quantity of initial template using fungi universal primer-pairs. PCR was performed under standard condition with universal primers, fungi 18S-UF and fungi 18S-UR, except 57.0°C annealing temperature. Lane M is DNA size marker; lane 1. template DNA of 100 ng; lane 2. 50 ng; lane 3. 10 ng; lane 4. 5 ng; lane 5. 1 ng; lane 6. 100 pg; lane 7. 10 pg; lane 8. 1 pg. The expected PCR product was 1215bp. **Panel A:** 100 ng chromosomal DNA from 6 fungi strains with same ratio. **Panel B:** 100 ng chromosomal DNA from *P. oryzae*.

마. Fungi Universal PCR primer 쌍과 specific primer 쌍을 사용한 2단계 PCR

Fungi universal primer를 이용한 fungi 18S gene의 증폭산물을 이용하여 specific detection의 민감도를 제고시키고자 하였다. 이 의도로 fungi universal primer를 사용하여 18S gene을 증폭시키는 1차 PCR을 수행한 후, 그 내부에 포함된 specific primer를 사용하여 2차 PCR을 수행하는 방법을 사용하였다. 1차 PCR은 chromosomal DNA를 template로 각 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg을 사용하였으며, PCR의 조성 및 수행은 표준조건에 준하였으며, annealing 온도를 57°C으로 40cycle을 시행하였다. 2차 PCR에서는 1차의 PCR product를 template로 5 µl씩 사용하였으며 PCR조성과 온도조건은 1차와 동일하게 수행하였다.

결과로써, *A. apis*의 chromosomal DNA를 주형으로 하여, 1차 PCR은 fungi universal primer를 사용하고, 이 PCR 산물을 주형으로 하여 *A. apis* 18S-SF/ *A. apis* 18S-SR2 primer pair를 사용하여 2차 PCR을 수행하였을 때, 초기 *A. apis*의 chromosomal DNA농도가 10 pg일 때까지 PCR detection이 가능함을 보여주었으며, *A. flavus*의 chromosomal

DNA를 주형으로 하여, 18S-SF/ *A. flavus* 18S-SR primers를 사용하여 2차 PCR을 수행한 것은 초기 *A. flavus*의 chromosomal DNA농도가 100 pg일 때까지 PCR detection이 가능함을 보여주었다(Figure 49). 이 결과는 *A. apis* 또는 *A. flavus*의 단일 PCR에 의한 검출 한계의 결과(Figure 45)를 각기 10배씩 제고시킨 것으로, 2차 PCR의 유용성을 보여준 것이라 하겠다.

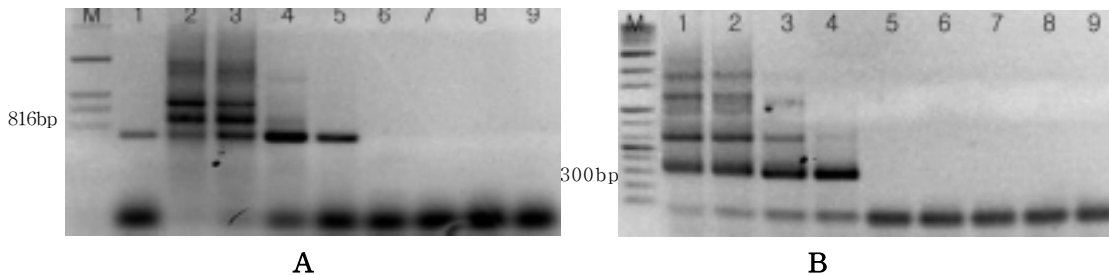


Figure 49. Detection limit of the quantity of initial template using secondary PCR with specific primer pairs. First PCR was performed under standard condition with different initial template using universal primers, fungi 18S-UF and fungi 18S-UR, except 57.0°C annealing temperature and 40 cycles. Lane M is DNA size marker; lane 1. template DNA of 100 ng; lane 2. 10 ng; lane 3. 1 ng; lane 4. 100 pg; lane 5. 10 pg; lane 6. 1 pg; lane 7. 100 fg; lane 8. 10 fg; lane 9. 1 fg. Secondary PCR were also performed under standard condition with each 5 μ l of first PCR product, except the specific primer pairs and 40 cycles. **Panel A:** Chromosomal DNA from *Ascospheara apis* and *A. apis* 18S-SF/ *A. apis* 18S-SR2 primer-pairs were used. **Panel B:** Chromosomal DNA from *Aspergillus flavus* and *A. flavus* 18S-SF/ *A. flavus* 18S-SR primers were used.

바. 증폭된 특이 서열의 검증.

본 연구를 위해 제작한 PCR detection primer를 사용하여 증폭시킨 유전자는 그 검증을 위해 T-vector cloning을 수행하였으며, T7, T3 primer를 사용하여 그 염기서열을 분석하였다.

*Ascospheara apis*의 18S rRNA는 *A. apis* 18S-SF/ *A. apis* 18S-SR1 primers로 증폭시킨 994bp의 특이 유전자를 클론화하여 염기서열을 확인하였으며, *Aspergillus flavus*의 18S rRNA는 *A. flavus* 18S-SF/ *A. flavus* 18S-SR primer pairs를 사용하여 증폭된 312bp의 gene을 클론화하여 그 염기서열을 확인하였다. 염기서열의 결과는 각기 GenBank에 보고된 해당 염기서열 (M83264, D63696)과 100% 일치하는 것으로 확인되었다(자료 미제시).

사. 결론

본 연구에서는 꿀벌의 진균성 질병인 백묵병과 석고병의 원인균이 되는 *Ascosphaera apis*와 *Aspergillus flavus*의 신속한 동정을 위해 이들의 18S rRNA gene을 이용한 PCR detection 방법을 확립하고자 하였다.

*A. apis*의 PCR detection을 위해 제작된 primer 쌍은 *A. apis* 18S-SF/ *A. apis* 18S-SR1라 명명하였으며 994bp의 PCR product를 생성하는 것으로 설계되었다. 본 연구에서 확립된 PCR 표준조건은 94°C, 3 min pre-denaturation/ 94°C, 30s; 60°C, 30s; 72°C, 30s; 30 cycles/ 72°C, 5min post-polymerization이며, 이 조건의 PCR에서 순수분리된 *A. apis*의 chromosomal DNA는 최소 1 ng일 때까지 검출이 가능하였다. 또한, fungi universal PCR primer로 1차 PCR 반응 후, 그 산물을 template로 사용한 2차 PCR에서는 *A. apis* 18S-SR2 primer가 사용되었으며, 생성되는 701bp의 PCR산물은 순수분리된 *A. apis*의 chromosomal DNA가 최소 0.1 ng일 때까지 검출이 가능하였다.

*A. flavus*의 PCR detection을 위해 제작된 primer 쌍은 *A. flavus* 18S-SF/ *A. flavus* 18S-SR이며, 312bp의 PCR product를 생성하는 것으로 설계되었다. 표준 반응조건은 94°C, 3 min pre-denaturation/ 94°C, 30s; 57°C, 30s; 72°C, 30s; 30 cycles/ 72°C, 5 min post-polymerization이며, 이 조건의 PCR에서 순수분리된 *A. flavus*의 chromosomal DNA는 최소 1 ng일 때까지 검출이 가능하였다. 본 연구에서 *A. apis*, *A. flavus*의 PCR 검출법은 포자 상태로 잔류하여 남아있는 벌통내의 진균성 질병의 원인균들을 빠르고 정확하게 동정하는 것이 가능함을 보여 주었으며, 또한 적은 양으로 존재하여도 이를 fungi universal primer를 사용하여 증폭한 뒤, specific primer를 사용하는 방법으로 검출한계를 늘릴 수 있음을 보여주었다. 이는 진균성 질병의 발병을 사전에 막을 수 있는 효과적인 예방법으로 이용되어 향후 백묵병 및 석고병으로 인한 피해를 줄일 수 있는 방안을 강구하는 데 주요 기구로 사용될 것을 기대한다.

제 2 항 *Ascosphaera apis*의 성장저해를 위한 항진균제 Albofix의 영향 (이 등, 2003)

가. 공시 균주, 공시 봉군 및 Albofix의 사용

공시균주는 백묵병의 원인균인 *Ascosphaera apis*를 미국표준균주보관소 (ATCC; American Type Culture Collection)에서 분양 받아 사용하였으며, 국내 균주는 경상북도 상주에서 채집한 시료를 본 연구실에서 배양하여 사용하였다. 실험 균주는 각 black strain(SJB21)과 white strain(SJW21)을 나누어 또는 혼합하여 배양하였다. 야외실험에 사용된 봉군은 경기도 수원 인근의 3개 고정 양봉장(송죽동 소재, 이목동 소재, 의왕시 초평리 소재)의 각 3개 봉군(총 9개 봉군)을 실험군으로 각 3개 봉군 (총 9개 봉군)을 대조군으로 사용하였으며, 실험 기간은 2002년 9월 8일부터 6주간 수행하였다.

Albofix는 일반적으로 원액의 1/9양의 멸균 증류수와 혼합하여 사용하였으며, 사용된 단위는 모두 ml단위로 표시하였다. Albofix의 도포는 병통의 내부 5면 (덮개 부위 제외)을 사용하였고, 페인트용 붓으로 도포하였다. 병통의 5면은 5,737평방cm이었으며, 1병통당 약 180 ml의 희석 Albofix를 사용하였다.

나. Albofix 함유배지에 의한 *Ascospaera apis*의 성장저해

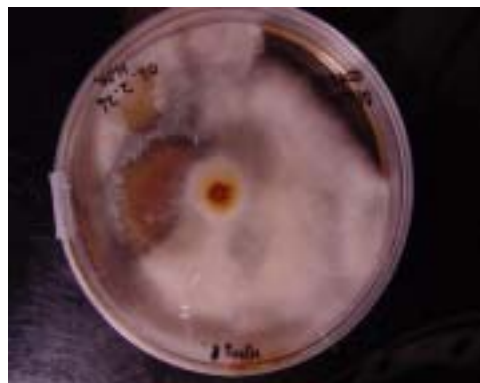
Albofix 0.1ml를 함유한 10 ml SDA+Y media를 Petri-dish에 넣고 여기에 *Ascospaera apis* 균사체 (black 및 white형)를 각각 또는 혼합하여 면봉으로 배지에 접종 한 후, 실온에서 배양하였다. 1일 간격으로 균주의 성장상태를 관찰하였으며, 성장 변화를 기록하였다. 대조군으로는 Albofix를 함유하지 아니한 SDA + Y배지에 같은 양의 균사체만을 접종하여 배양하고, 관찰 및 기록하였다.

Albofix 함유배지에서 백목병의 원인균인 *Ascospaera apis*는 상당한 성장저해를 나타내는 것으로 나타났다. SDA+Y배지에서 Albofix는 수용액 중으로 용해되기보다는 쉽게 프라스틱에 점착되었으며, 혼합비, 즉 0.1ml Albofix대 10 ml의 배지의 비는 적절한 용해도를 보이지 않은 이유로 성장저해 효과의 적정농도로 판정되지는 아니하였다.

2주의 배양 후, 실험군의 *A. apis*는 검은색의 포자가 일부 관찰되었으나 균사체를 제대로 형성하지 못하였으며, 일부에서는 괴사가 진행되고 있는 것으로 관찰되었다. 한편, 대조군에서는 포자로부터 발아한 균사가 plate전체에 걸쳐 골고루 잘 성장하고 있는 것이 관찰되었다(Fig. 50.).



< 실험군 >



< 대조군 >

Fig. 50. Albofix함유배지에서의 *Ascospaera apis*(SJB21)의 배양

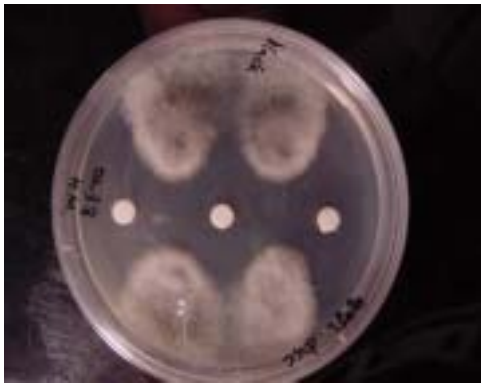
실험군은 Albofix 0.1ml를 함유한 10 ml SDA+Y media를 사용하였으며, *Ascospaera apis* 균사체 (black 및 white형; 각기 strain, SJW21) 혼합하여 멸균된 면봉으로 접종하여 실온에서 2주 배양하였다. 대조군은 Albofix를 함유하지 아니한 SDA+Y배지에 같은 양의 균사체만을 접종하여 배양하였다.

대조군과 비교하여 실험군의 성장저해는 분명하며, 특히 Strain SJB21이 보다 더 성장이 저해되고, 괴사가 발생됨이 관찰되었다. 또한, Albofix의 불균질한 혼합에 의하여 실험군의 하반부에는 Albofix의 덩어리가 관찰되었으며, 그 부위에는 전혀 균사체의 성장을 볼 수 없었다.

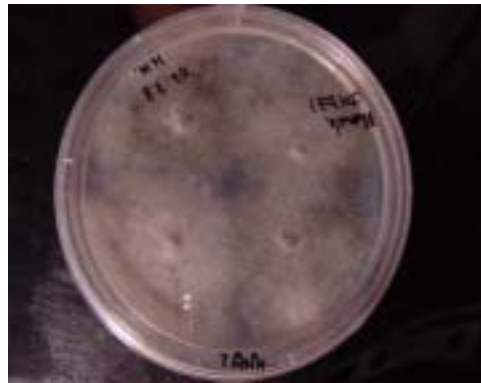
다. DISC 확산법에 의한 *Ascospaera apis*의 성장저해

336 Potato dextrose agar (PDA) plate에 성장된 판형의 균사체를 지름 0.6cm인 원형으로 잘라 핀셋으로 접종하고, 멸균된 filter-disc(지름 0.6cm)에 0.1 ml Albofix를 흡수시켜 plate위에 올려놓은 후 실온에서 배양하였다. 대조군은 Albofix가 없는 filter-disc를 사용하였고, 같은 크기의 균사체를 사용하여 동일한 방법으로 배양 관찰 하였다.

Albofix를 filter-disc에 흡수시켜 *A. apis*와 평판 배양함으로, Albofix의 성장저해효과를 판정한 결과, Albofix의 유효성분은 수용성 배지에 확산되며, 이 확산에 따라 강력한 성장저해효과를 보이는 것이 판명되었다. 실험군에서는 균사체의 성장이 Albofix함유 disc가 위치한 부위에서 가까울수록 강력한 성장저해효과가 일어남이 관찰되었으며, 그 반대편으로 미약한 성장이 진행되었음 보여주었다. 한편, 대조군에서는 접종된 균사체로부터 전방향으로 균사체가 뻗어 나아갔고 2주만에 plate전체에 걸쳐 잘 성장되었음을 보여주었다. 이러한 성장저해효과는 *Ascospaera apis*의 black 및 white형, 즉 strain SJB21, SJW21를 혼합배양한 것과, strain SJW21단독배양에서 동일하게 나타났다 (Fig. 51.; Fig. 52.)



< 실험군 >



< 대조군 >

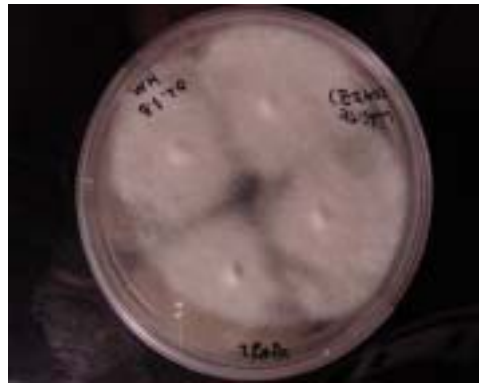
Fig. 51. Disc 확산법에 의한 *Ascospaera apis* strain SJB21의 성장억제

실험군은 각기 Albofix 0.1ml를 함유한 Disc (지름 0.6cm) 3개를 중앙에 배치하였으며, 배지는 336 Potato dextrose agar (PDA)를 사용하였다. 접종은 성장된 판형의 균사체를 지름 0.6cm의 원형으로 잘라 핀셋으로 plate 중 4곳에 위치하게 하였다. 접종된 균사체는 *Ascospaera apis*의 black형, 즉 strain SJB21을 균사체로 성장시킨 것을 사용하였다. 대조군과 비교하여 실험군의 성장저해는 분명하며, Albofix의 확산에 따라 이에 비례하는 성

장저해효과를 보이고 있다.



< 실험군 >



< 대조군 >

Fig 52. Disc 확산법에 의한 *Ascospaera apis* strain SJW21의 성장억제

실험군은 각기 Albofix 0.1ml를 함유한 Disc (지름 0.5cm) 3개를 중앙에 배치하였으며, 배지는 336 Potato dextrose agar (PDA)를 사용하였다. 접종은 성장된 판형의 균사체를 지름 0.6cm의 원형으로 잘라 핀셋으로 plate 중 4곳에 위치하게 하였다. 접종된 균사체는 *Ascospaera apis*의 white형, 즉 strain SJW21를 균사체로 성장시킨 것을 사용하였다. 대조군과 비교하여 실험군의 성장저해는 분명하며, Albofix의 확산에 따라 이에 비례하는 성장저해효과를 보이고 있다.

라. 간접 접촉에 의한 *Ascospaera apis*의 성장저해

336 Potato dextrose agar (PDA) plate에 성장된 판형의 균사체를 지름 0.6cm인 원형으로 잘라 핀셋으로 접종하고, Petri-dish 뚜껑 안쪽에 0.1 ml Albofix를 면봉에 묻혀 바른 후, 뚜껑을 덮고 실온에서 배양하였다. 대조군은 같은 크기의 균사체를 같은 위치에 접종하고 Albofix처리 없이 동일한 방법으로 배양하였다.

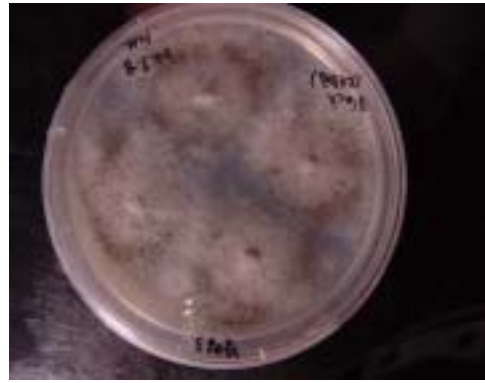
Albofix의 공기 중 확산에 의한 *A. apis*의 성장저해효과를 판정하기 위하여, Petri-dish 뚜껑 안쪽에 0.1 ml Albofix를 도포하여 실험하였다. 결과는 일정한 성장저해효과가 있음이 판명되었으며, 특히 SJB21의 성장저해가 두드러진 것으로 나타났다 (Fig. 53., Fig. 54.).

또한, Albofix의 공기 중 확산에 의한 *A. apis*의 성장저해효과는 수용배지 중 확산에 의한 효과에 비해 미약하나, 균사에 의한 왕성한 성장은 확실히 억제하는 것으로 판정되었으며, 이 결과는 백묵병의 예방치료제로써 Albofix의 안전한 용법, 즉 벌통의 벽면에 도포하는 방법이 가능함을 시사하였다.

Albofix의 공기 중 확산에 의한 *A. apis*의 성장억제효과는 우선 적절한 용량을 측정하기 위한 정량실험이 요구되며, 수용액 중 확산에 의한 *A. apis*의 성장억제효과와는 다른 mechanism에 의한 것이 아닌지 의심되고 있다. 이에 대한 또한 각 strain에 따른 차별적 성장억제효과에 대한 생화학적 연구가 필요한 것으로 사료된다.



< 실험군 >



< 대조군 >

Fig 53. Albofix의 공기 중 확산에 의한 *A. apis* strain SJB21의 생장억제

실험군은 Albofix 0.1ml를 Petri-dish 뚜껑내부에 도포하였으며, 배지는 336 Potato dextrose agar (PDA)를 사용하였다. 접종은 성장된 판형의 균사체를 지름 0.6cm의 원형으로 잘라 핀셋으로 plate 중 4곳에 위치하게 하였다. 접종된 균사체는 *A. apis*의 black형, 즉 strain SJB21을 배양하여 균사체로 성장시킨 것을 사용하였다.

대조군과 비교하여 실험군의 성장저해는 분명하며, 특히 Albofix가 존재한 상층부로의 균사의 성장은 확실하게 억제되었다. 또한 strain SJB21이 보다 더 생장억제가 됨이 관찰되었다. 대조군의 경우 균사가 plate의 전체에 걸쳐 활발히 자라고 있으며 뚜껑부분까지 균사가 확장된 모습을 보여주고 있다.

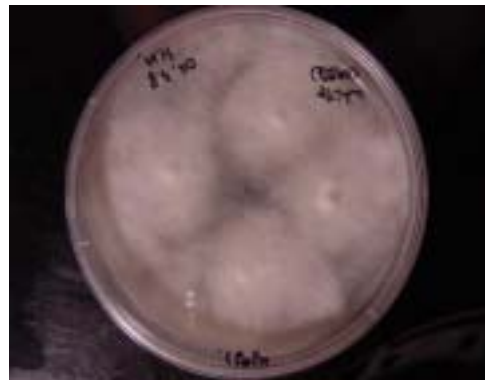


Fig 54. Albofix의 공기 중 확산에 의한 *A. apis* strain SJW21의 생장억제

실험군은 Albofix 0.1ml를 Petri-dish 뚜껑내부에 도포하였으며, 배지는 336 Potato dextrose agar (PDA)를 사용하였다. 접종은 성장된 판형의 균사체를 지름 0.6cm의 원형으로 잘라 핀셋으로 plate 중 4곳에 위치하게 하였다. 접종된 균사체는 *A. apis*의 white형, 즉 strain SJW21를 배양하여 균사체로 성장시킨 것을 사용하였다.

대조군과 비교하여 실험군의 성장저해는 분명하며, 특히 Albofix가 존재한 상층부로의 균

사의 성장은 확실하게 억제되었다. 대조군의 경우 군사가 plate의 전체에 걸쳐 활발히 자라고 있지만 실험군의 경우 군사가 퍼지는 것에 제한을 받고 있다.

마. 백목병 발생 봉군에 대한 Albofix 처리 실험 결과

실험군 및 대조군의 선발: 실험군과 대조군은 수원시 및 인근에 위치한 3군데의 고정 양봉장(송죽동 소재, 이목동 소재, 의왕시 초평리 소재)에서 선발하였으며, 각 양봉장마다 6개의 백목병 발생 봉군을 확인하고, 각 3개의 실험군 및 3개의 대조군을 선정하였다. 선발된 실험군 및 대조군은 실험기간 내에 별도의 약물처리 및 관리를 제외하였으며, 모두 일반적인 백목병 발생 봉군의 경우와 같이 약세군에서 선발하였다.

실험군과 대조군으로 선발한 각각의 벌통 속에는 대부분 5개의 소비가 있었고 각 소비마다 고유 번호를 부여하였으며, 각 소비 당 백목병이 발생한 애벌레의 수를 counting 하고 그 수를 기록 하였다.

Albofix의 처리: 먼저 각 양봉장 당 여분의 벌통을 3개 준비하여 벌통 내부를 깨끗이 청소한 후, Albofix를 멸균 증류수와 9 : 1로 혼합하여 도포하였다. 도포는 벌통의 뚜껑을 제외한 벌통의 내부 5면에 페인트 붓으로 골고루 칠을 하였고 완전히 건조시킨 후 사용하였다. 벌통의 5면은 5,737평방cm로 계산되었으며, 1벌통 당 약 180ml의 희석 Albofix가 도포되었다.

Albofix처리군(실험군)으로 선발한 3개 벌통의 모든 소비를 Albofix가 칠해져 있는 3개의 벌통으로 각각 옮긴 후 처음 일주일간은 매일 나머지 기간은 일주일 간격으로 병의 진행 상황을 관찰하고 기록하였다. 대조군 역시 같은 방법으로 관찰 기록하였다.

결과의 판정: 실험군 및 대조군 모두 각 소비 당 백목병이 발생한 애벌레의 수를 기준으로 백목병 발생의 증가 또는 감소를 판정하였다. 일반적으로 감염된 애벌레는 성충에 의해 제거되기에, 소비에서 감염된 애벌레의 소멸은 강균육성의 정도와 비례하나 본 실험에서는 각 봉군당 소비의 수가 5개인 봉군만을 선별하여 실시하였기에 강균육성의 정도를 동일하다고 가정하였다.

Albofix의 실험실적 결과에 따라, Albofix의 백목병 치료제로의 효능은 확인되었으며, 또한 간편하며 안전한 처리방법이 될 수 있는 공기 중 확산에 의한 용법의 가능성도 확인되었다. 현장 봉군에 대한 적용실험은 수원시 인근에 위치한 3군데의 고정 양봉장(송죽동 소재, 이목동 소재, 의왕시 초평리 소재)에서 수행되었으며, 선발된 백목병 발생 봉군을 대상으로 2002년 9월 8일부터 6주간 수행되었다.

벌통 당 180ml의 Albofix를 도포한 결과, 3개 양봉장에서 모두 처치 후 2-3일내에 현저한 치료효과를 관찰할 수 있었으며, 4-5일 후 각 소비에서 감염된 애벌레를 발견할 수 없었다. 감염된 애벌레의 제거는 물론 성충에 의해 이루어진 결과이나, 대조군의 경우 각 소비에서 감염된 애벌레가 최종 제거된 자연적 치료가 10월 중순 경인 5주-6주 후에 나타난

점을 비교하면 매우 우수한 치료효과가 있는 것으로 판정하였다 (Table 19; Table 20; Table 21).

한편, 현장 적용실험 중 실험자 및 직접 봉군들을 사양하였던 양봉인 모두에게서 Albofix 처리에 의한 봉군의 이상 징후를 발견하지 못하였으며, 처리군은 모두 백목병의 조기 치료에 따라 강군으로 쉽게 육성되었다. 그러나 봉군에 의한 Albofix의 소비내 축적여부 등은 육안에 의한 이상징후를 발견하지 못하였을 뿐 정밀한 분석은 실시하지 아니하였고, Albofix처리 후 생산된 벌꿀의 성분변화 역시 조사하지 아니하였다.

한편 2002년 8월에 강원지방에서 수행한 현장적용 실험은 봉군 당 Albofix 30m의 처치이었으며, 특기할 백목병 치료효과를 발견하지 못하였다(자료 미제시).

Table 19. Albofix처리 후 백묵병에 감염된 애벌레 수의 변화 (수원 송죽동 소재 양봉장)

구 분		감염 애 벌레의수	처 치 후 경과													
			1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	2주	3주	4주	5주	6주		
실 험 군	별통1	소비1	3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		소비2	2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		소비3	5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		소비4	0													
		소비5	0													
	별통2	소비1	9	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		소비2	8	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		소비3	13	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		소비4	0													
		소비5	0													
	별통3	소비1	5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		소비2	11	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		소비3	7	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		소비4	0													
		소비5	0													
대 조 군	별통1	소비1	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
		소비2	7	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-
		소비3	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		소비4	0													
		소비5	0													
	별통2	소비1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
		소비2	6	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-
		소비3	14	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	-	-
		소비4	0													
		소비5	0													
	별통3	소비1	5	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	-
		소비2	10	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-
		소비3	8	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-
		소비4	0													
		소비5	0													

감염애벌레수 (+++: 11 마리 이상, ++: 6-10마리, +: 1-5마리, -: 병이 사라짐)
 별통당 평균 3개의 소비에 백묵병 감염이 있었으며, 처치 후 2일째 되는 날 소비 내 백묵병 감염 애벌레의 수가 감소함이 관찰되었고, 3~4일을 전후하여 소비 내에 백묵병 감염 애벌레가 완전히 제거되었으며, 제거된 이후에도 관찰기간 동안 백묵병의 발병이 관찰되지 아니하였다. 이에 비하여 대조군에서는 실험기간 내 백묵병이 지속 또는 확산되고 있었으며, 10월초(5주 후)에 들어서 전반적 감소추세를 보이다가 10월 중순이후 대부분 자연 소멸되었다.

Table 20. Albofix처리 후 백묵병에 감염된 애벌레 수의 변화 (수원 이목동 소재 양봉장)

구 분		감염 애 벌레의수	처 치 후 경과												
			1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	2주	3주	4주	5주	6주	
실 험 군	별통1	소비1	15	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		소비2	6	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		소비3	35	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
		소비4	0												
		소비5	0												
	별통2	소비1	2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		소비2	15	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		소비3	5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		소비4	34	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		소비5	0												
	별통3	소비1	18	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		소비2	4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		소비3	9	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		소비4	0												
		소비5	0												
대 조 군	별통1	소비1	31	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
		소비2	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		소비3	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		소비4	0												
		소비5	0												
	별통2	소비1	28	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
		소비2	20	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+
		소비3	9	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
		소비4	0												
		소비5	0												
	별통3	소비1	11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
		소비2	20	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
		소비3	6	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
		소비4	0												
		소비5	0												

감염애벌레수 (+++: 11 마리 이상, ++: 6-10마리, +: 1-5마리, -: 병이 사라짐)
 별통당 평균 3개의 소비에 백묵병 감염이 있었으며, 처치 후 2-3일째 되는 날 소비 내 백묵병 감염 애벌레의 수가 감소함이 관찰되었고, 3~5일을 전후하여 소비 내에 백묵병 감염 애벌레가 완전히 제거되었으며, 제거된 이후에도 관찰기간 동안 백묵병의 발병이 관찰되지 아니하였다. 이에 비하여 대조군에서는 실험기간 내 백묵병이 지속 또는 확산되고 있었으며, 10월초(5주 후)에 들어서 전반적 감소추세를 보이다가 10월 중순이후 대부분 자연 소멸되었다.

Table 21. Albofix처리 후 백묵병에 감염된 애벌레 수의 변화 (의왕시 초평리 양봉장)

구 분		감염 애 벌레의수	치 치 후 경과												
			1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	2주	3주	4주	5주	6주	
실 협 군	별통1	소비1	15	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		소비2	10	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		소비3	14	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		소비4	0												
		소비5	0												
	별통2	소비1	14	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		소비2	13	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		소비3	18	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		소비4	0												
		소비5	0												
	별통3	소비1	2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		소비2	7	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		소비3	0												
		소비4	0												
		소비5	0												
대 조 군	별통1	소비1	14	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	-	-
		소비2	8	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-
		소비3	17	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+
		소비4	0												
		소비5	0												
	별통2	소비1	16	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
		소비2	14	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
		소비3	13												
		소비4	0												
		소비5	0												
	별통3	소비1	1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
		소비2	7	++	++	++	+++	++	++	++	++	+	+	-	-
		소비3	5	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	-	-
		소비4	0												
		소비5	0												

감염애벌레수 (+++: 11 마리 이상, ++: 6-10마리, +: 1-5마리, -: 병이 사라짐)

별통당 평균 3개의 소비에 백묵병 감염이 있었으며, 치치 후 2-3일째 되는 날 소비 내 백묵병 감염 애벌레의 수가 감소함이 관찰되었고, 3~4일을 전후하여 소비 내에 백묵병 감염 애벌레가 완전히 제거되었으며, 제거된 이후에도 관찰기간 동안 백묵병의 발병이 관찰되지 아니하였다. 이에 비하여 대조군에서는 실험기간 내 백묵병이 지속 또는 확산되고 있었으며, 10월초(5주 후)에 들어서 전반적 감소추세를 보이다가 10월 중순이후 대부분 자연 소멸되었다.

바. 결론

1. 본 연구는 항진균제로 알려진 Albofix의 꿀벌 백목병 치료제로써의 가능성을 실험한 것이다.
2. Albofix의 백목병 원인균 *Ascosphaera apis* 에 대한 성장저해는 Albofix함유배지를 통하여, Disc확산법에 의하여, 공기 중 확산법을 통하여 모두 유효함이 확인되었으며, 각기 약간씩 다른 양상의 성장저해 또는 괴사가 관찰되었고, 이 성장저해는 *A. apis*의 균주에 따른 상이성도 발견되었다.
3. Disc확산법에 따라 Albofix의 *A. apis*의 성장저해는 dose-effect manner를 보이는 것으로 시사되었다.
4. Albofix의 백목병 치료제로의 현장적용실험은 2002년 9월 봉군 당 Albofix 180 ml의 양으로 실시되었으며, 처리된 9봉군(45소비) 에서 처리 후 2-3일 내에 현저한 치료효과를 보이는 것으로 판정되었다.
5. 2002년 7월에 강원지방에서 수행한 현장적용실험은 봉군당 Albofix 30ml의 양으로 처리되었으며 특기할 백목병 치료효과를 관찰하지 못하였다.
6. Albofix의 유효성분분석 및 꿀벌에 의한 Albofix의 축적 그리고 Albofix처리 후 생산된 벌꿀의 성분분석 등의 후속실험이 요구된다.

제 3 항 *Ascosphaera apis*의 성장저해를 위한 항진균제 Albio K, Pure Wild Oil의 영향 (이 등, 2005)

가. 공시 균주, 공시 봉군의 사용

공시균주로 백목병의 원인균인 *Ascosphaera apis*는 미국표준균주보관소(ATCC; American Type Culture Collection)에서 표준균주를 분양받아 사용하였으며, 국내 균주는 경상북도 상주에서 채집된 백목병 시료를 본 연구실에서 배양하여, *Ascosphaera apis* SJW21 (single strain)과 *Ascosphaera apis* SJB21 (double strain)으로 분리, 동정하여 사용하였다. 또한, 농촌진흥청 잠사연구소에서 분리된 *Ascosphaera apis* A007균주를 분양 받아 사용하였다(남 등, 2004).

배양은 PDB(Potato Dextrose Broth, Difco), 또는 SAD+Y(Sabaraud's Dextrose Agar, added Yeast extract) media로 제조한 agar plate를 사용하였으며, 상온의 암처에서 2-4주간격으로 계대 배양하며 실험에 사용하였다.

나. 백목병 detection PCR에 의한 *A. apis*의 확인

실험에 사용한 *Ascosphaera apis*는 모두 실험실에서 배양하였으며, 배양된 균사체로부터 Protease K를 이용한 chromosomal DNA 순수분리 방법(윤, 1999)으로 DNA를 순수분리하였고, 본 연구실에서 제작한 백목병 specific primer를 사용하여 균주의 특이서열을 확인, *Ascosphaera apis* 로 동정한 후 실험에 사용하였다(이 등, 2004). 이 PCR 검출법을 약술하

면; *Ascospaera apis*의 18S rRNA gene(NCBI M83264)의 특이 서열 검출을 위한 primer 쌍 (*A. apis* 18S-SF, *A. apis* 18S-SR1)을 사용하였으며, PCR 반응산물은 994bp로 확인되었다. PCR의 조성은 template로는 *A. apis* chromosomal DNA 100 ng, 50 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg을 사용하였고, 각 50 pmol primer pairs, 2.5mM dNTPs, 1×PCR buffer, 1.5mM MgCl₂, 2.5U *Taq* polymerase를 사용하였으며 각 반응액의 총 volume은 50 μ l로 하였다. PCR의 수행은 Gene Amp PCR System 9600(Perkin Elmer, USA)을 사용하여 94°C, 3min의 pre-denaturation에 이어 94°C, 30sec; 60°C, 30sec; 72°C, 30sec을 30 cycle로 하였으며, 최종신장을 위하여 72°C, 5min post-polymerization을 수행하였다.

본 실험에서 사용한 *Ascospaera apis* strain은 *A. apis* 18S specific primer인 *A. apis* 18S-SF, *A. apis* 18S-SR1 primer로 PCR 검증을 거친 후에 사용하였다. 각 strain의 균사체로부터 chromosomal DNA를 isolation하여 PCR의 template로 사용하였고, PCR후 전기영동을 거쳐 *A. apis* 균주 특유의 994 bp의 PCR product를 확인하였다. 본 실험에 사용된 모든 *A. apis*균주는 이 PCR 검출법에서 양성(994 bp)으로 나타났으며, 이 후 계대배양을 통하여 본 실험에 사용되었다(Fig. 55).

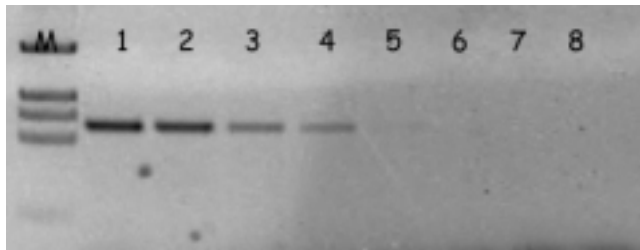


Fig. 55. Detection limit of initial template using *A. apis* specific primer pairs.

Each PCR was performed under standard condition with different quantities of initial template DNA. PCR detection of *Ascospaera apis* by using the specific primer pairs *A. apis* 18S-SF/ *A. apis* 18S-SR1. PCR product size is 994bp. Lane M is DNA size marker; lane 1. 100 ng template DNA of *Ascospaera apis* strain A0007; lane 2. 50 ng; lane 3. 10 ng; lane 4. 5 ng; lane 5. 1 ng; lane 6. 100 pg; lane 7. 10 pg; lane 8. 1 pg.

다. Albio K 및 Pure Wild Organo Oil에 의한 *Ascospaera apis*의 성장저해 측정

1) DISC 확산법에 의한 *Ascospaera apis*의 성장저해

Albio K의 수용성 배지를 통한 정균 또는 살균효과는 “감염병 실험실 진단지침-국립보건원 1996”의 디스크 확산법(disc diffusion method)에 따라 실험하였다. 이 디스크 확산법은 발육억제대의 크기가 최저발육 억제농도(minimal inhibitory concentration; MIC)와 상관관계를 유지하고 있다는 원리를 이용하는 시험법으로 임상적으로 알고 있는 내성균 및 감수성균들의 반응을 다양하게 조사함으로써 그 실용성이 입증된 방법이다.

PDB(Potato Dextrose Broth), 또는 SDA+Y(Sabaraud's Dextrose Agar, added Yeast

extract) media로 제조한 고체평판배지에 멸균된 filter-disc(지름 0.6 cm)를 4개씩 올려놓고, 각 Disc에 ALBIO K를 실험 조건에 따라 10 mg 또는 20 mg을 흡수시켰다. 또한 성장시킨 관형의 균사체를 원형으로 잘라(지름 0.5 cm) 멸균된 핀셋으로 Agar 평판배지위에 올려놓아 접종시켰다. 균사체와 약제가 포함된 Disc는 그 위치가 엇갈리도록 배치하였으며, plate는 parafilm으로 싸고 상온의 암처에서 정위치(plate의 뚜껑이 위로)로 배양하며 형태 관찰을 하였다. 일반적으로 *Ascospaera apis* double strain(SJB21)으로 실험을 수행하였으며, 대조군은 동일한 균사체를 동일한 방법으로 접종하고, Albio K를 첨가하지 않은 상태로 하여 배양, 관찰하였다.

실험에서 *Ascospaera apis* 균사체의 성장은 Albio K 함유 disc가 위치한 곳 부근에서는 저해되고 있는 것이 관찰되었으며, 10 mg처리군 (40 mg/plate)보다 20 mg처리군 (80 mg/plate)에서 그 영향이 더 미치는 것으로 보여지나(Fig. 56. C 와 E, D 와 F), 그 성장저해정도가 *A. apis*의 성장저해제로서 사용될 만큼 충분하지는 못하다고 판단되었다. Albio K의 공기 중 확산에 의한 *A. apis*의 성장저해 실험(Fig. 56)에서 강력한 효과를 보인 점과 비교하면, Albio K의 anti-fungal agent 유효성분은 수용성 물질이 아니며, 기화에 의해 확산되는 것으로 판단되며, 후자의 실험이 plate당 200 mg 이상을 사용하였을 때 강한 저해효과를 보인 것이 비추어 본 실험에서 사용된 plate당 80 mg은 적정하지 아니한 용량으로 판단되었다.

이러한 성장저해효과는 *Ascospaera apis*의 double 및 single형, 즉 strain SJB21, SJW21에서 모두 보여졌으나 SJW21에서는 SJB21보다 성장저해효과가 더 미약한 것으로 관찰되었다(Fig. 56. C 와 D, E 와 F).



A



B

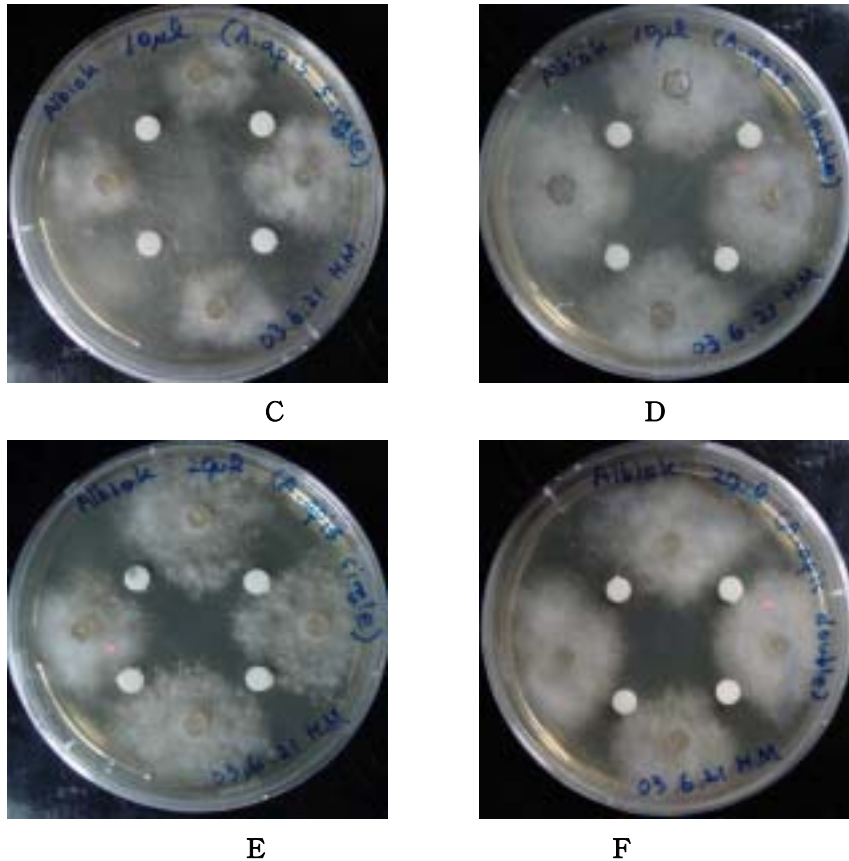


Fig. 54. The Growth-Inhibition of *Ascospaera apis* using Disc-Diffusion with different quantities of Albio K

Ascospaera apis was inoculated using 4 circle-form hyphae (each 5 mm in diameter) in one Potato Dextrose Broth (PDB) agar plate. Four Albio K-Filter Disc (each 6 mm in diameter including 10 or 20 mg Albio K) were located on one agar plate. Each plate was incubated in dark, room temperature until 2 weeks after inoculation.

Panel A. Control strain, *Ascospaera apis* strain SJW21 (Albio K untreated); Panel B. Control strain, *A. apis* SJB21 (Albio K untreated); Panel C. 40 mg Albio K was treated per plate. *A. apis* SJW21; Panel D. 40 mg Albio K treated per plate. *A. apis* SJB21; Panel E. 80 mg Albio K was treated per plate. *A. apis* SJW21; Panel F. 80 mg Albio K treated per plate. *A. apis* SJB21.

2) 공기 중 확산에 의한 *Ascospaera apis*의 성장저해

Potato Dextrose Broth (PDB) 고체평판배지의 plate 뚜껑 안쪽에 Albio K를 흡수시킨 지름 0.6 cm의 원형 Disc를 붙이고, 균사체로 접종된 *A. apis*의 Agar plate를 덮은 후, 균의 성장을 관찰하였다. Albio K의 양은 Disc 당 40 mg이 되도록 하였으며, plate 당 5개, 10

개, 15개씩 사용하여 최종 200 mg, 400 mg 600 mg이 되게 하였다. 고체평판배지에는 *Ascosphaera apis* double strain(SJB21)을 지름이 0.5 cm의 판형으로 잘라 4군데에 접종하였다. Plate는 parafilm으로 싸고 상온의 암처에서 배양하며 형태 관찰을 하였다. 대조군은 동일한 고체평판배지에 동일 크기, 위치에 균사체를 접종하고, 함께 배양하며 관찰하였다.

Albio K의 공기 중 확산에 의한 *A. apis*의 성장저해효과를 판정하기 위하여, plate 뚜껑 안쪽에 멸균된 filter Disc(지름 0.6 cm)를 고정시키고 각 disc에 Albio K를 각 40 mg 흡수시킨 것을 5개, 10개, 15개씩을 부착하여 *A. apis*의 성장을 관찰하였다. 각 plate당 Albio K는 각기 200 mg, 400 mg, 600 mg씩 처리된 것이며, 2주 후 관찰에서 *A. apis*의 성장은 대조군을 제외한 모든 실험군에서 확실히 저해된 것으로 판정되었다(Fig. 55).

Albio K를 처리한 실험군에서 성장된 균사체들은 모두 괴사한 것과 같은 형태가 관찰되었으며, 대조군의 경우 균사가 plate의 전체에 걸쳐 활발히 자라고 있으며 plate 상층부까지 균사가 확장되어 자라나고 있는 모습을 보여주고 있었던 것에 반하여 Albio K를 처리한 plate의 상층부로는 균사의 성장이 분명히 억제되고 있는 것이 확인되었다. 특히 600 mg의 처리군의 경우 실험 후 균사체의 계대배양이 모두 실패할 정도로 괴사됨이 확인되어 살진균제의 가능성을 시사하였다. 또한 plate당 200 mg, 400 mg, 600 mg의 ALBIO K의 처리량에 따라 각 실험군은 분명한 용량-반응 관계를 보임으로써 Albio K의 백목병 방제제로써의 가능성을 보다 크게 하였다 판단된다.

본 실험은 균사의 성장 억제 효과만을 관찰한 것이지만, 이는 수용성 배지를 통한 성장저해 실험 (Fig. 56)과 비교하면, 본 실험인 공기 중 확산방법이 Albio K의 보다 강력한 성장저해효과를 보여줄 수 있음이 확인되었다. 공기 중 확산에 의한 약제의 처리는 식품으로써 벌꿀을 생산하는 양봉에서 매우 요긴하며, 적절한 치료제가 없었던 백목병의 제어에서 보다 안전한 방법, 즉 벌통의 내벽면에서 Albio K의 도포 등을 제시할 수 있게 되었다.



A



B



C



D

Fig. 55. The Growth-Inhibition of *Ascospaera apis* by Air-Diffusion of Albio K
Ascospaera apis was inoculated using 4 circle-form hyphae (each 5 mm in diameter) in one Potato Dextrose Broth (PDB) agar plate. Albio K-Filter Disc (each 6 mm in diameter including 40 mg Albio K) were attached on the inner deck of plate. Each plate was incubated in dark, room temperature until 2 weeks after inoculation.

Panel A. Control strain, *Ascospaera apis* strain SJB21(left), strain SJW21 (Albio K untreated); Panel B. 200 mg Albio K was treated per each plate. *A. apis* strain

SJB21(left), strain SJW21; Panel C. 400 mg Albio K treated per plate. *A. apis* strain SJB21(left), strain SJW21; Panel D. 600 mg Albio K treated per plate. *A. apis* strain SJB21(left), strain SJW21.

3) Pure Wild Organo Oil에 의한 *Ascosphaera apis*의 성장저해

Potato Dextrose Broth (PDB)에 1.5% agar를 첨가하여 만든 고체평판배지에 *Ascosphaera apis* double strain을 지름이 0.5 cm가 되도록 잘라 4군데에 동일하게 접종하고, 멸균된 filter- disc(지름 0.6 cm) 4개를 plate의 뚜껑에 붙인 후, Pure wild organo oil을 각 20 μ l씩 흡수시키고, 뚜껑을 덮어 주었다. Plate는 parafilm으로 싸고 상온의 암처에서 배양하며 형태 관찰을 하였다. 대조군은 같은 크기의 균사체를 같은 위치에 접종하고, Pure Wild Organo oil을 첨가하지 않은 disc를 붙여놓고 동일하게 배양하며 관찰하였다.

Pure Wild Organo Oil(PWO)에 의한 *A. apis*의 성장저해 효과를 판정하기 위해서 멸균된 filter disc (지름 0.6 cm)를 plate 뚜껑 내부에 4개를 점착시켰으며, 각 disc에는 Pure Wild Organo oil을 각 10 μ l씩 4 곳에 흡수시켰다. *Ascosphaera apis* SJW21 strain을 지름이 0.5 cm가 되도록 잘라 4군데에 동일하게 접종하고, 배지는 SDA+Y를 사용하였다. 접종된 균사체는 *A. apis*의 single형 (strain SJW21), double형(strain SJB21)을 각각 사용하였다. 배양은 암처 상온배양으로 2주간 실시하였고, 배양 성장저해를 판정하였다.

Plate 당 40 μ l를 사용한 Pure Wild Organo oil에 의한 실험군의 성장저해효과는 매우 강력한 것으로 나타났으며 대조군과 달리 실험군의 균사는 성장한 흔적을 발견할 수 없었다. 이러한 강력한 성장저해효과는 strain SJW21, strain SJB21 모두에서 동일하게 나타났다 (Fig. 56).



A



B

Fig. 56. The Growth-Inhibition of *Ascospaera apis* strain by Air-Diffusion of Pure Wild Organo Oil (PWO)

Ascospaera apis was inoculated using 4 circle-form hyphae (each 5 mm in diameter) in one Potato Dextrose Broth (PDB) agar plate. PWO-Filter Disc (each 6 mm in diameter including 40 μ l PWO) were attached on the inner deck of plate. Each plate was incubated in dark, room temperature until 2 weeks after inoculation.

Panel A: Left, Control strain, *Ascospaera apis* strain SJW21 (PWO untreated); Right, 40 μ l PWO was treated per plate. Panel B: Left, Control strain, *Ascospaera apis* strain SJB21 (PWO untreated); Right, 40 μ l PWO was treated per plate. The growth of hyphae from inoculated *A. apis* strains was perfectly inhibited.

4) *A. apis* 성장저해를 위한 Pure Wild Organo Oil의 최소 요구량 측정

Pure Wild Organo oil의 사용에서 그 최소처리량을 알아보기 위하여 SDA+Y (Sabaraud's Dextrose Agar, added Yeast extract) media를 사용한 고체 평판배지에 멸균된 filter disc(지름 0.6 cm)를 plate 뚜껑 중앙에 배치하고 Pure Wild Organo oil을 20 μ l, 10 μ l, 5 μ l, 3 μ l, 1 μ l를 흡수시켰으며, Agar배지 표면 2군데에 *A. apis* double strain(strain A0007)을 접종하고 상온의 암처에서 배양하며 형태 관찰을 하였다. 대조군은 같은 크기의 균사체를 같은 위치에 접종하고, Pure Wild Organo oil을 첨가하지 않은 disc를 붙여놓고 동일하게 배양하며 관찰하였다.

Pure Wild Organo Oil에 의한 *A. apis*의 성장저해에서 그 최소 처리량을 알아보기 위하여 멸균된 filter disc(지름 0.6 cm)를 plate 뚜껑 내부의 중앙에 배치하고 Pure Wild Organo Oil을 각각 20 μ l, 10 μ l, 5 μ l, 3 μ l, 1 μ l를 처리하고, Agar배지 표면 2군데에 *A. apis* strain A0007을 접종하였다. 배지는 SDA+Y를 사용하였으며, 상온의 암처에 보관하여 2주간 배양하며 관찰하였다.

Pure Wild Organo Oil에 의한 *A. apis*의 성장저해효과는 1 μ l를 처리한 실험군에서도 나타났으며, 3 μ l 이상 PWO를 처리한 실험군에서는 균사의 성장을 완전히 저해한 것으로 판정되었다(Fig. 57).

Pure Wild Organo Oil (PWO)에 의한 *A. apis*의 성장저해는 매우 강력한 것으로 판단되며, 이는 PWO 특유의 향이 공기 중으로 전파되어 영향을 미친 것으로, 백목병의 저해제 및 치료제로의 사용에 매우 적합한 조건을 갖추었다고 사료된다. 또한 PWO에 의한 백목병 원인균의 성장제어는 실험에 사용된 모든 균주에서 균일한 효과를 보여주어 백목병의 제어제로 폭넓은 효과를 기대하게 하였다. 진기한 바와 같이 PWO는 식용의 허브추출물로써 이미 그 안전성은 입증된 것으로 판단된다. 그간 백목병에 대한 적절한 제어제를 제시하지 못하였던 주 이유는 강력한 살진균 약제의 경우 이를 백목병의 제어제로 사용한다면 벌꿀의 식품안전성을 보장할 수 없는 문제가 있었기 때문이었다. 본 연구에서 제시하고자 하는 PWO는 극히 소량으로 강력한 *A. apis*의 성장저해 효과를 보이고 있고, 또한 벌꿀 또는 꿀벌에 직접적인 접촉이 없는 공기 중 확산방식으로 효과를 보이며, 또한 약제의 원료가 식용인 허브추출물로 높은 안전성을 이미 확보하고 있다는 강점을 보이고 있다. 본 연구의 결과로써 백목병에 대한 제어제로 Albio K 및 PWO에 대한 용법 및 용량에 관한 연구가 시급히 수행될 것을 기대한다.

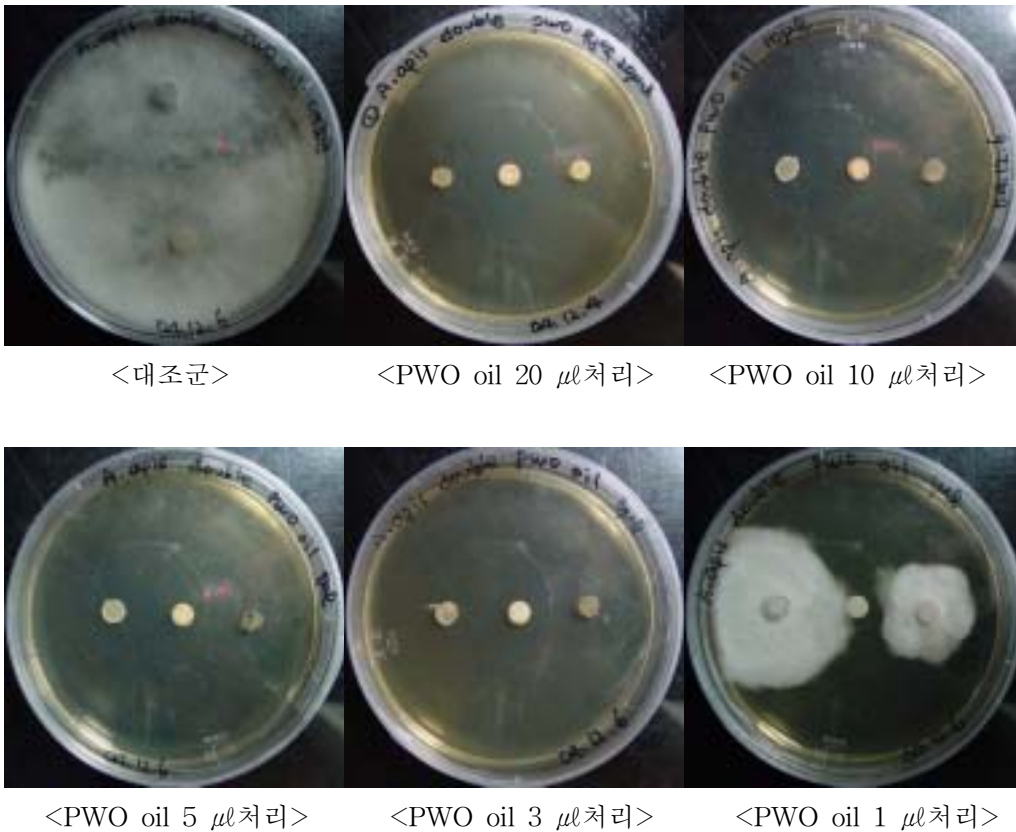


Fig. 57. The Growth-Inhibition of *Ascospaera apis* by Air-Diffusion of different quantities of Pure Wild Organo Oil (PWO)

Ascospaera apis was inoculated using 2 circle-form hyphae (each 5 mm in diameter)

in one Potato Dextrose Broth (PDB) agar plate. PWO-Filter Disc (6 mm in diameter including different volume of PWO) were attached on the inner deck of plate. Each plate was incubated in dark, room temperature until 2 weeks after inoculation.

Panel A: Left, Control strain, *Ascospaera apis* strain A0007 (PWO untreated); Center, 20 μ l PWO was treated per plate; Right, 10 μ l PWO treated per plate. Panel B: Left, 5 μ l PWO treated per plate; Center, 3 μ l PWO was treated; Right, 1 μ l PWO treated. The growth of hyphae from inoculated *A. apis* was perfectly inhibited by treatment of only 3 μ l PWO.

마. 결론

1. 본 연구는 항진균제로 추정되는 Albio K와 허브 추출물로서 의약품으로 사용되고 있는 Pure wild organio oil의 꿀벌 백목병 치료제로써의 가능성을 실험한 것이다.
2. Albio K의 백목병 원인균 *Ascospaera apis* 에 대한 성장저해는 40 mg, 80 mg을 Disc 확산법을 통하여 처리하였을 경우, 그 효과가 매우 미약한 것으로 나타났다.
3. Albio K의 백목병 원인균 *Ascospaera apis*에 대한 성장저해는 200 mg, 400 mg, 600 mg을 공기 중 확산법으로 처리하였을 경우, 그 성장저해 효과가 매우 유효한 것으로 확인되었다. Albio K의 처리에서 균사의 성장저해 또는 괴사가 관찰되었고, Albio K 처리량에 따른 *A. apis*의 성장저해는 dose-effect manner를 보이는 것으로 시사되었다.
4. Pure Wild Organio oil에 의한 백목병 원인균 *Ascospaera apis*에 대한 성장저해는 매우 강력한 것으로 나타났으며, 20 μ l 의 PWO처리에서 균사의 성장을 발견할 수 없었다. 이는 *A. apis*의 single형, double형에서 모두 확인되었다.
5. *A. apis*의 성장저해를 위한 Pure Wild Organio Oil의 최소용량실험에서 균사 성장을 완전히 저해하는 용량은 지름 8 cm의 plate의 경우 단지 3 μ l의 PWO처리라는 것이 확인되었다.
6. ALBIO K 및 Pure Wild Organio oil의 유효성분 분석과 꿀벌에 의한 축적, 처리 후 벌꿀 생산물의 성분분석 등의 후속 실험이 요구된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구 개발목표의 달성도

1. 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2002)	유럽부저병 진단용 PCR Kit의 개발 (실험실용, 꿀벌검사용)	- 16S DNA의 분리, 염기서열 결정 - 적합한 PCR primer의 선별, 제작 및 PCR - PCR 최적조건의 확립 - 인공감염 꿀벌시료에 의한 민감도 조사 - 인공감염 꿀벌시료에 의한 정확도 조사 - 질병발생 시료에 대한 민감도, 정확도 조사 - 대량생산 및 안정성 확립
	미국 부저병 진단용 PCR Kit의 개선 개발	- 적합한 PCR primer의 선별, 제작 및 PCR - PCR 최적조건의 확립 - 인공감염 꿀벌시료에 의한 민감도 조사 - 인공감염 꿀벌시료에 의한 정확도 조사 - 질병발생 시료에 대한 민감도, 정확도 조사 - 대량생산 및 안정성 확립

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2003)	유럽 부저병 진단용 ELISA Kit의 개발 (실험실용, 꿀벌검사용)	- <i>M. pluton</i> 단백질로 면역원 제조: - BALB/c 마우스를 사용한 동물 면역 - 특이항체 생성 측정을 위한 면역확인 시험 - Hybridoma clone 개발: - 복수 생산 및 특이항체 순수분리 정제 - 정량법 개발: Sandwich ELISA법
	미국 부저병 진단용 ELISA Kit의 개발 (실험실용, 꿀벌검사용)	- <i>P. larvae</i> 단백질로 면역원 제조: - BALB/c 마우스를 사용한 동물면역 - 특이항체 생성 측정을 위한 면역확인 시험 - Hybridoma clone 개발: - 복수 생산 및 특이항체 순수분리 - 정량법 개발: Sandwich ELISA법

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (2004)	유럽 부저병 진단용 Rapid Kit의 개발 (현장용, 꿀벌검사용)	<ul style="list-style-type: none"> - 개발된 단클론항체의 다중적합성 실험 - Colloidal gold와 항체의 결합 - Immuno-chromatography (<i>M. pluton</i> 포자에 대한 monoclonal antibody를 이용한) Rapid kit의 제작 - Rapid kit의 특이도, 민감도 조사 - Rapid kit의 경시 안정성 조사 - 시제품 생산 및 제품화 연구 - 양봉현장 적용실험
	미국 부저병 진단용 Rapid Kit의 개발 (현장용, 꿀벌검사용)	<ul style="list-style-type: none"> - 개발된 단클론항체의 다중적합성 실험 - Colloidal gold개발 - Immuno-chromatography (<i>P. larvae</i> 포자에 대한 monoclonal antibody를 이용한) Rapid kit의 제작 - Rapid kit의 특이도, 민감도 조사 - Rapid kit의 경시적 안정성 조사 - 시제품 생산 및 제품화 연구 - 양봉현장 적용실험

2. 연구평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도(2002년)	○유럽부저병 진단용 PCR kit의 개발	50
	○미국부저병 진단용 PCR kit의 개발	50
2차년도(2003년)	○유럽부저병 진단용ELISA	50
	○미국부저병진단 ELISA kit의 개발	50
3차년도(2004년)	○유럽부저병 진단용 Rapid kit의 개발	50
	○미국부저병 진단용 Rapid kit의 개발	50
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> ○상기 6종의 진단용 kit의 개발 ○실용성 및 현장성을 평가 ○제품화 실적을 평가 	

3. 연구개발목표의 달성도

본 연구에서 3년 동안의 연구결과는 전체적으로 만족스럽게 달성하였다고 자평한다. 연구 종료 후, 현재까지 세부과제 모두는 연구개발 목표의 모든 부분을 달성하였으며, 성공적인 결과를 내었다고 확신한다.

주관 연구기관의 세부과제인 “유럽부저병 진단용 키트의 개발” 연구는 1차 년도에 유럽부저병 진단용 PCR kit의 개발을 성공적으로 수행하였으며, *Mellisococcus pluton*의 16S DNA를 분리하여 염기서열을 확인하였고, 확인된 염기서열을 바탕으로 특이 PCR primer를 선별하였다. PCR 반응의 최적 조건을 확립하고 인공감염 꿀벌시료로부터 특이 primer의 민감도와 정확도를 평가한 뒤, 질병발생 시료에 대한 민감도, 정확도를 조사하였다. 안전성이 입증된 PCR 진단키트를 대량생산, 제품화 하였다.

2차 년도에는 유럽부저병 진단용 ELISA kit를 개발하였으며, *Mellisococcus pluton*의 배양균을 아포화한 후 면역원으로 사용하여 마우스 단클론항체를 개발하고, 특이도와 역가를 확인하고 실험실적인 ELISA kit 개발에 성공하였으며 검출감도를 향상시켜 ELISA kit의 개발을 완료하였다.

3차 년도에는 유럽부저병 진단용 Rapid kit를 개발하였으며 Colloidal-gold와 mAb의 접합체를 제작하여 Immuno-chromatographic assay를 수행하였고, 결과에서 100%의 민감도와 특이도를 보이는 것을 확인하였다.

협동기관의 협동과제인 “미국부저병 진단용 키트개발”에서는 1차 년도에 미국부저병 진단용 PCR kit를 개발하였고, 이는 미국 부저병 원인균 *Paenibacillus larvae*의 16S DNA로부터 적합한 PCR primer를 선별하고, PCR 반응의 최적조건을 확립하였으며, 인공감염 꿀벌시료에 의한 민감도와 정확도가 확인되었다. 이를 통해 질병발생 시료에 대한 검사를 수행하였고, 민감도와 정확도가 조사되었으며, 안전성이 확립된 PCR 진단키트를 대량생산하여 제품화 하였다.

2차 년도에는 미국부저병 진단용 ELISA kit를 개발하였으며, *P. larvae* 관련 세균을 아포화 한 후, 이를 면역원으로 사용하여 마우스 단클론항체를 개발하고, 특이도와 역가를 확인하여 실험실적인 ELISA kit 개발에 성공하였으며 검출감도를 향상시켜 ELISA kit의 개발을 완료하였다.

3차 년도에는 미국부저병 진단용 Rapid kit를 개발하였고, 2차 년도에 개발한 단일클론항체를 Colloidal-gold와 결합시켜 gold-mAb 접합체를 제작하였고, Immuno-chromatographic assay를 수행하여 100%의 민감도와 특이도를 보이는 것을 확인하였다.

본 연구의 결과물은 (주)진클론사에서 시제품을 개발하였으며, 이는 농림부 주관의 “2004 농림과학기술대전” 우수기술전시회에서 전시되어 제품의 완성도를 확인하였다.

한편, 본 연구를 통하여 발표된 논문은 아래와 같으며, 총 7건이 게재되었다.

1. 백경찬, 양옥순, 정규희, 윤병수. 2002. *Paenibacillus larvae*에 대한 다클론 항체 및 그 응용. 한국응용곤충학회지. 41(1):49-53.
2. 양옥순, 권순환, 윤병수. 2002. *Paenibacillus larvae* 16S rDNA의 특이서열을 이용한 신속 검출법의 개발. 한국양봉학회지. 17(1): 21-32.
3. 이혜민, 하정순, 윤병수. 2003. Prevention and Control of Honey Bee's Chalkbrood Disease by Using Albifox, an Anti-fungal Agent. *Korean J. Apiculture* 18(2): 139-150
4. 이혜민, 하정순, 조용호, 남성희, 윤병수. 2004. PCR Detection Method of *Ascosphaera apis*, *Aspergillus flavus* for Rapid Identification of Fungal Disease in Honeybee. *Korean J. Apiculture*. 19 (2): 139-148
5. 이혜민, 하정순, 조용호, 김동수, 윤병수. 2005. 향진균제 ALBIO K와 Pure Wild Organo oil을 사용한 꿀벌 백묵병의 예방. *Korea J. Apiculture*. 20(1)
6. 이도부, 양옥순, 한상훈, 임윤규, 윤병수. 2004. Real-Time PCR을 이용한 미국 부저병 원인균인 *Paenibacillus larvae larvae*의 신속 진단. *Korea J. Apiculture*. 19(2): 97-108
7. 하정순, 이혜민, 김동수, 임윤규, 윤병수. 2005. A PCR Detection Method of *Melissococcus pluton* for Rapid Identification of European Foulbrood. *Korean J. Apiculture*. 20(1)

현재 2005년 11월 심사 완료, 심사 중 또는 준비과정에 있는 논문은 아래와 같다.

1. 이혜민, 윤병수. Rapid Identification of Fungal Disease in Honeybee; *Ascosphaera apis*, *Aspergillus flavus*, by Real-Time PCR
2. 이혜민, 윤병수. PCR Detection of Deformed Wing Virus Infection in Honeybees, In Korea.
3. 이도부, 윤병수. High-Speed PCR Detection of American Foulbrood Disease(AFB) Using Genespector Real-Time PCR.

그 외, 연구기간 내에 국내 학술대회에서 발표된 논문은 총 5건이며 아래와 같다.

1. 양옥순, 백경찬, 윤병수. 2001. PCR 및 면역학적 방법을 이용한 꿀벌 미국 부저병의 검출. International Meeting of the Microbiological society of Korea.
2. 이혜민, 임희영, 윤병수. 2002. *Paenibacillus larvae* 16S rRNA gene의 염기서열 비교, 분석. International Meeting of the Microbiological society of Korea.
3. 이혜민, 하정순, 이은정, 이도부, 한상훈, 오정균, 윤병수. 2004. Detection of *Ascospaera apis* using specific primers based on 18S rRNA gene. International Meeting of the Microbiological society of Korea.
4. 이혜민, 조용호, 하정순, 한상훈, 윤병수. 2005. D007. Rapid Identification of Fungal Disease in Honeybee; *Ascospaera apis*, *Aspergillus flavus*, by Real-Time PCR. International Meeting of the Microbiological society of Korea.
5. 하정순, 이혜민, 이도부, 조용호, 이은정, 한상훈, 오정균, 윤병수. 2004. A PCR Detection Method of *Melissococcus pluton* for Rapid Identification of European. International Meeting of the Microbiological society of Korea.
6. 하정순, 이도부, 이혜민, 한상훈, 윤병수. 2005. D004. Detection of *Melissococcus pluton*, *Paenibacillus alvei* and *Bacillus subtilis* by Multiplex PCR Analysis. International Meeting of the Microbiological society of Korea.

또한, 연구진행 과정 중 genbank에 등록된 염기서열은 총 2건이며, 다음과 같다.

1. Yoon, B. S. and Ha, J. S., 2005. *Melissococcus plutonius* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank accession No. **AY 862057**.
2. Yoon, B. S. and Ha, J. S., 2005. *Paenibacillus alvei* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank accession No. **AY 862058**

그 외, 2005년 제 20차 한국양봉학회 특별강연 및 학술발표대회에서 “유럽 부저병

(European Foulbrood)의 원인균, *Melissococcus pluton*의 PCR 진단법 개발 및 꿀벌 질병에 대한 통합 PCR검출법”을 주제로 발표경력이 있다.

종합하면, 본 연구과제의 연구개발 목표는 과제 종료시점인 현재까지 모든 부분에서 거의 완료되었으며, 내용도 매우 만족스러운 수준이다. 세부연구과제에서 계획되었던 년차별 연구결과에서 미완성되었던 부분들은 현재까지 지속적인 수정과 보완이 이루어졌으며, 거의 완성된 수준으로 과제를 종료할 수 있었다.

이는 위에 기술된 총 7건의 국내 학술지 발표논문과 5건의 국내 학술대회 발표 결과, 2건의 Genbank 등록 염기서열 및 양봉관련 특별 강연 발표결과에서 그 우수성을 입증하는 바이다.

제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

꿀벌 세균성질병에 대한 본 연구의 성과는 국내 양봉기술의 발전에 큰 기여를 할 수 있음을 확신한다. 국내에 만연하고 있는 꿀벌의 질병은 현재 수준에서는 신속하고 정확한 진단방법이 확립되지 않은 상태이며, 이로 인해 양봉산업에서는 생산성과 품질의 하락 등의 문제를 겪고 있다.

본 연구에서 도입된 선진 진단기술인 PCR 검색법, ELISA 검색법, Immuno-chromatography법은 성공적인 결과를 가져왔으며, 이는 다른 꿀벌의 질병, 진균성 및 바이러스성 질병의 검색법을 개발하는 것으로 확장시킬 수 있다. 이를 통해, 모든 꿀벌질병의 신속한 진단을 가능하게 하면 양봉산업에 미치는 효과는 매우 클 것이라 예상되어 진다. 본 연구에서 확립한 진단기술을 요약하면 다음과 같다.

- ① 미국부저병 원인균 *P. larvae*의 PCR 진단방법 확립
- ② 미국부저병 원인균 *P. larvae*의 Real-Time PCR 진단방법 확립
- ③ 미국부저병 원인균 *P. larvae*의 Rapid PCR 진단방법 확립
- ④ 미국부저병 원인균 *P. larvae*의 ELISA 진단방법 확립
- ⑤ 미국부저병 원인균 *P. larvae*의 Immuno-chromatography 진단방법 확립

- ⑥ 미국부저병 원인균 *M. pluton*의 PCR 진단방법 확립
- ⑦ 미국부저병 원인균 *M. pluton*의 Real-Time PCR 진단방법 확립
- ⑧ 미국부저병 원인균 *M. pluton*의 Rapid PCR 진단방법 확립
- ⑨ 미국부저병 원인균 *M. pluton*의 ELISA 진단방법 확립
- ⑩ 미국부저병 원인균 *M. pluton*의 Immuno-chromatography 진단방법 확립

위의 진단기술은 현재 거의 완성된 수준으로 확립되었으며, (주) 진클론에서 시제품을 개

발하였다. 향후 추가 야외 시험 과정을 거쳐 그 효능을 확실히 입증 받은 후, 양봉질병에 관한 국내 표준 현장 screening 진단법으로의 사용허가를 진행코자 한다. 이는 양봉산업에 크게 기여할 것이라 예상된다.

실제로, 현재 질병의 방제를 위한 방법으로 사용되어지는 항생제나 기타 안전성이 결여된 약제를 오/남용하는 것은 이들의 잔류성 때문에 저품질의 벌꿀로 평가되는 요인이 되고 있으며, 질병으로 인한 벌꿀 생산성의 감소는 매우 크다. 본 과제에서 확립된 꿀벌의 신속한 진단법을 바탕으로 꿀벌질병 전반에 대한 연구가 확장되어 수행되어 진다면 이러한 문제점들을 해결할 수 있는 방안이 될 것이며, 나아가 질병검사 전문기관을 양성하여 활성화 시킨다면 국내 양봉산업의 수준은 매우 발전되리라 기대된다.

본 과제의 성공으로 양봉농민들은 그들의 가축인 꿀벌(수의사법에 의하여 가축으로 지정됨)의 질병을 쉽게 의뢰 진단 또는 과학적 자가진단을 하는 것이 가능하게 되었으며, 이는 항생제의 남용을 막아 고품질 벌꿀을 생산하도록 할 것이며, 그 경제적 효과는 매우 클 것이라 기대 된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구과제의 개발결과는 다음과 같다.

제 1차년도에는 꿀벌 세균성질병 진단용 PCR kit의 제작을 목표로 하였다.

연구 결과로서 유럽 부저병 (European foulbrood)의 PCR detection 방법, Real-time PCR 진단법을 개발하였고 이는 민감성과 특이성이 우수하다는 것이 증명되었다. 또한 *M. pluton*, *P. alvei*와 *B. subtilis*의 Multiplex PCR과 Rapid PCR 진단법을 개발하여 혼합된 꿀벌 시료로부터 특이적으로 유럽 부저병 원인균을 검색할 수 있는 방법이 개발되었으며, 그 정확성은 확인되었다.

미국 부저병 (American Foulbrood disease)의 PCR 진단방법의 개발에서는 원인균인 *Paenibacillus larvae* 16S DNA를 사용한 PCR 진단 키트의 제조법, Real-Time PCR을 이용한 미국 부저병 원인균인 *Paenibacillus larvae subspecies larvae*의 신속 진단법 등이 개발되었고, 이 또한 정확성 특이성, 민감성이 여러 가지 결과로부터 입증된 바이다.

제 2차년도에는 꿀벌 세균성질병 진단용 ELISA kit의 제작을 목표로 하였다.

유럽부저병 원인균 *M. pluton*, 미국부저병 원인균 *P. larvae*의 spore에 대한 단일클론항체를 제작하였으며, 이를 통해 민감도 95.7%, 특이도가 100% 이상인 유럽부저병 진단용 ELISA kit 및 민감도 96.0%, 특이도가 100%인 미국부저병 진단용 ELISA kit을 개발하였다. 본 결과물은 한국양봉학회지에 게재 예정이다.

제 3차년도에는 꿀벌 세균성질병 진단용 Rapid kit의 개발을 목표로 하였으며, 2차 년도에 개발된 단일클론항체와 Colloidal-gold의 접합체를 제작하고, 이를 사용하여 민감도 87.0%, 특이도가 100% 이상인 유럽부저병 진단용 Rapid kit 및 민감도 92.0%, 특이도가 100%인 미국부저병 진단용 Rapid kit을 개발하였다. 본 결과물 역시 한국양봉학회지에 게재 예정이다.

본 연구과제의 수행결과로 꿀벌 질병 및 벌꿀 진단용 키트 6종은 다음과 같다.

- ① 유럽 부저병 진단용 PCR kit
- ② 미국 부저병 진단용 PCR kit
- ③ *M. pluton* spore 검출용 Sandwich ELISA kit
- ④ *P. larvae* spore 검출용 Sandwich ELISA kit
- ⑤ *M. pluton* spore 검출용 Rapid kit
- ⑥ *P. larvae* spore 검출용 Rapid kit

위의 6종 kit는 현재 시제품 개발완성의 단계까지 와있는 수준으로, 세균성 질병 원인균에

대한 PCR 진단 kit 및 ELISA 진단 kit의 개발은 꿀벌 질병에 대해 실험실적인 정확하고 신속한 진단을 가능하게 하였으며, 양봉현장에서 직접적으로 진단이 가능한 Rapid kit의 개발은 양봉인에게 보급하여 자가 진단의 정확성을 높여 치료제의 오용 및 남용을 방지하는 것으로 사용될 수 있게 하였다.

이러한 연구방법을 바탕으로 꿀벌 바이러스성 질병 (낭충봉아부패병, 마비병), 진균성 질병 (백목병, 석고병), 원생동물성 질병 (노제마병), 기생성 질병 (응애, 진드기) 등 다양한 꿀벌 질병에 대한 검색법을 확립한다면 양봉산업에 큰 파급효과를 미치리라 예상되어 진다. 각 질병의 원인균을 탐색하고 특이 서열을 이용한 PCR 진단법의 확립, 특이 항체를 제작하여 ELISA 진단법의 개발, 현장에서 양봉농민들이 직접 검사하여 빠른 결과를 확인할 수 있는 Rapid kit의 제작 등은 앞으로 수행되어야 할 연구 분야가 될 것이다.

새로운 PCR법 2종과 ELISA 및 Rapid kit에 사용되는 단클론항체 모두는 물질특허의 대상이며, 본 과제에 의해 개발된 kit는 모두 참여기업인 (주)진클론이 상품화를 진행해 나가게 될 것이다. 또한 실험실용 PCR kit 및 ELISA kit는 협력연구기관인 한국양봉협회의 양봉산물연구소 등에서 사용되게 될 것이며, Rapid kit는 현장의 양봉농민에게 직접 과학적 자가진단을 수행할 수 있는 현장용으로 해결의 좋은 예가 될 것이다.

제 6 장 참고문헌

- 백경찬, 양옥순, 정규희, 윤병수. 2002. *Paenibacillus larvae*에 대한 다클론항체 및 그 응용. 한국응용곤충학회지. 41(1):49-53.
- 양옥순, 권순환, 윤병수. 2002. *Paenibacillus larvae* 16S rDNA의 특이서열을 이용한 신속 검출법의 개발. 한국양봉학회지. 17(1): 21-32.
- 양옥순, 윤병수. 2001. Metalloprotease 및 16s rRNA 유전자 염기서열에 의한 미국부저병의 원인균 *Paenibacillus larvae*의 신속 PCR 검출법. 한국양봉학회지. 16:1-8
- 윤병수. 1999a. *Paenibacillus larvae*에 대한 PCR detection 방법의 개발. 분자생물학연구방법론 II. 경기대학교 출판부. p.42-47, p.32-41.
- 윤병수. 1999b. Chromosomal DNA의 순수분리. 분자생물학연구방법론 II. 경기대학교 출판부. p.157-165.
- 윤병수. 2001. 꿀벌의 전염병과 방제. 동계양봉대학교재: 최신양봉경영 (2001). 한국양봉과학연구소. p44~77.
- 이명렬. 2001. 꿀벌 질병의 발생현황과 대책. 시험 사업연구 보고. 농업과학기술원.
- 이혜민, 하정순, 윤병수. 2003. Prevention and Control of Honey Bee's Chalkbrood Disease by Using Albofix, an Anti-fungal Agent. *Korean J. Apiculture* 18(2): 139-150
- 이혜민, 하정순, 조용호, 남성희, 윤병수. 2004. PCR Detection Method of *Ascospheara apis*, *Aspergillus flavus* for Rapid Identification of Fungal Disease in Honeybee. *Korean J. Apiculture*. 19 (2): 139-148
- 이혜민, 하정순, 조용호, 김동수, 윤병수. 2005. 향진균제 ALBIO K와 Pure Wild Organo oil을 사용한 꿀벌 백목병의 예방. *Korea J. Apiculture*. 20(1)
- 이도부, 양옥순, 한상훈, 임윤규, 윤병수. 2004. Real-Time PCR을 이용한 미국 부저병 원인균인 *Paenibacillus larvae larvae*의 신속 진단. *Korea J. Apiculture*. 19(2): 97-108
- 하정순, 이혜민, 김동수, 임윤규, 윤병수. 2005. 유럽부저병의 신속 확인을 위한 *Melissococcus plutonious*의 PCR detection method. 한국양봉학회지. 20권 1호

Atkins, E.L.Jr., L.D. Anderson and E.A. Greywood. 1970. Research on the effect of pesticides on honey bees 1968-69. *Am. Bees. J.* 110: 387.

Alippi, A. M. 1991. A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera*, in Argentina. *J. Apic. Res.* 30:75-80. 1.

Allen, M. F., and B. V. Ball. 1993. The cultural characteristics and serological relationships of isolates of *M. plutonious*. *J. Apic. Res.* 2:80-88. 2.

Anderson, D. L. 1990. Pests and pathogens of the honeybee (*Apis mellifera*L.) in Fiji. *J. Apic. Res.* 29:53-59. 3.

Bamrick, J.F. 1964. Resistance to American Foulbrood in honey bees. V. Comparative pathogenesis in resistant and susceptible larvae. *J. Insect Pathol.* 6: 284-304.

Baczynska, A. Svenstrup, H. F. Fedder J. Birkelund, S. 2004. Development of real-time PCR for detection of *Mycoplasma hominis*. *BMC Microbiology* 35:1471-2180

Bailey, L. 1981. Honey bee pathology. *Annu. Rev. Entomol.* 13: 191-212.

Bailey, L. 1983. *M. plutonious*, the cause of European foulbrood of honeybees (*Apis* spp.). *J. Appl. Bacteriol.* 55:65-69. 5.

Bailey, L. 1985. *M. plutonious* and European foulbrood. *Bee World* 6:134-136

Bailey, L., and M. D. Collins. 1982. Reclassification of *Streptococcus pluton* (White) in a new genus *M. plutonious*. *J. Appl. Bacteriol.* 3:215-217.

Bakonyi, T. Derakhshifar, I. Grabensteiner, E. Nowotny, N. 2003. Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus* larvae in honey samples: comparison with isolation and biochemical characterization. *Appl Environ Microbiol.* 69:1504-1510

Cai, J., and M. D. Collins. 1994. Evidence for a close phylogenetic relationship between *M. plutonious*, the causative agent of European foulbrood disease, and the genus.

Enterococcus. Int. J. Syst. Bacteriol. 4:365-367.

Claudio R. Giles B. Lisa W. Gerard C. Concepcion R. A. Christine H. 2004. Detection and relative quantitation of Soil-borne cereal mosaic virus(SBCMV) and Polymyxa graminis in winter wheat using real-time PCR(TaqMan[®]). J. Virological Methods. 122:95-103

Dancer, B. N. and P. Chantawannakul. 1997. The protease of american foulbrood scales, J. Invert. Pathol. 70:79-87

Davidson, E.W. 1971. Ultrastructure of peritrophic membrane development and American Foulbrood disease pathogenesis in larvae of the worker honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Ph. D. thesis, The Ohio State University, Columbus, Ohio.

Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K., Bunn, H.F. 1990. Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:2725-2729.

Govan, V. Brozel, M. H. Allosopp, and S. Davison. 1998. A PCR Detection Method for Rapid Identification of *M. plutonious* in Honeybee Larvae. Appl. Envir. Microbio 64:1983-1985

Govan, V. A., M. H. Allosopp and S. Davison. 1999. A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*, Appl. Environ. Microbiol. 65:2243-2245.

Haseman, L. 1961. How long can spores of American foulbrood live *American Bee J.* 101: 298-299.

Holmes, D.S. and M. Quigley. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. 114, 193-197.

Hornitsky, M. A. Z., and S. C. Wilson. 1989. A system for the diagnosis of the major bacterial brood diseases of honeybees. J. Apic. Res. 28:191-195. 11.

Kilwinski J, Peters M, Ashiralieva A, Genersch E. 2004. Proposal to reclassify *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* DSM3615 comparative biochemical and genetic

study. *Bet Microbiol.* 104:31-42

Lauro, F. M. Favaretto, M. Covolo, L. Rassa, M. Bertoloni, G. 2003. Rapid detection of *Paenibacillus* larvae from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *Int J Food Microbiol.* 81:195-201

Lee, T. H. Chafets, D. M. Busch, M. P. Murphy, E. L. Quantitation of HTLV- I and II proviral load using real-time quantitative PCR with SYBR Green chemistry. *J. Clinical Virology.* 31:275-282

Lee, T. M. Kim, S. W. Lee, K. S. Jin, H. S. Koo, S. K. Jo, I. H. K, S. M. Jung, S. C. 2004. Quantitative analysis of SMN1 gene and estimation of SMN1 deletion carrier frequency in korean population based on real-time PCR. *J Korean Med Sci.* 19:870-873

Matheson, A. 1993. World bee health report. *Bee World* 74:176-212. 13.

Olsen, P. E, G. A. Grant, D. L. Nelson and W. A. Rice. 1990. Detection of american foulbrood disease of the honey bee using a monoclonal antibody specific to *Bacillus larvae* in an ELISA. *Can. J. Microbiol.* 36:732-735

Ratti, C. Budge, G. Ward, L. Clover, G. Autonell, C. Henry, C. 2004. Detection and realtive quantitation of Soil-borne cereal mosaic virus (SBCMV) and Polymyxa graminis in winter wheat using real-time PCR (TaqMan[®]). *J Virological Method.* 122:95-103

Sambrook J., Firtsch E.F. and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning 1.* Cold spring Harbor Laboratory Press, USA. 1.53-1.105.

Shimanuki, H., D. A. Knox, B. Furgala, D. M. Caron, and J. L. Williams. 1992. Diseases and pests of honey bees, p. 1083-1151. In J. Graham (ed.), *The hive and the honey bee.* Dadant and Sons, Hamilton, Ill. 16.

Shimanuki, H. and T. Lehnert. 1968. Ethylene oxide for the control of American Foulbrood in honey bees. *J. Econ. Ent.* 61: 1456.

Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpee and J.G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. Williams and Wilkinss.* 1070-1071.

Towbin, H., J.S. Staehelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350–4354.

Wilhelm J. Pingoud A. 2003. Real-time polymerase chain reaction. *ChemBioChem* 4:1120–1128

Walker, N.J. 2001. Real-Time and Quantitative PCR: applications to mechanism-based toxicology. *J. Biochem, Molecular Toxicology.* 15(3):121–127

Yoon, B. S. 1997a. *Paenibacillus larvae* 16s ribosomal RNA, partial sequence. *GenBank* accession U85263.

Yoon, B. S. 1997b. *Paenibacillus larvae* strain ATCC 25747 16s ribosomal RNA gene, partial sequence. *GenBank* accession U86605

Yoon, B. S. 1997c. *Paenibacillus larvae* strain pK4-5 16s ribosomal RNA gene, partial sequence. *GenBank* accession U86606.

Yoon, B. S. and Ha, J. S., 2005. *Melissococcus plutonius* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. *GenBank* accession No. AY 862057.

Yoon, B. S. and Ha, J. S., 2005. *Paenibacillus alvei* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. *GenBank* accession No. AY 862058